(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) **1-0030789**

(51)[7] **C07K 16/00**

(13) **B**

(21) 1-2015-01758 (22) 21/11/2013

(86) PCT/US2013/071288 21/11/2013 (87) WO 2014/081954 A1 30/05/2014

(30) 61/728,912 21/11/2012 US; 61/782,550 14/03/2013 US; 61/809,541 08/04/2013 US; 61/864,717 12/08/2013 US; 61/892,797 18/10/2013 US

(45) 25/01/2022 406 (43) 25/01/2016 334A

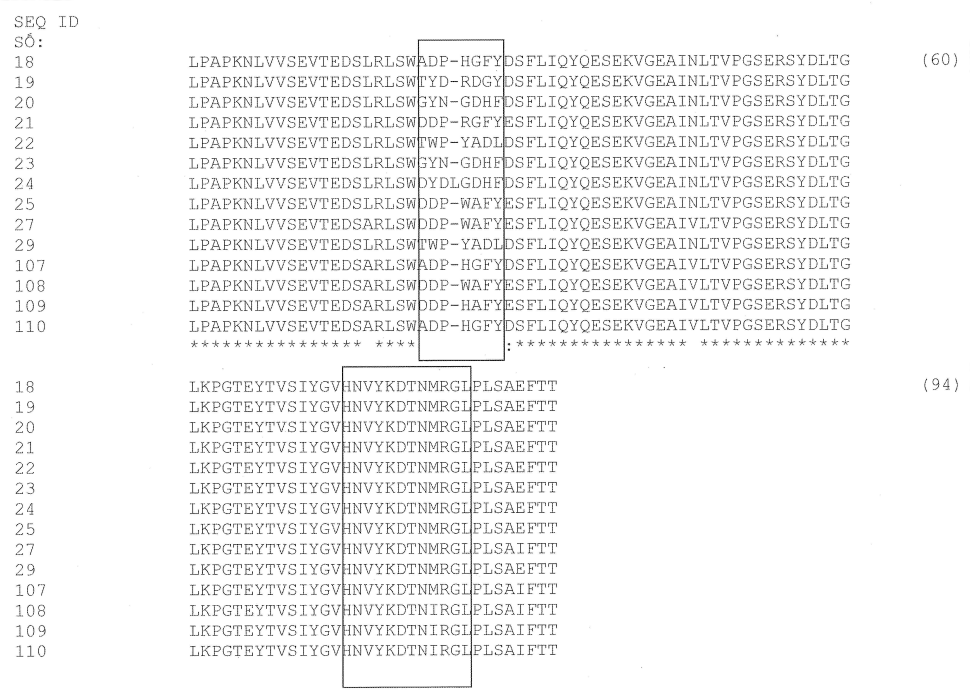
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, USA

(72) CHIU, Mark (US); MOORES, Sheri (US); NEIJSSEN, Joost (NL); PARREN, Paul (NL); SCHUURMAN, Janine (NL).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ EGFR/C-MET ĐẶC HIỆU KÉP, POLYNUCLEOTIT TỔNG HỢP ĐƯỢC PHÂN LẬP, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép, polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 và/hoặc LC2 của kháng thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể này, dược phẩm chứa kháng thể này và phương pháp sử dụng kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép và các phương pháp tạo ra và sử dụng các phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR, ErbBl hoặc HER1) là glycoprotein xuyên màng Tuýp I 170 kDa mà được mã hóa bởi gen tiền ung thư c-erbBl. EGFR là thành phần của họ Thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì người (HER- Human Epidermal growth factor Receptor) của các tyrosin kinaza thụ thể (RTK-Receptor Tyrosine Kinase) mà bao gồm HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) và HER4 (ErbB4). Tín hiệu EGFR được khởi đầu bởi phối tử gắn kết sau đó cảm ứng theo sự thay đổi thể cấu tạo, đồng lưỡng phân hoặc dị lưỡng phân của thụ thể với các thành phần họ ErbB khác, và sự tự chuyển phosphoryl hóa của thụ thể (Ferguson *và các đồng tác giả*, Annu Rev Biophys, 37: 353-73, 2008), mà khởi đầu các đợt truyền tín hiệu mà sau cùng tác động đến sự đa dạng của nhiều chức năng tế bào, bao gồm sự tăng sinh tế bào và sự sống. Sự gia tăng trong biểu hiện hoặc hoạt tính kinaza của EGFR đã được liên kết với một loạt bệnh ung thư của con người, làm EGFR là mục tiêu hấp dẫn để can thiệp liệu pháp 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 gia tăng cả về số bản sao gen EGFR và biểu hiện protein đã được kết hợp với các đáp ứng thuận lợi cho chất ức chế tyrosin kinaza EGFR, IRESSA™ (gefitinib), trong ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (Hirsch *và các đồng tác giả*, Ann Oncol 18:752-60, 2007).

