



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



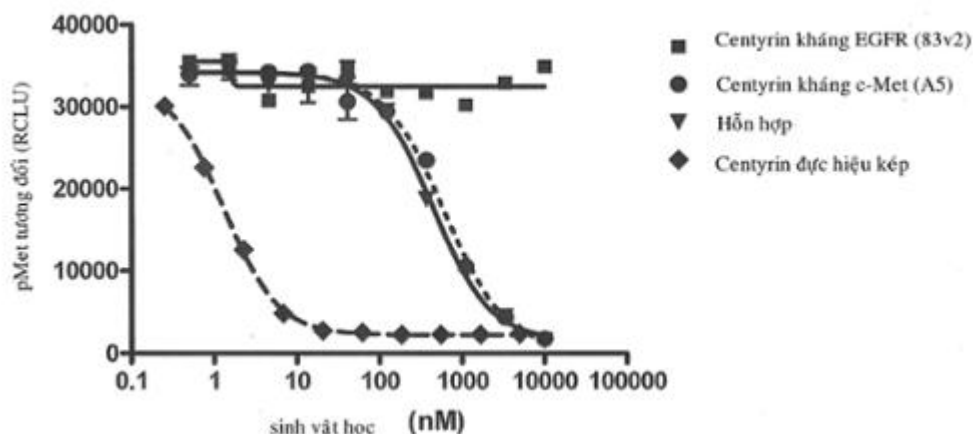
1-0030615

(51)⁷ A61K 38/39; C07K 14/00; A61K 38/00 (13) B

- (21) 1-2015-01757 (22) 21/11/2013
(86) PCT/US2013/071267 21/11/2013 (87) WO 2014/081944 A2 30/05/2014
(30) 61/728,906 21/11/2012 US; 61/728,912 21/11/2012 US; 61/728,914 21/11/2012 US;
61/782,550 14/03/2013 US; 61/809,541 08/04/2013 US
(45) 25/01/2022 406 (43) 25/01/2016 334A
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, USA
(72) ANDERSON, Mark (US); ATTAR, Ricardo (US); DIEM, Michael (US); HYUN,
Linus (US); JACOBS, Steven (US); KING, Alastair (US); KLEIN, Donna (US);
MOORES, Sheri (US); O'NEIL, Karyn (US); PICHA, Kristen (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHÂN TỬ CHỨA MIỀN FN3 ĐẶC HIỆU KÉP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA
PHÂN TỬ ĐẶC HIỆU KÉP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến EGFR (EGFR - Epidermal growth factor receptor - Thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì) đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép và/hoặc vùng c-Met FN3 chứa các phân tử, nucleotit được phân lập mã hóa các phân tử, vectơ, tế bào chủ, và các phương pháp tạo ra chúng là hữu dụng trong việc tạo ra các phân tử điều trị bệnh và các chứng rối loạn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết EGFR (EGFR - Epidermal growth factor receptor - Thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì) và/hoặc c-Met đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép và phương pháp bào chế và sử dụng phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR, ErbB1 hoặc HER1) là glycoprotein màng của 170 kDa mà được mã hóa bằng gen tiền ung thư c-erbB1. EGFR là phân tử của dãy thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì ở người (HER) của thụ thể tiroxin kinaza (receptor tyrosine kinases - RTK) mà bao gồm HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) và HER4 (ErbB4). Tín hiệu EGFR được bắt đầu bằng gắn kết phối tử tiếp theo là sự cảm ứng của thay đổi cấu tạo, sự giống nhau hoặc khác nhau của thụ thể với phân tử dãy ErbB khác, và trans-tự phosphoryl hóa của thụ thể (Ferguson và các đồng tác giả, Annu Rev Biophys, 37: 353-73, 2008), mà bắt đầu dòng thác chuyển nạp tín hiệu cuối cùng ảnh hưởng đến hàng loạt các chức năng tế bào, bao gồm sự phát triển và tồn tại tế bào. Sự tăng lên trong biểu hiện hoặc hoạt tính kinaza của EGFR đã được liên kết với một loạt bệnh ung thư ở người, làm cho EGFR là mục tiêu thu hút dùng cho việc can thiệp điều trị (Mendelsohn và các đồng tác giả, Oncogene 19: 6550-6565, 2000; Grünwald và các đồng tác giả, J Natl Cancer Inst 95: 851-67, 2003; Mendelsohn và các đồng tác giả, Semin Oncol 33: 369-85, 2006). Sự tăng cả về số lượng bản sao gen EGFR và biểu hiện protein được kết hợp với phản ứng phù hợp với chất ức chế tiroxin kinaza EGFR, IRESSA™ (gefitinib) trong ung thư phổi tế bào lớn (Hirsch và các đồng tác giả, Ann Oncol 18:752-60, 2007).

Liệu pháp điều trị EGFR bao gồm cả phân tử nhỏ và các kháng thể kháng EGFR, được chấp nhận dùng để điều trị bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư tụy tạng, ung thư đầu và cổ, và ung thư phổi tế bào lớn (non-small cell lung cancer - NSCLC) (Baselga và Arteaga, J Clin Oncol 23:2445-2459 (2005); Gill và các đồng

tác giả, J Biol Chem, 259:7755-7760, 1984; Goldstein và các đồng tác giả, Clin Cancer Res, 1:131 1-1318; 1995; Prewett và các đồng tác giả, Clin Cancer Res, 4:2957-2966,1998).

Hiệu quả liệu pháp điều trị kháng EGFR có thể phụ thuộc vào loại khối u và tình trạng đột biến/khuếch đại EFGR trong khối u. Tác dụng phụ của liệu pháp điều trị hiện nay có thể bao gồm độc tố trên da (De Roock và các đồng tác giả, Lancet Oncol 11 :753-762, 2010; Linardou và các đồng tác giả, Nat Rev Clin Oncol, 6: 352-366, 2009; Li và Perez-Soler, Targ Oncol 4: 107-119, 2009). Các chất ức chế tiroxin kinaza EGFR (tyrosine kinase inhibitors -TKI) thường được sử dụng như liệu pháp điều trị hàng thứ hai cho bệnh ung thư phổi tế bào lớn (NSCLC), nhưng thường dừng việc điều trị trong vòng 12 tháng do quá trình kháng (Riely và các đồng tác giả, Clin Cancer Res 12: 839-44, 2006).

c-Met mã hóa thụ thể tiroxin kinaza. Lần đầu tiên được nhận dạng là gen tiền ung thư vào năm 1984 sau khi phát hiện ra rằng việc điều trị bằng carxinogen dẫn đến protein dung hợp hoạt tính cấu trúc TPR-MET (Cooper và các đồng tác giả, Nature 311:29-33, 1984). Sự hoạt hóa c-Met bằng phối tử yếu tố tăng trưởng tế bào gan của nó (HGF) kích thích một loạt quá trình tế bào bao gồm tăng trưởng, khả năng vận động, xâm nhập, di căn, quá trình chuyển đổi biểu mô, sản sinh mạch/làm lành vết thương, và tái tạo mô (Christensen và các đồng tác giả, Cancer Lett 225:1-26, 2005; Peters và Adjei, Nat Rev Clin Oncol 9:314-26, 2012). c-Met được tổng hợp làm protein mạch đơn được phân cắt phân giải protein thành 50 kDa alpha- và 140 kDa beta- đơn vị con được gắn kết bằng liên kết disulfua (Ma và các đồng tác giả, Cancer và Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003). c-Met tương tự về cấu trúc với các thụ thể màng khác như Ron và. Hóa học lượng pháp chính xác của gắn kết HGF:c-Met là chưa rõ ràng, nhưng thường cho rằng hai phân tử liên kết với hai phân tử c-Met mà dẫn đến sự dimer hóa và sự tự phosphoryl hóa thụ thể ở các tiroxin 1230, 1234, và 1235 (Stamos và các đồng tác giả, The EMBO Journal 23: 2325-2335, 2004). Sự tự phosphoryl hóa c-Met độc lập phối tử cũng có thể xuất hiện do sự khuếch đại gen, đột biến hoặc quá biểu hiện thụ thể.

c-Met thường được khuếch đại, được đột biến hoặc được quá biểu hiện ở nhiều loại bệnh ung thư bao gồm ung thư dạ dày, phổi, đại tràng, ngực, bàng quang, đầu và cổ, buồng trứng, tuyến tiền liệt, tuyến giáp, tuyến tụy, và thần kinh trung ương. Các đột biến sai nghĩa thường được cục bộ hóa đối với vùng kinaza thường thấy ở ung thư di truyền tế bào nhú thận (hereditary papillary renal carcinomas - PRCC) và ở 13% PRCC đơn phát (Schmidt và các đồng tác giả, *Oncogene* 18: 2343-2350, 1999). Các đột biến c-Met được cục bộ hóa đối với miền semaphorin hoặc juxtamembran của c-Met thường xuyên thấy ở ung thư dạ dày, đầu và cổ, gan, buồng trứng, NSCLC và tuyến giáp (Ma và các đồng tác giả, *Cancer và Metastasis Reviews*, 22: 309-325, 2003; Sakakura và các đồng tác giả, *Chromosomes và Cancer*, 1999. 24:299-305). Sự khuếch đại c-Met đã được phát hiện ở ung thư não, đại thực tràng, dạ dày, và phổi, thường tương ứng với tiến triển của bệnh (Ma và các đồng tác giả, *Cancer và Metastasis Reviews*, 22: 309-325, 2003). Lần lượt lên đến 4% và 20% bệnh ung thư phổi tế bào lớn (NSCLC) và các bệnh ung thư dạ dày, biểu hiện sự khuếch đại c-Met (Sakakura và các đồng tác giả, *Chromosomes and Cancer*, 1999. 24:299-305; Sierra and Tsao, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3:S21-35, 2011). Thậm chí không có sự khuếch đại gen, quá biểu hiện c-Met thường được quan sát ở bệnh ung thư phổi (Ichimura và các đồng tác giả, *Jpn J Cancer Res*, 87:1063-9, 1996). Hơn nữa, ở các thử nghiệm lâm sàng, gần một nửa ung thư biểu mô tuyến phổi được biểu hiện mức cao của c-Met và HGF, cả hai đều tương quan với tốc độ tăng trưởng khối u tăng cường, di căn và tiên lượng kém (Sierra và Tsao, *Liệu pháp điều trị Advances in Medical Oncology*, 3:S21-35, 2011; Siegfried và các đồng tác giả, *Ann Thorac Surg* 66: 1915-8, 1998).

Gần 60% toàn bộ khối u mà trở nên kháng các chất ức chế tiroxin kinaza EGFR tăng biểu hiện -Met, c-Met khuếch đại, hoặc tăng phối tử đã biết duy nhất của nó, HGF (Turke và các đồng tác giả, *tế bào ung thư*, 17:77-88, 2010), cho thấy sự tồn tại của quá trình phi đối với EGFR thông qua c-Met. Sự khuếch đại c-Met lần đầu tiên được nhận dạng trong các tế bào được nuôi cấy mà trở nên kháng với gefinitib, chất ức chế EGFR kinaza, và được biểu hiện sự sống sót được tăng cường thông qua con đường Her3 (Engelman và các đồng tác giả, *Science*, 316:1039-43,

2007). Điều này liên tục được xác nhận trong các thử nghiệm lâm sàng mà chín trong số bốn ba bệnh nhân có khả năng kháng đối với erlotinib hoặc gefitinib được biểu hiện sự khuếch đại c-Met, so với chỉ có hai trong số sáu hai bệnh nhân không được điều trị. Bốn trong số chín bệnh nhân được điều trị cũng mắc đột biến hoạt hóa EGFR, T790M, mà chứng minh con đường kháng đồng thời (Beat và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci U S A, 104:20932-7, 2007).

Các vai trò riêng lẻ của cả hai EGFR và c-Met ở bệnh ung thư cũng được hình thành, làm cho các mục tiêu này hấp dẫn đối với liệu pháp điều trị kết hợp. Cả hai thụ thể tín hiệu thông qua cùng con đường sống sót và con đường chống lại cơ chế gây chết tế bào (ERK và AKT); do đó, ức chế cặp tổ hợp có thể giới hạn tiềm tàng đối với sự hoạt hóa con đường bù nhờ đó nâng cao hiệu quả toàn phần. Liệu pháp điều trị kết hợp hướng đến EGFR và c-Met được thử nghiệm trong các thử nghiệm lâm sàng bằng Tarceva® (erlotinib) kết hợp với kháng thể đơn dòng kháng - c-Met đối với NSCL (Spigel và các đồng tác giả, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011, Journal of Clinical Oncology: Chicago, IL. p. 7505) và Tarceva (erlotinib) kết hợp với ARQ-197, các chất ức chế phân tử nhỏ của c-Met (Adjei và các đồng tác giả, Oncologist, 16:788-99, 2011). Liệu pháp điều trị kết hợp hoặc các phân tử kháng-EGFR/c-Met đặc hiệu kép đã được bộc lộ đối với Ví dụ trong: Công bố đơn quốc tế số WO2008/127710, công bố bằng Mỹ số US2009/0042906, Công bố đơn quốc tế số WO2009/111691, Công bố đơn quốc tế số WO2009/126834, Công bố đơn quốc tế số WO2010/039248, Công bố đơn quốc tế số WO2010/115551.

Liệu pháp điều trị phân tử nhỏ và phân tử lớn hiện tại tiếp cận để kháng các con đường tín hiệu EGFR và/hoặc c-Met cho liệu pháp điều trị có thể gần tối ưu do có thể thiếu tính đặc hiệu, hoạt tính làm cân đích tiềm ẩn và độc tố giới hạn liều mà có thể gặp với các chất ức chế phân tử nhỏ. Kháng thể hóa trị hai thông thường có thể dẫn đến sự phân nhóm của các thụ thể liên kết màng và sự hoạt hóa không mong muốn của các con đường tín hiệu xuôi dòng. Các kháng thể hóa trị một (nửa cánh tay) gây ra sự phức tạp và chi phí đáng kể cho quá trình sản xuất.

Do đó, nhu cầu tồn tại đối với các chất ức chế EGFR đặc hiệu đơn và EGFR đặc hiệu kép bổ sung và/hoặc c-Met dùng cho cả hai mục đích điều trị và chẩn đoán.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử bao gồm miền fibronectin loại III thứ nhất (FN3) và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met.

Sáng chế cũng đề xuất miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử bao gồm miền fibronectin loại III thứ nhất (FN3) và miền FN3 thứ hai trong đó miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự axit amin ít nhất là 87% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27, và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 83% so với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41.

Sáng chế cũng đề xuất gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép và miền FN3 gắn kết EGFR hoặc c-Met đặc hiệu đơn chứa các phân tử có một số các trình tự.

Sáng chế cũng đề xuất miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, trong đó miền FN3 được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự axit amin Tencon của SEQ ID NO: 1.

Sáng chế cũng đề xuất miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử theo sáng chế. Khía cạnh khác của sáng chế là vector bao gồm polynucleotit theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ bao gồm vector theo sáng chế

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra phân tử đặc hiệu kép, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ được phân lập theo sáng chế trong các điều kiện sao cho phân tử đặc hiệu kép này được biểu hiện, và tinh sạch phân tử đặc hiệu kép.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bao gồm phân tử theo sáng chế và chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử hoặc miền FN3 gắn kết với EGFR hoặc c-Met cho bệnh nhân cần điều trị trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Fig. 1A và Fig. 1B. Sự sắp xếp axit amin của các miền FN3 gắn kết EGFR. Các vòng BC và FG được tạo hộp tại các gốc từ 22 đến 28 và từ 75 đến 86 của SEQ ID NO: 18. Một số biến thể bao gồm độ ổn định nhiệt mà cải thiện sự thể L17A, N46K và E86I (số gốc theo Tencon SEQ ID NO: 1). Các gốc paratop P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27) được gạch dưới (D23, F27, Y28, V77, G85 trong SEQ ID NO: 27).

Fig 2. Sự sắp xếp trình tự của khung sinh học Tencon27 (SEQ ID NO: 99) và thư viện TCL14 (SEQ ID NO: 100) đã ngẫu nhiên hóa bề mặt thể C-CD-F-FG. Các gốc vòng được tạo hộp. Các vòng và các sợi được xác định các trình tự nêu trên.

Fig 3. Sự sắp xếp trình tự của các miền FN3 gắn kết c-Met. Vòng C và sợi CD và vòng F và sợi FG được tạo hộp và các gốc dạng dải từ 29 đến 43 và từ 65 đến 81. Các gốc paratop P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41) được gạch dưới (R34S, F38S, M72S và I79S).

Fig 4. Sự ức chế của sự phosphoryl hóa c-Met trong các tế bào H292 được xử lý trước bằng miền FN3 đặc hiệu đơn hoặc miền FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử và được kích thích bằng HGF là được Thể hiện. Tăng đáng kể về tiềm năng của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (ECB1) được quan sát khi so với miền FN3 gắn kết c-Met đặc hiệu đơn (P114AR5P74-A5, được Thể hiện làm A5 trong hình vẽ) lên chính nó hoặc tổ hợp với miền FN3 gắn kết EGFR (P54AR4-83v2, được Thể hiện như 83v2 trong hình vẽ).

Fig. 5. Sự ức chế của EGFR và phosphoryl hóa c-Met trong các tế bào được xử lý trước bằng miền FN3 đặc hiệu đơn hoặc miền FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử. Trong các dòng tế bào biểu hiện mức cao của EGFR, NCI-H292 (Fig. 5A) và H596 (Fig. 5B), miền đặc hiệu đơn kháng EGFR và miền FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử có tiềm năng tương đương khi giảm sự phosphoryl hóa EGFR. Trong các dòng tế bào biểu hiện các mức thấp của EGFR so với c-Met, H441 (Fig. 5C), các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép cải thiện tiềm năng cho sự ức chế của phosphoryl hóa EGFR so với một miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn. Trong các dòng tế bào có các mức thấp của c-Met, so với EGFR, H292 (Fig. 5D) và H596 (Fig. 5E), sự ức chế phosphoryl hóa c-Met là có tiềm năng đáng kể bằng phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép, so với duy nhất miền FN3 gắn kết c-Met đặc hiệu đơn. Các phân tử được sử dụng trong nghiên cứu là: ECB5 đặc hiệu kép (được thể hiện như 17-A3 trong hình vẽ), miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn P53A1R5-17 (được thể hiện là “17” trong hình vẽ), phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép ECB3 (được thể hiện là 83-H9 trong hình vẽ), và miền FN3 gắn kết c-Met đặc hiệu đơn P114AR7P93-H9 (được thể hiện là H9 trong hình vẽ).

Fig. 6. Tín hiệu pharmacodynamic trong các khối u được phân lập từ chuột được định lượng bằng các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép trong khoảng 6h hoặc 72h. Tất cả các phân tử bị giảm đáng kể sự phosphoryl hóa c-Met, EGFR và ERK ở cả 6h và 72h, mức độ nếu sự ức chế phụ thuộc vào ái lực của các miền FN3 với EGFR và/hoặc c-Met. Phân tử đặc hiệu kép được sản sinh bằng cách gắn miền FN3 gắn kết EGFR bằng ái lực cao (“83” trong hình vẽ là p54AR4-83v2) hoặc ái lực trung bình (“17v2” trong hình vẽ là P53A1R5-17v2) với miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao (“A3” trong hình vẽ là P114AR7P94-A3) hoặc ái lực trung bình (“A5” trong hình vẽ là P114AR5P74-A5).

Fig. 7: Plasma (phía trên) và sự tích lũy khối u (phía dưới) của các phân tử đặc hiệu kép EGFR/cMet của các ái lực biến đổi được liên kết với miền gắn kết albumin (albumin binding domain - ABD) được thể hiện 6h (bên trái) và 72h (bên phải) sau khi định lượng IP. Sáu giờ sau khi định lượng, sự tích lũy khối u là tối đa ở chuột được định lượng bằng phân tử đặc hiệu kép chứa miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực

trung bình (17v2) hoặc miền EGFR có ái lực cao (83v2). Phân tử đặc hiệu kép được kết hợp miền FN3 gắn kết EGFR hoặc c-Met có ái lực cao hoặc trung bình như sau: 83v2-A5-ABD (ECB18 cao/trung bình đối với EGFR/cMet) 83v2-A3-ABD (ECB38 cao/cao) 17v2-A5 (ECB28 trung bình/trung bình) 17v2-A3-ABD (ECB39 trung bình/cao). Trong hình vẽ 83v2 nhằm để chỉ p54AR4-83v2; 17v2 nhằm để chỉ p53A1R5-17v2; A3 nhằm để chỉ p114AR7P94-A3 và A5 nhằm để chỉ p114AR5P74-A5.

Fig. 8. Ghép ngoại lai khối u H292-HGF được cấy vào chuột be SCID. Khi các khối u đạt được lượng trung bình khoảng 80 mm³, thì chuột này được định lượng mỗi tuần ba lần bằng các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (25 mg/kg) hoặc tá được lỏng PBS. Tất cả phân tử đặc hiệu kép đều được giảm tăng trưởng khối u, sự ức chế tăng trưởng khối u (tumor growth inhibition -TGI) phụ thuộc vào các ái lực của các phân tử đối với c-Met và EGFR. (EGFR cao-cMet cao nhằm để chỉ p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); EGFR -med cMet cao nhằm để chỉ p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); med EGFR-cMet cao nhằm để chỉ p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); med EGFR-med-cMet nhằm để chỉ p53A1R5-17-p114AR5P74-A 5 (ECB28)).

Fig. 9. Ghép ngoại lai khối u H292-HGF được cấy vào chuột be SCID và chúng được xử lý bằng liệu pháp điều trị khác nhau. Hoạt tính chống ung thư của liệu pháp điều trị được thể hiện. (phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép nhằm để chỉ p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3-ABD (ECB38); liệu pháp điều trị khác là crizotinib, erlotinib, cetuximab, và sự tổ hợp của crizotinib và erlotinib).

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “miền fibronectin loại III (FN3)” (miền FN3) như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ miền xuất hiện thường xuyên trong các protein bao gồm fibronectin, tenascin, protein xytoskeletal nội bào, thụ thể xytokin và enzym động vật bậc thấp (Bork và Doolittle, Proc Nat Acad Sci USA 89:8990-8994, 1992; Meinke và các đồng tác giả, J Bacteriol 175:1910-1918, 1993; Watanabe và các đồng tác giả, J Biol Chem 265:15659-15665, 1990). Các miền FN3 minh họa là 15

miền FN3 khác nhau có trong tenascin C ở người, 15 miền FN3 khác nhau có trong fibronectin (FN) ở người, và các miền FN3 tổng hợp không tự nhiên như được mô tả Ví dụ trong công bố bằng Mỹ số 2010/0216708. Các miền FN3 riêng rẽ được tham chiếu bằng số miền và tên protein, Ví dụ, miền FN3 thứ 3 của tenascin (TN3), hoặc miền FN3 thứ 10 của fibronectin (FN10).

Thuật ngữ “thế” hoặc “được thế” hoặc “biến đổi” hoặc “được biến đổi” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ sự thay đổi, loại bỏ việc chèn một hoặc nhiều axit amin hoặc nucleotit trong trình tự polypeptit hoặc trình tự polynucleotit để tạo ra một biến thể của trình tự nêu trên.

Thuật ngữ “ngẫu nhiên” hoặc “được ngẫu nhiên” hoặc “được đa dạng hóa” hoặc “đa dạng hóa” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ sự tạo ra ít nhất là một sự thế, sự chèn hoặc sự mất trong trình tự polynucleotit hoặc trình tự polypeptit.

“Biến thể” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ polypeptit hoặc polynucleotit mà khác với polypeptit mẫu hoặc polynucleotit mẫu bởi một hoặc nhiều sự biến đổi Ví dụ, sự thế, sự chèn hoặc sự mất.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ khả năng của miền FN3 theo sáng chế liên kết với kháng nguyên được xác định trước có hằng số phân ly (K_D) khoảng 1×10^{-6} M hoặc nhỏ hơn, Ví dụ khoảng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-12} M hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 1×10^{-13} M hoặc nhỏ hơn. Miền FN3 đặc hiệu theo sáng chế liên kết với kháng nguyên được xác định trước (tức là EGFR hoặc c-Met) có K_D ít nhất là nhỏ hơn mười lần so với K_D của nó đối với kháng nguyên không đặc hiệu (Ví dụ BSA hoặc casein) như được đo bằng cách cộng hưởng bề mặt plasmon mà sử dụng Ví dụ Proteon Instrument (BioRad). Do đó, miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với mỗi EGFR và c-Met có ái lực gắn kết (K_D) ít nhất là 1×10^{-6} M hoặc nhỏ hơn ái lực của cả hai EGFR và c-Met. Có thể miền FN3 được phân lập theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên được xác định trước, tuy nhiên, có khả năng phản ứng chéo với các kháng

nguyên liên quan khác, Ví dụ kháng nguyên được xác định trước này từ các loài khác (tương đồng).

Thuật ngữ “thư viện” nhằm để chỉ sự thu gom của các biến thể. Có thể thư viện bộ bao gồm các biến thể polypeptit hoặc polynucleotit.

Thuật ngữ “độ ổn định” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ khả năng của phân tử duy trì trạng thái gấp trong các điều kiện sinh lý sao cho nó vẫn giữ ít nhất là một trong số hoạt tính chức năng thông thường của nó, Ví dụ, liên kết với kháng nguyên được xác định trước như EGFR hoặc c-Met.

“Thụ thể của yếu tố sinh trưởng thượng bì” hoặc “EGFR” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ EGFR của người (cũng đã biết như HER-1 hoặc Erb-B1 (Ullrich và các đồng tác giả, Nature 309:418-425, 1984) có trình tự được Thể hiện trong SEQ ID NO: 73 và theo số đăng ký GenBank NP_005219, cũng như các biến thể diễn ra tự nhiên của chúng. Các biến thể này bao gồm EGFRvIII đã biết và các biến thể được ghép thay thế khác (Ví dụ, như được nhận dạng bằng các số SwissProt Accession P00533-1 (kiểu đại; tương đồng với SEA ID NO: 73 và NP_005219), P00533-2 (F404L/L405S), P00533-3 (628-705: CTGPGLEGCP...GEAPNQALLR → PGNESLKAML...SVIITASSCH và 706-1210 được xóa bỏ), P00533-4 (C628S và 629-1210 được xóa bỏ), các biến thể Q98, R266, K521, I674, G962, và P988 (Livingston và các đồng tác giả, NIEHS-SNPs, dự án bộ gen môi trường, NIEHS ES15478), T790M, L858R/T790M và del(E746, A750).

“Phối tử EGFR” như được sử dụng ở đây bao hàm tất cả các phối tử cho EGFR (Ví dụ, physiological), bao gồm EGF, TGF- α , EGF liên kết heparin (HB-EGF), amphiregulin (AR), và epiregulin (EPI).

“Yếu tố tăng trưởng thượng bì” (EGF) như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ 53 axit amin EGF của người đã biết có trình tự axit amin được Thể hiện trong SEQ ID NO: 74.

“Thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan” hoặc “c-Met” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ c-Met của người có trình tự axit amin được Thể hiện trong SEQ

ID NO: 101 hoặc trong GenBank Accession No: NP_001120972 và các biến thể tự nhiên của chúng.

“Yếu tố tăng trưởng tế bào gan” (HGF) như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ HGF của người đã biết có trình tự axit amin được Thể hiện trong SEQ ID NO: 102 mà được tách thành dạng đime của chuỗi alpha và beta được liên kết bằng liên kết disunfit.

“Chặn liên kết” hoặc “ức chế liên kết”, như được sử dụng ở đây có thể hoán đổi cho nhau nhằm để chỉ khả năng của các miền FN3 theo sáng chế của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử để chặn hoặc ức chế liên kết của phối tử EGFR như EGF với EGFR và/hoặc HGF với c-Met, và bao hàm cả ngăn chặn/ức chế một phần hoặc toàn phần. Ngăn chặn/ức chế phối tử EGFR như EGF với EGFR và/hoặc HGF với c-Met bằng miền FN3 hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế giảm từng phần hoặc toàn bộ mức thông thường của tín hiệu EGFR và/hoặc tín hiệu c-Met khi so với liên kết phối tử EGFR với EGFR và/hoặc gắn kết HGF với c-Met mà không chặn hoặc ức chế. Miền FN3 hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế “chặn liên kết” của phối tử EGFR như EGF với EGFR và/hoặc HGF với c-Met ít nhất là 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi ức chế. Có thể ức chế liên kết được đo bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, Ví dụ bằng cách đo sự ức chế liên kết của EGF được biotin hóa trên các tế bào A431 biểu hiện EGFR được bộc lộ trên miền FN3 hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế sử dụng FACS, và các phương pháp sử dụng được mô tả ở đây, hoặc đo sự ức chế gắn kết của HGF được biotin hóa trên miền ngoại bào c-Met bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết và các phương pháp được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “tín hiệu EGFR” nhằm để chỉ sự chuyển nạp tín hiệu được cảm ứng bởi liên kết phối tử EGFR với EGFR dẫn đến sự tự phosphoryl hóa của ít nhất là một gốc tiroxin trong EGFR. Phối tử EGFR minh họa mẫu là EGF.

“Trung hòa tín hiệu EGFR” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ khả năng của miền FN3 theo sáng chế để ức chế tín hiệu EGFR được cảm ứng bởi phối tử EGFR như EGF bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Thuật ngữ “tín hiệu c-Met” nhằm để chỉ sự chuyển nạp tín hiệu được cảm ứng bởi HGF gắn kết với c-Met dẫn đến sự tự phosphoryl hóa ít nhất một gốc tiroxin trong c-Met. Thông thường ít nhất là một gốc tiroxin tại các vị trí 1230, 1234, 1235 hoặc 1349 được tự phosphoryl hóa khi gắn kết HGF.

“Trung hòa tín hiệu c-Met” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ khả năng của miền FN3 theo sáng chế để ức chế tín hiệu c-Met được cảm ứng bởi HGF bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

“Quá biểu hiện”, “được quá biểu hiện” và “sự quá biểu hiện” như được sử dụng ở đây có thể hoán đổi cho nhau nhằm để chỉ bệnh ung thư hoặc tế bào ác tính mà có mức cao hơn bằng cách đo EGFR và/hoặc c-Met trên bề mặt so với tế bào thông thường của loại mô giống nhau. Sự quá biểu hiện này có thể gây ra bởi sự khuếch đại gen hoặc do tăng phiên mã hoặc dịch mã. Có thể sự biểu hiện và sự quá biểu hiện EGFR và/hoặc c-Met được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết sử dụng Ví dụ ELISA, miễn dịch huỳnh quang, phân tích tế bào theo dòng hoặc phản ứng miễn dịch phóng xạ trên các tế bào sống hoặc được dung giải. Theo một cách khác, hoặc theo cách bổ sung, thì mức của EGFR và/hoặc phần tử axit nucleic mã hóa c-Met có thể được đo trong tế bào Ví dụ sử dụng kỹ thuật lai quang tại chỗ, phương pháp Southern Blot, hoặc kỹ thuật PCR. EGFR và/hoặc c-Met được quá biểu hiện khi mức của EGFR và/hoặc c-Met trên bề mặt của tế bào ít nhất là lớn hơn 1,5 lần khi so với tế bào thông thường.

“Tencon” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ miền tổng hợp của loại fibronectin III (FN3) có trình tự được Thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và được mô tả trong công bố bằng Mỹ số US2010/0216708.

“Tế bào ung thư” hoặc “tế bào khối u” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ tế bào mắc ung thư, tế bào tiền ung thư hoặc tế bào biến nạp, *in vivo*, *ex vivo*, và trong môi trường nuôi cấy mô, mà có sự biến đổi tự phát hoặc sự biến đổi kiểu hình được cảm ứng mà không nhất thiết phải bao gồm sự hấp thu vật liệu di truyền mới. Mặc dù sự chuyển nạp có thể xuất hiện do nhiễm loại virus biến đổi và sự kết hợp của axit nucleic di truyền mới, hoặc hấp thu axit nucleic ngoại sinh, cũng có thể xuất hiện một cách tự nhiên hoặc sau khi tiếp xúc với carxinogen, do đó đột biến gen nội sinh. Sự chuyển nạp/ung thư được minh họa bằng, Ví dụ, các thay đổi hình thái học, sự bất tử của tế bào, kiểm soát tăng trưởng khác thường, sự hình thành tiêu điểm, sự tăng sinh, khối u ác tính, mức chỉ thị đặc hiệu của khối u, sự xâm nhập, tăng trưởng hoặc chặn khối u trong các động vật chủ thích hợp như chuột thiếu hụt miễn dịch, và các chuột tương tự, *in vitro*, *in vivo*, và *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Thuật ngữ “vector” có nghĩa là polynucleotit có khả năng được nhân đôi trong hệ thống sinh học hoặc có thể được di chuyển giữa các hệ thống này. Vector polynucleotit đặc hiệu chứa các thành phần, như hoặc các gốc tái tạo, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc các chỉ thị chọn lọc mà có chức năng làm dễ dàng nhân đôi hoặc duy trì các polynucleotit này trong hệ thống sinh học. Các ví dụ về các hệ thống sinh học này có thể bao gồm tế bào, virus, động vật, thực vật, và các hệ thống sinh học được tái tạo sử dụng các thành phần sinh học có khả năng nhân đôi vector. Polynucleotit bao gồm vector có thể là các phân tử ADN hoặc ARN hoặc lai các phân tử này.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” có nghĩa là vector mà có thể được sử dụng trong hệ thống sinh học hoặc trong hệ thống sinh học được tái tạo để trực tiếp dịch mã của polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit có mặt trong vector biểu hiện.

Thuật ngữ “polynucleotit” có nghĩa là phân tử bao gồm chuỗi nucleotit được liên kết cộng hóa trị bằng mạch chính đường-phosphat hoặc hóa trị hóa học tương đương khác. Các ADN được tạo mạch đơn và mạch kép và các ARN là Các ví dụ cụ thể về polynucleotit.

Thuật ngữ “polypeptit” hoặc “protein” có nghĩa là phân tử mà bao gồm ít nhất là hai gốc axit amin được liên kết bằng liên kết peptit để tạo ra polypeptit. Các polypeptit nhỏ mà nhỏ hơn khoảng 50 axit amin có thể được gọi là “peptit”.

Thuật ngữ “phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép” hoặc “phân tử chứa miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ phân tử bao gồm Miền FN3 gắn kết EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met riêng biệt mà được liên kết cộng hóa trị với liên kết với nhau một cách trực tiếp hoặc qua chất liên kết. Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép minh họa bao gồm EGFR gắn kết đặc hiệu miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với c-Met.

“Hóa trị” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ với có mặt của số chỉ dẫn của các vị trí gắn kết đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử. Như, các thuật ngữ “hóa trị một”, “hóa trị hai”, “hóa trị bốn”, và “hóa trị sáu” nhằm để chỉ lần lượt với có mặt của một, hai, bốn và sáu vị trí gắn kết đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử.

“Hỗn hợp” như được sử dụng ở đây nhằm để chỉ mẫu hoặc chế phẩm của hai hoặc nhiều miền FN3 không được liên kết cộng hóa trị với nhau. Hỗn hợp có thể bao gồm hai hoặc nhiều miền FN3 đồng nhất hoặc miền FN3 riêng biệt.

Các chế phẩm của chất

Sáng chế đề cập đến EGFR đặc hiệu đơn và EGFR đặc hiệu kép và/hoặc miền FN3 gắn kết c-Met chứa các phân tử. Sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa các miền FN3 theo sáng chế hoặc các axit nucleic bổ sung của chúng, các vectơ, các tế bào chủ, và các phương pháp tạo ra và sử dụng chúng.

Các phân tử gắn kết EGFR đặc hiệu đơn

Sáng chế đề cập đến các miền fibronectin loại III (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, và do đó có thể được sử dụng rộng rãi trong ứng dụng liệu pháp điều trị và chẩn đoán. Sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa các miền FN3 theo sáng chế hoặc các axit nucleic bổ sung của chúng, các vectơ, các tế bào chủ, và các phương pháp tạo ra và sử dụng chúng.

Các miền FN3 theo sáng chế gắn kết với EGFR bằng ái lực cao và ức chế tín hiệu EGFR, và có thể tạo ra lợi ích về tính đặc hiệu và làm giảm độc tố làm cân đích khi so với các chất ức chế EGFR phân tử nhỏ, và sự xâm nhập mô được cải thiện khi so với liệu pháp điều trị kháng thể thông thường.

Sáng chế cũng đề cập đến miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR.

Các miền FN3 theo sáng chế được mô tả ở đây có thể chặn EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-11} M, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-12} M trong thử nghiệm cạnh tranh dùng các tế bào A431 và phát hiện lượng huỳnh quang từ EGF được biotin hóa liên kết bằng cách sử dụng thể tiếp hợp streptavidin-phycoerythrin tại 600 nM trên các tế bào A431 được ủ có hoặc không có các miền FN3 theo sáng chế. Các miền FN3 minh họa có thể chặn EGF gắn kết với EGFR có giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} M đến 1×10^{-7} M, như các miền FN3 gắn kết EGFR có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, hoặc 122-137. Các miền FN3 theo sáng chế có thể chặn EGF gắn kết với EGFR bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với liên kết của EGF với EGFR với có mặt của các miền FN3 theo sáng chế sử dụng trong cùng điều kiện thử nghiệm.

Miền FN3 theo sáng chế được mô tả ở đây có thể ức chế tín hiệu EGFR bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với mức tín hiệu với có mặt của các miền FN3 theo sáng chế sử dụng cùng điều kiện thử nghiệm.

Gắn kết của phối tử như EGF với EGFR cảm ứng sự dimer hóa thụ thể, sự tự phosphoryl hóa, sự hoạt hóa bên trong của thụ thể, miền xytoplasmic tiroxin kinaza, và sự khởi đầu con đường truyền nhiều tín hiệu và con đường hoạt hóa chéo

điều hòa quy trình tổng hợp ADN (sự hoạt hóa gen) và sự tiến triển hoặc sự phân chia chu kỳ tế bào. Sự ức chế tín hiệu EGFR có thể dẫn đến sự ức chế ở một hoặc nhiều con đường tín hiệu xuôi dòng EGFR và do đó có thể làm trung hòa EGFR có các tác dụng khác nhau, bao gồm sự ức chế tăng sinh và sự biệt hóa tế bào, sự sản sinh mạch, khả năng vận động và di căn tế bào.

Tín hiệu EGFR có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau, Ví dụ đo sự tự phosphoryl hóa của thụ thể ở bất kỳ trong số các tiroxin Y1068, Y1148, và Y1173 (Downward và các đồng tác giả, Nature 311:483-5, 1984) và/hoặc sự phosphoryl hóa của các chất nền tổng hợp hoặc tự nhiên. Có thể sự phosphoryl hóa được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết như thử nghiệm ELISA hoặc phương pháp western plot sử dụng kháng thể đặc hiệu phosphotiroxin. Có thể các thử nghiệm minh họa được phát hiện trong Panek và các đồng tác giả, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997 và Batley và các đồng tác giả, Life Sci 62:143-50, 1998, và các thử nghiệm được mô tả ở đây.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được cảm ứng bởi EGF tại vị trí gốc Tiroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $2,5 \times 10^{-6}$ M, Ví dụ nhỏ hơn khoảng 1×10^{-6} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-11} M, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-12} M khi được đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50ng/mL EGF của người.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được cảm ứng bởi EGF tại vị trí gốc Tiroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ $1,8 \times 10^{-8}$ M đến $2,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người. Các miền FN3 minh họa này là các miền có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, hoặc 122-137.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế gắn kết với EGFR của người có hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, Ví dụ nhỏ

hơn khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-12} M, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-13} M như được xác định trước bằng cách cộng hưởng bề mặt plasmon hoặc phương pháp Kinexa, như được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án, miền FN3 theo sáng chế gắn kết với EGFR của người có K_D nằm trong khoảng từ 2×10^{-10} đến 1×10^{-8} M. Có thể ái lực của miền FN3 cho EGFR được xác định bằng thử nghiệm sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. (Xem, Ví dụ, Berzofsky, và các đồng tác giả, “Antibody-Antigen Interactions,” In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman và Company: New York, NY (1992); và các phương pháp được mô tả ở đây). Ái lực được đo của sự tương tác kháng nguyên miền miền FN3 có thể biến đổi nếu được đo trong các điều kiện khác nhau (Ví dụ, nồng độ mol, nồng độ pH). Do đó, các phép đo ái lực và các thông số gắn kết kháng nguyên (Ví dụ, K_D , K_{on} , K_{off}) tốt hơn là được thực hiện bằng các giải pháp chuẩn hóa về khung sinh học protein và kháng nguyên, và chất đệm chuẩn hóa, như chất đệm được mô tả ở đây.

Các miền FN3 minh họa theo sáng chế mà gắn kết EGFR bao gồm các miền FN3 của các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, hoặc 122-137.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với EGFR bao gồm trình tự axit amin ít nhất là 87% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với EGFR bao gồm

Vòng FG bao gồm trình tự HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), trong đó X₉ là M hoặc I; và

vòng BC bao gồm trình tự X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181); trong đó

X₁ là A, T, G hoặc D;

X₂ là A, D, Y hoặc W;

X_3 là P, D hoặc N;

X_4 là L hoặc không có mặt;

X_5 là D, H, R, G, Y hoặc W;

X_6 là G, D hoặc A;

X_7 là A, F, G, H hoặc D; và

X_8 là Y, F hoặc L.

Các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và ức chế sự tự phosphoryl hóa của EGFR như được mô tả ở đây có thể bao gồm làm đặc điểm cấu trúc vòng FG bao gồm trình tự HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), trong đó X_9 là M hoặc I. Các miền FN3 này có thể còn bao gồm vòng BC của 8 hoặc 9 axit amin theo chiều dài và được xác định bằng trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID NO: 181), và ức chế sự tự phosphoryl hóa EGFR có trị số IC₅₀ nhỏ hơn khoảng $2,5 \times 10^{-6}$ M, hoặc có trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ $1,8 \times 10^{-8}$ M đến $2,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người.

Các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và ức chế sự tự phosphoryl hóa của EGFR như được mô tả ở đây còn bao gồm trình tự

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),
hoặc trình tự

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

trong đó

X_1 là A, T, G hoặc D;

X_2 là A, D, Y hoặc W;

X_3 là P, D hoặc N;

X_4 là L hoặc không có mặt;

X₅ là D, H, R, G, Y hoặc W;

X₆ là G, D hoặc A;

X₇ là A, F, G, H hoặc D;

X₈ là Y, F hoặc L; và

X₉ là M hoặc I

Các miền FN3 gắn kết EGFR có thể được tạo ra như được mô tả ở đây và được thử nghiệm đối với khả năng của chúng để ức chế sự tự phosphoryl hóa EGFR bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết và các phương pháp được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với EGFR, trong đó miền FN3 bao gồm trình tự được thể hiện trong các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 hoặc 194-211.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, các miền FN3 gắn kết EGFR bao gồm methionin khởi mào (Met) được liên kết với đầu N hoặc cystein (Cys) được liên kết với đầu C của miền FN3 cụ thể, Ví dụ để dễ dàng biểu hiện và/hoặc kết hợp các phân tử kéo dài chu kỳ bán hủy.

Sáng chế cũng đề cập đến miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và chặn gắn kết của EGF với EGFR, trong đó miền FN3 được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon của SEQ ID NO: 1.

Sáng chế cũng đề cập đến miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và chặn gắn kết của EGF với EGFR, trong đó miền FN3 gắn kết với EGFR với một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc D23, F27, Y28, V77 và G85 của P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27).

