

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039356**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.01.18**

**(21)** Номер заявки  
**201891597**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.11.21**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)

---

**(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ К EGFR/c-Met АНТИТЕЛА**

---

**(31)** 61/728,912; 61/782,550; 61/809,541;  
61/864,717; 61/892,797

**(32)** 2012.11.21; 2013.03.14; 2013.04.08;  
2013.08.12; 2013.10.18

**(33)** US

**(43)** 2018.12.28

**(62)** 201590985; 2013.11.21

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

**(72)** Изобретатель:  
**Чжу Марк, Мурс Шери (US), Нейссен  
Йост, Паррен Пауль, Схюрман Янине  
(NL)**

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

**(56)** US-A1-20030194403  
WO-A2-2011110642  
US-A1-20100254989  
ARAN F. LABRIJIN et al. Species-specific  
determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-  
Arm exchange by affecting the noncovalent CH3-  
CH3 interaction strength, The Journal of Immunology,  
2011, Vol. 187, p. 3238-3246, p. 3239

---

**(57)** Биспецифические к EGFR и/или c-Met антитела и способы получения и применения молекул. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1 или HER1) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном c-ErbB1. EGFR является членом семейства человеческих рецепторов эпидермальных факторов роста (HER), которые представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK), включающего HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). Сигнализация EGFR инициируется связыванием лигандов, за которым следует индукция конформационного изменения, гомодимеризация или гетеродимеризация рецептора с другими членами семейства ErbB.

---

**B1**

**039356**

**039356  
B1**

### Область применения изобретения

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

### Предпосылки создания изобретения

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1 или HER1) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном с-ErbB1. EGFR является членом семейства человеческих рецепторов эпидермальных факторов роста (HER), которые представляют собой рецепторные тирозинкиназы (RTK), включающего HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4). EGFR-сигнализация запускается связыванием с лигандом, за которым следует индукция конформационного изменения, гомодимеризация или гетеродимеризация рецептора с другими членами семейства ErbB и трансавтофосфорилирование рецептора (Ferguson et al., *Annu Rev Biophys*, 37:353-73, 2008), в результате чего запускаются каскады трансдукции 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 вмешательства (Mendelsohn et al., *Oncogene*, 19:6550-6565, 2000; Grünwald et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 95:851-67, 2003; Mendelsohn et al., *Semin. Oncol.* 33:369-85, 2006). Как увеличение числа 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.*, 1:131 1-1318; 1995; Prewett et al., *Clin. Cancer Res.*, 4:2957-2966, 1998).

Эффективность терапии анти-EGFR 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 12 месяцев из-за обуславливающих резистентность путей (Riely et al., *Clin. Cancer Res.* 12:839-44, 2006).

с-Met кодирует трансмембранный рецептор тирозинкиназы. Впервые его обнаружили как протоонкоген в 1984 г., после того как было выявлено, что воздействие канцерогена приводило к появлению конститутивно активного слитного белка TPR-MET (Cooper et al., *Nature*, 311:29-33, 1984). Активация с-Met посредством его лиганда, фактора роста гепатоцитов (HGF), вызывает стимуляцию большого числа клеточных процессов, включая рост, подвижность, вовлечение в злокачественный процесс, метастазирование, эпителиально-мезенхимальное превращение, ангиогенез/заживление ран и регенерацию тканей (Christensen et al., *Cancer Lett.* 225:1-26, 2005; Peters and Adjei, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9:314-26, 2012). с-Met синтезируется в виде одноцепочечного белка, который протеолитически расщепляется на альфа-субъединицу массой 50 кДа и бета-субъединицу массой 140 кДа, которые соединены дисульфидной связью (Ma et al., *Cancer and Metastasis Reviews*, 22:309-325, 2003). с-Met структурно аналогичен другим мембранным рецепторам, таким как RON и Sea. Точная стехиометрия связывания HGF:с-Met неизвестна, но по существу считается, что две молекулы HGF связываются с двумя молекулами с-Met, что приводит к димеризации рецептора и аутофосфорилированию по тирозиновым остаткам 1230, 1234 и 1235 (Stamos et al., *The EMBO Journal*, 23:2325-2335, 2004). Также возможно независимое от лиганда аутофосфорилирование с-Met из-за амплификации гена, мутации или сверхэкспрессии рецептора.

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

ной 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, повышена экспрессия c-Met, амплификация c-Met или уровень единственного известного лиганда c-Met - 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 гефитинибу, ингибитору киназы EGFR, и показывали улучшенную выживаемость через путь Her3 (Engelman et al., *Science*, 316:1039-43, 2007). Это было дополнительно подтверждено по клиническим образцам, в которых у 9 из 43 пациентов с приобретенной резистентностью к эрлотинибу или гефитинибу проявилась амплификация c-Met по сравнению лишь с 2 из 62 пациентов без лечения. Четверо из девяти получавших лечение пациентов также приобрели активирующую EGFR мутацию T790M, что демонстрирует одновременные обуславливающие резистентность пути (Beat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 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, ингибирование данной пары в комбинации может ограничить потенциал активации компенсаторных путей, таким образом повышая общую эффективность. Комбинированные виды терапии, нацеленные на EGFR и c-Met, тестировали в клинических испытаниях Tarceva® (эрлотиниб) в комбинации с одновалентным антителом к c-Met при NSCLC (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 международных патентных публикациях № WO 2008/127710, WO 2009/111691, WO 2009/126834, WO 2010/039248, WO 2010/115551 и патентной публикации США № US 2009/0042906.

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 моноспецифические двухвалентные антитела могут приводить к кластеризации мембраносвязанных рецепторов и нежелательной активации сигнальных путей, расположенных ниже. Одновалентные антитела, имеющие полноразмерные тяжелые цепи (полуплечи), отличаются значительной сложностью и затратны в производстве.

Соответственно, существует потребность в дополнительных моноспецифических или биспецифических к EGFR и/или c-Met ингибиторах как для терапевтической, так и для диагностической целей.

#### **Изложение сущности изобретения**

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное биспецифическое к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (c-Met) антитело, содержащее:

первую тяжелую цепь (HC1), содержащую константный домен 3 HC1 (HC1 CH3) и варибельный участок 1 HC1 (VH1);

вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую константный домен 3 HC2 (HC2 CH3) и варибельный участок 2 HC2 (VH2);

первую легкую цепь (LC1), содержащую варибельный участок 1 легкой цепи (VL1); и

вторую легкую цепь (LC2), содержащую варибельный участок 2 легкой цепи (VL2),

причем VH1 и VL1 совместно образуют первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с EGFR,

VH2 и VL2 совместно образуют второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с c-Met,

HC1 содержит по меньшей мере одну замену в HC1 CH3, а HC2 содержит по меньшей мере одну замену в HC2 CH3, и замена в HC1 CH3 и замена в HC2 CH3 происходит по разным положениям аминокислотных остатков, если нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, причем антитело ингибирует фосфорилирование связанных с внеклеточными сигналами киназ 1 и 2 (ERK1/2) в клеточной линии NCI-H292, NCI-H1975 или SKMES-1 со значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере приблизительно в 10 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 20 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 30 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 40 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 50 раз меньше или по меньшей мере приблизительно в 60 раз меньше по сравнению со значением IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования ERK1/2 в клеточных линиях NCI-H292, NCI-H1975 или SKMES-1 при помощи смеси контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего тяжелую цепь 3 (HC3) и легкую цепь 3 (LC3), и контрольного однова-

лентного антитела к с-Met, содержащего тяжелую цепь 4 (HC4) и легкую цепь 4 (LC4), причем HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно, причем фосфорилирование ERK1/2 измеряют в цельноклеточных лизатах методом сэндвич-ИФА с применением антитела к фосфо-ERK1/2 в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела, связывающегося с не фосфорилированной и фосфорилированной ERK1/2, в качестве детекторного антитела.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, причем антитело ингибирует фосфорилирование протеинкиназы В (АКТ) по Ser473 в клеточной линии NCI-H1975 со значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере приблизительно в 70 раз меньше значения IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования АКТ по Ser473 в клеточной линии NCI-H1975 с помощью смеси контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего HC3 и LC3, и контрольного одновалентного антитела к с-Met, содержащего HC4 и LC4, причем HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно, причем фосфорилирование АКТ по Ser473 измеряют в цельноклеточных лизатах методом сэндвич-ИФА с применением антитела, связывающегося с не фосфорилированной и фосфорилированной АКТ, в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела к фосфорилированной по Ser473 АКТ в качестве детекторного антитела.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, которые связываются с EGFR в SEQ ID NO: 73 по остаткам EGFR K489, I491, K467 и S492 и с с-Met по остаткам PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID NO: 238) и FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID NO: 239).

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, которые ингибируют рост клеток NCI-H292 или NCI-H1975 со значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере приблизительно в 300 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 400 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 500 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 600 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 700 раз меньше или по меньшей мере приблизительно в 800 раз меньше значения IC<sub>50</sub> для ингибирования роста клеток NCI-H292 или NCI-H1975 цетуксимабом, когда клетки NCI-H292 или NCI-H1975 выращивают в условиях с низким прикреплением.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, которые ингибируют рост опухоли из экспрессирующих HGF клеток SKMES-1 у мышей SCID Beige с процентным (%) значением Т/С на 36 сутки, которое по меньшей мере в 500 раз меньше по сравнению с цетуксимабом, при введении биспецифического антитела и цетуксимаба в дозе 20 мг/кг.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, в которых HC1 CH3 содержит замену K409R или F405L, а HC2 CH3 содержит замену K409R или F405L, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, содержащие некоторые последовательности тяжелой и легкой цепей CDR, VH1, VL1, VH2, VL2, HC1, LC1, HC2 и LC2.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ получения выделенного биспецифического к EGFR/c-Met антитела, включающий:

объединение выделенного моноспецифического двухвалентного антитела к EGFR, содержащего две тяжелые цепи с SEQ ID NO: 199 и две легкие цепи с SEQ ID NO: 200, а также выделенного моноспецифического двухвалентного антитела к с-Met, содержащего две тяжелые цепи с SEQ ID NO: 201 и две легкие цепи с SEQ ID NO: 202, в смесь с молярным соотношением приблизительно 1:1;

введение в смесь восстанавливающего агента;

инкубирование смеси в течение от приблизительно 90 мин до приблизительно 6 ч;

удаление восстанавливающего агента;

очистку биспецифического к EGFR/c-Met антитела, содержащего первую тяжелую цепь с SEQ ID NO: 199 и вторую тяжелую цепь с SEQ ID NO: 201, первую легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и вторую легкую цепь с SEQ ID NO: 202, причем первая тяжелая цепь с SEQ ID NO: 199 совместно с первой легкой цепью с SEQ ID NO: 200 образует первый связывающий домен, который специфически связывается с EGFR, а вторая тяжелая цепь с SEQ ID NO: 201 совместно со второй легкой цепью с SEQ ID NO: 202 образует второй связывающий домен, который специфически связывается с с-Met.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело настоящего изобретения и фармацевтически при-

емлемый носитель.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего рак, который включает введение терапевтически эффективного количества биспецифического к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения нуждающемуся в лечении пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ ингибирования роста или пролиферации клеток, экспрессирующих EGFR и/или с-Met, который включает приведение клеток в контакт с биспецифическим антителом настоящего изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ ингибирования роста и метастазирования экспрессирующей EGFR и/или с-Met опухоли или раковых клеток у субъекта, который включает введение субъекту эффективного количества биспецифического антитела настоящего изобретения для ингибирования роста или метастазирования экспрессирующей EGFR и/или с-Met опухоли или раковых клеток.

#### Краткое описание чертежей

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 в SEQ ID NO: 18. Некоторые варианты включают повышающие температурную стабильность замены L17A, N46K и E86I (нумерация остатков соответствует Tencon SEQ ID NO: 1).

Фиг. 2. Выравнивание последовательности каркаса Tencon27 (SEQ ID NO: 99) и библиотеки TCL14 (SEQ ID NO: 100), имеющей рандомизированную альтернативной поверхность C-CD-F-FG. Остатки петли заключены в прямоугольники. Над последовательностями указаны петли и тяжи.

Фиг. 3. Выравнивание последовательности доменов FN3, связывающихся с с-Met. Петля C и тяж CD, а также петля F и тяж FG заключены в прямоугольники и охватывают остатки 29-43 и 65-81.

Фиг. 4. Ингибирование фосфорилирования с-Met в клетках NCI-H292, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домен FN3, и стимулированных HGF. Наблюдали существенное увеличение эффективности биспецифической к EGFR/с-Met молекулы (ECB1) по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с с-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 с-Met в клетках, предварительно обработанных моноспецифическими или биспецифическими молекулами, содержащими домен FN3. В клеточных линиях с высокими уровнями экспрессии EGFR, NCI-H292 (фиг. 5А) и H596 (фиг. 5В) моноспецифические или биспецифические молекулы антител к EGFR, содержащих домен FN3, в равной степени могут эффективно уменьшать фосфорилирование EGFR. В клеточных линиях с низким уровнем экспрессии EGFR относительно с-Met, NCI-H441 (фиг. 5С) биспецифические к EGFR/с-Met молекулы повышают эффективность ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению только с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с EGFR. В клеточных линиях с низким уровнем экспрессии с-Met относительно EGFR, NCI-H292 (фиг. 5D) и H596 (фиг. 5E) ингибирование фосфорилирования с-Met существенно усиливалось с биспецифической к EGFR/с-Met молекулой по сравнению только с 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 к 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 к EGFR/с-Met молекулы в течение 6 или 72 ч. Все молекулы существенно снижали фосфорилирование с-Met, EGFR и ERK через 6 и 72 ч, причем степень ингибирования зависела от аффинности доменов FN3 к EGFR и/или с-Met. Биспецифические молекулы создавали 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 (сверху) и в опухоли (снизу) биспецифических к EGFR/с-Met молекул с различными значениями аффинности, связанных с альбумин-связывающим доменом (ABD), показано через 6 ч (слева) и 72 ч (справа) после интраперитонеального (и/п) введения. Через 6 ч после введения накопление в опухоли было максимальным у мышей, получавших биспецифическую молекулу, в которой удерживается домен FN3, связывающийся с EGFR (17v2), со средней аффинностью, или домен, связывающийся с EGFR (83v2), с высокой аффинностью. Биспецифические молекулы, в которые включены домены FN3, связывающиеся с EGFR или с-Met, со средней или высокой аффинностью, были следующими: 83v2-A5-ABD (ECB18; высокая/средняя для EGFR/с-Met) 83v2-A3-ABD (ECB38; высокая/высокая) 17v2-A5 (ECB28; средняя/средняя) 17v2-A3-ABD (ECB39; средняя/высокая). На фиг. 7 3v2 обозначает p54AR4-83v2; 17v2 обозначает p53A1R5-17v2; A3 обозначает p114AR7P94-A3 и A5 обозна-

чает p114AR5P74-A5.

Фиг. 8. Ксенотрансплантаты опухоли H292-HGF имплантировали мышам SCID Beige. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 80 мм<sup>3</sup>, мышам три раза в неделю вводили биспецифические к EGFR/с-Met молекулы (25 мг/кг) или носитель PBS. Все биспецифические молекулы уменьшали рост опухоли, причем ингибирование роста опухоли (TGI) зависело от значений аффинности молекул к с-Met и EGFR (высокая EGFR - высокая с-Met соответствует p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); высокая EGFR - средняя с-Met соответствует p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); средняя EGFR - высокая с-Met соответствует p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); средняя EGFR - средняя с-Met соответствует p53A1R5-17-p114AR5P74-A5 (ECB28)).

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

Фиг. 10. Ксенотрансплантаты опухоли SKMES-HGF имплантировали мышам SCID Beige и проводили разные виды терапии. Противоопухолевая активность терапии показана как изменение размера опухоли (мм<sup>3</sup>) с течением времени. Биспецифическое к EGFR/с-Met антитело EM1-mAb вводили интраперитонеально (и/п) дважды в неделю в дозе 20, 5 или 1 мг/кг; цетуксимаб вводили и/п дважды в неделю в дозе 20 мг/кг. Стрелки на фигуре показывают дни введения. Числа после антител указывают на введенную дозу.

Фиг. 11. Ксенотрансплантаты опухоли HCC827 имплантировали бестимусным мышам, и мыши получали лечение эрлотинибом или EM1-mAb в указанных дозах. EM1-mAb вводили дважды в неделю, а эрлотиниб - один раз в сутки в течение четырех недель. Стрелки на фигуре показывают дни введения. Противоопухолевая активность терапии показана как изменение размера опухоли (мм<sup>3</sup>) с течением времени.

Фиг. 12. Ксенотрансплантаты опухоли SNU-5 имплантировали мышам CB17/SCID, и мыши получали лечение цетуксимабом 10 мг/кг или EM1-mAb 10 или 1 мг/кг. Антитела вводили дважды в неделю в течение четырех недель. Стрелки на фигуре показывают дни введения. Противоопухолевая активность терапии показана как изменение размера опухоли (мм<sup>3</sup>) с течением времени.

Фиг. 13. Ксенотрансплантаты опухоли H1975-HGF имплантировали бестимусным мышам, и мыши получали лечение 10 мг/кг цетуксимаба, 10 мг/кг EM1-mAb, 50 мг/кг эрлотиниба, 15 мг/кг афатиниба или комбинацией 10 мг/кг EM1-mAb и 15 мг/кг афатиниба. Антитела вводили дважды в неделю, а низкомолекулярные соединения - один раз в сутки в течение трех недель. Стрелки на фигуре показывают дни введения. Противоопухолевая активность терапии показана как изменение размера опухоли (мм<sup>3</sup>) с течением времени.

Фиг. 14. Ксенотрансплантаты опухоли HCC827-ER1 имплантировали бестимусным мышам, и мыши получали лечение 10 мг/кг EM1-mAb, 25 мг/кг эрлотиниба или комбинацией двух препаратов. EM1-mAb вводили дважды в неделю, а эрлотиниб вводили один раз в сутки в течение 19 дней. Стрелки на фигуре показывают дни введения. Противоопухолевая активность терапии показана как изменение размера опухоли (мм<sup>3</sup>) с течением времени.

Фиг. 15. Средние уровни EGFR и с-Met в лизатах опухолей, выделенных из ксенотрансплантатов опухоли H1975 HGF, имплантированных мышам SCID Beige, после однократного введения 20 мг/кг EM1-mAb. Уровни рецепторов показаны в % относительно контроля PBS в указанное время после лечения.

Фиг. 16. Ксенотрансплантаты опухоли H1975-HGF имплантировали бестимусным мышам, и мыши получали лечение 10 мг/кг EM1-mAb или 10 мг/кг варианта EM1-mAb IgG<sub>2</sub> V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, не связывающегося с рецептором Fc и не имеющего эффекторных функций. Антитела вводили дважды в неделю в указанные дни. Противоопухолевая активность терапии показана как изменение размера опухоли (мм<sup>3</sup>) с течением времени.

#### Подробное описание изобретения

Термин "домен фибронектина типа III (FN3)" ("домен FN3") в настоящем документе 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 разных 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 обозначают по номеру домена и названию белка, например 3-й домен FN3 тенасцина (TN3) или 10-й домен FN3 фибронектина (FN10).

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

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

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

Термин "специфически связывается" или "специфическое связывание" в настоящем документе относится к способности домена FN3, биспецифического агента, который специфически связывается с EGFR и с-Met, или биспецифического к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения связываться с заданным антигеном с константой диссоциации ( $K_D$ ) приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М или менее, например, приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М или менее или приблизительно  $1 \times 10^{-13}$  М или менее. Как правило, домен FN3, биспецифический агент, который специфически связывается с EGFR и с-Met, или биспецифическое к EGFR/с-Met антитело настоящего изобретения связывается с заданным антигеном (т. е. EGFR или с-Met) с  $K_D$ , который по меньшей мере в десять раз меньше его  $K_D$  для неспецифического антигена (например, BSA или казеина), что измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью, например, прибора Proteon (BioRad). Таким образом, биспецифическая к EGFR/с-Met молекула, содержащая домен FN3, биспецифический агент, который специфически связывается с EGFR и с-Met, или биспецифическое к EGFR/с-Met антитело настоящего изобретения специфически связывается с каждым EGFR и с с-Met с аффинностью связывания ( $K_D$ ) по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М или менее, например, приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М или менее или приблизительно  $1 \times 10^{-13}$  М или менее. Однако биспецифическая к EGFR/с-Met молекула, содержащая домен FN3, биспецифический агент, который специфически связывается с EGFR и с-Met, или биспецифическое к EGFR/с-Met антитело настоящего изобретения, которое специфически связывается с заданным антигеном, может обладать перекрестной реактивностью к другим родственными антигенам, например к одному и тому же заданному антигену других видов (гомологам).

Термин "библиотека" в настоящем документе относится к группе вариантов. Библиотека может состоять из вариантов полипептида или полинуклеотида.

Термин "стабильность" в настоящем документе 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 с-Met.

Термин "рецептор эпидермального фактора роста" или "EGFR" в настоящем документе относится к человеческому EGFR, также известному как HER1 или ErbB1 (Ullrich et al., Nature, 309:418-425, 1984), с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 73, и по номеру доступа NP 005219 в GenBank, а также ее вариантами, которые встречаются в естественных условиях. Такие варианты включают хорошо известный EGFRvIII и другие варианты альтернативного сплайсинга (например, определенный под номером P00533-1 в SwissProt (дикий тип, идентичный SEQ ID NO: 73 и NP 005219), P00533-2 (F404L/L405S), P00533-3 (628-705: CTGPGLEGCP...GEAPNQALLR→PGNESLKAML...SVIITASSCH и 706-1210 делеция), P00533-4 (C628S и 629-1210 делеция), варианты GlnQ98, R266, K521, I674, G962 и P988 (Livingston et al., NIEHS-SNPs, Environmental Genome Project, NIEHS ES15478), T790M, L858R/T790M и del (E746, A750)).

Термин "лиганд EGFR" в настоящем документе охватывает все (например, физиологические) лиганды для EGFR, включая EGF, TGF $\alpha$ , гепарин-связывающий EGF (HВ-EGF), амфирегулин (AR) и эпирегулин (EPI).

Термин "эпидермальный фактор роста" (EGF) в настоящем документе относится к хорошо известному EGF человека из 53 аминокислот, имеющему аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 74.

Термин "рецептор фактора роста гепатоцитов", или "с-Met", в настоящем документе относится к с-Met человека с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 101, или по номеру доступа в GenBank NP 001120972, и ее природными вариантами.

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

В настоящем документе на взаимозаменяемой основе термины "блокирует связывание" или "ингибирует связывание" относятся к способности доменов FN3, биспецифической к EGFR/с-Met молекулы, содержащей домены FN3 настоящего изобретения, биспецифического агента, специфически связывающегося с EGFR и с-Met, или биспецифического к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения блокировать или ингибировать связывание лиганда EGFR, например EGF с EGFR и/или HGF с с-Met, и вклю-

часть как частичное, так и полное блокирование/ингибирование. Блокирование/ингибирование лиганда EGFR, например EGF с EGFR и/или HGF с с-Met, посредством доменов FN3 или биспецифической к EGFR/с-Met молекулы настоящего изобретения, содержащей домены FN3, биспецифического агента, специфически связывающегося с EGFR и с-Met, или биспецифического к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения частично или полностью снижает нормальный уровень сигнализации EGFR и/или сигнализации с-Met по сравнению со связыванием лиганда EGFR с EGFR и/или связыванием HGF с с-Met без блокирования или ингибирования. Домен FN3 или биспецифическая к EGFR/с-Met молекула, содержащая домены FN3, биспецифический агент, специфически связывающийся с EGFR и с-Met, или биспецифическое к EGFR/с-Met антитело настоящего изобретения "блокирует связывание" лиганда EGFR, например EGF с EGFR и/или HGF с с-Met, когда ингибирование составляет по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Ингибирование связывания можно измерить при помощи хорошо известных способов, например путем измерения ингибирования связывания биотинилированного EGF на экспрессирующих EGFR клетках A431, которые подвергали воздействию домена FN3, биспецифической молекулы, содержащей домены FN3, связывающихся с EGFR/с-Met, биспецифического агента, специфически связывающегося с EGFR и с-Met, или биспецифического к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения, с использованием FACS, а также с использованием способов, описанных в настоящем документе, или путем измерения связывания биотинилированного HGF с внеклеточным доменом с-Met с использованием хорошо известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

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

Термин "нейтрализует сигнализацию EGFR" в настоящем документе относится к способности доменов FN3, биспецифической к EGFR/с-Met содержащей FN3 молекулы, биспецифического агента, специфически связывающегося с EGFR и с-Met, или биспецифического к EGFR/с-Met антитела 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%.

Термин "сигнализация с-Met" в настоящем документе относится к трансдукции сигнала, индуцированной связыванием лиганда HGF с с-Met, что приводит к аутофосфорилированию по меньшей мере одного тирозинового остатка в с-Met. Как правило, по меньшей мере один тирозиновый остаток в положениях 1230, 1234, 1235 или 1349 после связывания HGF подвергается аутофосфорилированию.

Термин "нейтрализует сигнализацию с-Met" в настоящем документе относится к способности доменов FN3, биспецифической к EGFR/с-Met содержащей FN3 молекулы, биспецифического агента, специфически связывающегося с EGFR и с-Met, или биспецифического к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения ингибировать сигнализацию с-Met, индуцируемую HGF, по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

В настоящем документе на взаимозаменяемой основе термины "сверхэкспрессия", "сверхэкспрессируемый" и "сверхэкспрессирующий" относятся к раковой или злокачественной клетке, которая имеет на поверхности измеримо повышенные уровни EGFR и/или с-Met по сравнению с нормальной клеткой из ткани того же типа. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию EGFR и/или с-Met можно измерить, используя хорошо известные анализы, например ИФА, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию или радиоиммунный анализ на живых или лизированных клетках. Альтернативно или дополнительно, уровни молекул нуклеиновых кислот, кодирующих EGFR и/или с-Met, можно измерить в клетке, например, с помощью методик флуоресцентной гибридизации *in situ*, саузерн-блоттинга или ПЦР. Сверхэкспрессия EGFR и/или с-Met означает, что уровень EGFR и/или с-Met на поверхности клетки по меньшей мере в 1,5 раза выше по сравнению с уровнем нормальной клетки.

Термин "Tepson" в настоящем документе обозначает синтетический домен фибронектина типа III (FN3), имеющий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 и описанную в патентной публикации США № US 2010/0216708.

Термин "раковая клетка" или "опухолевая клетка" в настоящем документе обозначает раковую, предраковую или преобразованную клетку *in vivo*, *ex vivo* и в культуре клеток, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения, которые необязательно 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 мутация эндогенного гена. Преобразование/рак проявляется, например, в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли или ее подавлении у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т.п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3<sup>rd</sup> ed. 1994)).

Термин "вектор" означает полинуклеотид, способный к воспроизведению внутри биологической



системы или который можно переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, которые функционируют так, чтобы способствовать удвоению или сохранению этих 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.

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

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

Термин "комплементарная ДНК", или "кДНК", обозначает известный синтетический полинуклеотид, имеющий то же расположение элементов последовательности, что и в нативных зрелых разновидностях мРНК, со смежными экзонами и с удаленными вмещающимися интронами, присутствующими в геномной ДНК. Кодоны, кодирующие начальный метионин, могут присутствовать или не присутствовать в кДНК. кДНК можно синтезировать, например, путем обратной транскрипции или синтетической сборки генов.

"Синтетический", или "неприродного происхождения", или "искусственный" в настоящем документе относится к полинуклеотидной или полипептидной молекуле, не присутствующей в природе.

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".

Термин "биспецифическая к EGFR/c-Met молекула" или "биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3" в настоящем документе обозначает молекулу, содержащую домен FN3, связывающийся с EGFR, и отдельный домен FN3, связывающийся с c-Met, которые ковалентно связаны либо напрямую, либо 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.

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

Термин "смесь" в настоящем документе относится к образцу или препарату из двух или более доменов FN3, не связанных вместе ковалентной связью. Смесь может состоять из двух или более идентичных доменов FN3 или разных доменов FN3. Смесь, использованная в настоящем документе, также относится к образцу или препарату из двух или более одновалентных антител, которые являются одновалентными по отношению к EGFR и/или одновалентными по отношению к c-Met.

Термин "биспецифический агент, специфически связывающийся с EGFR и c-Met", в настоящем документе означает молекулу, содержащую первый домен, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен, специфически связывающийся с c-Met. Примером агента, специфически связывающегося с EGFR и c-Met, является биспецифическое антитело. Другим примером биспецифического агента, специфически связывающегося с EGFR и c-Met, является молекула, содержащая связывающийся с EGFR домен FN3, и отдельный домен FN3, связывающийся с c-Met. Биспецифический агент, специфически связывающийся с EGFR и c-Met, может быть образован из одного полипептида или более чем из одного полипептида.

Термин "биспецифическое антитело к EGFR/c-Met", или "биспецифическое к EGFR/c-Met антитело", в настоящем документе означает биспецифическое антитело, имеющее первый домен, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен, специфически связывающийся с c-Met. Домены, специфически связывающиеся с EGFR и c-Met, как правило, представляют собой пары VH/VL, а биспецифическое антитело к EGFR/c-Met является одновалентным в отношении связывания с EGFR и c-Met.

Предполагается, что термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулинов, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

Имуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изотипы IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ)

и лямбда ( $\lambda$ ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "фрагменты антитела" означает часть молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий сайт тяжелой цепи и/или легкой цепи, например участки тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность, участки легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность, переменный участок тяжелой цепи (VH) или переменный участок легкой цепи (VL). К фрагментам антител относятся фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмент F(ab)<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном участке; фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; доменный (dAb) фрагмент антитела (Ward et al. (1989), Nature, 341:544-546), состоящий из домена VH. Домены VH и VL могут быть сконструированы методами инженерии и связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конструкций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессированы в отдельных одноцепочечных конструктах антител, с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, например одноцепочечного Fv (scFv) или диатела; описаны, например, в международных публикациях РСТ № WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047. Данные фрагменты антител получают с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области, и проводят скрининг фрагментов на пригодность таким же образом, как и для полноразмерных антител.

Фраза "выделенное антитело" означает антитело или фрагмент антитела, по существу не содержащий других антител, имеющих разные значения антигенной специфичности (например, выделенное биспецифическое антитело, специфически связывающееся с EGFR и c-Met, по существу не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от человеческого EGFR и c-Met). Однако выделенное антитело, специфически связывающееся с EGFR и c-Met, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, например ортологами человеческого EGFR и/или c-Met, такими как EGFR и/или c-Met *Macaca fascicularis* (яванский макак). Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Переменный участок антитела состоит из "каркасного" участка, разделенного тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: (i) участки, определяющие комплементарность (CDR) - три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) - основаны на изменчивости последовательности (Wu и Kabat (1970), J. Exp. Med. 132:211-50, 1970; Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); (ii) "гипервариабельные участки", HVR или HV - три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3) - обозначают участки переменных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk Mol. Biol. 196:901-17, 1987). К другим терминам относятся IMGT-CDR (Lefranc et al., Dev. Comparat Immunol. 27:55-77, 2003) и "используемые остатки, определяющие специфичность" (SDRU) (Almagro Mol. Recognit. 17:132-43, 2004). В базе данных International ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлена стандартизованная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между границами CDR, HV и IMGT описано в публикации Lefranc et al., Dev. Comparat Immunol. 27:55-77, 2003.

"Остатки по Chothia" в настоящем документе представляют собой остатки антитела VL и VH с нумерацией в соответствии с Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-48, 1997).

"Каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой оставшиеся последовательности переменного участка, которые отличны от определяющих антигенсвязывающие сайты. Так как антигенсвязывающие сайты, как описано выше, могут определяться различными терминами, точная аминокислотная последовательность каркаса зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

"Гуманизованное антитело" означает антитело, в котором антиген связывающие сайты получены от видов, отличных от человека, а каркасы переменного участка получены от последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизованные антитела могут включать замены в каркасных участках, в результате чего каркас может не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или зародышевых генных последовательностей.

Термин "адаптированные для человека" антитела или "адаптированные для человеческого каркаса" (HFA) антитела означает гуманизованные антитела, адаптированные в соответствии со способами, описанными в патентной публикации США № US 2009/0118127. Адаптированные для человека антитела гуманизируют путем выбора человеческих каркасов-реципиентов на основе максимальных сходств CDR и FR, совместимости длины и сходства последовательности петель CDR1 и CDR2 и части петель CDR3 легкой цепи.

Термин "человеческое антитело" означает антитело, имеющее переменные участки тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константный участок, то константный участок также получен из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит переменные участки тяжелой или легкой цепи, которые "полу-

ченны из" последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные участки антитела получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перераспределенные гены иммуноглобулина. К таким системам относятся библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаговом дисплее и трансгенные животные, отличные от человека, например мыши, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. "Человеческое антитело" может содержать аминокислотные отличия по сравнению с человеческой зародышевой линией или перераспределенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, встречающимися в естественных условиях соматическими мутациями или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, "человеческое антитело" по меньшей мере приблизительно на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческой зародышевой линии или перераспределенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях "человеческое антитело" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализа человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000), или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов на фаговом дисплее, например, как описано в публикации Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO 2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены от видов, отличных от человека, не подходят под определение "человеческого антитела".

Выделенные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Человеческие антитела, хотя и полученные из последовательностей человеческого иммуноглобулина, могут быть созданы с использованием таких систем, как фаговый дисплей, включающий синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антитела, что приведет к получению антител, в естественных условиях не входящих в репертуар человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Термин "рекомбинантное антитело" в настоящем документе включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, например антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или из полученной из него гибридомы (дополнительно описана ниже), антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые включают сплайсинг генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* с помощью обмена плеч Fab.

Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе означает препарат молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одну специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания с двумя отдельными эпитопами.

Термин "по существу идентичный" в настоящем документе означает, что аминокислотные последовательности двух сравниваемых вариабельных участков антител идентичны или имеют "несущественные отличия". Несущественные отличия представляют собой замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в последовательности вариабельного участка антитела, не оказывающие отрицательного воздействия на свойства антитела. Аминокислотные последовательности, по существу идентичные последовательностям вариабельных участков, описанных в настоящем документе, находятся в рамках объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или выше. Процентное значение идентичности можно определить, например, путем попарного выравнивания с использованием настроек по умолчанию для модуля AlignX в Vector NTI v. 9.0.0 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Белковые последовательности настоящего изобретения можно использовать в качестве искомой последовательности при выполнении поиска в общедоступных или патентованных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Примерами программ, используемых для выполнения таких поисков, являются программы XBLAST или BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) или пакет GenomeQuest™ (GenomeQuest, г. Вестборо, штат Массачусетс, США) с использованием настроек по умолчанию.

Термин "эпитоп" в настоящем документе означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (например, полярных, неполярных или гидрофобных) поверхностных группировок остатков, например, боковых цепей аминокислот или полисахаридов, и они могут иметь специфические особенности трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационный пространственный блок. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в трехмерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Термин "в комбинации с" в настоящем документе означает, что два или более терапевтических

средства можно вводить субъекту в смеси, одновременно в качестве отдельных средств или последовательно в качестве отдельных средств в любом порядке.

Нумерация аминокислотных остатков в константном участке антитела в настоящем описании осуществляется в соответствии с каталогом ЕС, как описано в публикации Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

#### **Композиции настоящего изобретения**

В настоящем изобретении предложены биспецифические агенты, которые специфически связываются с EGFR и c-Met. В настоящем изобретении предложены полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие биспецифические агенты настоящего изобретения, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Моноспецифические и биспецифические к EGFR и/или c-Met содержащие домен FN3 связывающие молекулы.

Моноспецифические к EGFR содержащие домен FN3 связывающие молекулы.

В настоящем изобретении предложены домены фибронектина типа III (FN3), которые специфически связываются с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокируют связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, и, следовательно, могут широко применяться в терапии и диагностике. В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие домены FN3 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, ингибируют сигнализацию EGFR, 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.

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

Домены FN3 настоящего изобретения могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М в конкурентном анализе с использованием клеток A431 и обнаружения величины флуоресценции от связанного биотинилированного EGF с использованием конъюгата стрептавидин-фикоэритрин при 600 нм в клетках A431, инкубированных с доменами FN3 настоящего изобретения или без них. Примеры доменов FN3 могут блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  до приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, 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 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 таких же условий анализа.

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

Сигнализацию EGFR можно измерять различными известными способами, например путем измерения аутофосфорилирования рецептора по любому из тирозиновых остатков Y1068, Y1148 и Y1173 (Downward et al., *Nature*, 311:483-5, 1984) и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование можно обнаруживать хорошо известными способами, такими как анализ ИФА или вестерн-блоттинг, с использованием антитела, специфического 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, а также в анализах, описанных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М, например, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М, менее чем приблизи-

тельно  $1 \times 10^{-7}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М при измерении в клетках А431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

В одном варианте осуществления домен FN3 настоящего изобретения ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому остатку EGFR в положении 1173 со значением  $IC_{50}$  от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  до приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках А431 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 одном варианте осуществления домен FN3 настоящего изобретения связывает человеческий EGFR с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, например, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-13}$  М при определении методом поверхностного плазмонного резонанса или методом кинетического исключения (Kinexa), известным специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления домен FN3 настоящего изобретения связывается с человеческим EGFR с  $K_D$  в диапазоне от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М. Аффинность домена FN3 к EGFR можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions*, Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubu, 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 разных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) предпочтительно выполняют с использованием стандартизированных растворов белкового каркаса и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем документе.

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

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

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

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), причем X<sub>9</sub> представляет собой М или I; и петлю BC, содержащую последовательность X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 181); причем X<sub>1</sub> представляет собой А, Т, G или D; X<sub>2</sub> представляет собой А, D, Y или W; X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N; X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует; X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W; X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A; X<sub>7</sub> представляет собой А, F, G, H или D; X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L.