Gốc axit amin góp phần để miền FN3 gắn kết với EGFR có thể được nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp như gây đột biến và đánh giá các gốc/bề mặt gắn kết bằng cấu trúc tinh thể. Sự thể tại các gốc D23, F27, Y28, V77, G85 trong miền FN3 gắn kết EGFR P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27) được giảm EGFR gắn

kết với miền FN3 lớn hơn 100 lần. Các miền FN3 gắn kết EGFR P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 và P54AR4-83v23 chia các gốc này và có thể được mong đợi để gắn kết với EGFR có các gốc cùng paratop là P54AR4-83v2. Các miền FN3 gắn kết EGFR khác có thể được tạo ra bằng cách giữ các vị trí không đổi D23, F27, Y28, V77, G85 trong khi thay đổi axit amin được bố trí tại các vị trí khác của các vòng BC và FG (các vị trí 24, 25, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, và 86). Sự thay đổi này có thể được thực hiện bằng cách thiết kế axit amin đặc hiệu tại các vị trí đặc hiệu hoặc bằng cách kết hợp các vị trí này thành thư viện mà thay thế các vị trí này bằng axit amin ngẫu nhiên. Các miền FN3 được thiết kế mới theo cách như vậy có thể được sử dụng để sàng lọc hoặc lựa chọn cho các đặc tính tối ưu hóa như sự gắn kết EGFR, độ hòa tan, độ ổn định, gây miễn dịch hoặc chu kỳ bán hủy huyết thanh.

Phân tử gắn kết c-Met đặc hiệu đơn

Sáng chế cũng đề cập đến các miền fibronectin loại III (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) và chặn sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met, và do đó có thể được sử dụng rộng rãi trong ứng dụng liệu pháp điều trị và chẩn đoán. Sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa các miền FN3 theo sáng chế hoặc các axit nucleic bổ sung của chúng, các vectơ, các tế bào chủ, và các phương pháp tạo ra và sử dụng chúng.

Các miền FN3 theo sáng chế được mô tả ở đây gắn kết c-Met bằng ái lực cao và ức chế tín hiệu c-Met, và có thể tạo ra lợi ích về tính đặc hiệu và làm giảm độc tố làm cân đích khi so với các chất ức chế c-Met phân tử nhỏ, và sự xâm nhập mô được cải thiện khi so với liệu pháp điều trị kháng thể thông thường. Các miền FN3 theo sáng chế có hóa trị một, nhờ đó ngăn chặn sự phân nhóm thụ thể không mong muốn và sự hoạt hóa mà có thể xuất hiện với các phân tử hóa trị hai khác.

Sáng chế cũng đề cập đến được phân lập miền fibronectin loại III (FN3) mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met.

Các miền FN3 theo sáng chế được mô tả ở đây có thể chặn gắn kết HGF với c-Met có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-11} M, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-12} M trong thử nghiệm phát hiện sự ức chế gắn kết của HGF được biotin hóa với protein dung hợp c-Met-Fc với có mặt của các miền FN3 theo sáng chế. Có thể các miền FN3 minh họa chặn gắn kết HGF với c-Met có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 2×10^{-10} M đến 6×10^{-8} M. Các miền FN3 theo sáng chế có thể chặn gắn kết HGF với c-Met bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với sự gắn kết của HGF với c-Met với có mặt của các miền FN3 theo sáng chế sử dụng cùng điều kiện thử nghiệm.

Miền FN3 theo sáng chế được mô tả ở đây có thể ức chế tín hiệu c-Met bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với mức tín hiệu với có mặt của các miền FN3 theo sáng chế sử dụng cùng điều kiện thử nghiệm.

Sự gắn kết của HGF với đime hóa thụ thể cảm ứng c-Met, sự tự phosphoryl hóa, sự hoạt hóa bên trong của thụ thể, miền xytoplasmic tiroxin kinaza, và sự khởi đầu của con đường truyền nhiều tín hiệu và con đường hoạt hóa chéo tham gia vào quy trình của sự tổng hợp ADN (sự hoạt hóa gen) và sự tiến triển hoặc sự phân chia chu kỳ tế bào. Sự ức chế tín hiệu c-Met có thể dẫn đến ức chế của một hoặc nhiều con đường tín hiệu xuôi dòng c-Met và do đó có thể làm trung hòa c-Met có các tác dụng khác nhau, bao gồm sự ức chế tăng sinh tế bào và sự biệt hóa, sự sản sinh mạch, khả năng vận động và di căn tế bào.

Tín hiệu c-Met có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau, Ví dụ đo sự tự phosphoryl hóa của thụ thể trên ít nhất là một gốc tiroxin Y1230, Y1234, Y1235 hoặc Y1349, và/hoặc sự phosphoryl hóa của các chất nền tổng hợp hoặc tự nhiên. Sự phosphoryl hóa này có thể được dò, Ví dụ, sử dụng kháng thể đặc hiệu cho sự phosphotiroxin trong thử nghiệm ELISA hoặc đối với phương pháp western blot. Các thử nghiệm đối với tiroxin hoạt tính kinaza (Panek

và các đồng tác giả, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997; Batley và các đồng tác giả, Life Sci 62:143-50, 1998), và các thử nghiệm được mô tả ở đây.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được cảm ứng bởi HGF tại vị trí gốc c-Met 1349 có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng 1×10^{-6} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn khoảng 1×10^{-11} M, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-12} M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF tái tổ hợp ở người.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được cảm ứng bởi HGF tại c-Met tiroxin Y1349 có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 4×10^{-9} M đến 1×10^{-6} M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF tái tổ hợp ở người.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế gắn kết với c-Met của người có hằng số phân ly (K_D) bằng hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M, hoặc 1×10^{-15} M như được xác định trước bằng cách cộng hưởng bề mặt plasmon hoặc phương pháp Kinexa, như được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án, miền FN3 theo sáng chế gắn kết với c-Met của người có K_D nằm trong khoảng từ 3×10^{-10} M đến 5×10^{-8} M. Ái lực của miền FN3 đối với c-Met có thể được xác định bằng thử nghiệm sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. (Xem, Ví dụ, Berzofsky, và các đồng tác giả, "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis *Immunology*, W. H. Freeman và Company: New York, NY (1992); và các phương pháp được mô tả ở đây). Ái lực được đo của sự tương tác kháng nguyên miền FN3 có thể biến đổi nếu được đo trong các điều kiện khác nhau (Ví dụ, nồng độ mol, nồng độ pH). Do đó, các phép đo ái lực và các thông số gắn kết kháng nguyên (Ví dụ, K_D , K_{on} , K_{off}) tốt hơn là được thực hiện bằng các giải pháp chuẩn hóa về khung sinh học protein và kháng nguyên, và chất đệm chuẩn hóa, như chất đệm được mô tả ở đây.

Các miền FN3 minh họa theo sáng chế mà gắn kết c-Met bao gồm các miền FN3 có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 32-49, 111-114 hoặc 212-223.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu c-Met bao gồm trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 83% so với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu c-Met bao gồm

sợi C và vòng CD bao gồm trình tự DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), trong đó

X₁₀ là W, F hoặc V;

X₁₁ là D, F hoặc L;

X₁₂ là V, F hoặc L;

X₁₃ là V, L hoặc T;

X₁₄ là V, R, G, L, T hoặc S;

X₁₅ là G, S, A, T hoặc K; và

X₁₆ là E hoặc D; và

Sợi F và vòng FG bao gồm trình tự TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), trong đó

X₁₇ là Y, W, I, V, G hoặc A;

X₁₈ là N, T, Q hoặc G;

X₁₉ là L, M, N hoặc I;

X₂₀ là G hoặc S;

X₂₁ là S, L, G, Y, T, R, H hoặc K;

X₂₂ là I, V hoặc L; và

X₂₃ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu với c-Met và ức chế sự tự phosphoryl hóa của c-Met được mô tả ở đây còn bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁₀IRYX₁₁EX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEF
TT (SEQ ID NO: 186),

trong đó

X₁₀ là W, F hoặc V; và

X₁₁ là D, F hoặc L;

X₁₂ là V, F hoặc L;

X₁₃ là V, L hoặc T;

X₁₄ là V, R, G, L, T hoặc S;

X₁₅ là G, S, A, T hoặc K;

X₁₆ là E hoặc D;

X₁₇ là Y, W, I, V, G hoặc A;

X₁₈ là N, T, Q hoặc G;

X₁₉ là L, M, N hoặc I;

X₂₀ là G hoặc S;

X₂₁ là S, L, G, Y, T, R, H hoặc K;

X₂₂ là I, V hoặc L; và

X₂₃ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu c-Met, trong đó miền FN3 bao gồm trình tự được thể hiện trong các SEQ ID NO: 32-49 hoặc 111-114.

Sáng chế cũng đề cập đến miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu c-Met và chặn gắn kết của HGF với c-Met, trong đó miền FN3

được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon của SEQ ID NO: 1.

Sáng chế cũng đề cập đến miền fibronectin loại III được phân lập (FN3) mà gắn kết đặc hiệu c-Met và chặn gắn kết của HGF với c-Met, trong đó miền FN3 gắn kết với c-Met có một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc R34, F38, M72 và I79 trong P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

Gốc axit amin góp phần để miền FN3 gắn kết với c-Met có thể được nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp như gây đột biến và đánh giá các gốc/bề mặt gắn kết bằng cấu trúc tinh thể. Sự thể tại các gốc R34S, F38S, M72S và I79S ở miền FN3 gắn kết c-Met P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 27) được giảm sự gắn kết c-Met với miền FN3 lớn hơn 100 lần. Các phần tử của các miền FN3 gắn kết c-Met P114AR7P92-F3, P114AR7P95-D3, P114AR7P95-F10 và P114AR7P95-H8 chia các gốc này và có thể được mong đợi để gắn kết với c-Met có các gốc cùng paratop là P114AR7P95-A3. Miền FN3 gắn kết c-Met khác có thể được tạo ra bằng cách giữ các vị trí không đổi R34S, F38S, M72S và I79S trong khi thay đổi axit amin được bố trí tại các vị trí khác của sợi C, sợi F, vòng CD và/hoặc các vòng FG (các vị trí 32, 36, 39, 40, 68, 70, 78, và 81). Sự thay đổi này có thể được thực hiện bằng cách thiết kế axit amin đặc hiệu tại các vị trí đặc hiệu hoặc bằng cách kết hợp các vị trí này thành thư viện mà thay thế các vị trí này bằng axit amin ngẫu nhiên. Các miền FN3 được thiết kế mới theo cách như vậy có thể được sử dụng để sàng lọc hoặc lựa chọn cho các đặc tính tối ưu hóa như gắn kết c-Met, độ hòa tan, độ ổn định, gây miễn dịch, hoặc chu kỳ bán hủy huyết thanh.

Sự phân tách EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met khỏi thư viện dựa trên trình tự Tencon

Tencon (SEQ ID NO: 1) là miền fibronectin loại III (FN3) xuất hiện không tự nhiên được thiết kế từ trình tự liên ứng của mười lăm miền FN3 từ tenascin-C ở người (Jacobs và các đồng tác giả, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; công bố bằng Mỹ số 2010/0216708). Cấu trúc tinh thể của Tencon Thể hiện sáu vòng tiếp xúc với bề mặt mà nối với bảy sợi beta như đặc

trung đối với các miền FN3, sợi beta được gọi là A, B, C, D, E, F, và G, và các vòng được gọi là vòng AB, BC, CD, DE, EF, và FG (Bork và Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; Patent Mỹ số 6,673,901). Các vòng này, hoặc các gốc được chọn ở mỗi vòng, có thể được ngẫu nhiên để các thư viện cấu trúc của các miền fibronectin loại III (FN3) mà có thể được sử dụng để chọn các phân tử mới mà gắn kết với EGFR hoặc c-Met. Bảng 1 Thể hiện các vị trí và các trình tự của mỗi vòng và sợi beta trong Tencon (SEQ ID NO: 1).

Thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon, do đó có thể có vòng FG ngẫu nhiên, hoặc các vòng BC và FG ngẫu nhiên, như các thư viện TCL1 hoặc TCL2 như được mô tả sau đây. Vòng Tencon BC là dài 7 axit amin, do đó 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin có thể được ngẫu nhiên trong thư viện được đa dạng hóa tại vòng BC và được thiết kế dựa trên trình tự Tencon. Vòng Tencon FG là dài 7 axit amin, do đó 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin có thể được ngẫu nhiên trong thư viện được đa dạng hóa tại vòng FG và được thiết kế dựa trên trình tự Tencon. Ngoài ra, tính đa dạng tại các vòng trong Các thư viện Tencon có thể đạt được bằng cách chèn và/hoặc loại bỏ các gốc ở các vòng. Ví dụ, các vòng FG và/hoặc BC có thể được kéo dài từ 1 đến 22 axit amin, hoặc được giảm từ 1 đến 3 axit amin. Vòng FG trong Tencon là dài 7 axit amin, trong khi vòng tương ứng trong các chuỗi nặng kháng thể nằm trong khoảng từ 4 đến 28 gốc. Để tạo ra tính đa dạng tối đa, vòng FG có thể được đa dạng hóa ở trình tự cũng như chiều dài sao cho tương ứng với chiều dài kháng thể CDR3 nằm trong khoảng từ 4 đến 28 gốc. Ví dụ, vòng FG có thể còn được đa dạng hóa theo chiều dài bằng cách kéo dài vòng bằng 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bổ sung.

Thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon cũng có thể đã được ngẫu nhiên các bề mặt thay đổi mà tạo ra về phía miền FN3 và bao gồm hai hoặc nhiều sợi beta, và ít nhất là một vòng. Một bề mặt thay đổi này được tạo ra bởi axit amin trong C và sợi beta F và CD và các vòng FG (bề mặt C-CD-F-FG). Thư viện thiết kế dựa trên bề mặt C-CD-F-FG thay đổi Tencon và được Thể hiện trong Fig. 1 và thể hệ cụ thể của các thư viện này được mô tả trong công bố bằng Mỹ số US2013/0226834. Thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon còn bao gồm

các thư viện được thiết kế dựa trên các biến thể Tencon, như các biến thể Tencon có sự thể tại các góc các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, hoặc 86 (số gốc tương ứng với SEQ ID NO: 1), và biểu hiện biến đổi cải thiện độ ổn định nhiệt. Các biến thể Tencon minh họa được mô tả trong công bố bằng Mỹ số 2011/0274623, và bao gồm Tencon27 (SEQ ID NO: 99) có sự thể E11R, L17A, N46V và E86I khi so với Tencon của SEQ ID NO: 1.

Bảng 1.

Miền FN3	Tencon (SEQ ID NO: 1)
Sợi A	1-12
Vòng AB	13-16
Sợi B	17-21
Vòng BC	22-28
Sợi C	29-37
Vòng CD	38-43
Sợi D	44-50
Vòng DE	51-54
Sợi E	55-59
Vòng EF	60-64
Sợi F	65-74
Vòng FG	75-81
Sợi G	82-89

Tencon và trình tự FN3 khác dựa trên các thư viện có thể được ngẫu nhiên khi chọn vị trí gốc bằng cách sử dụng bộ ngẫu nhiên hoặc được xác định của axit amin. Ví dụ, các biến thể trong thư viện có sự thể ngẫu nhiên có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các codon NNK, mà mã hóa tất cả 20 axit amin xuất hiện tự

nhiên. Trong các sơ đồ đa dạng hóa khác, các codon DVK có thể được sử dụng để mã hóa axit amin Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, và Cys. Theo một cách khác, các codon NNS có thể được sử dụng để làm tăng lên tất cả 20 gốc axit amin và đồng thời làm giảm tần số của các codon kết thúc. Các thư viện của các miền FN3 có sự phân bố axit amin không đều tại các vị trí để được đa dạng hóa có thể được tổng hợp Ví dụ sử dụng Slonomics® technology (<http://www.sloming.com>). Kỹ thuật này sử dụng thư viện bộ ba được tạo sợi kép tạo ra trước mà hoạt động làm cấu trúc đa dụng chặn đủ một nghìn quy trình tổng hợp gen. Thư viện bộ ba là tất cả các trình tự có thể tổ hợp cần thiết để cấu trúc phân tử ADN mong muốn bất kỳ. Các ký hiệu codon theo mã IUB đã biết.

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được phân lập bằng cách tạo ra thư viện FN3 như thư viện Tencon bằng cách sử dụng biểu hiện *cis* để nối các đoạn ADN mã hóa protein dạng khung sinh học với RepA mã hóa đoạn AND để tạo ra vùng chứa của các phức protein-DNA được tạo ra sau khi dịch mã *in vitro* trong đó mỗi protein được kết hợp ổn định với ADN mà mã hóa nó (Patent Mỹ số 7,842,476; Odegrip và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2806-2810, 2004), và thư viện thử nghiệm sự gắn kết đặc hiệu với EGFR và/hoặc c-Met theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả trong Ví dụ. Các phương pháp minh họa đã biết mà có thể được sử dụng là ELISA, xét nghiệm miễn dịch sandwich, và các thử nghiệm cạnh tranh và không cạnh tranh (xem, Ví dụ, Ausubel và các đồng tác giả, eds, 1994, Current Định chuẩn in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Các miền FN3 được nhận dạng gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met còn được đặc trưng đối với khả năng của chúng để chặn phối tử EGFR như EGF gắn kết với EGFR, hoặc gắn kết HGF với c-Met, và khả năng của chúng để ức chế EGFR và/hoặc tín hiệu c-Met bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây.

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được tạo ra bằng cách sử dụng miền FN3 bất kỳ như khuôn để tạo ra thư viện và sàng lọc thư viện dùng cho các phân tử gắn kết đặc hiệu

với EGFR hoặc c-Met sử dụng phương pháp được tạo ra trong đó. Các miền FN3 minh họa mà có thể được sử dụng miền FN3 thứ 3 của tenascin C (TN3) (SEQ ID NO: 75), Fibcon (SEQ ID NO: 76), và miền FN3 thứ 10 của fibronectin (FN10) (SEQ ID NO: 77). Dòng tiêu chuẩn và kỹ thuật biểu hiện được sử dụng để sao chép các thư viện thành vector hoặc các hộp băng cDNA được tạo sợi kép tổng hợp của thư viện để biểu hiện, hoặc để dịch các thư viện *in vitro*. Ví dụ biểu hiện ribô thể (Hanes và Pluckthun, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 4937-4942, 1997), biểu hiện mRNA (Roberts và Szostak, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 12297-12302, 1997), hoặc các hệ thống không có tế bào khác (Patent Mỹ số 5,643,768) có thể được sử dụng. Các thư viện của các biến thể miền FN3 có thể được biểu hiện làm các protein dung hợp được thể hiện trên bề mặt Ví dụ vật ăn vi khuẩn thích hợp bất kỳ. Phương pháp Thể hiện polypeptit dung hợp trên bề mặt của vật ăn vi khuẩn đã biết (Công bố bằng Mỹ số 2011/0118144; Công bố đơn quốc tế số WO2009/085462; Patent Mỹ số 6,969,108; Patent Mỹ số 6,172,197; Patent Mỹ số 5,223,409; Patent Mỹ số 6,582,915; Patent Mỹ số 6,472,147).

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được biến đổi để cải thiện các đặc tính của chúng như cải thiện độ ổn định nhiệt và tính nghịch đảo gấp hoặc không gấp của nhiệt. Một số phương pháp đã được áp dụng để độ ổn định tăng nhiệt rõ ràng của các protein và enzym, bao gồm thiết kế thích hợp dựa trên sự so sánh với các trình tự ổn định nhiệt tương tự cao, thiết kế ổn định các cầu disulfide, các đột biến để tăng xu hướng xoắn alpha, thiết kế cầu muối, sự biến đổi tích điện bề mặt của the protein, sự tiến triển trực tiếp, và thành phần của các trình tự liên ứng (Lehmann và Wyss, *Curr Opin Biotechnol*, 12, 371-375, 2001). Độ ổn định nhiệt cao có thể làm tăng hiệu suất của protein biểu hiện, cải thiện độ ổn định hoặc hoạt tính, làm giảm miễn dịch, và giảm thiểu sự cần thiết của chuỗi lạnh trong sản xuất. Các góc mà có thể được thể để cải thiện độ ổn định nhiệt của Tencon (SEQ ID NO: 1) là các vị trí góc 11, 14, 17, 37, 46, 73, hoặc 86, và được mô tả trong công bố bằng Mỹ số 2011/0274623. Sự thể tương ứng với các góc này có thể được kết hợp với các miền FN3 hoặc miền FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và chặn gắn kết của EGF với EGFR, bao gồm trình tự được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137, còn bao gồm sự thể tại một hoặc nhiều vị trí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID NO: 1).

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu c-Met và chặn gắn kết của HGF với c-Met, bao gồm trình tự được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 32-49 hoặc 111-114, còn bao gồm sự thể tại một hoặc nhiều vị trí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID NO: 1).

Sự thể minh họa là sự thể E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y và E86I (đánh số theo SEQ ID NO: 1).

Theo một số phương án, các miền FN3 theo sáng chế bao gồm sự thể tương ứng với sự thể L17A, N46V, và E86I trong Tencon (SEQ ID NO: 1).

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR như được mô tả ở đây (Fig. 1) có vòng FG được kéo dài khi so với Tencon (SEQ ID NO: 1). Do đó, các gốc tương ứng với các gốc 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID NO: 1) là các gốc 11, 14, 17, 37, 46, 73 và 91 trong EGFR các miền FN3 được Thể hiện trong Fig. 1A và 1B loại trừ miền FN3 của SEQ ID NO: 24, trong đó các gốc tương ứng là các gốc 11, 14, 17, 38, 74, và 92 do sự chen một trong số các axit amin lên vòng BC.

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và chặn gắn kết của EGF với EGFR bao gồm trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 hoặc 194-211, tùy ý có một, hai hoặc ba sự thể tương ứng với sự thể L17A, N46V và E86I trong Tencon (SEQ ID NO: 1).

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu c-Met và chặn gắn kết của HGF với c-Met bao gồm trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 32-49, 111-114 hoặc 212-223, tùy ý có một, hai hoặc ba sự thể tương ứng với sự thể L17A, N46V, và E86I trong Tencon (SEQ ID NO: 1).

Phép đo độ ổn định của protein và độ không bền của protein có thể được coi là các khía cạnh giống hoặc khác nhau về tính đồng nhất protein. Các protein là nhạy hoặc “không bền” đối với sự làm biến tính gây ra bởi nhiệt bằng bức xạ cực tím hoặc bức xạ ion hóa, sự thay đổi nồng độ mol và nồng độ pH môi trường xung quanh nếu trong dung dịch lỏng lực cắt cơ học được áp dụng bằng kích sự lọc có kích cỡ lỗ hồng nhỏ, bức xạ cực tím, bức xạ ion hóa, như bằng bức xạ gamma, sự khử nhờ nhiệt hoặc hóa chất, hoặc hoạt tính hoặc lực khác bất kỳ mà có thể làm sự phá vỡ cấu trúc protein. Độ ổn định của phân tử có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, độ ổn định của phân tử có thể được nhận dạng bằng cách đo nhiệt độ nóng chảy nhờ nhiệt ("TM"), nhiệt độ ở độ C (°C) mà tại đó một nửa phân tử trở nên không được gấp, bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Thông thường, TM cao hơn, phân tử thích hợp hơn. Ngoài ra nhiệt, môi trường hóa học cũng làm thay đổi khả năng của protein để duy trì cấu trúc không gian ba chiều cụ thể.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, các miền FN3 gắn kết với EGFR hoặc c-Met theo sáng chế biểu hiện tăng độ ổn định bằng ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn so với miền tương tự trước khi thiết kế được đo bằng cách làm tăng TM.

Sự làm biến tính hóa học cũng có thể được đo theo nhiều phương pháp. Các chất làm biến tính hóa học bao gồm guanidin hydrochlorit, guanidin thioxyanat, ure, axeton, hoặc các tá dược lỏng hữu cơ (DMF, benzen, axetonitril), các muối (ammoni sunfat, liti bromua, liti clorua, natri bromua, canxi clorua, natri clorua); các chất khử (Ví dụ dithiothreitol, beta-mercaptoetanol, dinitrothiobenzen, và hydrit, như natri borohydrit), chất tẩy rửa không có ion và có ion, các axit (Ví dụ axit hydrochloric (HCl), axit axetic (CH_3COOH), axit axetic được halogen hóa), các phân tử kỵ nước (Ví dụ phospholipid), và chất làm biến tính mục tiêu. Định lượng về mức độ biến tính có thể dựa trên sự mất đặc tính chức năng, như khả năng gắn kết phân tử đích, hoặc bằng các đặc tính lý hóa, như xu hướng kết tụ, tiếp xúc

các gốc không thể xâm nhập tá được lỏng trước đó, hoặc phá hủy hoặc hình thành các liên kết disunfit.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 theo sáng chế gắn kết với EGFR hoặc c-Met biểu hiện tăng độ ổn định bằng ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn so với khung sinh học tương tự trước khi thiết kế, được đo bằng cách sử dụng guanidin hydrochlorit làm chất làm biến tính hóa học. Độ ổn định tăng có thể được đo như chức năng của huỳnh quang tryptophan khi điều trị với sự tăng nồng độ của guanidin hydrochlorit bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Các miền FN3 theo sáng chế được mô tả ở đây có thể được tạo ra như monome, đime, hoặc multime, Ví dụ, như một phương thức để tăng hóa trị và do đó ái lực của gắn kết phân tử đích, hoặc để tạo ra các khung sinh học đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu gắn kết đồng thời với hai hoặc nhiều các phân tử đích khác nhau. Các đime và các multime có thể được tạo ra bằng cách gắn kết các khung sinh học protein đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, Ví dụ, bằng cách bao gồm liên kết axit amin, Ví dụ liên kết chứa poly-glyxin, glyxin và serin, hoặc alanin và prolin. Liên kết minh họa bao gồm (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 224), (GGGGS)₅ (SEQ ID NO: 79), (AP)₂ (SEQ ID NO: 80), (AP)₅ (SEQ ID NO: 81), (AP)₁₀ (SEQ ID NO: 82), (AP)₂₀ (SEQ ID NO: 83) và A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84). Các đime và các multime có thể được liên kết với nhau theo hướng từ N đến C. Việc sử dụng xuất hiện tự nhiên cũng như các chất peptit nhân tạo để nối các polypeptit thành polypeptit dung hợp được liên kết mới đã biết trong tài liệu sáng chế (Hallewell và các đồng tác giả, *J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989; Alfthan và các đồng tác giả, *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996; Patent Mỹ số 5,856,456).

Các phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế được mô tả ở đây có thể tạo ra lợi ích về tính đặc hiệu và làm giảm độc tố làm cân đích

khi so với các chất ức chế EGFR phân tử nhỏ, và sự xâm nhập mô được cải thiện khi so với liệu pháp điều trị kháng thể thông thường. Sáng chế dựa trên ít nhất một phân dựa trên sự phát hiện bất ngờ mà miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế tạo ra hiệu quả ức chế tổng hợp được cải thiện đáng kể khi so với hỗn hợp của các miền FN3 gắn kết EGFR và các miền FN3 gắn kết c-Met. Các phân tử có thể được điều chỉnh ái lực đặc hiệu đối với cả hai EGFR và c-Met để tối đa hóa sự xâm nhập và sự duy trì khối u. Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế tạo ra sự ức chế hiệu quả hơn của các con đường tín hiệu EGFR và/hoặc c-Met và ức chế sự tăng trưởng khối u hiệu quả hơn so với cetuximab (Eribtux[®])

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử bao gồm miền fibronectin loại III thứ nhất (FN3) và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế được mô tả ở đây có thể được tạo ra bằng liên kết cộng hóa trị miền FN3 gắn kết EGFR bất kỳ và miền FN3 gắn kết c-Met bất kỳ theo sáng chế một cách trực tiếp hoặc thông qua chất liên kết. Do đó, miền FN3 thứ nhất của phân tử đặc hiệu kép có thể có các đặc trưng như được mô tả trên đây đối với các miền FN3 gắn kết EGFR, và miền FN3 thứ hai của phân tử đặc hiệu kép có thể có các đặc trưng như được mô tả trên đây đối với các miền FN3 gắn kết c-Met.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 thứ nhất của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được cảm ứng bởi EGF tại gốc Tiroxin 1173 của EGFR có trị số IC₅₀ nhỏ hơn khoảng $2,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người, và miền FN3 thứ hai của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được cảm ứng bởi HGF tại gốc Tiroxin

1349 c-Met của c-Met có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $1,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF của người.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 thứ nhất của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được cảm ứng bởi EGF tại gốc Tiroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ $1,8 \times 10^{-8}$ M đến $2,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H292 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người, và miền FN3 thứ hai của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được cảm ứng bởi HGF tại gốc Tiroxin 1349 c-Met của c-Met có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 4×10^{-9} M đến $1,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100ng/mL HGF của người.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền FN3 thứ nhất của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử gắn kết với EGFR của người có hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, và miền FN3 thứ hai của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử gắn kết với c-Met của người có K_D nhỏ hơn khoảng 5×10^{-8} M.

Trong phân tử đặc hiệu kép gắn kết với cả EGFR và c-Met như được mô tả ở đây, miền FN3 thứ nhất gắn kết với EGFR của người có K_D nằm trong khoảng từ 2×10^{-10} đến 1×10^{-8} M, và miền FN3 thứ hai gắn kết với c-Met của người có K_D nằm trong khoảng từ 3×10^{-10} đến 5×10^{-8} M.

Ái lực của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép đối với EGFR và c-Met có thể được xác định như được mô tả trong Ví dụ 3 và Ví dụ 5 đối với các phân tử đặc hiệu đơn.

Miền FN3 thứ nhất trong phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể chặn EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} M đến $1,5 \times 10^{-7}$ M trong thử nghiệm dùng các tế bào A431 và phát hiện lượng của huỳnh quang từ EGF được biotin hóa liên kết bằng cách sử dụng thể tiếp hợp streptavidin-phycoerythrin tại 600 nM trên các tế bào A431 được ủ có hoặc không có miền FN3 thứ nhất. Miền FN3 thứ nhất trong phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

theo sáng chế có thể chặn EGF gắn kết với EGFR bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với sự gắn kết của EGF với EGFR với có mặt của các miền FN3 thứ nhất sử dụng cùng điều kiện thử nghiệm.

Miền FN3 thứ hai trong phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể chặn gắn kết HGF với c-Met có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 2×10^{-10} M đến 6×10^{-8} M trong thử nghiệm phát hiện sự ức chế gắn kết của HGF được biotin hóa với protein dung hợp c-Met-Fc với có mặt của miền FN3 thứ hai. Miền FN3 thứ hai trong phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép có thể chặn gắn kết HGF với c-Met bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với sự gắn kết của HGF với c-Met với có mặt của miền FN3 thứ hai sử dụng cùng điều kiện thử nghiệm.

Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế được mô tả ở đây có thể ức chế EGFR và/hoặc tín hiệu c-Met bằng ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi so với mức tín hiệu với có mặt của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế sử dụng cùng điều kiện thử nghiệm.

EGFR và tín hiệu c-Met có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau như được mô tả trên đây đối với các phân tử đặc hiệu đơn.

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả ở đây bao gồm miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với EGFR và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với c-Met tạo ra sự ức chế hiệp đồng tăng đáng kể của tín hiệu EGFR và c-Met và khối u sự tăng sinh tế bào khi so với sự ức chế hiệp đồng được quan sát bởi hỗn hợp của miền FN3 thứ nhất và thứ hai. Sự ức chế hiệp đồng có thể được đánh giá Ví dụ bằng cách đo sự ức chế sự phosphoryl hóa ERK bằng miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử và bằng hỗn hợp của hai các phân tử đặc hiệu đơn, một gắn kết EGFR và c-Met khác. Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể ức chế sự phosphoryl hóa ERK có ít nhất là nhỏ hơn

khoảng 100 lần, Ví dụ ít nhất là nhỏ hơn 500, 1000, 5000 hoặc 10,000 lần trị số IC_{50} khi so với trị số IC_{50} đối với hỗn hợp của hai miền FN3 đặc hiệu đơn, Thể hiện rằng ít nhất là khả năng được tăng 100 lần đối với miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử khi so với hỗn hợp của hai miền FN3 đặc hiệu đơn. Miền EGFR-c-Met FN3 đặc hiệu kép minh họa chứa các phân tử có thể ức chế sự phosphoryl hóa ERK có và trị số IC_{50} khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn. Sự phosphoryl hóa ERK có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn và các phương pháp được mô tả ở đây.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể ức chế sự tăng sinh tế bào H292 có trị số IC_{50} mà ít nhất là nhỏ hơn 30 lần khi so với trị số IC_{50} của sự ức chế sự tăng trưởng tế bào H292 với hỗn hợp của miền FN3 thứ nhất và FN3 thứ hai, trong đó sự tăng sinh tế bào được cảm ứng bằng môi trường chứa 10% FBS được bổ sung 7,5 ng/mL HGF. Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể ức chế khối u sự tăng sinh tế bào có trị số IC_{50} là khoảng 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, hoặc nhỏ hơn khoảng 1000 lần khi so với trị số IC_{50} của sự ức chế khối u sự tăng sinh tế bào với hỗn hợp của miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai. Sự ức chế của khối u sự tăng sinh tế bào có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn và các phương pháp được mô tả ở đây.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử liên kết với EGFR with một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc D23, F27, Y28, V77 và G85 của P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27).

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử gắn kết với c-Met có một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc R34, F38, M72 và I79 trong P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

Các gốc paratop trong phân tử đặc hiệu kép có thể được xác định bằng các nghiên cứu gây đột biến hoặc từ cấu trúc đồng tinh thể của miền FN3 và EGFR hoặc c-Met. Các nghiên cứu gây đột biến có thể được sử dụng bởi Ví dụ bằng cách sử dụng sự quét alanin, và các biến thể thu được có thể được thử nghiệm cho gắn

kết của chúng để EGFR hoặc c-Met sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Thông thường các gốc paratop là các gốc nêu trên mà khi được gây đột biến gen, dẫn đến các biến thể có liên kết bị giảm hoặc bị phá hủy đối với EGFR hoặc c-Met. Các miền FN3 gắn kết EGFR bằng sự thể tại axit amin vị trí gốc tương ứng với các gốc D23, F27, Y28, V77 và G85 của P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), khi được thể, giảm gắn kết EGFR ít nhất là 100 lần khi so với kiểu đại P54AR4-83v2. Phân tử đặc hiệu kép ECB1, ECB2, ECB3, ECB4, ECB5, ECB6, ECB7, ECB15, ECB17, ECB60, ECB37, ECB94, ECB95, ECB96, ECB97, ECB91, ECB18, ECB28, ECB38, ECB39, ECB168 và ECB176 have D, F, Y, V và G tại vị trí gốc tương ứng với các gốc D23, F27, Y28, V77 và G85 của P54AR4-83v2 và được mong muốn gắn kết với EGFR có các gốc này. Miền FN3 gắn kết c-Met bằng sự thể tại axit amin vị trí gốc tương ứng với các gốc R34, F38, M72 và I79 của P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41), khi được thể, phá hủy hoặc giảm sự gắn kết c-Met ít nhất là 100 lần khi so với kiểu đại P114AR7P95-A3. Phân tử đặc hiệu kép ECB2, ECB5, ECB15, ECB60, ECB38 và ECB39 có R, F, M và I tại vị trí gốc tương ứng với các gốc R34, F38, M72 và I79 của P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41) và được mong muốn gắn kết với c-Met có các gốc này.

Sáng chế cũng đề cập đến miền đặc hiệu kép FN3 chứa phân tử bao gồm miền fibronectin loại III thứ nhất (FN3) và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met, trong đó

miền FN3 thứ nhất bao gồm

vòng FG bao gồm trình tự HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), trong đó X₉ là M hoặc I; và

vòng BC bao gồm trình tự X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181), trong đó

X_1 là A, T, G hoặc D;

X_2 là A, D, Y hoặc W;

X_3 là P, D hoặc N;

X_4 là L hoặc không có mặt;

X_5 là D, H, R, G, Y hoặc W;

X_6 là G, D hoặc A;

X_7 là A, F, G, H hoặc D; và

X_8 là Y, F hoặc L; và

miền FN3 thứ hai bao gồm

sợi C và vòng CD bao gồm trình tự DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
(SEQ ID NO: 184), trong đó

X_{10} là W, F hoặc V;

X_{11} là D, F hoặc L;

X_{12} là V, F hoặc L;

X_{13} là V, L hoặc T;

X_{14} là V, R, G, L, T hoặc S;

X_{15} là G, S, A, T hoặc K; và

X_{16} là E hoặc D; và

sợi F và vòng FG bao gồm trình tự TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V
KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), trong đó

X_{17} là Y, W, I, V, G hoặc A;

X_{18} là N, T, Q hoặc G;

X_{19} là L, M, N hoặc I;

X_{20} là G hoặc S;

X_{21} là S, L, G, Y, T, R, H hoặc K;

X₂₂ là I, V hoặc L; và

X₂₃ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, phân tử đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ nhất mà liên kết với EGFR bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGEAINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),
hoặc trình tự

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGEAINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDMVLP LLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

trong đó trong các SEQ ID NO: 182 và 183;

X₁ là A, T, G hoặc D;

X₂ là A, D, Y hoặc W;

X₃ là P, D hoặc N;

X₄ là L hoặc không có mặt;

X₅ là D, H, R, G, Y hoặc W;

X₆ là G, D hoặc A;

X₇ là A, F, G, H hoặc D;

X₈ là Y, F hoặc L; và

X₉ là M hoặc I.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, phân tử đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ hai mà gắn kết với c-Met bao gồm trình tự

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁₀IRYX₁₁EX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID
NO: 186),

trong đó

X₁₀ là W, F hoặc V; và

X₁₁ là D, F hoặc L;

X₁₂ là V, F hoặc L;

X₁₃ là V, L hoặc T;

X₁₄ là V, R, G, L, T hoặc S;

X₁₅ là G, S, A, T hoặc K;

X₁₆ là E hoặc D;

X₁₇ là Y, W, I, V, G hoặc A;

X₁₈ là N, T, Q hoặc G;

X₁₉ là L, M, N hoặc I;

X₂₀ là G hoặc S;

X₂₁ là S, L, G, Y, T, R, H hoặc K;

X₂₂ là I, V hoặc L; và

X₂₃ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử bao gồm trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-178 hoặc 190-193.

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả ở đây bao gồm một số đặc trưng cấu trúc được kết hợp với đặc trưng chức năng của chúng, như sự ức chế tự phosphoryl hóa EGFR, như vòng FG của miền FN3 thứ nhất mà liên kết với EGFR bao gồm trình tự HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), trong đó X₉ là M hoặc I.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế

Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được cảm ứng bởi EGF tại các gốc Tiroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng 8×10^{-7} M khi được đo trong các tế bào H292 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người;

Ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được cảm ứng bởi HGF tại gốc Tiroxin 1349 c-Met của c-Met có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $8,4 \times 10^{-7}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100ng/mL HGF của người;

Ức chế sự tăng sinh tế bào NCI-H292 được cảm ứng bởi HGF có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $9,5 \times 10^{-6}$ M trong đó sự tăng sinh tế bào được cảm ứng có 10% FBS chứa 7,5 ng HGF;

Gắn kết EGFR có K_D nhỏ hơn khoảng $2,0 \times 10^{-8}$ M; hoặc

gắn kết c-Met có K_D nhỏ hơn khoảng $2,0 \times 10^{-8}$ M; trong đó K_D được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng bề mặt plasmon như được mô tả trong Ví dụ 3 hoặc Ví dụ 5.

Theo phương án khác, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế

Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được cảm ứng bởi EGF tại các gốc Tiroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ $4,2 \times 10^{-9}$ M và 8×10^{-7} M khi được đo trong các tế bào H292 bằng cách sử dụng 50ng/mL EGF của người;

ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được cảm ứng bởi HGF tại c-Met các gốc Tiroxin 1349 có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ $2,4 \times 10^{-8}$ M đến $8,4 \times 10^{-7}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100ng/mL HGF của người;

ức chế sự tăng sinh tế bào NCI-H292 được cảm ứng bởi HGF có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ $2,3 \times 10^{-8}$ M đến $9,5 \times 10^{-6}$ M trong đó sự tăng sinh tế bào được cảm ứng bằng 10% FBS chứa 7,5 ng HGF;

gắn kết EGFR có K_D nằm trong khoảng từ 2×10^{-10} M đến $2,0 \times 10^{-8}$ M; hoặc

gắn kết c-Met có K_D nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} M đến $2,0 \times 10^{-8}$ M, trong đó K_D được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng bề mặt plasmon như được mô tả trong Ví dụ 3 hoặc Ví dụ 5.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 gắn kết EGFR bao gồm trình tự

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV HNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),
trong đó

X₁ là D;

X₂ là D;

X₃ là P;

X₄ không có mặt;

X₅ là H hoặc W;

X₆ là A;

X₇ là F

X₈ là Y; và

X₉ là M hoặc I; và

miền FN3 gắn kết c-Met bao gồm trình tự

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁₀IRYX₁₁EX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃ PLSAEFTT (SEQ ID
NO: 186),

trong đó

X₁₀ là W;

X₁₁ là F;

X₁₂ là F;

X₁₃ là V hoặc L;

X₁₄ là G hoặc S;

X₁₅ là S hoặc K;

X₁₆ là E hoặc D;

X₁₇ là V;

X₁₈ là N;

X₁₉ là L hoặc M;

X₂₀ là G hoặc S;

X₂₁ là S hoặc K;

X₂₂ là I; và

X₂₃ là P.

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép minh họa là các phân tử có trình tự được thể hiện trong các SEQ ID NO: 57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 hoặc 190-193.

Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể còn bao gồm sự thể tại một hoặc nhiều vị trí gốc trong miền FN3 thứ nhất và/hoặc miền FN3 thứ hai tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73 và 86 trong Tencon (SEQ ID NO: 1) như được mô tả trên đây, và sự thể tại vị trí 29. Sự thể minh họa là sự thể E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y, E86I và D29E (đánh số theo SEQ ID NO: 1). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ cho rằng axit amin khác có thể được sử dụng cho sự thể, như axit amin trong dãy axit amin mà được liên quan với các chuỗi bên của chúng như được mô tả *infra*.. Các biến thể được tạo ra có thể được thử nghiệm đối với độ ổn định của chúng và gắn kết với EGFR và/hoặc c-Met bằng cách sử dụng phương pháp ở đây.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử bao gồm miền FN3 thứ nhất mà gắn kết với EGFR đặc hiệu và miền FN3 thứ hai mà gắn kết với c-Met đặc hiệu, trong đó miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVGEAIX₃₀LTVPGSER
SYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (SEQ ID NO: 187),
trong đó

X₂₄ là E, N hoặc R;

X₂₅ là E hoặc P;

X₂₆ là L hoặc A;

X₂₇ là H hoặc W;

X₂₈ là E hoặc D;

X₂₉ là E hoặc P;

X₃₀ là N hoặc V;

X₃₁ là G hoặc Y;

X₃₂ là M hoặc I; và

X₃₃ là E hoặc I;

và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSEFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂LTVPG
SERSYDLTGLKPGTEYVVNIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPPLSAX₄₆FTT (SEQ ID NO: 188); trong
đó

X₃₄ là E, N hoặc R;

X₃₅ là E hoặc P;

X₃₆ là L hoặc A;

X₃₇ là E hoặc P;

X₃₈ là V hoặc L;

X₃₉ là G hoặc S;

X₄₀ là S hoặc K;

X₄₁ là E hoặc D;

X₄₂ là N hoặc V;

X₄₃ là L hoặc M;

X₄₄ là G hoặc S;

X₄₅ là S hoặc K; và

X₄₆ là E hoặc I.

Theo một số phương án được mô tả ở đây, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử bao gồm miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự axit amin ít nhất 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27, và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin ít nhất 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được điều chỉnh sao cho ái lực đặc hiệu đối với EGFR và c-Met đến tối đa hóa sự tích lũy khối u.

Sáng chế cũng đề cập đến miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử bao gồm miền fibronectin loại III thứ nhất (FN3) và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met, trong đó miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon của SEQ ID NO: 1.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được tạo ra bằng liên kết cộng hóa trị miền FN3 gắn kết EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Các miền FN3 có thể được liên kết thông qua chất liên kết, Ví dụ chất liên kết chứa poly-glyxin, glyxin và serin, hoặc alanin và prolin. Chất liên kết minh họa bao

gồm (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 224), (GGGGS)₅ (SEQ ID NO: 79), (AP)₂ (SEQ ID NO: 80), (AP)₅ (SEQ ID NO: 81), (AP)₁₀ (SEQ ID NO: 82), (AP)₂₀ (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84). Việc sử dụng xuất hiện tự nhiên cũng như các chất peptit nhân tạo để nối các polypeptit thành polypeptit dung hợp được liên kết mới đã biết trong tài liệu sáng chế (Hallewell và các đồng tác giả, *J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989; Alfthan và các đồng tác giả, *Protein Eng.* 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996; Patent Mỹ số 5,856,456). Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được liên kết với nhau từ đầu C của miền FN3 thứ nhất với đầu của miền FN3 thứ hai, hoặc từ đầu C của miền FN3 thứ hai với đầu N của miền FN3 thứ nhất. Miền FN3 gắn kết EGFR bất kỳ có thể được liên kết cộng hóa trị với miền FN3 gắn kết c-Met. Miền FN3 gắn kết EGFR minh họa là miền có trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 hoặc 194-211, và miền FN3 gắn kết c-Met minh họa là miền có trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 32-49, 111-114 hoặc 212-223. Các miền FN3 gắn kết EGFR sao cho được tạo cặp với phân tử đặc hiệu kép có thể bao gồm thêm methionin khơi mào (Met) tại đầu N của chúng.

Các biến thể của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử như được mô tả ở đây trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, sự thể có thể được thực hiện trong miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử miễn là biến thể thu được vẫn giữ tính lực chọn và khả năng tương tự đối với EGFR và c-Met khi so với phân tử gốc. Sự biến đổi minh họa, Ví dụ sự thể thích hợp mà sẽ dẫn đến các biến thể có các đặc trưng tương tự với các biến thể của các phân tử gốc. Sự thể thích hợp là sự thể mà diễn ra trong dãy axit amin được liên quan với các chuỗi bên của chúng. Axit amin được mã hóa về mặt di truyền học có thể được phân chia thành bốn dãy: (1) axidic (aspartat, glutamat); (2) basic (lysin, arginin, histidin); (3) (alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan) không cực; và (4) (glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, tiroxin) không phân cực. Phenylalanin, tryptophan, và tiroxin đôi khi được phân lập cùng nhau làm axit amin thơm. Theo một cách khác, danh mục axit amin có thể được tạo nhóm như (1)

axidic (aspartat, glutamat); (2) basic (lysin, arginin histidin), (3) aliphatic (glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin), với serin và amino axit thiết yếu tùy ý được tạo nhóm riêng rẽ như aliphatic-hydroxyl; (4) (phenylalanin, tiroxin, tryptophan) thơm; (5) amit (asparagin, glutamin); và (6) (xystein và methionin) chứa lưu huỳnh (Stryer (ed.), Biochemistry, 2nd ed, WH Freeman và Co., 1981). Các sự thể không thích hợp có thể được thực hiện đối với miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử mà bao gồm sự thể của gốc axit amin giữa các loại axit amin khác nhau để cải thiện các đặc tính của các phân tử đặc hiệu kép. Liệu sự biến đổi trong trình tự axit amin của polypeptit hoặc đoạn của nó thu được trong sự tương đồng về chức năng có thể được xác định dễ dàng bằng cách đánh giá khả năng của polypeptit hoặc đoạn được biến đổi để tạo ra sự đáp ứng mẫu tương tự với polypeptit hoặc đoạn không được biến đổi bằng cách sử dụng các thử nghiệm được mô tả ở đây. Peptit, polypeptit hoặc protein mà trong đó nhiều hơn một sự thể đã diễn ra có thể dễ dàng được thử nghiệm theo cách này.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được tạo ra làm dime hoặc multime, Ví dụ, như một phương thức để tăng hóa trị và do đó ái lực của gắn kết phân tử đích. Multime này có thể được tạo ra bằng cách gắn kết một hoặc nhiều miền FN3 gắn kết EGFR và một hoặc nhiều miền FN3 gắn kết c-Met để tạo ra các phân tử bao gồm ít nhất ba miền FN3 riêng rẽ mà ít nhất là đặc hiệu kép đối với EGFR hoặc c-Met, Ví dụ bằng cách bao gồm chất liên kết axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Sáng chế cũng đề cập đến miền đặc hiệu kép FN3 chứa phân tử bao gồm miền fibronectin loại III thứ nhất (FN3) và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và chặn gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met bao gồm trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-179 hoặc 190-193.

Các gốc kéo dài chu kỳ bán hủy

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử hoặc các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc c-Met đặc hiệu đơn theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể kết hợp các đơn vị con khác Ví dụ thông qua sự tương tác cộng hóa trị. Theo một khía cạnh của sáng chế, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế còn bao gồm gốc kéo dài chu kỳ bán hủy. Các gốc kéo dài chu kỳ bán hủy minh họa là albumin, các biến thể albumin, các protein và/hoặc các miền gắn kết albumin, transferrin và các đoạn và các chất tương tự của chúng, và các vùng Fc. Miền gắn kết albumin minh họa được Thể hiện trong SEQ ID NO: 117 và biến đổi albumin minh họa được Thể hiện trong SEQ ID NO: 189.

Tất cả hoặc một phần vùng không thay đổi kháng thể có thể được gắn với các phân tử theo sáng chế để truyền các đặc tính giống kháng thể, cụ thể là, các đặc tính này được kết hợp với vùng Fc, như các chức năng tác động Fc như gắn kết C1q, gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), liên kết thụ thể Fc, gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc thụ thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC), sự thực bào, sự điều hòa ức chế thụ thể thấy ngoài màng tế bào (Ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), và có thể còn được biến đổi bằng cách biến đổi các gốc trong Fc có thể đáp ứng các hoạt tính này (để xem xét; xem Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20, 685-691, 2009).

Các gốc bổ sung có thể được kết hợp thành phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế như các phân tử polyetylen glycol (PEG), như PEG5000 hoặc PEG20,000, các axit béo và các este của axit béo có chiều dài chuỗi khác nhau, Ví dụ laurat, myristat, stearat, arachidat, behenat, oleat, arachidonat, axit octandioic, axit tetradexanedioic, axit octadexanedioic, axit docosanedioic, và các axit tương tự, polylysin, octan, carbohydrat (dextran, xenluloza, oligo- hoặc polysaccharit) cho các đặc tính mong muốn. Các gốc này có thể được dung hợp trực tiếp bằng các trình tự mã hóa khung sinh học protein và có thể được tạo ra bởi dòng tiêu chuẩn và kỹ thuật biểu hiện. Theo một cách khác, phương pháp liên kết hóa học đã biết có thể được sử dụng để gắn các gốc với các phân tử được sản sinh bằng cách tái tổ hợp theo sáng chế.

Gốc pegyl có thể Ví dụ được bổ sung vào các phân tử đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn theo sáng chế bằng cách kết hợp gốc xystein với đầu C của phân tử và gắn nhóm pegyl với xystein bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Phân tử đặc hiệu kép minh họa có xystein ở đầu C là các phân tử có trình tự axit amin được Thể hiện trong SEQ IN NO: 170-178.

Phân tử đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả ở đây kết hợp các gốc bổ sung có thể được so với chức năng bằng một số thử nghiệm đã biết. Ví dụ, các đặc tính biến đổi của phân tử đặc hiệu đơn và/hoặc đặc hiệu kép do sự kết hợp của các biến thể của miền Fc và/hoặc miền Fc có thể được thử nghiệm trong các thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc bằng cách sử dụng các dạng có thể hòa tan của thụ thể, như các thụ thể FcγRI, FcγRII, FcγRIII hoặc FcRn, hoặc bằng cách sử dụng các thử nghiệm dựa trên các tế bào đã biết đo Ví dụ ADCC hoặc CDC, hoặc đánh giá các đặc tính truyền nhiễm của các phân tử theo sáng chế trong các mô hình *in vivo*.

Các polynucleotit, các vector, các tế bào chủ

Sáng chế đề cập đến các axit nucleic mã hóa gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế làm các polynucleotit được phân lập hoặc làm các phần của các biểu hiện vector hoặc làm các phần của các trình tự ADN mạch thẳng, bao gồm các trình tự ADN mạch thẳng được sử dụng dùng để phiên mã/dịch mã *in vitro*, các vector tương hợp với biểu hiện động vật bậc thấp, động vật bậc cao hoặc thực khuẩn thể dạng sợi, tiết và/hoặc biểu hiện của các thành phần hoặc các chất gây đột biến trực tiếp của chúng. Một số polynucleotit minh họa được bộc lộ ở đây, tuy nhiên, polynucleotit khác mà tạo ra sự thoái hóa của mã di truyền hoặc sự ưu tiên codon trong hệ thống biểu hiện được đưa ra, mã hóa các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền gắn kết c-Met hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử theo sáng chế cũng trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 hoặc 194-211.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa miền FN3 gắn kết đặc hiệu với c-Met có trình tự axit amin của trình tự được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 32-49, 111-114 hoặc 212-223.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa miền EGFR/-c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-179 hoặc 190-193.

Sáng chế cũng đề cập đến an polynucleotit được phân lập bao gồm polynucleotit trình tự của các SEQ ID NO: 97, 98, 103, 104, 115, 116 hoặc 166-169.

Polynucleotit theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được sản sinh bằng cách tổng hợp hóa học như tổng hợp polynucleotit pha rắn trên thiết bị tổng hợp polynucleotit tự động hóa và được kết hợp thành các phân tử được tạo sợi đơn hoặc kép hoàn toàn. Theo một cách khác, polynucleotit theo sáng chế có thể được sản sinh bằng các kỹ thuật khác như PCR sau đó là tách dòng theo lộ trình. Các kỹ thuật tạo ra hoặc thu được polynucleotit của trình tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Polynucleotit theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể bao gồm ít nhất là một trình tự không mã hóa, như trình tự hoạt hóa hoặc tăng cường, intron, tín hiệu polyadenyl hóa, trình tự *cis* đẩy nhanh gắn kết RepA, và tương tự. Các trình tự polynucleotit cũng có thể bao gồm các trình tự bổ sung mã hóa axit amin bổ sung mà mã hóa Ví dụ trình tự chỉ thị hoặc trình tự đánh dấu như chất đánh dấu histidin hoặc chất đánh dấu HA để đẩy nhanh sự tinh sạch hoặc sự phát hiện protein, trình tự tín hiệu, thành phần protein dung hợp như RepA, Fc hoặc protein phủ vật ăn vi khuẩn như pIX hoặc pIII.

Sáng chế cũng đề cập đến vector bao gồm ít nhất là một polynucleotit theo sáng chế. Các vector này có thể là các vector plasmit, các vector virus, các vector biểu hiện baculovirus, các vector dựa trên gen nhảy hoặc vector khác bất kỳ thích hợp để

đưa polynucleotit theo sáng chế vào sinh vật hoặc nền di truyền được đưa ra bằng các phương thức bất kỳ. Các vector này có thể là các biểu hiện vector bao gồm các thành phần của trình tự axit nucleic mà có thể điều khiển, điều hòa, gây ra hoặc cho phép biểu hiện của polypeptit được mã hóa bằng vector này. Các thành phần này có thể bao gồm các vị trí gắn kết vùng tăng cường phiên mã, các vị trí khởi đầu của ARN polymeraza, vị trí gắn kết ribô thể, và các vị trí khác mà đẩy nhanh biểu hiện của polypeptit được mã hóa trong hệ thống biểu hiện được đưa ra. Các hệ thống biểu hiện này có thể là các hệ thống dựa trên tế bào, hoặc không có tế bào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ bao gồm vector theo sáng chế. Miền FN3 gắn kết EGFR hoặc gắn kết c-Met đặc hiệu đơn hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử theo sáng chế có thể tùy ý được tạo ra bằng dòng tế bào, dòng tế bào được trộn, tế bào được cố định hoặc sự phân bố dòng của các tế bào được cố định, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, Ví dụ, Ausubel, và các đồng tác giả, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, và các đồng tác giả, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow và Lane, *Các kháng thể, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, và các đồng tác giả, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan và các đồng tác giả, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Tế bào chủ được chọn để biểu hiện có thể có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc có thể được chọn từ COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, myeloma, lymphoma, men, các tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật, hoặc dẫn xuất bất kỳ, tế bào bất tử và được biến nạp của nó. Theo một cách khác, tế bào chủ có thể được chọn từ các loài hoặc sinh vật không có khả năng glycosyl hóa các polypeptit, Ví dụ tế bào hoặc sinh vật nhân sơ, như BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), và bất kỳ các chủng *E. coli* spp, *Klebsiella* spp., hoặc *Pseudomonas* spp tự nhiên hoặc được thiết kế.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp tạo ra miền FN3 được phân lập gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met theo sáng chế hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử theo sáng chế, bao gồm sự nuôi cấy tế bào chủ được phân lập theo sáng chế trong các điều kiện sao cho miền FN3 được phân lập gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử được biểu hiện, và tinh sạch miền hoặc phân tử.

Miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met hoặc miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử theo sáng chế có thể được tinh sạch từ các canh trường tế bào tổ hợp theo các phương pháp đã biết, Ví dụ bằng cách tinh sạch protein A, kết tủa ammoni sunfat hoặc etanol, chiết axit, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký phosphoxenluloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit và ái lực lectin, hoặc phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC).

Sử dụng miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử và các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc gắn kết c-Met theo sáng chế

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế như được mô tả ở đây có thể được sử dụng để chuẩn đoán, giám sát, điều biến, điều trị, thuyên giảm, giúp ngăn chặn tỷ lệ mắc bệnh, hoặc giảm các triệu chứng bệnh ở người hoặc các bệnh lý trong các tế bào, các mô, hoặc cơ quan, chất lỏng, hoặc, thông thường trong vật chủ. Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhân động vật thuộc phân loại bất kỳ. Ví dụ về các động vật này bao gồm các động vật có vú như con người, động vật gặm nhấm, chó, mèo và gia súc.

Một khía cạnh theo sáng chế là phương pháp ức chế sự tăng trưởng hoặc sự tăng sinh cả các tế bào mà biểu hiện EGFR và/hoặc c-Met, bao gồm sự tiếp xúc của các tế bào với miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp ức chế sự tăng trưởng hoặc di căn EGFR và/hoặc khối u hoặc các tế bào ung thư c-Met trong đối tượng bao gồm việc dùng đối tượng với lượng có hiệu quả của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế sao cho tăng trưởng hoặc di căn của khối u hoặc tế bào ung thư biểu hiện EGFR- và/hoặc c-Met được ức chế.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR, hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế để bệnh nhân cần điều trị trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ được đặc trưng bởi sự hoạt hóa hoặc sự sản sinh bất thường của EGFR, c-Met, EGF hoặc phối tử EGFR khác hoặc HGF, hoặc rối loạn liên quan đến biểu hiện EGFR hoặc c-Met, mà có thể hoặc có thể không bao gồm khối u ác tính hoặc bệnh ung thư, trong đó sự hoạt hóa và/hoặc sự sản sinh bất thường EGFR, c-Met, EGF hoặc phối tử EGFR khác, hoặc HGF xuất hiện trong các tế bào hoặc các mô của đối tượng mắc hoặc dễ mắc phải bệnh hoặc rối loạn. Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các khối u, bao gồm các bệnh ung thư và các khối u lành tính. Các bệnh ung thư mà chịu việc điều trị bằng phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các phân tử mà quá biểu hiện EGFR và/hoặc c-Met, các bệnh ung thư được kết hợp với hoạt tính EGFR và/hoặc các mức biểu hiện cao (như, Ví dụ, đột biến hoạt hóa EGFR, sự khuếch đại gen EGFR, hoặc sự hoạt hóa EGFR gián tiếp phối tử) và hoạt tính c-Met và/hoặc các mức biểu hiện cao (như, Ví dụ, đột biến hoạt hóa c-Met, sự khuếch đại gen c-Met, hoặc sự hoạt hóa c-Met gián tiếp HGF).

Các đột biến hoạt hóa EGFR minh họa mà có thể được kết hợp với bệnh ung thư bao gồm sự đột biến điểm, sự mất các đột biến, sự chèn các đột biến, sự nghịch

đảo hoặc sự khuếch đại gen mà dẫn đến tăng ít nhất là một hoạt tính sinh học của EGFR, như tiroxin hoạt tính kinaza cao, hình thành homodime và heterodime thụ thể, liên kết phối tử được tăng cường v.v.. Các đột biến có thể được đặt ở phần bất kỳ của gen EGFR hoặc vùng điều hòa được kết hợp với gen EGFR và bao gồm các đột biến trong exon 18, 19, 20 hoặc 21 hoặc các đột biến trong vùng kinaza. Các đột biến EGFR hoạt hóa minh họa là G719A, L861X (X là axit amin bất kỳ), các sự thể L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P hoặc T790M, sự mất E746-A750, sự mất R748-P753, sự chèn của Ala giữa M766 và A767, sự chèn của SVA (Ser, Val, Ala) giữa S768 và V769, và sự chèn của NS (Asn, Ser) giữa P772 và H773. Các ví dụ khác về các đột biến hoạt hóa EGFR đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem Ví dụ, công bố bằng Mỹ số US2005/0272083). Thông tin về EGFR và thụ thể ErbB khác bao gồm thụ thể homo- và hetero-dime, các phối tử thụ thể, các vị trí phosphoryl hóa, và các phân tử tín hiệu bao gồm trong tín hiệu gián tiếp ErbB đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem Ví dụ, Hynes và Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341-354, 2005).

Các đột biến hoạt hóa c-Met minh họa bao gồm sự đột biến điểm, sự mất các đột biến, sự chèn các đột biến, sự nghịch đảo hoặc sự khuếch đại gen mà dẫn đến tăng ít nhất là một hoạt tính sinh học của protein c-Met, như tiroxin hoạt tính kinaza cao, hình thành homodime và heterodime thụ thể, liên kết phối tử được tăng cường v.v.. Các đột biến có thể được đặt ở phần bất kỳ của gen c-Met hoặc các vùng điều hòa được kết hợp với gen, như các đột biến trong vùng kinaza của c-Met. Các đột biến hoạt hóa c-Met minh họa là các đột biến tại vị trí gốc N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 và E168. Các phương pháp phát hiện đột biến EGFR và các c-Met hoặc sự khuếch đại gen đã biết.

Các bệnh ung minh họa thư mà chịu sự điều trị bằng miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế bao gồm ung thư tế bào biểu mô, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư phổi tế bào lớn (NSCLC), ung thư mô tuyến phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bờ viền hậu môn, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư đầu và cổ, ung thư buồng trứng, ung thư tụy

tạng, ung thư da, hoặc ung thư miệng, ung thư thực quản, ung thư âm đạo, ung thư cổ tử cung, ung thư lá lách, ung thư tinh hoàn, ung thư dạ dày, ung thư biểu mô tuyến ức, ung thư đại tràng, ung thư biểu mô tuyến giáp, ung thư gan, hoặc ngẫu nhiên hoặc ung thư tế bào thận nhú (PRCC).

Các miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với c-Met và chặn sự gắn kết của HGF với c-Met theo sáng chế có thể để điều trị các khối u, bao gồm các bệnh ung thư và các khối u lành tính. Các bệnh ung thư mà chịu việc điều trị bằng miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế bao gồm các bệnh ung thư mà quá biểu hiện c-Met. Các bệnh ung thư minh họa mà chịu sự điều trị bằng các miền FN3 theo sáng chế bao gồm các ung thư tế bào biểu mô, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bờ viền hậu môn, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư bàng quang, bệnh ung thư đầu và cổ, ung thư buồng trứng, ung thư tụy tạng, ung thư da, hoặc ung thư miệng, ung thư thực quản, ung thư âm đạo, ung thư cổ tử cung, ung thư lá lách, ung thư tinh hoàn, và ung thư biểu mô tuyến ức.

Các miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với EGFR và chặn gắn kết của EGF với EGFR theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các khối u, bao gồm các bệnh ung thư và các khối u lành tính. Các bệnh ung thư mà chịu sự điều trị bằng các miền FN3 theo sáng chế bao gồm các bệnh ung thư mà quá biểu hiện EGFR hoặc các biến thể. Các bệnh ung thư minh họa mà chịu sự điều trị bằng các miền FN3 theo sáng chế bao gồm ung thư tế bào biểu mô, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bờ viền hậu môn, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư đầu và cổ, ung thư buồng trứng, ung thư tụy tạng, ung thư da, hoặc ung thư miệng, ung thư thực quản, ung thư âm đạo, ung thư cổ tử cung, ung thư lá lách, ung thư tinh hoàn, và ung thư biểu mô tuyến ức.

Theo một số phương pháp được mô tả ở đây, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư cụ thể là kháng hoặc đạt được sự kháng lại đối với việc điều trị bằng một hoặc nhiều chất ức chế EGFR. Chất ức chế EGFR minh họa mà bệnh ung thư có thể đạt được sự kháng

lại là kháng thể kháng EGFR cetuximab (Erbix[®]), pantinimumab (Vectibix[®]), matuzumab, nimotuzumab, các chất ức chế EGFR phân tử nhỏ Tarceva[®] (erlotinib), IRESSA (gefitinib), EKB-569 (pelitinib, không thể nghịch đảo EGFR TKI), pan-ErbB và chất ức chế thụ thể tiroxin kinaza lapatinib (chất ức chế EGFR và HER2), pelitinib (chất ức chế EGFR và HER2), vandetanib (ZD6474, ZACTIMA[™], EGFR, VEGFR2 và RET TKI), PF00299804 (dacomitinib, pan-erbB TKI không thể nghịch đảo), CI-1033 (pan-erbB TKI không thể nghịch đảo), afatinib (BIBW2992, pan-erbB TKI không thể nghịch đảo), AV-412 (chất ức chế dual EGFR và ErbB2) EXEL-7647 (chất ức chế EGFR, ErbB2, GEVGR và EphB4), CO-1686 (đột biến lựa chọn không thể nghịch đảo EGFR TKI), AZD9291 (đột biến lựa chọn không thể nghịch đảo EGFR TKI), và HKI-272 (chất ức chế neratinib, không thể nghịch đảo EGFR/ErbB2). Các phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư cụ thể là kháng hoặc đạt được sự kháng lại đối với việc điều trị bằng gefitinib, erlotinib, afatinib, CO-1686, AZD9291 và/hoặc cetuximab. Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met mà có thể được sử dụng là các miền được mô tả ở đây có các trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137, 194-211, 32-49, 111-114, 212-223, 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-178 hoặc 190-193.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với c-Met hoặc miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với EGFR cho bệnh nhân cần điều trị trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư, trong đó đối tượng kháng hoặc đã đạt được sự kháng lại đối với việc điều trị bằng erlotinib, gefitinib, afatinib, CO-1686 (CAS number: 1374640-70-6), AZD9291 hoặc cetuximab.

Các phương pháp đặc tính và/hoặc định lượng khác nhau có thể được sử dụng để xác định liệu đối tượng có kháng lại hay không, đã được pháp triển hoặc nhạy với sự kháng tăng để điều trị bằng chất ức chế EGFR. Các triệu chứng mà có thể được kết hợp bằng cách kháng đối với chất ức chế EGFR bao gồm, Ví dụ, sự

giảm hoặc cân bằng sức khỏe của bệnh nhân, tăng kích cỡ của khối u, được ngăn chặn hoặc làm chậm sự giảm tăng trưởng khối u, và/hoặc sự lan rộng của tế bào ung thư trong cơ thể từ một vị trí này đến các cơ quan khác, các mô hoặc các tế bào. Sự thiết lập lại hoặc trở nên xấu hơn của các triệu chứng khác nhau được kết hợp với bệnh ung thư cũng có thể là một dấu hiệu cho thấy đối tượng đã được pháp triển hoặc nhạy với sự kháng tăng đối với chất ức chế EGFR, như anorexia, rối loạn nhận thức, sự suy thoái, chứng khó thở, mệt mỏi, rối loạn nội tiết tố, giảm bạch cầu trung tính, đau nhức, bệnh thần kinh ngoại biên, và rối loạn chức năng tình dục. Các triệu chứng được kết hợp với bệnh ung thư có thể biến đổi theo loại bệnh ung thư. Ví dụ, các triệu chứng được kết hợp với ung thư cổ tử cung có thể bao gồm chảy máu bất thường, dịch tiết âm đạo nhiều bất thường, đau ở vùng bụng dưới mà không liên quan đến chu kỳ kinh nguyệt thông thường, đau bàng quang hoặc đau trong khi đi tiểu, và chảy máu giữa các chu kỳ kinh nguyệt thường xuyên, sau khi quan hệ tình dục, thụt rửa, hoặc khám phụ khoa. Các triệu chứng được kết hợp với bệnh ung thư phổi có thể bao gồm ho dai dẳng, ho ra máu, khó thở, đau ngực kèm theo thở khò khè, chán ăn, giảm cân mà không khó chịu và mệt mỏi. Các triệu chứng ung thư gan có thể bao gồm chán ăn và giảm cân, đau bụng, cụ thể là ở phần bên phải phía trên của bụng mà có thể lan rộng ra phía lưng và vai, buồn nôn và ói mửa, bất lực và mệt mỏi, gan to, sưng bụng (sưng cổ trướng), và vết đốm vàng trên da và lòng trắng của mắt (chứng vàng da). Một chuyên gia về u bướu học có thể sẵn sàng nhận biết các triệu chứng được kết hợp với các loại bệnh ung thư cụ thể.

Các phương thức khác để xác định liệu đối tượng đã được pháp triển sự kháng để chất ức chế EGFR hay không bao gồm việc kiểm tra sự phosphoryl hóa EGFR, sự phosphoryl hóa ERK1/2 và/hoặc sự phosphoryl hóa AKT trong các tế bào ung thư, mà sự phosphoryl hóa tăng có thể cho thấy rằng đối tượng đã được pháp triển hoặc nhạy với sự kháng tăng đối với chất ức chế EGFR. Các phương pháp xác định phosphoryl hóa EGFR, ERK1/2 và/hoặc AKT đã biết và được mô tả ở đây. Sự đồng nhất hóa đối tượng mà đã được pháp triển sự kháng đối với chất ức chế EGFR có thể bao gồm sự phát hiện các mức biểu hiện c-Met cao hoặc hoạt tính

c-Met cao, Ví dụ, phát sinh từ các mức tăng của HGF tuần hoàn, sự đột biến hoạt hóa của gen c-Met hoặc sự khuếch đại gen c-Met.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp điều trị NSCLC ở bệnh nhân có khối u NSCLC hoặc di căn khối u có sự đột biến EGFR hoạt hóa hoặc sự khuếch đại gen EGFR, bao gồm việc dùng đối với bệnh nhân với lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư phổi tế bào lớn (NSCLC), bao gồm ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tuyến, và ung thư tế bào lớn. Theo một số phương án, các tế bào của NSCLC có kiểu hình biểu mô. Theo một số phương án, NSCLC đạt được sự kháng lại đối với việc điều trị bằng một hoặc nhiều chất ức chế EGFR.

Trong NSCLC, các đột biến đặc hiệu trong gen EGFR được kết hợp với các tỷ lệ đáp ứng cao (nằm trong khoảng từ 70 đến 80%) so với các chất ức chế tiroxin kinaza EGFR (EGFR-TKIs). Sự mất 5 axit amin trong exon 19 hoặc đột biến điểm L858R trong EGFR được kết hợp với độ nhạy EGFR-TKI (Nakata và Gotoh, Expert Opin Ther Targets 16 :771-781, 2012). Các đột biến này dẫn đến sự hoạt hóa độc lập với phối tử của hoạt tính kinaza EGFR. Các đột biến EGFR hoạt hóa xuất hiện nằm trong khoảng từ 10 đến 30% của các bệnh nhân NSCLC và phổ biến đáng kể hơn ở Châu Á, phụ nữ, người không hút thuốc, và các bệnh nhân mắc ung thư biểu mô tuyến tuyến mô học (Janne ADN Johnson Clin Cancer Res 12(14 Suppl): 4416s-4420s, 2006). Sự khuếch đại gen EGFR cũng tương quan mạnh với sự đáp ứng sau khi điều trị EGFR-TKI (Cappuzzo và các đồng tác giả, J Natl Cancer Inst 97:643-55, 2005).

Mặc dù phần lớn các bệnh nhân NSCLC mắc các đột biến EGFR đáp ứng ban đầu đối với liệu pháp điều trị EGFR TKI, hầu như tất cả đạt được sự kháng lại mà ngăn chặn sự đáp ứng bền. Nằm trong khoảng từ 50 đến 60% bệnh nhân đạt được sự kháng lại do đột biến điểm phụ thứ hai trong vùng kinaza của EGFR

(T790M). Gần 60% trong số toàn bộ khối u mà trở nên kháng với các chất ức chế tiroxin kinaza EGFR tăng biểu hiện c-Met, khuếch đại gen c-Met, hoặc tăng phối tử đã biết duy nhất của nó, HGF (Turke và các đồng tác giả, Cancer Cell, 17:77-88, 2010).

Các phương án khác theo sáng chế là phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế cho bệnh nhân cần điều trị trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư này được kết hợp với đột biến hoạt hóa EGFR, sự khuếch đại gen EGFR, đột biến hoạt hóa c-Met hoặc sự khuếch đại gen c-Met.

Theo một số phương án đột biến hoạt hóa EGFR là G719A, G719X (X là axit amin bất kỳ), L861X (X là axit amin bất kỳ), sự thế L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P hoặc T790M, sự mất E746-A750, sự mất R748-P753, sự chèn Ala (A) giữa M766 và A767, sự chèn của Ser, Val và Ala (SVA) giữa S768 và V769, và sự chèn của Asn và Ser (NS) giữa P772 và H773.

Các phương án khác theo sáng chế là phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế cho bệnh nhân cần điều trị trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư này được kết hợp với L858R đột biến EGFR, T790M hoặc sự mất các gốc E746-A750 (del(E746, A750)), sự khuếch đại EGFR hoặc sự khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với kiểu đại EGFR và kiểu đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với kiểu đại EGFR và sự k c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với các đột biến EGFR L858R và T790M và kiểu đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với sự mất EGFR del (E764, A750) và kiểu đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với sự mất EGFR del(E764, A750) và sự khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với sự mất EGFR del(E764, A750), sự khuếch đại EGFR và sự khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân mắc NSCLC được kết hợp với các đột biến EGFR L858R và T790M và kiểu đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân mắc NSCLC được kết hợp với sự khuếch đại EGFR và kiểu đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân mắc NSCLC được kết hợp với sự khuếch đại EGFR và sự khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân mắc NSCLC được kết hợp với sự mất EGFR del(E764, A750) và kiểu đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân mắc NSCLC được kết hợp với sự mất EGFR del(E764, A750) và sự khuếch đại c-Met. Sự khuếch đại EGFR hoặc c-Met có thể được đánh giá bằng các phương pháp tiêu chuẩn, Ví dụ bằng cách xác định số sao chép của gen EGFR hoặc c-Met bằng phương pháp lai southern blot, FISH, hoặc lai ghép gen so sánh(comparative genomic hybridization - CGH)

Các thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” nhằm để chỉ cả liệu pháp điều trị việc điều trị và các biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, trong đó đối tượng để ngăn chặn hoặc làm chậm (giảm) sự thay đổi hoặc rối loạn sinh lý không mong muốn, như sự phát triển hoặc lây lan bệnh. Đối với mục đích của sáng chế này, các kết quả lâm sàng được mong muốn hoặc hữu ích bao gồm, nhưng không giới hạn đến sự giảm các triệu chứng, sự giảm kéo dài bệnh, trạng thái ổn định của bệnh (tức là, không trở nên xấu hơn), sự trì hoãn hoặc làm chậm tiến triển của bệnh, sự cải thiện hoặc sự làm dịu tình trạng bệnh, và sự thuyên giảm (một phần hoặc toàn bộ) có thể phát hiện hoặc không phát hiện. “Việc điều trị” cũng có thể có nghĩa là kéo

dài sự sống sót so với sự sống sót mong muốn nếu không tiếp nhận việc điều trị. Các bệnh nhân có nhu cầu điều trị bao gồm các bệnh nhân đã mắc tình trạng hoặc rối loạn cũng như các bệnh nhân dễ mắc tình trạng hoặc rối loạn hoặc các bệnh nhân mà trong đó tình trạng hoặc rối loạn được ngăn chặn.

“Lượng có hiệu quả điều trị” nhằm để chỉ lượng có hiệu quả, ở các liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả liệu pháp điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể biến đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và cân nặng của cá nhân, và khả năng của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế để tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá nhân. Các chất chỉ báo minh họa của liệu pháp điều trị EGFR/c-Met có hiệu quả mà có thể giảm hoặc làm dịu kết hợp với sự kháng bao gồm, Ví dụ, cải thiện sức khỏe của bệnh nhân, giảm hoặc co kích cỡ của khối u, được ngăn chặn hoặc kìm hãm sự tăng trưởng của khối u, và/hoặc không có sự di căn của tế bào ung thư so với các vị trí khác trong cơ thể.

Việc dùng/dược phẩm

Sáng chế đề cập đến các dược phẩm miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế và chất mang dược dụng. Để sử dụng liệu pháp điều trị, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được bào chế làm dược phẩm chứa lượng có hiệu quả của miền hoặc phân tử làm thành phần hoạt tính trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang" nhằm để chỉ chất pha loãng, chất phụ gia, tá dược, hoặc tá dược lỏng với thành phần hoạt tính được dùng. Các tá dược lỏng này có thể là chất lỏng, như nước và dầu, bao gồm các tá dược lỏng của dầu mỡ, động vật, rau hoặc gốc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu đậu tương, dầu vừng và các loại dầu tương tự. Ví dụ, 0,4% salin và 0,3% glyxin có thể được sử dụng. Các dung dịch này vô khuẩn và thường không có chất dạng hạt. Chúng có thể được khử trùng bằng các kỹ thuật khử trùng thông thường đã biết (Ví dụ, lọc). Các thành phần có

thể chứa các chất bổ trợ được dụng như được yêu cầu để ước lượng các điều kiện sinh lý học như các chất điều chỉnh độ PH hoặc các chất đệm, chất làm ổn định, chất cô đặc, chất bôi trơn và chất tạo màu, v.v.. Nồng độ của các phân tử theo sáng chế trong dược phẩm này có thể biến đổi khác nhau, tức là, nhỏ hơn khoảng 0,5%, thường nằm trong khoảng từ 1% đến 15 hoặc 20% theo trọng lượng và sẽ được chọn chủ yếu dựa trên liều được yêu cầu, thể tích chất lỏng, độ nhớt, v.v., theo cách dùng cụ thể được chọn. Các tá dược lỏng và các chế phẩm thích hợp, bao gồm các protein khác nhau ở người, Ví dụ, albumin huyết thanh ở người được mô tả, Ví dụ, trong Ví dụ Remington: The Science và Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams và Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, See especially pp. 958-989.

Cách dùng đối với việc sử dụng liệu pháp điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể là lộ trình thích hợp bất kỳ mà đưa chất vào vật chủ dùng qua đường ngoài ruột, Ví dụ, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch hoặc dưới da, trong phổi; qua niêm mạc (dùng qua đường miệng, trong mũi, trong âm đạo, trong thực tràng), bằng cách sử dụng chế phẩm ở dạng viên nén, viên nang, dung dịch, bột, gel, hạt; và được chứa trong ống tiêm, thiết bị cấy, bơm thẩm thấu, hộp, vi bơm; hoặc các phương thức khác được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Việc dùng đặc hiệu vị trí có thể đạt được bằng Ví dụ trong khớp, cuống phổi, trong bụng, trong vỏ, trong sụn, trong khoang, trong khoang cơ thể, trong tiểu não, trong tâm thất não, trong kết tràng, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong tim, trong xương, xương chậu, trong màng ngoài tim, trong bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong thực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong cột sống, trong bao hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong mạch, trong bàng quang, trong thương tổn, âm đạo, trong thực tràng, miệng, dưới lưỡi, trong mũi, hoặc cấp qua da.

Do đó, dược phẩm theo sáng chế dùng để tiêm trong cơ có thể được bào chế chứa nước đệm vô khuẩn 1 ml, và nằm trong khoảng từ 1 ng đến 100 mg, Ví dụ

nằm trong khoảng từ 50 ng đến 30 mg hoặc tốt hơn là, nằm trong khoảng từ 5 mg đến 25 mg của miền FN3 theo sáng chế.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân theo lộ trình thích hợp bất kỳ, Ví dụ dùng ngoài đường tiêu hóa bằng cách tiêm trong tĩnh mạch (IV) hoặc tiêm bolus, dùng trong cơ hoặc dùng dưới da hoặc dùng trong bụng. Sự tiêm IV có thể được đưa ra ít nhất là 15 phút, nhưng thường xuyên hơn là trong khoảng 30 phút, 60 phút, 90 phút hoặc thậm chí là 2 hoặc 3 giờ. Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế cũng có thể được tiêm trực tiếp vào vị trí mắc bệnh (Ví dụ, chính khối u). Liều được đưa ra cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư để làm thuyên giảm hoặc ít nhất là ngăn chặn một phần bệnh được điều trị (“lượng có hiệu quả điều trị”) và có thể đôi khi nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/kg theo thể trọng, Ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 mg/kg, nhưng có thể thậm chí cao hơn, Ví dụ 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 mg/kg. Liều đơn vị được cố định cũng có thể được xác định, Ví dụ, 50, 100, 200, 500 hoặc 1000 mg, hoặc liều có thể dựa trên diện tích bề mặt của bệnh nhân, Ví dụ, 400, 300, 250, 200, hoặc 100 mg/m². Thường nằm trong khoảng từ 1 đến 8 liều, (Ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8) có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư, nhưng 10, 12, 20 liều hoặc nhiều hơn có thể được đưa ra. Việc dùng miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được lặp lại sau khi một ngày, hai ngày, ba ngày, bốn ngày, năm ngày, sáu ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần, một tháng, năm tuần, sáu tuần, bảy tuần, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng hoặc lâu hơn. Quá trình được lặp lại việc điều trị cũng có thể là việc dùng thường xuyên. Việc dùng được lặp lại có thể với liều tương tự hoặc với liều khác.

Ví dụ, dược phẩm của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế dùng để truyền qua đường tĩnh mạch có thể có thể được thực hiện để chứa khoảng 200 ml dung dịch Ringer vô khuẩn, và nằm trong khoảng từ 8 mg đến 2400 mg, nằm

trong khoảng từ 400 mg đến 1600 mg, hoặc nằm trong khoảng từ 400 mg đến 800 mg kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép dùng để dùng cho bệnh nhân 80 kg. Các phương pháp điều chế các chế phẩm dùng qua đường ngoài đường tiêu hóa đã biết và được mô tả trong cụ thể hơn trong, Ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được đông khô dùng để bảo quản và được tái tạo trong chất mang thích hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã được Thể hiện để có hiệu quả bằng các kỹ thuật tạo ra protein thông thường và làm khô lạnh đã biết và tái tạo có thể được dùng.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng ở liều đơn hoặc việc dùng này có thể được lặp lại, Ví dụ sau khi một ngày, hai ngày, ba ngày, năm ngày, sáu ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần, một tháng, năm tuần, sáu tuần, bảy tuần, hai tháng hoặc ba tháng. Việc dùng được lặp lại có thể ở liều tương tự hoặc liều khác. Việc dùng có thể được lặp lại một, hai, ba lần, bốn lần, năm lần, sáu lần, bảy lần, tám lần, chín lần, mười lần, hoặc nhiều hơn.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế có thể được dùng tổ hợp với chất điều trị thứ hai một cách đồng thời, tuần tự hoặc riêng rẽ. Chất điều trị thứ hai có thể là chất hóa trị liệu, chất chống sản sinh mạch máu, hoặc chất gây độc tế bào. Khi được sử dụng dùng để điều trị bệnh ung thư, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met có thể được sử dụng tổ hợp với liệu pháp điều trị bệnh ung thư thông thường, như phẫu thuật, phép trị liệu bằng tia X, hóa trị liệu hoặc sự tổ hợp của chúng. Các chất minh họa mà có thể được sử dụng tổ hợp với các miền FN3 theo sáng chế là các cơ đối vận của HER2, HER3, HER4, VEGF, và các chất ức chế protein tiroxin kinaza như Iressa® (gefitinib) và Tarceva (erlotinib).

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met có thể được dùng cùng với một hoặc nhiều được chất hóa trị liệu bất kỳ hoặc các liệu pháp điều trị kháng bệnh ung thư khác đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các chất hóa trị liệu là các hợp chất hóa học hữu dụng trong việc điều trị bệnh ung thư và bao gồm các chất ức chế tăng trưởng hoặc các chất gây độc tế bào khác và bao gồm chất alkyl hóa, chất kháng trao đổi chất, chất ức chế kháng vi ống, chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế thụ thể tiroxin kinaza, chất ức chế sản sinh mạch và các chất tương tự. Các ví dụ về các chất hóa trị liệu bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamid (CYTOXAN®); alkyl sunfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và các metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenemelamin, trietylenephosphoramit, trietylenethiophosphaoramit và trimetylolomelamin; các mù tạc nitơ như chlorambucil, chlornaphazin, cholophosphamid, estramustin, ifosfamit, mechlorethamin, mechlorethamin oxit hydrochlorit, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamit, uracil mustard; các nitrosure như carmustin, chlorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các thuốc kháng sinh như aclacinomysin, actinomycin, anthramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, calicheamixin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin, epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomycin, mitomycin, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất kháng trao đổi chất như methotrexat và 5-FU; các chất tương tự của axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; và các rogen như calusteron, dromostanolon propionat, epitioestan, mepitioestan, testolacton; các chất kháng thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan;

chất độn axit folic như axit frolinic; aceglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabucil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziqun; elfornithin; elliptinium axetat; etoglucid; gallium nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK®; razoxan; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziqun; 2,2',2"-trichlorotrietylamin; uretan; vindesin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; các thành phần của dãy taxoid hoặc taxan, như paclitaxel (TAXOL®) docetaxel (TAXOTERE®) và các chất tương tự của chúng; chlorambucil; gemcitabin; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các chất tương tự platin như xisplatin và carboplatin; vinblastin; platin; etoposit (VP-16); ifosfamid; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposit; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza hoặc RFS 2000; difluorometylornithin (DMFO); axit retinoic; esperamixin; capecitabin; các chất ức chế của thụ thể tiroxin kinaza và/hoặc các chất sản sinh mạch, bao gồm sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®), pazopanib (VOTRIENT™), toceranib (PALLADIA™), vandetanib (ZACTIMA™), cediranib (RECENTIN®), regorafenib (BAY 73-4506), axitinib (AG013736), lestaurtinib (CEP-701), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA™), BIBW 2992 (TOVOK™), lapatinib (TYKERB®), neratinib (HKI-272), và các chất tương tự, và các muối được dùng, các axit hoặc các chất dẫn xuất bất kỳ nêu trên. Ngoài ra được bao gồm trong sự xác định này là chất kháng hormon mà hoạt động để điều hòa hoặc ức chế hoạt tính hormon trên các khối u như chống estrogen bao gồm Ví dụ tamoxifen, raloxifen, 4(5)-imidazol ức chế aromataza, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY 117018, onapriston, và toremifen (FARESTON®); và các chất chống androgen như flutamid, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; và các muối được dùng, các axit hoặc các chất dẫn xuất bất kỳ nêu trên. Các hợp chất hóa học gây độc tế bào thông thường khác như các chất được Thể hiện trong Wiemann và các đồng tác giả, 1985, in *Medical*

Oncology (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, cũng có thể áp dụng được đối với các biện pháp theo sáng chế.

Các chất minh họa mà có thể được sử dụng tổ hợp với miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met bao gồm các chất ức chế tiroxin kinaza và liệu pháp điều trị chống ung thư đích như Iressa® (gefitinib) và

Tarceva (erlotinib) và các cơ đối vận khác của HER2, HER3, HER4 hoặc VEGF. Các cơ đối vận HER2 minh họa bao gồm CP-724-714, HERCEPTIN™ (trastuzumab), OMNITARG™ (pertuzumab), TAK-165, lapatinib (chất ức chế EGFR và HER2), và GW-282974,. Các cơ đối vận HER3 minh họa bao gồm các kháng anti-Her3 (xem Ví dụ, công bố bằng Mỹ số US2004/0197332). Các cơ đối vận HER4 minh họa bao gồm anti-HER4 siRNAs (xem Ví dụ, Maatta và các đồng tác giả, *Mol Biol Cell* 17: 67-79, 2006,. Cơ đối kháng VEGF minh họa là Bevacizumab (Avastin™).