Домены FN3 настоящего изобретения, которые специфически связываются с EGFR и ингибируют аутофосфорилирование EGFR, могут содержать в качестве структурного элемента петлю FG, которая содержит последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180), причем X<sub>9</sub> представляет собой М или I. Такие домены FN3 могут дополнительно содержать петлю BC длиной 8 или 9 аминокислот, которая описана последовательностью X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 181), и могут ингибировать аутофосфорилирование EGFR со значением  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М или со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $1,8 \times 10^{-8}$  до приблизительно  $2,5 \times 10^{-6}$  М при измерении в клетках А431 с использованием 50 нг/мл человеческого EGF.

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

последовательность

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

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX<sub>9</sub>RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182) или

последовательность

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

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFENDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

причем X<sub>1</sub> представляет собой А, Т, G или D;

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

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

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

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

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

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

Моноспецифические к с-Met содержащие домен FN3 связывающие молекулы.

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

Домены FN3 настоящего изобретения связываются с с-Met с высокой аффинностью, ингибируя сигнализацию с-Met, и могут оказать благоприятный эффект в отношении специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами с-Met и иметь улучшенное проникновение в ткань 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.

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

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

Связывание лиганда, например HGF с с-Met, стимулирует димеризацию рецептора, аутофосфорилирование, активацию внутреннего рецептора, цитоплазматического тирозинкиназного домена и иницирование множества сигнальных путей трансдукции и трансактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла или деления. Ингибирование сигнализации с-Met может приводить к ингибированию 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 известными способами, например путем измере-

ния аутофосфорилирования рецептора по меньшей мере одного из тирозиновых остатков Y1230, Y1234, Y1235 или Y1349 и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов. Фосфорилирование можно обнаруживать, например, при помощи антитела, специфичного к фосфотирозину, с помощью анализа ИФА или вестерн-блоттинга. Анализы на тирозинкиназную активность описаны, например, в публикациях Panek et al., J. Pharmacol. Exp. Thera. 283:1433-44, 1997 и Batley et al., Life Sci. 62:143-50, 1998, а также в анализах, описанных в настоящем документе.

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления домен FN3, который специфически связывается с с-Met, содержит тяж С и петлю CD, содержащую последовательность DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub> (SEQ ID NO: 184),

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LPAPKNLVVSRTVEDSARLSWTAPDAAF DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>

AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub>PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

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

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

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

- X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;  
 X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;  
 X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K;  
 X<sub>16</sub> представляет собой E или D;  
 X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;  
 X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;  
 X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;  
 X<sub>20</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;  
 X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L;  
 X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y или L.

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

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

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

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

Таким образом, библиотека, разработанная на основе последовательности Tenson, может иметь рандомизированную петлю FG или рандомизированные петли BC и FG, например описанные ниже библиотеки TCL1 или TCL2. Петля BC Tenson имеет длину 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 Tenson имеет длину 7 аминокислот, таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tenson с диверсификацией по петле FG можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Дополнительного разнообразия в петлях библиотек Tenson можно достичь путем вставки и/или делеций остатков в петлях. Например, петли FG и/или BC можно расширить на 1-22 аминокислоты или уменьшить на 1-3 аминокислоты. Петля FG Tenson имеет длину 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител находится в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петлю FG можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела в 4-28 остатков. Например, петлю FG можно дополнительно диверсифицировать по длине, удлив петлю 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, показана на фиг. 1, и подробное создание таких библиотек описано в патентной публикации США № US 2013/0226834.

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), и такие варианты демонстрируют повышенную термическую стабильность. Примеры вариантов Tenson описаны в патентной публикации США № 2011/0274623 и включают Tenson27 (SEQ ID NO: 99), имеющую замены E11R, L17A, N46V и E86I по сравнению с Tenson в SEQ ID NO: 1.



Таблица 1

Домен FN3	Tencon (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 Tencon и другой FN3-последовательности можно рандомизировать по выбранным положениям остатков с использованием случайного или заданного набора аминокислот. Например, варианты библиотеки, имеющие случайные замены, можно создать 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, для получения всех 20 аминокислотных остатков и одновременного снижения частоты стоп-кодонов можно применять кодоны NNS. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, с использованием технологии Slonomics® ([http://www\\_sloning\\_com](http://www_sloning_com)). В данной технологии применяют библиотеку предварительно приготовленных двухцепочечных триплетов, которые выступают в качестве универсальных строительных блоков, достаточных для тысяч процессов синтеза генов. В библиотеке триплетов представлены все возможные комбинации последовательностей, необходимые для построения любой желаемой молекулы ДНК. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или с-Met, можно выделить путем получения FN3-библиотеки, такой как библиотека Tencon, с использованием cis-дисплея для лигирования фрагментов ДНК, кодирующих каркасные белки, с фрагментом ДНК, кодирующим RepA, для создания пула комплексов белок-ДНК, образованных после трансляции *in vitro*, причем каждый белок стабильно связан с кодирующей его ДНК (патент США № 7842476; Odegrip et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 2806-2810, 2004), и анализа библиотеки на специфическое связывание с EGFR и/или с-Met любым способом, известным в данной области или описанным в примере. Примеры хорошо известных способов, которые можно применять, представляют собой ИФА, сэндвич-ИФА 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 с-Met, по их способности блокировать связывание лиганда EGFR, например EGF, с EGFR, или связывание HGF с с-Met, а также по их способности ингибировать сигнализацию EGFR и/или с-Met с использованием способов, описанных в настоящем документе.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или с-Met, можно конструировать, используя любой домен FN3 в качестве матрицы для создания библиотеки и отбора в библиотеке молекул, специфически связывающихся с EGFR или с-Met, с использованием предложенных в ней способов. Примеры подходящих для использования доменов FN3 включают 3-й домен FN3 теназина 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 № 5643768). Библиотеки вариантов домена FN3 можно экспрессировать как слитные белки, отображающиеся на поверхности, например, любого подходящего бактериофага. Хорошо известны способы отображения слитных полипептидов на поверхности бактериофага (патентная публикация США № 2011/0118144; международная патентная публикация № WO 2009/085462; патенты США № 6969108; 6172197; 5223409; 6582915; 6472147).

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с EGFR или с-Met, можно модифицировать для улучшения их свойств, например, улучшения термической стабильности и обратимости термического свертывания и разворачивания. Для повышения очевидной термической стабильности

белков и ферментов использовали несколько способов, включая рациональную конфигурацию, основанную на сравнении с термически стабильными 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, растворимость или активность, снижать иммуногенность и минимизировать необходимость в холодной линии для производства. Остатки, в которые можно ввести замены для повышения термической стабильности Tencon (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.

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный домен FN3, который специфически связывается с c-Met и блокирует связывание HGF с c-Met, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32-49, 111-114, которая 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 (фиг. 1), имеют удлиненную петлю FG по сравнению с Tencon (SEQ ID NO: 1). Следовательно, остатки, соответствующие остаткам 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 86 в Tencon (SEQ ID NO: 1), представляют собой остатки 11, 14, 17, 37, 46, 73 и 91 в доменах FN3 EGFR, показанных на фиг. 1A и 1B, кроме домена FN3 с SEQ ID NO: 24, в которой соответствующие остатки представляют собой остатки 11, 14, 17, 38, 74 и 92 вследствие вставки одной аминокислоты в петлю BC.

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

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

Измерение стабильности белка и лабильности белка можно рассматривать как один или разные аспекты целостности белка. Белки чувствительны или "лабильны" к денатурации, вызванной нагревом, ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, изменениями осмолярности окружающей среды и pH при нахождении в жидком растворе, механическим сдвиговым усилием, вызванным фильтрованием через поры малого размера, ультрафиолетовым излучением, ионизирующим излучением, таким как гамма-облучение, химической или термической дегидратацией или любым другим воздействием или усилием, которые могут привести к разрушению структуры белка. Стабильность молекулы можно определить с 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. Способность белка сохранять конкретную трехмерную структуру можно изменять, кроме нагревания, путем изменения химической среды.

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

Химическую денатурацию аналогичным образом можно измерить различными способами. Химические денатурирующие вещества включают гидрохлорид гуанидина, тиоцианат гуанидина, мочевины, ацетон, органические растворители (ДМФ, бензол, ацетонитрил), соли (сульфат аммония, бромид лития, хлорид лития, бромид натрия, хлорид кальция, хлорид натрия); восстанавливающие агенты (например, дитиотреитол, бета-меркаптоэтанол, динитроотиобензол, а также гидриды, такие как борогидрид натрия), неионные и ионные моющие средства, кислоты (например, соляную кислоту (HCl), уксусную кислоту

( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), галогензамещенные уксусные кислоты), гидрофобные молекулы (например, фосфолипиды) и направленные денатурирующие вещества. Количественное определение степени денатурации может быть основано на потере функционального свойства, такого как способность связываться с молекулой-мишенью, или на физико-химических свойствах, таких как склонность к агрегации, открытие доступа к ранее недоступным растворителю остаткам, или на разрушении или образовании дисульфидных связей.

В одном варианте осуществления домен FN3 настоящего изобретения, связывающийся с EGFR или c-Met, демонстрирует стабильность, повышенную по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% или более по сравнению с таким же каркасом до конструирования, что измеряется путем применения гидрохлорида 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 можно создать в виде мономеров, димеров или мультимеров, например, как средство повышения валентности и, таким образом, avidности к связыванию молекулы-мишени или для создания би- или мультиспецифических каркасов, одновременно связывающих две или более разные 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  $(\text{GS})_2$ , (SEQ ID NO: 78),  $(\text{GGGG})_5$  (SEQ ID NO: 79),  $(\text{AP})_2$  (SEQ ID NO: 80),  $(\text{AP})_5$  (SEQ ID NO: 81),  $(\text{AP})_{10}$  (SEQ ID NO: 82),  $(\text{AP})_{20}$  (SEQ ID NO: 83) и  $\text{A}(\text{EAAAK})_5\text{AAA}$  (SEQ ID NO: 84) линкеры. 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 известно в литературе (Hallewell et al., *J. Biol. Chem.* 264, 5260-5268, 1989; Alftan et al., *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry*, 35, 109-116, 1996; патент США № 5856456).

Биспецифические агенты, специфически связывающиеся с EGFR и c-Met.

Биспецифические агенты настоящего изобретения, которые специфически связываются с EGFR и c-Met, могут обеспечить преимущество в отношении специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами EGFR и/или c-Met. Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на неожиданном обнаружении того, что биспецифические агенты, специфически связывающиеся с EGFR и c-Met, обеспечивают значительно повышенный синергический ингибиторный эффект по сравнению со смесью моноспецифических агентов, связывающихся с EGFR и c-Met. Молекулы можно настроить на конкретную аффинность в отношении как EGFR, так и c-Met для максимального повышения проникновения в опухоль и удержания в ней. Биспецифические агенты, специфически связывающиеся с EGFR и c-Met, обеспечивают более эффективное ингибирование сигнальных путей EGFR и/или c-Met и более эффективное ингибирование роста опухоли, чем цетуксимаб (Erbbitux®).

Биспецифические агенты, специфически связывающиеся с EGFR и c-Met, могут быть образованы любым полипептидом или мультимерным полипептидом, который содержит домен, связывающийся с EGFR, и домен, связывающийся с c-Met. Домены, связывающиеся с EGFR и c-Met, могут представлять собой антигенсвязывающие сайты антитела, пару VH/VL антитела или другой тип связывающейся молекулы, например, домен, основанный на домене фибронектина типа III (FN3), домене фибронектина типа IX (FN9) или любой их комбинации.

Полипептиды, связывающиеся с EGFR и c-Met, могут быть получены из существующих моноспецифических полипептидов, связывающихся с EGFR и c-Met, или их можно выделить *de novo*.

Содержащие домен FN3 биспецифические к EGFR/c-Met молекулы.

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

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, содержащие домен FN3, можно создать путем ковалентного связывания любого домена FN3, связывающегося с EGFR, и любого домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-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 c-Met.

В одном варианте осуществления первый домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, ингибирует индуцированное EGF фосфорилирование EGFR по тирозиновому

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

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

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

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

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

Первый домен FN3 в биспецифической к EGFR/c-Met молекуле настоящего изобретения может блокировать связывание EGF с EGFR со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  до приблизительно  $1,5 \times 10^{-7}$  М в анализе с использованием клеток A431 и с детекцией величины флуоресценции от связанного биотинилированного EGF с использованием конъюгата стрептавидин-фикоэритрин при длине волны 600 нм в клетках A431, инкубированных с первым доменом FN3 или без него. Первый домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы 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 к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения может блокировать связывание HGF с c-Met со значением  $IC_{50}$  в диапазоне от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  до приблизительно  $6 \times 10^{-8}$  М в анализе на детекцию ингибирования связывания биотинилированного HGF со слитным белком c-Met-Fc в присутствии второго домена FN3. Второй домен FN3 биспецифической к EGFR/c-Met молекулы может блокировать связывание HGF с c-Met по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению со связыванием HGF с c-Met в отсутствие второго домена FN3 при использовании одинаковых условий анализа.

Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула настоящего изобретения может ингибировать сигнализацию EGFR и/или c-Met по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по сравнению с уровнем сигнализации в отсутствие биспецифической к EGFR/c-Met молекулы 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 к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, содержащие первый домен FN3, специфически связывающийся с EGFR, и второй домен FN3, специфически связывающийся с c-Met, обеспечивают значительно более высокое синергичное ингибирование сигнализации EGFR и c-Met и пролиферации опухолевых клеток по сравнению с синергичным ингибированием, наблюдаемым в случае смеси первого и второго домена FN3. Синергичное ингибирование можно анализировать, например, путем измерения ингибирования фосфорилирования ERK посредством биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, и посредством смеси двух моноспецифических молекул, одна из которых связывается с EGFR, а другая - с c-Met. Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы 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 10000 раз меньше по сравнению со значением  $IC_{50}$  для смеси двух моноспецифических доменов FN3, что указывает на по меньшей мере 100-кратно более высокую эффективность биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, по сравнению со смесью двух моноспецифических доменов FN3. Примеры биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, могут ингибировать фосфорилирование ERK со значением  $IC_{50}$  приблизительно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее. Фосфорилирование ERK можно измерять с использованием стандартных способов и способов, описанных в настоящем до-

кументе.

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

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

первый домен FN3 содержит:

петлю FG, содержащую последовательность HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL (SEQ ID NO: 179) или последовательность LGSYVFENDVML (SEQ ID NO: 180),

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

второй домен FN3 содержит:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

последовательность:

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

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX<sub>9</sub>RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182) или

последовательность

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

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFENDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

причем в SEQ ID NO: 182 и 183:

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

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

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

X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;  
 X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;  
 X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;  
 X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D;  
 X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L;  
 X<sub>9</sub> представляет собой M или I.

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

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

причем X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V;  
 X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;  
 X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;  
 X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;  
 X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;  
 X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K;  
 X<sub>16</sub> представляет собой E или D;  
 X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;  
 X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;  
 X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;  
 X<sub>20</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;  
 X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L;  
 X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y, T или L.

Примеры биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домену FN3, содержат аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121 или 138-167.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ингибируют индуцированное HGF фосфорилирование c-Met по тирозиновому остатку c-Met в положении 1349 со значением IC<sub>50</sub> в диапазоне от приблизительно  $2,4 \times 10^{-8}$  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<sub>50</sub> в диапазоне от приблизительно  $2,3 \times 10^{-8}$  до  $9,5 \times 10^{-6}$  М, причем пролиферацию клеток индуцируют 10% FBS с содержанием 7,5 нг HGF;

связываются с EGFR с K<sub>D</sub> от приблизительно  $2 \times 10^{-10}$  до приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$  М или

связываются с c-Met с K<sub>D</sub> от приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  до приблизительно  $2,0 \times 10^{-8}$  М.

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

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

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

причем X<sub>1</sub> представляет собой D;

X<sub>2</sub> представляет собой D;

X<sub>3</sub> представляет собой P;

X<sub>4</sub> отсутствует;

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

X<sub>6</sub> представляет собой A;

X<sub>7</sub> представляет собой F;

X<sub>8</sub> представляет собой Y;

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

домен FN3, связывающийся с c-Met, с последовательностью

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>

AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub> PLSAEFTT (SEQ ID

NO: 186),

причем X<sub>10</sub> представляет собой W;

X<sub>11</sub> представляет собой F;

X<sub>12</sub> представляет собой F;

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

X<sub>14</sub> представляет собой G или S;

X<sub>15</sub> представляет собой S или K;

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

X<sub>17</sub> представляет собой V;

X<sub>18</sub> представляет собой N;

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

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

X<sub>21</sub> представляет собой S или K;

X<sub>22</sub> представляет собой I;

X<sub>23</sub> представляет собой P.

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

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

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

причем первый домен FN3 содержит последовательность

LPAPKNLVVVSX<sub>24</sub>VTX<sub>25</sub>DSX<sub>26</sub>RLSWDDPX<sub>27</sub>AFYX<sub>28</sub>SFLIQYQX<sub>29</sub>SEKVGEAIX<sub>30</sub>LTVPGSERSYDL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

второй домен FN3 содержит последовательность

LPAPKNLVVVSX<sub>34</sub>VTX<sub>35</sub>DSX<sub>36</sub>RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX<sub>37</sub>FX<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>GX<sub>41</sub>AIX<sub>42</sub>LTVPGSERSY

DLTGLKPGTEYVVNIX<sub>43</sub>X<sub>44</sub>VKGGX<sub>45</sub>ISPPLSAX<sub>46</sub>FTT (SEQ ID NO: 188);

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

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

X<sub>36</sub> представляет собой L или A;  
 X<sub>37</sub> представляет собой E или P;  
 X<sub>38</sub> представляет собой V или L;  
 X<sub>39</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>40</sub> представляет собой S или K;  
 X<sub>41</sub> представляет собой E или D;  
 X<sub>42</sub> представляет собой N или V;  
 X<sub>43</sub> представляет собой L или M;  
 X<sub>44</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>45</sub> представляет собой S или K;  
 X<sub>46</sub> представляет собой E или I.

В других вариантах осуществления биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3, содержит первый домен FN3, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и второй домен FN3, который содержит 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 к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, содержащие домен FN3, могут быть созданы с учетом конкретной аффинности в отношении EGFR и c-Met для максимального увеличения накопления в опухоли.

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

Биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу настоящего изобретения, содержащую домен FN3, можно создать путем ковалентного соединения домена FN3, связывающегося с EGFR, и домена FN3 настоящего изобретения, связывающегося с c-Met, с использованием известных способов. Домены FN3 можно соединить посредством линкера, например линкера, содержащего полиглицин, глицин и серин или аланин и пролин. Примеры линкеров включают (GS)<sub>2</sub>, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 79), (AP)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 80), (AP)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 81), (AP)<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 82), (AP)<sub>20</sub> (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)<sub>5</sub>AAA (SEQ ID NO: 84) линкеры. Применение встречающихся в естественных условиях, а также искусственных пептидных линкеров для соединения полипептидов в новые связанные слитные полипептиды 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 № 5856456). Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения можно соединить вместе С-концом первого домена FN3 к N-концу второго домена FN3 или С-концом второго домена FN3 к N-концу первого домена FN3. Любой домен FN3, связывающийся с EGFR, можно ковалентно соединять с доменом FN3, связывающимся с c-Met. Примеры доменов FN3, связывающихся с EGFR, представляют собой домены, имеющие аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 18-29, 107-110 или 122-137, а примеры доменов FN3, связывающихся с c-Met, представляют собой домены, имеющие аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 32-49 и 111-114. Домены FN3, связывающиеся с EGFR, которые нужно соединить с биспецифической молекулой, могут дополнительно содержать инициатор-метионин (Met) на своих N-концах.

Варианты биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, находятся в рамках объема настоящего изобретения. Например, в биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу, содержащую домен FN3, можно вводить замены, если полученный вариант будет сохранять аналогичную селективность и эффективность в отношении EGFR и c-Met по сравнению с исходной молекулой. Примеры модификаций представляют собой, например, консервативные замены, которые приводят к получению вариантов с характеристиками, которые аналогичны характеристикам исходной молекулы. Консервативными являются замены, проводимые внутри семейства аминокислот с родственной структурой их 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*, 2<sup>nd</sup> ed, WH Freeman and Co., 1981). Возможно введение в биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу, содержащую домен FN3, неконсервативных замен, которые включают замены аминокислотных остатков на другие классы аминокислот для улучшения свойств биспецифических молекул. Чтобы быстро определить возможность получения функционального гомолога в результате изменения аминокислотной последовательности полипептида или его фрагмента можно проанализировать 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 к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, содержащие домен FN3, можно создавать, например, в форме димеров или мультимеров в качестве средства повышения валентности и, таким образом, avidности связывания с молекулой-мишенью. Мультимеры можно создавать 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 отдельных домена FN3, которые являются по меньшей мере биспецифическими либо к EGFR, либо к c-Met, например, путем включения аминокислотного линкера с использованием известных способов.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой биспецифическую молекулу, содержащую домен FN3, которая содержит первый домен фибронектина типа III (FN3) и второй домен FN3, причем первый домен FN3 специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и блокирует связывание эпидермального фактора роста (EGF) с EGFR, а второй домен FN3 специфически связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов (c-Met) и блокирует связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с c-Met, причем молекула содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 50-72, 106 или 138-165.

Фрагменты, продлевающие период полужизни.

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

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

В биспецифические молекулы настоящего изобретения можно встроить дополнительные фрагменты, такие как молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), такие как ПЭГ-5000 или ПЭГ-20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с разной 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 необходимых 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, легальный 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, показанной в SEQ IN NO:170-178.

Моноспецифические и биспецифические молекулы настоящего изобретения, которые включают дополнительные фрагменты, можно сравнить по функциональности с помощью нескольких известных анализов. Например, изменение свойств моноспецифических и/или биспецифических молекул вследствие включения 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 известных клеточных анализов для измерения, например, ADCC

или CDC, или оценки фармакокинетических свойств молекул настоящего изобретения в моделях *in vivo*.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева.

В настоящем изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие домены FN3, связывающиеся с EGFR или с-Met, или биспецифические к EGFR/с-Met молекулы настоящего изобретения, содержащие домен FN3, 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 с-Met, или биспецифические к EGFR/с-Met молекулы настоящего изобретения, содержащие домен FN3, также входят в объем настоящего изобретения.

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

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

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

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

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

Полинуклеотиды настоящего изобретения можно получить 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 получить другими методиками, такими как ПЦР с последующим стандартным клонированием. Методики производства или получения полинуклеотидов с заданной известной последовательностью хорошо известны в данной области.

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотидов настоящего изобретения в данный организм или 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.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор настоящего изобретения. Моноспецифический домен FN3, связывающийся с EGFR или с-Met, или биспецифическую к EGFR/с-Met молекулу настоящего изобретения, содержащую домены FN3, можно необязательно получить с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно в данной области. См., например, 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*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Выбранная для экспрессии клетка-хозяин может происходить от млекопитающего или ее можно выбрать из клеток COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомых или растений или любых производных, их иммортализованных или преобразованных клеток. Альтернативно, клетку-хозяина можно выбрать из видов или организмов, не способных 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 c-Met, или выделенной биспецифической к EGFR/c-Met молекулы настоящего изобретения, содержащей домен FN3, включающий культивирование выделенной клетки-хозяина настоящего изобретения в таких условиях, чтобы экспрессировался выделенный домен FN3, специфически связывающийся с EGFR или c-Met, или выделенная биспецифическая к EGFR/c-Met молекула, содержащая домен FN3, а также очистку домена или молекулы.

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

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела можно создавать *de novo* или можно конструировать из существующих моноспецифических антител к EGFR и c-Met.

Примерами антител к EGFR, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул, являются, например, панитумумаб (ABX-EGF), нимотузумаб, нецитумумаб, матузумаб, а также описанные, например, в патентах США № US 7595378, US 7247301, патентной публикации США № US 2011/0256142, патентах США № US 5891996; US 5212290, US 5558864, US 7589180. Например, можно использовать домен VH антитела, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 189 или 191, и домен VL антитела, имеющий аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 190 или 192.

К примерам антител к c-Met, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул, относятся, например, рилотумумаб, онартузумаб, фиклатузумаб и антитела, описанные, например, в международной публикации PCT № WO 2011/110642, патентной публикации США № US 2004/0166544, в международной публикации PCT № WO 2005/016382 или в международной публикации PCT № WO 2006/015371. Например, можно использовать домен VH антитела, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 193 или 195, и домен VL антитела, имеющий аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 194 или 196. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антител, идентифицированные по их наименованиям в соответствии с United States Adopted Names (USAN), можно получить в American Medical Association на сайте [http://\\_www\\_ama-assn\\_org](http://www_ama-assn_org) или в реестре CAS.

Моноспецифические к EGFR и c-Met переменные домены можно выбрать *de novo*, например, из библиотеки на фаговом дисплее, где сконструирован фаг, экспрессирующий человеческие иммуноглобулины или их части, такие как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные переменные участки антитела (Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J. Immunol. Meth.* 254:67-84, 2001; Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, 1996; Sheets et al., *PITAS (USA)*, 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991), и затем конструируют в биспецифическом формате. Моноспецифические к EGFR и c-Met переменные домены можно выделять, например, из библиотек фаговых дисплеев, экспрессирующих переменные участки легкой и тяжелой цепей, в виде белков, слитых с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в Shi et al. (2010), *J. Mol. Biol.* 397:385-96 и в международной публикации PCT № WO 09/085462). В библиотеках антител проводят скрининг на связывание с внеклеточными доменами человеческих EGFR или c-Met, и полученные положительные клоны дополнительно характеризуют, а из лизатов клонов выделяют Fab. Такое применение способов фагового дисплея для выделения человеческих антител известно в данной области. См., например, патенты США № 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793; 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 и 6593081. Полученные *de novo* переменные участки, связывающиеся с EGFR или c-Met, конструируют в биспецифических форматах, используя способы, описанные в настоящем документе.

Биспецифические форматы антител.

Антитела настоящего изобретения имеют два или более антигенсвязывающих сайта и являются биспецифическими. К биспецифическим антителам настоящего изобретения относятся антитела, имеющие полную размерную структуру антитела.

Термин "полноразмерное антитело" в настоящем документе означает антитело, имеющее две полноразмерных тяжелых цепи антитела и две полноразмерных легкие цепи антитела. Полноразмерная тяжелая цепь антитела (HC) состоит из хорошо известных переменных и константных доменов тяжелой цепи VH, CH1, CH2 и CH3. Полноразмерная легкая цепь антитела (LC) состоит из хорошо известных переменных и константных доменов легкой цепи VL и CL. Полноразмерное антитело может не содержать С-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях.

Термин "Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару тяжелая цепь - легкая цепь, специфически связывающуюся с антигеном.

Полноразмерные биспецифические антитела настоящего изобретения можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, введя в CH3-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации CH3-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно CH3-домены исходных антител высвобождаются? и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. CH3-домены Fab-плеч могут быть сконструированы так, чтобы они способствовали гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на EGFR и эпитопом на c-Met.

Термин "гомодимеризация" в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности CH3. Термин "гомодимер" в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями CH3.

Термин "гетеродимеризация" в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности CH3. Термин "гетеродимер" в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями CH3.

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию PCT № WO 2006/028936). Вкратце, выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами CH3 в человеческом IgG, можно подвергнуть мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов CH3, стимулируя образование гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном. После коэкспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в CH3, образующих выступ и впадину, являются следующие (указано как модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S\_L368A\_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, например стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности CH3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности CH3, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127, патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): L351Y\_F405A\_Y407V/T394W, T366I\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F, L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F или T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876; патентной публикации США № US 2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела настоящего изобретения можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в CH3-участках двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации США № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к c-Met) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (например,

антитело к EGFR) конструируют так, чтобы они имели некоторые замены в домене CH3, которые способствуют стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, позволяющих цистеинам в шарнирном участке проходить изомеризацию дисульфидной связи; в результате этого путем обмена Fab-плечами создается биспецифическое антитело. Условия инкубирования можно оптимально возратить к невозстановительным. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (ДТТ), дитиоэритритол (ДТЕ), глутатион, трис-(2-карбокситил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис-(2-карбокситил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при pH 5-8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения могут обеспечить преимущество в отношении специфичности и сниженной побочной токсичности по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами EGFR и/или c-Met. Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на неожиданном открытии того, что биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения обеспечивают существенно повышенный синергический ингибиторный эффект по сравнению со смесью связывающихся с EGFR и связывающихся с c-Met моноспецифических антител или описанными в публикациях биспецифическими к EGFR/c-Met антителами. В зависимости от анализа наблюдался синергический эффект в диапазоне от приблизительно 14-кратного до более чем приблизительно 800-кратного. Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения обеспечивают более эффективное ингибирование сигнальных путей EGFR и c-Met и более эффективное ингибирование роста опухоли, чем цетуксимаб (Erbix®). Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения ингибируют сигнализацию EGFR в опухолях и/или линиях опухолевых клеток, имеющих активирующие EGFR мутации и/или мутации в EGFR, в отношении которых известен эффект резистентности к лечению ингибиторами тирозинкиназ, таким как гефитиниб, и ингибируют сигнальный путь c-Met, для которого показано усиление активности и обеспечение компенсаторной сигнализации при лечении ингибиторами тирозинкиназы EGFR при онкологических заболеваниях, таких как NSCLC. Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения в дополнение к прямому ингибированию сигнализации EGFR и c-Met демонстрируют противоопухолевую активность благодаря усиленной антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и деградации рецепторов EGFR и c-Met. В отличие от существующих видов терапии EGFR (цетуксимаб и панитумумаб), биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения индуцируют уничтожение опухолевых клеток, имеющих мутации KRAS, посредством усиленной ADCC.

В международной патентной публикации США № WO 2010/115551 описано биспецифическое к EGFR/c-Met антитело (BSAB01), сконструированное в формате IgG-scFv с применением связывающей EGFR пары VH/VL из цетуксимаба и связывающей c-Met пары VH/VL из антитела 5D5 (MetMab, онартузумаб), в настоящее время проходящее фазу III испытаний. BSAB01 демонстрирует приблизительно двукратное (аддитивное) усиление ингибирования пролиферации клеток A431 по сравнению с исходными антителами (пример 7, фиг. 8b в WO 2010/115551) и умеренное аддитивное ингибирование пролиферации клеток Ovarc-8 (фиг. 10a, пример 16 в WO 2010/115551) по сравнению с комбинацией двух исходных антител (ингибирование 15% в сравнении с 10%). Таким образом, что удивительно и неожиданно, в настоящем изобретении предложены биспецифические к EGFR/c-Met антитела, демонстрирующие существенный синергический эффект при ингибировании сигнализации EGFR и c-Met, выживании раковых клеток и росте опухоли. Без стремления к ограничению какой-либо теорией считается, что существенный синергический эффект биспецифических антител настоящего изобретения по меньшей мере частично обусловлен специфичностью к эпитопам обоих из связывающихся с EGFR и c-Met плеч, что, возможно, приводит к ингибированию сигнализации не только через гомодимеры EGFR и c-Met, но также через гетеродимеры EGFR/HERx.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенное биспецифическое к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (c-Met) антитело, содержащее:

- а) первую тяжелую цепь (HC1), содержащую константный домен 3 HC1 (HC1 CH3) и переменный участок 1 HC1 (VH1);
- б) вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую константный домен 3 HC2 (HC2 CH3) и переменный участок 2 HC2 (VH2);
- в) первую легкую цепь (LC1), содержащую переменный участок 1 легкой цепи (VL1); и вторую легкую цепь (LC2), содержащую переменный участок 2 легкой цепи (VL2), причем VH1 и VL1 совместно образуют первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с EGFR, а VH2 и VL2 совместно образуют второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с c-Met, причем HC1 содержит по меньшей мере одну замену в HC1 CH3, а HC2 содержит по меньшей

мере одну замену в HC2 CH3, причем замена в HC1 CH3 и замена в HC2 CH3 происходят по разным положениям аминокислотных остатков, если нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело ингибирует фосфорилирование связанных с внеклеточными сигналами киназ 1 и 2 (ERK1/2) в клеточной линии NCI-H292, NCI-H1975 или SKMES-1 со значением  $IC_{50}$ , которое по меньшей мере приблизительно в 10 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 20 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 30 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 40 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 50 раз меньше или по меньшей мере приблизительно в 60 раз меньше по сравнению со значением  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования ERK1/2 в клеточных линиях NCI-H292, NCI-H1975 или SKMES-1 при помощи смеси контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего тяжелую цепь 3 (HC3) и легкую цепь 3 (LC3), и контрольного одновалентного антитела к c-Met, содержащего тяжелую цепь 4 (HC4) и легкую цепь 4 (LC4), причем HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно, и фосфорилирование ERK1/2 измеряют в цельноклеточных лизатах с помощью сэндвич-ИФА с применением антитела к фосфо-ERK1/2 в качестве захватывающего антитела, и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела, связывающегося с не фосфорилированной и фосфорилированной ERK1/2, в качестве детекторного антитела. Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения обеспечивают синергическое, более выраженное ингибирование сигнализации EGFR и c-Met по сравнению с комбинацией моноспецифических антител к EGFR и моноспецифических антител к c-Met, если оценивать ингибирование по ингибированию фосфорилирования ERK1/2. Таким примером биспецифического к EGFR/c-Met антитела является антитело EM1-mAb настоящего изобретения.

Термин "контрольное моноспецифическое к EGFR антитело" в настоящем документе означает антитело, имеющее первое Fab-плечо, которое связывается с EGFR и идентично по аминокислотной последовательности связываемому с EGFR Fab-плечу тестируемого биспецифического к EGFR/c-Met антитела и имеет второе Fab-плечо, являющееся "инертным" и связывающимся с неродственным/не связанным антигеном, вирусом иммунодефицита человека (HIV) gp120. Второе Fab-плечо имеет легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 209, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 198, в тех случаях, когда связываемое с EGFR Fab-плечо в тестируемом биспецифическом к EGFR/c-Met антителе содержит замену F405L. Второе Fab-плечо имеет легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 209, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 197, в тех случаях, когда связываемое с EGFR Fab-плечо в тестируемом биспецифическом к EGFR/c-Met антителе содержит замену K409R.

Термин "контрольное моноспецифическое к c-Met антитело" в настоящем документе означает антитело, имеющее первое Fab-плечо, которое связывается с c-Met и идентично по аминокислотной последовательности связываемому с c-Met Fab-плечу тестируемого биспецифического к EGFR/c-Met антитела, и имеющее второе Fab-плечо, являющееся "инертным" и связывающимся с неродственным/не связанным антигеном, HIV gp120. Второе Fab-плечо имеет легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 209, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 198, в тех случаях, когда связываемое с c-Met Fab-плечо в тестируемом биспецифическом к EGFR/c-Met антителе содержит замену F405L. Второе, инертное Fab-плечо имеет легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 209, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 197, в тех случаях, когда связываемое с c-Met Fab-плечо в тестируемом биспецифическом к EGFR/c-Met антителе содержит замену K409R.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело ингибирует фосфорилирование ERK1/2 со значением  $IC_{50}$  приблизительно  $2 \times 10^{-9}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее или приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ERK1 фосфорилируется по остаткам Thr202 и Tyr204, а ERK2 фосфорилируется по остаткам Thr185 и Tyr197.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело ингибирует фосфорилирование протеинкиназы B (АКТ) по Ser473 в клеточной линии NCI-H1975 со значением  $IC_{50}$ , по меньшей мере приблизительно в 70 раз меньшим по сравнению со значением  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования АКТ по Ser473 в клеточной линии NCI-H1975 со смесью контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего HC3 и LC3, и контрольного одновалентного антитела к c-Met, содержащего HC4 и LC4, причем HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно, причем фосфорилирование АКТ по Ser473 измеряют в цельноклеточных лизатах с помощью сэндвич-ИФА с применением антитела, связывающегося с не фосфорилированной и фосфорилированной АКТ в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела к фосфорилированной по Ser473 АКТ в качестве детекторного антитела.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело ингибирует фосфорилирование протеинкиназы B (АКТ) по Thr308 в клеточной линии NCI-H1975 со значением  $IC_{50}$ , по меньшей мере приблизительно в 100 раз меньшим по сравнению

со значением  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования АКТ по Thr308 в клеточной линии NCI-H1975 со смесью контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего HC3 и LC3, и контрольного одновалентного антитела к c-Met, содержащего HC4 и LC4, причем HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно, причем фосфорилирование АКТ по Thr308 измеряют в цельноклеточных лизатах с помощью сэндвич-ИФА с применением антитела, связывающегося с не фосфорилированной и фосфорилированной АКТ в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела к фосфорилированной по Thr308 АКТ в качестве детекторного антитела.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения обеспечивают синергическое, более выраженное ингибирование сигнализации EGFR и c-Met по сравнению с комбинацией моноспецифических к EGFR антител и моноспецифических к c-Met антител, если оценивать ингибирование по ингибированию фосфорилирования АКТ. Таким примером биспецифического к EGFR/c-Met антитела является антитело EM1-mAb настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело ингибирует фосфорилирование АКТ по Ser473 или Thr308 со значением  $IC_{50}$  приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело связывается с EGFR с SEQ ID NO: 73 по остаткам EGFR K489, I491, K467 и S492 и с c-Met по остаткам PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID NO: 238) и FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID NO: 239). Примером такого биспецифического антитела является EM1-mAb. Биспецифическое антитело EM-1 связывается с EGFR и c-Met в отдельных эпитопах по сравнению с антителом BSAB01, как описано выше в международной патентной публикации США № WO 2010/115551. Исходное связывающееся с EGFR плечо (цетуксимаб) BSAB01 связывается с аминокислотными остатками EGFR R353, Q384, Q408, H409, F412, S418, S440, K443, K465, I467, S468 и N473 в зрелом EGFR, что соответствует остаткам R367, Q408, Q432, H433, F436, S442, S464, K467, K489, I491, S492 и N497 полноразмерного EGFR с SEQ ID NO: 73 (Li et al., *Cancer Cell*, 7:301-311, 2005). Исходное связывающееся с c-Met плечо BSAB01 (mAb 5D5) связывается с c-Met с остатками 325-340 PGAQLARQIGASLNDD (SEQ ID NO: 240).

Картирование эпитопа, связывающегося с EGFR антитела (2F8), исходного для EM1-mAb, описано в патентной публикации США № US 2011/0256142A1. Цетуксимаб и исходное антитело 2F8 связываются с частично перекрывающимися, но отличными эпитопами.