Khi phân tử nhỏ được sử dụng tổ hợp với miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế, thông thường được dùng thường xuyên hơn, tốt hơn là một lần một ngày, nhưng 2, 3, 4 hoặc nhiều lần trên mỗi ngày là cũng có thể, như hai ngày một lần, hàng tuần hoặc ở một số khoảng thời gian khác. Các dược chất phân tử nhỏ thường được dùng qua đường miệng nhưng việc dùng ngoài đường tiêu hóa là cũng có thể, Ví dụ, bằng cách tiêm IV hoặc tiêm bolus hoặc dùng dưới da hoặc dùng trong cơ. Các liều của các dược chất phân tử nhỏ có thể thông thường nằm trong khoảng từ 10 đến 1000 mg, hoặc khoảng 100, 150, 200 hoặc 250 mg.

Khi miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa các phân tử, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế được dùng tổ hợp với chất điều trị thứ hai, sự tổ hợp có thể xảy ra trên khung thời gian thuận tiện bất kỳ. Ví dụ, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế và chất điều trị thứ hai có thể được dùng cho bệnh nhân trong cùng một ngày, và thậm chí cùng truyền qua đường

tĩnh mạch. Tuy nhiên, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế và chất điều trị thứ hai cũng có thể được dùng vào các ngày khác hoặc các tuần khác, hai tuần hoặc hàng tháng, và v.v.. Theo một số phương pháp, miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế và chất điều trị thứ hai được dùng gần đủ trong thời gian mà chúng có mặt đồng thời (Ví dụ, trong huyết thanh) tại các mức có thể phát hiện ở bệnh nhân được điều trị. Theo một số phương pháp, toàn bộ quá trình điều trị của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế bao gồm số liều trong khoảng thời gian trước hoặc sau quá trình điều trị chất điều trị thứ hai cũng bao gồm số liều. Theo một số phương pháp, việc điều trị bằng miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế bắt đầu được dùng lần thứ hai nếu bệnh nhân kháng lại hoặc phát triển kháng đối với chất điều trị thứ hai được dùng ban đầu. Bệnh nhân có thể nhận duy nhất một quá trình hoặc nhiều quá trình điều trị bằng một hoặc cả hai miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế và chất điều trị thứ hai. Khoảng thời gian hồi phục là 1, 2 hoặc một vài ngày hoặc hàng tuần có thể được sử dụng giữa việc dùng của miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế và chất điều trị thứ hai. Khi chế độ điều trị thích hợp đã được thiết lập cho chất điều trị thứ hai, mà vùng này có thể được sử dụng tổ hợp với miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế. Ví dụ, Tarceva® (erlotinib) được uống viên 100 mg hoặc viên 150 mg một lần một ngày, và Iressa® (gefitinib) được uống viên 250 mg hàng ngày.

Miền EGFR/c-Met FN3 đặc hiệu kép chứa phân tử, miền FN3 gắn kết EGFR hoặc miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế, tùy ý tổ hợp với chất điều trị thứ hai có thể được dùng cùng với dạng bất kỳ của xạ trị bao gồm bức xạ bằng tia bên ngoài, trị xạ ung thư chuẩn hóa (intensity modulated radiation therapy - IMRT)

và dạng bất kỳ của xạ phẫu bao gồm bức xạ Gamma Knife, Cyberknife, Linac, và interstitial (Ví dụ cấy các hạt có hoạt tính phóng xạ, bình cầu GliaSite), và/hoặc bằng phẫu thuật. Sự tổ hợp với xạ trị có thể đặc biệt thích hợp đối với bệnh ung thư đầu và cổ và các khối u não.

Trong khi sáng chế được mô tả các thuật ngữ chung, các phương án theo sáng chế còn được bộc lộ trong Các ví dụ sau mà không nên hiểu là giới hạn trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Cấu trúc của các thư viện Tencon

Tencon (SEQ ID NO: 1) là khung sinh học giống với globulin miễn dịch, miền fibronectin loại III (FN3), được thiết kế từ trình tự liên ứng của mười lăm miền FN3 từ tenascin-C ở người (Jacobs và các đồng tác giả, Protein Engineering, Design, và Selection, 25:107-117, 2012; công bố bằng Mỹ số 2010/0216708). Cấu trúc tinh thể của Tencon Thể hiện sáu vòng tiếp xúc với bề mặt mà nối với bảy sợi beta. Các vòng này, hoặc các gốc được chọn ở mỗi vòng, có thể được ngẫu nhiên hóa để các thư viện cấu trúc của các miền fibronectin loại III (FN3) mà có thể được sử dụng để chọn các phân tử mới mà liên kết với các đích đặc hiệu.

Tencon:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSEFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEY
TVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID SỐ 1):

Cấu trúc của thư viện TCL1

Thư viện được thiết kế để ngẫu nhiên hóa chỉ vòng FG của Tencon (SEQ ID NO: 1), TCL1, được tạo cấu trúc để sử dụng với hệ thống biểu hiện cis (Jacobs và các đồng tác giả, Protein Engineering, Design, và Selection, 25:107-117, 2012). Trong hệ thống này, các trình tự kết hợp ADN dạng sợi đơn được tạo ra cho các chất hoạt hóa, trình tự mã hóa thư viện Tencon, trình tự mã hóa RepA, thành phần cis, và thành phần ori. Khi biểu hiện trong hệ thống phiên mã/dịch mã *in vitro*, phức hợp được tạo ra từ protein dung hợp Tencon-RepA giới hạn từ *cis* đến ADN từ đó phức hợp này được mã hóa. Các phức mà liên kết với phân tử đích sau đó

được phân lập và được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction -PCR), như được mô tả sau đây.

Cấu trúc của thư viện TCL1 để sử dụng với Thẻ hiện *cis* đạt được bằng chu kỳ liên tục của PCR để tạo ra các phân tử ADN dạng sợi kép mạch thẳng cuối cùng ở hai nửa; đoạn 5' chứa vùng khởi đầu và trình tự Tencons, trong khi đoạn 3' chứa gen *repA* và các thành phần cis- và ori. Hai nửa này được kết hợp bằng cách phân cắt giới hạn để sản sinh toàn bộ cấu trúc. Thư viện TCL1 được thiết kế để kết hợp các axit amin ngẫu nhiên chỉ trong vòng FG của Tencon, KGGHRSN (SEQ ID NO: 86). các codon NNS được sử dụng trong cấu trúc của thư viện này, dẫn đến sự kết hợp có thể của tất cả 20 axit amin và một codon kết thúc thành vòng FG. Thư viện TCL1 chứa sáu thư viện con riêng rẽ, mỗi thư viện con này có chiều dài vòng FG được ngẫu nhiên khác nhau, nằm trong khoảng từ 7 đến 12 gốc, để tăng lên sự đa dạng hơn. Thiết kế của các thư viện dựa trên tencon được Thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2.

Thư viện	Thiết kế vòng BC	Thiết kế vòng FG
Tencon WT	TAPDAAFD*	KGGHRSN**
TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXXXX
TCL2	#####	#####S##

*TAPDAAFD: các gốc nằm trong khoảng từ 22 đến 28 của SEQ ID NO: 1;

**KGGHRSN: SEQ ID NO: 86

X nhằm để chỉ axit amin thoái hóa được mã hóa bởi các codon NNS.

nhằm để chỉ “sự phân bố được thiết kế của axit amin” được mô tả trong ngữ cảnh.

Để cấu trúc thư viện TCL1, chu kỳ liên tục của PCR được thực hiện để gắn vào vùng khởi đầu Tac, cấu thành sự thoái hóa vào vòng FG, và bổ sung các vị trí giới hạn cần thiết để tổ hợp cuối cùng. Đầu tiên, trình tự ADN chứa vùng khởi đầu trình tự và trình tự Tencon 5' của vòng FG được tạo ra bởi PCR theo hai bước. ADN tương ứng với trình tự gen Tencon đầy đủ được sử dụng làm khuôn PCR bằng các đoạn mồi POP2220 (SEQID NO: 2) và TC5'toFG (SEQID NO: 3). Sản phẩm PCR thu được từ phản ứng này được sử dụng làm khuôn cho chu kỳ tiếp theo của khuếch đại PCR với các đoạn mồi 130mer (SEQID NO: 4) và Tc5'toFG để hoàn thiện việc gắn của các trình tự 5' và các trình tự vùng khởi đầu với Tencon. Tiếp theo, tính đa dạng được đưa vào vòng FG bằng cách khuếch đại sản phẩm ADN được tạo ra ở bước thứ nhất bằng mồi xuôi POP2222 (SEQID NO: 5), và các đoạn mồi nghịch đảo TCF7 (SEQID NO: 6), TCF8 (SEQID NO: 7), TCF9 (SEQID NO: 8), TCF10 (SEQID NO: 9), TCF11 (SEQID N NO: 10), hoặc TCF12 (SEQID NO: 11), mà chứa nucleotit thoái hóa. Ít nhất là tám phản ứng PCR 100 μ L được thực hiện cho mỗi thư viện con để tối thiểu hóa các chu kỳ PCR và tối đa hóa tính đa dạng của thư viện. Ít nhất là 5 μ g của sản phẩm PCR này được tinh sạch geo và được sử dụng ở bước PCR tiếp theo với các đoạn mồi POP2222 (SEQ ID NO: 5) và POP2234 (SEQID NO: 12), dẫn đến sự gắn của vị trí giới hạn 6xHis tag và NotI với đầu 3' của trình tự Tencon. Phản ứng PCR này được tiến hành bằng cách sử dụng chỉ mười lăm chu kỳ PCR và ít nhất là 500 ng của khuôn DNA. Sản phẩm PCR thu được được tinh sạch geo, được phân cắt bằng enzym giới hạn NotI, và được tinh sạch bằng cột Qiagen.

Đoạn 3' của thư viện là trình tự ADN không đổi chứa các thành phần để Thể hiện, bao gồm vị trí giới hạn PspOMI, vùng mã hóa gen *repA*, và the cis- và thành phần oris. Các phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmid (pCR4Blunt) (Invitrogen) chứa đoạn ADN này với các đoạn mồi xuôi M13 và các đoạn mồi ngược M13. Các sản phẩm PCR thu được được phân cắt bằng PspOMI qua đêm và được tinh sạch geo. Để nối phần 5' của thư viện ADN với ADN 3'

chứa gen *repA*, 2 pmol của 5' ADN được nối với lượng mol tương đương của 3' *repA* ADN với có mặt của NotI và PspOMI enzym và T4 ligaza. Sau khi nối qua đêm ở 37°C, phần nhỏ của ADN được nối được chạy trên gel để kiểm tra hiệu quả nối. Sản phẩm thư viện được nối được chia thành mười hai phản ứng khuếch đại PCR và phản ứng PCR 12 chu kỳ được chạy bằng cặp đoạn mồi POP2250 (SEQID NO: 13) và DidLigRev (SEQID NO: 14). Lượng ADN đối với mỗi thư viện con của thư viện TCL1 nằm trong khoảng từ 32 đến 34 μ g.

Để đánh giá chất lượng của thư viện, phần nhỏ của thư viện hoạt động được khuếch đại bằng các đoạn mồi Tcon5new2 (SEQID NO: 15) và Tcon6 (SEQID NO: 16), và được nhân dòng trong vector pET được biến đổi thông qua thông qua tách dòng phụ thuộc vào ligaza. ADN plasmit được biến nạp thành các tế bào thành phần BL21-GOLD (DE3) (Stratagen) và 96 cụm khuẩn được chọn ngẫu nhiên được tạo dãy bằng cách sử dụng đoạn mồi của vùng khởi đầu T7. Không có các trình tự lặp lại được phát hiện. Toàn bộ, nằm trong khoảng từ 70 đến 85% dòng có vùng khởi đầu hoàn thiện và trình tự mã hóa Tencon mà không có đột biến xê dịch khung. Tỷ lệ trình tự chức năng, mà loại trừ dòng với các codon kết thúc nằm trong khoảng từ 59% đến 80%.

Cấu trúc của thư viện TCL2

Thư viện TCL2 được tạo cấu trúc mà trong đó cả vòng BC và vòng FG của Tencon được ngẫu nhiên và sự phân bố của axit amin tại mỗi vị trí được kiểm soát chặt chẽ. Bảng 3 Thể hiện sự phân bố axit amin tại các vị trí vòng mong muốn trong thư viện TCL2. Sự phân bố axit amin được thiết kế có hai đích. Đầu tiên, thư viện được dịch chuyển đến các gốc mà được dự đoán là quan trọng về cấu trúc đối với việc gấp Tencon và độ ổn định dựa trên sự phân tích của cấu trúc tinh thể Tencon và/hoặc từ mô hình tương đồng. Ví dụ, vị trí 29 được cố định chỉ với tập hợp con của axit amin kỵ nước, như gốc này được đặt trong lõi kỵ nước của gấp Tencon. Lớp thiết kế thứ hai bao gồm sự dịch chuyển phân bố axit amin đến that của các gốc được phát hiện ưu tiên trong chuỗi nặng HCDR3 của các kháng thể, để tạo ra hiệu quả các gắn kết có ái lực cao (Birtalan và các đồng tác giả, J Mol Biol 377:1518-28, 2008; Olson và các đồng tác giả, Protein Sci 16:476-84, 2007). Đối

với mục tiêu này, “sự phân bố được thiết kế ” của bảng 3 nhằm để chỉ sự phân bố như sau: 6% alanin, 6% arginin, 3,9% asparagin, 7,5% axit aspartic, 2,5% glutamic acid, 1,5% glutamin, 15% glyxin, 2,3% histidin, 2,5% isoleuxin, 5% leuxin, 1,5% lysin, 2,5% phenylalanin, 4% prolin, 10% serin, 4,5% threonin, 4% tryptophan, 17,3% tiroxin, và 4% valin. Sự phân bố này không có methionin, xystein, và các codon kết thúc.

Bảng 3.

Vị trí gốc*	Các gốc WT	Sự phân bố trong thư viện TCL2
22	T	sự phân bố được thiết kế
23	A	sự phân bố được thiết kế
24	P	50% P + sự phân bố được thiết kế
25	D	sự phân bố được thiết kế
26	A	20% A + 20% G + sự phân bố được thiết kế
27	A	sự phân bố được thiết kế
28	F	20% F, 20% I, 20% L, 20% V, 20% Y
29	D	33% D, 33% E, 33% T
75	K	sự phân bố được thiết kế
76	G	sự phân bố được thiết kế
77	G	sự phân bố được thiết kế
78	H	sự phân bố được thiết kế
79	R	sự phân bố được thiết kế
80	S	100% S
81	N	sự phân bố được thiết kế
82	P	50% P + sự phân bố được thiết kế

*số gốc là dựa trên trình tự Tencon của SEQ ID NO: 1

Đoạn 5' của thư viện TCL2 được chứa vùng khởi đầu và vùng mã hóa của Tencon (SEQ ID NO: 1), mà được tổng hợp hóa học làm bể thư viện (Sloning Biotechnology). Bể này của ADN được chứa ít nhất là 1×10^{11} thành phần khác

nhau. Tại đầu của đoạn, vị trí giới hạn BsaI được bao gồm trong thiết kế để nối với *RepA*.

Đoạn 3' của thư viện là trình tự ADN không đổi chứa các thành phần để Thể hiện bao gồm 6xHis tag, vùng mã hóa của gen *repA*, và thành phần cis. ADN được sản sinh bằng phản ứng PCR bằng cách sử dụng khuôn ADN có sẵn (nêu trên), và các đoạn mồi LS1008 (SEQID NO: 17) và DidLigRev (SEQID NO: 14). Để tổ hợp thư viện hoàn thiện TCL2, tổng lượng là 1 µg thư viện ADN Tencon 5' được phân cắt BsaI được nối với 3,5 µg của đoạn 3' mà được sản sinh bằng cách thủy phân giới hạn bằng enzym tương tự. Sau khi nối qua đêm ADN được tinh sạch bằng cột Qiagen và ADN được định lượng bằng cách đo khả năng hút ở 260 nm. Sản phẩm thư viện được nối được khuếch đại bằng phản ứng PCR 12 chu kỳ bằng cặp đoạn mồi POP2250 (SEQID NO: 13) và DidLigRev (SEQID NO: 14). Tổng lượng là 72 phản ứng được thực hiện, mỗi phản ứng chứa 50 ng sản phẩm ADN được nối làm khuôn. Tổng lượng của TCL2 working thư viện ADN khoảng 100 µg. Phần nhỏ của thư viện hoạt động là được nhân dòng con và được tạo dãy, như được mô tả trên đây cho thư viện TCL1. Không có các trình tự lặp lại được phát hiện. Khoảng 80% trình tự được chứa vùng khởi đầu hoàn toàn và các trình tự mã hóa Tencon không có các đột biến xê dịch khung.

Cấu trúc của thư viện TCL14

Các vòng trên (BC, DE, và FG) và các vùng dưới (AB, CD, và EF), Ví dụ, các bề mặt gắn kết được thông báo trong các miền FN3 được tách bởi sợi beta mà tạo ra tâm của cấu trúc FN3. Các bề mặt thay đổi lưu trú về hai “phía” của các miền FN3 có các hình dạng khác so với các bề mặt được tạo ra bởi các vòng chỉ được tạo ra về một phía của miền FN3 bằng hai sợi đối beta song song, sợi beta C và sợi beta F, và vòng CD và vòng FG, và ở đây được gọi là bề mặt C-CD-F-FG.

Thư viện ngẫu nhiên bề mặt thay đổi của Tencon được tạo ra bởi bề mặt chọn ngẫu nhiên tiếp xúc với các gốc của các sợi C và F, cũng như các phần của vòng CD và vòng FG như được Thể hiện trong Fig. 1. Biến thể Tencon, Tencon27 (SEQ ID NO: 99) có sự thể sau khi so với Tencon (SEQ ID NO: 1) được sử dụng

để tạo ra thư viện; E11R L17A, N46V, E86I. Sự mô tả đầy đủ về các phương pháp được sử dụng để cấu thành thư viện này được mô tả trong Công bố bằng Mỹ số US2013/0226834.

Ví dụ 2: Lựa chọn các miền fibronectin loại III (FN3) mà gắn kết EGFR và ức chế gắn kết EGF

Sàng lọc thư viện

Thế hiện *cis* được sử dụng để chọn các miền gắn kết EGFR từ các thư viện TCL1 và TCL2. Miền ngoại bào tái tổ hợp ở người của EGFR được nối với IgG1 Fc (các hệ thống R&D) được biotin hóa bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn và được sử dụng để quét (các gốc 25-645 có chiều dài EGFR đầy đủ của SEQ ID NO: 73). Đối với phiên mã và dịch mã *in vitro* (ITT), 2-6 μ g thư viện ADN được ủ với axit amin hoàn thiện 0,1 mM, các thành phần trộn sẵn 1X S30, và 30 μ L phần chiết S30 (Promega) trong lượng tổng là 100 μ L và được ủ tại 30°C. Sau khi 1 giờ, 450 μ L dung dịch chặn (PBS pH 7,4, được bổ sung với 2% albumin huyết thanh của bò, 100 μ g/mL tinh trùng DNA của cá trích, và 1 mg/mL heparin) được bổ sung và phản ứng được ủ trên đá trong khoảng 15 phút. Các phức EGFR-Fc:EGF được tổ hợp ở các tỷ lệ mol là 1:1 và 10:1 EGFR so với EGF bằng cách trộn EGF tái tổ hợp ở người (các hệ thống R&D) với EGFR-Fc tái tổ hợp được biotin hóa trong dung dịch chặn trong khoảng 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng. Để liên kết, trộn 500 μ L phản ứng ITT được chặn với 100 μ L của các phức EGFR-Fc:EGF và được ủ trong khoảng 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng, mà các phức liên kết được lấy ra bằng các hạt thủy tinh neutravidin hoặc streptavidin từ tính (Seradyn). Thành phần thư viện không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa liên tục bằng PBST và PBS. Sau khi rửa, ADN được rửa giải từ các phức liên kết bằng cách gia nhiệt đến 65°C trong khoảng 10 phút, được khuếch đại bằng PCR, và được gắn với RepA mã hóa đoạn ADN bằng cách thủy phân giới hạn và nối trong khoảng chu kỳ quét tiếp theo. Các gắn kết có ái lực cao được phân lập bằng cách giảm liên tục nồng độ của EGFR-Fc đích trong khi mỗi chu kỳ nằm trong khoảng từ 200 nM đến 50 nM và làm tăng tính rửa kỹ. Trong chu kỳ 4 và 5, các miền FN3 không liên

kết và liên kết yếu được loại bỏ bằng cách rửa với có mặt của EGFR-Fc không được biotin hóa dư gấp 10 lần theo nồng độ mol trong PBS qua đêm.

Tiếp theo quét, các miền FN3 được chọn được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng oligos Tcon5new2 (SEQID NO: 15) và Tcon6 (SEQID NO: 16), được tái tạo dòng thành vector pET được biến đổi để bao gồm vị trí tách dòng phụ thuộc vào ligaza, và được biến nạp thành các tế bào BL21-GOLD (DE3) (Stratagen) để biểu hiện có thể hòa tan trong *E. coli* bằng cách sử dụng công nghệ sinh học phân tử tiêu chuẩn. Bổ sung gen trình tự mã hóa đánh dấu poly-histidin đầu C vào mỗi miền FN3 để cho phép tinh sạch và phát hiện. Canh trường được sinh trưởng đến mật độ quang là nằm trong khoảng từ 0,6 đến 0,8 trong môi trường 2YT được bổ sung với 100 µg/mL carbenixillin trong 96 giếng 1-mL chặn tại 37°C trước khi bổ sung IPTG vào 1 mM, mà tại đó điểm nhiệt độ được giảm xuống 30°C. Thu hoạch các tế bào trong khoảng 16 giờ sau đó bằng phân tách tâm và đông lạnh tại -20°C. Sự phân giải tế bào đạt được bằng cách nuôi cấy mỗi hạt nhỏ trong dung dịch đệm phân giải BugBuster® HT 0,6 mL (Novagen EMD Biosciences) bằng cách khuấy tại nhiệt độ trong phòng trong khoảng 45 phút.

Lựa chọn các miền FN3 mà gắn kết EGFR trên các tế bào

Để đánh giá khả năng của miền FN3 khác nhau để gắn kết EGFR trong các ngữ cảnh sinh lý, khả năng của chúng để gắn kết các tế bào A431 được đánh giá. Các tế bào A431 (American Type Culture Collection, cat. #CRL-1555) quá biểu hiện EGFR có $\sim 2 \times 10^6$ thụ thể trên tế bào. Các tế bào được đưa với 5,000/giếng trong các đĩa có 96 giếng đen đục và cho phép gắn qua đêm ở 37°C, trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Các hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn biểu hiện miền FN3 được pha loãng 1,000 lần thành dung dịch đệm nhuộm FACS (Becton Dickinson) và được ủ trong khoảng 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng trong ba đĩa giống nhau. Các hợp chất dung giải tế bào được loại bỏ và các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm FACS. Các tế bào được ủ với 50 µL/giếng thể tiếp hợp của kháng thể kháng penta His-Alexa488 (Qiagen) được pha loãng 1:100 trong dung dịch đệm nhuộm FACS trong khoảng 20 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm FACS, mà các giếng

này được đổ đầy bằng 100 μL dung dịch đệm nhuộm FACS và đọc huỳnh quang tại 488 nm bằng cách sử dụng bộ đọc Acumen eX3. Sàng lọc các hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn chứa các miền FN3 cho khả năng của chúng để gắn kết các tế bào A431 (1320 các hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn thô cho các thư viện TCL1 và TCL2) và 516 dòng dương tính được nhận dạng, trong đó gắn kết ≥ 10 lần so với tín hiệu gốc. 300 hợp chất dung giải tế bào từ thư viện TCL14 được sàng lọc để liên kết, dẫn đến 58 trình tự miền FN3 đơn nhất mà liên kết với EGFR.

Lựa chọn các miền FN3 mà ức chế EGF gắn kết với EGFR trên các tế bào

Để mô tả hơn nữa về cơ chế gắn kết EGFR, khả năng của các dòng của miền FN3 được nhận dạng khác nhau để gắn kết EGFR theo cách cạnh tranh EGF được đo bằng cách sử dụng các tế bào A431 và chạy song song với sàng lọc thử nghiệm gắn kết A431. Các tế bào A431 được đưa với 5,000/giếng trong các đĩa có 96 giếng đen đục và cho phép gắn qua đêm tại 37°C trong 5% khí CO_2 được làm ẩm. Các tế bào được ủ với 50 μL /giếng được pha loãng ở tỷ lệ 1:1,000 bằng hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn trong khoảng 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng trong ba đĩa giống nhau. Bổ sung EGF được biotin hóa (Invitrogen, cat. #E-3477) vào mỗi giếng cho nồng độ cuối cùng là 30 ng/mL và được ủ trong khoảng 10 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 μL /giếng dung dịch đệm nhuộm FACS. Các tế bào được ủ với 50 μL /giếng của thể tiếp hợp streptavidin-phycoerythrin (Invitrogen) được pha loãng ở tỷ lệ 1:100 trong dung dịch đệm nhuộm FACS trong khoảng 20 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 μL /giếng dung dịch đệm nhuộm FACS, mà các giếng này được đổ đầy bằng 100 μL dung dịch đệm nhuộm FACS và đọc huỳnh quang tại 600 nm bằng cách sử dụng bộ đọc Acumen eX3.

Các hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn chứa các miền FN3 được sàng lọc trong cạnh tranh thử nghiệm EGF được mô tả nêu trên. 1320 hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn thô từ các thư viện TCL1 và TCL2 được sàng lọc dẫn đến 451 dòng dương tính mà được ức chế gắn kết EGF > 50%.

Biểu hiện và tinh sạch của các miền FN3 được nhận dạng gắn kết với EGFR

Các miền FN3 được đánh dấu His được tinh sạch từ các hợp chất dung giải tế bào *E. coli* được làm sạch bằng các đĩa His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) và được rửa giải trong dung dịch đệm chứa 20 mM natri photphat, 500 mM natri clorua, và 250 mM imidazol có nồng độ pH là 7,4. Các mẫu được tinh sạch được chuyển đổi thành PBS có nồng độ pH là 7,4 để phân tích bằng cách sử dụng các đĩa PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

Phân tích sắc ký theo loại cỡ

Sắc ký theo loại cỡ được sử dụng để xác định trạng thái kết tập của các miền FN3 gắn kết EGFR. Lượng xác định (10 µL) của mỗi miền được tinh sạch FN3 được đưa vào cột Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) ở tốc độ dòng là 0,3 mL/phút ở pha chuyển động của PBS pH 7,4. Sự rửa giải từ cột là được kiểm soát bằng khả năng hút tại 280 nm. Các miền FN3 mà được biểu hiện mức cao về sự kết tụ bằng SEC bị loại khỏi phân tích further anasự phân giải.

Phân ly các miền FN3 gắn kết EGFR được chọn từ EGFR-Fc

Chọn các miền FN3 gắn kết EGFR được sàng lọc để nhận dạng các miền này bằng tốc độ phân ly thấp (k_{off}) ở liên kết với EGFR-Fc trên dụng cụ đo ProteOn XPR-36 (Bio-Rad) để dễ dàng lựa chọn các gắn kết có ái lực cao. Fc IgG kháng người ở dê (các hệ thống R&D), ở nồng độ là 5 µg/mL, được cố định trực tiếp thông qua liên kết amin (tại độ pH là 5,0) trên tất cả 6 kênh phối tử theo hướng ngang trên chip với tốc độ dòng là 30 µL/phút trong PBS chứa 0,005% Tween-20. Mật độ cố định trung bình khoảng 1500 đơn vị phản ứng (Response Units -RU) có biến thể ít hơn 5% trong số các kênh khác. EGFR-Fc được giữ trên bề mặt Fc IgG kháng ở người đến mật độ khoảng 600 RU theo hướng phối tử dọc. Tất cả các miền FN3 được thử nghiệm được chuẩn hóa đến nồng độ là 1 µM và được thử nghiệm cho gắn kết của chúng theo hướng ngang. Tất cả 6 kênh phân tích được sử dụng cho các miền FN3 để tối đa hóa năng suất truyền sàng lọc. Pha phân ly được kiểm soát trong khoảng 10 phút tại tốc độ dòng là 100 µL/phút. Các tín hiệu gắn kết liên điểm được sử dụng các tín hiệu tham chiếu để kiểm soát gắn kết không đặc hiệu giữa các mẫu phân tích và bề mặt IgG được cố định, và loại trừ tất cả các đáp ứng

gắn kết. Dữ liệu gắn kết được xử lý thích hợp cục bộ để mẫu gắn kết Langmuir đơn giản 1:1 đưa ra k_{off} cho mỗi miền FN3 gắn kết với EGFR-Fc được giữ.

Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được kích thích bởi EGF

Các miền FN3 gắn kết EGFR được tinh sạch được thử nghiệm đối với khả năng của chúng để ức chế phosphoryl hóa được kích thích bởi EGF của EGFR trong các tế bào A431 ở một nồng độ. Sự phosphoryl hóa EGFR được điều chỉnh bằng cách sử dụng kit EGFR phosphor (Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Các tế bào được đưa với 20,000/giếng trong các đĩa được xử lý nuôi cấy mô có 96 giếng sạch (Nunc) trong 100 μ L/giếng của môi trường RPMI (Gibco) chứa GlutaMAX™ với 10% huyết thanh của bào thai bò (fetal bovine serum-FBS) (Gibco) và cho phép gắn qua đêm ở 37°C trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào được bổ sung qua đêm trong 100 μ L/giếng của môi trường không chứa FBS ở 37°C trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Sau khi các tế bào được xử lý bằng 100 μ L/giếng môi trường bổ sung được làm ẩm trước (37°C) chứa các miền FN3 gắn kết EGFR tại nồng độ là 2 μ M trong khoảng 1 giờ ở 37°C trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Các mẫu đối chứng chỉ được xử lý bằng môi trường bổ sung. Các tế bào được kích thích bằng cách bổ sung và trộn nhẹ 100 μ L/giếng môi trường bổ sung được làm ẩm trước (37°C) chứa 100 ng/mL EGF tái tổ hợp ở người (các hệ thống R&D, cat. #236-EG) cho nồng độ cuối cùng là 50 ng/mL EGF và miền FN3 gắn kết EGFR 1 μ M, và ủ tại 37°C, 5% CO₂ trong khoảng 15 phút. Một bộ giếng đối chứng không được kích thích được để lại làm các mẫu đối chứng âm. Môi trường được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào được dung giải bằng 100 μ L/giếng dung dịch đệm phân giải hoàn toàn (Meso Scale Discovery) trong khoảng 10 phút tại nhiệt độ trong phòng bằng cách khuấy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đĩa thử nghiệm được tạo kết cấu để đo EGFR được phosphoryl hóa trên tiroxin 1173 (Meso Scale Discovery) được chặn bằng dung dịch chặn được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất tại nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1,5 đến 2 giờ. Tiếp theo các đĩa được rửa 4 lần bằng 200 μ L/giếng của 1X Tris Wash Buffer (Meso Scale Discovery). Lượng xác định hợp chất dung giải tế bào (30 μ L/giếng) được chuyển nạp vào các đĩa thử nghiệm, mà được phủ bằng màng bịt kín dạng đĩa (plate sealing

film VWR) và được ủ tại nhiệt độ trong phòng bằng cách khuấy trong khoảng 1 giờ. Các đĩa thử nghiệm được rửa 4 lần bằng 200 μ L/giếng của Tris Wash Buffer, mà 25 μ L dung dịch kháng thể phát hiện được làm lạnh bằng đá (Meso Scale Discovery) được bổ sung vào mỗi giếng, cẩn thận không để tạo ra bọt. Các đĩa được ủ tại nhiệt độ trong phòng bằng cách khuấy trong khoảng 1 giờ, tiếp theo là 4 rửa bằng 200 μ L/giếng của Tris Wash Buffer. Các tín hiệu được phát hiện bằng cách bổ sung 150 μ L/giếng Read Buffer (Meso Scale Discovery) và đọc trên dụng cụ đo SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) bằng cách sử dụng nhà sản xuất-thử nghiệm được thiết lập-các thiết lập mặc định cụ thể. Phần trăm ức chế tín hiệu đối chứng dương được kích thích bởi EGF được tính cho mỗi miền FN3 gắn kết EGFR.

Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được kích thích bởi EGF được đo đối với 232 dòng được nhận dạng từ các thư viện TCL1 và TCL2. 22 dòng này được ức chế sự phosphoryl hóa bởi EGFR $\geq 50\%$ ở nồng độ là 1 μ M. Sau khi loại bỏ dòng mà có được biểu hiện xấu hoặc được đánh giá là đa phân bằng sắc ký theo loại cỡ, chín dòng được đưa ra để mô tả thêm về đặc tính sinh học. Trình tự các vòng BC và FG của các dòng này được thể hiện trong bảng 4. Tám trong số chín dòng được chọn có trình tự vòng FG chung (HNVYKDTNMRGL; SEQ ID NO: 95) và các vùng giống nhau đáng kể được quan sát giữa một số dòng trong các trình tự vòng BC của chúng.

Bảng 4.

Miền FN3		Vòng BC		Vòng FG	
Dòng ID	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự	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

Ví dụ 3: Đặc trưng của miền FN3 gắn kết EGFR mà ức chế gắn kết EGF

Biểu hiện phạm vi rộng, sự tinh sạch, và loại bỏ nội độc tố

Các miền FN3 được thể hiện trong bảng 4 được khuếch đại để tạo ra nhiều vật liệu cho đặc trưng chi tiết. Canh trường qua đêm chứa mỗi biến đổi của miền FN3 gắn kết EGFR được sử dụng để đưa 0,8 L môi trường nước thịt Terrific được bổ sung 100 µg/mL ampicillin với dung dịch pha loãng ở tỉ lệ 1/80 của canh trường qua đêm vào môi trường sạch, và được ủ bằng cách khuấy ở 37°C. Canh trường được cảm ứng khi mật độ quang ở 600 nm đạt được ~1,2-1,5 bằng cách bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 1 mM và nhiệt độ được giảm xuống 30°C. Sau khoảng 4 giờ, các tế bào được thu gom bằng phân tách tâm và tế bào hạt nhỏ được bảo quản ở -80°C cho đến khi cần.

Đối với sự phân giải tế bào, viên giã đông được tạo huyền phù trong 1X BugBuster® được bổ sung 25 U/mL Benzonase® (Sigma-Aldrich) và 1 kU/mL rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) ở tỷ lệ là 5 mL BugBuster® trên mỗi gram hạt nhỏ. Sự phân giải được tiến hành trong khoảng 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng bằng cách trộn nhẹ, tiếp theo là ly tâm ở 56,000 x g trong khoảng 50 phút tại 4°C. Dịch nổi được thu gom và được lọc qua bộ lọc 0,2 µm, sau đó được tải vào cột 5-mL HisTrap FF làm cân bằng trước bằng dung dịch đệm A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol) bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s. Cột được rửa bằng 20 thể tích cột của dung dịch đệm A và còn được rửa bằng 16 % dung dịch đệm B (50 mM Tris-HCl có nồng độ pH là 7,5, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol) cho 6 thể tích cột. Các miền FN3 được rửa giải bằng 50% B cho 10 thể tích cột, tiếp theo gradient nằm trong khoảng từ 50 đến 100% B vượt quá 6 thể tích cột. Các đoạn chứa protein của miền FN3 được thu gom, được cô đặc bằng cách sử dụng máy cô đặc Millipore 10K MWCO, và được lọc trước khi tải vào cột HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare) làm cân bằng trước bằng PBS. Đỉnh monome protein rửa giải từ cột loại trừ kích thước được giữ.

Các nội độc tố được loại bỏ bằng cách sử dụng phương pháp theo mẻ bằng ActiClean Etox nhựa (Sterogene Bioseparations). Trước khi loại bỏ nội độc tố, nhựa được xử lý trước bằng 1 N NaOH trong khoảng 2 giờ ở 37°C (hoặc qua đêm tại 4°C) và được rửa kỹ bằng PBS cho đến khi độ pH đã được ổn định đến ~7 như được đo bằng giấy chỉ thị độ pH. Protein được tinh sạch được lọc qua bộ lọc 0,2 μm trước khi bổ sung vào 1 mL Etox nhựa ở tỷ lệ là 10 mL protein so với 1 mL nhựa. Sự gắn kết của nội độc tố với nhựa được cho phép tiến hành ở nhiệt độ trong phòng ít nhất là khoảng 2 giờ bằng cách trộn nhẹ. Nhựa được loại bỏ bằng cách ly tâm 500 x g trong khoảng 2 phút và dịch nổi protein được giữ. Các mức nội độc tố được đo bằng cách sử dụng các hộp EndoSafe®-PTS™ và được phân tích dựa trên bộ đọc EndoSafe®-MCS (Charles River). Nếu các mức nội độc tố là 5 EU/mg nêu trên sau khi điều trị Etox thứ nhất, quá trình nêu trên được lặp lại cho đến khi các mức nội độc tố được giảm xuống ≤ 5 EU/mg. Trong trường hợp mà mức nội độc tố là 5 EU/mg nêu trên và được ổn định sau khi hai điều trị liên tiếp bằng Etox, các điều kiện thay đổi anion hoặc sắc ký tương tác kỵ nước được thiết lập cho protein để loại bỏ các nội độc tố còn lại.

Xác định ái lực của các miền FN3 gắn kết EGFR được chọn với EGFR-Fc (ái lực EGFR-Fc)

Ái lực gắn kết của các miền FN3 gắn kết EGFR được chọn với miền ngoại bào EGFR tái tổ hợp còn được đặc trưng bằng các phương pháp cộng hưởng bề mặt plasmon bằng cách sử dụng Proteon Instrument (BioRad). Thử nghiệm được thiết lập (chế phẩm dạng mảnh, sự giữ EGFR-Fc) tương tự với thử nghiệm được mô tả nêu trên dùng để phân tích sự phân ly. Các miền FN3 gắn kết EGFR được chọn được thử nghiệm ở nồng độ là 1 μM trong các dây pha loăng gấp 3 lần theo hướng ngang. Mẫu dung dịch đệm cũng được đưa vào để kiểm soát độ ổn định đường chuẩn. Pha phân ly đối với tất cả nồng độ của mỗi miền FN3 gắn kết EGFR được kiểm soát ở tốc độ dòng là 100 μL /phút trong khoảng 30 phút (đối với các pha phân tán nêu trên có $k_{\text{off}} \sim 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ từ việc sàng lọc phân ly), hoặc 1 giờ (đối với các pha phân ly nêu trên có $k_{\text{off}} \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn). Hai bộ dữ liệu tham chiếu được loại trừ từ dữ liệu đáp ứng: 1) các tín hiệu liên điểm để hiệu chỉnh các

tương tác không đặc hiệu giữa miền FN3 gắn kết EGFR và bề mặt IgG được cố định; 2) các tín hiệu kênh đệm để hiệu chỉnh đường chuẩn sự lệch do sự phân ly bề mặt EGFR-Fc được giữ theo thời gian. Dữ liệu gắn kết được xử lý ở tất cả các nồng độ cho mỗi miền FN3 là thích hợp toàn bộ để mẫu gắn kết Langmuir đơn giản 1:1 đưa ra các đánh giá về các hằng số động lực học (k_{on} , k_{off}) và ái lực (K_D). Bảng 5 Thể hiện các hằng số động lực học cho mỗi cấu trúc, có ái lực biến đổi nằm trong khoảng từ 200 pM đến 9,6 nM.

Gắn kết miền FN3 gắn kết EGFR được chọn với EGFR trên các tế bào (“thử nghiệm gắn kết tế bào A431”)

Các tế bào A431 được đưa với 5,000/giếng vào các đĩa có 96 giếng đen đục và cho phép gắn qua đêm tại 37°C, trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Bổ sung các miền FN3 gắn kết EGFR được tinh sạch (1,5 nM to 30 µM) vào các tế bào (ở 50 µL) trong khoảng 1 giờ trong ba đĩa giống nhau tại nhiệt độ trong phòng. Dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm FACS. Các tế bào được ủ với 50 µL/giếng của thể tiếp hợp của kháng thể kháng penta His-Alexa488 (Qiagen) được pha loãng 1:100 trong dung dịch đệm nhuộm FACS trong khoảng 20 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm FACS, mà các giếng này được đổ đầy bằng 100 µL dung dịch đệm nhuộm FACS và đọc huỳnh quang tại 488 nm bằng cách sử dụng bộ đọc Acumen eX3. Dữ liệu được đánh dấu làm tín hiệu huỳnh quang nguyên dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3 và được thích hợp đối với đường cong đáp ứng liều xichma có độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) để tính các trị số EC₅₀. Bảng 5 Thể hiện EC₅₀ cho mỗi cấu trúc nằm trong khoảng từ 2,2 nM đến 20 µM.

Ức chế EGF gắn kết với EGFR trên các tế bào bằng cách sử dụng các miền FN3 gắn kết EGFR được chọn (cạnh tranh thử nghiệm A431 tế bào EGF)

Các tế bào A431 được đưa với 5,000 tế bào/giếng vào các đĩa có 96 giếng đen đục và cho phép gắn qua đêm tại 37°C, trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Bổ sung các miền FN3 gắn kết EGFR được tinh sạch (1,5 nM to 30 µM) vào các tế bào

(50 μL /giếng) trong khoảng 1 giờ trong ba đĩa giống nhau tại nhiệt độ trong phòng. Bổ sung EGF được biotin hóa (Invitrogen, Cat #: E-3477) vào mỗi giếng để tạo ra nồng độ cuối cùng là 30 ng/mL và được ủ trong khoảng 10 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 μL /giếng dung dịch đệm nhuộm FACS. Các tế bào được ủ với 50 μL /giếng thể tiếp hợp streptavidin-phycoerythrin (Invitrogen) được pha loãng 1:100 trong dung dịch đệm nhuộm FACS trong khoảng 20 phút tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 μL /giếng dung dịch đệm nhuộm FACS, mà các giếng được đổ đầy bằng 100 μL dung dịch đệm nhuộm FACS và đọc huỳnh quang tại 600 nm bằng cách sử dụng bộ đọc Acumen eX3. Dữ liệu được đánh dấu làm tín hiệu huỳnh quang nguyên dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3 và được thích hợp đối với đường cong đáp ứng liều xichma với độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (GraphPad Software) để tính các trị số IC_{50} . Bảng 5 Thể hiện trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 1,8 nM đến 121 nM.

Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được kích thích bởi EGF (thử nghiệm phospho-EGRF)

Chọn các miền FN3 mà được ức chế đáng kể sự phosphoryl hóa EGFR được kích thích bởi EGF được đánh giá hoàn thiện hơn bằng cách đo các trị số IC_{50} đối với sự ức chế. Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được kích thích bởi EGF được đánh giá ở các nồng độ của miền FN3 khác nhau (nằm trong khoảng từ 0,5 nM đến 10 μM) như được mô tả trên đây về “ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được kích thích bởi EGF”. Dữ liệu được đánh dấu làm tín hiệu điện hóa phát quang dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3 và các trị số IC_{50} được xác định bằng dữ liệu thích hợp để đáp ứng liều xichma có độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). Bảng 5 Thể hiện trị số IC_{50} mà nằm trong khoảng từ 18 nM đến 2,5 μM .

Ức chế sự tăng trưởng tế bào khối u ở người (thử nghiệm tăng trưởng NCI-H292 và tăng trưởng NCI-H322)

Ức chế sự tăng trưởng tế bào phụ thuộc vào EGFR được đánh giá bằng cách đo khả năng sống sót của các dòng tế bào khối u ở người quá biểu hiện EGFR, NCI-H292 và NCI-H322 (lần lượt là, American Type Culture Collection, cat. #CRL-1848 & #CRL-5806), như sau

Bảng 5.

Dòng ID của miền FN3	SEQ ID NO:	Ái lực EGFR-Fc (nM)	Sự gắn kết tế bào A431	Sự cạnh tranh A431 Tế bào EGF	Phospho -EGFR	Sự tăng trưởng - H292	Sự tăng trưởng NCI-H322
			EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
P53A1R5-17	18	1,89	4,0	9,8	>2500	86	65
P54AR4-17	19	9,62	16	21	184	ND	ND
P54AR4-47	20	2,51	8,6	7,1	295	44	39
P54AR4-48	21	7,78	12	9,8	170	ND	ND
P54AR4-73	22	0,197	9,4	4,6	141	83	73
P54AR4-74	23	ND	77	ND	ND	ND	ND
P54AR4-81	24	ND	84	121	ND	ND	ND
P54AR4-83	25	0,255	2,2	1,8	18	5,9	9,2
P54CR4-31	26	0,383	>20000	55	179	1150	>3073

thể hiện các miền FN3 gắn kết EGFR. Các tế bào được đưa với 500 tế bào/giếng (NCI-H292) hoặc 1,000 tế bào/giếng (NCI-H322) trong các đĩa được xử lý nuôi cấy mô trắng đục có 96 giếng (Nunc) trong 100µL/giếng của môi trường RPMI (Gibco) chứa GlutaMAX™ và 10mM HEPES, được bổ sung 10% huyết thanh của bào thai bò không được kích hoạt bởi nhiệt (Gibco) và 1% penixillin/streptomycin (Gibco), và cho phép gắn qua đêm tại 37°C trong 5% khí CO₂ được làm ẩm. Các tế bào được xử lý bằng cách bổ sung 5µL/giếng salin được đệm photphat (PBS) chứa

khoảng nồng độ của các miền FN3 gắn kết EGFR. Các mẫu đối chứng được xử lý bằng duy nhất 5 μ L/giếng PBS hoặc 25 mM axit etylenediaminetetraaxetic trong PBS. Các tế bào được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong khoảng 120 giờ. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách bổ sung 75 μ L/giếng thuốc thử CellTiter-Glo® (Promega), tiếp theo là trộn trên máy khuấy dạng tấm trong khoảng 2 phút, và ủ vào ban đêm tại nhiệt độ trong phòng trong khoảng 10 phút nữa. Các đĩa được đọc trên bộ máy đọc dạng tấm SpectraMax M5 (Molecular Devices) được cài đặt chế độ phát quang với thời gian đọc là 0,5 giây/giếng đối với đối chứng chỉ môi trường. Dữ liệu được đánh dấu là phần trăm của sự tăng trưởng tế bào được xử lý PBS dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3. Các trị số IC₅₀ được xác định bằng dữ liệu thích hợp với đẳng thức đáp ứng liều xichma có độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). Bảng 5 Thể hiện các trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 5,9 nM đến 1,15 μ M và nằm trong khoảng từ 9,2 nM đến > 3,1 μ M, bằng cách sử dụng lần lượt các tế bào NCI-H292 và NCI-H322. Bảng 5 Thể hiện bản chất của các đặc tính sinh học của các miền FN3 gắn kết EGFR cho mỗi thử nghiệm.

Ví dụ 4: Thiết kế các miền FN3 gắn kết EGFR

Tập con của các miền FN3 gắn kết EGFR được thiết kế để tăng độ ổn định về hình dạng của mỗi phân tử. Các đột biến L17A, N46V và E86I mà đã được Thể hiện để cải thiện độ ổn định của miền FN3 (được mô tả trong công bố bằng Mỹ số US2011/0274623) được kết hợp thành dòng P54AR4-83, P54CR4-31, và P54AR4-37 by Tổng hợp DNA. Các đột biến mới, P54AR5-83v2, P54CR431-v2, và P54AR4-37v2 được biểu hiện và được tinh sạch như được mô tả trên đây. Phân tích nhiệt quét vi sai trong PBS được sử dụng để đánh giá độ ổn định của mỗi đột biến so với độ ổn định của phân tử gốc tương ứng. Bảng 6 Thể hiện mỗi biến thể phân tử được ổn định đáng kể với mức tăng trung bình ở T_m là 18,5°C.

Bảng 6.

Dòng của miền FN3	SEQ ID NO:	T _m (°C)
P54AR4-83	25	50,6

P54AR4-83v2	27	69,8
P54CR4-31	26	60,9
P54CR4-31v2	28	78,9
P54AR4-37	22	45,9
P54AR4-37v2	29	64,2

Ví dụ 5: Lựa chọn các miền fibronectin loại III (FN3) mà gắn kết c-Met và ức chế gắn kết HGF

Quét trên c-Met của người

Thư viện TCL14 được sàng lọc against miền ngoại bào c-Met được biotin hóa ở người (bt-c-Met) để nhận dạng các miền FN3 có khả năng gắn kết đặc hiệu với c-Met. Đối với các lựa chọn, 3 μ g thư viện TCL14 được sao chép và được chuyển đổi *in vitro* (IVTT) trong *E. Coli* S30 Linear Extract (Promega, Madison, WI) và thư viện được biểu hiện được chặn bằng Cis Block (2% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 μ g/ml Herring Sperm ADN (Promega), 1 mg/mL heparin (Sigma-Aldrich)). Đối với các lựa chọn, bt-c-Met được bổ sung tại nồng độ là 400 nM (chu kỳ 1), 200 nM (chu kỳ 2 và 3) và 100 nM (chu kỳ 4 và 5). Thư viện gắn kết các thành phần được khôi phục bằng cách sử dụng các hạt từ neutravidin (Thermo Fisher, Rockford, IL) (Chu kỳ 1, 3, và 5) hoặc các hạt từ streptavidin (Promega) (chu kỳ 2 và 4) và thành phần thư viện không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa các hạt từ 5 đến 14 lần bằng 500 μ L PBS-T tiếp theo là 2 rửa bằng 500 μ L PBS.

Các chu kỳ lựa chọn bổ sung được thực hiện để nhận dạng các miền FN3 các phân tử có các ái lực được cải thiện. Tóm lại, các đầu ra từ chu kỳ 5 được thực hiện như được mô tả trên đây và được đưa vào các chu kỳ lặp lại bổ sung của sự lựa chọn với các biến đổi sau: ủ bằng bt-c-Met được giảm từ 1 giờ xuống 15 phút và thu nạp hạt được giảm từ 20 phút xuống 15 phút, bt-c-Met được giảm xuống 25 nM (chu kỳ 6 và 7) hoặc 2,5 nM (chu kỳ 8 và 9), và rửa bổ sung trong khoảng 1 giờ được thực hiện với có mặt của lượng dư c-Met không được biotin hóa. Mục đích

thay đổi này là để chọn đồng thời cho các gắn kết có hiệu suất phân ly chậm và hiệu suất liên kết nhanh tiềm ẩn K_D thấp hơn đáng kể.

Các đầu ra của chu kỳ 5, 7 và 9 là PCR được nhân dòng thành vector pET15 được biến đổi (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ) chứa vị trí tách dòng phụ thuộc vào ligaza (pET15-LIC) bằng cách sử dụng TCON6 (SEQID No. 30) và các đoạn mồi TCON5 E86I ngắn (SEQID No. 31), và các protein được biểu hiện làm các protein được đánh dấu His6 đầu C sau khi chuyển nạp và cảm ứng IPTG (nồng độ cuối cùng là 1 mM, 30°C trong khoảng 16 giờ) bằng cách sử dụng định chuẩn tiêu chuẩn. Các tế bào được thu hoạch bằng phân tách tâm và sau đó được dung giải bằng Bugbuster HT (EMD Biosciences) được bổ sung 0,2 mg/mL Chicken Egg White Lysozyme (Sigma-Aldrich). Các hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn được làm sạch bằng phân tách tâm và các dịch nổi được chuyển nạp vào các đĩa của các giếng sâu có 96 giếng mới.

Sàng lọc các miền FN3 mà ức chế gắn kết HGF với c-Met

Các miền FN3 có mặt trong các hợp chất dung giải tế bào *E. coli* được sàng lọc cho khả năng ức chế gắn kết HGF với miền được tinh sạch ngoại bào c-Met ở dạng hóa sinh. Thử nghiệm c-Met Fc tái tổ hợp ở người (0,5 µg/mL trong PBS, 100 µL/giếng) được phủ trên đĩa Maxisorp trắng có 96 giếng (Nunc) và được ủ qua đêm ở 4°C. Các đĩa này được rửa hai lần bằng 300 µl/giếng salin được đệm Tris bằng 0,05% Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich) trên máy rửa dạng tấm Biotek. Các đĩa thử nghiệm được chặn bằng StartingBlock T20 (200 µL/giếng, Thermo Fisher Scientific, Rockland, IL) trong khoảng 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng (RT) bằng cách khuấy và được rửa lại hai lần bằng 300 µl TBS-T. Các hợp chất dung giải tế bào của miền FN3 được pha loãng trong StartingBlock T20 (ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:100,000) bằng cách sử dụng hệ thống robot bọc Hamilton STARplus. Các hợp chất dung giải tế bào (50 µL/giếng) được ủ trên các đĩa thử nghiệm trong khoảng 1 giờ tại RT bằng cách khuấy. Mà không rửa các đĩa này, bt-HGF (1 µg/mL trong StartingBlock T20, 50 µL/giếng được biotin hóa) được bổ sung vào đĩa trong khoảng 30 phút tại RT trong khi khuấy. Các giếng đối chứng chứa các hợp chất dung giải tế bào Tencon27 được tiếp nhận Sự chặn bắt đầu T20

hoặc được pha loãng bt-HGF. Tiếp theo các đĩa được rửa bốn lần bằng 300 μ l/giếng TBS-T và được ủ với 100 μ l/giếng Streptavidin-HRP (1:2000 trong TBS-T, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) trong khoảng từ 30 đến 40 phút tại RT bằng cách khuấy. Một lần nữa các đĩa được rửa bốn lần bằng TBS-T. Để phát triển tín hiệu, hợp chất quang hóa POD (50 μ L/giếng, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), được tiến hành theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất, được bổ sung vào đĩa và trong khoảng 3 phút phát quang được đọc trên Molecular Devices M5 bằng cách sử dụng SoftMax Pro. Phần trăm ức chế được xác định trước bằng cách sử dụng phép đo sau: $100 - ((RLU_{\text{mẫu}} - RLU_{\text{đối chứng không có bt-HGF trung bình}}) / (RLU_{\text{đối chứng có bt-HGF}} - RLU_{\text{đối chứng không có bt-HGF trung bình}})) * 100$. Các trị số phần trăm ức chế là 50% hoặc lớn hơn là được xem xét đánh giá.

Biểu hiện năng suất truyền cao và sự tinh sạch của các miền FN3

Các miền FN3 được đánh dấu His được tinh sạch từ các hợp chất dung giải tế bào E. coli được làm sạch bằng các đĩa His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) và được rửa giải trong dung dịch đệm chứa 20 mM natri photphat, 500 mM natri clorua, và 250 mM imidazol ở nồng độ pH là 7,4. Các mẫu được tinh sạch được thay đổi thành PBS có nồng độ là pH 7,4 để phân giải bằng cách sử dụng các đĩa PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

Xác định IC₅₀ sự ức chế của gắn kết HGF với c-Met

Chọn các miền FN3 còn được đặc trưng trong thử nghiệm cạnh tranh HGF. Các đường cong đáp ứng liều dùng cho các miền FN3 được tinh sạch được tạo ra bằng cách sử dụng thử nghiệm được mô tả nêu trên (nồng độ bắt đầu là 5 μ M). Các trị số phần trăm ức chế được tính. Dữ liệu được đánh dấu làm % sự ức chế dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3 và các trị số IC₅₀ được xác định bằng dữ liệu thích hợp để đáp ứng liều xichma có độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4.

35 trình tự độc nhất được nhận dạng từ chu kỳ 5 để biểu hiện hoạt tính các tỷ lệ pha loãng là 1:10, có các trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1500 nM. Chu kỳ 7 đạt được 39 trình tự độc nhất có hoạt tính các tỷ lệ pha loãng là 1:100 và các

trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,16 đến 2,9 nM. 66 trình tự độc nhất được nhận dạng từ chu kỳ 9, mà các đánh giá được xác định làm hoạt tính ở các tỷ lệ pha loãng là 1:1000. Các trị số IC_{50} thấp nhất là 0,2 nM được quan sát trong chu kỳ 9 (bảng 8).

Xác định ái lực của các miền FN3 gắn kết c-Met được chọn với c-Met -Fc (ái lực c-Met-Fc)

Các ái lực được xác định từ miền FN3 gắn kết c-Met được chọn theo định ước được mô tả để xác định các ái lực với miền FN3 gắn kết EGFR trong Ví dụ 3 loại trừ protein dung hợp c-Met-Fc được sử dụng trong các thử nghiệm.

Ví dụ 6: Đặc trưng của các miền FN3 mà gắn kết c-Met và ức chế gắn kết HGF

Các miền FN3 được biểu hiện và được tinh sạch như được mô tả trên đây trong Ví dụ 2. Phân tích sắc ký theo loại cỡ và động lực học được thực hiện như được mô tả trên đây lần lượt trong Các ví dụ 1 và 2. Bảng 7 Thể hiện các trình tự sợi C, vòng CD, sợi F, và vòng FG, và SEQ ID NO: đối với toàn bộ trình tự axit amin cho mỗi miền.

Bảng 7.

Dòng		Vòng C	Sợi D	Vòng F	Sợi FG
Tên	SEQ ID NO:				
P114AR5P74-A5	32	FDSFWIRYDE	VVVGGE	TEYVYNILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYWVTILGV	KGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVYNILGV	KGGGLSV
P114AR7P92-G8	36	FDSFVIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P92-H5	37	FDSFWIRYLE	FLLGGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P93-D11	38	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVGINGV	KGGYISY
P114AR7P93-G8	39	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYGVTINGV	KGGRVST
P114AR7P93-H9	40	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIIGV	KGGHISL
P114AR7P94-A3	41	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV
P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGG	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LLSTGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP

Các gốc C vòng tương ứng với các gốc nằm trong khoảng từ 28 đến 37 của SEQ ID NO: được chỉ thị

Các gốc sợi CD tương ứng với các gốc nằm trong khoảng từ 38 đến 43 của SEQ ID NO: được chỉ thị

Các gốc vòng F tương ứng với các gốc nằm trong khoảng từ 65 đến 74 của SEQ ID NO: được chỉ thị

Các gốc sợi FG tương ứng với các gốc nằm trong khoảng từ 75 đến 81 của SEQ ID NO: được chỉ thị

Gắn kết các miền FN3 gắn kết c-Met được chọn với c-Met trên các tế bào (“thử nghiệm gắn kết tế bào H441”)

Các tế bào NCI-H441 (Cat # HTB-174, American Type Culture Collection, Manassas, VA) với lượng 20.000 tế bào trên mỗi giếng được đưa vào trong các đĩa có 96 giếng đáy đen trong được phủ Poly-D-lysine (BD Biosciences, San Jose, CA) và cho phép để qua đêm tại nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Các miền FN3 được tinh sạch (50 µL/giếng; nằm từ 0 đến 1000 nM) được bổ sung vào các tế bào trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trong đĩa giếng nhau. Dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch đệm nhuộm FACS (150 µL/giếng, BD Biosciences, cat # 554657). Các tế bào được ủ với kháng thể kháng HIS được biotin hóa (được pha loãng với tỷ lệ 1:160 trong dung dịch đệm nhuộm FACS, 50 µL/giếng, các hệ thống R&D, cat # BAM050) trong khoảng thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch đệm nhuộm FACS (150 µL/giếng), mà các giếng được ủ với kháng thể được kết hợp kháng IgG1-Alexa 488 ở chuột (được pha loãng với tỷ lệ 1:80 trong dung dịch đệm nhuộm FACS, 50 µL/giếng, Life Technologies, cat # A21121) trong khoảng thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch đệm nhuộm FACS (150 µL/giếng) và được để lại trong dung dịch đệm nhuộm FACS (50 µL/giếng). Toàn bộ huỳnh quang được xác định trước bằng cách sử dụng bộ đọc Acumen eX3. Dữ liệu được vẽ đồ thị là tín hiệu huỳnh quang thô đối với logarit của nồng độ mol của miền FN3 và được làm khớp đối với đường cong đáp ứng liều xichma với độ

nghiên biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (phần mềm GraphPad) để tính toán trị số EC_{50} . Các miền FN3 được nhận thấy là để biểu hiện dải hoạt tính gắn kết, có các trị số EC_{50} nằm trong khoảng từ 1,4 nM đến 22,0 nM, như được Thể hiện trong bảng 8.

Ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được kích thích bởi HGF

Các miền FN3 đã được tinh sạch được thử nghiệm khả năng của chúng để ức chế sự phosphoryl hóa được kích thích bởi HGF của c-Met trong NCI-H441, bằng cách sử dụng kit c-Met phosphor (Tyr1349) từ Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD). Các tế bào với lượng 20,000/giếng được đưa vào các đĩa đã được xử lý nuôi cấy mô có 96 giếng sạch trong 100 μ L/giếng môi trường RPMI (chứa Glutamax và HEPES, Life Technologies) có 10% huyết thanh của bào thai bò (FBS; Life Technologies) và cho phép để qua đêm tại nhiệt độ 37°C, 5% CO_2 . Môi trường nuôi cấy được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào được bỏ đói qua đêm trong môi trường RPMI không có huyết thanh (100 μ L/giếng) ở 37°C, 5% CO_2 . Sau đó các tế bào không được bổ sung môi trường RPMI không có huyết thanh sạch (100 μ L/giếng) chứa các miền FN3 tại nồng độ là 20 μ M và nhỏ hơn trong khoảng 1 giờ tại 37°C, 5% CO_2 . Các mẫu đối chứng chỉ được xử lý bằng môi trường. Các tế bào được kích thích bằng 100 ng/mL HGF tái tổ hợp ở người (100 μ L/giếng, các hệ thống R&D cat # 294-HGN) và được ủ ở 37°C, 5% CO_2 trong khoảng 15 phút. Một bộ các giếng đối chứng không được kích thích được để lại làm các mẫu đối chứng âm. Tiếp theo môi trường được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào được dung giải bằng dung dịch đệm phân giải hoàn toàn (50 μ L/giếng, Meso Scale Discovery) trong khoảng 10 phút tại RT bằng cách khuấy, theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đĩa thử nghiệm được tạo kết cấu để đo được phosphoryl hóa c-Met được chặn bằng dung dịch chặn được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất tại nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau đó các đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm Tris Wash (200 μ L/giếng, Meso Scale Discovery). Các hợp chất dung giải tế bào (30 μ L/giếng) được chuyển nạp vào các đĩa thử nghiệm, và được ủ tại RT bằng cách khuấy trong khoảng 1 giờ. Sau đó các đĩa thử nghiệm được rửa bốn lần bằng Tris Wash Buffer, mà dung dịch kháng thể phát hiện được làm lạnh

bằng đá (25 μ L/giếng, Meso Scale Discovery) được bổ sung vào mỗi giếng trong khoảng 1hr tại RT bằng cách khuấy. Các đĩa được súc lại bốn lần bằng Tris Wash Buffer. Các tín hiệu được phát hiện bằng cách bổ sung 150 Read Buffer (150 μ L/giếng, Meso Scale Discovery) và đọc trên dụng cụ đo SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) bằng cách sử dụng nhà sản xuất-thử nghiệm được thiết lập-các thiết lập mặc định cụ thể. Dữ liệu được đánh dấu làm tín hiệu điện hóa phát quang dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3 và các trị số IC₅₀ được xác định bằng dữ liệu thích hợp để đáp ứng liều xichma có độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4. Các miền FN3 được phát hiện để ức chế được phosphoryl hóa c-Met có các trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 4,6 nM đến 1415 nM như được Thể hiện trong bảng 8.

Ức chế sự tăng trưởng tế bào khối u ở người

Ức chế sự tăng trưởng tế bào phụ thuộc vào c-Met được đánh giá bằng cách đo khả năng sống sót của các tế bào U87-MG (American Type Culture Collection, cat # HTB-14), sau khi tiếp xúc với các miền FN3 gắn kết c-Met. Các tế bào được đưa với 8000 tế bào trên mỗi giếng vào các đĩa được xử lý nuôi cấy mô trắng đục có 96 giếng (Nunc) trong 100 μ L/giếng của môi trường RPMI, được bổ sung 10% FBS và cho phép gắn qua đêm tại 37°C, 5% CO₂. 24 giờ sau khi mạ, môi trường được hút và các tế bào không được bổ sung môi trường RPMI không có huyết thanh.

Bảng 8.

Dòng		Ái lực	Cạnh tranh HGF IC50 (nM)	Gắn kết tế bào (EC50, nM)	Ức chế p Met trong các tế bào (IC50, nM)	Ức chế sự phát triển các tế bào U87- MG (IC50, nM)
Tên	SEQ ID NO:					
P114AR5P74-A5	32	10,1	5,2	18,7	1078	464,4
P114AR5P75-E9	33	45,8	51,9	ND	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	ND	22,0	766,4	672,3

P114AR7P93-D11	38	ND	ND	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	ND	9,8	17,4
P114AR7P95-D3	44	0,3	0,2	1,5	4,6	1,7
P114AR7P95-D4	45	0,4	ND	1,4	19,5	19,4
P114AR7P95-E3	46	1,5	ND	3,2	204,6	209,2
P114AR7P95-F10	47	4,2	1,4	4,4	187,6	129,7
P114AR7P95-G7	48	20,0	ND	11,3	659,3	692
P114AR7P95-H8	49	3,7	ND	4,1	209,8	280,7

24 giờ sau khi nhện đói huyết thanh, các tế bào được xử lý bằng cách bổ sung môi trường không có huyết thanh chứa các miền FN3 gắn kết c-Met (30 μ L/giếng). Các tế bào được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong khoảng 72 giờ. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L/giếng thuốc thử CellTiter-Glo® (Promega), tiếp theo là trộn trên máy khuấy dạng tấm trong khoảng 10 phút. Các đĩa được đọc trên máy đọc dạng tấm SpectraMax M5 (Molecular Devices) được thiết lập chế độ phát quang, với thời gian đọc là 0,5 giây/giếng. Dữ liệu được đánh dấu làm đơn vị phát quang nguyên (RLU) dựa vào logarit của nồng độ mol của miền FN3. Các trị số IC₅₀ được xác định bằng dữ liệu thích hợp với đẳng thức để đáp ứng liều xichma có độ nghiêng biến đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4. bảng 8 Thể hiệncác trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 1 nM đến >1000 nM.

Các đặc trưng của miền FN3 gắn kết c-Met được tóm lược trong bảng 8.

Độ ổn định nhiệt của các miền FN3 gắn kết c-Met

Phân tích nhiệt quét vi sai trong PBS được sử dụng để đánh giá độ ổn định của mỗi miền FN3. Các kết quả thử nghiệm được Thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9.

Dòng		Độ ổn định nhiệt (Tm, C)
Tên	SEQ ID NO:	
P114AR5P74-A5	32	74,1
P114AR5P75-E9	33	ND
P114AR7P92-F3	34	81,5
P114AR7P92-F6	35	76,8
P114AR7P92-G8	36	90,9
P114AR7P92-H5	37	87
P114AR7P93-D11	38	ND
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

Ví dụ 7. Sản sinh và đặc trưng của các phân tử kháng-EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Sản sinh các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Nhiều tổ hợp của miền EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met được mô tả trong Các ví dụ từ 1 đến 6 được nối thành phân tử đặc hiệu kép có khả năng gắn kết với cả hai EGFR và c-Met. Ngoài ra, các miền FN3 gắn kết EGFR có các trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 107-110 và miền FN3 gắn kết c-Met có các trình tự axit amin được Thể hiện trong các SEQ ID NO: 111-114 được tạo ra và được nối thành phân tử đặc hiệu kép. Các gen tổng hợp được sản sinh để mã hóa cho trình tự axit amin được mô tả trong các SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121 hoặc

190-193 (bảng 10) sao cho dạng sau được duy trì: Miền FN3 gắn kết EGFR tiếp theo là liên kết peptit tiếp theo là miền FN3 gắn kết c-Met. Đánh dấu poly-histidin được kết hợp ở đầu C để hỗ trợ sự tinh sạch. Ngoài ra để các phân tử nêu trên được mô tả trong bảng 10, liên kết giữa hai các miền FN3 được biến đổi theo chiều dài, thành phần trình tự và cấu trúc theo các thành phần và cấu trúc được liệt kê trong bảng 11. Có thể hình dung rằng số liên kết khác nhau có thể được sử dụng để liên kết các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép của các miền FN3 này được biểu hiện và được tinh sạch từ *E. coli* như được mô tả các miền EGFR hoặc FN3 c-Met đặc hiệu đơn bằng cách sử dụng IMAC và các bước sắc ký tinh lọc gel. Được làm rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép có thể hoặc có thể không chứa methionin khởi mào. Minh họa các phân tử có methionin khởi mào là các phân tử có trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID NO: 106, 118-121, 138-165, 190 và 192, và minh họa các phân tử không có methionin khởi mào được thể hiện trong các SEQ ID NO: 50-72, 191 và 193. Với có mặt của methionin khởi mào dùng cho các miền FN3 gắn kết EGFR đảm bảo hoạt tính riêng; methionin khởi mào có ít tác động trên các miền FN3 c-Met.

Bảng 10.

Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép		Miền FN3 gắn kết với EGFR		Miền FN3 gắn kết với cMET		Liên kết	
Dòng ID	SEQ ID NO:	Dòng ID	SEQ ID NO:	Dòng ID	SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(GGGGS) ₄	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) ₄	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) ₄	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) ₄	79
ECB5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) ₄	79
ECB6	55	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) ₄	79
ECB7	56	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) ₄	79
ECB15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB60	59	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB37	60	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) ₅	81
ECB95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) ₅	81
ECB96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) ₅	81
ECB97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB106	65	P54AR4-83v23	109	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) ₅	81
ECB107	66	P54AR4-83v23	109	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) ₅	81
ECB108	67	P54AR4-83v23	109	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) ₅	81
ECB109	68	P54AR4-83v23	109	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB118	69	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P94-A3v22	111	(AP) ₅	81
ECB119	70	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P121-A6v2	112	(AP) ₅	81
ECB120	71	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P122-A7v2	113	(AP) ₅	81
ECB121	72	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB91	106	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB18	118	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB28	119	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	(AP) ₅	81
ECB38	120	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB39	121	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	(AP) ₅	81
ECB168	190	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81
ECB176	192	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P95-C5v2	114	(AP) ₅	81

Bảng 11.

Liên kết	SEQ ID NO:	Chiều dài liên kết ở axit amin	Cấu trúc
GS	78	2	Không trật tự
GGGGS	105	5	Không trật tự
(GGGGS) ₂	224	10	Không trật tự
(GGGGS) ₄	79	20	Không trật tự
(AP) ₂	80	4	Bền vững

(AP) ₅	81	5	Bền vững
(AP) ₁₀	82	20	Bền vững
(AP) ₂₀	83	40	Bền vững
A(EAAAK) ₅ AAA	84	29	Xoắn α

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép tăng cường khả năng so với chỉ riêng phân tử đặc hiệu đơn đưa ra ái lực

Các tế bào NCI-H292 được đưa vào đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS. Sau 24 giờ, môi trường được thay thế bằng huyết thanh không có RPMI. 24 giờ sau khi nhện đổi huyết thanh, các tế bào được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của các miền FN3: miền FN3 EGFR đặc hiệu đơn có ái lực cao (P54AR4-83v2), miền FN3 c-Met đặc hiệu đơn có ái lực thấp (P114AR5P74-A5), hỗn hợp của hai miền FN3 EGFR và c-Met đặc hiệu đơn, hoặc các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được bao gồm miền c-Met FN3 có ái lực được liên kết với miền FN3 EGFR có ái lực cao (ECB1). Các tế bào được xử lý trong khoảng 1h bằng phân tử đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép và tiếp theo được kích thích bằng EGF, HGF, hoặc tổ hợp của EGF và HGF trong khoảng 15 phút ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào được dung giải bằng dung dịch đệm phân giải MSD và tín hiệu tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng các đĩa thử nghiệm MSD thích hợp, theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất, như được mô tả trên đây.

Miền c-Met FN3 có ái lực được ức chế sự phosphoryl hóa của c-Met có IC₅₀ là 610 nM (Fig. 4). Như được mong đợi Miền FN3 EGFR không thể ức chế sự phosphoryl hóa c-Met và hỗn hợp của các phân tử đặc hiệu đơn được chặn tương đồng với một miền c-Met FN3. Tuy nhiên, phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được ức chế sự phosphoryl hóa của c-Met có IC₅₀ là 1 nM (Fig. 4), được tạo ra nhiều hơn bước nhảy 2 log cải thiện khả năng so với chỉ riêng c-Met đặc hiệu đơn.

Tiềm tàng đối với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép để tăng cường sự ức chế của c-Met và/hoặc sự phosphoryl hóa EGFR thông qua hiệu quả ái lực được đánh giá trong nhiều loại tế bào có các mật độ và các tỷ lệ c-Met và EGFR biến đổi

(Fig. 5). Các tế bào NCI-H292, NCI-H441, hoặc NCI-H596 được đưa vào đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS. 24 giờ sau, môi trường được thay thế bằng RPMI không có huyết thanh. 24 giờ sau khi nhịn đói huyết thanh, các tế bào được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn, miền FN3 c-Met đặc hiệu đơn, hoặc phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (ECB5, được bao gồm P53A1R5-17v2 và P114AR7P94-A3). Các tế bào được xử lý trong khoảng 1h bằng phân tử đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép và sau đó được kích thích bằng EGF, HGF, hoặc tổ hợp EGF và HGF trong khoảng 15 phút ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào được dung giải bằng dung dịch đệm phân giải MSD và tín hiệu tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng các đĩa thử nghiệm MSD thích hợp, theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất, như được mô tả trên đây.

Fig. 5 (A-C) Thể hiện sự ức chế của EGFR bằng cách sử dụng miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn so với phân tử EGFR/cMet đặc hiệu kép trong ba dòng tế bào khác nhau. Để đánh giá ái lực trong thử nghiệm phosphoryl hóa EGFR, miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình (1,9 nM) (P53A1R5-17v2) so với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép chứa cùng miền FN3 gắn kết với EGFR được gắn kết với miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao (0,4 nM) (P114AR7P94-A3). Trong các tế bào H292 và H596, ức chế sự phosphoryl hóa của EGFR có thể so với phân tử đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép (Fig.s 5A và 5B), có khả năng do các dòng tế bào này có tỷ lệ cao của EGFR so với các thụ thể c-Met. Để thử nghiệm học thuyết này, ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được đánh giá ở các tế bào NCI-H441 mà biểu hiện nhiều thụ thể c-Met hơn so với EGFR. Việc điều trị các tế bào NCI-H441 bằng phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được giảm IC₅₀ đối với sự ức chế sự phosphoryl hóa EGFR so với miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn bằng 30 lần (Fig. 5C).

Tiềm tàng đối với khả năng được tăng cường bằng phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được đánh giá trong thử nghiệm c-Met phosphoryl hóa bằng cách sử dụng phân tử có ái lực cao so với EGFR (0,26 nM) và ái lực trung bình so với c-Met (10,1 nM). Trong cả hai tế bào NCI-H292 và NCI-H596, sự ức chế phosphoryl hóa của c-Met được tăng cường bằng phân tử đặc hiệu kép so với miền FN3 gắn kết c-Met đặc hiệu đơn, lần lượt bằng 134 và 1012 lần (Fig. 3D và 3E).

Được kiểm chứng rằng khả năng được tăng cường đối với sự ức chế của EGFR và sự phosphoryl hóa c-Met bằng các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được chuyển đổi thành sự ức chế được tăng cường của tín hiệu và sự tăng sinh. Đối với các thử nghiệm này, hỗn hợp của các miền gắn kết FN3 EGFR và các miền FN3 gắn kết c-Met so với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép. Như được mô tả trong bảng 12 và 13, các trị số IC_{50} cho dự phosphoryl hóa ERK (bảng 12) và sự tăng sinh của các tế bào H292 (bảng 13) được giảm khi các tế bào được xử lý bằng phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép so với hỗn hợp của các gắn kết đặc hiệu đơn. IC_{50} cho sự ức chế của sự phosphoryl hóa ERK đối với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép là nhỏ hơn 143 lần so với hỗn hợp của hai miền FN3 EGFR và c-Met đặc hiệu đơn, Thể hiện hiệu quả ái lực đối với tiềm năng của các phân tử trong thử nghiệm này. Trong bảng 12, miền FN3 gắn kết EGFR và c-Met đặc hiệu đơn không có hoạt tính ức chế đầy đủ và do đó các trị số IC_{50} được Thể hiện nên được xem là các giới hạn dưới. Thử nghiệm sự tăng sinh được hoàn thiện bằng cách sử dụng các tổ hợp khác nhau của miền FN3 gắn kết c-Met và EGFR làm hỗn hợp hoặc được liên kết ở dạng đặc hiệu kép. IC_{50} cho sự ức chế của sự tăng sinh đối với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép là nhỏ hơn từ 34 đến 236 lần so với hỗn hợp của miền FN3 gắn kết c-Met hoặc EGFR gốc đặc hiệu đơn. Điều này khẳng định rằng hiệu quả ái lực được quan sát ở mức của các thụ thể (Fig. 4 và Fig. 5) chuyển thành cải thiện trong việc ức chế tín hiệu tế bào (bảng 12) và sự tăng sinh tế bào (bảng 13).

Bảng 12.

Tính đặc hiệu của phân tử miền FN3	Dòng #	Loại	IC_{50} (nM) (sự phosphoryl hóa)
EGFR	P54AR 4-83v2	Đặc hiệu đơn	>10,000
c- Met	P114AR5P 74-A5	Đặc hiệu đơn	2366
EGFR hoặc c- Met	P54AR 4-83v2 + P114AR5P 74-A5	Hỗn hợp của các phân tử đặc hiệu đơn	798,4
EGFR và c- Met	ECB1	Đặc hiệu kép	5,6

Bảng 13.

Miền FN3 gắn kết EGFR (ái lực)	Miền FN3 gắn kết c-Met (ái lực)	IC50 dùng cho hỗn hợp của các đặc hiệu đơn (nM)	IC50 đối với đặc hiệu kép (nM)	Số lần tăng IC50 đối với đặc hiệu kép/hỗn hợp của các đặc hiệu đơn
P54AR4-83v2 (0,26 nM)	P114ARP94-A3 (0,4 nM)	36,5	1,04	35
P54AR4-83v2 (0,26 nM)	P114ARP93-H9 (3,3 nM)	274,5	8,05	34
P54AR4-83v2 (0,26 nM)	P114AR5P74-A5 (10,1 nM)	1719	7,29	236

Ghép ngoại lai khối u *in vivo*: PK/PD

Để xác định tính hiệu quả của các phân tử của miền FN3 đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép *in vivo*, khối u các tế bào được thiết kế để tiết HGF của người (HGF ở chuột không gắn kết với c-Met của người). HGF của người được biểu hiện ổn định trong các tế bào NCI-H292 bằng cách sử dụng sự tiêm entivirus (Vector ADN Lentivirut biểu hiện HGF của người (Accession #X16322) và kit bao gói Lentivirut từ Genecopoeia). Sau khi nhiễm, các tế bào biểu hiện HGF được chọn với 4 µg/mL puromyxin (Invitrogen). Protein HGF của người được phát hiện trong môi trường điều hòa của các tế bào được gắn bằng cách sử dụng các đĩa thử nghiệm từ MesoScale Discovery.

Chuột be SCID được cấy dưới da các tế bào NCI-H292 biểu hiện HGF của người ($2,0 \times 10^6$ tế bào trong Cultrex (Trevigen) ở lượng là 200 µL) trên hông phía lưng của mỗi động vật. Các phép đo khối u được thực hiện mỗi tuần hai lần cho đến khi thể tích khối u nằm trong khoảng từ 150 đến 250 mm³. Tiếp theo cho chuột này dùng một liều trong màng bụng của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (được liên kết với miền gắn kết albumin để tăng chu kỳ bán hủy) hoặc tá được lỏng PBS. Tại 6h hoặc 72h sau khi định lượng các khối u được chiết và đông lạnh ngay lập tức trong nitrogen lỏng. Các mẫu máu được thu gom thông qua lỗ thủng qua tim vào 3,8% xitrat chứa các chất ức chế proteaza. Ngay sau khi sự thu gom, các mẫu máu được ly tâm và plasma thu được được chuyển nạp vào các ống mẫu và được

bảo quản ở -80°C . Các khối u được cân, được cắt thành các đoạn nhỏ, và được dung giải trong các ống chất nền phân giải A (Lysing Matrix A - LMA) chứa dung dịch đệm RIPA với các chất ức chế proteaza/phosphatase HALT (Pierce), 50 mM natri florua (Sigma), 2 mM natri orthovanadat được hoạt hóa (Sigma), và 1 mM PMSF (MesoScale Discovery). Các hợp chất dung giải tế bào được loại bỏ khỏi chất nền LMA và được ly tâm để loại bỏ protein không thể hòa tan. Protein của khối u có thể hòa tan được định lượng bằng thử nghiệm protein BCA và được pha loãng thành các mức protein tương đương trong khối u dung dịch đệm phân giải. c-Met, EGFR và ERK được phosphoryl hóa được đo bằng cách sử dụng các đĩa thử nghiệm từ MesoScale Discovery (theo định ước của nhà sản xuất và như được mô tả trên đây).

Fig. 6 Thể hiện các kết quả thử nghiệm. Mỗi phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được giảm đáng kể mức của c-Met, EGFR, và ERK được phosphoryl hóa ở cả 6h và 72h. Dữ liệu được trình bày trong Fig. 6 Thể hiện tầm quan trọng của sự ức chế đồng thời cả c-Met và EGFR và ái lực của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép dùng cho mỗi thụ thể đóng vai trò trong sự ức chế ERK xuôi dòng như thế nào. Các phân tử chứa các miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực cao (P54AR4-83v2; được Thể hiện là “8” trong hình vẽ, $K_D=0,26$ nM) được ức chế sự phosphoryl hóa của EGFR để mở rộng hơn so với các phân tử chứa các miền FN3 gắn kết EGFR ái lực trung bình (P53A1R5-17v2; được Thể hiện như “17” trong hình vẽ $K_D=1,9$ nM) ở cả 6h và 72h. Tất cả bốn phân tử đặc hiệu kép được thử nghiệm sự phosphoryl hóa được ức chế hoàn toàn của ERK tại thời điểm 6 giờ không liên quan đến ái lực. Tại thời điểm 72 giờ, các phân tử chứa miền gắn kết c-Met có ái lực cao (P114AR7P94-A3; được Thể hiện là “A3” trong hình vẽ $K_D=0,4$ nM) được ức chế đáng kể sự phosphoryl hóa của ERK so với ái lực trung bình miền FN3 gắn kết c-Met (P114AR5P74-A5; được Thể hiện là “A5” trong hình vẽ; $K_D=10,1$ nM; Fig. 6).

Nồng độ của mỗi phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được đo ở 6 giờ và 72 giờ sau khi định lượng trong máu và trong khối u (Fig. 7). Đáng quan tâm là phân tử đặc hiệu kép có miền gắn kết EGFR có ái lực trung bình (P53A1R5-17v2 ; $K_D=1,9$ nM) nhưng miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao (P114AR7P94-A3; $K_D=0,4$

nM) có sự tích lũy khối u nhiều hơn một cách đáng kể tại 6 giờ so với các phân tử khác, trong khi mức chênh lệch được giảm bằng 72 giờ. Có thể được giả định rằng các tế bào bên ngoài khối u có mức thấp hơn của cả biểu hiện bề mặt EGFR và c-Met và do đó phân tử EGFR có ái lực trung bình không gắn kết với mô thông thường chặt so với miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực cao. Do đó không có nhiều miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình có sẵn để gắn kết trong khối u. Do đó, nhận biết các ái lực thích hợp cho mỗi thụ thể có thể cho phép đồng nhất hóa liệu pháp điều trị có độc tố toàn thân được giảm và sự tích lũy khối u được tăng.

Nghiên cứu tính hiệu quả khối u bằng các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Chuột be SCID được cấy dưới da các tế bào NCI-H292 biểu hiện HGF của người ($2,0 \times 10^6$ tế bào trong Cultrex (Trevigen) trong 200 μ L) ở hông phía lưng của mỗi động vật. Một tuần sau khi cấy dưới da, chuột được phân thành nhóm có thể tích khối u tương đương (thể tích khối u trung bình = $77,9 \pm 1,7 \text{ mm}^3$). Chuột này được cho uống mỗi tuần ba lần bằng phân tử đặc hiệu kép và thể tích khối u được ghi hai lần mỗi tuần. Sự ức chế tăng trưởng khối u (TGI) được quan sát có bốn phân tử đặc hiệu kép khác nhau, có các ái lực biến đổi đối với c-Met và EGFR. Fig. 8 Thể hiện lợi ích ức chế cả c-Met và EGFR làm chậm sự tăng trưởng khối u được quan sát ở chuột được xử lý bằng các phân tử chứa miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực cao so với miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình khi miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực trung bình (hở so với các tam giác kín, P54AR4-83v2-P114AR5P74-A5 so với P53A1R5-17-P114AR5P74-A5). Ngoài ra, dữ liệu Thể hiện tầm quan trọng là có miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao làm phân tử đặc hiệu kép chứa miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình hoặc cao nhưng miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao được Thể hiện có hiệu quả nhất (các đường được chấm đen và xám, P54AR4-83v2-P114AR7P94-A3 và P53A1R5-17v2-P114AR7P94-A3).

Tính hiệu quả của phân tử đặc hiệu kép và các chất ức chế khác của EGFR và c-Met

Hiệu quả liệu pháp điều trị *in vivo* của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (ECB38) và các chất ức chế phân tử nhỏ crizotinib (chất ức chế c-Met) và erlotinib (chất ức chế EGFR), cetuximab (kháng thể kháng EGFR), mỗi hiệu quả điều trị dùng một chất, và sự tổ hợp của crizotinib và erlotinib, được đánh giá trong việc điều trị kiểu gộp ngoại lai bệnh ung thư phổi H292-HGF dưới da ở người trong SCID/một con chuột be.

Các tế bào H292-HGF được duy trì *in vitro* trong môi trường RPMI1640 được bổ sung huyết thanh của bào thai bò (10% v/v), và L-glutamin (2 mM) ở 37°C trong môi trường có 5% CO₂ trong không khí. Các tế bào được nuôi cấy thông thường hai lần một tuần bằng cách xử lý trypsin-EDTA. Các tế bào tăng theo pha tăng trưởng theo số mũ được thu hoạch và được tính đối với sự truyền nhiễm khối u.

Bảng 14.

Nhóm	N	Xử lý	Liều (mg/kg)	Đường dùng liều	Trình tự tiến hành	Trình tự thực tế
1	10	Đối chứng tá dược lỏng	0	tiêm qua màng bụng	QD×3 tuần	QD×3 tuần
2	10	phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép	25	tiêm qua màng bụng	3 lần/tuần ×3 tuần	3 lần/tuần ×3 tuần
3	10	Crizotinib	50	qua đường miệng	QD×3 tuần	QD×17 ngày
4	10	Erlotinib	50	qua đường miệng	QD×2 tuần	QD×3 tuần
5	10	Crizotinib	50	qua đường miệng	QD×3 tuần	QD×3 tuần
6	10	Cetuximab	1 mg/một con chuột	tiêm qua màng bụng	Q4d*6	Q4d*6

N: số lượng động vật; *p.o.*: dùng qua đường miệng; *i.p.*: tiêm qua màng bụng 3 lần/tuần: các liều được uống vào các ngày thứ 1, 3 và 5 của tuần.