Картирование эпитопов можно выполнять стандартными способами. Например, в случае, когда известны структуры обоих отдельных компонентов, можно использовать анализ *in silico* прикрепления одного белка к другому белку для идентификации способных к взаимодействию участков. Может быть проведено избирательное замещение водорода дейтерием (H/D) в комплексе антигена и антитела с целью картирования участков антигена, способных связываться с антителом. Сегментный и точечный мутагенез антигена можно использовать для определения местоположения важных для связывания с антителом аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело нейтрализует сигнализацию EGFR и c-Met.

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

Связывание лиганда, например, EGF с EGFR, стимулирует димеризацию рецепторов, аутофосфорилирование, активацию внутреннего рецептора, цитоплазматического тирозинкиназного домена и иницирование множества сигнальных путей трансдукции и трансактивации, вовлеченных в регуляцию синтеза ДНК (активацию генов) и прохождение клеточного цикла или деления. Нейтрализация 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, а также ингибирование расположенных ниже сигнальных путей.

Сигнализацию EGFR и нейтрализацию сигнализации EGFR можно измерить с помощью различных хорошо известных способов, 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, а также измерения ингибирования аутофосфорилирования и/или фосфорилирования природных или синтетических субстратов биспецифическими антителами настоящего изобретения. Фосфорилирование можно обнаруживать хорошо известными способами, такими как анализ ИФА или вестерн-блоттинг, с использованием антитела, специфического к фосфотирозину. Примеры анализа можно найти в Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 283:1433-44, 1997 и Batley et al., *Life Sci.* 62:143-50, 1998, а также в настоящем документе.

Связывание лиганда, например, HGF с c-Met, стимулирует димеризацию рецептора, аутофосфорилирование, активацию цитоплазматического тирозинкиназного домена рецептора и иницирование мно-

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

Сигнализацию с-Met и нейтрализацию сигнализации 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 обнаруживать, например, при помощи антитела, специфического к фосфотирозину, способом ИФА или вестерн-блоттингом. Примеры анализа можно найти в Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 283:1433-44, 1997 и Batley et al., *Life Sci.* 62:143-50, 1998, а также в настоящем документе.

Сигнализацию EGFR и с-Met можно измерять при помощи различных хорошо известных способов, описанных в настоящем документе, например, путем измерения ингибирования фосфорилирования ERK1/2 и АКТ. Ингибирование фосфорилирования ERK1 по Thr202 и Tyr204 и фосфорилирования ERK2 по Thr185 и Tyr187, а также ингибирование фосфорилирования АКТ по Ser473 или Thr308 можно измерять, например, в клеточных лизатах NCI-H1975 с помощью сэндвич-ИФА с захватывающими антителами, нанесенными на твердую подложку, и детекторными антителами, конъюгированными с электрохемилюминесцентным соединением, например, меткой Meso Scale Discover (MSD) SULFO-TAG, с последующим обнаружением сигнала на считывателе для планшетов.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/с-Met антитело ингибирует рост клеток NCI-H292 или NCI-H1975 со значением  $IC_{50}$ , по меньшей мере приблизительно в 300 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 400 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 500 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 600 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 700 раз меньшим или по меньшей мере приблизительно в 800 раз меньшим по сравнению со значением  $IC_{50}$  ингибирования роста клеток NCI-H292 или NCI-H1975 цетуксимабом, если клетки NCI-H292 или NCI-H1975 выращиваются в условиях с низким прикреплением.

Ингибирование роста клеток можно анализировать известными способами. Клетки можно высевать на планшеты, покрытые гидрогелями или полимерами-биомиметиками (например, планшеты Ultra Low Attachment производства Corning) для предотвращения или уменьшения прикрепления клеток, а воздействие антител на индуцированный 7,5 нг/мл HGF рост клеток можно оценивать путем измерения процентной доли жизнеспособных клеток после инкубации в течение 72 ч с применением стандартных способов.

Биспецифические к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения обеспечивают синергическое и более выраженное ингибирование экспрессирующих EGFR и/или с-Met раковых клеток по сравнению с комбинацией моноспецифических к EGFR антител и моноспецифических к с-Met антител, а также со стандартным лечением цетуксимабом. Примером такого биспецифического к EGFR/с-Met антитела является антитело EM1-mAb настоящего изобретения. Биспецифические к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения ингибируют раковые клетки, которые экспрессируют EGFR дикого типа и с-Met дикого типа, а также раковые клетки, которые экспрессируют мутантный EGFR L858R/T790M, причем было обнаружено, что данная мутация способствует развитию резистентности к лечению низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназ (TKI), такими как гефитиниб. Таким образом, биспецифические к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения могут обеспечивать преимущество в более широкой популяции пациентов по сравнению с цетуксимабом и TKI.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/с-Met антитело ингибирует рост опухоли из экспрессирующих HGF клеток SKMES-1 у мышей SCID Beige с процентным (%) значением Т/С, которое на 36 сутки по меньшей мере в 500 раз меньше по сравнению с цетуксимабом при введении биспецифического антитела и цетуксимаба в дозе 20 мг/кг.

Модели ксенотрансплантата опухоли с использованием мышей SCID Beige являются хорошо известными. Клетки SKMES-1 можно сконструировать так, чтобы они экспрессировали человеческий HGF, с помощью стандартных способов. Как правило, мышам SCID Beige можно подкожно инокулировать клетки SKMES-1, экспрессирующие человеческий HGF, встроенные во внеклеточный матрикс, такой как Culturex, вводя их в дорсальную часть бока каждого животного. Через одну неделю после имплантации мышей можно разделить на группы с эквивалентными объемами опухоли, а после этого вводить, например, три раза в неделю биспецифические к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения, контрольные или сравнимые антитела или низкомолекулярные соединения. Объемы опухолей можно регистрировать дважды в неделю, а ингибирование роста опухоли (TGI) можно наблюдать, вычисляя процентное (%) значение Т/С. Значение % Т/С является показателем противоопухолевой эффективности. Т и С представляют собой средние объемы в получавшей лечение и контрольной группе соответственно в заданный день.

Биспецифические к EGFR/с-Met антитела настоящего изобретения обеспечивают существенно более высокую эффективность в отношении уничтожения опухоли *in vivo* по сравнению со стандартным



лечением цетуксимабом и, следовательно, могут обеспечить преимущество в популяции пациентов по сравнению с цетуксимабом.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит HC1 и HC2 из изоформа IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит HC1 и HC2 из изоформа IgG<sub>1</sub>.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело в HC1 CH3 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь замен, а в HC2 CH3 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь замен по положениям остатков 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409, если нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело в HC1 CH3 содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре замены, а в HC2 CH3 содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре замены по положениям остатков 350, 370, 405 или 409, если нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

Домены антитела и нумерация являются хорошо известными. Два домена CH3 (или участка CH3) являются неидентичными, если они отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотной заменой. Участок IgG<sub>1</sub> CH3, как правило, состоит из остатков 341-446 в IgG<sub>1</sub> (нумерация остатков соответствует каталогу ЕС). Пример константного участка IgG<sub>1</sub> показан в SEQ ID NO: 203. Домен CH3 охватывает остатки 224-329 SEQ ID NO: 203 и соответствует остаткам 341-446 по каталогу ЕС.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело в HC1 CH3 содержит по меньшей мере одну замену, а в HC2 CH3 содержит по меньшей мере одну замену по положениям остатков 405 или 409, если нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В других вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело в HC1 CH3 содержит замену K409R или F405L, а в HC2 CH3 содержит замену K409R или F405L, если нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело в HC1 CH3 содержит замену F405L, а в HC2 CH3 содержит замену K409R.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, замены в HC1 CH3 и HC2 CH3 представляют собой замены в положениях 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409 (нумерация соответствует каталогу ЕС). Эти положения соответствуют линейным положениям остатков 248, 250, 252, 281, 287, 289 и 291 соответственно в константном участке тяжелой цепи SEQ ID NO: 203 и 204.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 409 в HC1 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met, а в положении 405 в HC2 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 405 в HC1 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe, а в положении 409 в HC2 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 409 в HC1 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met, а в положении 405 в HC2 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe, Arg или Gly.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, в положении 405 в HC1 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Phe, Arg или Gly, а в положении 409 в HC2 CH3 имеется аминокислотная замена, отличная от Lys, Leu или Met.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 содержит Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а HC2 CH3 содержит аминокислоту, отличную от Phe, в положении 405 и содержит Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет аминокислоту, отличную от Phe в положении 405 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а HC2 CH3 имеет замену, отличную от Phe, Arg или Gly в положении 405 и Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет замену, отличную от Phe, Arg или Gly в положении 405 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а HC2 CH3 имеет Leu в положении 405 и Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Leu в положении 405 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Phe в положении 405 и аминокислоту, отлич-



положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409, а HC2 CH3 имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а HC2 CH3 имеет аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407 и Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Tyr в положении 407 и Arg в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а HC2 CH3 имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Tyr в положении 407 и Arg в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а HC2 CH3 имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409, а HC2 CH3 имеет Tyr в положении 407 и Arg в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а HC2 CH3 имеет (i) аминокислоту, отличную от Phe, Leu и Met, в положении 368, или (ii) Trp в положении 370, или (iii) аминокислоту, отличную от Asp, Cys, Pro, Glu или Gln в положении 399.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет (i) аминокислоту, отличную от Phe, Leu и Met в положении 368, или (ii) Trp в положении 370, или (iii) аминокислоту, отличную от Asp, Cys, Pro, Glu или Gln в положении 399, а HC2 CH3 имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Arg, Ala, His или Gly в положении 409, а HC2 CH3 содержит (i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368 или (ii) Trp в положении 370, или (iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет (i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или (ii) Trp в положении 370, или (iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399, а HC2 CH3 имеет Arg, Ala, His или Gly в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет Arg в положении 409, а HC2 CH3 имеет (i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или (ii) Trp в положении 370, или (iii) Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 имеет (i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или (ii) Trp в положении 370, или (iii) Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399, а HC2 CH3 имеет Arg в положении 409.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 содержит замену K409R или замену F405L, а HC2 CH3 содержит замену K409R или замену F405L, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, HC1 CH3 содержит замену F405L, а HC2 CH3 содержит замену K409R.

Как правило, замены вводят в молекулу, например, в константный домен антитела, на уровне ДНК с помощью стандартных способов.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит VH1 и VL1, причем:

VH1 содержит участок, определяющий комплементарность, тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), HCDR2 (HCDR2) и HCDR3 (HCDR3) с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 210, 211 и 212 соответственно; и

VL1 содержит участок, определяющий комплементарность, легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), LCDR2 (LCDR2) и LCDR3 (LCDR3) с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 213, 214 и 215 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит VH2 и VL2, причем:

VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 216, 217 и 218 соответственно; и

VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 219, 220 и 221 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит VH1, VL1, VH2 и VL2 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 189, 190, 193 и 194 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит HC1, LC1, HC2 и LC2 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 199, 200, 201 и 202 соответственно, необязательно имеющие С-концевой лизин, удаленный из HC1, HC2 или обоих из HC1 и HC2.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит VH1 и VL1, причем:

VH1 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 222, 223 и 224 соответственно; и

VL1 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 225, 226 и 227 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит VH2 и VL2, причем:

VH2 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 228, 229 и 230 соответственно; и

VL2 содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 231, 232 и 233 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит VH1, VL1, VH2 и VL2 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 191, 192, 195 и 196 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит HC1, LC1, HC2 и LC2 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 234, 235, 236 и 237 соответственно, необязательно имеющими удаленный из HC1, HC2 или как из HC1, так и из HC2 С-концевой лизин.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифические к EGFR/c-Met антитела могут блокировать связывание EGF с EGFR и связывание HGF с c-Met со значительным  $IC_{50}$  менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М или менее чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М в конкурентном анализе с использованием внеклеточных доменов рекомбинантного человеческого EGFR или рекомбинантного человеческого c-Met, нанесенных на планшеты и инкубированных с биспецифическими к EGFR/c-Met антителами настоящего изобретения или без них. Биспецифические к EGFR/c-Met антитела, описанные в настоящем документе, могут блокировать связывание EGF с EGFR и 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 EGF с EGFR и связыванием HGF с c-Met в отсутствие биспецифических к EGFR/c-Met антител настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, при использовании одинаковых условий анализа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело содержит HC1, LC1, HC2 и LC2, причем HC1, LC1, HC2 и LC2 кодируются синтетическими полинуклеотидами, содержащими последовательность SEQ ID NO: 205, 206, 207 и 208 соответственно.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно создать с помощью методик, описанных в настоящем документе, например, с использованием конструирования CH3 и создания антител с помощью обмена Fab-плечами *in vitro*. Пример биспецифического антитела можно создать из двух моноспецифических антител, объединив приблизительно 1-20 мг/мл каждого антитела в молярном соотношении 1:1 в PBS при pH 7,0-7,4 в буферном растворе, имеющем конечную концентрацию 75 мМ 2-меркаптоэтанолamina (2-МЕА), инкубируя в течение 2-6 ч при 25-37°C с последующим удалением 2-МЕА путем диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и фильтрации в вихревой ячейке. Выход биспецифического антитела может составлять более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 90%, более чем приблизительно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложены способы получения выделенного биспецифического к EGFR/c-Met антитела, включающие:

объединение выделенного моноспецифического двухвалентного антитела к EGFR, содержащего две тяжелые цепи с SEQ ID NO: 199 и две легкие цепи с SEQ ID NO: 200, а также выделенного моноспеци-

фического двухвалентного антитела к с-Met, содержащего две тяжелые цепи с SEQ ID NO: 201 и две легкие цепи с SEQ ID NO: 202, в смесь с молярным соотношением приблизительно 1:1;

введение в смесь восстанавливающего агента;

инкубирование смеси в течение от приблизительно 90 мин до приблизительно 6 ч;

удаление восстанавливающего агента;

очистку биспецифического к EGFR/с-Met антитела, содержащего первую тяжелую цепь с SEQ ID NO: 199 и вторую тяжелую цепь с SEQ ID NO: 201, первую легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и вторую легкую цепь с SEQ ID NO: 202, причем первая тяжелая цепь с SEQ ID NO: 199 совместно с первой легкой цепью с SEQ ID NO: 200 образует первый связывающий домен, который специфически связывается с EGFR, а вторая тяжелая цепь с SEQ ID NO: 201 совместно со второй легкой цепью с SEQ ID NO: 202 образует второй связывающий домен, который специфически связывается с с-Met.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, восстанавливающий агент представляет собой 2-меркаптоэтанолламин (2-MEA).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, 2-MEA присутствует в концентрации от приблизительно 25 до приблизительно 75 мМ.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, стадию инкубации проводят при температуре от приблизительно 25 до приблизительно 37°C.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложено выделенное биспецифическое к EGFR/с-Met антитело, содержащее HC1, LC1, HC2 и LC2, причем HC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 199, LC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 200, HC2 содержит последовательность SEQ ID NO: 201 и LC2 содержит последовательность SEQ ID NO: 202, причем HC1, LC1, HC2 и/или LC2 дополнительно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 консервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложено выделенное биспецифическое к EGFR/с-Met антитело, содержащее HC1, LC1, HC2 и LC2, причем HC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 234, LC1 содержит последовательность SEQ ID NO: 235, HC2 содержит последовательность SEQ ID NO: 236 и LC2 содержит последовательность SEQ ID NO: 237, причем HC1, LC1, HC2 и/или LC2 дополнительно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 консервативных аминокислотных замен.

Биспецифические к EGFR/с-Met антитела, в которых аминокислотные последовательности HC1, LC1, HC2 и LC2 несущественно отличаются от антител, описанных в настоящем документе, входят в объем настоящего изобретения. Как правило, это включает одну или более консервативных аминокислотных замен на аминокислоту, имеющую аналогичный заряд, гидрофобные или стереохимические характеристики в антигенсвязывающих сайтах или в каркасах без неблагоприятного изменения свойств антитела. Также могут быть осуществлены консервативные замены, улучшающие свойства антитела, например, стабильность или аффинность. Например, возможно введение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен в VH1, VL1, VH2 и/или VL2. Например, "консервативные аминокислотные замены" могут включать замену нативных аминокислотных остатков на ненативные остатки, такие как те, которые не сопровождаются изменением или сопровождаются незначительными изменениями полярности или заряда аминокислотного остатка в этом положении. Более того, любой нативный остаток в полипептиде также может быть заменен на аланин, как было описано ранее в отношении аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan et al., *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67, 1998; Sasaki et al., *Adv. Biophys.* 35:1-24, 1998). Желательные аминокислотные замены могут определить специалисты в данной области, когда такие замены необходимы. Например, аминокислотные замены можно использовать для того, чтобы идентифицировать важные остатки в последовательности молекулы или для увеличения или уменьшения аффинности молекул, описанных в настоящем изобретении. Примеры консервативных аминокислотных замен описаны выше.

Аминокислотные замены могут быть выполнены, например, с помощью ПЦР-мутагенеза (патент США №4,683,195). Библиотеки вариантов можно создать с использованием хорошо известных способов, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например, кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), а также скрининга библиотек на наличие вариантов с желательными свойствами.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, аминокислотные замены можно вводить в константный участок антитела. Например, можно использовать разные аллотипы IgG<sub>1</sub> в биспецифических к EGFR/с-Met антителах настоящего изобретения, например хорошо известный аллотип G1m17, аллотип G1m3, аллотип G1m1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, фармакокинетические свойства биспецифических к EGFR/с-Met антител можно улучшить путем введения в домен Fc замен, модулирующих период полужизни антитела. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/с-Met антитело содержит замену M252Y/S254T/T256E в HC1 и/или HC2, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС. Было показано, что замены M252Y/S254T/T256E увеличивают период полужизни антитела (Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.*

281:23514-24, 2006).

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела, имеющие консервативные замены и/или дополнительные замены в их Fc-участке, тестировали для определения их характеристик с помощью способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, иммуноэффektorные свойства биспецифических к EGFR/c-Met антител могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), уменьшение числа рецепторов на поверхности клетки (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.п., можно обеспечивать и/или контролировать путем модификации остатков в Fc, отвечающих за эти функции.

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", или "ADCC", представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени, а затем вызывают лизис клетки-мишени.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. Человеческие IgG<sub>1</sub> или IgG3 подвергаются N-гликозилированию по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые неконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах приблизительно по меньшей мере 85%. Удаление центральной фукозы из 2-антенарных комплексных олигосахаридов, присоединенных к Fc-участкам, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания с FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или комплемент-зависимой (CDC) активности. Такие mAb можно получить разными способами, которые, по сообщениям, приводили к успешной экспрессии антител с относительно высоким дефукозилированием, несущих Fc-олигосахариды 2-антенарного комплексного типа, например, путем контроля осмоляльности культуры (Konno et al., *Cytotechnology*, 64:249-65, 2012), путем применения варианта клеточной линии CHO Lec13 в качестве клеток-хозяев (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740, 2002), путем применения варианта клеточной линии CHO EB66 в качестве клеток-хозяев (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; Epub ahead of print; PMID:20562582), путем применения гибридной клеточной линии YB2/0 в качестве клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J. Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), путем введения малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol. Bioeng.* 88:901-908, 2004) или путем коэкспрессии β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы Гольджи II или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J. Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ADCC, вызванную биспецифическими к EGFR/c-Met антителами, также можно усилить путем введения некоторых замен в Fc-область антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных положениях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация соответствует каталогу ЕС), как описано в патенте США № US6737056.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело настоящего изобретения имеет структуру 2-антенарного гликана с содержанием фукозы в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15%, например 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое к EGFR/c-Met антитело имеет структуру 2-антенарного гликана с содержанием фукозы приблизительно 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25 или 20%.

"Содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахарной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентную долю фукозосодержащих структур относительно всех гликоструктур. Его можно охарактеризовать и количественно измерить множеством способов, например 1) при помощи MALDI-TOF (времяпролетной ионизации лазерной десорбцией с использованием матрицы) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной публикации США № WO 2008/077546; 2) путем ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующим получением производных и обнаружением/количественной оценкой ВЭЖХ (СЭЖХ) с флуоресцентным обнаружением и/или ВЭЖХ-МС (СЭЖХ-МС); 3) путем анализа интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой/без обработки гликанов Asn297 при помощи Endo S или другого фермента, выполняющего расщепление между первым и вторым GlcNAc-моносахаридами, оставляя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) путем расщепления mAb на составляющие пептиды ферментативным способом (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) с последующим разделением, обнаружением и количественной оценкой методом ВЭЖХ-МС (СЭЖХ-МС);

5) путем отделения олигосахаридов от белка mAb методом специфического ферментативного дегликозилирования PNGase F по Asn 297. Высвобожденные таким образом олигосахариды можно пометить флуорофором, разделить и идентифицировать различными вспомогательными методиками, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов методом масс-спектрометрии с ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиалилирования ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно измерить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно измерить формы олигосахаридов высокоэффективным капиллярным электрофорезом с лазерно-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Термин "низкофукозный" или "с низким содержанием фукозы" в настоящем документе относится к антителам с содержанием фукозы приблизительно 1-15%.

Термин "нормальнофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы" в настоящем документе относится к антителам с содержанием фукозы приблизительно более 50%, как правило, приблизительно более 80 или более 85%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены синтетические нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые цепи и легкие цепи биспецифических антител настоящего изобретения, связывающихся с EGFR/c-Met, в виде выделенных полинуклеотидов, или в виде частей экспрессионных векторов, 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 некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 205, 206, 207 или 208.

Полинуклеотиды настоящего изобретения можно получить 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 получить другими методиками, такими как ПЦР с последующим стандартным клонированием. Методики производства или получения полинуклеотидов с заданной известной последовательностью хорошо известны в данной области.

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

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложен вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, подходящие для введения полинуклеотида настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение каким-либо образом. Например, полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи биспецифических антител настоящего изобретения, можно ввести в экспрессионные векторы. Легкую и тяжелую цепи можно клонировать в одном или в разных векторах экспрессии. ДНК-сегменты, кодирующие иммуноглобулиновые цепи, могут быть функционально соединены в векторе(ах) экспрессии с управляющими последовательностями, обеспечивающими экспрессию иммуноглобулиновых полипептидов. К таким управляющим последовательностям относятся сигнальные последовательности, промоторы (например, естественно ассоциированные или гетерологичные промоторы), энхансерные элементы и останавливающие транскрипцию последовательности, и их можно выбирать так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии антитела. После введения вектора в соответствующего хозяина можно провести инкубацию хозяина в условиях, подходящих для высокоуровневой экспрессии белков, кодируемых введенными синтетическими полинуклеотидами.

Как правило, подходящие экспрессионные векторы могут подвергаться репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат маркеры селекции, например, резистентность к ампициллину, резистентность к гигромицину, резистентность к тетрациклину, резистентность к канамицину или резистентность к неомицину, чтобы можно было выполнить обнаружение клеток, трансформированных желательными последовательностями ДНК.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, предложена клетка-хозяин, содержащая вектор настоящего изобретения. Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую вводят вектор. Следует понимать, что термин "клетка-хозяин" означает не только конкретную клет-

ку субъекта, но и потомков такой клетки. Так как в последующих поколениях могут возникнуть некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может быть не идентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином "клетка-хозяин". Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей.

Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например, SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580) мышинные клеточные линии. Обычно используется линия клеток миеломы человека U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие полезные клеточные линии включают линии, полученные из яичников китайского хомячка (CHO), например линии CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Использование биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, биспецифических к EGFR/c-Met антител и связывающихся с EGFR или c-Met доменов FN3 настоящего изобретения.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домен FN3, связывающиеся с EGFR домены FN3, связывающиеся с c-Met домены FN3 или биспецифические к EGFR-c-Met антитела настоящего изобретения можно использовать для диагностики, отслеживания, модуляции, лечения, ослабления, помощи при профилактике развития или облегчения симптомов заболевания человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, текучей среды или по существу хозяина. Способы настоящего изобретения можно использовать для лечения любого пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные/домашние животные.

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

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 к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, домена FN3, связывающегося с EGFR, домена FN3, связывающегося с c-Met, или биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения 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, имеющего рак, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенной биспецифической к EGFR/c-Met молекулы, содержащей домен FN3, домена FN3, связывающегося с EGFR, домена FN3, связывающегося с c-Met, или биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения нуждающемуся в лечении пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака.

Биспецифическую к EGFR/c-Met молекулу, содержащую домен FN3, FN3-домен, связывающийся с EGFR, или FN3-домен, связывающийся с c-Met, или биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно использовать для лечения любого заболевания или расстройства, характеризующегося аномальной активацией или продукцией EGFR, c-Met, EGF, растворимого EGF, растворимого c-Met или другого лиганда EGFR или HGF, или расстройства, связанного с экспрессией EGFR или c-Met, которые могут быть связаны или не связаны со злокачественными образованиями или раком, в которых аномальная активация и/или продукция EGFR, c-Met, EGF или другого лиганда EGFR или HGF происходит в клетках или тканях субъекта, имеющего заболевание или расстройство, или субъекта, предрасположенного к заболеванию или расстройству.

Домены FN3 настоящего изобретения, специфически связывающиеся с c-Met и блокирующие связывание HGF с c-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 с помощью 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 желудка, 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 доброкачествен-



ные 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. Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домен FN3, или биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно использовать для лечения опухолей, включая раковые заболевания и доброкачественные опухоли. Примерами раковых заболеваний, поддающихся лечению биспецифической к EGFR/c-Met молекулой настоящего изобретения, содержащей домен FN3, или биспецифическим к EGFR/c-Met антителом настоящего изобретения являются раковые заболевания со сверхэкспрессией EGFR и/или c-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 c-Met (например, с активирующей c-Met мутацией, амплификацией гена c-Met или опосредованной лигандом активацией c-Met).

Примеры активирующих EGFR мутаций, которые могут быть связаны 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 регуляторных участках, связанных 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, делецию E746-A750, делецию R748-P753, вставку Ala между M766 и A767, вставку SVA (Ser, Val, Ala) между S768 и V769 и вставку NS (Asn, Ser) между P772 и H773. Другие примеры активирующих EGFR мутаций известны в данной области (см. например, патентную публикацию США № US 2005/0272083). 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 c-Met мутаций включают точечные мутации, мутации делеции, мутации вставки, инверсии или амплификации генов, которые приводят к усилению по меньшей мере одной биологической активности белка c-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 c-Met или регуляторных участках, связанных с геном, например мутации в киназном домене c-Met. Примеры активирующих c-Met мутаций представляют собой мутации по положениям остатков N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 и E168. Способы обнаружения мутаций или амплификаций генов EGFR и c-Met хорошо известны.

Примерами раковых заболеваний, поддающихся лечению биспецифическими молекулами настоящего изобретения, такими как биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения, являются рак эпителиальных клеток, рак молочной железы, рак яичников, рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), легочная аденокарцинома, 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 (гепатоклеточная карцинома (HCC)) или спорадическая или наследственная папиллярная почечная карцинома (PRCC).

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения нуждающемуся в этом пациенту в течение периода времени, достаточного для лечения рака, причем субъект является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 (генотип Fc $\gamma$ RIIIa-158F/F) или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16 (генотип Fc $\gamma$ RIIIa-158F/V). CD16 также известен как Fc-гамма рецептор IIIa (Fc $\gamma$ RIIIa) или низкоаффинный рецептор к Fc-участку иммуноглобулина гамма, изоформа III-A. Было показано, что полиморфизм валин/фенилаланин (V/F) в белке Fc $\gamma$ RIIIa в положении 158 отрицательно влияет на аффинность Fc $\gamma$ RIIIa к человеческому IgG. Рецептор с полиморфизмами Fc $\gamma$ RIIIa-158F/F или Fc $\gamma$ RIIIa-158F/V демонстрирует сниженное связывание с Fc и, таким образом, сниженную ADCC по сравнению с Fc $\gamma$ RIIIa-158V/V. Отсутствие или низкое количество фукозы в N-связанных олигосахаридах увеличивает способность антител индуцировать ADCC вследствие улучшенного связывания антител с человеческим Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-40, 2002). Антитела настоящего изобретения

имеют сниженное содержание фукозы в диапазоне приблизительно от 1 до приблизительно 10%. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое к EGFR/c-Met антитело имеет гликановую структуру с содержанием фукозы приблизительно 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%. Таким образом, антитела настоящего изобретения могут быть более эффективными при лечении пациентов с генотипами FcγRIIIa-158F/F или FcγRIIIa-158F/V. Пациентов можно проанализировать на их полиморфизм FcγRIIIa с помощью стандартных способов.

В некоторых способах, описанных в настоящем документе, антитела настоящего изобретения можно использовать для лечения субъекта, имеющего рак, который резистентен или приобрел резистентность к лечению одним или более ингибиторами EGFR. Примеры ингибиторов EGFR, к которым рак может приобретать резистентность, представляют собой антитела к EGFR цетуксимаб (Erbtux®), пантинумаб (Vectibix®), матузумаб, нимотузумаб, низкомолекулярные ингибиторы EGFR Tarceva® (эрлотиниб), IRESSA (гефитиниб), ЕКВ-569 (пелитиниб, необратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR), ингибиторы пан-ErbB и другие ингибиторы 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 к лечению гефитинибом, эрлотинибом, афатинибом, CO-1686, AZD9291 и/или цетуксимабом. Примером антитела, которое можно использовать, является EM1-mAb.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически эффективного количества выделенного биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения в течение периода времени, достаточного для лечения рака, причем субъект является резистентным или приобрел резистентность к лечению эрлотинибом, гефитинибом, афатинибом, CO-1686, 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. Показателем того, что у субъекта развилась резистентность или имеется предрасположенность к развитию резистентности к ингибиторам EGFR, также может быть повторное появление или ухудшение различных симптомов, связанных с раком, 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 обнаружение 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, имеющего опухоль NSCLC или метастазирование опухоли, имеющей активирующую EGFR мутацию или амплификацию гена EGFR, включающий введение пациенту терапевтически

эффективного количества биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения 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 связана 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 в значительно большей степени 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 в значительной степени коррелирует с ответом после лечения 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).

Другие варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой способ лечения пациента, имеющего рак, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически эффективного количества биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения в течение периода времени, достаточного для лечения рака, причем рак связан с активирующей EGFR мутацией, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, активирующей c-Met мутацией 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 Asp и Ser (NS) между P772 и H773.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой способы лечения пациента, имеющего рак, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически эффективного количества биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения в течение периода 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 и 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.

В некоторых вариантах осуществления пациенты получают лечение EM1-mAb настоящего изобретения. Антитело EM1-mAb настоящего изобретения демонстрирует эффективность в животных моделях опухолей *in vivo*, когда опухоли связаны с мутациями L858R, T790M, del (E746, A750) в EGFR, амплификацией EGFR, диким типом c-Met и/или амплификацией c-Met. Амплификацию EGFR или c-Met можно оценивать стандартными способами, например путем определения числа копий гена EGFR или c-Met

с помощью саузерн-блоттинга, FISH или сравнительной геномной гибридизации (CGH).

Другие варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой способ лечения пациента, имеющего рак, включающий введение нуждающемуся в лечении пациенту терапевтически эффективного количества биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения в течение периода 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 и мутантным KRAS.

В некоторых вариантах осуществления мутантный KRAS имеет замену G12V. KRAS относится к семейству протоонкогенов RAS, кодирующих гуанозинтрифосфатазы (ГТФазы), и опосредует трансдукцию сигнала EGFR ниже от рецептора. Таким образом, ожидается, что опухоли с мутациями протоонкогенного KRAS, например с активирующей мутацией G12V или G12C, не будут поддаваться лечению антителами EGFR. Клинические исследования антител к EGFR, таких как цетуксимаб и панитумумаб, продемонстрировали, что пациенты с колоректальными опухолями, имеющими мутацию KRAS, не отвечают на лечение этими агентами (Van Cutsem et al., N. Eng. J. Med. 360:1408-1417, 2009; Lievre et al., J. Clin. Oncol. 26:374-379, 2008; Amado et al., J. Clin. Oncol. 26:1626-1634m 2008). Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения опосредуют уничтожение клеточной линии с мутантным KRAS посредством эффективной ADCC и, таким образом, в отличие от существующих видов терапии антителами к EGFR, могут быть эффективны при лечении пациентов, у которых рак связан с мутациями, активирующими KRAS. Примером такого антитела является EM1-mAb.

Термины "лечить" или "лечение" обозначают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, развития или распространения рака. Для целей настоящего изобретения преимущественные 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 обнаружимые, так и не обнаружимые. "Лечение" также может обозначать продление срока жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние или расстройство, а также тех, кто имеет предрасположенность к состоянию или расстройству, или тех, у кого 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 биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения может изменяться в зависимости от факторов, таких как состояние болезни, возраст, пол и вес индивида, а также способности биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения вызывать желательный ответ у индивида. Примеры показателей эффективности терапевтического средства с EGFR/c-Met, 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, содержащие биспецифическое к EGFR/c-Met антитело настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домен FN3, домены FN3, связывающиеся с EGFR, домены FN3, связывающиеся с c-Met, или биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество домена, молекулы или антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят активное соединение. Такие носители могут быть жидкостями, такими как вода и 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%-ный соляной раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых примесей. Затем стерилизацию проводят с использованием стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, сгущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т.п. Концентрация молекул или антител 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, значений вязкости и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Подходящие носители и составы, включая другие белки человека, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в

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

Способ введения для терапевтического применения биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, доменов FN3, связывающихся с EGFR, доменов FN3, связывающихся с c-Met, или биспецифических к EGFR/c-Met антител настоящего изобретения может представлять собой любой подходящий способ, доставляющий агент к хозяину, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное или подкожное, легочное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), введение с применением состава в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка, геля, частицы и введение содержимого в шприце, имплантируемом устройстве, осмотическом насосе, кассете, микронасосе или другие средства, известные специалистам, а также известные в данной области. Специфическое введение в область можно обеспечить, например, путем доставки в сустав, бронхи, брюшную полость, внутрь капсулы, в 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, в 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 забуференной воды и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг/кг, например, от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг/кг или более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг/кг биспецифических к EGFR/c-Met молекул, содержащих домен FN3, домены FN3, связывающиеся с EGFR, или домены FN3, связывающиеся с c-Met, настоящего изобретения.

Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно вводить пациенту любым подходящим способом, например парентерально, путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или интраперитонеально. Внутривенную инфузию можно проводить в течение лишь 15 мин, но чаще - в течение 30, 60, 90 мин или даже 2 или 3 ч. Биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения также можно вводить непосредственно в область заболевания (например, в саму опухоль). Доза, вводимая пациенту, имеющему рак, 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. Также можно обеспечивать фиксированную разовую дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может зависеть от площади поверхности тела пациента, например 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м<sup>2</sup>. Для лечения рака обычно вводят от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить 10, 12, 20 или более доз. Введение биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно повторять через одни 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 более. Также возможны повторные курсы лечения в виде хронического применения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе.

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

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домен FN3, домены FN3, связывающиеся с EGFR, домены FN3, связывающиеся с c-Met, и биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно лиофилизировать для хранения и перед применением восстановить в подходящем носителе. Было показано, что данная методика эффективна для стандартных белковых препаратов, при этом можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы, содержащие домен FN3, домены FN3, связывающиеся с EGFR, домены FN3, связывающиеся с c-Met, и биспецифические к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом одновременно, последовательно или по отдельности. Второй терапевтический агент может представлять собой химиотерапевтический агент или средство для таргетной противораковой терапии.

Биспецифическое к EGFR/c-Met антитело настоящего изобретения можно вводить вместе с любым одним или более из химиотерапевтических лекарственных средств или другими противораковыми терапевтическими средствами, известными в данной области. Химиотерапевтические агенты представляют собой химические соединения, подходящие для лечения рака, включают ингибирующие рост или другие цитотоксические агенты и включают алкилирующие агенты, 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 бисульфат, импросульфат и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбохион, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамин и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамин, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицины, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-*b*-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуromoцин, куэламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболические средства, такие как метотрексат и 5-FU; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестволактон; 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; гидроксимочевину; 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® доцетаксел (TAXOTERE®) и его аналоги; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы рецепторных тирозинкиназ и/или ангиогенеза, такие как сорафениб (NEXAVAR®), сунитиниб (SUTENT®), пазопаниб (VOTRIENT™), тоцераниб (PALLADIA™), вандетаниб (ZACTIMA™), цедирабиб (RECENTIN®), регорафениб (BAY 73-4506), акситиниб (AG013736), лестауртиниб (CEP-701), эрлотиниб (TARCEVA®), gefитиниб (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 Wiemann et al., 1985, in *Medical Oncology* (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, также применимы к способам настоящего изобретения.

К примерам агентов, которые можно использовать в комбинации с биспецифическими к EGFR/c-Met молекулами, содержащими домен FN3, доменами FN3, связывающимися с EGFR, доменами FN3, связывающимися с c-Met, и биспецифическими к EGFR/c-Met антителами настоящего изобретения, относятся ингибиторы тирозинкиназ и таргетные противораковые препараты, такие как Iressa® (gefитиниб) и Tarceva (эрлотиниб), а также 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 № US 2004/0197332). 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 применяется в комбинации с биспецифическим к EGFR/c-Met антителом настоящего изобретения, его, как правило, вводят чаще, предпочтительно один раз в сутки, но также возможно вводить 2, 3, 4 или более раз в сутки, а также каждые два дня, раз в неделю или с некоторым другим интервалом. Низкомолекулярные лекарственные средства часто вводят перорально, но также возможно парентеральное введение, например в/в инфузия, болюсная инъекция, 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 биспецифического к EGFR/c-Met антитела настоящего изобретения в комбинации со вторым терапевтическим агентом комбинация может иметь место в любом удобном временном промежутке. Например, биспецифическое к EGFR/c-Met антитело и второй терапевтический агент можно вводить пациенту в один и тот же день и даже в одной и той же внутривенной инфузии. Однако биспецифическое к EGFR/c-Met антитело и второй терапевтический агент также можно вводить в чередующиеся дни или чередующиеся недели, двухнедельные промежутки или месяцы и т.д. В некоторых способах биспецифическое к EGFR/c-Met антитело и второй терапевтический агент вводят достаточно близко по времени друг к другу, так что они одновременно присутствуют (например, в сыворотке) в обнаружимых уровнях у получающего лечение пациента. В некоторых способах весь курс лечения биспецифическим к EGFR/c-Met антителом состоит из введения некоторого числа доз в течение периода времени, за которым следует или которому предшествует курс лечения вторым терапевтическим агентом, который также состоит из введения некоторого числа доз. В некоторых способах лечение биспецифическим к EGFR/c-Met антителом, вводимым во вторую очередь, начинается, если у пациента имеется резистентность или развивается резистентность ко второму терапевтическому агенту, вводимому изначально. Пациент может получать только один курс или множество курсов лечения одним или обоими из биспецифического к EGFR/c-Met антитела и второго терапевтического агента. Можно использовать период восстановления 1, 2 или несколько дней или недель между введением биспецифического к EGFR/c-Met антитела и второго терапевтического агента. Когда установлена подходящая схема лечения вторым терапевтическим агентом, эту схему можно применять в комбинации с биспецифическим к EGFR/c-Met антителом настоящего изобретения. Например, Tarceva® (эрлотиниб) принимают в виде пилюль 100 или 150 мг один раз в сутки, а Iressa® (гефитиниб) принимают в виде таблетки 250 мг один раз в сутки.