QD: mỗi ngày một lần Q4d: bốn ngày một lần; một số tổ hợp của crizotinib và erlotinib là 0,5 giờ; thể tích liều được điều chỉnh dựa trên thể trọng (10 l/g); a: liều

không được đưa ra vào ngày thứ 14 sau khi tạo nhóm.

Mỗi chuột được cấy dùng dưới da tại vùng hông bên phải bằng các tế bào khối u H292-HGF (2×10^6) trong 0,1 ml PBS với cultrex (1:1) dùng cho sự tăng trưởng khối u. Việc điều trị được bắt đầu khi kích cỡ khối u trung bình đạt được 139 mm^3 . Việc dùng vật dụng thử nghiệm và số lượng động vật trong mỗi nhóm nghiên cứu được thể hiện trong trong bảng thiết kế thử nghiệm sau. Ngày truyền nhiễm tế bào khối u được ký hiệu là ngày thứ 0. Bảng 14 Thể hiện nhóm điều trị.

Trước khi bắt đầu điều trị, cân tất cả các động vật và đo thể tích khối u. Vì thể tích khối u có thể ảnh hưởng không có hiệu quả của việc điều trị đưa ra bất kỳ, chuột được chỉ định vào các nhóm bằng cách sử dụng thiết kế chặn được ngẫu nhiên dựa trên thể tích khối u của chúng. Điều này đảm bảo rằng tất cả các nhóm có thể so sánh ở đường chuẩn. Thiết kế chặn được ngẫu nhiên được sử dụng để chỉ định các động vật thử nghiệm thành nhóm. Đầu tiên, các động vật thử nghiệm được phân chia thành các khối đồng nhất theo thể tích khối u ban đầu của chúng. Thứ hai, trong phạm vi mỗi khối, sự ngẫu nhiên hóa các động vật thử nghiệm để điều trị được tiến hành. Bằng cách sử dụng thiết kế chặn được ngẫu nhiên để chỉ định các động vật thử nghiệm được đảm bảo rằng mỗi động vật có cùng tần xuất được chỉ định để việc điều trị được đưa ra và do đó lỗi hệ thống được giảm.

Tại thời điểm kiểm soát thông thường, các động vật được kiểm tra đối với các ảnh hưởng bất kỳ của sự tăng trưởng khối u và việc điều trị dựa trên tập tính thông thường, như tính lưu động, đánh giá bằng mắt thường về sự tiêu thụ thức ăn và nước uống, tăng/giảm thể trọng (các thể trọng được đo hai lần một tuần), sờ mắt/rụng tóc và ảnh hưởng bất thường khác bất kỳ.

Điểm cuối liệu tăng trưởng khối u có thể được chậm lại hoặc chuột mắc khối u có thể được điều trị. kích cỡ khối u được đo hai lần một tuần theo hai chiều bằng cách sử dụng thước kẹp, và thể tích được biểu hiện ở mm^3 bằng cách sử dụng công thức: $V = 0,5 a \times b^2$ trong đó a và b lần lượt là các đường kính dài và ngắn của khối u. Sau đó kích cỡ khối u được sử dụng dùng để tính cả hai trị số T-C và T/C. T-C được tính bằng T là thời gian (trong các ngày) được yêu cầu đối với kích cỡ

khối u trung bình của nhóm đối chứng để đạt được 1000 mm^3 , và C là thời gian (trong các ngày) đối với kích cỡ khối u trung bình của nhóm đối chứng để đạt được cùng kích cỡ. Trị số T/C (theo phần trăm) là chỉ dẫn của hiệu quả kháng khối u; T và C lần lượt là thể tích khối u trung bình của các nhóm được điều trị và đối chứng vào ngày được đưa ra. Sự thoái hóa khối u hoàn toàn (CR) được xác định làm các khối u mà được giảm xuống dưới giới hạn khi khám bệnh ($62,5 \text{ mm}^3$). Sự thoái hóa khối u một phần (PR) được xác định làm các khối u mà được giảm xuống từ thể tích khối u ban đầu. Thời gian nhỏ nhất của CR hoặc PR trong 3 hoặc nhiều hơn phép đo khối u liên tục được yêu cầu đối với CP hoặc PR để được xem xét lâu dài.

Các động vật mà thể trọng giảm vượt quá 20%, hoặc kích cỡ khối u trung bình của nhóm vượt quá 2000 mm^3 được làm chết không gây đau. Nghiên cứu được kết thúc khi hai tuần quan sát sau liều cuối cùng.

Các thống kê bản chất, bao gồm trị số trung bình và sai số tiêu chuẩn trung bình (SEM), được tạo ra cho thể tích khối u của mỗi nhóm tại mỗi thời điểm được thể hiện trong bảng 15. Các phân tích thống kê chênh lệch về thể tích khối u giữa các nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng một cách ANOVA tiếp theo là các so sánh riêng lẻ bằng cách sử dụng Games-Howell (biến đổi tương đương được được giả định). Tất cả các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng SPSS 18,0. $p < 0,05$ được xem xét là có ý nghĩa thống kê.

Bảng 15.

Ngày	Thể tích khối u (mm^3) a					
	Tả được lỏng	Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép 25mg/kg	Crizotinib 50mg/kg	Erlotinib 50mg/kg	Crizotinib; Erlotinib 50mg/kg; 50mg/kg	Cetuximab 1 mg/một con chuột
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

Kích cỡ khối u trung bình của nhóm được điều trị bằng tá dược lỏng (nhóm 1) đạt được 1,758 mm³ vào ngày thứ 23 sau khi truyền nhiễm khối u. Việc điều trị bằng phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép ở mức liều là 25 mg/kg (nhóm 2) dẫn sự thoái hóa khối u hoàn toàn (CR) trong tất cả chuột mà kéo dài trong 3 phép đo khối u liên tục (TV trung bình = 23 mm³, trị số T/C = 1%, $p = 0,004$ so với nhóm tá dược lỏng vào ngày thứ 23).

Việc điều trị bằng crizotinib làm một chất ở mức liều là 50 mg/kg (nhóm 3) được thể hiện không có hoạt tính kháng khối u; kích cỡ khối u trung bình là 2,102 mm³ vào ngày thứ 23 (trị số T/C = 120%, $p = 0,944$ so với nhóm tá dược lỏng).

Việc điều trị bằng erlotinib làm một chất ở mức liều là 50 mg/kg (nhóm 4) được thể hiện hoạt tính kháng khối u nhỏ, nhưng sự chênh lệch không đáng kể được phát hiện so với nhóm tá dược lỏng; kích cỡ khối u trung bình là 1,122 mm³ vào ngày thứ 23 (trị số T/C = 64%, $p = 0,429$ so với nhóm tá dược lỏng), với 4 ngày làm chậm sự tăng trưởng khối u ở kích cỡ khối u là 1,000 mm³ so với nhóm tá dược lỏng.

Sự tổ hợp của crizotinib (50 mg/kg, nhóm 5) và erlotinib (50 mg/kg, nhóm 5) được thể hiện hoạt tính kháng khối u đáng kể; kích cỡ khối u trung bình là 265 mm³ vào ngày thứ 23 (T/C = 15%; $p = 0,008$), với 17 ngày làm chậm sự tăng trưởng khối u ở kích cỡ khối u là 1,000 mm³ so với nhóm tá dược lỏng.

Cetuximab ở mức liều là 1 mg/một con chuột làm một chất (nhóm 6) được thể hiện các hoạt tính kháng khối u đáng kể; kích cỡ khối u trung bình là 485 mm³ vào ngày thứ 23 (T/C = 28%; $p = 0,018$), với 17 ngày làm chậm sự tăng trưởng khối u ở kích cỡ khối u là 1,000 mm³ so với nhóm tá dược lỏng. Fig. 9 và bảng 16 thể hiện các hoạt tính kháng khối u của các liệu pháp điều trị khác nhau. Bảng 16.

Việc điều trị	Kích cỡ khối u (mm ³) vào ngày thứ 23	T/C (%)	T-C (ngày) ở 1000 mm ³	Trị số P
Tá được lỏng	1758±259	--	--	--
Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (25mg/kg)	23±7	1	--	0,004
Crizotinib (50mg/kg)	2102±298	120	-1	0,944
Erlotinib (50mg/kg)	1122±202	64	4	0,429
Crizotinib+ Erlotinib (50mg/kg+50mg/kg)	265±40	15	17	0,008
Cetuximab (1 mg/một con chuột)	485±61	28	17	0,018

Môi trường để giảm thể trọng trầm trọng được quan sát ở nhóm tá được lỏng mà có thể là do các khối u tăng; 3 chuột chết và 1 chuột được làm chết không gây đau khi $BWL > 20\%$ vào ngày thứ 23. Độc tố nhẹ của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được quan sát ở nhóm 2; 3 chuột được làm chết không gây đau khi $BWL > 20\%$ trong suốt khoảng thời gian điều trị; thể trọng được khôi phục dần dần khi điều trị được bỏ qua trong giai đoạn quan sát là 2 tuần. Giảm thể trọng trầm trọng hơn được quan sát trong nhóm đơn trị liệu crizotinib hoặc erlotinib so với nhóm tá được lỏng, đề xuất việc điều trị liên quan đến độc tố. Sự tổ hợp của crizotinib và erlotinib thường được dung hợp trong pha liều, nhưng giảm thể trọng trầm trọng được quan sát ở cuối nghiên cứu, mà có thể là do khôi phục sự tăng trưởng khối u nhanh trong giai đoạn không điều trị. Đơn trị liệu của cetuximab cũng được dung hợp trong nghiên cứu; sự giảm thể trọng chỉ được quan sát ở cuối nghiên cứu do sự khôi phục sự tăng trưởng khối u.

Tóm lại, phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép ở 25 mg/kg (3 lần/tuần x 3 tuần) được sản sinh đáp ứng hoàn toàn theo kiểu ghép ngoại lai ung thư H292-HGF của người trong SCID/một con chuột be. Việc điều trị được dung hợp ở 7 trong số 10 chuột, và dẫn đến giảm thể trọng trầm trọng ở 3 trong số 10 chuột. Fig. 9 Thể hiện

ảnh hưởng của các liệu pháp điều trị khác nhau dựa trên kích cỡ khối u trong thời điểm sau khi việc điều trị.

Ví dụ 8: Sự kéo dài chu kỳ bán hủy của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Nhiều các phương pháp đã được mô tả để lọc thận và do đó kéo dài chu kỳ bán hủy huyết thanh của các protein bao gồm sự biến tính với polyetylen glycol (PEG) hoặc polyme khác, liên kết với albumin, dung hợp với các vùng protein mà liên kết với albumin hoặc các protein huyết thanh khác, gen dung hợp với albumin, dung hợp với các miền IgG Fc, và dung hợp với các trình tự axit amin không tạo cấu trúc dài.

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được biến đổi bằng PEG để tăng bán kính động lực bằng cách kết hợp xystein tự do ở đầu C của phân tử. Thông thường nhất, nhóm thiol tự do của gốc xystein được sử dụng để gắn các phân tử PEG mà được chức năng hóa bằng các nhóm maleimit hoặc iodoacetemit bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Các dạng khác nhau của PEG có thể được sử dụng để biến đổi protein bao gồm PEG tuyến tính 1000, 2000, 5000, 10,000, 20,000, hoặc 40,000 kDa. Các phân tử được phân nhánh PEG có các trọng lượng phân tử này cũng có thể được sử dụng dùng để biến tính. Các nhóm PEG cũng có thể được gắn thông qua các amin ban đầu trong các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép trong một số trường hợp.

Ngoài ra để PEGylation, chu kỳ bán hủy của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kéo dài bằng cách tạo ra các protein này làm các phân tử dung hợp với miền gắn kết albumin huyết thanh dạng khối 3-helix xuất hiện tự nhiên (ABD) hoặc miền gắn kết albumin liên ứng (ABDCon). Các protein này được liên kết với đầu C của miền FN3 gắn kết c-Met thông qua bất kỳ các liên kết được mô tả trong bảng 12. Miền ABD hoặc ABDCon cũng có thể được đặt giữa miền FN3 gắn kết EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met trong trình tự ban đầu. trong một số trường hợp, albumin hoặc biến thể albumin (SEQ ID NO: 189) được liên kết với các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép với đầu C của miền FN3 gắn kết c-Met.

Ví dụ 9: Đặc trưng của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép chọn lọc

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép chọn lọc được đặc trưng đối với ái lực của chúng với cả EGFR và c-Met, khả năng của chúng để ức chế Sự tự phosphoryl hóa EGFR và c-Met, và ảnh hưởng của chúng đối với sự tăng sinh của các tế bào HGF. Ái lực gắn kết của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép với miền ngoại bào EGFR và/hoặc c-Met tái tổ hợp còn được phân tích bằng các phương pháp cộng hưởng bề mặt plasmon bằng cách sử dụng Proteon Instrument (BioRad) theo định chuẩn được mô tả trong Ví dụ 3. Các kết quả đặc trưng được Thể hiện trong bảng 17.

Bảng 17.

Phân tử	K _D (EGFR, nM)	K _D (c- Met, nM)	Ức chế pMet trong các tế bào H441 (IC ₅₀ , nM)	Ức chế pEGFR trong các tế bào H292 (IC ₅₀ , nM)	Ức chế sự tăng sinh H292-HGF trong Các tế bào H292 cảm ứng bởi HGF (IC ₅₀ , nM)
ECB15	0,2	2,6	n/a	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
ECB168	0,4	0,32			3,1
ECB158*	0,9	0,58			10,8

*ECB158 là ECB168 được tiếp hợp với biến thể albumin huyết thành C34S ở người thông qua chất liên kết (GGGGS)₂ của SEQ ID NO: 224

Ví dụ 10. Paratop của miền FN3 gắn kết c-Met và EGFR

Một loạt đột biến được thực hiện với phân tử P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27) để xác định các gốc quan trọng dùng để liên kết với miền ngoại bào EGFR. Đối với phân tích này, mỗi vị trí axit amin trong các vòng BC và FG được biến đổi

thành vị trí alanin tại thời điểm để tạo ra 18 phân tử mới. Ái lực mà các đột biến này liên kết với EGFR được xác định trước bằng cách Phân tích SPR bằng cách sử dụng dụng cụ đo Proteon. Các kết quả được Thể hiện trong bảng 18. 10 vị trí dẫn đến giảm ái lực gắn kết lớn hơn gấp 10 lần Thể hiện rằng các vị trí này góp phần liên kết với EGFR. Sự biến đổi số lần cho biết sự biến đổi số lần của trị số K_D của một biến thể khi so với P54AR4-83v2 gốc. Tổ hợp của các gốc từ các vòng BC và FG tạo ra bề mặt gắn kết. 10 các vị trí được Thể hiện liên kết yếu với EGFR lớn hơn 10 lần, và 5 các vị trí được Thể hiện để liên kết yếu với EGFR lớn hơn 100 lần (D23, F27, Y28, V77, G85). Ngoài ra các phân tử P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 và P54AR4-83v23 gắn kết với P54AR4-83v2, EGFR (lần lượt là các SEQ ID NO: 21, 25, 107, 108 và 109) có các gốc giống nhau tại các vị trí paratop mà gắn kết EGFR yếu lớn hơn 100 lần khi được biến đổi. Một vài phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được sản sinh bao gồm P54AR4-83v2, P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 hoặc P54AR4-83v2 làm miền FN3 gắn kết EGFR của chung như được Thể hiện trong bảng 10.

Bảng 18.

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

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

Tương tự như vậy, một loạt đột biến được thực hiện với bề mặt tương tác c-Met được giả định của phân tử P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41) để xác định các vị trí quan trọng cho gắn kết đích. Sự phân tích này được thực hiện trong ngữ cảnh của phân tử đặc hiệu kép ECB15 (SEQ ID NO: 145) và serin được sử dụng làm phân tử thay thế thay alanin như được mô tả trên đây. Serin được chọn để làm giảm tính kỵ nước của các đột biến thu được. Bảng 19 mô tả các kết quả SPR với sự đánh số mỗi vị trí đột biến so với vị trí của phân tử A3 (SEQ ID NO: 41). 7 vị trí được thể hiện liên kết yếu với c-Met lớn hơn 10 lần. Không có gắn kết đo được đối với các đột biến M72S, R34S, và đột biến I79S. F38S được giảm gắn kết với c-Met lớn hơn 100 lần. Dữ liệu này chứng minh rằng các vị trí góp phần gắn kết c-Met được phân bố trong sợi C, sợi F, vòng CD, và vòng FG. Sự biến đổi số lần cho biết sự biến đổi số lần của trị số K_D của một biến thể khi so với P114AR7P95-A3 gốc. Ngoài ra P95-D3, P114AR7P95-F10 và P114AR7P95-H8 (lần lượt là các SEQ ID NO: 34, 44, 47 và 49) có các gốc giống nhau tại các vị trí paratop mà gắn kết c-Met yếu lớn hơn 100 lần khi được biến đổi.

Bảng 19.

Mẫu	SEQ ID NO:	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	Sự biến đổi số lần
ECB15	145	3,51E+05	1,33E-04	0,4	1
A3 K78S	212	4,40E+05	1,50E-04	0,3	0,75
A3 G40S	213	1,85E+05	3,20E-04	1,7	4,25
A3 L39S	214	4,75E+05	1,27E-03	2,7	6,75
A3 V68S	215	3,29E+05	1,20E-03	3,6	9
A3 N70S	216	4,25E+05	2,49E-03	5,9	14,75
A3 P81S	217	3,21E+05	5,36E-04	1,7	4,25

A3 F36S	218	1,88E+05	5,12E-03	27,2	68
A3 W32S	219	2,89E+05	8,60E-03	29,8	74,5
A3 M72S	220	-	-	-	
A3 R34S	221	-	-	-	
A3 F38S	222	4,51E+04	3,23E-02	717	1792,5
A3 I79S	223	-	-	-	

Ví dụ 11. Ức chế sự tăng trưởng tế bào khối u ở người bằng các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Ức chế sự tăng trưởng tế bào khối u ở người được đánh giá trong canh trường gắn kết tiêu chuẩn như được mô tả trong Ví dụ 3 hoặc 6, hoặc ở các điều kiện gắn kết yếu. Để đánh giá sự sống sót trong các điều kiện gắn kết yếu, các tế bào được đặt trong các đĩa có 96 giếng Ultra Low Attachment (Corning Costar) trong môi trường RPMI 50 μ L/giếng (Invitrogen) chứa GlutaMAX và 25mM Hepes, được bổ sung 1 mM natri pyruvat (Gibco), 0,1 mM NEAA (Gibco), và 10% huyết thanh của bào thai bò không được kích hoạt bởi nhiệt (Gibco), và cho phép gắn qua đêm tại 37°C, 5% CO₂. Các tế bào được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của các kháng thể (nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,035 đến 700 nM), cùng với HGF (7,5 ng/mL, các hệ thống R&D cat# 294-HGN), sau đó được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong khoảng 72 giờ. Một số giếng không được xử lý để lại với HGF hoặc các kháng thể làm các mẫu đối chứng. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách sử dụng thuốc thử CellTiter-Glo® (Promega), và dữ liệu được phân tích như được mô tả trên đây trong Ví dụ 3 “ức chế sự tăng trưởng tế bào khối u ở người (thử nghiệm tăng trưởng NCI-H292 và tăng trưởng NCI-H322)”, loại trừ các hợp chất dung giải tế bào được chuyển nạp vào các đĩa được xử lý nuôi cấy mô trắng đục có 96 giếng (PerkinElmer) trước khi đọc phát quang.

Dòng tế bào được phân lập làm một bộ đáp ứng mạnh đối với Phân tử đặc hiệu kép EGFR/c-Met trong các trường hợp nêu trên khi ức chế tối đa sự tăng trưởng tế bào > 40% và IC₅₀ tương đối < 5 mM.

Hoạt tính ức chế ECB15 được đánh giá ở nhiều dòng tế bào có kiểu đại, EGFR được khuếch đại hoặc đột biến và c-Met kiểu đại hoặc được khuếch đại.

ECB15 được sức chế sự tăng trưởng tế bào khối u của các dòng tế bào được Thể hiện trong bảng 20. ECB15 cũng được ức chế sự tăng trưởng của dòng tế bào NCI-H1975 có đột biến T790M mà đã được Thể hiện dẫn đến sự kháng đối với các TKI như erlotinib.

Bảng 20.

Dòng tế bào	Tuyến mô học	EGFR	c-Met
NCI-H1650	Ung thư biểu mô tuyến phế quản-phế nang	Del(E746, A750)	WT
SKMES-1	Có vảy	WT	WT
NCI-H1563	Ung thư biểu mô tuyến		
GLC-82	Ung thư biểu mô tuyến		
Calu-3	Ung thư biểu mô tuyến		
NCI-H1573	Ung thư biểu mô tuyến	AMP	AMP
NCI-H1435	NSCLC		
NCI-H1975	NSCLC	L858R; T790M	WT
NCI-H1666	ung thư biểu mô tuyến phế quản-phế nang		
HCC2935	NSCLC	del (E746 - T751), S752I	
HCC4006	Ung thư biểu mô tuyến	del(L747 - E749), A750P	
H292	Biểu bì nhày	WT	WT
H322	Ung thư biểu mô tuyến	WT	WT
HCC827	Ung thư biểu mô tuyến	del (E746, A750); AMP	WT
H596	Tuyến-vảy hỗn hợp	WT	Mất Exon 14
H1869	Có vảy	WT	WT

WT: kiểu đại

AMP: được khuếch đại

Del: sự mất

Danh mục trình tự

SEQ ID NO:	Kiểu	Loại	Mô tả	Trình tự
1	PRT	Nhân tạo	Tencon	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	DNA	Nhân tạo	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	DNA	Nhân tạo	TC5'toFG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	DNA	Nhân tạo	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	DNA	Nhân tạo	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	DNA	Nhân tạo	TCF7	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	DNA	Nhân tạo	TCF8	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	DNA	Nhân tạo	TCF9	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	DNA	Nhân tạo	TCF10	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	DNA	Nhân tạo	TCF11	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	DNA	Nhân tạo	TCF12	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
12	DNA	Nhân tạo	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCGCGAGACAG

13	DNA	Nhân tạo	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	DNA	Nhân tạo	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	DNA	Nhân tạo	Tcon5new 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGGT GACCACCGGTGGTGAATTCGCGAGACAG
16	DNA	Nhân tạo	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	DNA	Nhân tạo	LS1008	TTTGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCAAC TGATCTTCACCAAC
18	PRT	Nhân tạo	P53A1R5- 17 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKGGEAINLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

19	PRT	Nhân tạo	P54AR4-17 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Nhân tạo	P54AR4-47 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	Nhân tạo	P54AR4-48 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Nhân tạo	P54AR4-37 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Nhân tạo	54AR4-74 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Nhân tạo	P54AR4-81 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83 không có met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQES KVGAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSY VFEHDMVLPPLSAEFTT
27	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v2 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31v2 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQES KVGIAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSY VFEHDMVLPPLSAIFTT
29	PRT	Nhân tạo	P54AR4-73v2 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	DNA	Nhân tạo	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC GAA AAA C
31	DNA	Nhân tạo	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	Nhân tạo	P114AR5P74- A5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VVGGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYVNIILGVKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	Nhân tạo	P114AR5P75- E9	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFL RSGEIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYWVILGVKGG VSTPLSAIFTT
34	PRT	Nhân tạo	P114AR7P92- F3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYIVNIMGVKGGSI SHPLSAIFTT

35	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 2-F6	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGGL SVPLSAIFTT
36	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 2-G8	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLG SGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWQILGVKGGYISI PLSAIFTT
37	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 2-H5	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLL GGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWQIMGVKGGTVS PPLSAIFTT
38	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 3-D11	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVVGINGVKGGYI SYPLSAIFTT
39	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 3-G8	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTDLKPGTEYGVTINGVKGGRV STPLSAIFTT
40	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 3-H9	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
41	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 4-A3	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
42	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 4-E5	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYAVNIMGVKGGRV SVPLSAIFTT
43	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-B9	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWQILGVKGGSI SVPLSAIFTT
44	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-D3	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGSI SYPLSAIFTT
45	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-D4	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWQILGVKGGYI SIPLSAIFTT
46	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-E3	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWQIMGVKGGTV SPPLSAIFTT
47	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-F10	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTT AGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGGIS PPLSAIFTT
48	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-G7	LPAPKNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLS TGEIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGGIS PPLSAIFTT

49	PRT	Nhân tạo	P114AR7P9 5-H8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGSI SPPLSAIFTT
50	PRT	Nhân tạo	ECB1	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVV VGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI VPLSAIFTT
51	PRT	Nhân tạo	ECB2	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL PAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKIS PPLSAIFTT
52	PRT	Nhân tạo	ECB3	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
53	PRT	Nhân tạo	ECB4	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLLR SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGGLVS TPLSAIFTT
54	PRT	Nhân tạo	ECB5	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
55	PRT	Nhân tạo	ECB6	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
56	PRT	Nhân tạo	ECB7	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT

57	PRT	Nhân tạo	ECB15	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Nhân tạo	ECB27	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYDEVVVGGEAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISVPLSAIFTT
59	PRT	Nhân tạo	ECB60	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPKNLVSRVT EDSARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSE RSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
60	PRT	Nhân tạo	ECB37	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYDEVVVGGEAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISVPLSAIFTT
61	PRT	Nhân tạo	ECB94	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
62	PRT	Nhân tạo	ECB95	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVGSGEAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
63	PRT	Nhân tạo	ECB96	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVSKGDAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
64	PRT	Nhân tạo	ECB97	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGKISPPLSAIFTT

65	PRT	Nhân tạo	ECB106	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSE YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
66	PRT	Nhân tạo	ECB107	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVGSGEIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
67	PRT	Nhân tạo	ECB108	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVSKGDAIVLTPGSE YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
68	PRT	Nhân tạo	ECB109	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSE YDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGKISPPLSAIFTT
69	PRT	Nhân tạo	ECB118	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSE YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
70	PRT	Nhân tạo	ECB119	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVGSGEIVLTPGSE SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
71	PRT	Nhân tạo	ECB120	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFVSKGDAIVLTPGSE YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
72	PRT	Nhân tạo	ECB121	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSEFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSE YDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGKISPPLSAIFTT

SEQ ID NO: 73, PRT, Người thông tuệ, EGFR

1 mrpsgtagaa llallaalcp asraleekkv cqgtsnklq lgtfedhfls lqrmfnncev
61 vlgnleityv qrnyslflk tiqevagyvl ialntverip lenlqiirgn myensyala
121 vlsnydankt glkelpmrnl qeilhgavrf snnpalcne siqwrdivss dflsnmsmdf
181 qnhlgscqkc dpscpngscw gageencqkl tkiicaqqcs grcrgkspsd cchnqcaagc
241 tgpresdclv crkfrdeatc kdtcpplmly npttyqmdvn pegkysfgat cvkkcprnyv

301 vtdhgscvra cgadsyemee dgvrkckkce gpcrkvcngi gigefkdsls inatnikhfk
 361 nctsisgdldh ilpvafrgds fthttppldpq eldilkvtke itgflligaw penrtdlhaf
 421 enleiirgrt kqhgqfslav vslnitslgl rslkeisdgd viisgnknlc yantinwkl
 481 fgtsgqtki isnrgensck atgqvchalc spegcwgpep rdcvscrns rgrecvdkcn
 541 llegeprefv enseciqchp eclpqamnit ctgrgpdnci qcahyidgph cvktcpagvm
 601 genntlvwky adaghvchlc hpnctygctg pglegcptng pkipsiatgm vgalllllv
 661 algiglfmrr rhivrkrtr rllqerelve pltpsgeapn qallrilket efkkikvlgs
 721 gafgtvykgl wipegekvi pvaikelrea tspkankeil deayvmasvd nphvcrlgi
 781 cltstvqlit qlmpfgclld yvrehkdng sqyllnwcvq iakgmnyled rrlvhrdlaa
 841 rnlvltkpqh vkitdfglak llgaekeyh aeggkvpikw malesilhri ythqsdvwsy
 901 gvtvwelmtf gskpydgipa seissilekg erlpqppict idvymimvkc wmidadsrp
 961 freliiefsk mardpqrylv iqgdermhlp sptdsnfya lmdeedmddv vdadeylipq
 1021 qgffsspsts rtpllsslsa tsnnstvaci drnglqscpi kedsflqrys sdptgalted
 1081 siddtflpvp eyinqsvpkr pagsvqnpvy hnqplnpaps rdphyqdphs tavgnpeyln
 1141 tvqptcvnst fdspahwaqk gshqisldnp dyqqdffpke akpngifkgs taenaeylr
 1201 apqssefiga

74	PRT	Người thông tuệ	EGF	NSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGIG ERCQYRDLKWWELR

SEQ ID NO: 75, PRT, Người thông tuệ, Tenasxin-C

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvyniklpv
 61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfgeh tvdgenqivf thriniprra cgcaaapdvk
 121 ellsrleele nlvsslreqc tagagcclqp atgrldtrpf csgrgnfste gcgcvccepww
 181 kgpncsepec pgnchlrgc idgqcicddg ftgedcsqia cpsdcndqgk cvngvcicfe
 241 gyagadcsre icpvpceeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn rgrcvenecv
 301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq
 361 cvcdegfagv dcsekrpad chnrgrcvdg rcecdgftg adcgelkcpn gcsghgrcnv
 421 ggcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceggf kgydcscmsc pndchqhgrc
 481 vngmcvddg ytgedcrdrq cprdcnrgl cvdggqvcdd gftgpdcael scpndchgqg
 541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgq grcvdggqic hegftgldeg qhscpsdcnn

601 lgqcvsgrci cnegysgedc sevspkdlv vtevteetvn lawdnemrvt eylvvytpth
 661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapeglkf
 721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifrnmm kedegaitks lrrpetsyrq tglapggqey
 781 islhivknnt rgpglkrvtt trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltygik
 841 dvpqdrttid ltedenqysi gnlkpdeye vslisrrgdm ssnpaketft tgldaprnlr
 901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte
 961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpa kfdryrlmys
 1021 lptgqwgvgvq lprnttsyvl rglepgqeyn vlltaekgrh kskparvkas teqapelenl
 1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy
 1141 tvsiygvigq yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda lklnwtapeg ayeyffiqvq
 1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitingvtq dfsttplsve vlteevpdmg
 1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt
 1321 pyvtlthgev rghstrplav evvtedlpql gdavsevgw dglrlnwtaa dnayehfviq
 1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls aeastakepe
 1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrllle tveynisgae rtahisglpp
 1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm asenafdsfl
 1561 vtvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp lraeivteae
 1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vlkirdtkkq sepleitlla pertrditgl
 1681 reateyeiel ygiskgrrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw raptaqvesf
 1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsi amkgfeesep vsgsfttald
 1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrvtsgntv eyaltdlepa
 1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdlstatevqs etalltwrpp rasvtgyllv
 1921 yesvdgtvke vivgpdttisy sladlspsth ytakiqalng plrsnmiqti fttigllypf
 1981 pkdcsgamln gdttsglyti ylngdkaeal evfcdmtsdg ggwivflrrk ngrenfyqnw
 2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaaggqy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk
 2101 lkvegysgta gdsamayhngv sfstfdkdtd saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd
 2161 nnhsqgvnwf hwkghehsig faemklrpsn frnlegrrkr a

76	PRT	Nhân tạo	Fibcon	Ldaptldlqvtntvdtstsvtwtppsatisitgyritytpsngpgpekelvtppsststv titgltpgvveywslyalkdnqespllvgtqt
77	PRT	Nhân tạo	Miền 10th FN3 của fibronectin (FN10)	VSDVPRDLVEVAATPTSLLIISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITIVYAVTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	Nhân tạo	Liên kết	GSGS
79	PRT	Nhân tạo	Liên kết	GGGGSGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
80	PRT	Nhân tạo	Liên kết	APAP
81	PRT	Nhân tạo	Liên kết	APAPAPAPAP
82	PRT	Nhân tạo	Liên kết	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Nhân tạo	Liên kết	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPA PAP

84	PRT	Nhân tạo	Liên kết	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	Nhân tạo	Vòng Tecon BC	TAPDAAFD
86	PRT	Nhân tạo	Vòng Tecon GF	KGGHRSN
87	PRT	Nhân tạo	Vòng P53A1R5-17 BC	ADPHGFYD
88	PRT	Nhân tạo	Vòng P54A4-17 BC	TYDRDGYD
89	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-47 BC	WDPF SFYD
90	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-48 BC	DDPRGFYE
91	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-73 BC	TWPYADLD
92	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-74 BC	GYNGDHFD

93	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-81 BC	DYDLGVYD
94	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-83 BC	DDPWDFYE
95	PRT	Nhân tạo	Các vòng FG của	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	Nhân tạo	Các vòng FG của	LGSYVFEHDVM
97	DNA	Nhân tạo	>EGFR phần ECB97; P54AR4-83v2 không có met	Atgttgccagcgcgcaagaacctggtagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtggcggttctacgagagcttct gatccagtatcaagagagcgagaaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgccccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccggtctgcctctgagcgccatttccacc
98	DNA	Nhân tạo	>EGFR phần ECB15; P54AR4-83v2 không có met	Atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcgccgcctgagctgggacgacccgtggcggttctatgagctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcggaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgtcctacgatctgaccggcctgaaacggg gtacggagtacacggtgtccatttcagggtgttcacaatgtgtataagac accaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgatttccacc
99	PRT	Nhân tạo	tencon 27	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGIAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	Nhân tạo	Thư viện TCL14	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXXGIAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

>SEQ ID NO: 101

PRT

Người thông tuệ

cMet

```

1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvnmk yqlpnftaet piqnvilheh
61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg vwkdinmal
121 vvdtyyddql iscgsvnrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc ifspqieeps qcpdcvvsal
181 gakvlssvkd rfinffvgnt inssyfpdhp lhsisvrllk etkdgfmflt dqsyidvlpe
241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriir fcsinsglhs ymemplecil
301 tekrrkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk pdsaepmdrs
361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqhfy gpnhehcfnr tllrnssgce arrdeyrtef
421 ttalqrvdfl mgqfsevlit sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvsrs gpstphvnfl
481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplnglgc rhfqscsqcl sappfvqcgw
541 chdkcwrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf rrnnkfdlkk
601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhfnmsiii snghgttqys tfsyvdpvit
661 sispkygpma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svnsilecy tpaqtistef
721 avklkidlan retsifsyre dpivyeihpt ksfristwke plnivsflfc fasggstitg
781 vgknlsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsenseicct tpslqqnlq lplktkaffm
841 ldgilskyfd liyvhnvpvk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg evlkgvknsc
901 enihlhseav lctvpndllk lnseiniwk qaisstvlkg vivqpqnft gliagvvsis
961 tallllllgff lwlkkrkqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvsnesvd
1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspllqntvh idlsalnpel
1081 vqavqhvvg psslivhfne vigrghfgcv yhgtilldng kkihcaavksl nritdigevs
1141 qfltegiimk dfshpnvls lgciclrsegs plvvlpymkh gdlnrfirne thnptvkdli
1201 gfglqvakgm kylaskkfvd rdlaarnclm dekftvkvad fglardmydk eyysvhnktg
1261 aklpvkwmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtgap pypdvntfdi tvyllqgrrl
1321 lqpeycpdl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrisaifs tfigehyvvh natyvvnkcv
1381 apypslsle dnaddevdtr pasfwets

```

102	PRT	Người thông tuệ	HGF	QKRNRNTHFEKKS AKTTLKIDPALKIK TKKVNTADQCANRCTRNGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMS SGVKKEFGHEFDLYE NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG KDLQENYCRNP RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVC DIPQCSEVECMTNGESYRGLMDH TESGKICQRWDHQTP HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIK TCADNTMNDTDVPL ETTECIQQGGEYRGTVNTMNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKC KDLRENYCRNPDGS ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNKKNYMGNLSQT RSLTCSMWDKNME DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPIS RCEGDTTPTIVNL DHPVISCAKTQLRVVNGIPTRTNIGWMMVSLRYRNKHICGGSLIKESW VLTARQC FPSRD LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQVLVYGPEGSDLVLMKLAR PAVLDDFVSTIDL NYGCTIPEKTSCSVYGWYTG LNYDGLLRVAHLYMNGNEKCSQHHRG KVTLNESEICAG AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIPGRGCAIPNRP GIV RVAYYAKWIIHII LTYKVPQS
103	DNA	Nhân tạo	>cMET phần ECB97; P114AR7P95- C5v2	Ctgcggctccgaagaacttggtgagccgtgtaccgaagatagc gcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcggtcgatagcttctgg attcgctatttgagtttctgggtagcggtagggcaattgttctgacggtgcc gggctctgaacgctcctacgattgaccggctgaaaccgggcaccga gtatggtgaacattctgagcgtaaggcggtagcatcagcccaccg ctgagcgcatcttcacgactggtggtgc
104	DNA	Nhân tạo	>cMET phần ECB15; P114AR7P94-A3	Ctgcggcaccgaagaacctggtgtcagccgtgtgaccgaggatag cgacggttgagctggaccgctccggatgcagccttgacagcttctgga ttcgttactttgaatttctggtagcggtagggcgatcgttctgacggtgccg ggctctgaacgcagctatgattgacgggcctgaagccgggtactgagt acgtggtaacatcatggcggttaagggtggtaaaatcagcccgcatt gtccgcgatctttaccacg
105	PRT	Nhân tạo	Liên kết	GGGGS
106	PRT	Nhân tạo	ECB91	mlpapknlvsevtedsarlswddpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgse rsydtglkpgteytsiygvhnvykdnirglplsaifttapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLT PGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGGISPPLSAIFTT
107	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v2	lpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteytsiygvhnvykdnmrglplsaiftt

108	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v22	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsers ydlglkpgteytsiygvhnvykdnirglpsaiftt
109	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v23	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersy dlglkpgteytsiygvhnvykdnirglpsaiftt
110	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v22	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersy dlglkpgteytsiygvhnvykdnirglpsaiftt
111	PRT	Nhân tạo	P114AR7P94-A3v22	lpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfeglsgeaivltvpgsersy dlglkpgteyvvnlgvgkgsispplsaiiftt
112	PRT	Nhân tạo	P114AR9P121-A6v2	LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGSISPPLSAIFTT
113	PRT	Nhân tạo	P114AR9P122-A7v2	LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILGVKGGSISPPLSAIFTT
114	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-C5v2	LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLSGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVNVILSVKGGSISPPLSAIFTT
115	DNA	Nhân tạo	ECB97	atgttgccagcgcgaagaacctggtagtagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtggcggttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtctgac cgtcccgggctccgagcgttctacgacctgaccggttgaagccgggt accgagtatacggtagcatctacggtgtcacatgtctataaggaca ctaatacccggtctgcctctgagcgccatttaccaccgcaccggc accggctccggctcctgccccgctgcccggctccgaagaacttggtggtg agccgtgtaccgaagatagcgacgcctgagctggacggcaccgga tgccggtgtgagcttctggttgcgtatcttgaattctggtagcggtga ggcaattgtctgacggtgcccggctctgaacgctctacgattgacg gtctgaaaccgggcaccgagtagtggtgaacattctgagcgtaagg cgtagcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggtgc
116	DNA	Nhân tạo	ECB15	atgtgcccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggac agcgcgcgcctgagctgggacgacccgtggcggttctatgagctttcct gattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgctctgac cgtcccgggtagcgagcgtcctacgactgacggcctgaaaccggg tacggagtacacggtgtccatttacggtgtcacatgtgtataaagaca ccaacatgcgtggcctgcccgtgtcggcgatttaccaccgcgcctgc gccagcgctgcaccggctccgctgcccggcaccgaagaacctggtgt cagccgtgtgaccgagtagcgacggtttagctggaccgctccgga tgacgctttgacagcttctggttgcgtatcttgaattctggtagcggtg aggcgatcgttctgacggtgcccggctctgaacgcagctatgattgacg ggcctgaagccgggtactgagtagctggttaacatcatggcggttaagg gtggtaaaatcagcccgcattgtccgcgactttaccacg
117	PRT	Nhân tạo	Miễn gắn kết albumin	tidewllkeakekaieelkkagitsdydfldlinkaktvegynalkdeilka

118	PRT	Nhân tạo	ECB18	mlpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekevgeaivltv pgsersydlgtlpgtetytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydlgtlpgtetyyvnlgvkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp
119	PRT	Nhân tạo	ECB28	mlpapknlvvsevtedsarlswwdphgfydsfliqyqesekevgeaivltv pgsersydlgtlpgtetytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydlgtlpgtetyyvnlgvkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp
120	PRT	Nhân tạo	ECB38	mlpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekevgeaivltv pgsersydlgtlpgtetytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltv pgsersydlgtlpgtetyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp
121	PRT	Nhân tạo	ECB39	mlpapknlvvsevtedsarlswwdphgfydsfliqyqesekevgeaivltv pgsersydlgtlpgtetytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltv pgsersydlgtlpgtetyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp
122	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Nhân tạo	P54AR4-47 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Nhân tạo	P54AR4-47 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
125	PRT	Nhân tạo	P54AR4-48 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
126	PRT	Nhân tạo	P54AR4-73 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	Nhân tạo	P54AR4-74 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
128	PRT	Nhân tạo	P54AR4-81 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQY QSEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

130	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFD SFLIQY QESEKVGEAINLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDMPLPLSAEFTT
131	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v2 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
132	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31v2 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFD SFLIQY QESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDMPLPLSAIFTT
133	PRT	Nhân tạo	P54AR4-73v2 có Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
134	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v2 có Met	mlpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytsiygvhnvykdtnmrglplsaifft
135	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v2 có Met	mlpapknlvsevtedsarlswddpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgse rsydtglkpgteytsiygvhnvykdtnirglplsaifft
136	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v23 có Met	mlpapknlvsevtedsarlswddphafyesfliqqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytsiygvhnvykdtnirglplsaifft
137	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v22 có Met	mlpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytsiygvhnvykdtnirglplsaifft
138	PRT	Nhân tạo	ECB1 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYDEVVGGGEAIVLTPGSESYDLTGLKPG TEYYVNILGVKGG SISVPLSAIFTT
139	PRT	Nhân tạo	ECB2 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGT EYVVMIMGVKGGKISPPLSAIFTT
140	PRT	Nhân tạo	ECB3 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSESYDLTGLKPG TEYVQIIIGVKGGHISLPLSAIFTT

141	PRT	Nhân tạo	ECB4 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFFIRYDEFRLSGEIVLTPGSESYDLTGLKPGT EYVVTILGVKGGVSTPLSAIFTT
142	PRT	Nhân tạo	ECB5 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSESYDLTGLKPG TEYVWNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
143	PRT	Nhân tạo	ECB6 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSESYDLTGLKPG TEYVWQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
144	PRT	Nhân tạo	ECB7 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTPGSESYDLTGLKPG TEYVWQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
145	PRT	Nhân tạo	ECB15 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
146	PRT	Nhân tạo	ECB27 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWVG EIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SVPLSAIFTT
147	PRT	Nhân tạo	ECB60 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPK NLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGG KISPPLSAIFTT
148	PRT	Nhân tạo	ECB37 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVWVG EIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SVPLSAIFTT

149	PRT	Nhân tạo	ECB94 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	Nhân tạo	ECB95 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVGSG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	Nhân tạo	ECB96 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKIS PPLSAIFTT
152	PRT	Nhân tạo	ECB97 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKIS PPLSAIFTT
153	PRT	Nhân tạo	ECB106 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKIS PPLSAIFTT
154	PRT	Nhân tạo	ECB107 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVGSG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Nhân tạo	ECB108 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKIS PPLSAIFTT
156	PRT	Nhân tạo	ECB109 không có Met	LPAPKNLWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKIS PPLSAIFTT

157	PRT	Nhân tạo	ECB118 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Nhân tạo	ECB119 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVGSG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Nhân tạo	ECB120 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
160	PRT	Nhân tạo	ECB121 không có Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGKIS PLSAIFTT
161	PRT	Nhân tạo	ECB91 không có Met	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydlgtlkgpgteytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapapLPAPK NLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGKISPPPLSAIFTT
162	PRT	Nhân tạo	ECB18 không có Met	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtlkgpgteytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirdevvvggeaivltv pgsersydlgtlkgpgteyyvnilgvkkggisvplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp
163	PRT	Nhân tạo	ECB28 không có Met	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtlkgpgteytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirdevvvggeaivltvp gsersydlgtlkgpgteyyvnilgvkkggisvplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp
164	PRT	Nhân tạo	ECB38 không có Met	lpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydlgtlkgpgteytsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirfeflgsgeaivltvp gsersydlgtlkgpgteyyvnmvgkkgkispplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyynlinnaktvegkalldeilaalp

165	PRT	Nhân tạo	ECB39 không có Met	lpapknlvsevtedsarlswardphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydlgtlpgteytsiygvhnvykdnmrplsaifttapapapapa lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeglsgeaivltvpg sersydlgtlpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapaplae akvlnreldkygvsdyynlinnaktvegvkaldeilaalp
166	DNA	Nhân tạo	ECB97 không có Met	ttgccagcgccgaagaacctggtagtagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtggcggttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcggttctacgacctgaccggttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccattttaccaccgcaccggcaccg gctccggctcctgccccgctgcccgtccgaagaactgggtggtgagcc gtgtaccgaagatagcgacgcctgagctggacggcaccggatgcg gcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctggtagcggtaggc aattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtct gaaaccgggcaccgagatgtggtgaacattctgagcgtaaggcggt agcatcagcccaccgctgagcgcatcttcacgactggtggtgc
167	DNA	Nhân tạo	ECB15 không có Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgctgagctgggacgacccgtggcggttctatgagctttctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgctctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgacggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgcccgtgctggcgattttaccaccgcgctgcgc cagcgctgcaccggctccgctgcccggcaccgaagaacctggtgtca gcccgtgagcgaggatagcgacgctttagctggaccgctccggatg cagccttgacagcttctgattcgtactttgaatttctggtagcggtag gcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgattgacggg cctgaagccgggtactgagtagtggttaacatcatggcggttaagggtg gtaaaatcagcccgcattgtccgcatctttaccacg
168	DNA	Nhân tạo	>EGFR phần ECB97; P54AR4-83v22 không có met	ttgccagcgccgaagaacctggtagtagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtggcggttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcggttctacgacctgaccggttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccattttaccacc
169	DNA	Nhân tạo	>EGFR phần ECB15; P54AR4-83v2 không có met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgctgagctgggacgacccgtggcggttctatgagctttctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgctctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgacggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgcccgtgctggcgattttaccacc
170	PRT	Nhân tạo	ECB94 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNHYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
171	PRT	Nhân tạo	ECB95 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNHYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC

172	PRT	Nhân tạo	ECB96 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	Nhân tạo	ECB97 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSG EAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI PPLSAIFTTC
174	PRT	Nhân tạo	ECB106 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSG EAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGKI SPPLSAIFTTC
175	PRT	Nhân tạo	ECB107 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVGSG EAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI SPPLSAIFTTC
176	PRT	Nhân tạo	ECB108 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI SPPLSAIFTTC
177	PRT	Nhân tạo	ECB109 có C-ter xystein	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSG EAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI PPLSAIFTTC
178	PRT	Nhân tạo	ECB91 có C-ter xystein	mlpapknlvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqeseqvgaeivltvpgse rsydlgtlkgpteytvsygvhnykdtnirglplsaifttapaapapapapLPAP KNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGSI SPPLSAIFTTC

>SEQ ID NO: 179

PRT

Nhân tạo

Vòng FG của miền FN3 gắn kết EGFR

HNVYKDTNX₉RGL;

trong đó X₉ là M hoặc I

>SEQ ID NO: 180

PRT

Nhân tạo

Vòng FG của miền FN3 gắn kết EGFR

LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180),

>SEQ ID NO: 181

PRT

Nhân tạo

vòng BC của miền FN3 gắn kết EGFR

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181); trong đó

X₁ là A, T, G hoặc D;

X₂ là A, D, Y hoặc W;

X₃ là P, D hoặc N;

X₄ là L hoặc không có mặt;

X₅ là D, H, R, G, Y hoặc W;

X₆ là G, D hoặc A;

X₇ là A, F, G, H hoặc D; và

X₈ là Y, F hoặc L.