Биспецифическое к EGFR/c-Met антитело, необязательно в комбинации со вторым терапевтическим агентом, можно вводить вместе с любой формой радиационной терапии, включая внешнее направленное излучение, радиационную терапию с модуляцией интенсивности (IMRT), а также любой формой радиохирургии, включая Gamma Knife, Cyberknife, Linac и интратканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон GliaSite), и/или хирургическим лечением. Комбинация с радиационной терапией особенно уместна для лечения рака головы и шеи и опухолей мозга.

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

Пример 1. Создание библиотек Tенсон.

Tенсон (SEQ ID NO: 1) представляет собой каркасный иммуноглобулин-подобный домен фибронектина типа III (FN3), разработанный на основе консенсусной последовательности 15 доменов FN3 тенасина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; патентная публикация США № 2010/0216708). На кристаллической структуре Tенсон 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.

Tенсон:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAEINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY  
GVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO 1):

Создание библиотеки TCL1.

Библиотека, разработанная с рандомизацией только петли FG в Tенсон (SEQ ID NO: 1), TCL1, была создана для применения с cis-дисплейной системой (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012). В данной системе создается одноцепочная ДНК, в которую включены последовательности для промотора Tас, кодовая последовательность библиотеки Tенсон, кодовая последовательность RepA, cis-элемент и ogi-элемент. При экспрессии в системе транскрипции/трансляции *in vitro* формируется комплекс слитного белка Tенсон-RepA, связанный в cis с ДНК, которая его кодирует. Затем комплексы, связывающиеся с молекулой-мишенью, выделяют и амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), 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 Tенсон, тогда как 3-фрагмент содержит ген герА и cis- и ogi-элементы. Эти две половины объединяют рестриктазным фрагментом с получением полного конструктора. Библиотека TCL1 была выполнена с возможностью включения случайных аминокислот только в петлю FG в Tенсон, KGGHRSN (SEQ ID NO: 86). При создании данной библиотеки использовали NNS-кодону, 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 Tенсон показана в табл. 2.

Таблица 2

Библиотека	Конфигурация петли BC	Конфигурация петли FG
WT Tencon	TAPDAAFD*	KGGHRN**
TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXXX XXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX
TCL2	#####	#####S##

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

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

X обозначает вырожденные аминокислоты, кодируемые NNS-кодонами.

# обозначает "разработанное распределение аминокислот", описанное в тексте.

Для создания библиотеки TCL1 выполняли последовательные циклы ПЦР для присоединения промотора Tac, введения вырожденных элементов в петлю FG и добавления необходимых рестрикционных сайтов для конечной сборки. Во-первых, в две стадии создали последовательность ДНК, содержащую промоторную последовательность и последовательность 5'-фрагмента петли FG Tencon. В качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК, соответствующую полной последовательности гена Tencon, с праймерами POP2220 (SEQ ID NO: 2) и TC5'toFG (SEQ ID NO: 3). Полученный в 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 Tencon. Затем в петлю FG вводили диверсификацию 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 NO: 10) или TCF12 (SEQ ID NO: 11), содержащими вырожденные нуклеотиды. Выполнили по меньшей мере по восемь ПЦР-реакций по 100 мкл для каждой подбиблиотеки, чтобы свести к минимуму число циклов ПЦР и максимально увеличить разнообразие библиотеки. По меньшей мере 5 мкг данного ПЦР-продукта очистили из геля и использовали на последующей 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 Tencon. Данную реакцию ПЦР проводили с использованием лишь 15 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, кодирующий участок гена герA и cis- и ori-элементы. ПЦР проводили с использованием плазмиды (pCR4Blunt) (Invitrogen), содержащей данный ДНК-фрагмент, с праймерами M13 Forward (прямой) и M13 Reverse (обратный). Полученные ПЦР-продукты расщепляли PspOMI в течение ночи и очищали из геля. Для лигирования 5-части библиотечной ДНК с 3'-фрагментом ДНК, содержащим ген герA, 2 пмоль 5'-фрагмента ДНК лигировали с эквимлярным количеством 3'-фрагмента герA ДНК в присутствии ферментов NotI и PspOMI и лигазы T4. После лигирования в течение ночи при 37°C небольшую часть лигированной ДНК прогоняли через гель для проверки эффективности лигирования. 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 находился в диапазоне 32-34 мкг.

Для анализа 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 посредством безлигазного клонирования. Плазмидную ДНК трансформировали в компетентные клетки BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) и 96 случайно выбранных колоний секвенировали с использованием праймера промотора T7. Дублирующиеся последовательности обнаружены не были. В целом приблизительно 70-85% клонов имели полный промотор и кодирующую последовательность Tencon без мутации сдвига рамки считывания. Доля функционального секвенирования, которая исключает клонов



со стоп-кодонами, находилась в диапазоне от 59 до 80%.

#### Создание библиотеки TCL2.

Была создана библиотека TCL2, в которой в Tencon были рандомизированы как петля BC, так и петля FG, а распределение аминокислот в каждом положении строго контролировалось. В табл. 3 представлено распределение аминокислот в желаемых положениях петель в библиотеке TCL2. Разработанное распределение аминокислот имело две цели. Во-первых, библиотека была ориентирована на остатки, которые по прогнозу являются структурно значимыми для сворачивания и стабильности Tencon на основании анализа кристаллической структуры Tencon и/или гомологического моделирования. Например, положение 29 было предназначено только для набора гидрофобных аминокислот, так как данный остаток погружен в гидрофобную сердцевину свернутого Tencon. Второй уровень разработки включал смещение распределения аминокислот к распределению остатков, которые предпочтительно обнаруживаются в тяжелой цепи HCDR3 антител, для эффективного получения соединений с высокой аффинностью связывания (Birtalan et al., J. Mol. Biol. 377:1518-28, 2008; Olson et al., Protein Sci. 16:476-84, 2007). Таким образом, "разработанное распределение" из табл. 3 обозначает представленное ниже 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-кодонами.

Таблица 3

Положение остатка*	Остатки дикого типа	Распределение в библиотеке TCL2
22	T	Разработанное распределение
23	A	Разработанное распределение
24	P	50% P + 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 кодирующий участок Tencon (SEQ ID NO: 1), которые химически синтезировали в виде библиотечного пула (Sloning Biotechnology). Данный пул ДНК содержал по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  разных элементов. В конец фрагмента был включен рестрикционный сайт BsaI для лигирования с RepA.

3'-фрагмент библиотеки представлял собой константную ДНК-последовательность, содержащую элементы дисплея, включая тег 6xHis, кодирующий участок герA и cis-элемент. ДНК получили в ПЦР-реакции с помощью существующей ДНК-матрицы (выше) и праймеров LS1008 (SEQ ID NO: 17) и DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Для сборки готовой библиотеки TCL2 общее количество 1 мкг расщепленного рестриктазой BsaI 5'-фрагмента библиотечной ДНК Tencon лигировали с 3,5 мкг 3'-фрагмента, полученного путем рестрикционного расщепления 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 для библиотеки TCL1.

Дублирующиеся последовательности обнаружены не были. Приблизительно 80% последовательностей содержали полный промотор и кодирующие последовательности Tenson без мутаций сдвига рамки считывания.

Создание библиотеки TCL14.

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

Была создана библиотека, рандомизирующая альтернативную поверхность Tenson путем рандомизации выбранных открытых на поверхности остатков, относящихся к тяжам С и F, а также к частям петель CD и FG, как показано на фиг. 1. Для создания библиотеки использовали вариант Tenson, Tenson27 (SEQ ID NO: 99), имеющий следующие замены по сравнению с Tenson (SEQ ID NO: 1): E11R L17A, N46V, E86I. Полное описание способов, использованных для разработки этой библиотеки, приведено в патентной публикации США № US 2013/0226834.

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 IgG<sub>1</sub> Fc (R&D Systems), биотинилировали стандартными способами и применяли для пэннинга (остатки 25-645 полно-размерного EGFR с SEQ ID NO: 73). Для транскрипции и трансляции *in vitro* (ИТТ) 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 ч добавляли 450 мкл блокирующего раствора (PBS pH 7,4 с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина, 100 мкг/мл ДНК спермы сельди и 1 мг/мл гепарина) и реакционную смесь инкубировали на льду в течение 15 мин. Собирали комплексы EGFR-Fc:EGF с молярными соотношениями 1:1 и 10:1 для EGFR к EGF путем смешивания рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems) с биотинилированным рекомбинантным EGFR-Fc в блокирующем растворе в течение 1 ч при комнатной температуре. Для связывания 500 мкл заблокированных реакционных смесей ИТТ смешивали со 100 мкл комплексов EGFR-Fc: EGF и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего связанные комплексы извлекали магнитными гранулами с нейтравидином или стрептавидином (Seradyne). Несвязанные элементы библиотеки удаляли путем последовательных промывок PBST и PBS. После промывки ДНК элюировали из связанных комплексов путем нагревания до 65°C в течение 10 мин, амплифицировали ПЦР и присоединяли к ДНК-фрагменту, кодирующему RepA, путем рестрикционного расщепления и лигирования для дополнительных циклов пэннинга. Соединения с высокой аффинностью связывания выделяли путем последовательного понижения концентрации мишени EGFR-Fc в каждом цикле от 200 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 небитинилированных EGFR-Fc в течение ночи в PBS.

После пэннинга выбранные домены FN3 амплифицировали ПЦР с помощью олигонуклеотидов Tson5new2 (SEQ ID NO: 15) и Tson6 (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 C-концевой полигистидиновый тег, для обеспечения возможности очистки и обнаружения. Культуры выращивали до достижения оптической плотности 0,6-0,8 в среде 2YT с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина в 96-луночных блоках объемом 1 мл при 37°C, затем добавляли IPTG до 1 мМ и в этот момент температуру снижали до 30°C. Клетки собирали приблизительно через 16 ч путем центрифугирования и замораживали при -20°C. Лизирование клеток проводили путем инкубации каждого осадка в 0,6 мл лизирующего буфера BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) со встряхиванием при комнатной температуре в течение 45 мин.

Выбор доменов FN3, связывающихся с EGFR на клетках.

Для анализа способности разных доменов FN3 связываться с EGFR в более физиологическом контексте измеряли их способность связываться с клетками A431. Клетки A431 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1555) обладают сверхэкспрессией EGFR  $\sim 2 \times 10^6$  рецепторов на клетку. Клетки высевали по 5000/луночка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Лизаты экспрессирующих домены FN3 бактерий 1000-кратно разбавляли в буфере для окрашивания при FACS (Becton Dickinson) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в трех планшетах. Лизаты удаляли и клетки промывали.

вали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата антител к пентагистидину His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с использованием считывателя Acumen eX3. Бактериальные лизаты, содержащие домены FN3, отбирали путем скрининга по их способности связываться с клетками A431 (1320 неочищенных бактериальных лизатов по библиотекам TCL1 и TCL2), и обнаружили 516 положительных клонов, у которых связывание  $\geq 10$ -кратно превосходило фоновый сигнал. Для связывания отбирали 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 обнаруженных клонов домена FN3 связываться с EGFR в конкуренции с EGF с использованием клеток A431 параллельно со скрининговым анализом связывания с A431. Клетки A431 высевали по 5000/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка разбавленного 1:1000 лизата бактерий в течение 1 ч при комнатной температуре в трех планшетах. Биотинилированный EGF (Invitrogen, № по кат. E-3477) добавляли в каждую лунку до конечной концентрации 30 нг/мл и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза буфером для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата стрептавидин-фикоцитрин (Invitrogen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 600 нм с использованием считывателя Acumen eX3.

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

Экспрессия и очистка идентифицированных доменов FN3, связывающихся с EGFR.

Домены FN3 с His-тегом очищали из лизатов *E. coli* с использованием планшетов His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) и элюировали в буфере, содержащем 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и 250 мМ имидазола, pH 7,4. В очищенных образцах для анализа заменяли буфер на PBS, pH 7,4, с 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 в колонку Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) со скоростью потока 0,3 мл/мин в подвижной фазе PBS с pH 7,4. Элюирование с колонки отслеживали по поглощению на 280 нм. Домены FN3, показывающие высокие уровни агрегации, в соответствии с SEC исключали из дополнительного анализа.

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

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

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR.

Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR, тестировали на их способность ингибировать стимулированное EGF фосфорилирование EGFR в клетках A431 в одной концентрации. Фосфорилирование EGFR отслеживали с помощью набора EGFR phospho (Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Клетки высевали по 20000/лунка на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования

ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка (Gibco), содержащую GlutaMAX™, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco), и позволяли им прикрепиться на ночь при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в течение ночи в условиях голодания в 100 мкл/лунка среды, не содержащей FBS, при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки обрабатывали по 100 мкл/лунка предварительно нагретой (37°C) средой без питательных веществ, содержащей домену FN3, связывающиеся с EGFR, в концентрации 2 мкМ в течение 1 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Контроли обрабатывали только средой без питательных веществ. Клетки стимулировали путем добавления и осторожного перемешивания 100 мкл/лунка подогретой (37°C) среды без питательных веществ, содержащей 100 нг/мл рекомбинантного человеческого EGF (R&D Systems, № по кат. 236-EG) с конечными концентрациями 50 нг/мл EGF, а также 1 мкМ домена FN3, связывающегося с EGFR, и инкубирования при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 15 мин. Один набор контрольных лунок оставляли без стимуляции в качестве отрицательных контролей. Среду полностью удаляли и клетки лизировали при помощи 100 мкл/лунка лизирующего буфера Complete Lysis Buffer (Meso Scale Discovery) в течение 10 мин при комнатной температуре при встряхивании, как описано в инструкциях производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения EGFR, фосфорилированного по тирозиновому остатку 1173 (Meso Scale Discovery), блокировали прилагаемым блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1,5-2 ч. Затем планшеты промывали 4 раза, используя 200 мкл/лунка 1X Tris Wash Buffer (Meso Scale Discovery). Аликвоты клеточных лизатов (30 мкл/лунка) переносили в планшеты для анализа, которые закрывали пленкой для герметизации планшетов (VWR), и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч. Планшеты для анализа промывали 4 раза, по 200 мкл/лунка Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли по 25 мкл ледяного раствора антител для обнаружения (Meso Scale Discovery), стараясь избегать появления пузырей. Планшеты инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч, затем промывали 4 раза по 200 мкл/лунка Tris Wash Buffer. Сигналы обнаруживали путем добавления по 150 мкл/лунка буфера считывания (Meso Scale Discovery) и считывали на приборе SECTOR® Imager 6 000 (Meso Scale Discovery) с использованием заданных производителем параметров для данного анализа по умолчанию. Процентное ингибирование стимулированного EGF положительного контрольного сигнала вычисляли для каждого домена FN3, связывающегося с EGFR.

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

Таблица 4

Домен FN3		Петля BC		Петля FG	
Идентификационный номер клона	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Петля FG	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. Характеризация доменов FN3, связывающихся с EGFR, которые ингибируют связывание EGF.

Крупномасштабная экспрессия, очистка и удаление эндотоксина.

Домены FN3, показанные в табл. 4, подвергли крупномасштабной экспрессии, чтобы обеспечить больше материала для подробной характеристики. Культивируемую в течение ночи культуру, содержащую каждый из вариантов домена FN3, связывающегося 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 плот-

ность ~1,2-1,5 при 600 нм, культуру индуцировали путем добавления IPTG до конечной концентрации 1 мМ и снижали температуру до 30°C. Через 4 ч клетки собирали путем центрифугирования и клеточный осадок хранили при -80°C столько, сколько необходимо.

Для лизирования клеток оттаявший осадок повторно суспендировали в растворе 1X BugBuster® с добавлением 25 Ед./мл Benzonase® (Sigma-Aldrich) и 1 тыс. Ед./мл rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) в соотношении 5 мл BugBuster® на 1 г осадка. Лизирование проводили в течение 1 ч при комнатной температуре с осторожным встряхиванием, затем центрифугировали при 56000×g в течение 50 мин при 4°C. Супернатант отбирали и фильтровали через фильтр 0,2 мкм, после чего наносили на 5-мл колонку HisTrap FF, предварительно доведенную до равновесного состояния при помощи буфера А (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) с использованием хроматографической системы GE Healthcare AKTAExplorer 100s. Колонку промывали буфером А объемом, составляющим 20 объемов колонки, и дополнительно промывали 16% буфером В (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ NaCl, 250 мМ имидазола) объемом, составляющим 6 объемов колонки. Домены FN3 элюировали 50% буфером В объемом, составляющим 10 объемов колонки, а затем градиентом 50-100% буфера В объемом, составляющим 6 объемов колонки. Фракции, содержащие белок домена FN3, объединяли, концентрировали с использованием концентратора Millipore 10K MWCO и фильтровали, после чего наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare), предварительно доведенную до равновесного состояния PBS. Выбирали пик мономерного белка, элюирующийся из эксклюзионной колонки.

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

Определение аффинности выбранных доменов FN3, связывающихся с EGFR, по отношению 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 с 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 мин (для доменов с  $k_{off} \sim 10^{-2} \text{ c}^{-1}$  в соответствии с данными скринингового исследования скорости диссоциации) или 1 ч (для доменов с  $k_{off} \sim 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  или менее). Из данных ответов вычитали два набора эталонных данных: 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 захваченной поверхности с EGFR-Fc с течением времени. Обработанные данные связывания при всех концентрациях для каждого домена FN3 глобально аппроксимировали простой моделью связывания Ленгмюра 1:1 для получения кинетических констант ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и константы аффинности ( $K_D$ ). В табл. 5 показаны кинетические константы для каждого из конструкторов с аффинностью в диапазоне 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/лунка на непрозрачные черные 96-луночные планшеты, позволяя им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Очищенные домены FN3, связывающиеся с EGFR (от 1,5 нМ до 30 мкМ), добавляли к клеткам (50 мкл) в течение 1 ч при комнатной температуре в трех планшетах. Супернатант удаляли и клетки промывали 3 раза, добавляя в лунки буфер для окрашивания при FACS по 150 мкл/лунка. Клетки инкубировали с 50 мкл/лунка конъюгата антител к пентагистидину His-Alexa488 (Qiagen) с разбавлением 1:100 в буфере для окрашивания при FACS в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали 3 раза со 150 мкл/лунка буфером для окрашивания при FACS, после чего к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания при FACS и регистрировали флуоресценцию при 488 нм с использованием считывателя

Ascimen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой "доза-ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений  $EC_{50}$ . В табл. 5 показаны  $EC_{50}$  для каждого из конструкторов в диапазоне от 2,2 нМ до >20 мкМ.

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

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

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

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

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

Ингибирование EGFR-зависимого роста клеток анализировали по измерению жизнеспособности клеток человеческих опухолевых клеточных линий со сверхэкспрессией EGFR, NCI-H292 и NCI-H322 (Американская коллекция типовых культур, № по кат. CRL-1848 и CRL-5806 соответственно) после воздействия доменов FN3, связывающихся с EGFR. Клетки высевали по 500/лунка (NCI-H292) или по 1000/лунка (NCI-H322) на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (Nunc), в среду RPMI (Gibco) 100 мкл/лунка, содержащую GlutaMAX™ и 10 мМ HEPES, с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco), и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5%  $CO_2$ . Клетки обрабатывали фосфатно-буферным соляным раствором (PBS), содержащим разные концентрации доменов FN3, связывающихся с EGFR, по 5 мкл/лунка. Контроли обрабатывали 5 мкл/лунка только PBS или 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты в PBS. Клетки инкубировали при 37°C, 5%  $CO_2$  в течение 120 ч. Жизнеспособные клетки обнаруживали путем добавления 75 мкл/лунка реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 2 мин и инкубацией в темноте при комнатной температуре в течение дополнительных 10 мин. Планшеты считывали на считывателе для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices) в режиме люминесценции с временем считывания 0,5 с/лунка в сравнении с пустой средой. Строили график зависимости процента роста обработанных PBS клеток от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения  $IC_{50}$  определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой "доза-ответ" с переменным наклоном с использованием GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). В табл. 5 показаны значения  $IC_{50}$  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 табл. 5 представлена сводная информация по биологическим свойствам доменов FN3, связывающихся с EGFR, для каждого анализа.

Таблица 5

ID клона домена FN3	SEQ ID NO:	Аффинность к EGFR-Fc (нМ)	Связывание с клетками A431	Конкуренция с EGF на клетках A431	Фосфо-EGFR	Рост NCI-H292	Рост NCI-H322
			EC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>50</sub> (нМ)
P53A1R5-17	18	1,89	4,0	9,8	> 2500	86	65
P54AR4-17	19	9,62	16	21	184	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

Пример 4. Конструирование доменов FN3, связывающихся с EGFR.

Было сконструировано подмножество доменов FN3, связывающихся с EGFR, для увеличения конформационной стабильности каждой молекулы. Мутации L17A, N46V и E86I, для которых было показано улучшение стабильности домена FN3 (описаны в патентной публикации США № US 2011/0274623), были введены 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 анализа стабильности каждого мутанта для сравнения с соответствующей исходной молекулой использовали дифференциальную сканирующую калориметрию в PBS. В табл. 6 показано, что молекулу каждого варианта существенно стабилизировали со средним увеличением  $T_m=18,5^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 6

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

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

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

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

стью ассоциации и более низкой скоростью диссоциации, что позволяет получить по существу меньшее значение  $K_D$ .

Результаты циклов 5, 7 и 9 клонировали с помощью ПЦР в модифицированный вектор pET15 (EMD Biosciences, г. Гиббстаун, штат Нью-Джерси, США), содержащий сайт безлигазного клонирования (pET15-LIC), с использованием праймеров TCON6 (SEQ ID NO: 30) и TCON5 E86I short (SEQ ID NO: 31), а белки экспрессировали как белки с His6-тегом на С-конце после преобразований и индукции IPTG (конечная концентрация 1 мМ, 30°C в течение 16 ч) с использованием стандартных протоколов. Клетки собирали путем центрифугирования и затем лизировали с помощью Bugbuster HT (EMD Biosciences) с добавлением 0,2 мг/мл лизоцима из белка куриного яйца (Sigma-Aldrich). Бактериальные лизаты очищали путем центрифугирования и супернатанты переносили в новые 96-луночные планшеты deep-well Plates (Nunc) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты дважды промывали, используя 300 мкл/луночка трис-буферного раствора с 0,05% Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich) в приборе для промывки планшетов Biotek. Планшеты для анализа блокировали StartingBlock T20 (200 мкл/луночка, Thermo Fisher Scientific, г. Рокленд, штат Иллинойс, США) в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) при встряхивании и повторно дважды промывали 300 мкл TBS-T. Лизаты с доменом FN3 разбавляли в StartingBlock T20 (от 1:10 до 1:100 000) с помощью роботизированной системы Hamilton STARplus. Лизаты (50 мкл/луночка) инкубировали на планшетах для анализа в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Без промывки планшетов добавляли bt-HGF (1 мкг/мл в StartingBlock T20, 50 мкл/луночка, биотинилированный) на 30 мин при комнатной температуре при встряхивании. В контрольные лунки, содержащие лизаты Tencon27, добавляли либо Starting Block T20, либо разбавленный bt-HGF. Затем планшеты промывали четыре раза 300 мкл/луночка TBS-T и инкубировали со 100 мкл/луночка Streptavidin-HRP (1:2000 в TBS-T, Jackson Immunoresearch, г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) в течение 30-40 мин при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты повторно промывали TBS-T четыре раза. Для формирования сигнала на планшет добавляли хемилюминесцентный субстрат, POD Chemiluminescence Substrate (50 мкл/луночка, Roche Diagnostics, г. Индианаполис, штат Индиана, США), полученный в соответствии с инструкциями производителя, и в течение приблизительно 3 мин регистрировали хемилюминесценцию на приборе Molecular Devices M5 с использованием SoftMax Pro. Процентное ингибирование определяли с использованием следующих расчетов:  $100 - ((RLU_{\text{образец}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}}) / (\text{среднее } RLU_{\text{контроль bt-HGF}} - \text{среднее } RLU_{\text{контроль без bt-HGF}})) \times 100$ . Значения процентного ингибирования 50% или более считались успешными.

Высокопроизводительная экспрессия и очистка доменов FN3.

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

Определение  $IC_{50}$  для ингибирования связывания HGF с c-Met.

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

В цикле 5 идентифицировали 35 уникальных последовательностей, показывающих активность при разбавлениях 1:10 со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 0,5 до 1500 нМ. В цикле 7 получали 39 уникальных последовательностей с активностью при разбавлениях 1:100 и значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 0,16 до 2,9 нМ. В цикле 9 идентифицировали 66 уникальных последовательностей, где удачными считались варианты, проявлявшие активность при разбавлениях 1:1000. В цикле 9 (табл. 8) наблюдали значения  $IC_{50}$  лишь 0,2 нМ.

Определение аффинности выбранных доменов FN3, связывающихся с c-Met, по отношению c-Met-Fc (аффинность к EGFR-Fc).

Значения аффинности для выбранных доменов FN3, связывающихся с c-Met, определяли так, как описано в примере 3 применительно к определению аффинности выбранных доменов FN3, связывающихся с EGFR, за исключением того, что в анализах использовали c-Met-Fc.

Пример 6. Характеризация доменов FN3, связывающихся с c-Met и ингибирующих связывание HGF.

Домены FN3 экспрессировали и очищали, как описано выше в примере 2. Эксклюзионную хроматографию и кинетический анализ проводили так, как описано выше в примерах 1 и 2 соответственно. В табл. 7 показаны 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	TEYVNVILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYVVTILGV	KGGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVNVILGV	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	TEYVNVIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV
P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVNVIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGE	TEYVNVIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LLSTGE	TEYVNVIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVNVIMGV	KGGSISP

Остатки петли С соответствуют остаткам 28-37 указанной SEQ ID NO. Остатки тяжа CD соответствуют остаткам 38-43 указанной SEQ ID NO. Остатки петли F соответствуют остаткам 65-74 указанной SEQ ID NO. Остатки петли FG соответствуют остаткам 75-81 указанной 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 кат. НТВ-174, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США) высевали по 20000/лунка на покрытые поли-D-лизином черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США) и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Очищенные домены FN3 (50 мкл/лунка; 0-1000 нМ) добавляли к клеткам на 1 ч при 4°C на двух планшетах. Супернатанты удаляли и клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка, BD Biosciences, № по кат. 554657). Клетки инкубировали с биотинилированным антителом к HIS (с разбавлением 1:160 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл/лунка, R&D Systems, № по кат. BAM050) в течение 30 мин при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка), после чего инкубировали с конъюгированными антителами к мышинному IgG<sub>1</sub>-Alexa488 (с разбавлением 1:80 в буфере для окрашивания при FACS, 50 мкл/лунка, Life Technologies, № по кат. A21121) в течение 30 мин при 4°C. Клетки трижды промывали буфером для окрашивания при FACS (150 мкл/лунка) и оставляли в буфере для окрашивания при FACS (50 мкл/лунка). Определяли полную флуоресценцию на считывателе Acumen eX3. Строили график зависимости необработанного сигнала флуоресценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и аппроксимировали сигмовидной кривой "доза-ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) для вычисления значений EC<sub>50</sub>. Было обнаружено, что домены FN3 показывают диапазон значений активности связывания со значениями EC<sub>50</sub> от 1,4 до 22,0 нМ, как показано в табл. 8.

Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования с-Met.

Очищенные домены FN3 тестировали на их способность ингибировать стимулированное HGF фосфорилирование с-Met в NCI-H441 с использованием набора с-Met phospho(Tyr1349) производства Meso Scale Discovery (г. Гейтерсберг, штат Мэриленд, США). Клетки высевали по 20000/лунка на прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани, в среду RPMI 100 мкл/лунка (содержащую Glutamax и HEPES, Life Technologies), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; Life Technologies) и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду полностью удаляли и клетки выдерживали в условиях голодания в бессывороточной среде RPMI (100 мкл/лунка) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI (100 мкл/лунка), содержащую домены FN3 в концентрации 20 мкМ и ниже, на 1 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Контроли обрабатывали только средой. Клетки стимулировали 100 нг/мл рекомбинантного человеческого HGF (100 мкл/лунка, R&D Systems, № по кат. 294-HGN) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 15 мин. Один набор контрольных лунок оставляли без стимуляции в качестве отрицательных контролей. Среду полностью удаляли и лизировали клетки полным лизирующим буфером Complete Lysis Buffer (50 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) в течение 10 мин при комнатной температуре со встряхиванием в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты для анализа, предназначенные для измерения фосфорилированного с-Met, блокировали прилагаемым блокирующим раствором в соответствии с инструкциями производителя при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем планшеты трижды промывали Tris Wash Buffer (200 мкл/лунка, Meso Scale Discovery). Клеточные лизаты (30 мкл/лунка) наносили на планшеты для анализа и инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 ч. Затем планшеты для анализа четырехкратно промывали Tris Wash Buffer, после чего в каждую лунку добавляли ледяной раствор антител для обнаружения (25 мкл/лунка,

Meso Scale Discovery) на 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием. Планшеты повторно четырехкратно промывали Tris Wash Buffer. Сигналы обнаруживали путем добавления буфера 150 Read Buffer (150 мкл/лунка, Meso Scale Discovery) и считывания на приборе SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с использованием заданных производителем параметров для данного анализа по умолчанию. Строили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма молярной концентрации домена FN3 и определили значения  $IC_{50}$  путем аппроксимации данных сигмовидной кривой "доза-ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. Было обнаружено, что домены FN3 ингибировали фосфорилирование c-Met со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 4,6 до 1415 нМ, как показано в табл. 8.

Ингибирование роста или жизнеспособности человеческих опухолевых клеток.

Ингибирование c-Met-зависимого роста клеток анализировали путем измерения жизнеспособности клеток U87-MG (Американская коллекция типовых культур, № по кат. НТВ-14) после воздействия доменов FN3, связывающихся с c-Met. Клетки высевали по 8000/лунка на непрозрачные белые 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования ткани (Nunc), в среду RPMI 100 мкл/лунка с добавлением 10% FBS и позволяли им прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 ч после высевания среду отсасывали и к клеткам добавляли свежую бессывороточную среду RPMI. Через 24 ч после обработки бессывороточной средой клетки обрабатывали путем добавления бессывороточной среды, содержащей домену FN3, связывающейся с c-Met (30 мкл/лунка). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. Жизнеспособные клетки обнаруживали путем добавления 100 мкл/лунка реагента CellTiter-Glo® (Promega) с последующим перемешиванием на шейкере для планшетов в течение 10 мин. Планшеты считывали на считывателе для планшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices), настроенном на режим люминесценции, с временем считывания 0,5 с/лунка. Строили график зависимости исходных единиц люминесценции (RLU) от логарифма молярной концентрации домена FN3. Значения  $IC_{50}$  определяли путем аппроксимации данных уравнением сигмовидной кривой "доза-ответ" с переменным наклоном при помощи GraphPad Prism 4. В табл. 8 показаны значения  $IC_{50}$  в диапазоне от 1 до >1000 нМ. Характеристики доменов FN3, связывающихся с c-Met, обобщены в табл. 8.

Таблица 8

Клон	SEQ ID NO	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)
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

Термостабильность доменов FN3, связывающихся с c-Met.

Для анализа стабильности каждого домена FN3 использовали дифференциальную сканирующую калориметрию в PBS. Результаты эксперимента показаны в табл. 9.

Таблица 9

Клон		Термостабильность (T <sub>m</sub> , °C)
Название	SEQ ID NO:	
P114AR5P74-A5	32	74,1
P114AR5P75-E9	33	Н/о
P114AR7P92-F3	34	81,5
P114AR7P92-F6	35	76,8

P114AR7P92-G8	36	90,9
P114AR7P92-H5	37	87
P114AR7P93-D11	38	H/o
P114AR7P93-G8	39	76,8
P114AR7P93-H9	40	88,2
P114AR7P94-A3	41	86,2
P114AR7P94-E5	42	80
P114AR7P95-B9	43	86,3
P114AR7P95-D3	44	82
P114AR7P95-D4	45	85,3
P114AR7P95-E3	46	94,2
P114AR7P95-F10	47	85,2
P114AR7P95-G7	48	87,2
P114AR7P95-H8	49	83

Пример 7. Создание и характеристика биспецифических к EGFR/c-Met молекул.

Создание биспецифических к EGFR/c-Met молекул.

Множество комбинаций 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, показанную в SEQ ID NO: 107-110, и домены FN3, связывающиеся с c-Met, имеющие аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 111-114. Были созданы синтетические гены, кодирующие аминокислотные последовательности, описанные в SEQ ID NO: 50-72 и 106 (табл. 10), так чтобы обеспечить соблюдение следующего формата: домен FN3, связывающийся с EGFR, затем пептидный линкер, затем домен FN3, связывающийся с c-Met. Для обеспечения очистки на С-конце встроили полигистидиновый тег. Помимо данных молекул, описанных в табл. 10, линкер между двумя доменами FN3 варьировали по длине, композиции последовательности и структуре в соответствии с перечисленным в табл. 11. Предусмотрена возможность использования ряда других линкеров для соединения таких доменов FN3. Биспецифические к EGFR/c-Met молекулы экспрессировали и очищали из *E. coli*, как описано применительно к моноспецифическим к EGFR или к c-Met доменам FN3, с использованием стадий ИМАС и гель-проникающей хроматографии.

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
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB5	54	P53A1 R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB6	55	P53A1 R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB7	56	P53A1 R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) <sub>4</sub>	79
ECB15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB60	59	P53A1 R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB37	60	P53A1 R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121 -A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB106	65	P54AR4-83v23	109	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB107	66	P54AR4-83v23	109	P114AR9P121 -A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB108	67	P54AR4-83v23	109	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB109	68	P54AR4-83v23	109	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB118	69	P53A1 R5-17v22	110	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB119	70	P53A1 R5-17v22	110	P114AR9P121 -A6v2	112	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB120	71	P53A1 R5-17v22	110	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB121	72	P53A1 R5-17v22	110	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB91	106	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB18	118	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB28	119	P53A1 R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB38	120	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81
ECB39	121	P53A1 R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) <sub>5</sub>	81

Таблица 11

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

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

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

Домен FN3 с низкой аффинностью к с-Met ингибировал фосфорилирование с-Met со значением  $IC_{50}$ , равным 610 нМ (фиг. 4). Как и ожидалось, домен FN3, связывающийся с EGFR, не был способен ингибировать фосфорилирование с-Met, а смесь моноспецифических молекул выглядела идентично одному домену FN3, связывающемуся с с-Met. Однако биспецифическая к EGFR/с-Met молекула ингибировала фосфорилирование с-Met с  $IC_{50}$ , равным 1 нМ (фиг. 4), т.е. с обеспечением сдвига эффективности более чем на 2 порядка относительно одной моноспецифической к с-Met молекулы.

Потенциал биспецифической к EGFR/с-Met молекулы в отношении увеличения ингибирования фосфорилирования с-Met и/или EGFR посредством эффекта avidности оценивали на множестве типов клеток с различными значениями плотности и соотношениями с-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 ч среду заменяли на бессывороточную RPMI. Через 24 ч после бессывороточной среды клетки обрабатывали разными концентрациями моноспецифического домена FN3, связывающегося с EGFR, моноспецифического домена FN3, связывающегося с с-Met, или биспецифической к EGFR/с-Met молекулы (ECB5, образован из P53A1R5-17v2 и P114AR7P94-A3). Клетки обрабатывали в течение 1 ч моноспецифическими или биспецифическими молекулами, а затем стимулировали EGF, HGF или комбинацией EGF и HGF в течение 15 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки лизировали лизирующим буфером MSD и анализировали сигнализацию в клетках с использованием соответствующих планшетов для анализа MSD в соответствии с инструкциями производителя, как описано выше.

На фиг. 5A-5C показано ингибирование EGFR с помощью моноспецифического домена FN3, связывающегося с EGFR, по сравнению с биспецифической к EGFR/с-Met молекулой в трех разных клеточных линиях. Для анализа avidности в анализе на фосфорилирование EGFR домен FN3, связывающийся с EGFR со средней аффинностью (1,9 нМ) (P53A1R5-17v2), сравнивали с биспецифической к EGFR/с-Met молекулой, содержащей тот же домен FN3, связывающийся с EGFR, соединенный с доменом FN3, связывающимся с с-Met с высокой аффинностью (0,4 нМ) (P114AR7P94-A3). В клетках NCI-H292 и H596 ингибирование фосфорилирования EGFR для моноспецифических и биспецифических молекул было сопоставимым (фиг. 5A и 5B), вероятно, вследствие того, что данные клеточные линии имели высокое соотношение рецепторов EGFR и с-Met. Для проверки данной теории оценивали ингибирование фосфорилирования EGFR в клетках NCI-H441, содержащих больше рецепторов с-Met, чем EGFR. Обработка клеток NCI-H441 биспецифической к EGFR/с-Met молекулой снижала  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования EGFR по сравнению с моноспецифическим доменом FN3, связывающимся с EGFR, в 30 раз (фиг. 5C).

Потенциал увеличения эффективности в случае биспецифической к EGFR/с-Met молекулы оценивали в анализе фосфорилирования с-Met с использованием молекулы с высокой аффинностью к EGFR (0,26 нМ) и средней аффинностью к с-Met (10,1 нМ). Как в клетках NCI-H292, так и в клетках NCI-H596 ингибирование фосфорилирования с-Met биспецифической молекулой было увеличено по сравнению с моноспецифическим 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 к 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 к EGFR/с-Met молекулой. Как описано в табл. 12 и 13, значения  $IC_{50}$  для фосфорилирования ERK (табл. 12) и пролиферации клеток NCI-H292 (табл. 13) были снижены при обработке клеток биспецифической к EGFR/с-Met молекулой по сравнению с моноспецифическими связывающимися соединениями.  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования ERK биспецифической к EGFR/с-Met молекулой было в 143 раза ниже, чем в случае смеси двух моноспецифических к EGFR и с-Met доменов FN3, что демонстрирует влияние avidности на эффективность молекул в данном анализе. В табл. 12 моноспецифические домены FN3, связывающиеся с EGFR и 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 в виде связанных в биспецифический формат.  $IC_{50}$  для ингибирования пролиферации для биспецифической к EGFR/с-Met молекулы было в 34-236 раза 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 5), преобразуется в улучшение ингибирования сигнализации в клетках (табл. 12) и пролиферации (табл. 13).

Таблица 12

Специфичность молекулы, содержащей домены FN3	Название клона	Тип	IC <sub>50</sub> (нМ) (фосфорилирование ERK)
EGFR	P54AR4-83v2	Моноспецифическая	> 10 000
c-Met	P114AR5P74-A5	Моноспецифическая	2366
EGFR или c-Met	P54AR4-83v2 + P114AR5P74-A5	Смесь моноспецифических молекул	798,4
EGFR и c-Met	ECB1	Биспецифическая молекула	5,6

Таблица 13

Домен FN3, связывающийся с EGFR (аффинность)	Домен FN3, связывающийся с c-Met (аффинность)	IC <sub>50</sub> для смеси моноспецифических молекул (нМ)	IC <sub>50</sub> для биспецифической молекулы (нМ)	Кратность увеличения IC <sub>50</sub> для смеси моноспецифических/ биспецифических
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*: фармакокинетика/фармакодинамика (ФК/ФД).

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

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

Фосфорилированные c-Met, EGFR и ERK измеряли при помощи планшетов для анализов MesoScale Discovery (в соответствии с протоколом производителя и приведенным выше описанием).

На фиг. 6 показаны результаты экспериментов. Каждая биспецифическая к 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, а также то, как аффинность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы для каждого рецептора 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<sub>D</sub>=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<sub>D</sub>=1,9 нМ), как через 6 ч, так и через 72 ч. Все четыре протестированные биспецифические молекулы полностью ингибировали фосфорилирование ERK в момент времени через 6 ч независимо от аффинности. Через момент времени 72 ч молекулы, содержащие домен, связывающийся с c-Met с высокой аффинностью (P114AR7P94-A3; показан на фигуре как элемент A3, K<sub>D</sub>=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<sub>D</sub>=10,1 нМ; фиг. 6).

Концентрацию каждой биспецифической к EGFR/c-Met молекулы измеряли через 6 и 72 ч после введения в крови и в опухоли (фиг. 7). Интересно, что биспецифическая молекула с доменом, связывающимся с EGFR со средней аффинностью (P53A1R5-17v2; K<sub>D</sub>=1,9 нМ), но с доменом FN3, связывающимся с c-Met с высокой аффинностью (P114AR7P94-A3; K<sub>D</sub>=0,4 нМ), демонстрировала существенно боль-

шее накопление через 6 ч относительно других молекул, хотя различие исчезало к 72 ч. Можно предположить, что клетки за пределами опухоли имеют на поверхности более низкие уровни 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 значений аффинности к каждому рецептору может позволить обнаружить терапевтическое средство со сниженными значениями системной токсичности и повышенным накоплением в опухоли.

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

Мышей SCID Beige подкожно инокулировали клетками NCI-H292, экспрессирующими человеческий HGF ( $2,0 \times 10^6$  клеток в Cultrex (Trevigen), 200 мкл), в дорсальную часть бока каждого животного. Через одну неделю после имплантации мышей делили на группы с эквивалентными объемами опухолей (средний объем опухоли =  $77,9 \pm 1,7$  мм<sup>3</sup>). Мышам три раза в неделю вводили биспецифические молекулы и дважды в неделю регистрировали объем опухоли.

Ингибирование роста опухоли (TGI) наблюдали при использовании четырех разных биспецифических молекул с разными значениями аффинности к c-Met и EGFR. На фиг. 8 показано преимущество 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 по сравнению с P53A1R5-17-P114AR5P74-A5). Кроме того, данные показывают значимость наличия домена FN3, связывающегося с c-Met с высокой аффинностью, поскольку биспецифические молекулы, содержащие домены FN3, связывающиеся с EGFR либо с высокой, либо со средней аффинностью, но домен FN3, связывающийся с c-Met с высокой аффинностью, показал наибольшую эффективность (пунктирные серые и черные линии, P54AR4-83v2-P114AR7P94-A3 и P53A1R5-17v2-P114AR7P94-A3).

Эффективность биспецифической молекулы и других ингибиторов EGFR и c-Met.

Терапевтическую эффективность *in vivo* биспецифической к EGFR/c-Met молекулы (ECB38) и низкомолекулярных ингибиторов кризотиниба (ингибитор c-Met) и эрлотиниба (ингибитор EGFR), цетуксимаба (антитело к EGFR), каждого по отдельности, а также комбинации кризотиниба и эрлотиниба оценивали в модели подкожной ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF у мышей 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% CO<sub>2</sub>. Клетки регулярно пересеивали дважды в неделю с обработкой трипсин-ЭДТА. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

Для развития опухоли каждой мыши подкожно инокулировали опухолевые клетки в область правого бока H292-HGF ( $2 \times 10^6$ ) в 0,1 мл PBS с Cultrex (1:1). Лечение начинали, когда средний размер опухоли достигал 139 мм<sup>3</sup>. Введение тестового продукта и число животных в каждой экспериментальной группе показаны в следующей таблице плана эксперимента. Дату инокуляции опухолевыми клетками обозначали как 0 сутки. В табл. 14 показаны группы лечения.

Таблица 14

Группа	N	Лечение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Плановый график	Фактический график
1	10	Контроль носителем	0	<i>u/n</i>	QD × 3 недели	QD × 3 недели
2	10	Биспецифическая к EGFR/c-Met молекула	25	<i>u/n</i>	3 раза в неделю × 3 недели	3 раза в неделю × 3 недели
3	10	Кризотиниб	50	<i>n/o</i>	QD × 3 недели	QD × 17 суток
4	10	Эрлотиниб	50	<i>n/o</i>	QD × 2 недели	QD × 3 недели
5	10	Кризотиниб	50	<i>n/o</i>	QD × 3 недели	QD × 3 недели
6	10	Цетуксимаб	1 мг/мышь	<i>u/n</i>	Q4d x 6	Q4d x 6

N: число животных;

*n/o*: пероральное введение;

*u/n*: интраперитонеальная инъекция 3 раза в неделю: введение доз в 1, 3 и 5 сутки недели;

QD: один раз в сутки;

Q4d: один раз в четверо суток;

интервал для комбинации кризотиниба и эрлотиниба составлял 0,5 ч;

объем введения корректировался с учетом веса тела (10 л/г);

*a*: дозу не давали на 14 сутки после разбиения на группы.

Перед началом лечения всех животных взвешивали и измеряли объемы опухолей. Поскольку объем опухоли может влиять на эффективность любого заданного лечения, мышей распределяли по группам в

соответствии с планом с рандомизированными блоками на основе их объемов опухолей. Это гарантирует, что все группы в исходном состоянии будут сопоставимы. Для распределения экспериментальных животных по группам применяли план с рандомизированными блоками. Во-первых, экспериментальных животных делили на однородные блоки в соответствии с их исходным размером опухолей. Во-вторых, в пределах каждого блока проводили рандомизацию экспериментальных животных по типам лечения. Распределение экспериментальных животных с использованием плана с рандомизированными блоками гарантирует, что у всех животных имеется одинаковая вероятность получения заданного типа лечения, и, следовательно, снижается систематическая ошибка.

Во время регулярного контроля у животных проверяли наличие каких-либо воздействий роста опухоли и видов лечения на нормальное поведение, например, на подвижность, визуальную оценку потребления корма и воды, прирост/потерю веса тела (вес тела измеряли дважды в неделю), помутнение глаз/шерсти и любые другие аномальные эффекты.

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; объем выражали в мм<sup>3</sup> с использованием формулы  $V=0,5 a \times b^2$ , где  $a$  и  $b$  представляют собой большой и малый диаметры опухоли соответственно. Затем размер опухоли использовали для вычислений значений как  $T - C$ , так и  $T/C$ . Вычисляли значение  $T - C$ , где  $T$  - время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в группе лечения достигла 1000 мм<sup>3</sup>, а  $C$  - время (в сутках), необходимое для того, чтобы опухоль среднего размера в контрольной группе достигла того же размера. Значение  $T/C$  (в процентах) представляло собой показатель противоопухолевой эффективности;  $T$  и  $C$  представляли собой средний объем опухоли в группе лечения и контрольной группе соответственно в заданные сутки. Полную регрессию опухоли (CR) определяли как уменьшение опухоли до предела, который не обнаруживается при пальпации (62,5 мм<sup>3</sup>). Частичную регрессию опухоли (PR) определяли как уменьшение опухоли относительно исходного объема опухоли. Чтобы CR или PR расценивались как устойчивые, требовалось, чтобы CR или PR определялись минимум в течение трех или более последовательных измерений опухоли.

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

В табл. 15 показана сводная статистика, включающая среднее и стандартную погрешность среднего (СПС) для объема опухоли в каждой группе и в каждый момент времени. Статистические анализы различий в объеме опухоли между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими отдельными сравнениями с использованием критерия Геймса-Хоуэлла (не предполагающим равные дисперсии). Все данные анализировали с использованием SPSS 18.0. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

Таблица 15

Сутки	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )а					
	Носитель	Биспецифическая к 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 лечение носителем (группа 1), достиг 1758 мм<sup>3</sup> на 23 сутки после инокуляции опухоли. Лечение биспецифической к EGFR/c-Met молекулой при уровне дозы 25 мг/кг (группа 2) приводило к полной регрессии опухоли (CR) у всех мышей, которая была устойчива при >3 последовательных измерениях опухоли (среднее значение объема опухоли 23 мм<sup>3</sup>, значение  $T/C=1\%$ ,  $p=0,004$ , в сравнении с группой с носителем, на 23 сутки).

Лечение кризотинибом в виде единственного агента при уровне дозы 50 мг/кг (группа 3) не показало противоопухолевой активности; средний размер опухоли составил 2102 мм<sup>3</sup> на 23 сутки (значение  $T/C=120\%$ ,  $p=0,944$  по сравнению с группой с носителем).

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



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

Цетуксимаб при уровне дозирования 1 мг/мышь в качестве единственного агента (группа 6) показал существенную противоопухолевую активность; средний размер опухоли составил 485 мм<sup>3</sup> на 23 сутки (T/C=28%, p=0,018) с замедлением роста опухоли при 1000 мм<sup>3</sup> на 17 суток по сравнению с группой с носителем. На фиг. 15 и в табл. 16 показаны значения противоопухолевой активности различных терапевтических средств.

Таблица 16

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

В группе с носителем наблюдали потерю веса от средней до высокой тяжести, что может быть связано с увеличением влияния опухоли; 3 мыши погибли, а 1 мышь усыпили при потере веса > 20% к 23 суткам. В группе 2 наблюдали небольшую токсичность биспецифической к EGFR/c-Met молекулы; 3 мышей усыпили при потере веса >20% в период лечения; вес тела постепенно восстановился после отмены лечения в течение 2-недельного периода наблюдения. Более тяжелую потерю веса наблюдали в группе монотерапии кризотинибом или эрлотинибом по сравнению с группой с носителем, 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 в период отсутствия лечения. Монотерапия цетуксимабом в настоящем исследовании хорошо переносилась; потерю веса наблюдали только к концу исследования из-за продолжения роста опухоли.

Таким образом, биспецифическая к EGFR/c-Met молекула при 25 мг/кг (3 раза в неделю×3 недели) обеспечивала полный ответ в модели ксенотрансплантации клеток человеческого рака легких H292-HGF мышам 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. Продление периода полужизни биспецифических к EGFR/c-Met молекул.

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

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

Помимо пегилирования, период полужизни биспецифических к EGFR/c-Met молекул продлевали путем формирования данных белков в виде слитных молекул с встречающимся в естественных условиях 3-спиральным связывающимся с сывороточным альбумином 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 табл. 12. Домен ABD или ABDCon также можно помещать в первичную последовательность между доменом FN3, связывающимся с EGFR, и доменом FN3, связывающимся с c-Met.

Пример 9. Характеризация биспецифических к EGFR/c-Met молекул.

Выбранные биспецифические к EGFR/c-Met молекулы характеризовали по их аффинности как к

EGFR, так и к с-Met, по их способности ингибировать аутофосфорилирование EGFR и с-Met и по их влиянию на пролиферацию клеток HGF. Аффинность связывания биспецифических к EGFR/с-Met молекул с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR и/или с-Met дополнительно оценивали методами поверхностного плазмонного резонанса с помощью прибора Proteon (BioRad) в соответствии с протоколом, описанным в примере 3. Результаты характеризации показаны в табл. 17.

Таблица 17

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

Пример 10. Создание биспецифических к EGFR/с-Met антител.

Несколько моноспецифических к EGFR и с-Met антител экспрессировали в виде IgG<sub>1</sub>, каппа, имеющего Fc-замены K409R или F405L в их Fc-участках (нумерация соответствует каталогу ЕС). Моноспецифические антитела экспрессировали в двух клеточных линиях CHO, причем одна линия имела сниженную способность к фукозилрованию, что позволило получить антитела с содержанием фукозы в полисахаридной цепи антитела 1-15%.

Моноспецифические антитела очищали с помощью стандартных способов с использованием колонки с белком А (колонка HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Биспецифические к EGFR/с-Met антитела создавали, объединяя моноспецифическое mAb к EGFR и моноспецифическое mAb к с-Met во время обмена Fab-плечами *in vitro* (как описано в WO 2011/131746). Вкратце, приблизительно 1-20 мг/мл каждого антитела в молярном соотношении 1:1 в PBS, pH 7-7,4 и 75 мМ 2-меркаптоэтанолamina (2-МЕА) смешивали вместе и инкубировали при 25-37°C в течение 2-6 ч, после чего удаляли 2-МЕА посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и фильтрации в вихревой ячейке с помощью стандартных способов.

Несколько моноспецифических антител к EGFR и антител к с-Met объединяли во время обмена Fab-плечами *in vitro* в матриксе с созданием биспецифических антител, которые впоследствии дополнительно характеризовали. Созданные биспецифические антитела ранжировали с применением четырехстадийной стратегии с помощью указанных ниже анализов.

Стадия 1: связывание с клетками NCI-H441, NCI-H1975 и A549 в анализе FACS (сортировка клеток с возбуждением флуоресценции).

Стадия 2: ингибирование фосфорилирования pMet в клетках A549.

Стадия 3: ингибирование пролиферации клеток NCI-H1975, KP4 и NCI-H441.

Стадия 4: ингибирование фосфорилирования EGFR в клетках A549 и SNU-5.

Следует отметить, что характеристики исходных антител в биспецифическом антителе не сохранялись. Например, присутствие некоторых связывающихся с EGFR плеч в биспецифическом антителе приводило к утрате или снижению ингибирования или к усилению фосфорилирования с-Met. Пары отобрали на основе характеристических исследований.

Было создано моноспецифическое двухвалентное антитело к EGFR, E1-K409R, содержащее участки VH и VL антитела к EGFR 2F8, имеющего VH с SEQ ID NO: 189 и VL с SEQ ID NO: 190 (антитело 2F8 описано в международной патентной публикации № WO 2002/100348) и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой K409R.

Было создано моноспецифическое двухвалентное антитело к EGFR, E1-F405L, содержащее участки VH и VL антитела к EGFR 2F8, имеющего VH с SEQ ID NO: 189 и VL с SEQ ID NO: 190 (антитело 2F8 описано в международной патентной публикации № WO 2002/100348) и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой F405L.

Было создано моноспецифическое двухвалентное антитело к EGFR, E2-K409R, содержащее участки VH и VL антитела к EGFR 018, имеющего VH с SEQ ID NO: 191 и VL с SEQ ID NO: 192 (антитело 018 описано в международной патентной публикации № WO 2009/030239) и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой K409R.

Было создано моноспецифическое двухвалентное антитело к EGFR, E2-F405L, содержащее участки VH и VL антитела к EGFR 018, имеющего VH с SEQ ID NO: 191 и VL с SEQ ID NO: 192 (антитело 018

описано в международной патентной публикации № WO 2009/030239) и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой F405L.

Было создано моноспецифическое двухвалентное антитело к с-Met, M1-K409R, содержащее участки VH и VL антитела к с-Met 069, имеющего VH с SEQ ID NO: 193 и VL с SEQ ID NO: 194 (антитело 069 описано в WO 2011/110642), и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой K409R.

Было создано моноспецифическое двухвалентное антитело к с-Met, M1-F405L, содержащее участки VH и VL антитела к с-Met 069, имеющего VH с SEQ ID NO: 193 и VL с SEQ ID NO: 194 (антитело 069 описано в WO 2011/110642), и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой F405L.

Было создано моноспецифическое антитело к с-Met, M2-K409R, содержащее участки VH и VL антитела к с-Met 058, имеющего VH с SEQ ID NO: 195 и VL с SEQ ID NO: 196 (антитело 058 описано в WO 2011/110642), и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой K409R.

Было создано моноспецифическое антитело к с-Met, M2-F405L, содержащее участки VH и VL антитела к с-Met 058, имеющего VH с SEQ ID NO: 195 и VL с SEQ ID NO: 196 (антитело 058 описано в WO 2011/110642), и константный участок IgG<sub>1</sub> с заменой F405L.

Последовательности VH, VL, HC и LC антител показаны ниже:

> SEQ ID NO: 189, mAb к EGFR E1 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLVTVS  
S

> SEQ ID NO: 190, mAb к EGFR E1 VL

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSALVWYQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSES  
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQFNYSYPLTFGGGTKVEIK

> SEQ ID NO: 191, mAb к EGFR E2 VH

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKLEWVAN IKKDGSEKYY  
VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWWYFDL

WGRGTLTVSS

> SEQ ID NO: 192, mAb к EGFR E2 VL

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASN RATGIPARFSGSGSGTD FTLTISL EPEDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK

> SEQ ID NO: 193, mAb к c-Met M1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFSTYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTNYAQ  
KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLTVTVSS

> SEQ ID NO: 194, mAb к c-Met M1VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSG  
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP-ITFGQGTRLEIK

> SEQ ID NO: 195, mAb к c-Met M2 VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRELVVATISDDGSYTYYPDS  
VKGRFTISRDNKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYGSGSYNQDYWGQGLTVTVSS

> SEQ ID NO: 196 c-Met mAb M2 VL

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQFTSYPIQITFGQGTRLEIK

> SEQ ID NO: 199, EM1-mAb H1 (антитело к EGFR<sub>405L</sub>)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSAAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 200, EM-1 mAb L1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISALVWYQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSES  
GTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVT  
HQLLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 201, EM-1 mAb H2 (K409R, антитело к c-Met)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFSTYSIGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTNYAQ  
 KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLTVTVSSASTKGP  
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSP  
 GK

> SEQ ID NO: 202, EM-1 mAb L2

DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSG  
 SGTDFLTITISLQPEDFATYYCQANSFPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
 LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTH  
 HQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 234, E2-mAb HC1 (EGFR-F405L)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY  
 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL  
 GWGWWYFDLWGRGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 235, E2-mAb LC1 (EGFR)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
 ASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISLLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQ  
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
 QDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 236, E2-mAb HC2 (c-Met-K409R)

EVQLVESGGGLV KPGGSLKLSAASGFTFS DYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDDGSYTYYPDS  
 VKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYYGSGSYNQDYWGQGLTVTVSS  
 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVTVVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ  
 KLSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 237

E2-mAb LC2 (c-Met)

QLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSG  
 TDFLTITISLQPEDFATYYCQFTSYPIITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
 LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTH  
 QGLSSPVTKSFNRGEC

Созданные моноспецифические антитела к EGFR и c-Met смешивали для обмена Fab-плечами *in vitro* в матриксе и охарактеризовывали с помощью различных анализов. Биспецифическое антитело EM1-mAb содержит связывающееся с EGFR плечо mAb E1-F405L и связывающееся с c-Met плечо mAb M1-K409R. Биспецифическое антитело EM2-mAb содержит связывающееся с EGFR плечо mAb E2-F405L и связывающееся с c-Met плечо mAb M2-K409R. Биспецифическое антитело EM3-mAb содержит связывающееся с EGFR плечо mAb E1-K409R и связывающееся с c-Met плечо mAb M1-F405L. Биспецифическое антитело EM4-mAb содержит связывающееся с EGFR плечо mAb E2-K409R и связывающееся с c-Met плечо mAb M2-F405L. EM1-mAb и EM3-mAb имели сопоставимые характеристики.

Биспецифическое антитело EM1-mAb культивировали в клеточной линии CHO, имеющей сниженную способность к фукозилированию гликопротеинов, и которое, следовательно, имело содержание фукозы приблизительно 1-15%. Удаление центральной фукозы из 2-антенарных олигосахаридов комплексного типа, присоединенных к Fc-участкам, существенно усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания с FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или комплемент-зависимой (CDC) активности. Такие mAb можно получить с помощью разных способов, которые, по сообщениям, приводят к успешной экспрессии терапевтических антител с относительно высоким дефукозилированием, ко-

торые содержат описанные выше 2-антенарные олигосахариды комплексного типа в Fc-участках.

Пример 11. Очистка биспецифических к EGFR/c-Met антител.

Биспецифическое антитело EM1-mAb дополнительно очищали после обмена Fab-плечами *in vitro* при помощи хроматографии с гидрофобным взаимодействием для сведения к минимуму остаточного содержания исходных антител к с-Met и EGFR с помощью стандартных способов.

Пример 12. Характеризация биспецифических к EGFR/c-Met антител.

В различных анализах тестировали характеристики биспецифического к EGFR/c-Met антитела EM1-mAb, включая ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR, стимулированного HGF фосфорилирования с-Met, фосфорилирования ERK1/2, фосфорилирования АКТ, ингибирования связывания лиганда и жизнеспособности клеток. Характеристики EM1-mAb сравнивали с контрольными одновалентными связывающимися с EGFR или с-Met антителами, а также с известными ингибиторами EGFR, такими как эрлотиниб (CAS 183321-74-6; ингибитор тирозинкиназ) и цетуксимаб (CAS 205923-56-4).

Так как антитела, являющиеся исходными для mAb EM-1 антителами, являются двухвалентными, контрольные одновалентные антитела к EGFR и с-Met были созданы в биспецифическом формате в комбинации с Fab-плечом, связывающим неродственный/несвязанный антиген, для более точного сравнения синергии и авидности биспецифического mAb EM-1 со смесью соответствующих контрольных одновалентных молекул.

Для создания контрольных одновалентных антител к EGFR и с-Met было создано моноспецифическое антитело к gp120 ВИЧ, gp120-K409R, содержащее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 198 и легкую цепь с SEQ ID NO: 209. Было создано моноспецифическое антитело к gp120 ВИЧ, gp120-F405L, содержащее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 197 и легкую цепь с SEQ ID NO: 209.

Контрольное одновалентное mAb к EGFR, E1-F405L-gp120-K409R, создали путем обмена Fab-плечами *in vitro* между E1-F405L и gp120-K409R, а контрольное одновалентное mAb к с-Met, M1-K409R-gp120-F405L, создали путем обмена Fab-плечами *in vitro* между M1-K409R и gp120-F405L и очистили так, как описано ранее.

Для характеристики биспецифических антител использовали следующие клеточные линии: NCI-H292 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), № по кат. CRL-1848), NCI-H1975 (ATCC, № по кат. CRL-5908), SKMES-1 (ATCC, № по кат. HTB-58), A431 (ATCC, № по кат. CRL-1555), NCI-H441 (ATCC, № по кат. HTB-174), NCI-H3255 (хранилище опухолевых/линейных клеток DCTD, NCI, Frederick, NCI-Navy Medical oncology Cell Line supplement. J. Cell Biochem suppl 24, 1996; Tracy S. Cancer Res. 64:7241-4, 2004; Shimamura T. Cancer Res. 65:6401-8, 2005) и HCC-827 (ATCC, № по кат. CRL-2868). Клетки NCI-H292 и SKMES-1 экспрессируют как EGFR дикого типа, так и с-Met дикого типа. NCI-3255 экспрессирует мутант L858R EGFR и проявляет амплификацию EGFR и с-Met. H1975 экспрессирует мутант L858R/T790M EGFR и с-Met дикого типа. HCC-827 экспрессирует Δ (E746, A750) EGFR и проявляет амплификацию EGFR. Клеточные линии NCI-H292, NCI-H975, NCI-H441 и NCI-H3255 в настоящем описании на взаимозаменяемой основе называются соответственно H292, H975, H441 и H3255.

Связывание биспецифических к EGFR/c-Met антител с EGFR и с-Met на клетках (анализ связывания с клетками A431).

Биспецифическое к EGFR/c-Met антитело EM1-mAb тестировали на связывание с EGFR и с-Met на клетках с помощью протокола, описанного в примере 3 ("Анализ связывания с клетками A431") и в примере 6 ("Анализ связывания с клетками H441"). Цетуксимаб и контрольное одновалентное антитело к EGFR, E1-F405L-gp120-K409R, использовали в качестве контролей для клеток A431. Цетуксимаб имел значение EC<sub>50</sub> 5,0 нМ. В табл. 18 показаны значения EC<sub>50</sub> для связывания. EM1-mAb продемонстрировало 1,9-кратное (клетки A431) и 2,3-кратное (клетки H441) снижение связывания по сравнению с двухвалентными моноспецифическими исходными контрольными антителами. Цетуксимаб был сопоставим с двухвалентными исходными контрольными антителами. У EM1-mAb наблюдались более высокие значения EC<sub>50</sub> связывания, чем значения для исходных mAb, вследствие одновалентного связывания EGFR и с-Met. EM1-mAb имело значения EC<sub>50</sub>, аналогичные биспецифическим одновалентным mAb одноплечевое E1/инертное плечо и E2/инертное плечо.

Таблица 18

		EC <sub>50</sub> (нМ) при связывании с клетками		
		EM1-mAb	Исходные mAb	E1-F405L-gp120-K409R (клетки A431) или M1- K409R -gp120- F405L (клетки H441)
A431	(анализ связывания с EGFR)	9,6 ± 3	5,1 ± 0,3	10,1 ± 0,6
H441	(анализ связывания с c-Met)	1,5 ± 0,7	0,65 ± 0,1	1,0 ± 0,3

Ингибирование связывания лиганда с рецептором.

Биспецифические антитела тестировали на их способность блокировать связывание EGF с внеклеточным доменом EGFR и HGF с внеклеточным доменом c-Met в иммуноферментном анализе (ИФА). Рекомбинантный человеческий EGFR-Fc (R&D Systems, № по кат. 344-ER-050) или человеческий HGF (R&D Systems, № по кат. 294-HGN-025/CF) наносили на планшеты MSD HighBind (Meso Scale Discovery, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд, США) в течение 2 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли буфер MSD Blocker A (Meso Scale Discovery, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд, США) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали 0,1 М буфера HEPES, pH 7,4, с последующим добавлением смеси либо меченного флуоресцентным красителем (MSD) EGF, либо биотинилированных белков HGF с разными концентрациями антител. Меченный рутением белок EGF инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре (RT) с увеличивающимися концентрациями разных антител - от 1 нМ до 4 мкМ. После 2 ч культивирования с осторожным встряхиванием при комнатной температуре планшеты трижды промывали 0,1 М буфера HEPES (pH 7,4). Разводили и добавляли буфер MSD Read Buffer T и анализировали сигналы при помощи SECTOR ImageG 6000. Анализы ингибирования HGF выполняли по аналогии с анализами ингибирования EGF/EGFR, за исключением того, что 10 нМ биотинилированного HGF инкубировали в течение 30 мин при RT с увеличивающимися концентрациями разных антител - от 1 нМ до 2 мкМ.

EM1-mAb ингибировало связывание EGF с EGFR со значением IC<sub>50</sub> 10,7±1,2 нМ в присутствии 50 нМ EGF и со значением IC<sub>50</sub> 10,6±1,5 нМ в присутствии 80 нМ EGF. Исходное двухвалентное антитело ингибировало связывание EGF с EGFR со значением IC<sub>50</sub> 0,14±1,5 нМ в присутствии 50 нМ EGF и со значением IC<sub>50</sub> 1,7±1,4 нМ в присутствии 80 нМ EGF. EM1 mAb обладало более слабым ингибированием связывания EGF с внеклеточным доменом EGFR из-за одновалентного связывания EM1 mAb по сравнению с двухвалентным исходным mAb.

EM1-mAb ингибировало связывание HGF с c-Met со значением IC<sub>50</sub> 29,9±1,5 нМ. Исходное двухвалентное антитело ингибировало связывание HGF с c-Met со значением IC<sub>50</sub> 14,8±1,6 нМ. EM1 mAb обладало более слабым ингибированием связывания HGF с внеклеточным доменом c-Met из-за одновалентного связывания EM1-mAb по сравнению с исходным двухвалентным mAb.

Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR и стимулированного HGF фосфорилирования c-Met.

Антитела тестировали для определения значений IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования EGFR и c-Met. Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR и стимулированного HGF фосфорилирования c-Met оценивали при различных концентрациях антител (итоговая - 0,035-700 нМ), как описано в примере 2 ("Ингибирование стимулированного EGF фосфорилирования EGFR") и примере 6 ("Ингибирование стимулированного HGF фосфорилирования c-Met"). В некоторых экспериментах к клеткам добавляли как EGF, так и HGF, так что один и тот же клеточный лизат можно было использовать для обнаружения как фосфорилирования EGFR, так и фосфорилирования c-Met.

Контрольное mAb к EGFR, E1-F405L-gp120-K409R, одновалентное к EGFR, и исходное двухвалентное антитело к EGFR с низким содержанием фукозы использовали в качестве контрольных антител. В табл. 19 показаны значения IC<sub>50</sub> в анализах.

Таблица 19

Клеточная линия	pEGFR (IC <sub>50</sub> , нМ)		pMet (IC <sub>50</sub> , нМ)	
	H292	H1975	H292	H1975
Антитело				
EM1-mAb	8,6–29	1,5	0,55–0,83	0,64
E1-F405L-gp120-K409R	10,9–13,1	H/o	0,7–4	H/o
Исходное mAb к EGFR (F405L)*	1,5	H/o	Нет эффекта	H/o

\*Антитело имело низкое содержание фукозы.

Усиленное ингибирование pERK и pAKT антителом EM1-mAb по сравнению со смесью одновалентных антител (анализ pERK (анализ mAb к pAKT)).

Потенциал усиления эффективности биспецифического к EGFR/c-Met антитела оценивали путем анализа воздействий mAb на сигнализацию pERK и pAKT, расположенную ниже. В этих экспериментах смесь одновалентных контрольных антител к EGFR и одновалентных контрольных антител к c-Met сравнивали с биспецифическим антителом EM1-mAb. Клетки высевали в прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (Nunc), в 100 мкл/луночка среды RPMI, содержащей GlutaMAX и 25 мМ Hepes (Invitrogen), с добавлением 1 мМ пирувата натрия (Gibco), 0,1 мМ NEAA (Gibco), 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) и 7,5 нг/мл HGF (R&D Systems, № по кат. 294-HGN) и позволяли прикрепиться в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки не подвергали воздействию бессывороточной среды. Клетки обрабатывали в течение 30 мин (анализ pERK) или 1 ч (анализ pAkt) с различными концентрациями (итоговая - 0,11-700 нМ) одновалентных контрольных антител или EM1-mAb.

В клетках анализировали уровни pERK или pAKT с помощью представленных ниже комплектов и в соответствии с инструкциями производителя, компании Meso Scale Discovery: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; Thr185/Tyr187) Assay Whole Cell Lysate Kit (№ по кат. K151DWD), Phospho-Akt (Ser473) Assay Whole Cell Lysate Kit (№ по кат. K151CAD), Phospho-Akt (Thr308) Assay Whole Cell Lysate Kit (№ по кат. K151DYD). При анализе pERK клетки лизировали и цельноклеточные лизаты добавляли на планшеты, покрытые антителом к фосфо-ERK1/2 (распознающим ERK1, фосфорилированную по остаткам Thr202 и Tyr204, и ERK2, фосфорилированную по остаткам Thr185 и Tyr187), и фосфорилированную ERK1/2 обнаруживали с использованием антитела ко всей ERK1/2, конъюгированного с реагентом MSD SULFO-TAG<sup>TM</sup>. При анализе pAKT Ser473 захватывающим антителом было антитело к общей АКТ, а детекторным антителом - антитело к pAKT Ser473, конъюгированное с реагентом MSD SULFO-TAG<sup>TM</sup>. При анализе pAKT Thr308 захватывающим антителом было антитело к общей АКТ, а детекторным антителом - антитело к pAKT Thr308, конъюгированное с реагентом MSD SULFO-TAG<sup>TM</sup>.

Планшеты считывали на SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) с использованием настроек, заданных производителем для данного анализа по умолчанию. Строили график зависимости сигнала электрохемилюминесценции от логарифма концентрации антитела и определяли значения IC<sub>50</sub> путем аппроксимации данных сигмовидной кривой "доза-ответ" с переменным наклоном при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 5. В этих анализах использовали клеточные линии NCI-H292, H1975 и SKMES-1.

IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования ERK биспецифическим антителом EM1-mAb было приблизительно в 14-63 раза ниже относительно смеси двух одновалентных контрольных антител, в зависимости от протестированной клеточной линии (табл. 20). Повышенная эффективность EM1-mAb по сравнению со смесью двух одновалентных контрольных антител указывает на кооперативный эффект или эффект avidности вследствие улучшенного связывания EM1-mAb с этими клеточными линиями. IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования АКТ по Ser475 (pAKTS475) и Thr308 (pAKTT308) в клеточной линии NCI-H1975 было приблизительно в 75 и 122 раза ниже соответственно по сравнению со смесью двух одновалентных контрольных антител (табл. 21). Повышенная эффективность EM1-mAb по сравнению со смесью двух одновалентных контрольных антител указывает на кооперативный эффект или эффект avidности вследствие улучшенного связывания EM1-mAb с этими клеточными линиями. Таким образом, биспецифический характер EM1-mAb привел к усиленному эффекту в отношении эффекторов нижележащей сигнализации.



Таблица 20

IC <sub>50</sub> (нМ) pERK			
Антитело			
Клеточная линия	Биспецифическое антитело EM1-mAb	Смесь E1-F405L-gp120-K409R и M1-K409R-gp120-F405L	Кратность изменения для биспецифических антител в сравнении со смесью двух одновалентных контрольных антител
H292	0,64	34,94	55
H1975	1,67	106	63
SKMES-1	0,54	7,63	14

Таблица 21

Антитело	IC <sub>50</sub> (нМ) pAKTS473	IC <sub>50</sub> (нМ) pAKTT308
Биспецифическое антитело EM1-mAb	0,87	0,96
Смесь E1-F405L-gp120-K409R и M1-K409R-gp120-F405L	65	117
Кратность изменения для смеси двух одновалентных антител в сравнении с биспецифическими	75	122

Ингибирование антителами роста или жизнеспособности человеческих опухолевых клеток.

Ингибирование с-Met-зависимого роста клеток оценивали путем измерения жизнеспособности различных опухолевых клеток после воздействия биспецифических антител EM1-mAb. В исследованиях использовали клетки NCI-H292, SKMES-1, NCI-H1975 и NCI-H3255.

Клетки культивировали в стандартном двумерном формате и в формате с низким прикреплением. В качестве контролей использовали эрлотиниб и цетуксимаб. В табл. 22 обобщены значения IC<sub>50</sub> в анализах.

Ингибирование антителами роста или жизнеспособности человеческих опухолевых клеток - стандартный двумерный формат.

Ингибирование роста клеток анализировали путем измерения жизнеспособности NCI-H292 и NCI-H1975 после воздействия антител в двух форматах. При работе со стандартным двумерным форматом клетки высевали на белые непрозрачные 96-луночные планшеты, обработанные для культивирования тканей (PerkinElmer), в среду RPMI, содержащую GlutaMAX и 25 mM Hepes (Invitrogen), с добавлением 1 mM пирувата натрия (Gibco), 0,1 mM NEAA (Gibco) и 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco), после чего позволяли прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали различными концентрациями антител (конечная концентрация - 0,035-700 нМ), а также HGF (7,5 нг/мл, R&D Systems, № по кат. 294-HGF), затем инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 72 ч. Некоторые лунки оставляли без обработки либо HGF, либо антителами в качестве контролей. Жизнеспособные клетки обнаруживали с помощью реагента CellTiter-Glo® (Promega), и данные анализировали так, как описано в примере 3 "Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток (анализ роста клеток NCI-H292 и NCI-H322)".

Ингибирование антителами роста или жизнеспособности человеческих опухолевых клеток - формат с низким прикреплением.

Для оценки выживаемости в условиях низкого прикрепления клетки высевали на 96-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением Ultra Low Attachment (Corning Costar) в 50 мкл/лунка среды RPMI (Invitrogen), содержащей GlutaMAX и 25 mM Hepes, с добавлением 1 mM пирувата натрия (Gibco), 0,1 mM NEAA (Gibco) и 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), после чего позволяли прикрепиться в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали различными концентрациями антител (конечная концентрация 0,035-700 нМ), а также HGF (7,5 нг/мл, R&D Systems № по каталогу 294-HGN), затем инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в течение 72 ч. Некоторые лунки оставляли без обработки либо HGF, либо антителами в качестве контролей. Жизнеспособные клетки обнаруживали с использованием реагента CellTiter-Glo® (Promega), и данные анализировали так, 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.