>SEQ ID NO: 182

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 gắn kết EGFR

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

X₁ là A, T, G hoặc D;

X₂ là A, D, Y hoặc W;

X₃ là P, D hoặc N;

X₄ là L hoặc không có mặt;

X₅ là D, H, R, G, Y hoặc W;

X₆ là G, D hoặc A;

X₇ là A, F, G, H hoặc D;

X₈ là Y, F hoặc L; và

X₉ là M hoặc I

>SEQ ID NO: 183

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 gắn kết EGFR

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

trong đó

X₁ là A, T, G hoặc D;

X₂ là A, D, Y hoặc W;

X₃ là P, D hoặc N;

X₄ là L hoặc không có mặt;

X₅ là D, H, R, G, Y hoặc W;

X₆ là G, D hoặc A;

X₇ là A, F, G, H hoặc D; và

X_8 là Y, F hoặc L.

>SEQ ID NO: 184

PRT

Nhân tạo

A Miền FN3 gắn kết c-Met C sợi và vòng CD trình tự

DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), trong đó

X_{10} là W, F hoặc V;

X_{11} là D, F hoặc L;

X_{12} là V, F hoặc L;

X_{13} là V, L hoặc T;

X_{14} là V, R, G, L, T hoặc S;

X_{15} là G, S, A, T hoặc K; và

X_{16} là E hoặc D; và

>SEQ ID NO: 185

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 gắn kết c-Met F sợi và vòng FG

TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), trong đó

X_{17} là Y, W, I, V, G hoặc A;

X_{18} là N, T, Q hoặc G;

X_{19} là L, M, N hoặc I;

X_{20} là G hoặc S;

X_{21} là S, L, G, Y, T, R, H hoặc K;

X_{22} là I, V hoặc L; và

X₂₃ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

>SEQ ID NO: 186

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 gắn kết c-Met

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁₀IRYX₁₁EX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆

AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

trong đó

X₁₀ là W, F hoặc V; và

X₁₁ là D, F hoặc L;

X₁₂ là V, F hoặc L;

X₁₃ là V, L hoặc T;

X₁₄ là V, R, G, L, T hoặc S;

X₁₅ là G, S, A, T hoặc K;

X₁₆ là E hoặc D;

X₁₇ là Y, W, I, V, G hoặc A;

X₁₈ là N, T, Q hoặc G;

X₁₉ là L, M, N hoặc I;

X₂₀ là G hoặc S;

X₂₁ là S, L, G, Y, T, R, H hoặc K;

X₂₂ là I, V hoặc L; và

X₂₃ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

>SEQ ID NO: 187

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 EGFR của miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép chứa phân tử

LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVGEAIX₃₀LTVPGSER
SYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (SEQ ID NO: 187),
trong đó

X₂₄ là E, N hoặc R;

X₂₅ là E hoặc P;

X₂₆ là L hoặc A;

X₂₇ là H hoặc W;

X₂₈ là E hoặc D;

X₂₉ là E hoặc P;

X₃₀ là N hoặc V;

X₃₁ là G hoặc Y;

X₃₂ là M hoặc I; và

X₃₃ là E hoặc I;

>SEQ ID NO: 188

miền c-Met FN3 của miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép chứa phân tử

LPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSEFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂LTVPG
SERSYDLTGLKPGTEYVVNIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPPLSAX₄₆FTT (SEQ ID NO: 188); trong
đó

X₃₄ là E, N hoặc R;

X₃₅ là E hoặc P;

X₃₆ là L hoặc A;

X₃₇ là E hoặc P;

X₃₈ là V hoặc L;

X₃₉ là G hoặc S;

X₄₀ là S hoặc K;

X₄₁ là E hoặc D;

X₄₂ là N hoặc V;

X₄₃ là L hoặc M;

X₄₄ là G hoặc S;

X₄₅ là S hoặc K; và

X₄₆ là E hoặc I.

>SEQ ID NO: 189

C34S biến thể HSA

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCV
ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD
NPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA
AFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAV
ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSI
SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF
LGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
VEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG
KCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFS
ALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQL
KAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

>SEQ ID NO: 190

ECB168

MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVPGSER
SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL
VVS RVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKP
GTEYVVNILSVKGG SISPPLSAIFTT

>SEQ ID NO: 191

ECB168 mà không có Met

LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSY
DLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLV
VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPG
TEYVVNILSVKGGISPPLSAIFTT

>192

ECB không có tên cuối cùng trong danh sách 17v2-C5v2

mLpapknlvvsevtedsarlswardphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdt
nmrglplsaifttapapapapap

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSY
DLTGLKPGTEYVVNILSVKGGISPPLSAIFTT

>193

ECB không có tên cuối cùng trong danh sách 17v2-C5v2

Lpapknlvvsevtedsarlswardphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdt
nmrglplsaifttapapapapap

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTVPGSERSY
DLTGLKPGTEYVVNILSVKGGISPPLSAIFTT

>SEQ ID NO: 194

83v2 D22A

Lpapknlvvsevtedsarlswardpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdt
nmrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 195

>83v2 D23A

Lpapknlvvsevtedsarlswardpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdt
nmrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 196

>83v2 P24A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdawafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 197

>83v2 W25A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpaaafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 198

>83v2 F27A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwaaafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 199

>83v2 Y28A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO:200

>83v2 H75A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 201

>83v2 N76A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 202

>83v2 V77a

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdn
mrglplsaiftt

>SEQ ID NO: 203

>83v2 Y78A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvakdtn
mrglplsaifft

>SEQ ID NO: 204

>83v2 K79A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvyadtn
mrglplsaifft

>SEQ ID NO: 205

>83v2 D80A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykatn
mrglplsaifft

>SEQ ID NO: 206

>83v2 M83A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdtn
arglplsaifft

>SEQ ID NO: 207

>83v2 R84A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdtn
maglplsaifft

>SEQ ID NO: 208

>83v2 G85A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqqesekvgeaivltvpgsersydlgtlpgteytsiygvhnvykdtn
mralplsaifft

>SEQ ID NO: 209

>83v2 L86A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpteytvsygvhnvykdn
mrgaplsaifft

>SEQ ID NO: 210

>83v2 T81A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpteytvsygvhnvykdan
mrglplsaifft

>SEQ ID NO: 211

>83v2 N82A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpteytvsygvhnvykda
mrglplsaifft

SEQ ID NO: 212

>K78S

lpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpteyvvnimgvkkgSisppls
aiftt

SEQ ID NO: 213

>G40S

lpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfelfSsgeaivltvpgsersydlgtlkgpteyvvnimgvkkgkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 214

>L39S

lpapknlvsvrvtedsarlswwtapdaafdsfwiryfelfSsgeaivltvpgsersydlgtlkgpteyvvnimgvkkgkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 215

>V68S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteySvnimgvkggkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 216

>N70S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteyvVSimgvkggkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 217

>P81S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteyvvnimgvkggkisSppls
aiftt

SEQ ID NO: 218

>F36S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirySeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteyvvnimgvkggkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 219

>W32S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfSiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteyvvnimgvkggkisppls
iftt

SEQ ID NO: 220

>M72S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteyvvnISgvkggkisppls
iftt

SEQ ID NO: 221

>R34S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiSyfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlpgteyvvnimgvkggkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 222

>F38S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeSlgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpteyvvnimgvkkgkisppls
aiftt

SEQ ID NO: 223

>I79S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpteyvvnimgvkkgkSsppls
aiftt

SEQ ID NO: 224

PRT

Nhân tạo

Chất liên kết

GGGGSGGGGS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử chứa miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập bao gồm miền fibronectin loại III (fibronectin type III - FN3) thứ nhất và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (yếu tố sinh trưởng thượng bì receptor -EGFR) và chặn sự gắn kết của yếu tố sinh trưởng thượng bì (epidermal growth factor - EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng tế bào gan (c-Met), và chặn sự gắn kết của yếu tố sinh trưởng tế bào gan (hepatocyte growth factor - HGF) với c-Met, và trong đó miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự axit amin ít nhất 87% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27, và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin ít nhất 83% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41.

2. Phân tử đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó:

a) miền FN3 thứ nhất ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được gây ra bởi EGF tại gốc EGFR Tiroxin 1173 có trị số IC_{50} là nhỏ hơn khoảng $2,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người, và miền FN3 thứ hai ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được gây ra bởi HGF tại gốc c-Met Tiroxin 1349 có trị số IC_{50} là nhỏ hơn khoảng $1,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF của người;

b) miền FN3 thứ nhất ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được gây ra bởi EGF tại gốc EGFR Tiroxin 1173 có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ $1,8 \times 10^{-8}$ M đến $2,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người, và miền FN3 thứ hai ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được gây ra bởi HGF tại gốc c-Met Tiroxin 1349 có trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 4×10^{-9} M đến $1,5 \times 10^{-6}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF của người;

c) miền FN3 thứ nhất gắn kết với EGFR của người có hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M, và miền FN3 thứ hai gắn kết với c-Met của người có K_D nhỏ hơn khoảng 5×10^{-8} M, trong đó K_D được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon; hoặc

d) miền FN3 thứ nhất gắn kết với EGFR của người có K_D nằm trong khoảng từ 2×10^{-10} đến 1×10^{-8} M, và miền FN3 thứ hai gắn kết với c-Met của người có K_D nằm trong khoảng từ 3×10^{-10} đến 5×10^{-8} M, trong đó K_D được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng bề mặt plasmon; và/hoặc

e) phân tử đặc hiệu kép ức chế sự tăng sinh tế bào NCI-H292 có trị số IC_{50} mà ít nhất nhỏ hơn 30 lần khi so với trị số IC_{50} của sự ức chế tăng trưởng tế bào NCI-H292 với hỗn hợp của miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai, trong đó sự tăng sinh tế bào được cảm ứng bằng 10% FBS chứa 7,5 ng/mL HGF; và/hoặc

f) phân tử đặc hiệu kép:

i) ức chế sự phosphoryl hóa EGFR được gây ra bởi EGF tại gốc EGFR Tiroxin 1173 có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng 8×10^{-7} M khi được đo trong các tế bào NCI-H292 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF của người;

ii) ức chế sự phosphoryl hóa c-Met được gây ra bởi HGF tại gốc c-Met Tiroxin 1349 có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $8,4 \times 10^{-7}$ M khi được đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF của người;

iii) ức chế sự tăng sinh tế bào NCI-H292 được gây ra bởi HGF có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $9,5 \times 10^{-6}$ M, trong đó sự tăng sinh tế bào được cảm ứng bằng 10% FBS chứa 7,5 ng HGF;

iv) gắn kết EGFR có K_D nhỏ hơn khoảng $2,0 \times 10^{-8}$ M; hoặc

v) gắn kết c-Met có K_D nhỏ hơn khoảng $2,0 \times 10^{-8}$ M, trong đó K_D được đo bằng cách sử dụng cộng hưởng bề mặt plasmon như được mô tả trong Ví dụ 3 và Ví dụ 5.

3. Phân tử đặc hiệu kép theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

a) miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 107 hoặc 108, và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 114;

b) miền FN3 thứ nhất gắn kết với EGFR có một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc D23, F27, Y28, V77 và G85 của P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), trong đó miền FN3 thứ hai tùy ý gắn kết với c-Met có một hoặc nhiều gốc axit

amin tương ứng với các gốc R34, F38, M72 và 179 trong P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41);

c) miền FN3 thứ nhất bao gồm

i) vòng FG bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 179 hoặc trình tự axit amin có SEQ ID NO: 180; và

ii) vòng BC bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 181; và miền FN3 thứ hai bao gồm

i) sợi C và vòng CD bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 184; và

ii) sợi F và vòng FG bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 185;

d) miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 182 hoặc trình tự axit amin có SEQ ID NO: 183; và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 186;

e) miền FN3 thứ nhất và/hoặc miền FN3 thứ hai bao gồm các sự thể tại một hoặc nhiều vị trí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73 và 86 trong Tencon (SEQ ID NO: 1), trong đó miền FN3 thứ nhất tùy ý bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 187; và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 188;

f) miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự được thể hiện trong một trong số các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 hoặc 194-211, và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự được thể hiện trong một trong số các SEQ ID NO: 32-49, 111-114 hoặc 212-223, trong đó miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai tùy ý bao gồm lần lượt trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27 và 32, lần lượt; 27 và 41, lần lượt; 27 và 40, lần lượt; 27 và 33, lần lượt; 107 và 41, lần lượt; 107 và 40, lần lượt; 107 và 33, lần lượt; 107 và 32, lần lượt; 107 và 114, lần lượt; 108 và 111, lần lượt; 108 và 112, lần lượt; 108 và 113, lần lượt; 108 và 114, lần lượt; 109 và 111, lần lượt; 109 và 112, lần lượt; 109 và 113, lần lượt; 109 và 114, lần lượt; 110 và 111, lần lượt; 110 và 112, lần lượt; 110 và 113, lần lượt; hoặc 110 và 114, lần lượt,

Ví dụ trong đó miền FN3 thứ nhất và/hoặc miền FN3 thứ hai bao gồm một hoặc nhiều sự thể tương ứng với các sự thể L17A, N46V và E86I trong Tencon (SEQ ID NO: 1); và/hoặc

g) miền FN3 thứ nhất và/hoặc miền FN3 thứ hai được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon SEQ ID NO: 1.

4. Phân tử đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3:

a) trong đó miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai được tạo cặp bằng chất liên kết, trong đó chất liên kết tùy ý bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong một trong số các SEQ ID NO: 78-84 hoặc 224;

b) bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121, 138-165 hoặc 190-193, và tùy ý bao gồm methionin (Met) được liên kết với đầu N của phân tử, còn tùy ý bao gồm xystein được liên kết với đầu C của phân tử; và/hoặc

c) được tạo cặp với gốc kéo dài chu kỳ bán hủy, trong đó gốc kéo dài chu kỳ bán hủy tùy ý là phân tử gắn kết albumin, polyetylen glycol (polyethylene glycol - PEG), albumin, biến thể albumin, hoặc ít nhất một phần của vùng Fc của globulin miễn dịch và trong đó gốc kéo dài chu kỳ bán hủy tùy ý là biến thể albumin của SEQ ID NO: 189.

5. Miền fibronectin loại III (fibronectin type III - FN3) được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGFR) và chặn sự gắn kết của yếu tố sinh trưởng thượng bì (EGF) với EGFR, trong đó miền FN3 được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự axit amin Tencon có SEQ ID NO: 1, trong đó:

a) miền FN3 bao gồm trình tự axit amin ít nhất 87% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27; và tùy ý

b) miền FN3 gắn kết với EGFR có một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc D23, F27, Y28, V77 và G85 của P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27);

c) miền FN3 bao gồm

i) vòng FG bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 179 hoặc trình tự axit amin có SEQ ID NO: 180; và

ii) vòng BC bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 181, và tùy ý bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 182 hoặc trình tự axit amin có SEQ ID NO: 183;

d) miền FN3 bao gồm trình tự được thể hiện trong một trong số các SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137 hoặc 194-211; và/hoặc

e) miền FN3 bao gồm các sự thể tại một hoặc nhiều vị trí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID NO: 1), trong đó miền FN3 tùy ý bao gồm một hoặc nhiều sự thể tương ứng với các sự thể L17A, N46V, và E86I trong trình tự axit amin Tencon có SEQ ID NO: 1.

6. Miền fibronectin loại III (FN3) được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng tế bào gan (c-Met) và chặn sự gắn kết của yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met, trong đó:

a) miền FN3 bao gồm trình tự axit amin ít nhất 83% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 41; và tùy ý

b) miền FN3 gắn kết với c-Met có một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với các gốc R34, F38, M72 và 179 trong P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41);

c) miền FN3 bao gồm:

i) sợi C và vòng CD bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 184; và

ii) sợi F và vòng FG bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 185, và tùy ý bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 186;

d) miền FN3 bao gồm trình tự được thể hiện trong một trong số các SEQ ID NO: 32-49, 111-114 hoặc 212-223; trong đó miền FN3 tùy ý bao gồm các sự thể tại một hoặc nhiều vị trí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 của trình tự axit amin Tencon có SEQ ID NO: 1, trong đó miền FN3 tùy ý bao gồm một hoặc nhiều sự thể tương ứng với các sự thể L17A, N46V, và E86I của trình tự axit amin Tencon có SEQ ID NO: 1; và/hoặc

e) miền FN3 được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự axit amin Tencon có SEQ ID NO: 1.

7. Polynucleotit được phân lập mã hóa:

a) phân tử đặc hiệu kép theo điểm 1;

b) miền FN3 theo điểm 5; hoặc

c) miền FN3 theo điểm 6.

8. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 7.

9. Tế bào chủ được phân lập bao gồm vector theo điểm 8.

10. Phương pháp tạo ra phân tử đặc hiệu kép bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được phân lập theo điểm 9, như phụ thuộc vào điểm 7a), trong các điều kiện sao cho phân tử đặc hiệu kép được biểu hiện, và bước tinh sạch phân tử đặc hiệu kép.

11. Phương pháp tạo ra miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với EGFR bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được phân lập theo điểm 9, như phụ thuộc vào điểm 7b), trong các điều kiện sao cho miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu với EGFR được biểu hiện, và bước tinh sạch miền FN3.

12. Phương pháp tạo ra miền FN3 gắn kết đặc hiệu với c-Met bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được phân lập theo điểm 9, như phụ thuộc vào điểm 7c), trong các điều kiện sao cho miền FN3 gắn kết đặc hiệu với c-Met được biểu hiện, và bước tinh sạch miền FN3 gắn kết đặc hiệu với c-Met.

13. Dược phẩm bao gồm:

a) i) phân tử đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4; hoặc

ii) miền FN3 theo điểm 5 hoặc 6; và

b) chất mang dược dụng.

Fig. 1A

SEQ ID NO :	ID		
18		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	(60)
19		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWYD-RDGYDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
20		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
21		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWDDP-RGFYESFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
22		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
23		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWGYN-GDHFDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
24		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWDYDLGDHFDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
25		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
27		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
29		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWTWP-YADLDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
107		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
108		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWDDP-WAFYESFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
109		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWDDP-HAFYESFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG	
110		LPAPKNLVVSEVTTEDSLRLSWADP-HGFYDSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG ***** : *****	
18		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	(94)
19		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
20		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
21		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
22		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
23		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
24		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
25		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
27		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
29		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
107		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
108		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
109		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT	
110		LKPGTEYTVSIIYGVHNVYKDTNMRGIPLSAEFTT ***** . * : *****	

Fig. 1B

SEQ ID			
NO:			
26	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLS	WTAP-DAAFD	DSFLIQQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTG (60)
28	LPAPKNLVVSEVTEDSARLS	WTAP-DAAFD	DSFLIQQESEKVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
	*****	*****	*****
26	LKPGTEYTVSIYGV	LGSYVFEHDVML	PLSAEFTT (94)
28	LKPGTEYTVSIYGV	LGSYVFEHDVML	PLSAIFTT
	*****	*****	***

Fig. 2

		A			B			C			D			E					
		A			AB			CD			DE			EF					
TENCON27	(1)	LPAPK ^N LVVSRV			TEDSARLSW			FLIQYQE			AIVLTVP			LKPGE			TEYTVSIYGV		
					TAPDAAF			G			G			KGGHRSN			PLSAIFTT		
					DS														
TCL14	(1)	LPAPK ^N LVVSRV			TEDSARLSW			FXIXYEXXX			G			LKPGE			TEYTVSIYGV		
					TAPDAAF			G			G			KGGHRSN			PLSAIFTT		
					DS														
TENCON27	(31)	FLIQYQE			AIVLTVP			FXIXYEXXX			G			LKPGE			TEYTVSIYGV		
					G			G			G			KGGHRSN			PLSAIFTT		
TCL14	(31)	FXIXYEXXX			G			LKPGE			TEYTVSIYGV			LKPGE			TEYTVSIYGV		
TENCON27	(61)	LKPGE			TEYTVSIYGV			LKPGE			TEYTVSIYGV			LKPGE			TEYTVSIYGV		
TCL14	(61)	LKPGE			TEYTVSIYGV			LKPGE			TEYTVSIYGV			LKPGE			TEYTVSIYGV		

SEQ ID

(60)

[illegible]

FIG.3 (tiếp)

SEQ ID NO:	
32	LKPGTEYYVNIILGVKGGISVPLSAIFTT
33	LKPGTEYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
34	LKPGTEYIVNIMGVKGGSIHPLSAIFTT
35	LKPGTEYVVNIILGVKGGLSVPLSAIFTT
36	LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37	LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38	LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39	LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40	LKPGTEYVVQILGVKGGHISLPLSAIFTT
41	LKPGTEYVVNIMGVKGGKISPLSAIFTT
42	LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43	LKPGTEYVVQILGVKGGISVPLSAIFTT
44	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIYPLSAIFTT
45	LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46	LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
47	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIHPLSAIFTT
48	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIYPLSAIFTT
49	LKPGTEYVVNIMGVKGGKISPLSAIFTT
111	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIHPLSAIFTT
112	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIYPLSAIFTT
113	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIHPLSAIFTT
114	LKPGTEYVVNIMGVKGGSIYPLSAIFTT
	***** * * . ***** : * *****

(89)

Fig. 4

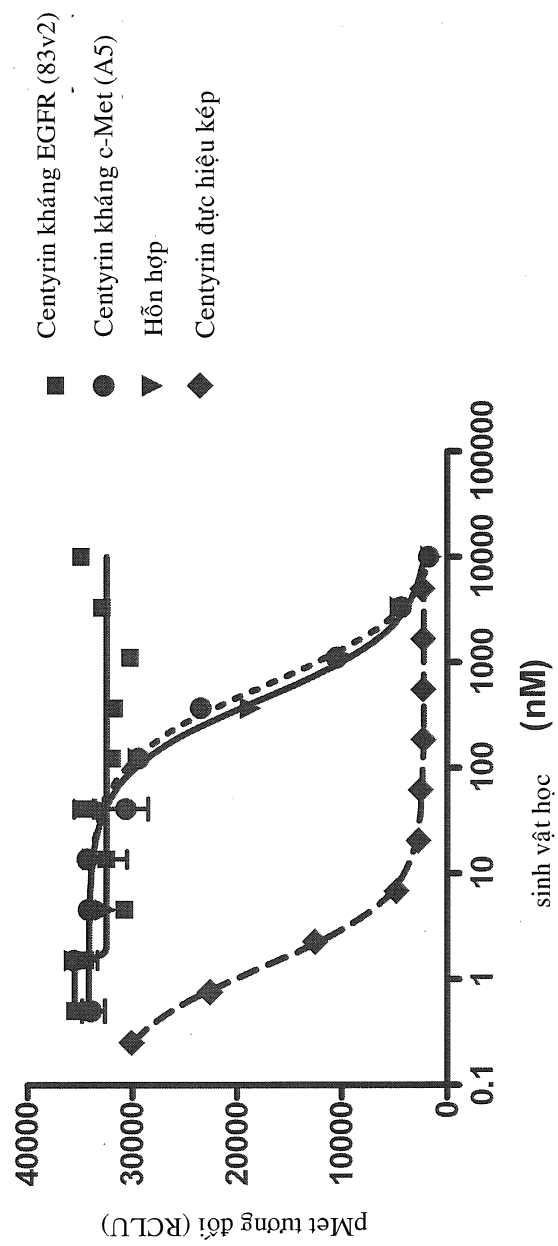


Fig. 5

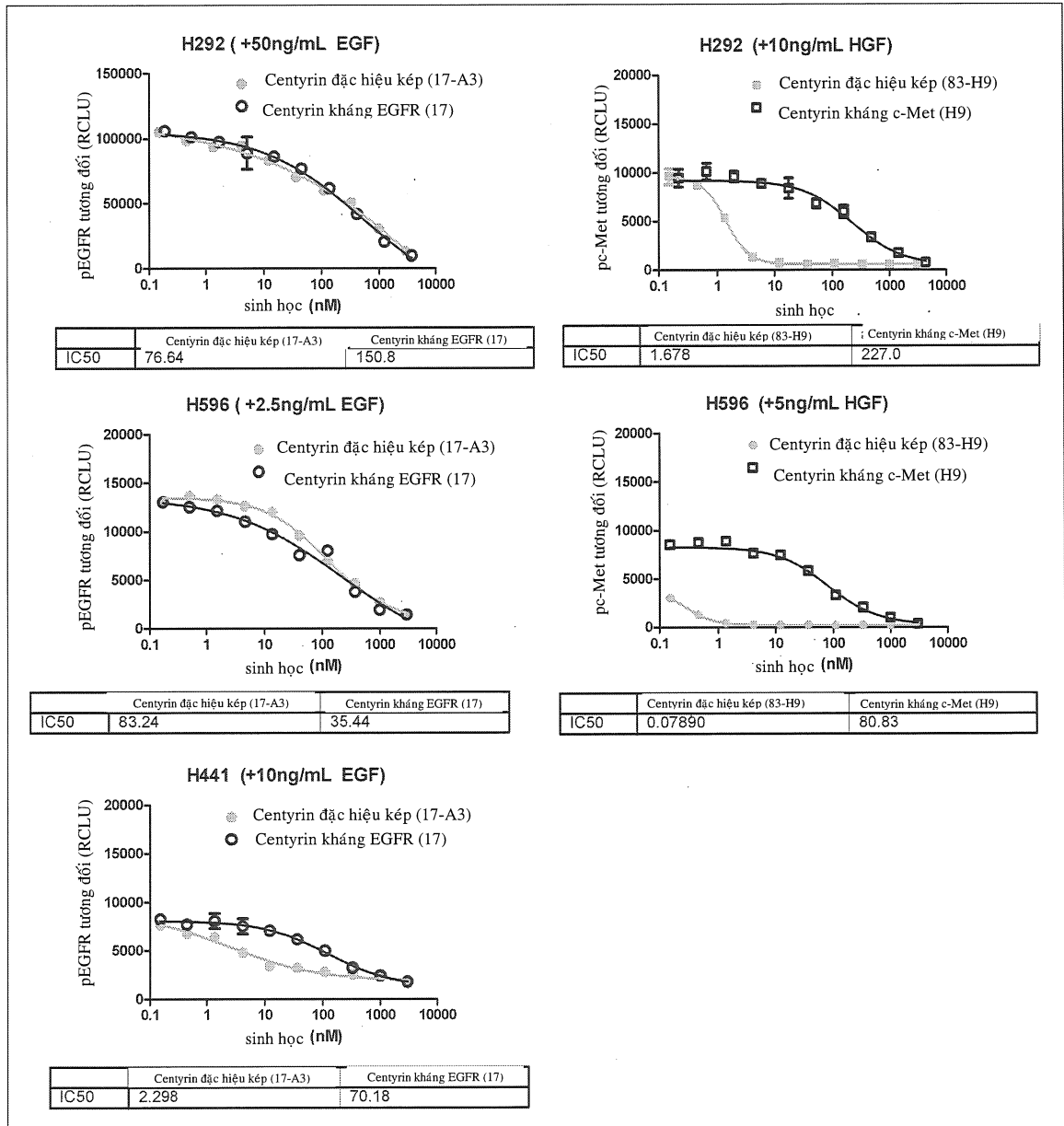


Fig. 6

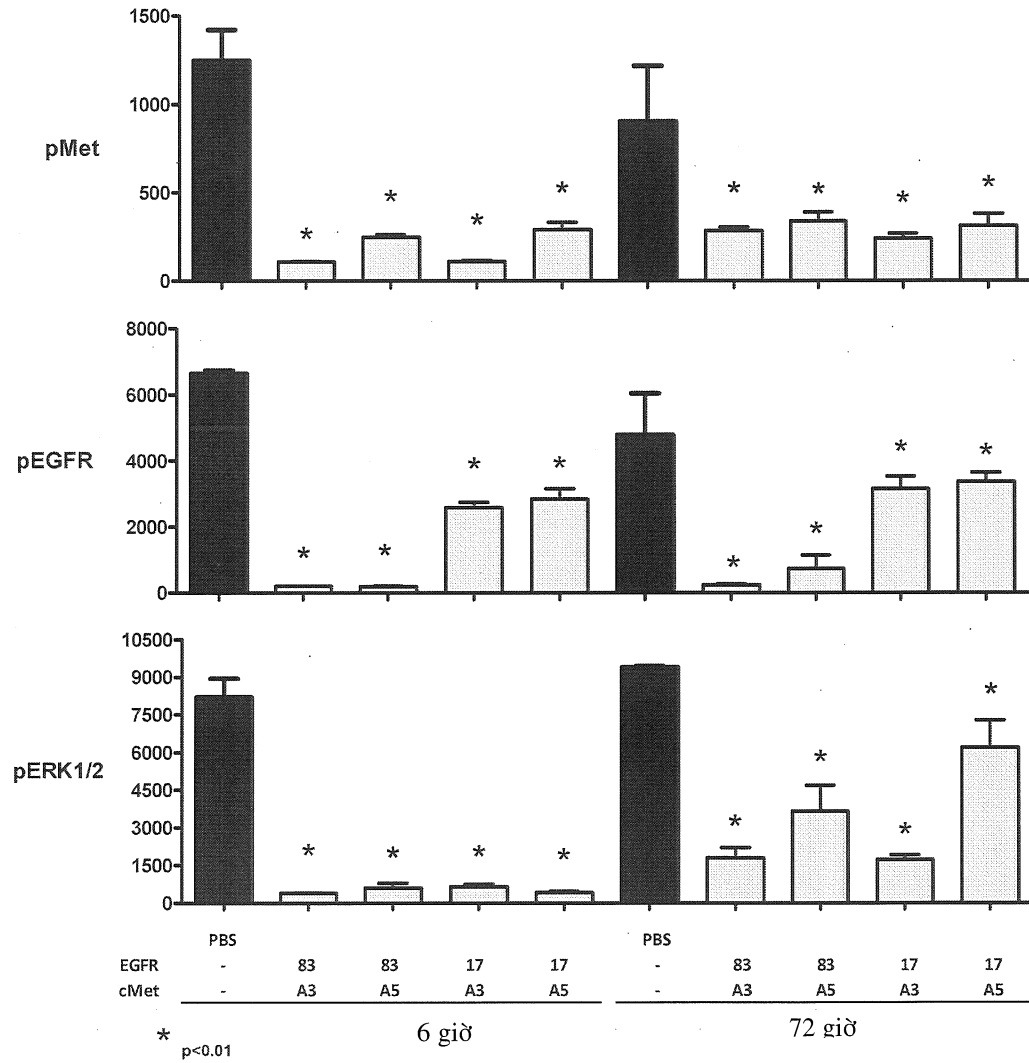


Fig. 7

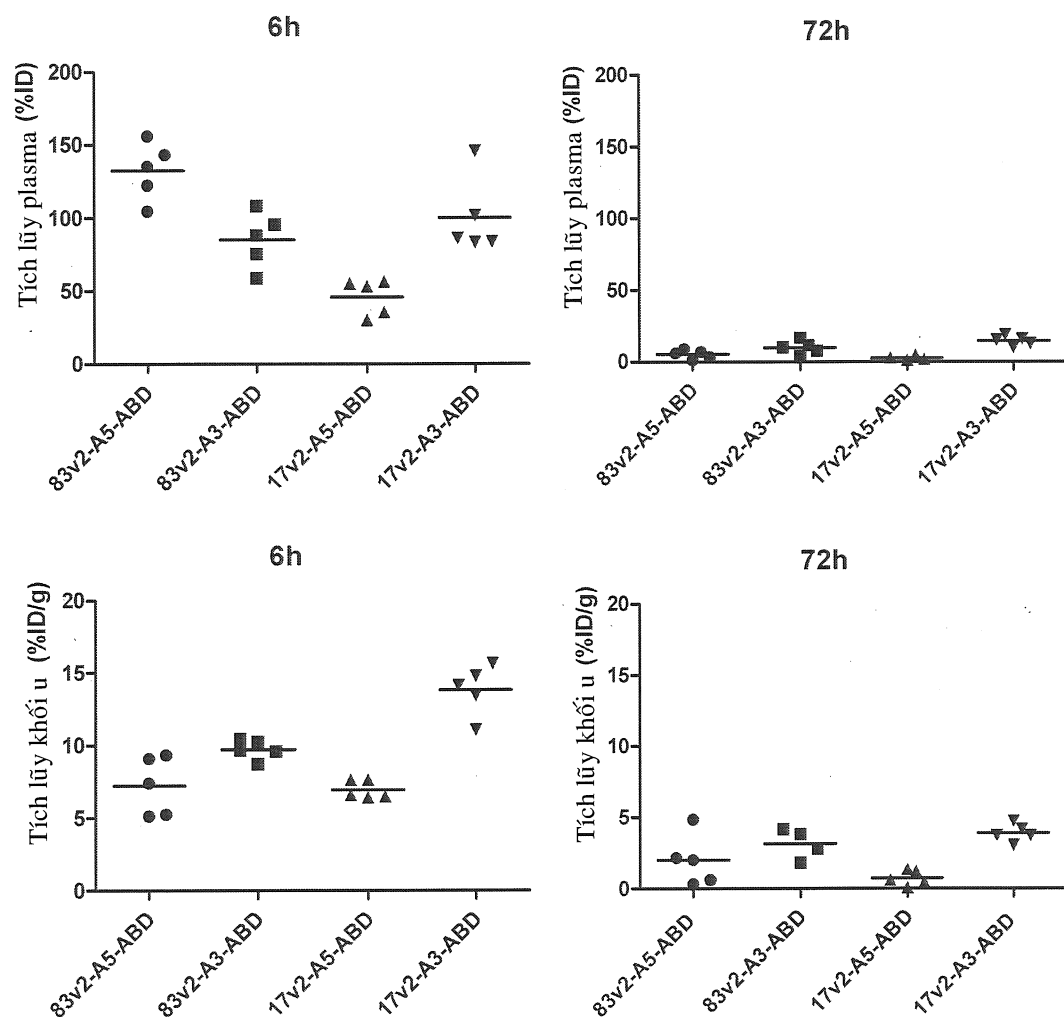


Fig. 8

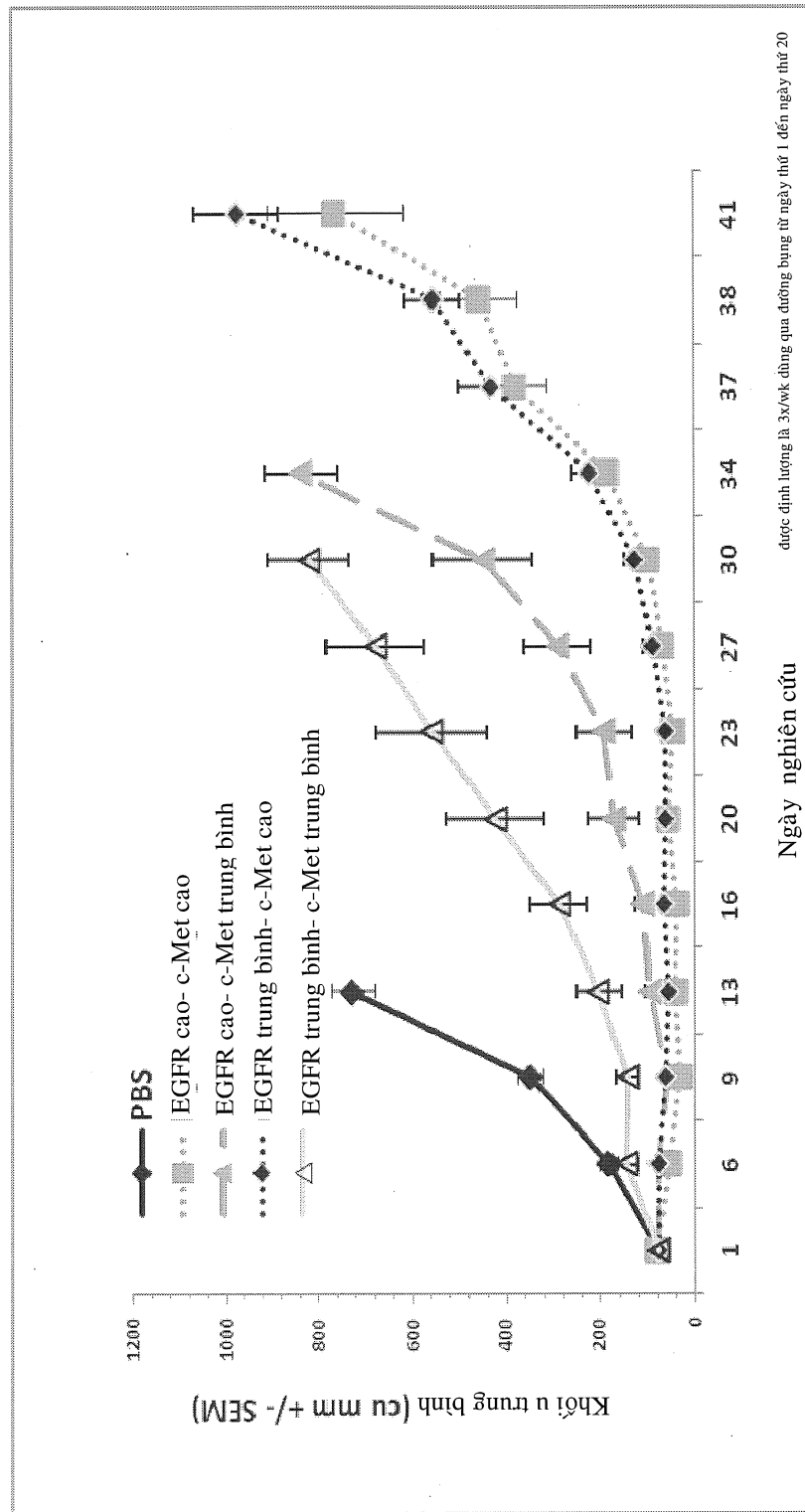
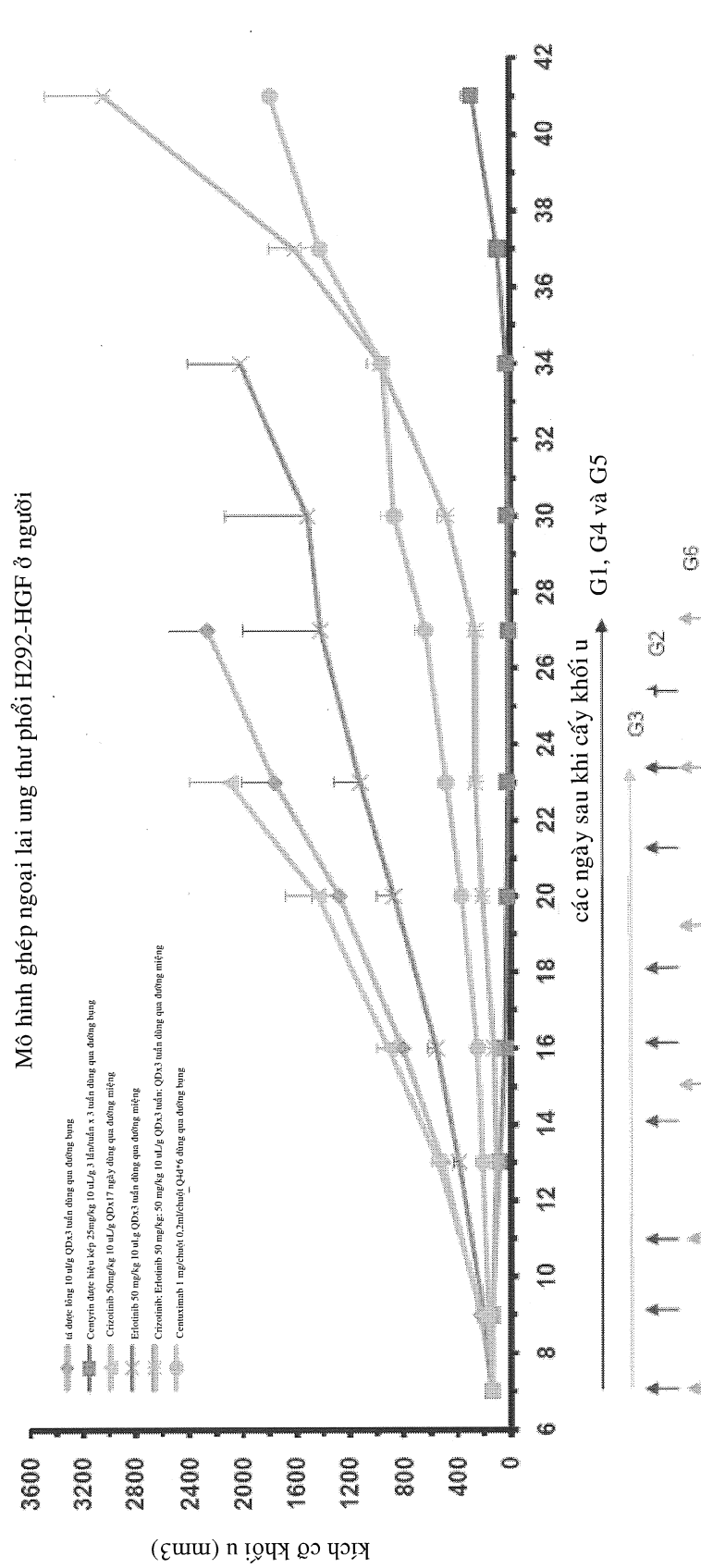