В стандартной двумерной культуре EM1-mAb ингибировало рост NCI-H292 с IC<sub>50</sub> 31 нМ, а в условиях низкого прикрепления - с IC<sub>50</sub> 0,64 нМ. EM-1 mAb ингибировало рост клеток NCI-H1975 с IC<sub>50</sub> >700 нМ и 0,8-1,35 нМ в стандартной двумерной культуре и с низким прикреплением соответственно. В клетках NCI-H292, экспрессирующих как EGFR, так и с-Met дикого типа, EM1-mAb имело эффективность, которая в 22 раза выше в стандартной двумерной культуре и приблизительно в 330 раз выше в условиях низкого прикрепления культуры по сравнению с цетуксимабом. В клетках NCI-H1975, экспрессирующих мутант EGFR L858R, T790M и с-Met дикого типа, mAb EM-1 было по меньшей мере в 518 раз

более эффективным по сравнению с цетуксимабом в условиях низкого прикрепления культуры. В табл. 22 показаны сводные данные по анализам.

Таблица 22

Клеточная линия	Статус EGFR	Статус с-Met	EM1-mAb, стандартная двухмерная культура, IC <sub>50</sub> (нМ)	EM1-mAb, низкое прикрепление, IC <sub>50</sub> (нМ)	Цетуксимаб, стандартная двухмерная культура, IC <sub>50</sub> (нМ)	Цетуксимаб, низкое прикрепление, IC <sub>50</sub> (нМ)
NCI-H292	д.т.	д.т.	31	0,64	> 700	212
NCI-H1975	L858R, T790M	д.т.	> 700	0,8–1,35	> 700	> 700

Комбинация эрлотиниба и EM1-mAb эффективно ингибирует рост клеточных линий с мутантным EGFR.

Ингибирование роста клеток комбинацией эрлотиниба и EM1-mAb оценивали как в условиях стандартной двумерной культуры, так и в формате с низким прикреплением. Клетки NCI-H3255 и HCC-827 высевали так, как описано выше в разделе "Ингибирование антителами роста или жизнеспособности человеческих опухолевых клеток". Вместе с обработкой антителами к клеткам добавляли HGF (7,5 нг/мл, R&D Systems, № по кат. 294-HGN). Клетки обрабатывали различными концентрациями антител (итоговая - 0,11-700 нМ), или эрлотиниба (итоговая - 0,46-3000 нМ), или комбинации эрлотиниба с антителом с использованием увеличивающихся количеств каждого при фиксированном соотношении (например, наименьшая концентрация комбинации = наименьшая концентрация антитела (0,11 нМ) + наименьшая концентрация эрлотиниба (0,46 нМ)). Некоторые лунки оставляли без обработки либо HGF, либо антителами в качестве контролей. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч, после чего жизнеспособные клетки обнаруживали при помощи реагента CellTiter-Glo® (Promega) и анализировали данные так, как описано выше в разделе "Ингибирование роста человеческих опухолевых клеток (анализ роста клеток NCI-H292 и NCI-H322)". В табл. 23 обобщены результаты эксперимента. В таблице значения IC<sub>50</sub> для комбинаций даны относительно или антитела, или эрлотиниба, в зависимости от того, что указано в скобках.

Как в клетках NCI-H3255, так и в клетках HCC-827 (клеточные линии с мутантным EGFR) добавление EM1-mAb к эрлотинибу как повышало мощность ингибирования жизнеспособности клеток, так и было более эффективным в отношении получения меньшего общего числа жизнеспособных клеток. В клетках NCI-H3255 с помощью стандартного двумерного формата IC<sub>50</sub> для одного эрлотиниба составило 122 нМ, тогда как для комбинации - 49 нМ. Аналогичным образом, в клетках HCC-827 IC<sub>50</sub> для одного эрлотиниба составило 27 нМ, тогда как для комбинации - 15 нМ. Кроме того, комбинация эрлотиниба и EM1-mAb также была более эффективной, чем комбинация эрлотиниба и цетуксимаба. Таким образом, в этом анализе в присутствии HGF добавление EM1-mAb повышало эффективность эрлотиниба.

Клетки NCI-H3255 экспрессируют мутант EGFR L858R и амплифицированный с-Met. Клетки HCC-827 экспрессируют мутанты EGFR с делециями в аминокислотных положениях 746 и 750, а также с-Met дикого типа. Антитело EM1-mAb оказывало более сильные воздействия на жизнеспособность HCC-827 и NCI-3255 в присутствии эрлотиниба, чем один эрлотиниб либо в стандартных условиях, либо в условиях с низким прикреплением культур.

Таблица 23

Образцы	IC <sub>50</sub> mAb EM1 + эрлотиниб (нМ)	IC <sub>50</sub> эрлотиниб (нМ)
NCI-H3255, стандартная двухмерная культура	49,0	122
NCI-H3255, культура с низким прикреплением	10,6	47,1
HCC-827, стандартная двухмерная культура	14,6	27,4
HCC-827, культура с низким прикреплением	3,5	9,5

Пример 13. Антитело-опосредованная клеточная цитотоксичность (ADCC) EM1-mAb в клеточных линиях *in vitro*.

Анализы ADCC проводили, как описано ранее (Scallan et al., Mol. Immunol. 44:1524-1534, 2007).

Вкратце, мононуклеары периферической крови (PBMC) из человеческой крови выделяли с использованием градиентов Ficoll и использовали в качестве эффекторных клеток для анализов ADCC. Клетки NCI-H292, NCI-H1975 или NCI-H441 использовали в качестве клеток-мишеней в соотношении 1 клетка-мишень к 50 эффекторным клеткам. Клетки-мишени предварительно метили BATDA (PerkinElmer) в течение 20 мин при 37°C, дважды промывали и повторно растворяли в DMEM с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин (все производства Invitrogen). Клетки-мишени ( $1 \times 10^4$  клеток) и эффекторные клетки ( $0,5 \times 10^6$  клеток) объединяли и добавляли по 100 мкл клеток в лунки 96-луночной планшеты с U-образным дном. Добавляли дополнительные 100 мкл с конструкторами mAb дикого типа с устойчивостью к протеазам или без них. Все образцы обрабатывали в двух повторностях. Планшеты центрифугировали при 200×g в течение 3 мин, инкубировали при 37°C в течение 2 ч, а затем вновь центрифугировали при 200×g в течение 3 мин. Отбирали всего 20 мкл супернатанта на лунку и лизис клеток измеряли путем добавления 200 мкл реагента DELPHIA на основе европия (PerkinElmer). Флуоресценцию измеряли при помощи считывателя Envision 2101 Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные нормализовали к максимальной цитотоксичности 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) и минимальному контролю, который определяли по спонтанному высвобождению BATDA из клеток-мишеней в отсутствие любого антитела, с использованием представленного ниже уравнения:  $(\text{экспериментальное высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение}) / (\text{максимальное высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение}) \times 100\%$ . Данные аппроксимировали сигмовидной моделью "доза-эффект" при помощи GraphPad Prism v5.

Результаты по ADCC для mAb EM1 и сравниваемых препаратов обобщены в табл. 24 (клетки NCI-H292), табл. 25 (клетки NCI-H1975) и табл. 26 (клетки NCI-H441), а в табл. 27 (клетки NCI-H1993) перечислены значения  $EC_{50}$  и максимальное достигнутое лизирование. Клетки NCI-H292 экспрессируют EGFR дикого типа (д.т.), c-Met д.т. и KRAS д.т.; клетки NCI-H1975 экспрессируют мутантный EGFR (L858R T790M), c-Met д.т. и KRAS д.т.; клетки NCI-H441 экспрессируют EGFR д.т., c-Met д.т. и мутацию KRAS (G12V), а клетки NCI-H1993 экспрессируют EGFR д.т., амплифицированный c-Met и KRAS д.т. KRAS также известен как GTPase KRas, а также как гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена V-Ki-ras2.

EM1-mAb имеет более высокую эффективность ADCC-ответов, чем цетуксимаб и версия EM1-mAb с нормальным содержанием фукозы, на что указывают более низкие значения  $EC_{50}$ . EM1 mAb имеет более высокую эффективность в отношении максимального достигнутого лизирования, чем цетуксимаб и биспецифическое mAb с нормальным содержанием фукозы. Как показано на профилях в табл. 24-27, EM-1 mAb оказывает ADCC-активность на клетки, имеющие мутантный и дикий тип EGFR, дикий тип с нормальным и амплифицированным уровнями c-Met, а также KRAS дикого типа и мутацию.

Таблица 24

mAb	Эффективность ( $EC_{50}$ , мкг/мл)	$R^2$	Эффективность (максимальное достигнутое лизирование)
EM1 mAb	0,0058	0,93	19%
Биспецифическое к EGFR x c-Met mAb с нормальным содержанием фукозы	0,22	0,85	13%
Цетуксимаб	0,0064	0,94	12%

Таблица 25

mAb	Эффективность ( $EC_{50}$ , мкг/мл)	$R^2$	Эффективность (максимальное достигнутое лизирование)
EM1 mAb	0,022	0,91	19%
Биспецифическое к EGFR x c-Met mAb с нормальным содержанием фукозы	1,8	0,79	13%
Цетуксимаб	0,029	0,70	11%

Таблица 26

mAb	Эффективность (EC <sub>50</sub> , мкг/мл)	R <sup>2</sup>	Эффективность (максимальное достигнутое лизирование)
EM1 mAb	0,022	0,97	24%
Биспецифическое к EGFR x c-Met mAb с нормальным содержанием фукозы	0,52	0,87	7,9%
Цетуксимаб	0,013	0,85	15%

Таблица 27

mAb	Эффективность (EC <sub>50</sub> мкг/мл)	R <sup>2</sup>	Эффективность (максимальное достигнутое лизирование)
EM1 mAb	0,0013	0,95	27%
Биспецифическое к EGFR x c-Met mAb с нормальным содержанием фукозы	0,054	0,87	17%
Цетуксимаб	0,0042	0,76	21%

Пример 14. Исследования противоопухолевой эффективности EM1-mAb.

Эффективность EM1 mAb в отношении роста опухоли оценивали так, как описано в примере 7 "Исследования эффективности биспецифических к EGFR/c-Met молекул в отношении опухоли". Вкратце, клетки NCI-H292-HGF имплантировали подкожно (п/к) с Cultrex при  $2 \times 10^6$  самкам мышей SCID Beige. Мышей разделяли по объему опухоли через 7 суток после имплантации на 5 групп, по 10 мышей в группе. Введение начинали после того, как средний объем опухоли в группе достигал 62-66 мм<sup>3</sup> (малые опухоли). PBS или терапевтическое средство вводили интраперитонеально (и/п) 2 раза в неделю.

В оценке эффективности также использовали SKMES-HGF, клетки человеческой плоскоклеточной карциномы, которую трансфицировали человеческим HGF (печеночный фактор роста). Эти клетки имплантировали п/к при  $10 \times 10^6$  самкам мышей SCID Beige. Этим мышам разделяли по объему опухоли через 12 суток после имплантации на 5 групп, по 8 мышей в группе. Первое исследование начинали после того, как средний объем опухоли в группе достигал 98-101 мм<sup>3</sup> (крупные опухоли). PBS или терапевтические mAb вводили и/п 2 раза в неделю в течение 4 недель. В исследовании опухолей более крупного размера мышам делили на 2 группы после того, как опухоли достигли объема приблизительно 200-300 мм<sup>3</sup>. Затем этим мышам проводили обработку либо цетуксимабом (20 мг/кг), либо EM1-mAb (20 мг/кг), и/п, 2 раза в неделю (3 недели).

Сводные данные показаны в табл. 28. На фиг. 10 показана эффективность молекул с течением времени. EM1-mAb имело улучшенный профиль подавления опухоли по сравнению с цетуксимабом в модели с небольшими опухолями H292-HGF и в моделях с большими опухолями SKMES-HGF.

Таблица 28

Образец и время	Клеточная линия	Доза в мг на кг	Частичная регрессия	Полная регрессия
EM1 на 35 сутки	H292-HGF, небольшая опухоль	20	10/10	10/10
		5	10/10	10/10
		1	0/10	0/10
Цетуксимаб на 35 сутки	H292-HGF, небольшая опухоль	20	0/10	0/10
EM1 на 67 сутки	SKMES-HGF, небольшая опухоль	20	0/8	8/8
		5	1/8	6/8
		1	2/8	4/8
Цетуксимаб на 67 сутки		20	0/8	6/8
EM1 на 70 сутки	SKMES-HGF,	20	4/7	3/7
Цетуксимаб на 35 сутки	крупная опухоль	20	0/7	0/7

В табл. 29 показаны размеры опухолей в группах лечения с опухолями SKMES-HGF, а в табл. 30 показана противоопухолевая активность.

EM1-mAb ингибировало рост опухоли в модели SKMES-HGF на 97% или более при многократных дозах вплоть до 1 мг/кг. Хотя изначально цетуксимаб был очень эффективен (88% TGI при 20 мг/кг), после окончания введения обработанные цетуксимабом опухоли снова выросли. Напротив, опухоли, обработанные EM1-mAb 5 или 20 мг/кг, не выросли в течение исследования (>2 месяцев).

Таблица 29

Сутки	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )				
	Носитель	Биспецифическое EM1, 20 мг/кг	Биспецифическое EM1, 5 мг/кг	Биспецифическое EM1, 1 мг/кг	Цетуксимаб, 20 мг/кг
1	99 ± 6	99 ± 7	101 ± 6	101 ± 6	98 ± 5
8	146 ± 14	48 ± 10	49 ± 9	49 ± 10	60 ± 8
15	192 ± 21	9 ± 1	22 ± 10	41 ± 13	44 ± 23
22	326 ± 43	3 ± 2	17 ± 12	33 ± 15	42 ± 23
29	577 ± 55	2 ± 1	15 ± 9	38 ± 17	85 ± 60
36	994 ± 114	0,2 ± 0,1	13 ± 9	26 ± 14	125 ± 62
50	--	0,04 ± 0,04	10 ± 7	18 ± 9	423 ± 115
57	--	0,1 ± 0,2	3 ± 2	21 ± 10	650 ± 116
67	--	0 ± 0	8 ± 7	34 ± 22	1257 ± 151

Таблица 30

Лечение	Размер опухоли (мм <sup>3</sup> ) на 36 сутки	T/C (%)	T - C (сутки) при 1000 мм <sup>3</sup>	Значение P
Носитель	994 ± 114	--	--	--
Биспецифическое EM1, 20 мг/кг	0,19 ± 0,12	0,02	--	
Биспецифическое EM1, 5 мг/кг	13 ± 9	1,3	--	
Биспецифическое EM1, 1 мг/кг	26 ± 14	2,6	--	
Цетуксимаб (20 мг/кг)	125 ± 62	13	31	

Пример 15. Ингибирование миграции клеток EM1-mAb in vitro.

Способ.

Воздействие EM-mAb и контрольных одновалентных антител на ингибирование миграции опухолевых клеток анализировали в клетках NIH-1650. Клеточную линию H1650 с мутантным EGFR (клетки легочной бронхоальвеолярной карциномы, имеющие мутацию в экзоне 19 [делеция E746, A750]) культивировали во флаконах для тканевой культуры в нормальных условиях для культивирования (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 95%). Все среды и добавки соответствовали рекомендациям поставщика клеток (Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США)

Сфероиды создавали путем посева клеток легочной опухоли H1650, по 10 000 клеток/лунка, в 96-луночные планшеты с U-образным дном и сверхнизким прикреплением Ultra Low Adherence (ULA) (Corning, г. Тьюксбери, США) по 200 мкл/лунка. Данные планшеты стимулируют спонтанное образование одиночного сфероида из клеток в течение 24 ч (инкубация при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Сфероиды выращивали в течение четырех суток в нормальных условиях культивирования.

Круглодонные 96-луночные планшеты (BD Bioscience) покрывали 0,1% желатином (EMD Millipore, г. Биллерика, США) в стерильной воде в течение 1 ч при 37°C. В исследованиях по оценке соединений на 4 сутки сфероиды из 10000 опухолевых клеток (H1650 и NCI-H1975) переносили в круглодонные планшеты с покрытием и обрабатывали EM1-mAb, контрольными одновалентными mAb к EGFR, E1-F405L-gp120-K409R, имеющими низкое содержание фукозы, контрольными одновалентными mAb к c-Met, M1-K409R-gp120-F405L, имеющими низкое содержание фукозы, и комбинацией двух одновалентных антител E1-F405L-gp120-K409R и M1-K409R-gp120-F405L (полученных с низким содержанием фукозы) в серии разведений с 20 нг/мл HGF (R&D systems). Контроли обрабатывали носителем, который представлял собой изотипический контрольный IgG<sub>1</sub> каппа (концентрация равна наивысшей для обработанных лекарственным средством клеток). Воздействие соединений анализировали через 48 ч путем измерения площади, покрытой мигрирующими клетками, с применением изображений в ярком поле в полностью автоматизированной системе многопараметрической визуализации Operetta (Perkin Elmer) с увеличением 2x. Ингибирование миграции клеток (общая площадь), обусловленное воздействием обработки, анализировали путем нормирования данных, используя деление на значение контроля, содержащего только среду, получив процентную долю миграции клеток относительно контроля. Таким образом, значение менее 1 будет означать ингибирование миграции клеток.

## Результаты.

EM1-mAb продемонстрировало мощное синергическое ингибирование миграции клеток в клетках H1650 (мутант EGFR L858R) и H1975 (мутант EGFR L858R/T790M) по сравнению с комбинацией контрольных одновалентных антител к EGFR и c-Met, E1-F405L-gp120-K409R и M1-K409R-gp120-F405L. В клетках H1650 шесть наивысших концентраций EM1-mAb значительно ингибировали миграцию клеток ( $p < 0,001$ ) по сравнению с изотипическим контролем. Значение  $EC_{50}$  для EM1-mAb составило 0,23 нМ, тогда как значение  $EC_{50}$  для комбинации моноспецифических контрольных антител составило 4,39 нМ. Следовательно, EM1-mAb приблизительно в 19 раз более эффективно ингибировало миграцию клеток H1650 по сравнению с комбинацией одновалентных контрольных антител. Уровень ингибирования миграции клеток EM1-mAb был выше, чем у комбинации моноспецифических контрольных mAb в клетках H1650 и H1975. В табл. 31 показаны значения  $EC_{50}$  для анализа.

Таблица 31

Образцы	H1650		H1975
	$EC_{50}$ (нМ)	Ингибирование при 30 нМ	Ингибирование при 30 нМ
EM1-mAb	0,23	64%	38%
Смесь E1-F405L-gp120-K409R* и M1-K409R-gp120-F405L*	4,39	59%	20%
E1-F405L - gp120-K409R*	5,44	15%	7%
M1-K409R-gp120-F405L*	7,36	43	10%

\* Антитела имели низкое содержание фукозы.

## Пример 16. Картирование эпитопов антител к c-Met-069 и 5D5.

Эпитоп, связывающий mAb с c-Met 069, картировали с использованием линейной и стесненной технологии CLIPS-пептидов. Пептиды сканировали SEMA, PSI и Ig-домены человеческого c-Met. Линейные пептиды и CLIPS-пептиды синтезировали с использованием аминокислотной последовательности вышеупомянутого c-Met с применением стандартных химических методов Fmoc, а защитные группы снимали при помощи трифторуксусной кислоты с акцепторами. Стесненные пептиды синтезировали на химических каркасах с целью реконструкции конформационных эпитопов с использованием технологии химически связанных пептидов на каркасах (Chemically linked Peptides on Scaffolds, CLIPS) (Timmerman et al., J. Mol. Recognition. 20:283, 2007). Линейные и стесненные пептиды присоединяли к платам PEPSCAN и проводили скрининг с использованием ИФА, ориентированного на PEPSCAN (Slootstra et al., Molecular Diversity, 1, 87-96, 1996). Эпитоп связывания mAb с c-Met 069 представляет собой непрерывный эпитоп, состоящий из аминокислот c-Met 239-253 PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID NO:238) и 346-361 FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID NO: 239). Аминокислотная последовательность c-Met показана в SEQ ID NO: 201.

Аналогичные методы использовали для картирования эпитопа mAb 5D5 (MetMab, онартузумаб). mAb 5D5 связывается с c-Met по остаткам 325-340 PGAQLARQIGASLNDD (SEQ ID NO: 240).

## Пример 17. Исследования противоопухолевой эффективности EM1-mAb in vivo.

Эффективность EM1-mAb в отношении роста опухоли исследовали так, как описано в примере 7 "Исследования эффективности биспецифических к EGFR/c-Met молекул в отношении опухоли" и в примере 14 с применением дополнительных опухолевых клеточных линий с мутацией EGFR или амплификациями EGFR и/или c-Met. Вкратце, клетки SNU-5, H1975, HCC827, клетки H1975, экспрессирующие человеческий HGF, или клон клеток HCC827, выбранный по его повышенной резистентности к эрлотинибу (клетки HCC827-ER1), имплантировали подкожно (п/к) самкам бестимусных мышей, за исключением клеток SNU-5, которые были имплантированы мышам CR17/SCID. Мышам интраперитонеально вводили PBS или EM1-mAb, цетуксимаб (CAS 205923-56-4), эрлотиниб (CAS 183321-74-6), афатиниб (CAS 439081-18-2) или комбинацию mAb EM-1 и афатиниба и mAb EM-1 и эрлотиниба в указанной дозировке и по схеме, показанной в табл. 32. Противоопухолевую эффективность измеряли в виде %TGI (ингибирование роста опухоли), вычисляемой как  $100 - \%T/C$  ( $T$  = средний размер опухоли в группе лечения;  $C$  = средний размер опухоли в контрольной группе в указанный день, как описано в примере 7).

В опухолях с первичными активирующими EGFR мутациями (без резистентности к ингибиторам тирозинкиназы (TKI) EGFR): (опухоль HCC827, EGFR del (E746, A750)), EM1-mAb в дозе 10 мг/кг ингибировало рост опухоли на 82%. Эрлотиниб в этой модели имел аналогичную эффективность, как и комбинация эрлотиниба и EM1-mAb. На фиг. 11 показана эффективность терапевтических средств с течением времени в модели опухоли HCC827.

В опухолях с EGFR дикого типа и амплификацией гена c-Met (модель рака желудка SNU-5) EM1-mAb продемонстрировало противоопухолевую эффективность с полной регрессией опухоли (98% TGI на 34 сутки,  $p < 0,01$  по сравнению с носителем с использованием однофакторного дисперсионного

анализа (ANOVA) с последующими отдельными сравнениями с использованием критерия Геймса-Хоуэлла). Противоопухолевая активность цетуксимаба (mAb к EGFR) в этой модели была меньше - 49% на 34 сутки. На фиг. 12 показана эффективность терапевтических средств с течением временем в модели SNU-5.

EM1-mAb тестировали в модели немелкоклеточного рака легких (NSCLC), содержащей первичную активирующую EGFR мутацию и мутацию EGFR T790M, придающую опухолям резистентность к ингибиторам тирозинкиназы EGFR 1-го поколения (модель H1975). EM1-mAb ингибировало рост опухоли со значением TGI 57% в модели с имплантацией клеточной линии H1975 бестимусным мышам ( $p < 0,0001$  по сравнению с носителем PBS с использованием логрангового анализа в программе Prism 3.03). Как и ожидалось, эрлотиниб не был эффективен в этой модели с мутацией T790M. Афатиниб был столь же эффективен, как и EM1-mAb (57% TGI). Цетуксимаб и комбинация EM1-mAb с афатинибом были наиболее эффективны, вызывая регрессию опухолей с ингибированием роста опухоли на 91 и 96% соответственно ( $p < 0,0001$  как для цетуксимаба по сравнению с PBS, так и для EM1-mAb + афатиниб по сравнению с группой с носителями PBS + афатиниб с использованием логрангового анализа в программе Prism 3.03). Сигнальные пути c-Met в этой модели не активировались, поскольку мышинный HGF не связывается с человеческим c-Met.

EM1-mAb тестировали в нескольких моделях, сконструированных для экспрессии человеческого HGF в системе трансдукции лентивируса. Это позволяет смоделировать лигандную активацию пути c-Met *in vivo*, поскольку мышинный HGF не активирует человеческий c-Met на имплантированных человеческих опухолевых клетках. Результаты модели SKMES-HGF показаны в примере 14 и на фиг. 10, а значения TGI в % обобщены в табл. 32. EM1-mAb ингибировало рост опухоли в модели H1975-HGF на 71% ( $p < 0,0001$  по сравнению с носителем PBS с использованием логрангового анализа в программе Prism 3.03). Афатиниб, эрлотиниб и цетуксимаб в этой модели были менее эффективными. Комбинация EM1-mAb и афатиниба была очень эффективной (96% TGI,  $p < 0,0001$ , по сравнению с группой с носителями PBS + афатиниб с использованием логрангового анализа в программе Prism 3.03). На фиг. 13 показана эффективность молекул с течением времени в модели H1975-HGF. Таким образом, эрлотиниб, афатиниб и цетуксимаб теряют свою противоопухолевую эффективность в моделях опухолей, в которых активируется путь c-Met.

EM1-mAb тестировали в модели опухоли, характеризующейся первичной активирующей EGFR мутацией и повышенной резистентностью к EGFR TKI 1-го поколения (эрлотиниб), обусловленной амплификацией гена c-Met (модель HCC827-ER1). EM1-mAb в дозе 10 мг/кг приводило к частичной регрессии имплантированных опухолей HCC827-ER1 со значением TGI 86% на 25 сутки и было более эффективным, чем только эрлотиниб (65% TGI на 25 сутки). Комбинация EM1-mAb и эрлотиниба не давала дополнительного повышения эффективности. На фиг. 14 показана эффективность молекул с течением времени.

Таким образом, EM1-mAb демонстрирует эффективность в моделях опухолей с EGFR дикого типа, с первичными активирующими EGFR мутациями, с мутацией EGFR T790M, связанной с резистентностью к терапевтическим средствам в отношении EGFR, а также в моделях, в которых c-Met активируется лиганд-зависимым (аутокринная экспрессия HGF) или лиганд-независимым (амплификация гена c-Met) способом. Комбинация EM1-mAb с эрлотинибом или афатинибом может повышать эффективность в некоторых моделях опухолей.

Таблица 32

Тип опухоли	EGFR	с-Met	Лечение	% TGI (сутки исследования); по сравнению с введением носителя PBS
			(доза в мг/кг), схема	
SKMES-HGF, плоскоклеточный рак легких	д.т.	д.т.	EM1-mAb (20), BIW x 4 недели	100 (36)
			Цетуксимаб (20), BIW x 4 недели	88 (36)
SNU-5 рак желудка	д.т.	ампл.	EM1-mAb (10), BIW x 4 недели	98 (34)
			Цетуксимаб (10), BIW x 4 недели	49 (34)
H1975 NSCLC	L858R; T790M	д.т.	EM1-mAb (10), BIW x 3 недели	57 (18)
			Цетуксимаб (10), BIW x 3 недели	91 (18)
			Эрлотиниб (50), QD x 21 сутки	9 (18)
			Афатиниб (15), QD x 21 сутки	57 (18)
			EM1-mAb (10), BIW x 3 недели + афатиниб (15), QD x 21 сутки	96 (18)
H1975-HGF NSCLC	L858R; T790M	д.т.	EM1-mAb (10), BIW x 3 недели	71 (16)
			Цетуксимаб (10), BIW x 3 недели	42 (16)
			Эрлотиниб (50), QD x 21 сутки	20 (16)
			Афатиниб (15), QD x 21 сутки	29 (16)
			EM1-mAb (10), BIW x 3 недели + афатиниб (15), QD x 21 сутки	96 (16)
HCC827 NSCLC	del (E746, A750); ампл.	д.т.	EM1-mAb (10), BIW x 4 недели	82 (35)
			Эрлотиниб (25), QD x 28 суток	79 (35)
			EM1-mAb (10), BIW x 3 недели + эрлотиниб (25), QD x 28 суток	78 (35)
HCC827-ER1 NSCLC	del (E746, A750); ампл.	ампл.	EM1-mAb (10), BIW x 4 недели	86 (25)
			Эрлотиниб (25), QD x 28 суток	65 (25)
			EM1-mAb (10), BIW x 3 недели + эрлотиниб (25), QD x 28 суток	87 (25)

BIW = два раза в неделю;

QD = один раз в сутки;

д.т. = дикий тип;

ампл. = амплифицированный.

Пример 18. EM1-mAb индуцирует деградацию EGFR и с-Met in vivo.

Чтобы продемонстрировать вовлечение EM1-mAb как EGFR, так и с-Met в опухоль, отбирали образцы опухолей H1975-HGF в различные временные периоды после однократной дозы 20 мг/кг EM1-mAb. Получали лизаты опухолей, нормализовали к общему белку и разгоняли образцы в гелях ДСН-ПААГ. Гели переносили на нитроцеллюлозу и выполняли анализ методом вестерн-блоттинга либо для EGFR (мышинные моноклональные антитела (mAb) к человеческому EGFR (EGF-R2); Santa Cruz Biotechnology, № по кат. sc-73511), либо для с-Met (мышинные моноклональные антитела к человеческому Met (L41G3); Cell Signaling Technology, № по кат. 3148). Уровни EGFR нормализовали к GAPDH; уровни с-Met нормализовали к актину. Уровни рецепторов в опухолях, обработанных EM1-mAb, сравнивали с уровнями рецепторов в опухолях, обработанных PBS, получив % общего числа рецепторов. Обработка EM1-mAb снизила общие уровни рецепторов EGFR и с-Met в опухолях H1975-HGF до значений в диапазоне от 20 до 60% от контроля в зависимости от анализируемой временной точки. На фиг. 15 показаны средние уровни рецепторов по сравнению с PBS с течением времени. pEGFR, pс-Met и pAKT также снижались через 72 ч после однократной дозы EM1.

Пример 19. Противоопухолевая активность при сравнении вариантов изоформ IgG<sub>1</sub> и IgG<sub>2</sub>, биспецифических к EGFR/с-Met mAb.



Чтобы лучше понять вклад эффекторной функции в эффективность, наблюдаемую в модели H1975-HGF, выполнили сравнение между EM1-mAb и вариантом EM1-mAb, имеющим Fc IgG<sub>2</sub> с обеспечивающими снижение эффекторной функции заменами V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG<sub>2</sub> (замены описаны в заявке на международный патент № WO 2011/066501) (нумерация соответствует каталогу ЕС). Антитело IgG<sub>2</sub> с заменами V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S не взаимодействует с Fc-рецепторами или эффекторными клетками (такими как естественные киллеры и макрофаги). Таким образом, любая потеря активности, наблюдаемая у варианта IgG<sub>2</sub> V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S EM1-mAb, может отражать вклад в противоопухолевую активность эффектор-опосредованных механизмов, таких как ADCC и/или ADCP. Через 32 суток после имплантации опухолевых клеток в вышеописанной модели H1975-HGF наблюдали потерю противоопухолевой активности варианта IgG<sub>2</sub> V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S EM1-mAb по сравнению с исходным EM1-mAb, что свидетельствует о том, что эффектор-опосредованные механизмы вносят вклад в функцию EM-1 mAb. На фиг. 16 показана противоопухолевая активность молекул.

#### Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Искусственная	Tencon	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNP LSAEFTT
2	ДНК	Искусственная	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGA AAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	ДНК	Искусственная	TC5'toFG	AACACCGT AGAT AGAAACGGT
4	ДНК	Искусственная	130mer	CGGCGGTT AGAACCGCGCT ACAATT AAT ACAT AACCCCAT CCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTG TGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCTAC CATGCTG
5	ДНК	Искусственная	POP2222	CGGCGGTTAGAACCGGCTAC
6	ДНК	Искусственная	TCF7	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	ДНК	Искусственная	TCF8	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNN S NNAACACCGT AGAT AGAAACGGT
8	ДНК	Искусственная	TCF9	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNN SNNS NNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	ДНК	Искусственная	TCF10	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNN SNNSNNS NNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	ДНК	Искусственная	TCF11	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNS NNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	ДНК	Искусственная	TCF12	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAA CGGT
12	ДНК	Искусственная	POP2234	AAGAT CAGTTGCGGCCGCT AGACT AGAACCGTGCCAT GGTGATG GTGATGGTGACCGCGGTGGTGAATTCGCGAG ACAG
13	ДНК	Искусственная	POP2250	CGGCGGTTAGAACCGGCTACAATTAATAC
14	ДНК	Искусственная	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	ДНК	Искусственная	Tcon5new 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAAATGGTATGGTG ATGGT GACCACCGGTGGTGAATTCGCGAGACAG
16	ДНК	Искусственная	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCG AAAAAC
17	ДНК	Искусственная	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCA TCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCC CCAAC TGATCTTCACCAAAC
18	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

19	PRT	Искусственная	P54AR4-17 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYSFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Искусственная	P54AR4-47 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	Искусственная	P54AR4-48 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Искусственная	P54AR4-37 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Искусственная	54AR4-74 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Искусственная	P54AR4-81 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQ YQES SEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Искусственная	P54AR4-83 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Искусственная	P54CR4-31 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQ YQES KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSY VFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
28	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWTPDAAFDSFLIQ YQES KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSY VFEHDVMLPLSAEFTT
29	PRT	Искусственная	P54AR4-73v2 без met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQ YQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	ДНК	Искусственная	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GCC GCC GAA AAA C
31	ДНК	Искусственная	TCON5 E86lshort	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	P114AR5 P74- A5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YDEV VVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVYNILG VKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	Искусственная	P114AR5 P75- E9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIR YDEFL RSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVILGV KGGGL VSTPLSAIFTT
34	PRT	Искусственная	P114AR7 P92- F3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVNIMGV KGGSI SHPLSAIFTT
35	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 2-F6	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVYNILGV KGGGL SVPLSAIFTT
36	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 2-G8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIR YFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVQILGVK GGYISI PLSAIFTT
37	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 2-H5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YLEFLL GGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVQIMGV KGGTVS PPLSAIFTT
38	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 3-D11	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVGING VKGGYI SYPLSAIFTT
39	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 3-G8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTDLKPGTEYGVTINGV KGGRV STPLSAIFTT
40	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 3-H9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVQNGV KGGHIS LPLSAIFTT
41	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 4-A3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVYNIMG VKGGKI SPPLSAIFTT
42	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 4-E5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVNIMG VKGGRV SVPLSAIFTT
43	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-B9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVQILGV KGGSI SVPLSAIFTT

44	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-D3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMG VKGGS! SYPLSAIFTT
45	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-D4	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQILGV KGGYI SIPLSAIFTT
46	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-E3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQIMG VKGGTV SPPLSAIFTT
47	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-F10	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFTT AGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGV KGGSI PPLSAIFTT
48	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-G7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFELLS TGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVK GGSI PPLSAIFTT
49	PRT	Искусственная	P114AR7 P9 5-H8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFV SKGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMG VKGGS! SPPLSAIFTT
50	PRT	Искусственная	ECB1	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YDEVV VGGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGV KGGSI VPLSAIFTT
51	PRT	Искусственная	ECB2	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSL PAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRY FEFLG SGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGV KGGKIS PPLSAIFTT
52	PRT	Искусственная	ECB3	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIR YFEFL GSGEAIVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQNGV KGGHIS LPLSAIFTT

53	PRT	Искусственная	ECB4	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIR YDEFRL SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVILGVK GGLVS TPLSAIFTT
54	PRT	Искусственная	ECB5	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMG VKGGKI SPPLSAI FTT
55	PRT	Искусственная	ECB6	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQNGV KGGHIS LPLSAIFTT
56	PRT	Искусственная	ECB7	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIR YFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQNGV KGGHIS LPLSAIFTT
57	PRT	Искусственная	ECB15	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVV SRVTED SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTV GSERS YDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Искусственная	ECB27	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVV SRVTED SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYDEVVVGGEAIVLTV PGSER SYDLTGLKPGTEYVNLGVKGGGSSISVPLSAIFTT

59	PRT	Искусственная	ECB60	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPMLPAPKNLVSRVT EDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEIVL TVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVNVIMGVKGGKISPPLSAIFT T
60	PRT	Искусственная	ECB37	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNMRGLPLSAI FTTAPAPAPAPLAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEIVLTV PGSER SYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGKISVPLSAIFTT
61	PRT	Искусственная	ECB94	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLAPKNLVVS RVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEIVLTV PGSERS YDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGKISPPLSAIFTT
62	PRT	Искусственная	ECB95	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLAPKNLVVS RVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEVFGSGEIVLTV PGSER SYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGKISPPLSAIFTT
63	PRT	Искусственная	ECB96	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLAPKNLVVS RVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEVSKGDAIVLTV PGSERS YDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGKISPPLSAIFTT
64	PRT	Искусственная	ECB97	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLAPKNLVVS RVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEIVLTV PGSERS YDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGKISPPLSAIFTT
65	PRT	Искусственная	ECB106	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPLAPKNLVVS RVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEIVLTV PGSERS YDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGKISPPLSAIFTT

66	PRT	Искусственная	ECB107	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGGEAIVLTV PGSER SYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGGISPPLSAIFTT
67	PRT	Искусственная	ECB108	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTV PGSERS YDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGGISPPLSAIFTT
68	PRT	Искусственная	ECB109	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV GSERS YDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGGISPPLSAIFTT
69	PRT	Искусственная	ECB118	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV GSERS YDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGKISPPPLSAIFTT
70	PRT	Искусственная	ECB119	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGGEAIVLTV PGSER SYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGGISPPLSAIFTT
71	PRT	Искусственная	ECB120	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTV PGSERS YDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGGISPPLSAIFTT
72	PRT	Искусственная	ECB121	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLI QYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVS RVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV GSERS YDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGGISPPLSAIFTT

SEQ ID NO: 73, PRT, Homo Sapiens, EGFR (включает сигнальную последовательность из 24 аминокислот. Зреющий белок начинается с остатка 25)