Fig. 9



DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> PHÂN TỬ CHỨA MIỀN FN3 ĐẶC HIỆU KÉP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PHÂN TỬ ĐẶC HIỆU KÉP NÀY

<130> JBI5014WOPCT

<140> Được chuyển nhượng
 <141> 2013-11-20

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

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

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

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

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

<160> 224

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khung sinh học Tencon FN3

<400> 1

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

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

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

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

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

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85

<210> 2
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 2
 ggaaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgtttctg aagttacc 58

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 3
 aacaccgtag atagaaacgg t 21

<210> 4
 <211> 131
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<400> 4
 cggcggttag aacgcggcta caattaatac ataaccocat cccctgttg acaattaatc 60

atcggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacaggat 120

ctaccatgct g 131

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 5

cggcggtag aàcgggcta c 21

<210> 6

<211> 66

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<220>

<221> dấu hiệu hiếm

<222> (26)..(27)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu hiếm

<222> (29)..(30)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu hiếm

<222> (32)..(33)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu hiếm

<222> (35)..(36)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu hiếm

<222> (38)..(39)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> dấu hiệu hiếm

<222> (41)..(42)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (44)..(45)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <400> 6
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnaacac cgtagataga 60

 aacggt 66

 <210> 7
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mới

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (41)..(42)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

 <220>
 <221> dấu hiệu hiếm
 <222> (44)..(45)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (47)..(48)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

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

<210> 8
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (41)..(42)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiêm
 <222> (44)..(45)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (47)..(48)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (50)..(51)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 8
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnnsnn snnnsnnnsns nnsnnnsnnn naacaccgta 60
 gatagaaacg gt 72

<210> 9
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (41)..(42)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (44)..(45)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (47)..(48)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (50)..(51)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (53)..(54)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 9
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnnsnn snnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnaacacc 60
 gtagatagaa acggt 75

<210> 10
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (28)..(29)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (31)..(32)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (34)..(35)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (37)..(38)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (40)..(41)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (43)..(44)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (46)..(47)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (49)..(50)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (52)..(53)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (55)..(56)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (58)..(59)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 10
 rmgggtggtga attccgcaga cagcggsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsnna 60
 acaccgtaga tagaaacggt 80

<210> 11
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (26)..(27)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (29)..(30)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (32)..(33)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (35)..(36)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (38)..(39)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (41)..(42)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (44)..(45)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (47)..(48)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (50)..(51)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (53)..(54)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (56)..(57)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> dấu hiệu hiểm
 <222> (59)..(60)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 11
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnnsnn snnnsnnnsns nnsnnnsnnn nsnnnsnnnsn 60
 aacaccgtag atagaaacgg t 81

<210> 12
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 12
 aagatcagtt gcggccgcta gactagaacc gctgccatgg tgatggtgat ggtgaccgcc 60
 ggtggtgaat tccgcagaca g 81

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 13
 cggcgggttag aacgcggcta caattaatac 30

<210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 14
 catgattacg ccaagctcag aa 22

<210> 15
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 15
 gagccgccgc caccggttta atggtgatgg tgatggtgac caccggtggt gaattccgca 60

gacag

65

<210> 16

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 16

aagaaggaga accggtatgc tgccggcgcc gaaaaac

37

<210> 17

<211> 89

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 17

tttgggaagc ttctaggtct cggcggtcac catcaccatc accatggcag cggttctagt

60

ctagcgcccc caactgatct tcaccaaac

89

<210> 18

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 18

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 19

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

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30

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

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

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

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

<210> 20
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 20

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 21

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

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

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

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

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

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

<210> 22
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 22

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

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

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

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

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

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

<210> 23
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 23

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

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 24

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

Leu Arg Leu Ser Trp Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Phe Asp Ser Phe
20 25 30

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 25

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 25

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 26

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

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

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

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

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val Phe
 65 70 75 80

Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

```
<210> 27
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 27

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

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

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

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

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

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

```
<210> 28
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 28

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

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu

20 25 30

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

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

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val Phe
65 70 75 80

Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90

<210> 29
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 29

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

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

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

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

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

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

<210> 30
<211> 37

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 30

Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Cys
 35

<210> 31
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 31

Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly
 20 25 30

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly Thr Gly
 35 40 45

Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala
 50 55 60

Gly
 65

<210> 32
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 32

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

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

Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 33

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 33

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

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

Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Leu Val Ser
65 70 75 80

Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 34
<211> 89
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 34

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

His Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 35
<211> 89
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 35

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 36

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 36

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser
65 70 75 80

Ile Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 37
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 37

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

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

Ile Arg Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Thr Val Ser
 65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 38
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 38

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Tyr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 39

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 39

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 40

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 40

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 41

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 41

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 42

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 42

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

Thr Glu Tyr Ala Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Arg Val Ser
65 70 75 80

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 43

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 43

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser
 65 70 75 80

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 44

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 44

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Tyr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 45

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 45

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ser
65 70 75 80

Ile Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 46

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 46

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Thr Val Ser
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 47

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 47

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Thr Thr Ala Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 48

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 48

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Leu Leu Ser Thr Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 49
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 49

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser Lys Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 50
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 50

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
 115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
 130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
 165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly
 180 185 190

Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200 205

<210> 51
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 51

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190

Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 52

<211> 205

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 52

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val

115 120 125
 Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
 130 135 140
 Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
 165 170 175
 Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly
 180 185 190
 Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200 205
 <210> 53
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet
 <400> 53
 Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
 35 40 45
 Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
 50 55 60
 Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140

Asp Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly
180 185 190

Gly Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 54

<211> 205

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 54

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly
180 185 190

Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 55

<211> 205

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 55

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val
115 120 125

Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe
130 135 140

Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala
145 150 155 160

Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly
180 185 190

Gly His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200 205

<210> 56

<211> 205

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 56

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1	5	10	15												
Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Ala	Asp	Pro	His	Gly	Phe	Tyr	Asp	Ser	Phe
	20						25						30		
Leu	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu
	35						40					45			
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro
	50					55					60				
Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	His	Asn	Val	Tyr	Lys
65					70					75				80	
Asp	Thr	Asn	Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Gly
				85					90					95	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Ser	Met	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Val	Ser	Arg	Val
		115					120					125			
Thr	Glu	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe
	130					135					140				
Asp	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Tyr	Phe	Glu	Phe	Leu	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala
145					150					155					160
Ile	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly
				165					170					175	
Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Gln	Ile	Ile	Gly	Val	Lys	Gly
			180					185					190		
Gly	His	Ile	Ser	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr			
	195						200					205			

<210> 57
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 57

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr

<210> 58
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 58

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
 130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr

<210> 59
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 59

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn
 100 105 110

Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr
 115 120 125

Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe
 130 135 140

Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn
165 170 175

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

Phe Thr Thr
195

<210> 60

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 60

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 61

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 61

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

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

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

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

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

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

[illegible]

```
<210> 62
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 62

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 63
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 63

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 64

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 64

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 65
<211> 194
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 65

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 66

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 66

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile

165

170

175

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

Thr Thr

<210> 67

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 67

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
 130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 68
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 68

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 69

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 69

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 70

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 70

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

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

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

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110
 Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125
 Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
 130 135 140
 Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160
 Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
 180 185 190
 Thr Thr

<210> 71
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 71

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
 20 25 30

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 72

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/phân tử gắn kết với cMet

<400> 72

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr

<210> 73

<211> 1210

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 73

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30

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

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
 165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
 180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
 195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420																425																430															
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu																																
		435					440					445																																			
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser																																
		450					455					460																																			
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu																																
		465					470					475																																			
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu																																
				485					490																																						
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro																																
				500					505																																						
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn																																
		515					520					525																																			
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly																																
		530					535					540																																			
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro																																
		545					550					555																																			
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro																																
				565					570					575																																	
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys	Val																																
				580					585					590																																	
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val	Trp																																
		595					600							605																																	
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn	Cys																																
		610					615					620																																			
Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly																																
		625					630					635																																			

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 74
<211> 53
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 74

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
20 25 30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg
50

<210> 75
<211> 2201
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
20 25 30

Arg Gln Ser Gly Val Asn Ala Thr Leu Pro Glu Glu Asn Gln Pro Val
35 40 45

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
100 105 110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu
115 120 125

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe
145 150 155 160

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
 180 185 190

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
 195 200 205

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
 275 280 285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
 290 295 300

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
 340 345 350

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
 355 360 365

Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly

385		390		395		400									
Ala	Asp	Cys	Gly	Glu	Leu	Lys	Cys	Pro	Asn	Gly	Cys	Ser	Gly	His	Gly
			405						410					415	
Arg	Cys	Val	Asn	Gly	Gln	Cys	Val	Cys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Thr	Gly	Glu
			420					425						430	
Asp	Cys	Ser	Gln	Leu	Arg	Cys	Pro	Asn	Asp	Cys	His	Ser	Arg	Gly	Arg
		435					440					445			
Cys	Val	Glu	Gly	Lys	Cys	Val	Cys	Glu	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly	Tyr	Asp
	450					455					460				
Cys	Ser	Asp	Met	Ser	Cys	Pro	Asn	Asp	Cys	His	Gln	His	Gly	Arg	Cys
465					470					475					480
Val	Asn	Gly	Met	Cys	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Glu	Asp	Cys
			485						490					495	
Arg	Asp	Arg	Gln	Cys	Pro	Arg	Asp	Cys	Ser	Asn	Arg	Gly	Leu	Cys	Val
			500					505					510		
Asp	Gly	Gln	Cys	Val	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Thr	Gly	Pro	Asp	Cys	Ala
		515					520					525			
Glu	Leu	Ser	Cys	Pro	Asn	Asp	Cys	His	Gly	Gln	Gly	Arg	Cys	Val	Asn
	530					535					540				
Gly	Gln	Cys	Val	Cys	His	Glu	Gly	Phe	Met	Gly	Lys	Asp	Cys	Lys	Glu
545					550					555					560
Gln	Arg	Cys	Pro	Ser	Asp	Cys	His	Gly	Gln	Gly	Arg	Cys	Val	Asp	Gly
			565						570					575	
Gln	Cys	Ile	Cys	His	Glu	Gly	Phe	Thr	Gly	Leu	Asp	Cys	Gly	Gln	His
			580					585					590		
Ser	Cys	Pro	Ser	Asp	Cys	Asn	Asn	Leu	Gly	Gln	Cys	Val	Ser	Gly	Arg
		595					600					605			

Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser
 610 615 620
 Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr
 645 650 655
 Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly
 660 665 670
 Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr
 675 680 685
 Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val
 690 695 700
 Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe
 705 710 715 720
 Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp
 725 730 735
 Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu
 740 745 750
 Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr
 755 760 765
 Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His
 770 775 780
 Ile Val Lys Asn Asn Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr
 785 790 795 800
 Thr Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp
 805 810 815
 Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly
 820 825 830

Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr
835 840 845

Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys
850 855 860

Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met
865 870 875 880

Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro
885 890 895

Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu
900 905 910

Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala
915 920 925

Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln
930 935 940

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu
945 950 955 960

Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro
965 970 975

Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln
980 985 990

Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro
995 1000 1005

Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr
1010 1015 1020

Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr
1025 1030 1035

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu
1040 1045 1050

Thr	Ala	Glu	Lys	Gly	Arg	His	Lys	Ser	Lys	Pro	Ala	Arg	Val	Lys
1055						1060					1065			
Ala	Ser	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Glu	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Val	Thr
1070						1075					1080			
Glu	Val	Gly	Trp	Asp	Gly	Leu	Arg	Leu	Asn	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp
1085						1090					1095			
Gln	Ala	Tyr	Glu	His	Phe	Ile	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Ala	Asn	Lys
1100						1105					1110			
Val	Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala
1115						1120					1125			
Val	Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser
1130						1135					1140			
Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Gln	Gly	Tyr	Arg	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	Ala
1145						1150					1155			
Glu	Ala	Ser	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Asn	Leu	Gly	Glu	Val	Val	Val
1160						1165					1170			
Ala	Glu	Val	Gly	Trp	Asp	Ala	Leu	Lys	Leu	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro
1175						1180					1185			
Glu	Gly	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Phe	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Ala	Asp
1190						1195					1200			
Thr	Val	Glu	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg
1205						1210					1215			
Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	His	Tyr	Thr	Ile
1220						1225					1230			
Thr	Ile	Arg	Gly	Val	Thr	Gln	Asp	Phe	Ser	Thr	Thr	Pro	Leu	Ser
1235						1240					1245			
Val	Glu	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Pro	Asp	Met	Gly	Asn	Leu	Thr

1250		1255		1260
Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr				
1265		1270		1275
Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala				
1280		1285		1290
Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu				
1295		1300		1305
Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr				
1310		1315		1320
Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu				
1325		1330		1335
Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu				
1340		1345		1350
Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr				
1355		1360		1365
Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu				
1370		1375		1380
Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser				
1385		1390		1395
Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr				
1400		1405		1410
Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val				
1415		1420		1425
Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn				
1430		1435		1440
Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp				
1445		1450		1455

Met	Ala	Thr	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Ile	Ile
1460						1465					1470			
Asp	Ser	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Thr	Val	Glu	Tyr	Asn	Ile	Ser	Gly
1475						1480					1485			
Ala	Glu	Arg	Thr	Ala	His	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr	Asp
1490						1495					1500			
Phe	Ile	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Pro	Ser	Ile	Arg	Thr	Lys
1505						1510					1515			
Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Glu	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu
1520						1525					1530			
Asn	Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Ile	Asn	Pro	Tyr	Gly	Phe	Thr	Val	Ser
1535						1540					1545			
Trp	Met	Ala	Ser	Glu	Asn	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Leu	Val	Thr	Val
1550						1555					1560			
Val	Asp	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Leu	Ser
1565						1570					1575			
Gly	Thr	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Ile
1580						1585					1590			
Gly	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Gln	Gly	His	Gln	Thr
1595						1600					1605			
Lys	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Val	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Val
1610						1615					1620			
Asp	Asn	Leu	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu
1625						1630					1635			
Ser	Trp	Thr	Ala	Asp	Glu	Gly	Val	Phe	Asp	Asn	Phe	Val	Leu	Lys
1640						1645					1650			
Ile	Arg	Asp	Thr	Lys	Lys	Gln	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu
1655						1660					1665			

Leu	Ala	Pro	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Ile	Thr	Gly	Leu	Arg	Glu	Ala
1670						1675					1680			
Thr	Glu	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ser	Lys	Gly	Arg	Arg
1685						1690					1695			
Ser	Gln	Thr	Val	Ser	Ala	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Met	Gly	Ser	Pro
1700						1705					1710			
Lys	Glu	Val	Ile	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Glu	Asn	Ser	Ala	Thr	Val
1715						1720					1725			
Ser	Trp	Arg	Ala	Pro	Thr	Ala	Gln	Val	Glu	Ser	Phe	Arg	Ile	Thr
1730						1735					1740			
Tyr	Val	Pro	Ile	Thr	Gly	Gly	Thr	Pro	Ser	Met	Val	Thr	Val	Asp
1745						1750					1755			
Gly	Thr	Lys	Thr	Gln	Thr	Arg	Leu	Val	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Val
1760						1765					1770			
Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Ile	Ile	Ala	Met	Lys	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser
1775						1780					1785			
Glu	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Asp	Gly	Pro	Ser
1790						1795					1800			
Gly	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ile	Thr	Asp	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg
1805						1810					1815			
Trp	Gln	Pro	Ala	Ile	Ala	Thr	Val	Asp	Ser	Tyr	Val	Ile	Ser	Tyr
1820						1825					1830			
Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Val	Ser	Gly	Asn
1835						1840					1845			
Thr	Val	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
1850						1855					1860			
Thr	Leu	Arg	Ile	Phe	Ala	Glu	Lys	Gly	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser	Thr
1865						1870					1875			

Ile	Thr	Ala	Lys	Phe	Thr	Thr	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Asp	Leu
1880						1885					1890			
Thr	Ala	Thr	Glu	Val	Gln	Ser	Glu	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr	Trp	Arg
1895						1900					1905			
Pro	Pro	Arg	Ala	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Tyr	Glu	Ser
1910						1915					1920			
Val	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Glu	Val	Ile	Val	Gly	Pro	Asp	Thr	Thr
1925						1930					1935			
Ser	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Ser	Thr	His	Tyr	Thr	Ala
1940						1945					1950			
Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly	Pro	Leu	Arg	Ser	Asn	Met	Ile	Gln
1955						1960					1965			
Thr	Ile	Phe	Thr	Thr	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Pro	Phe	Pro	Lys	Asp
1970						1975					1980			
Cys	Ser	Gln	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Thr	Ser	Gly	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Val	Phe
2000						2005					2010			
Cys	Asp	Met	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Trp	Ile	Val	Phe	Leu	Arg
2015						2020					2025			
Arg	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gln	Asn	Trp	Lys	Ala	Tyr
2030						2035					2040			
Ala	Ala	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg	Arg	Glu	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu
2045						2050					2055			
Asp	Asn	Leu	Asn	Lys	Ile	Thr	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Glu	Leu	Arg
2060						2065					2070			
Val	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Gly	Glu	Thr	Ala	Phe	Ala	Val	Tyr	Asp

2075 2080 2085
 Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val
 2090 2095 2100
 Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn
 2105 2110 2115
 Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile
 2120 2125 2130
 Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 2135 2140 2145
 Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His
 2150 2155 2160
 Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser
 2165 2170 2175
 Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn
 2180 2185 2190
 Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala
 2195 2200

 <210> 76
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Fibcon FN3 domain

 <400> 76

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

 Ile Thr Val Ser Trp Thr Pro Pro Ser Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 20 25 30

 Ile Thr Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Pro Gly Glu Pro Lys Glu Leu Thr
 35 40 45

Val Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Thr Ile Thr Gly Leu Thr Pro Gly
50 55 60

Val Glu Tyr Val Val Ser Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Asn Gln Glu Ser
65 70 75 80

Pro Pro Leu Val Gly Thr Gln Thr Thr
85

<210> 77
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

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

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<400> 78

Gly Ser Gly Ser
1

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<400> 80

Ala Pro Ala Pro
1

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<400> 81

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10

<210> 82
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất liên kết

<400> 82

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro
 20

<210> 83

<211> 40

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất liên kết

<400> 83

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 35 40

<210> 84

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất liên kết

<400> 84

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala
 20 25

<210> 85

<211> 8

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tencon BC loop

<400> 85

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 1 5

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tencon FG loop

<400> 86

Lys Gly Gly His Arg Ser Asn
 1 5

<210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 87

Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp
 1 5

<210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 88

Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 89

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 89

Trp Asp Pro Phe Ser Phe Tyr Asp
 1 5

<210> 90
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 90

Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu
 1 5

<210> 91
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 91

Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp
 1 5

<210> 92
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 92

Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp
 1 5

<210> 93
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 93

Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Asp
 1 5

<210> 94
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR BC loop

<400> 94

Asp Asp Pro Trp Asp Phe Tyr Glu
 1 5

<210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR FG loop

<400> 95

His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu
 1 5 10

<210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR FG loop

<400> 96

Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met
 1 5 10

<210> 97
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR from ECB97; P54AR4-83V22

<400> 97
 atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgcgctctg 60
 agctgggacg atccgtgggc gttctacgag agctttctga tccagtatca agagagcgag 120
 aaagtcgggtg aagcgattgt gctgaccgtc ccgggctccg agcgcttccta cgacctgacc 180
 ggtttgaagc cgggtaccga gtatacggtg agcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240
 gacactaata tccgcggtct gcctctgagc gccattttca ccacc 285

<210> 98
 <211> 285
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR from ECB15; P54AR4-83V2

<400> 98
 atgctgccag cccctaagaa tctggctcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgccctg 60
 agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttctctga ttcagtatca agaaagcgaa 120
 aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgctccta cgatctgacc 180
 ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccattttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240
 gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gogattttca ccacc 285

<210> 99
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tencon27 FN3 domain

<400> 99

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

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

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

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

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

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 100
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> TCL14 library

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (70)..(70)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> DẤU HIỆU HIỂM
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa is any amino acid

<400> 100

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

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

Ile Xaa Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Xaa Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 101
<211> 1408
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 101

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg

370		375		380											
Cys 385	Leu	Gln	His	Phe	Tyr 390	Gly	Pro	Asn	His	Glu 395	His	Cys	Phe	Asn	Arg 400
Thr	Leu	Leu	Arg	Asn 405	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu 410	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu 415	Tyr
Arg	Thr	Glu	Phe	Thr 420	Thr	Ala	Leu	Gln 425	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly 430
Gln	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Thr 440	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly 445
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu 455	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly 460	Arg	Phe	Met	Gln
Val 465	Val	Val	Ser	Arg	Ser 470	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu 480
Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Thr	Leu 495
Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Ile 505	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys 510
Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln 525
Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys 540
Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile 560
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu 575
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750

Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu
755 760 765

Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn
770 775 780

Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala
785 790 795 800

Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile
805 810 815

Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
820 825 830

Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
835 840 845

Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
850 855 860

Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
865 870 875 880

Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
885 890 895

Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
900 905 910

Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
915 920 925

Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
930 935 940

Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
945 950 955 960

Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
965 970 975

Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
980 985 990

Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser
995 1000 1005

Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala
1010 1015 1020

Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser
1025 1030 1035

Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu
1040 1045 1050

Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr
1055 1060 1065

Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala
1070 1075 1080

Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe
1085 1090 1095

Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly
1100 1105 1110

Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys
1115 1120 1125

Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu
1130 1135 1140

Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu
1145 1150 1155

Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val
1160 1165 1170

Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg
1175 1180 1185

Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly
1190 1195 1200

Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe
1205 1210 1215

Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys
1220 1225 1230

Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr

1235		1240		1245
Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu				
1250		1255		1260
Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe				
1265		1270		1275
Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu				
1280		1285		1290
Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe				
1295		1300		1305
Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro				
1310		1315		1320
Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp				
1325		1330		1335
His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser				
1340		1345		1350
Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val				
1355		1360		1365
His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr				
1370		1375		1380
Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp				
1385		1390		1395
Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser				
1400		1405		

<210> 102
 <211> 697
 <212> PRT
 <213> HOMO SAPIENS

 <400> 102

Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys

1		5		10		15											
Thr	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys		
		20						25					30				
Val	Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly		
		35					40					45					
Leu	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln		
	50					55					60						
Cys	Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu		
65					70					75					80		
Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn		
				85					90					95			
Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr		
			100					105						110			
Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu		
		115					120					125					
His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn		
		130				135					140						
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr		
145					150					155					160		
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser		
				165					170					175			
Glu	Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met		
			180					185					190				
Asp	His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr		
		195					200					205					
Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe		
	210					215					220						

Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys
225 230 235 240

Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr
245 250 255

Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr
260 265 270

Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr
275 280 285

Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His
290 295 300

Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu
305 310 315 320

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr
325 330 335

Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys
340 345 350

Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr
355 360 365

Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp
370 375 380

Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp
385 390 395 400

Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala
405 410 415

His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr
420 425 430

Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn
435 440 445

```

Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val
 450                               455                      460

Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu
465                               470                      475                      480

Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser
          485                               490                      495

Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp
          500                               505                      510

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu
          515                               520                      525

Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu
          530                               535                      540

Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp
545                               550                      555                      560

Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro
          565                               570                      575

Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile
          580                               585                      590

Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn
          595                               600                      605

Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser
          610                               615                      620

Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly
625                               630                      635                      640

Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val
          645                               650                      655

Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro
          660                               665                      670

```

Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile
 675 680 685

Ile Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
 690 695

<210> 103
 <211> 276
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

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

<210> 104
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 104
 ctgccggcac cgaagaacct ggttgtcagc cgtgtgaccg aggatagcgc acgtttgagc 60
 tggaccgctc cggatgcagc ctttgacagc ttctggattc gttactttga atttctgggt 120
 agcggtgagg cgatcggttct gacggtgccg ggctctgaac gcagctatga tttgacgggc 180
 ctgaagccgg gtactgagta cgtggttaac atcatgggcg ttaaggggtg taaaatcagc 240
 ccgccattgt ccgcgatctt taccacg 267

<210> 105
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất liên kết

<400> 105

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 106

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 106

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr

<210> 107

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 107

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

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

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

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

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

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

<210> 108

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 108

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

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

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

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

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

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

<210> 109

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 109

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

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

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

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

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

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

<210> 110
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 110

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

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

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

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

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

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

<210> 111
<211> 89
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 111

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 112

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 112

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 113
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 113

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 114
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 114

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 115
<211> 591
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 115
atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgagggtta ctgaggacag cgcgcgctctg 60
agctgggacg atccgtgggc gttctacgag agctttctga tccagtatca agagagcgag 120
aaagtcggtg aagcgattgt gctgaccgtc ccgggctccg agcgttccta cgacctgacc 180
ggtttgaagc cgggtaccga gtatacggtg agcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240
gacactaata tccgcggtct gcctctgagc gccattttca ccaccgcacc ggcaccggct 300
ccggctcctg ccccgtgcc ggctccgaag aacttggtgg tgagccgtgt taccgaagat 360
agcgcacgcc tgagctggac ggcaccgat gcggcggttcg atagcttctg gattcgctat 420
tttgagtttc tgggtagcgg tgaggcaatt gttctgacgg tgccgggctc tgaacgctcc 480
tacgatttga ccggtctgaa accgggcacc gagtatgtgg tgaacattct gagcgtaag 540
ggcggtagca tcagcccacc gctgagcgcg atcttcacga ctggtggttg c 591

<210> 116
<211> 582
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 116
atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgctg 60
agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120

```

aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgctccta cgatctgacc 180
ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240
gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccaccgcgcc tgcgccagcg 300
cctgcaccgg ctccgctgcc ggcaccgaag aacctgggtg tcagccgtgt gaccgaggat 360
agcgcacgtt tgagctggac cgctccggat gcagcctttg acagcttctg gattcgttac 420
tttgaatttc tgggtagcgg tgaggcgatc gttctgacgg tgccgggctc tgaacgcagc 480
tatgatttga cgggcctgaa gccgggtact gagtacgtgg ttaacatcat gggcgtaag 540
ggtggtaaaa tcagcccgcc attgtccgcg atctttacca cg 582

```

```

<210> 117
<211> 51
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> albumin binding domain

```

```

<400> 117

```

```

Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu
1           5           10           15

```

```

Glu Leu Lys Lys Ala Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile
          20           25           30

```

```

Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile
          35           40           45

```

```

Leu Lys Ala
          50

```

```

<210> 118
<211> 250
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

```

```

<400> 118

```

```

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

```

1		5		10		15											
Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Asp	Asp	Pro	Trp	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ser	Phe		
			20					25					30				
Leu	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu		
		35					40					45					
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro		
	50					55					60						
Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	His	Asn	Val	Tyr	Lys		
65					70					75					80		
Asp	Thr	Asn	Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Ala		
				85					90					95			
Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu		
			100					105						110			
Val	Val	Ser	Arg	Val	Thr	Glu	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala		
		115					120						125				
Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Tyr	Asp	Glu	Val	Val		
	130					135					140						
Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser		
145					150					155					160		
Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Val	Asn	Ile		
				165					170					175			
Leu	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe		
			180					185					190				
Thr	Thr	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala		
		195					200					205					
Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Asp	Tyr		
	210					215					220						

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
 225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 245 250

<210> 119
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 119

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val
 130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145					150					155					160
Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Val	Asn	Ile
				165					170					175	
Leu	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe
			180					185					190		
Thr	Thr	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala
		195					200					205			
Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Asp	Tyr
	210					215					220				
Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Val	Lys	Ala
225					230					235					240
Leu	Leu	Asp	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro						
				245					250						
<210>	120														
<211>	250														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule														
<400>	120														
Met	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Glu	Asp
1				5					10					15	
Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Asp	Asp	Pro	Trp	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ser	Phe
			20					25					30		
Leu	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu
		35					40					45			
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro
	50					55					60				
Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	His	Asn	Val	Tyr	Lys
65					70					75					80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 121

<211> 250

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 121

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
 225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 245 250

<210> 122
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 122

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 123
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 123

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asp	Gly	Tyr	Asp	Ser	Phe
	20							25					30		
Leu	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Asn	Leu
	35						40					45			
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro
	50					55					60				
Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	His	Asn	Val	Tyr	Lys
65					70					75					80
Asp	Thr	Asn	Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Glu	Phe	Thr	Thr	
				85					90					95	
<210>	124														
<211>	95														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	Miền FN3 gắn kết với EGFR														
<400>	124														
Met	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Glu	Asp
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Trp	Gly	Tyr	Asn	Gly	Asp	His	Phe	Asp	Ser	Phe
			20					25					30		
Leu	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Asn	Leu
		35					40					45			
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro
	50					55					60				
Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	His	Asn	Val	Tyr	Lys
65					70					75					80
Asp	Thr	Asn	Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Glu	Phe	Thr	Thr	
				85					90					95	

<210> 125
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 125

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 126
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 126

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

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

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu

35 40 45

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 127
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 127

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 128
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Trp Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Phe Asp Ser
20 25 30

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

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

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

Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 129

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 129

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

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

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

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

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 130
<211> 95
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 130

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

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

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

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

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val
65 70 75 80

Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 131
<211> 95
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 131

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 132

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 132

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

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

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

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

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val
65 70 75 80

Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 133

<211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 133

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 134
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 134

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 135

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 135

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 136

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 136

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 137

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 137

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 138

<211> 204

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 138

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu

165
 170
 175
 Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly
 180 185 190
 Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200
 <210> 139
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain
 <400> 139
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
 20 25 30
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
 85 90 95
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu
 115 120 125
 Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser
 130 135 140

Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val
 145 150 155 160

Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys
 165 170 175

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys
 180 185 190

Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200

<210> 140

<211> 204

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 140

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
 165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
 180 185 190

His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200

<210> 141

<211> 204

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 141

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140

Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190

Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 142
<211> 204
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 142

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

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

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

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
 85 90 95
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
 115 120 125
 Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 130 135 140
 Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
 165 170 175
 Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly
 180 185 190
 Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200
 <210> 143
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain
 <400> 143
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
 20 25 30

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
 115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 130 135 140

Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
 145 150 155 160

Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
 165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
 180 185 190

His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200

<210> 144

<211> 204

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 144

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
 20 25 30
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
 85 90 95
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
 115 120 125
 Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 130 135 140
 Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
 165 170 175
 Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
 180 185 190
 His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 195 200
 <210> 145
 <211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 145

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
 165 170 175

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

Thr

<210> 146

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 146

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

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

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

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

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

Thr	Asn	Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Ala	Pro
				85					90					95	

Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val
			100					105					110		

Val	Ser	Arg	Val	Thr	Glu	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala	Pro
		115					120					125			

Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Tyr	Asp	Glu	Val	Val	Val
	130					135					140				

Gly	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr
145					150					155					160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 147

<211> 194

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 147

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu

130 135 140
 Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160
 Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175
 Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
 180 185 190
 Thr Thr

 <210> 148
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

 <400> 148
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
 20 25 30
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
 130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 149
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 149

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr

<210> 150
<211> 193
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 150

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr

<210> 151

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 151

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

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110
 Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125
 Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser
 130 135 140
 Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160
 Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175
 Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
 180 185 190

Thr

<210> 152
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 152

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 153

<211> 193
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 153

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 154

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 154

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

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

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

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

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

Thr	Asn	Ile	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Ala	Pro
				85					90					95	

Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val
			100					105					110		

Val	Ser	Arg	Val	Thr	Glu	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala	Pro
		115					120					125			

Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Tyr	Phe	Glu	Phe	Val	Gly
	130					135					140				

Ser	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr
145					150					155					160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 155

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 155

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser
130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr

<210> 156
<211> 193
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 156

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val


```

100              105              110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
  115              120              125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
  130              135              140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
  145              150              155              160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
      165              170              175

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

```

Thr

```

<210> 157
<211> 193
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 157

```

```

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

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

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

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

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

```

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr

<210> 158
<211> 193
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 158

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr

<210> 159

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 159

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser
130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr

<210> 160

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 160

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 161
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 161

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180

185

190

Thr

<210> 162

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 162

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
 130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 163

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 163

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
165 170 175

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

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 164

<211> 249

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 164

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
 20 25 30
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110
 Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125
 Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140
 Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160
 Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
 165 170 175
 Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
 180 185 190
 Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
 195 200 205
 Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
 210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
 225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 245

<210> 165
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 165

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
165 170 175

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

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 166
<211> 588
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 166
ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60
tgggacgatc cgtgggcgtt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120
gtcggatgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180
ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaaatgt ctataaggac 240
actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca ccgcaccggc accggctccg 300
gctcctgccc cgctgccggc tccgaagaac ttggtggtga gccgtgttac cgaagatagc 360
gcacgcctga gctggacggc accggatgcg gcgttcgata gcttctggat tcgctatattt 420
gagtttctgg gtagcggatga ggcaattggt ctgacgggtgc cgggctctga acgctcctac 480
gatttgaccg gtctgaaacc gggcaccgag tatgtggtga acattctgag cgttaagggc 540

ggtagcatca gccaccgct gagcgcgatc ttcacgactg gtggttgc 588

<210> 167
 <211> 579
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding domain

<400> 167
 ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60
 tgggacgacc cgtgggcgtt ctatgagtct ttcctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120
 gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgagc gtcctacga tctgaccggc 180
 ctgaaaccgg gtacggagta cacggtgtcc atttacggtg ttcacaatgt gtataaagac 240
 accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca ccgcgcctgc gccagcgcct 300
 gcaccggctc cgctgccggc accgaagaac ctggttgtca gccgtgtgac cgaggatagc 360
 gcacgtttga gctggaccgc tccggatgca gcctttgaca gcttctggat tcgttacttt 420
 gaatttctgg gtagcgggtga ggcgatcgtt ctgacggtgc cgggctctga acgcagctat 480
 gatttgacgg gcctgaagcc gggtagtgag tacgtgggtta acatcatggg cgtaagggt 540
 ggtaaaatca gcccgccatt gtccgcgatc tttaccacg 579

<210> 168
 <211> 282
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR from ECB97

<400> 168
 ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60
 tgggacgatc cgtgggcgtt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120
 gtcggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggc 180
 ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240
 actaatatcc gcggtctgcc totgagcgcc attttcacca cc 282

<210> 169
 <211> 282

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR from ECB15

<400> 169

ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60

tgggacgacc cgtgggcgtt ctatgagtct ttcttgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120

gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgagc gctcctacga tctgaccggc 180

ctgaaaccgg gtacggagta cacgggtgtcc atttacgggtg ttcacaatgt gtataaagac 240

accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca cc 282

<210> 170

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 170

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr Cys
195

<210> 171

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 171

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr Cys
195

<210> 172

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 172

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

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

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

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60
 Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110
 Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125
 Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
 130 135 140
 Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160
 Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
 180 185 190
 Thr Thr Cys
 195

<210> 173
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 173

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
 20 25 30

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr Cys
 195

<210> 174

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 174

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr Cys
195

<210> 175

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 175

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

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

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

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

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

Asp	Thr	Asn	Ile	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Ala
				85					90					95	

Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu
			100					105					110		

Val	Val	Ser	Arg	Val	Thr	Glu	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala
		115					120					125			

Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Trp	Ile	Arg	Tyr	Phe	Glu	Phe	Val
	130						135				140				

Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser
145					150					155					160

Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Asn	Ile
				165					170					175	

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

Thr Thr Cys
195

<210> 176

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 176

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr Cys
 195

<210> 177

<211> 195

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 177

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu

```

130              135              140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145              150              155              160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165              170              175

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

Thr Thr Cys
195

<210> 178
<211> 195
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met binding molecule

<400> 178

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85      90      95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100     105     110

```

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr Cys
 195

<210> 179

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Consensus FG loop of EGFR binding FN3 domain

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Xaa may be Met hoặc Ile

<400> 179

His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu
 1 5 10

<210> 180

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GF loop of Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 180

Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met Leu
 1 5 10

<210> 181
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Consensus BC loop of Miền FN3 gắn kết với EGFR

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa may be Ala, Thr, Gly hoặc Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa may be Ala, Asp, Tyr hoặc Trp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa may be Pro, Asp hoặc Asn

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa may be Leu hoặc absent

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa may be Asp, His, Arg, Gly, Tyr hoặc Trp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa may be Glu, Asp hoặc Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa may be Ala, Phe, Gly, His hoặc Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa may be Tyr, Phe hoặc Leu

<400> 181

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 182
<211> 95
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR consensus sequence

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> Xaa may be Ala, Thr, Gly hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> Xaa may be Ala, Asp, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> Xaa may be Pro, Asp hoặc Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (25)..(25)
<223> Xaa may be Leu hoặc absent

<220>
<221> VARIANT
<222> (26)..(26)
<223> Xaa may be Asp, His, Arg, Gly, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> Xaa may be Gly, Asp hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)..(28)
<223> Xaa may be Ala, Phe, Gly, His hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> Xaa may be Tyr, Phe hoặc Leu

<220>

<221> VARIANT
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa may be Met hoặc Ile

 <400> 182

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

 Leu Arg Leu Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Phe
 20 25 30

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

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

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

 Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

 <210> 183
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR consensus sequence

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa may be Ala, Thr, Gly hoặc Asp

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa may be Ala, Asp, Tyr hoặc Trp

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa may be Pro, Asp hoặc Asn

 <220>

<221> VARIANT
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa may be Leu hoặc absent

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa may be Asp, His, Arg, Gly, Tyr hoặc Trp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa may be Gly, Asp hoặc Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa may be Ala, Phe, Gly, His hoặc Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa may be Tyr, Phe hoặc Leu

<400> 183

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

Leu Arg Leu Ser Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Phe
 20 25 30

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

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

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Leu Gly Ser Tyr Val
 65 70 75 80

Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90 95

<210> 184
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met C strand and CD loop consensus sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is Trp, Phe hoặc Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is Asp, Phe hoặc Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa is Val, Phe hoặc Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa is Val, Leu hoặc Thr

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa is Val, Arg, Gly, Leu, Thr hoặc Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa is Gly, Ser, Ala, Thr hoặc Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa is Glu hoặc Asp

<400> 184

Asp	Ser	Phe	Xaa	Ile	Arg	Tyr	Xaa	Glu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa
1				5				10					15	

<210> 185
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met F strand and FG loop consensus sequence

<220>

<221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is Tyr, Trp, Ile, Val, Gly hoặc Ala

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa is Asn, Thr, Qln hoặc Gly

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is Leu, Met, Asn hoặc Ile

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa is Gly hoặc Ser

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa is Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His hoặc Lys

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa is Ile, Val hoặc Leu

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa is Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr hoặc Leu

 <400> 185

 Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser
 1 5 10 15

Xaa

<210> 186
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met consensus sequence

 <220>
 <221> VARIANT

```

<222> (32)..(32)
<223> Xaa is Trp, Phe hoặc Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> Xaa is Asp, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (38)..(38)
<223> Xaa is Val, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (39)..(39)
<223> Xaa is Val, Leu hoặc Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (40)..(40)
<223> Xaa is Val, Arg, Gly, Leu, Thr hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (41)..(41)
<223> Xaa is Gly, Ser, Ala, Thr hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (43)..(43)
<223> Xaa is Glu hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (68)..(68)
<223> Xaa is Tyr, Trp, Ile, Val, Gly hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (70)..(70)
<223> Xaa is Asn, Thr, Qln hoặc Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (72)..(72)
<223> Xaa is Leu, Met, Asn hoặc Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (73)..(73)
<223> Xaa is Gly hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT

```

<222> (78)..(78)
 <223> Xaa is Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His hoặc Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa is Ile, Val hoặc Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa is Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr hoặc Leu

<400> 186

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

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

Ile Arg Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Xaa Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85

<210> 187
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR consensus FN3 domain of EGFR đặc hiệu kép/c-Met molecule

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa is Glu, Asn hoặc Arg

<220>
 <221> VARIANT

<222> (14)..(14)
 <223> Xaa is Glu hoặc Pro

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa is Leu hoặc Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa is His hoặc Trp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa is Glu hoặc Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa is Glu hoặc Pro

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa is Asn hoặc Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa is Gly hoặc Tyr

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa is Met hoặc Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa is Glu hoặc Ile

<400> 187

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

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

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

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

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

Thr Asn Xaa Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Xaa Phe Thr Thr
 85 90

<210> 188

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> c-Met consensus FN3 domain of EGFR đặc hiệu kép/c-Met molecule

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Glu, Asn hoặc Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Glu hoặc Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Leu hoặc Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (37)..(37)

<223> Xaa is Glu hoặc Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> (39)..(39)

<223> Xaa is Val hoặc Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (40)..(40)

<223> Xaa is Gly hoặc Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (41)..(41)
 <223> Xaa is Ser hoặc Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa is Glu hoặc Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa is Asn hoặc Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa is Leu hoặc Met

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa is Gly hoặc Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa is Ser hoặc Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (86)..(86)
 <223> Xaa is Glu hoặc Ile

<400> 188

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

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

Ile	Arg	Tyr	Phe	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Ala	Ile	Xaa	Leu	Thr
		35						40				45			

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Xaa Phe Thr Thr
85

<210> 189
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (34)..(34)
<223> C34S

<400> 189

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro

370		375		380
Gln Asn Leu Ile Lys	Gln Asn Cys Glu Leu Phe	Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395		400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro				
	405	410		415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys				
	420	425		430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys				
	435	440		445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His				
	450	455		460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser				
	465	470		475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr				
	485	490		495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp				
	500	505		510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala				
	515	520		525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu				
	530	535		540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys				
	545	550		555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val				
	565	570		575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu				
	580	585		

<210> 190
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met molecule

<400> 190

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe

180

185

190

Thr Thr

<210> 191

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met molecule

<400> 191

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

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

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 192
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met molecule

<400> 192

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

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

Thr Thr

<210> 193

<211> 193

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> EGFR đặc hiệu kép/c-Met molecule

<400> 193

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

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

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

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

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

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

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

Thr

<210> 194

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 194

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

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

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

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

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

<210> 195

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 195

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

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

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

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

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

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

<210> 196

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 196

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

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Ala Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30

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

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

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

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

<210> 197

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 197

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

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

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

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

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

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

<210> 198

<211> 94
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 198

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

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

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

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

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

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

<210> 199
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 199

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

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

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

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

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

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

<210> 200

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 200

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

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

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

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

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

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

<210> 201

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 201

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

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

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

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

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

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

<210> 202

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 202

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

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

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

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

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

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

<210> 203
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 203

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

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

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

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

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

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

<210> 204
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 204

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

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

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

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

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

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

<210> 205

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 205

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

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

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

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

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

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

<210> 206

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 206

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

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

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

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

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

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

<210> 207

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 207

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

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

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

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

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

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

<210> 208

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 208

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

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

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

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

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

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

<210> 209

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 209

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

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

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

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

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

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

<210> 210

<211> 94

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 210

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

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

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

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

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

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

<210> 211
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền FN3 gắn kết với EGFR

<400> 211

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

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

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

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

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

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

<210> 212
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 212

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 213
<211> 89
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 213

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Ser Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 214
<211> 89
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 214

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Ser Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 215

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 215

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 216

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 216

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 217

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 217

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

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp

20 25 30
 Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 218
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 218

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

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

Ile Arg Tyr Ser Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 219
 <211> 89

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 219

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 220
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 220

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

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

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50

55

60

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 221

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 221

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

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

Ile Ser Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45

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

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser
 65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 222

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 222

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Ser Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 223

<211> 89

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền FN3 gắn kết với c-Met

<400> 223

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp
20 25 30

Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ser Ser
65 70 75 80

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85

<210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<400> 224

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10