1 MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS LQRMFNCEV  
 61 VLGNLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP LENLQIIRGN MYYENSYALA  
 121 VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF  
 181 QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW GAGEENCQKL TKIICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC  
 241 TGPRESDCLV CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNVY  
 301 VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS INATNIKHKF  
 361 NCTSIGSDLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE ITGFLLIQAW PENRTDLHAF  
 421 ENLEIIRGRT KQHGFSLAV VSLNITSLGL RSLKEISDGD VIISGNKLC YANTINWKKL  
 481 FGTSGQKTKI ISNRGENSCK ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNVS RGRECVKCN  
 541 LLEGEPREFV ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCPAGVM  
 601 GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCPNG PKIPSIATGM VGALLLLLVV  
 661 ALGIGLFMRH RHIVRKRTL RLLQERELVE PLTPSGEAPN QALLRILKET EFKKIKVLGS  
 721 GAFGTVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLGI  
 781 CLTSTVQLIT QLMFPGCLLD YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA  
 841 RNVLVKTPQH VKITDFGLAK LLGAEKEYH AEGGKVPKWK MALESILHRI YTHQSDVWSY  
 901 GVTWELMTF GSKPYDGIPA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC WMIDADSRPK  
 961 FRELIIIEFSK MARDPQRYLV IQGDERMHLF SPTDSNFYRA LMDEEDMDVV VDADEYLIPQ  
 1021 QGFFSSPSTS RTPLLSLSA TSNNSTVACI DRNGLQSCPI KEDSFLQRYV SDPTGALTED  
 1081 SIDDTFPLVP EYINQVSPKR PAGSVQNPVY HNQLNPAPS RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN  
 1141 TVQPTCVNST FDSPAHWAQK GSHQISLDNP DYQQDFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV  
 1201 APQSSEFIGA

74	PRT	Homo sapiens	EGF	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGIG ERCQYRDLKWWELR
----	-----	--------------	-----	--

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

1 mgamtqllag vflafalat egvikkvir hkrqsgvnat lpeenqpvf nhvynklpv  
 61 gsqcsvdles asgeklapp sepsesfgeh tvdgenqvif thnupira cgcaaadvk  
 121 ellsrlele nlvsslreq tagagclqp atgrldtrpf csgrgnfste ggcvccegw  
 181 kgnpcsepec pgnchlrgc idgcqicddg figedcsqla cpsdcndqgk cvngvcicfe  
 241 gyagadesre icpvpseeh gtcvdglvc hdgagddcn kplclnncyn rgrcvenecv  
 301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq



361 cvcedegfagv dcekrepcad chnrgrcvdg rcecdgftg adcgelkcpn gcsghgrcvn  
421 gqcvcegyt gedcsqrlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsmcsc pndchqhgrc  
481 vngmrvoddg ytedcrdrq cprdcnrgl cvdgqvcged gftgpdcael scpndchggq  
541 rvcngqvcch egfmgkdcke qrcpsdchgq grcvdggqic hegftgldcg qhscpsdcnn  
601 lgqcvsgrei cnegysgedc sevspkdlv vtevetvnlawdnemrvt eylvvypth  
661 egglemqfrv pgdqstuuq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapeglkf  
721 ksketsvev ewdpldiafe tweiufnmn kedegentks lrpetsyrq tglapqeyc  
781 islhvknnt rgpglkrvtt trldapsqe vkdvtdttal itwfkplaei dgietygik  
841 dvpgrdttd ltedenqysi gnlpdteye vslsirgdm ssnpakett tglapmlr  
901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrkyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte  
961 yggysavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltlwktpla kfdryrlns  
1021 lptgqwvvgvq lpmntsyvl rglepgqeyn vlltaekgrh kskparvkas teqapelenl  
1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiqvqe ankveaaml tvpgslravd ipglkaatpy  
1141 tvsiyviqg yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda lknwtapeg ayeyffiqvq  
1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytutrgvtq dfstplsve vlteevpdmg  
1261 nltvtevsdw alrlnwttpd gtydqftuv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt  
1321 pyvtlthgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dgrlrnwtaa dnayehfvic  
1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls acastakepe  
1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfu eudsnrle tveymisgae rtahisglpp  
1501 stdfivylsg lapsirtki satattealp llenltsidi npygftvswm asenafdsfl  
1561 vtvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tggyevmvs gftqghqtkp lraervteae  
1621 pevdllysd atpdgfrlsw tadegvdfnf vlkirdtkkq sepletila pertrditgl  
1681 reateyeiel ygiskgrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw raptaqvesf  
1741 ntyvpitegg tpsmvtdgt ktqtrlvkli pgveylvsu amkgfeesep vsgsftald  
1801 gpsglvtami tdsealarwq paivatvsyv isytgekype itrtvsgntv eyaltdlepa  
1861 teytlrfae kgpqksstit akfttdldsp rdlatevqs etalltwrpp rasvtgyllv  
1921 yesvdgtvke vivgpdttisy sladlspsth ytakiqalng plrsnmqiti fituglypf  
1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfdmtdsg ggwivflrk ngrenfyqnv  
2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqqgy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk  
2101 lkvegysgta gdsamayhngv sfstfdktdt saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd  
2161 nnhsqgvnwf hwkghesiq faemklrpsn frnlegrkr a

76	PRT	Искусственная	Fibcon	Ldaptldqvntdtsitvswtppsaitgyritytspngpgepkelt vppsstsv titgltpgveyvvslyalkdnqespplvgtgtt
77	PRT	Искусственная	10-й домен FN3 фибронектина (FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLSISWDAPAVTVRYY RITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITVYAVTG RGDSPASSKISINY RT
78	PRT	Искусственная	Линкер	GSGS
79	PRT	Искусственная	Линкер	GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
80	PRT	Искусственная	Линкер	APAP
81	PRT	Искусственная	Линкер	APAPAPAPAP
82	PRT	Искусственная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Искусственная	Линкер	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP APAPA PAP
84	PRT	Искусственная	Линкер	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	Искусственная	Петля Tencon	BC TAPDAAFD

86	PRT	Искусственная	Петля Tenson	GF	KGGHRSN
87	PRT	Искусственная	P53A1R5-17 Петля BC		ADPHGFYD
88	PRT	Искусственная	P54AR4-17 Петля BC		TYDRDGVD
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		DYDLGVVD
94	PRT	Искусственная	P54AR4-83 Петля BC		DDPWDFYE
95	PRT	Искусственная	Петли EGFR	FG	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	Искусственная	Петли EGFR	FG	LGSYVFEHDVM
97	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECV97; P54AR4-83v22		Atgttgccagcgcgaagaacctgtagtagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctggacgatccgtggcggttctacgagagctttct gatccagatcaagagagcgagaaagtgcgtgaagcgattgctgac cgtcccgggctccgagcgtcctacgacctgaccggttgaagccggg accgagtatacggtagcatctacgggttcacaatgtctataagaca ctaataatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccacc
98	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECV15; P54AR4-83v2		Atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcgcctgagctgggacgacctggtggcggttctatgagctttcc tgattcagatcaagaaagcgaagaaagtggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgcctcctacgatctgaccggcctgaaaccgg gtaccgagtacacgggtccatttacgggttcacaatgtgtataaagac accaacatcggtggcctgcccgtgctggcgatttcaccacc
99	PRT	Искусственная	Tenson 27		LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGAIIVTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	Искусственная	Библиотека TCL14		LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXVGAIIVTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

> SEQ ID NO: 101  
PRT  
Homo sapiens  
c-Met

1 mkapavlapg ilvlftlvq rsngeckea aksemnvnmk yqlpnftaet piqnvilheh

61 hiflgatnyi yvlneddlq vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg vwkdnmal  
 121 vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfpnhh tadiqsevhe ifspqieeps qcpcvvsal  
 181 gakvlssvkd rfinffvngt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdgfmft dqsydvlpe  
 241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtnur fcsinsglhs ymemplecil  
 301 tekrrkrstk kevfmlqaa yvskpqaqla rqiagaslndd ilfgvfaqsk pdsaeprdrs  
 361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqhfy gpnhehefnr tllrnssgce ardeyrtef  
 421 ttalqrvldf mgqfsevlit sistfikgdl tianltseg rfmqvvsrs gpstphvnfl  
 481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvtgkkl tkiplnglge rhfqscsqcl sappfvqcgw  
 541 chdkcvrsee clsgwtwqqi clparykvfp nsapleggr ltcgwdfgf rrmkfdlkk  
 601 trvlgnesc titllestmn tlkctvgpam nkhfnmsiu snghgttqys tfsyvdpvit  
 661 sispygpma ggtiltltgn ylnsgnsrhu siggkctik svnsilecy tpaqtistef  
 721 avklkidlan retsfsyre dpivyehpt ksistwwke plnsvsffc fasggsttg  
 781 vgnlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsneucct tpslqqnlq lpltkaffin  
 841 ldglskyfd hyvhnpvfk pfekevmsm gnenvleikg ndidpeavkg evlkgvgnksc  
 901 enihlhseav lctvpndllk lnsehniewk qaisstvlgk vivqpdqnt gliagvvsis  
 961 tallllgff lwlkkkqkik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvsnesvd  
 1021 yratfpedqf pssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspllqntvh idlsalnpel  
 1081 vqavqhvviq psslvhfne vigrghfgcv yhgtildndg kkihcaavksl nritdigevs  
 1141 qfitegumk dfshpnlsl lgiclrsegs plvlpymkh gdlrnfirne thnptvkdi  
 1201 gfglvakgm kylaskkfvh idlaarncl dektvkvad fgldarmyd eyysvhnkgt  
 1261 aklpkvkmal eslqtqkft ksdvwsfgvl lwelmtgap pypdvntfdi tvyllqgrrl  
 1321 lqpeycpdpl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrsafs tfigehyv hv natyvvnkcv  
 1381 apypslsse dnaddevdtr pasfwets

102	PRT	Homo sapiens	HGF	<p>QRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK  TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDK  ARKQCLWFPFNSMS  SGVKKEFGHEFDLYE  NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWS  SMIPHEHSFLPSSYRG  KDLQENYCRNP  RGEEGPPWCFTSNPEVRYEVCDDIPQCSEVEC  MTCNGESYRGLMDH  TESGKICQRWDHQTP  HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPW  CYTLDPHTRWEYCAIK  TCADNTMNDTDVPL  ETTECQQGQEGYRGTVNTWNGIPCQRWDSQ  YPHEHDMTPENFKC  KDLRENYCRNPDGS  ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDC  YRGNKNYMGNLSQT  RSGLTCSMWDKNME  DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDAAGPW  CYTGNPLIPWDYCPIS  RCEGDTTPTIVNL  DHPVISAATKQLRVVNGIPTRTNIGWMMVSLR  YRNKHICGGLIKESW  VLTARQCFPSRD  LKDYEAWLGIHVDVHGRGDEKCKQVLNVSQLV  YGPESDLVLMKLAR  PAVLDD FVSTID LP  NYGCTIPEKTSVYGWGTYGLINYDGLLRVA  HLYIMGNEKCSQHHRG  KVTLNESEICAG  AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMRMVLGVI  VPRGCAIPNRPGIFV  RVAYYAKWIHKII    LTYKVPQS</p>
103	ДНК	Искусственная	> c-MET часть ECB97 P114AR7P95- C5v2	<p>Ctgccggctccgaagaactgggtgagccgtgtaccgaag  atagc  gcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttcgatagct  tctgg  attcgctatttgagttctgggtgagcggtaggcaattgtctgacg  gtgcc  gggctctgaacgctcctacgattgaccggctctgaaccgggca  ccga  gtatggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagccc  accg  ctgagcgcgatctcagcactgggtgctc</p>
104	ДНК	Искусственная	> c-MET часть ECB15 P114AR7P94- A3	<p>Ctgccggcaccgaagaacctggttcagccgtgtgaccgagg  atag  cgcacgcttgagctggaccgctccggatgcagccttgacagct  ctgga  ttcgtaacttgaattctgggtgagcggtagcggatcgttctgacg  gtgccg  ggctctgaacgcagctatgattgacgggctgaagccgggtac  tgagt  acgtggttaacatcatggcggttaaggggtgtaaatcagccc  ccatt  gtccgcgatcttaccacg</p>
105	PRT	Искусственная	Линкер	GGGGS

106	PRT	Искусственная	ECB91	mpapknlvsevedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvg eavltvpgse rsydltlkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpsaiftapapapa papLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYF EFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYWNILSVKGG SISPP LSAIFTT
107	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17v2	lpapknlvsevedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeai vltvpgsersy dtlglkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpsaift
108	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v22	lpapknlvsevedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgea ivltvpgsers ydltlkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpsaift
109	PRT	Искусственная	P54AR4- 83v23	lpapknlvsevedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeai vltvpgsersy dtlglkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpsaift
110	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17v22	lpapknlvsevedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeai vltvpgsersy dtlglkpgteyvtvsygvhnvykdnirglpsaift
111	PRT	Искусственная	P114AR7P94- A3v22	lpapknlvsvrvedsarlswtapdaafdsfwirfelfgsgeaiv tvpgsersyd ltglkpgteyvvnlgvkggkispplsaift
112	PRT	Искусственная	P114AR9P121 -A6v2	LPAPKN LVVSRVTE DSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFVGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWNILGVKGG ISPPLSAIFTT
113	PRT	Искусственная	P114AR9P122 -A7v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFVSKGDA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGG SISPPLSAIFTT
114	PRT	Искусственная	P114AR7P95- C5v2	LPAPKN LVVSRVTE DSARLSWT APDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILSVKGG SISPPLSAIFTT
115	ДНК	Искусственная	ECB97	atgttgccagcgccgaagaacctgtagttagcgaggttactga ggac agcgcgctctgagctgggacgatccgtggcgctctacgaga gctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtccgtgaagcgattgtg ctgac cgtcccgggctccgagcgttctctacgacctgaccgggttgaagc cgggt accgagtatacggtagcatctacggtttcacaatgtctataag gaca ctaataatccgctgctgctctgagcgcattttcaccaccgacc ggc accggctccgctcctgccccgctgcccggctccgaagaactgg tgggtg agccgtgttaccgaagatagcgacgcctgagctggacggca ccgga tgcggcgctcgatagcttctgattcgctatttgattctggtagc ggtag ggcaattgtctgacgggtccgggctctgaaacgctctacgattg accg gtctgaaaccgggaccgagtagtggtagaacattctgagcgtta aggg cggtagcatcagcccaccgctgagcgatctcagcactggg gttgc

116	ДНК	Искусственная	ЕСВ15	atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccg aggac agcgcccgctgagctgggacgacccgtggcgctctatgagtc tttct gattcagatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtc ctgac cgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaa ccggg tacggagtacacgggtgccattacggtgtcacaatgtataaaa gaca ccaaatcgctggcctgcccgtgtcggcgattttcaccaccg cctgc gccagcgctgcaccggctccgctgcccggcaccgaagaacct ggtgt cagccgtgtgaccgaggatagcgcacgttgagctggaccgct ccgga tgcagccttgacagcttctgattcgttacttgaattctggtagc ggtg aggcgatgcttctgacgggtccgggctctgaacgcagctatgatt tgacg ggcctgaagccgggtactgagtacgtgttaacatcatggcggt aagg gtgtaaaatcagcccgcattgtccgcatcttaccacg
117	PRT	Искусственная	альбумин- связывающий домен	tidewllkeakekaieelkagitsdyfdlinkaktvegvnalkde ilka
118	PRT	Искусственная	ЕСВ18	mlpapknlwsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvge aivltv pgsersydltgkpgteytsiygvhmvkydtnmrglplsaiifta papapa paplpapknlvsvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvgg eavlt vpgsersydltgkpgteyynilgkvggsisvplsaiiftapapap apapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
119	PRT	Искусственная	ЕСВ28	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvge aivltv pgsersydltgkpgteytsiygvhmvkydtnmrglplsaiiftap apapa paplpapknlvsvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvg geavlt vpgsersydltgkpgteyynilgkvggsisvplsaiiftapapap apapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
120	PRT	Искусственная	ЕСВ38	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvg eavltv pgsersydltgkpgteytsiygvhmvkydtnmrglplsaiiftap apapa paplpapknlvsvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsge aivltv pgsersydltgkpgteyynimgkvgkispplsaiiftapapap papapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp
121	PRT	Искусственная	ЕСВ39	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvge aivltv pgsersydltgkpgteytsiygvhmvkydtnmrglplsaiiftap apapa paplpapknlvsvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsge aivltv pgsersydltgkpgteyynimgkvgkispplsaiiftapapap papapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegkalldeilaalp

122	PRT	Искусственная	P53A1 R5-17 withMet	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDS FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Искусственная	P54AR4-17 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDS FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Искусственная	P54AR4-47 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNDDHFDSD FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
125	PRT	Искусственная	P54AR4-48 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYES FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
126	PRT	Искусственная	P54AR4-73 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTPYADLDS FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	Искусственная	P54AR4-74 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNDDHFDSD FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
128	PRT	Искусственная	P54AR4-81 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFD SFLIQ YQESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTE YTVSI YGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	Искусственная	P54AR4-83 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYES FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
130	PRT	Искусственная	P54CR4-31 Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSF LIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT
131	PRT	Искусственная	P54AR4-83v2 c Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYES FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNM RGLPLSAIFTT
132	PRT	Искусственная	P54CR4-31v2 c Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDS FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
133	PRT	Искусственная	P54AR4-73v2 c Met	c	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTPYADLDS FLIQY QESEKVGAINLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
134	PRT	Искусственная	P53A1R5- 17v2 c Met	c	mlpapknlwsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvge aivltvpgser sydltlgkpgteytsiygvhnykdtnmrglplsaiift

135	PRT	Искусственная	P54AR4-83v22 с Met	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvg eaiivtvpgge rsydlitgkpgteyvtvsygvhnykdnirglplsaiftt
136	PRT	Искусственная	P54AR4-83v23 с Met	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvg eaiivtvpgge sydlitgkpgteyvtvsygvhnykdnirglplsaiftt
137	PRT	Искусственная	P53A1R5-17v22 с Met	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvg eaiivtvpgge sydlitgkpgteyvtvsygvhnykdnirglplsaiftt
138	PRT	Искусственная	ECB1 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAP DAAF DSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG LKPG TEYVYNILGVKGGKSISVPLSAI FTT
139	PRT	Искусственная	ECB2 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGSLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFD SFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGLK PGT EYVYNIMGVKGGKISPLSAIFTT
140	PRT	Искусственная	ECB3 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAP DAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGL KPG TEYWQIIGVKGGHISLPLSAI FTT
141	PRT	Искусственная	ECB4 без met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAP DAAF DSFFIRYDEFLLRSGEIVLTVPGSERSYDLTGL KPGT EYVWVILGVKGGVSTPLSAIFTT



142	PRT	Искусственная	ECB5 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAP DAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGL KPG TEYVVNIMGVKGKISPPLSAIFTT
143	PRT	Искусственная	ECB6 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAP DAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGL KPG TEYVVQ11GVKGGHISLPLSAIFTT
144	PRT	Искусственная	ECB7 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGS GGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAP DAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGL KPG TEYVVQ 11 GVKGGHISLPLSAI FTT
145	PRT	Искусственная	ECB15 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF LGGG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGV KGGKI SPPLSAIFTT
146	PRT	Искусственная	ECB27 без met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VGGG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNILGVK GGSI SVPLSAIFTT

147	PRT	Искусственная	ECB60 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPM LPAPK NLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FLGS GEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMG VKGG KISPPLSAIFTT
148	PRT	Искусственная	ECB37 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPL PAPKN LVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VVG EAIIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVK GCSI SVPLSAIFTT
149	PRT	Искусственная	ECB94 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGE AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVKG GKIS PPLSAIFTT
150	PRT	Искусственная	ECB95 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV GSG EAIIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVK GCSI SPPLSAIFTT
151	PRT	Искусственная	ECB96 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKGD AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVKG GSI PPLSAIFTT

152	PRT	Искусственная	ECB97 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFL GSGE AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILSVKG GSISP PLSAIFTT
153	PRT	Искусственная	ECB106 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFL IQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFL GSGE AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVKG GKIS PPLSAIFTT
154	PRT	Искусственная	ECB107 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFL IQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFV GSG EIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVK GCSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Искусственная	ECB108 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFL IQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFV SKGD AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVKG GSIS PPLSAIFTT
156	PRT	Искусственная	ECB109 met	без	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFL IQYQ ESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAP L PAP KNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFL GSGE AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILSVKG GSISP PLSAIFTT

157	PRT	Искусственная	ECB118 met	6e3	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLP APKNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGE AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNNILGVKG GKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Искусственная	ECB119 met	6e3	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLP APKNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV GSG EAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNNILGVK GCSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Искусственная	ECB120 met	6e3	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLP APKNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKGD AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNNILGVKG GSIS PPLSAIFTT
160	PRT	Искусственная	ECB121 met	6e3	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFL IQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYT VSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLP APKNL VVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGE AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNNILSVKG GSISP PLSAIFTT
161	PRT	Искусственная	ECB91 met	6e3	lpapknlvsevtedsarlswwdpafyesfliqyqesekvgea ivtpgse ydlitglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglplsaittapapap apLPAPK NLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFE FLGSGEAIVLTP GSESYDLTGLKPGTEYVNNILSVKGGISIPPL SAIFTT
162	PRT	Искусственная	ECB18 met	6e3	lpapknlvsevtedsarlswwdpafyesfliqyqesekvgea ivltp gseSYDLTglkpgteyvtvsiygvhnvykdnirglplsaittapa papap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvgg eaivtv pgseSYDLTglkpgteyyvnilgvkgsisvplsaittapa papap eakvlnreldkygvsdyknlnnaktvegvkalldeilaalp

163	PRT	Искусственная	ECB28 met	без	lpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgea vltvpg sersydlitgkpgteytsiygvhnvykdnmrglplsaifttapap apapa lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvgge avltvp gsersydlitgkpgteyvniilgvkvggsisvplsaifttapapapap aplae akvlanreldkygvsdyknlnnaktvegkalldeilaalp
164	PRT	Искусственная	ECB38 met	без	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafydsfliqyqesekvgea ivltvp gsersydlitgkpgteytsiygvhnvykdnmrglplsaifttapa papap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsg ivltvp gsersydlitgkpgteyvnmimgvkggkispplsaifttapapap apapla eakvlanreldkygvsdyknlnnaktvegkalldeilaalp
165	PRT	Искусственная	ECB39 met	без	lpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgea vltvpg sersydlitgkpgteytsiygvhnvykdnmrglplsaifttapap apapa lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsg vltvpg sersydlitgkpgteyvnmimgvkggkispplsaifttapapap aplae akvlanreldkygvsdyknlnnaktvegkalldeilaalp
166	ДНК	Искусственная	ECB97 met	без	ttgccagcgccgaagaacctgtagtagcgaggttactgagg cagc gcgctctgagctgggacgatccgtggcgttctacgagagctt ctgat ccagatcaagagagcgagaaagtggggaagcgattgtgctg accgt cccgggctccgagcgttctacgacctgaccggttgaagccgg gtacc gagtatacggtagcatctacgggttcacaatgtctataaggac actaa tatccgggtctgcctctgagcgccattttcaccaccgaccggc accg gctccggctcctgccccgctgccccgctccgaagaactgggtg gagcc gtgtaccgaagatagcgacgcctgagctggacggcaccgg atgcg gcgttcgatagctctggtatctatggtttctggtagcgg gaggc aatgttctgacgggctccgggctctgaacgctcctacgattgacc ggctc gaaaccgggaccgagtagtggtgaacattctgagcgtaag ggcgg agcatcagcccaccgctgagcgcgatctcagcagtggtg c

167	ДНК	Искусственная	ECB15 без met	ctgccagcccctaagaatctggtctgagcgaagtaaccgagg acag cgcccgcctgagctgggacgaccctgggcttctatgagcttt cctga ttcagtatcaagaaagcgaagaaagtggcgaagcgatcgtcct gaccg tcccggtagcgcgctcctacgatctgaccggcctgaaacc gggta cggagtacaagggtccatttacgggttcaaatgtgataaag acacc aacatgcgtggcctgcccgtctggcgattttaccaccgcgcct gagc cagcgcctgcaccggctccgctgcccgaaccaagaacctgg ttgca gccgtgtgaccgagatagcgcacgtttgagctgaccgctcc ggatg cagccttgacagcttctgattcgttactttgaattctggtagcg gtgag gcgatcgttctgacgggtccggctctgaacgcagctatgattg acggg cctgaagccggtagctgagtagctggttaacatcatggcgtaa gggtg gtaaatcagcccattgtccgcatctttaccaccg
168	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB97; P54AR4- 83v22 без met	ttgccagcccgaagaacctgtagttagcagaggtactgagga cagc gcgctctgagctgggacgatccgtgggcttctacgagagcttt ctgat ccagtatcaagagagcgaagaaagtgggaagcattgtgctg accgt cccgggctccgagcgttctacgacctgaccggttgaaccgg gtacc gagtatacggtagcatctacgggttcaaatgtctataaggac actaa tatccgggtctgctctgagcgccattttaccacc
169	ДНК	Искусственная	> EGFR часть ECB15; P54AR4-83v2 без met	ctgccagcccctaagaatctggtctgagcgaagtaaccgagg acag cgcccgcctgagctgggacgaccctgggcttctatgagcttt cctga ttcagtatcaagaaagcgaagaaagtggcgaagcgatcgtcct gaccg tcccggtagcgcgctcctacgatctgaccggcctgaaacc gggta cggagtacaagggtccatttacgggttcaaatgtgataaag acacc aacatgcgtggcctgcccgtctggcgattttaccacc
170	PRT	Искусственная	ECB94 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYES FLIQY QESEKVG E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF LGSG E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y V V N I L G V K GGKI SPPLSAIFTC

171	PRT	Искусственная	ECB95 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYES FLIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAI FTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF VGSG EAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVK GCSI SPPLSAIFTTC
172	PRT	Искусственная	ECB96 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYES LIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF VSKG DAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVK GCSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	Искусственная	ECB97 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYES FLIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF LGSG EAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILSVK GGSIS PPLSAIFTTC
174	PRT	Искусственная	ECB106 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYES FLIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF LGSG EAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVK GGKI SPPLSAIFTTC
175	PRT	Искусственная	ECB107 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYES FLIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF VGSG EAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVK GCSI SPPLSAIFTTC
176	PRT	Искусственная	ECB108 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYES FLIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF VSKG DAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILGVK GCSI SPPLSAIFTTC
177	PRT	Искусственная	ECB109 с концевым цистеином	C-MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYES FLIQY QESEKVGAEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEY TVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPL PAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEF LGSG EAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVNVILSVK GGSIS PPLSAIFTTC
178	PRT	Искусственная	ECB91 с концевым цистеином	C-mlpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvg eaivltpgse rsydltgkpgteytsiygvhnykdtnirglplsaifttapapapa papLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYF EFLGSGEAIPLTV PGSESYDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGSISP PLSAIFTTC

> SEQ ID NO: 179

PRT

Искусственная

Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR

HNVYKDTNX<sub>9</sub>RGL;

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

> SEQ ID NO: 180

PRT

Искусственная

Петля FG домена FN3, связывающегося с EGFR

LGSYVFEHDVML (SEQ ID NO: 180),

> SEQ ID NO: 181

PRT

Искусственная

Петля BC домена FN3, связывающегося с EGFR



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

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

> SEQ ID NO: 182

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с EGFR

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DSFLIQYQSEKVGAINLTVP  
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX<sub>9</sub>RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

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

> SEQ ID NO: 183

PRT

Искусственная

Домен FN3, связывающийся с EGFR

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DSFLIQYQSEKVGAINLTVP  
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFENDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

причем:

- X<sub>1</sub> представляет собой A, T, G или D;
- X<sub>2</sub> представляет собой A, D, Y или W;
- X<sub>3</sub> представляет собой P, D или N;
- X<sub>4</sub> представляет собой L или отсутствует;

X<sub>5</sub> представляет собой D, H, R, G, Y или W;  
 X<sub>6</sub> представляет собой G, D или A;  
 X<sub>7</sub> представляет собой A, F, G, H или D; и  
 X<sub>8</sub> представляет собой Y, F или L.

> SEQ ID NO: 184

PRT

Искусственная

Последовательность тьяга С и петли CD домена FN3, связывающегося с с-Met

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

X<sub>10</sub> представляет собой W, F или V;  
 X<sub>11</sub> представляет собой D, F или L;  
 X<sub>12</sub> представляет собой V, F или L;  
 X<sub>13</sub> представляет собой V, L или T;  
 X<sub>14</sub> представляет собой V, R, G, L, T или S;  
 X<sub>15</sub> представляет собой G, S, A, T или K; и  
 X<sub>16</sub> представляет собой E или D; и

> SEQ ID NO: 185

PRT

Искусственная

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

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

X<sub>17</sub> представляет собой Y, W, I, V, G или A;  
 X<sub>18</sub> представляет собой N, T, Q или G;  
 X<sub>19</sub> представляет собой L, M, N или I;  
 X<sub>20</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>21</sub> представляет собой S, L, G, Y, T, R, H или K;  
 X<sub>22</sub> представляет собой I, V или L; и  
 X<sub>23</sub> представляет собой V, T, H, I, P, Y или L.

> SEQ ID NO: 186

PRT

Искусственная

домен FN3, связывающийся с с-Met

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX<sub>10</sub>IRYX<sub>11</sub>E X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>

AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX<sub>17</sub>VX<sub>18</sub>IX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>VKGGX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>SX<sub>23</sub>PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

причем:

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

> SEQ ID NO: 187

PRT

Искусственная

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

LPAPKNLVVVSX<sub>24</sub>VTX<sub>25</sub>DSX<sub>26</sub>RLSWDDPX<sub>27</sub>AFYX<sub>28</sub>SFLIQYQX<sub>29</sub>SEKVGEAIX<sub>30</sub>LTVPGSERSYDL  
 TGLKPGTEYTVSIYX<sub>31</sub>VHNVYKDTNX<sub>32</sub>RGLPLSAX<sub>33</sub>FTT (SEQ ID NO: 187), причем:

X<sub>24</sub> представляет собой E, N или R;  
 X<sub>25</sub> представляет собой E или P;  
 X<sub>26</sub> представляет собой L или A;  
 X<sub>27</sub> представляет собой H или W;  
 X<sub>28</sub> представляет собой E или D;  
 X<sub>29</sub> представляет собой E или P;  
 X<sub>30</sub> представляет собой N или V;  
 X<sub>31</sub> представляет собой G или Y;  
 X<sub>32</sub> представляет собой M или I; и  
 X<sub>33</sub> представляет собой E или I;

X<sub>34</sub> представляет собой E, N или R;  
 X<sub>35</sub> представляет собой E или P;  
 X<sub>36</sub> представляет собой L или A;  
 X<sub>37</sub> представляет собой E или P;  
 X<sub>38</sub> представляет собой V или L;  
 X<sub>39</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>40</sub> представляет собой S или K;  
 X<sub>41</sub> представляет собой E или D;  
 X<sub>42</sub> представляет собой N или V;  
 X<sub>43</sub> представляет собой L или M;  
 X<sub>44</sub> представляет собой G или S;  
 X<sub>45</sub> представляет собой S или K; и  
 X<sub>46</sub> представляет собой E или I.

> SEQ ID NO: 189

VH mAb к EGFR E1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSYKYYGD  
 SVKGRFTISRDNKNTLY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS

> SEQ ID NO: 190

VL mAb к EGFR E1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISSALVWYQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFGSGES  
 GTDFLTISLQRP  
 EDFATYYCQQFNQSYPLTFGGGKVEIK

> SEQ ID NO: 191

VH mAb к EGFR E2

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN  
 IKKDGSEKYY  
 61 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWWYFDL  
 WGRGTLTVTS  
 121 S

> SEQ ID NO: 192

VL mAb к EGFR E2

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA  
 61 RFGSGSGGTD FTLTISLLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK

> SEQ ID NO: 193

VH mAb к c-Met M1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYFTFSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAYNGYTNYAQ  
KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLVTVSS

> SEQ ID NO: 194

VL mAb к c-Met M1

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSG  
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP-ITFGQGTRLEIK

> SEQ ID NO: 195

VH mAb к c-Met M2

EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDDGSYTYYPDS  
VKGRFTISRDNKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYGSGSYYNQDYWGQGLVTVSS

> SEQ ID NO: 196

c-Met mAb M2 VL

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK

> SEQ ID NO: 197

Gp120 тяжелая цепь с F405L

qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapqgrfwmqwinpyngkefsakfqdrvtftadtsantaymelrslrsadtavy  
ycarvgpywddspqdnymdvwgkgttivssastkqpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgl  
yslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtccpcepapellggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfn  
wyvdgvevhnaktprreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppreemtknqvsltlcvk  
gfypsdiaewesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqgnvfscsvmhealhhnytqkslslspgk

> SEQ ID NO: 198

Gp120 тяжелая цепь с K409R

qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapqgrfwmqwinpyngkefsakfqdrvtftadtsantaymelrslrsadtavy  
ycarvgpywddspqdnymdvwgkgttivssastkqpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgl  
yslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtccpcepapellggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfn  
wyvdgvevhnaktprreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppreemtknqvsltlcvk  
gfypsdiaewesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdkrsrqgnvfscsvmhealhhnytqkslslspgk

> SEQ ID NO: 199

H1 mAb EM1 (антитело к EGFR, 405L)

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLVTVS

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK  
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT  
 QKLSLSPGK

> SEQ ID NO: 200

L1 mAb EM-1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSES  
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
 LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVT  
 HQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 201

H2 mAb EM-1 (K409R, антитело к c-Met)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHLEWMGWISAYNGYTNYAQ  
 KLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLTVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSLRSLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ  
 KLSLSPGK

> SEQ ID NO: 202

L2 mAb EM-1

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSRFSGSG  
 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSPITFGQGRLEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 203

H1, константный участок

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

DWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLY SRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 204

H2, константный участок

ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 205

EM1-mAb H1, κДНК pdr000015499

caggctgagctgctgagagcggcggagggtgctgagcggcggcagaagcctgaggctgctcgcggccagcggcttcacctcagcacctac  
 ggcctgactggctgagcggcagggccaggcaaggcctgagtgaggctgctgagcggcagcggcagctacaagtactacggcagcagcgt  
 gaaggcaggttcacctcagcagggacaacagcaagaacacctgtactctgagatgaacagcctgaggccgagacaccgctgtactactg  
 cggcaggagcggcatccacctgctggggcctgatgaaggactactctgactactggggccaggcaccctggtgacctgagcagcggccagc  
 caaggcccaagcgtgtccccctggccccagcagcaagagcaccagcggcggcagccgcccctggctgctgctggaaggactactccccga  
 gccagtgacctgctcctggaactctggcggcctgactccggcgtgacacacttccccgctgctgagcagcggcctgtacagcctgagcagc  
 tggtagcctgcccagcagcagcctggcaccagactacatctgcaactggaaccacaagccagcaaccacaaggtggacaagagagtgagc  
 ccaagagctgagacaagaccacacctgccccctgcccagcccagagctgctggcggaccagcgtgttctgttcccccaagcccaagga  
 caccctgatgatcagcaggacccccagggtgacctgctggtggtgagcgtgagccacgaggaccagaggtgaagttcaactgtactgtgagcgc  
 gtggagggtgacacaagccaagaccaagcccagagagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 ctgaaaggcaagaaatacaagtgcaaggtctcacaagggcctgcccagccccatgaaaagaccatcagcaaggccaaggccagccagcggga  
 gcccccaggtgtacacctgccccagcgggagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtgaaaggcttctccccagcagacatc  
 gccgtggagtgaggagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccccccagctgctggacagcagcggcagcttctctctgtacagcaag  
 ctgacctgggacaagtcaggtggcagcagggcaactgttctgctgagcgtgatgacagggcctgcacaaccactacaccagaagtcctga  
 gcctgagccccggcaaatga

> SEQ ID NO: 206

EM1-mAb L1, κДНК pDR000015499

atccagctgaccagagccccagcagcctgagcggcagcgtggcgaccgggtgacctcacctgcccggccagccagacatcagcagcgcct  
 ggtctggtatcagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacgacgccagctccctggaaaagcggctgcccagccgggtcagcggcag  
 cgagagcggcaccgacttaccctgacctcagcagcctgagcccagagacttcccactactactccagcagttcaacagctaccccctgacctt  
 tggcggcggacaagaaggtggagatcaagcgtacgtgcccctccagcgtgttctctccccccagcagcagcagctgaagagcggcaccgc  
 cagcgtggtgctgctgtaacaacttctacccccggaggccaaggtgagtggaaggtggacaacgccctgagagcggcaacagccagagag

cgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctg  
cgagggtaccaccaggccctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacagggcgagtgctga

> SEQ ID NO: 207

EM1-mAb H2, κДНК pDR000016584

cagggtcagctgggtcagctggagctgagtgagaagcctggggcctcagfgaaggtctcctgagacttctggttacacctttaccagctatggtat  
cagctgggtgacagagccctggacagggcctgagtgatgggatgagatcagcgttacaatggttacacaaactatgcacagaagctccaggggca  
gggtcaccatgaccacagacacatccacagcagcctacatggagctgagggagcctgagatctgacgacagccgtgtattactgtgcgagagat  
ctgagaggaactaactcttctgactactgggcccaggaaccctggcaccgtctcctcagcctccaccaaggcccaagcgtgttccctctgcccccc  
agcagcaagagacatctggcgaacagcccccctgggctcctggtgaaagactctcccgagccgtgaccgtgtcctggaactctggcgccct  
gaccagcggcgtgacacaccttccagcctgctgacagcagcggcctgtacagcctgtccagcgtggtgaccgtgcccagcagctccctgggacc  
cagacctacatctgcaactgtaaccacaagccagcaacaccaagggtggacaagcgggtggaaccaagagctgcaacaagaccacacctgtccc  
ccctgcctgccccctgactgtggcggaccctcctgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaagtgc  
ctgctgtggtgagcgtgtccacagagaccctgaaagtgaagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccacccaga  
gaggaaactgacacagcactaccgggtggtctcctgctgacagctgtcaccaggactggtgaaacggcaagagtacaagtcaaggtctcca  
acaaggccctgctgtccatcgagaaaaccatcagcaagccaaggccagcccccgagcctcaggtgtacacactgctcccagccgggaag  
agatgaccaagaacaggtgtccctgacctgtctgtgaaaggcttctccccagcgatctcctggaatgggagagcaacggacagcccagaa  
caactacaagaccacccccctgtgctggacagcagcgtcctctctctgtactctcgtgacctggacaagagccgggtggcagcagggaacg  
gtttcagctgcagcgtgatgacagagccctgcaacaacctacaccagaagctcctgagcctgagccccgggaagtga

> SEQ ID NO: 208

EM1-mAb L2, κДНК pDR000016584

gacatccagatgaccagtcctccctcctcctgctcctctgtggcgacagagtgaccatcacctgtcggcctcccagggtatccaactggctg  
gcctggtccagcacaagcccggcaagcccccaagctgctgatctacgccctcctcctcctgctgtccggctgcccctccagattctccgctctgct  
ccggcaccgacttaccctgacctctccagcctgagcccagagacttccaccctactactcagcagcccaactccttcccacaccttggcca  
gggcacccgctggaatcaagcgtacggtgcccctcccagcgttctatctccccccagcagcagcagctgaagagcggcaccgccagcgt  
ggtgtcctgctgaacaactctacccccggagccaaggtgcagtggaagtggaacaagcctcagagcggcaacagccagagagcgtcac  
cagcagcagcagcaagactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgtccaagcccactacgagaagcacaaggtgtacgctgagcgt  
gaccaccaggccctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacagggcgagtgctga

> SEQ ID NO: 209

Gp120 легкая цепь

Eivltqspgtlslsperatfscrshsirsrvvayqhkpgqaprlyihgvsnragsidrfsgsgtdfltitrvpedfalyycqvvygassytfgg  
tklerkrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssstltskadyekhkyvacevthq  
glsspvtksfirgce



> SEQ ID NO 210

E1 HC1 HCDR1

TYGMH

> SEQ ID NO 211

E1 HC1 HCDR2

VIWDDGSYKYYGDSVKG

> SEQ ID NO 212

E1 HC1 HCDR3

DGITMVRGVMKDYFDY

> SEQ ID NO 213

E1 LC1 LCDR1

RASQDISSALV

> SEQ ID NO 214

E1 LC1 LCDR2

DASSLES

> SEQ ID NO 215

E1 LC1 LCDR3

QQFNSYPLT

> SEQ ID NO 216

E1 HC2 HCDR1

SYGIS

> SEQ ID NO 217

E1 HC2 HCDR2

WISAYNGYTNYAQKLQG

> SEQ ID NO 218

E1 HC2 HCDR3

DLRGTNYFDY

> SEQ ID NO 219

E1 LC2 LCDR1

RASQGISNWLA

> SEQ ID NO: 220

E1 LC2 LCDR2

AASSLLS

> SEQ ID NO: 221

E1 LC2 LCDR3

QQANSFPIT

> SEQ ID NO: 222

E2-mAb HC1, HCDR1

SYWMN

> SEQ ID NO: 223

E2-mAb HC1, HCDR2

NIKKDGSEKYYVDSVKG

> SEQ ID NO: 224

E2-mAb HC1, HCDR3

DLGWGWGWYFDL

> SEQ ID NO: 225

E2-mAb LC1 LCDR1

RASQSVSSYLA

> SEQ ID NO: 226

E2-mAb LC1, LCDR2

DASNRAT

> SEQ ID NO: 227

E2-mAb LC1, LCDR3

QQRSNWPPPT

> SEQ ID NO: 228

E2-mAb HC2, HCDR1

DYYMY

> SEQ ID NO: 229

E2-mAb HC2, HCDR2

TISDDGSYTYYPDSVKG

> SEQ ID NO: 230

E2-mAb HC2, HCDR3

EGLYYYGSGSYYNQDY

> SEQ ID NO: 231

E2-mAb LC2, LCDR1

RASQGLSSALA

> SEQ ID NO: 232

E2-mAb LC2, LCDR2

DASSLES

> SEQ ID NO: 233

E2-mAb LC2, LCDR3

QQFTSYYPQIT

> SEQ ID NO: 234

E2-mAb, HC1 (EGFR-F405L)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY  
 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL  
 WGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS  
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVM  
 HEALHNHYTQKSLSPGK

> SEQ ID NO: 235

E2-mAb LC1, (EGFR)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA  
 RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 236

E2-mAb HC2 (c-Met- K409R)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDDGSYTYYPDS  
 VKGRFTISRDNANKNNLYLQMSLKSSEDAMYYCAREGLYYYGSGSYYNQDYWGQGTLLVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSL

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEVESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  
 KLSLSLSPGK

> SEQ ID NO: 237

E2-mAb LC2 (c-Met)

QLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSQSGSG  
 TDFTLTISLQPEDFATYYCQFTSYPIQITFGQGRLEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> SEQ ID NO: 238

непрерывный эпитоп c-Met в mAb 069

PEFRDSYPIKYVNAF

> SEQ ID NO: 239

непрерывный эпитоп c-Met в mAb 069

FAQSKPDSAEPMDRSA

> SEQ ID NO: 240

эпитоп mAb 5D5

PGAQLARQIGASLNDD

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное биспецифическое антитело к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)/рецептору фактора роста гепатоцитов (c-Met), содержащее:

а) первую тяжелую цепь (HC1), содержащую константный домен 3 HC1 (HC1 CH3) и переменный участок 1 HC1 (VH1), содержащий определяющие комплементарности участки тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 210, 211 и 212 соответственно;

б) вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую константный домен 3 HC2 (HC2 CH3) и переменный участок 2 HC2 (VH2), содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 216, 217 и 218 соответственно;

в) первую легкую цепь (LC1), содержащую переменный участок 1 легкой цепи (VL1), содержащий определяющие комплементарности участки легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 213, 214 и 215 соответственно; и

г) вторую легкую цепь (LC2), содержащую переменный участок 2 легкой цепи (VL2), содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 219, 220 и 221 соответственно,

где пара VH1 и VL1 образует первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с EGFR, пара VH2 и VL2 образует второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с c-Met;

где антитело представляет собой IgG<sub>1</sub> и имеет замену F405L в плече связывания EGFR и замену K409R в плече связывания c-Met в константном домене CH3 для усиления гетеродимеризации с образованием биспецифического антитела.

2. Биспецифическое антитело по п.1, где

антитело ингибирует фосфорилирование связанных с внеклеточными сигналами киназ 1 и 2 (ERK1/2) в клеточной линии NCI-H292, NCI-H1975 или SKMES-1 со значением IC<sub>50</sub>, которое по меньшей мере приблизительно в 10 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 20 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 30 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 40 раз меньше, по меньшей мере приблизительно в 50 раз меньше или по меньшей мере приблизительно в 60 раз меньше по сравнению со значением IC<sub>50</sub> для ингибирования фосфорилирования ERK1/2 в клеточных линиях NCI-H292, NCI-H1975 или SKMES-1 смесью контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего тяже-

люю цепь 3 (HC3) и легкую цепь 3 (LC3), и контрольного одновалентного антитела к с-Met, содержащего тяжелую цепь 4 (HC4) и легкую цепь 4 (LC4);

HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно;

фосфорилирование ERK1/2 измеряют в цельноклеточных лизатах методом сэндвич-ИФА с применением антитела к фосфо-ERK1/2 в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела, связывающегося с нефосфорилированной и фосфорилированной ERK1/2, в качестве детекторного антитела.

3. Биспецифическое антитело по п.1 или 2, где антитело ингибирует фосфорилирование ERK1/2 со значением  $IC_{50}$  приблизительно  $2 \times 10^{-9}$  М или менее, приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее или приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М или менее.

4. Биспецифическое антитело по п.2 или 3, где ERK1 фосфорилирован на остатках Thr202 и Tyr204, а ERK2 фосфорилирован на остатках Thr185 и Tyr197.

5. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-4, где

антитело ингибирует фосфорилирование протеинкиназы В (АКТ) на Ser473 в клеточной линии NCI-H1975 со значением  $IC_{50}$ , по меньшей мере приблизительно в 70 раз меньшим по сравнению со значением  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования АКТ по Ser473 в клеточной линии NCI-H1975 смесью контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего HC3 и LC3, и контрольного одновалентного антитела к с-Met, содержащего HC4 и LC4;

HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно;

фосфорилирование АКТ на Ser473 измеряют в цельноклеточных лизатах методом сэндвич-ИФА с применением антитела, связывающегося с нефосфорилированной и фосфорилированной АКТ, в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела к фосфорилированной на Ser473 АКТ в качестве детекторного антитела.

6. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-5, где

антитело ингибирует фосфорилирование АКТ на Thr308 в клеточной линии NCI-H1975 со значением  $IC_{50}$ , по меньшей мере приблизительно в 100 раз меньшим по сравнению со значением  $IC_{50}$  для ингибирования фосфорилирования АКТ на Thr308 в клеточной линии NCI-H1975 смесью контрольного одновалентного антитела к EGFR, содержащего HC3 и LC3, и контрольного одновалентного антитела к с-Met, содержащего HC4 и LC4;

HC3 и HC1, LC3 и LC1, HC4 и HC2, а также LC4 и LC2 имеют идентичные аминокислотные последовательности соответственно;

фосфорилирование АКТ на Thr308 измеряют в цельноклеточных лизатах методом сэндвич-ИФА с применением антитела, связывающегося с нефосфорилированной и фосфорилированной АКТ, в качестве захватывающего антитела и конъюгированного с электрохемилюминесцентным соединением антитела к фосфорилированной на Thr308 АКТ в качестве детекторного антитела.

7. Биспецифическое антитело по п.5 или 6, где антитело ингибирует фосфорилирование АКТ на Ser473 или Thr308 со значением  $IC_{50}$ , равным приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или менее.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-7, где биспецифическое антитело связывается с EGFR, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, на остатках EGFR K489, I491, K467 и S492 и с с-Met на остатках PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID NO: 238) и FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID NO: 239).

9. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-8, где антитело ингибирует рост клеток NCI-H292 или NCI-H1975 со значением  $IC_{50}$ , по меньшей мере приблизительно в 300 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 400 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 500 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 600 раз меньшим, по меньшей мере приблизительно в 700 раз меньшим или по меньшей мере приблизительно в 800 раз меньшим по сравнению со значением  $IC_{50}$  для ингибирования роста клеток NCI-H292 или NCI-H1975 цетуксимабом, если клетки NCI-H292 или NCI-H1975 выращивают в условиях с низким прикреплением.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-9, где антитело ингибирует рост опухоли из экспрессирующих HGF клеток SKMES-1 у мышей SCID Beige с процентным (%) значением T/C на 36 сутки, по меньшей мере в 500 раз меньшим по сравнению с цетуксимабом при введении биспецифического антитела и цетуксимаба в дозе 20 мг/кг.

11. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-10, где антитело нейтрализует передачу сигналов EGFR и с-Met.

12. Биспецифическое антитело по п.1, где VH1, VL1, VH2 и VL2 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 189, 190, 193 и 194 соответственно.

13. Биспецифическое антитело по п.12, содержащее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 консервативных аминокислотных замен в HC1, LC1, HC2 или LC2.

14. Биспецифическое антитело по п.13, содержащее замену M252Y/S254T/T256E в HC1 и/или в

HC2, где нумерация остатков соответствует индексу ЕС.

15. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-14, где антитело имеет 2-антенарную структуру гликана с содержанием фукозы в диапазоне приблизительно от 1 до приблизительно 15%.

16. Биспецифическое антитело по п.2, где HC1, LC1, HC2 и LC2 кодированы синтетическими полинуклеотидами, содержащими последовательности SEQ ID NO: 205, 206, 207 и 208 соответственно.

17. Выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 по п.16.

18. Выделенный полинуклеотид по п.17, содержащий полинуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 205, 206, 207 или 208.

19. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.17 или 18.

20. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.19.

21. Способ получения выделенного биспецифического к EGFR/c-Met антитела по п.12, включающий:

а) объединение выделенного моноспецифического двухвалентного антитела к EGFR, содержащего две тяжелые цепи SEQ ID NO: 199 и две легкие цепи SEQ ID NO: 200, и выделенного моноспецифического двухвалентного антитела к c-Met, содержащего две тяжелые цепи SEQ ID NO: 201 и две легкие цепи SEQ ID NO: 202, в смеси с молярным соотношением приблизительно 1:1;

б) введение в смесь восстанавливающего агента;

в) инкубирование смеси в течение от приблизительно 90 мин до приблизительно 6 ч;

г) удаление восстанавливающего агента;

е) очистку биспецифического антитела к EGFR/c-Met антитела, содержащего первую тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 210, 211 и 212, и вторую тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 216, 217 и 218, первую легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 213, 214 и 215, и вторую легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 219, 220 и 221, где пара первой тяжелой цепи и первой легкой цепи образует первый связывающий домен, который специфически связывается с EGFR, и пара второй тяжелой цепи и второй легкой цепи образует второй связывающий домен, который специфически связывается с c-Met.

22. Способ по п.21, где восстанавливающий агент представляет собой 2-меркаптоэтанолламин (2-MEA).

23. Способ по п.22, где 2-MEA присутствует в концентрации от приблизительно 25 до приблизительно 75 mM.

24. Способ по п.23, где стадию инкубации проводят при температуре от приблизительно 25 до приблизительно 37°C.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Способ лечения онкологического больного, включающий введение терапевтически эффективно количества биспецифического к EGFR/c-Met антитела по пп.2, 12 больному в течение периода времени, достаточного для лечения рака, 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 почки, 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).

27. Способ по п.26, где рак связан с активирующей EGFR мутацией, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, активирующей c-Met мутацией, амплификацией гена c-Met или мутацией KRAS.

28. Способ по п.27, где 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.

29. Способ по п.28, где активирующая EGFR мутация представляет собой замену L858R, del (E476, A750) и/или T790M.

30. Способ по п.27, где мутация KRAS имеет замену G12V или G12C.

31. Способ по п.30, где мутация KRAS имеет замену G12V.

32. Способ по п.27, где больной резистентен или приобрел резистентность к лечению эрлотинибом, gefитинибом, афатинибом, CO-1686, AZD9192 или цетуксимабом.

33. Способ по п.26, где субъект является гомозиготным по фенилаланину в положении 158 в CD16 или гетерозиготным по валину и фенилаланину в положении 158 в CD16.

34. Способ по п.26, включающий введение второго терапевтического агента.

35. Способ по п.34, где второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент или средство для таргетной противораковой терапии.

36. Способ по п.35, где химиотерапевтический агент представляет собой цисплатин или винбластин.
37. Способ по п.35, где химиотерапевтический агент или средство для таргетной противораковой терапии представляет собой ингибитор тирозинкиназы EGFR, с-Met, HER2, HER3, HER4 или VEGFR.
38. Способ по п.37, где ингибитор тирозинкиназы представляет собой эрлотиниб, gefитиниб или афатиниб.
39. Способ по п.34, где второй терапевтический агент вводят одновременно или по отдельности.
40. Способ по п.39, где второй терапевтический агент вводят последовательно.
41. Способ ингибирования роста или пролиферации клеток, экспрессирующих EGFR и/или с-Met, включающий приведение клеток в контакт с биспецифическим антителом по пп.2, 12.
42. Способ ингибирования роста или метастазирования экспрессирующей EGFR и/или с-Met опухоли или раковых клеток у больного, включающий введение больному эффективного количества биспецифического антитела по пп.2, 12.
43. Способ по п.42, где опухоль, экспрессирующая EGFR и/или с-Met, 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).
44. Способ по п.43, где экспрессирующая EGFR и/или с-Met опухоль связана с активирующей EGFR мутацией, амплификацией гена EGFR, повышенным уровнем циркулирующего HGF, активирующей с-Met мутацией, амплификацией гена с-Met или мутацией KRAS.
45. Способ по п.44, где 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.
46. Способ по п.45, где активирующая EGFR мутация представляет собой замену L858R, del (E476, A750) и/или T790M.
47. Способ по п.44, где мутация KRAS имеет замену G12V или G12C.
48. Способ по п.47, где мутация KRAS имеет замену G12V.
49. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-16 для терапии.
50. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-16 для лечения рака, 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).

```

SEQ ID
NO:
18 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
19 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYD-RDGYDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
20 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWBYN-GDHFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
21 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-RGFYESFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
22 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
23 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWBYN-GDHFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
24 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGDHFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
25 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
27 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
29 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG
107 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
108 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-WAFYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
109 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDP-HAFYESFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
110 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADP-HGFYDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
*****
*****

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. 1А

```

SEQ ID
NO:
26 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAP-DAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
28 LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWAP-DAAFDSFLIQYQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
*****
*****

26 LKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLEPLSAEFTT (94)
28 LKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLEPLSAIFTT
*****
*****

```

Фиг. 1В

		A	AB	B	BC	
TENCON27	(1)	LPAPKNLVVSRV	TEDSARLSW	TAPDAAF	DS	(30)
TCL14	(1)	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSW	TAPDAAF	DS		(30)
		C	CD	D	DE E	
TENCON27	(31)	FLIQYQE	SEKVGGEAIVLTVP	G	SERSYDLTG	(60)
TCL14	(31)	FXIXYXEXXX	GGEAIVLTVPGSERSYDLTG			(60)
		EF	F	FG	G	
TENCON27	(61)	LKPGTEYTVSIYGV	KGGHRSN	PLSAIFTT		(89)
TCL14	(61)	LKPGTEYXVXIXGV	KGGXXS	PLSAIFTT		(89)

Фиг. 2



SEQ ID

NO:

```

32 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
33 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYDEFLLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
34 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
35 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
36 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
37 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
38 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
39 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTD
40 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
41 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
42 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
43 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
44 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
45 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
46 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
47 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG
48 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG
49 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG
111 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
112 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
113 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTG
114 LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAE DSWWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
***** ** * . * :*****
    
```

Фиг. 3

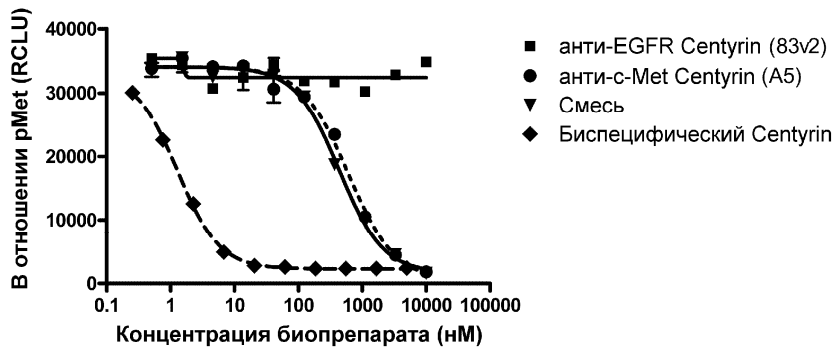
SEQ ID

NO:

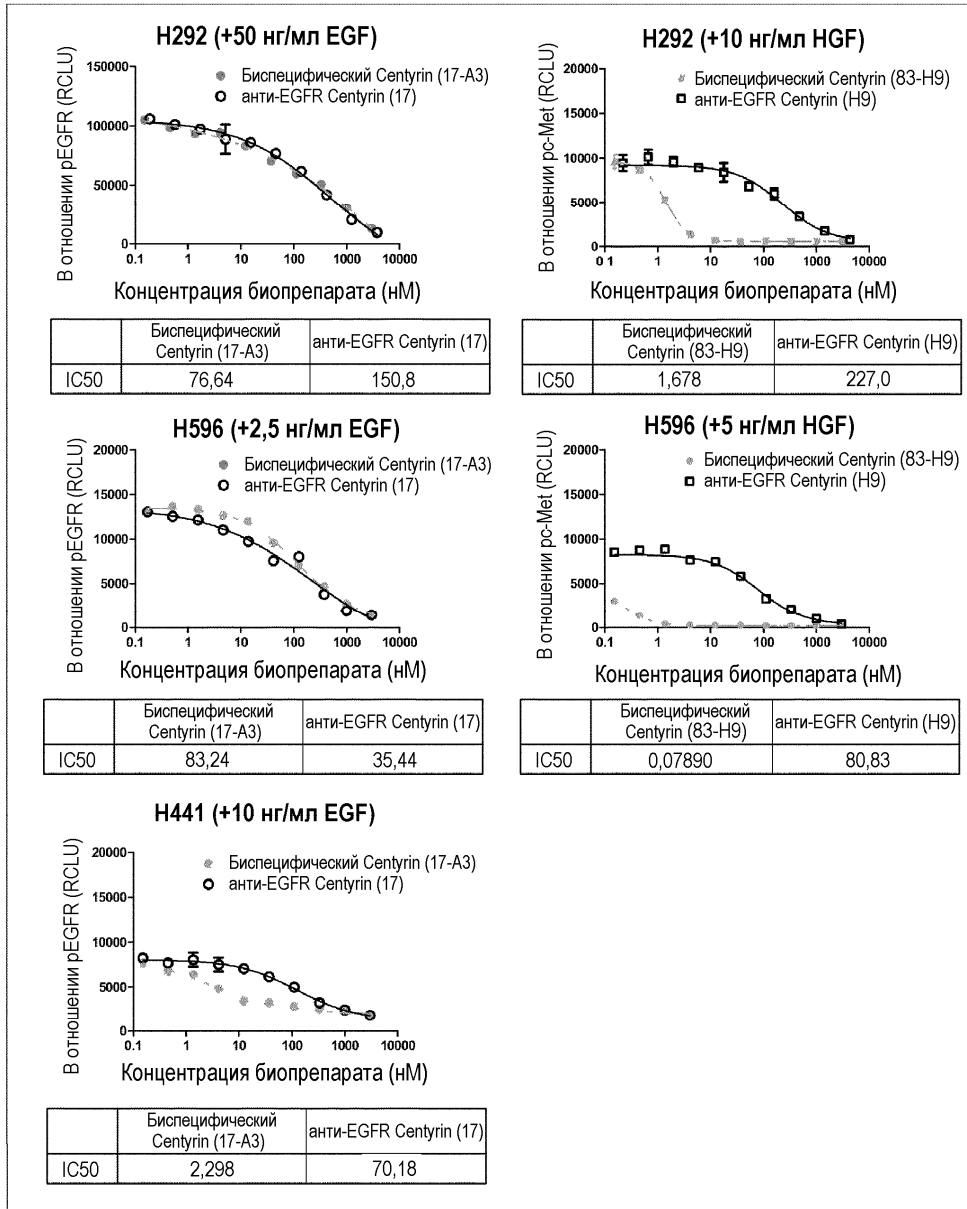
```

32 LKPGTEYVNVILGVKGGISVPLSAIFTT (89)
33 LKPGTEYWVTILGVKGLVSTPLSAIFTT
34 LKPGTEYVNVIMGVKGGISHPLSAIFTT
35 LKPGTEYVNVILGVKGGLSVPLSAIFTT
36 LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37 LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPLSAIFTT
38 LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39 LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40 LKPGTEYVVQILGVKGGHISLPLSAIFTT
41 LKPGTEYVNVIMGVKGGKISPPLSAIFTT
42 LKPGTEYAVNVIMGVKGGRVSPLSAIFTT
43 LKPGTEYVVQILGVKGGISVPLSAIFTT
44 LKPGTEYVNVIMGVKGGISYPLSAIFTT
45 LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46 LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPLSAIFTT
47 LKPGTEYVNVIMGVKGGISPPLSAIFTT
48 LKPGTEYVNVIMGVKGGISPPLSAIFTT
49 LKPGTEYVNVIMGVKGGISPPLSAIFTT
111 LKPGTEYVNVILGVKGGKISPPLSAIFTT
112 LKPGTEYVNVILGVKGGISPPLSAIFTT
113 LKPGTEYVNVILGVKGGISPPLSAIFTT
114 LKPGTEYVNVILSVKGGISPPLSAIFTT
***** ** * . * :*****
    
```

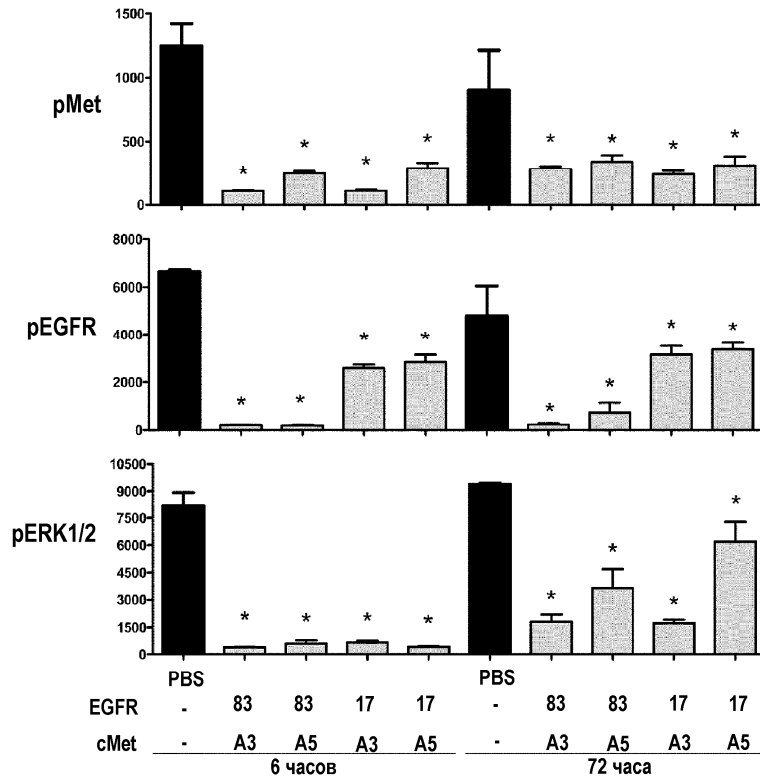
Фиг. 3



Фиг. 4

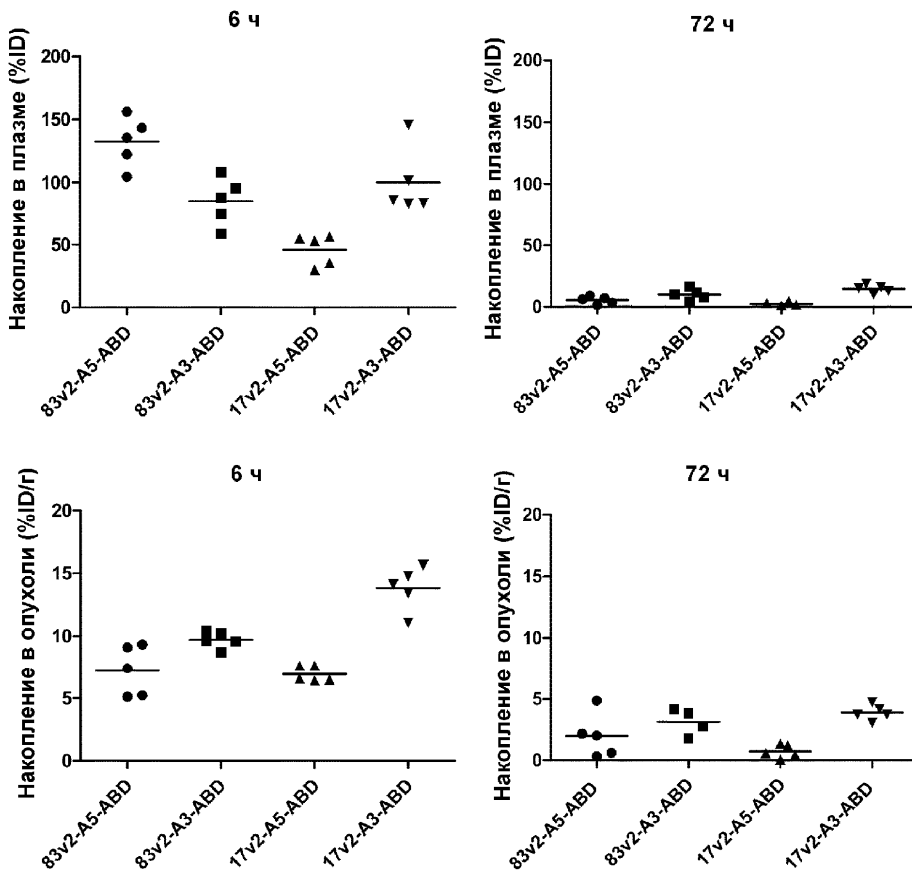


Фиг. 5

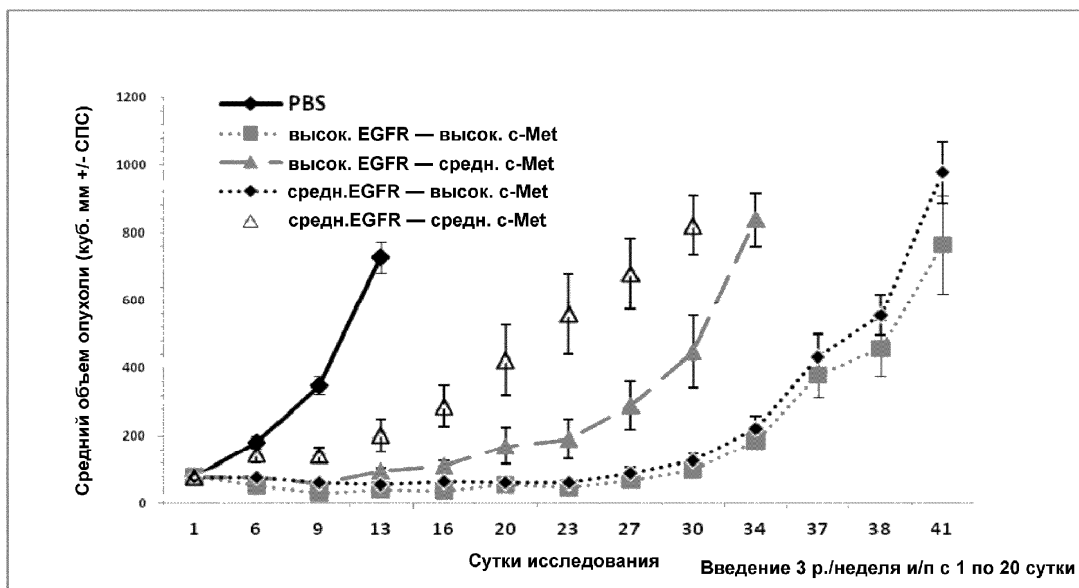


\* p < 0,01

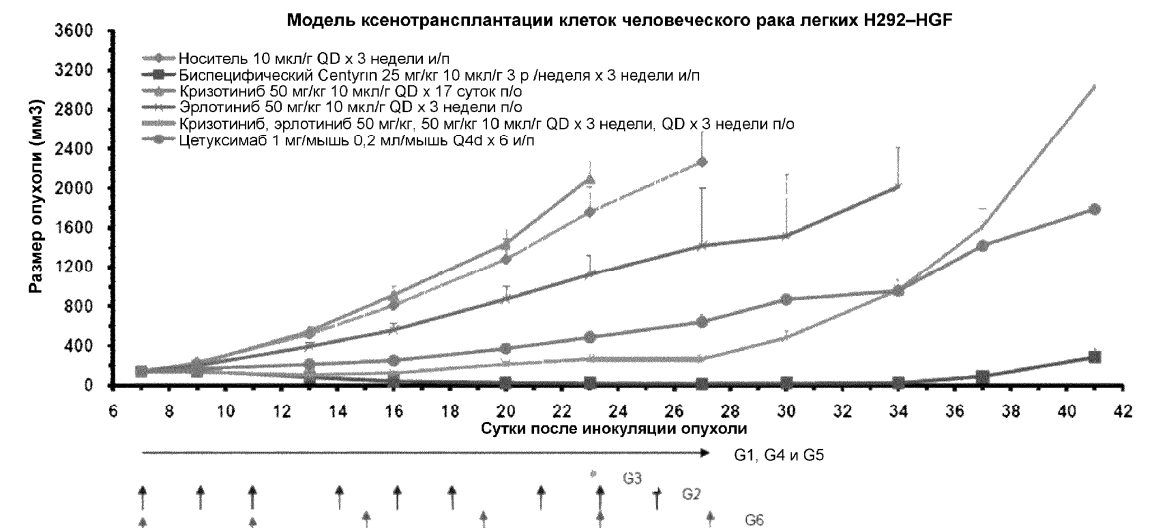
Фиг. 6



Фиг. 7

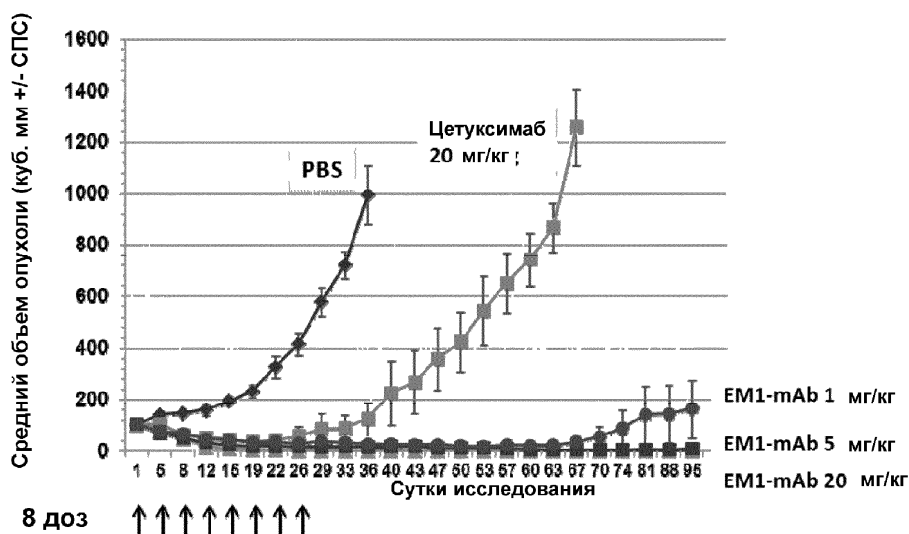


Фиг. 8



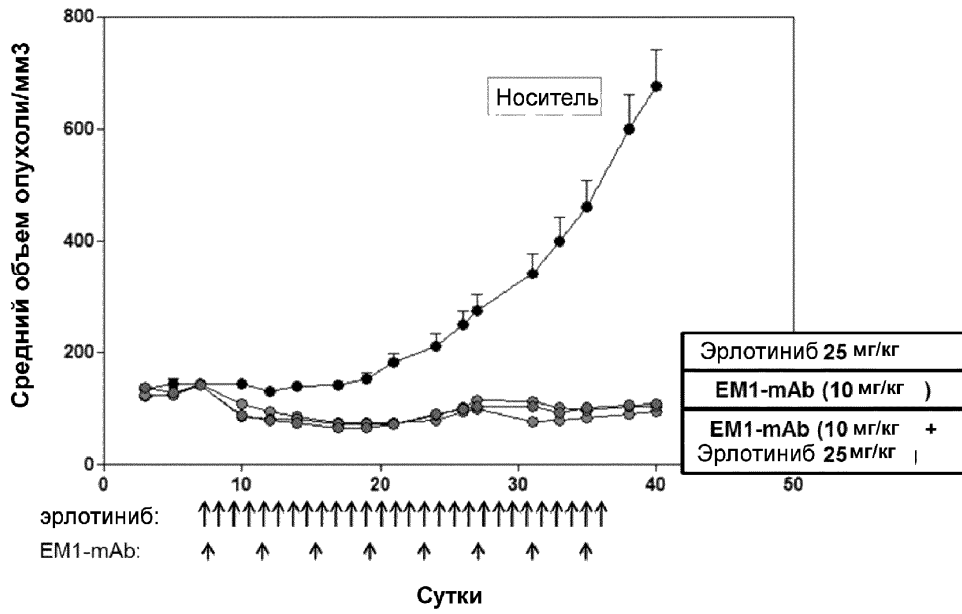
Фиг. 9

**SKMES-HGF (EGFR дикого типа; c-Met дикого типа)**



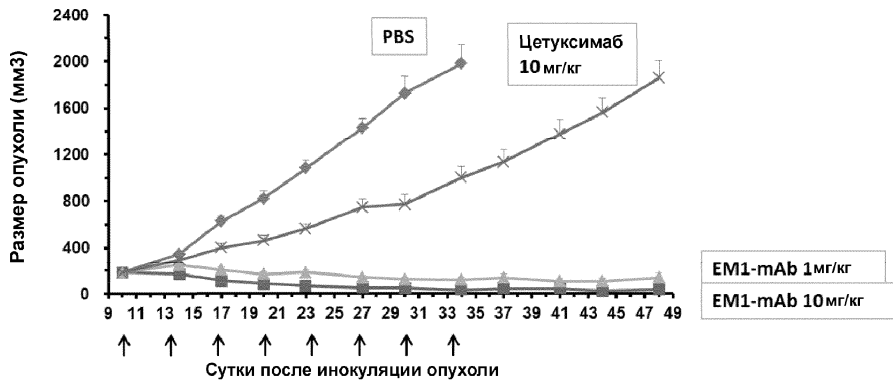
Фиг. 10

**HCC827 (EGFR del (E746, A750))**



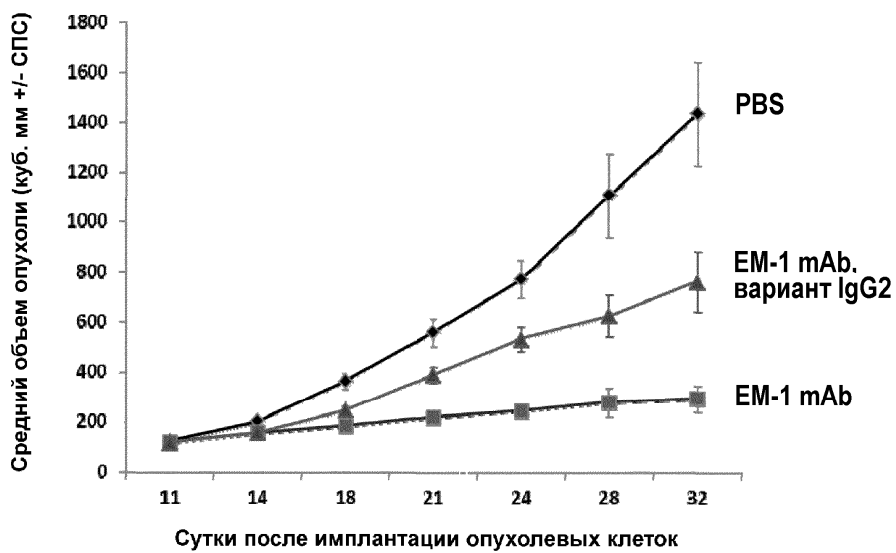
Фиг. 11

**SNU-5 (EGFR дикого типа; MET ампл.)**



Фиг. 12





Введение терапевтического средства и/п, 11, 14, 18, 21, 24, 28, 32 сутки

Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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