Các liệu pháp EGFR bao gồm cả kháng thể phân tử nhỏ và kháng thể kháng EGFR, được chấp nhận để điều trị ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tụy, ung thư đầu và cổ, và ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC- Non Small Cell Lung Cancer) (Baselga và Arteaga, J Clin Oncol 23:2445-2459 (20005; 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).

Tính hiệu quả của các liệu pháp kháng EGFR có thể phụ thuộc vào loại khối u và tình trạng đột biến/khuếch đại EGFR trong khối u. Các tác dụng phụ của các liệu pháp điều trị hiện nay có thể bao gồm độc tính của 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 and Perez-Soler, Targ Oncol 4: 107-119, 2009). Các chất ức chế tyrosin kinaza EGFR (TKI-Tyrosine Kinase Inhibitor) thông thường được sử dụng như các liệu pháp dòng 2nd cho ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC), nhưng thường ngừng hoạt động trong mười hai tháng do các con đường đề kháng (Riely *và các đồng tác giả*, Clin Cancer Res 12: 839-44, 2006).

c-Met mã hóa thụ thể tyrosin kinaza xuyên màng. Nó được nhận biết trước tiên là gen tiền ung thư vào năm 1984 sau khi phát hiện ra rằng việc điều trị với chất gây ung thư đã dẫn tới cấu thành protein dung hợp hoạt hóa TPR-MET (Cooper *và các đồng tác giả*, Nature 311:29-33, 1984). Sự hoạt hóa của c-Met bởi phối tử yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF- Hepatocyte Growth Factor) của nó kích thích lượng lớn quá trình tế bào bao gồm sự tăng trưởng, vận động, sự xâm lấn, di căn, chuyển dạng trung mô-biểu mô, sự tạo mạch/chữa 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 như protein chuỗi đơn mà là protein phân giải được tách thành các đơn vị con –anpha 50 kDa và đơn vị con - beta 140 kDa được liên kết bởi liên kết disunfua (Ma *và các đồng tác giả*, Cancer and Metastasis Reviews Reviews, 22: 309-325, 2003). c-Met có cấu trúc tương tự với các thụ thể có màng khác như RON và Sea. Hóa học lượng pháp chính xác của HGF: gắn kết c-Met không rõ ràng, nhưng thường được cho rằng hai phân tử HGF gắn với hai phân tử c-Met dẫn đến sự lưỡng phân hóa thụ thể và tự phosphoryl hóa ở các tyroxin 1230, 1234, và 1235 (Stamos *và các đồng tác giả*, The EMBO Journal 23: 2325-2335, 2004). Sự tự phosphoryl hóa c-Met không phụ thuộc phối tử cũng có thể xảy ra do khuếch đại gen, đột biến hoặc thụ thể biểu hiện quá mức.

c-Met được khuếch đại, bị đột biến hoặc có biểu hiện quá mức thường xuyên ở nhiều loại ung thư bao gồm dạ dày, phổi, ruột kết, vú, bàng quang, đầu và cổ, buồng trứng, tuyến tiền liệt, tuyến giáp, tuyến tụy, và các loại ung thư hệ thần kinh trung ương

(CNS). Các đột biến sai nghĩa thường khu trú ở miền kinaza thường được tìm thấy trong các loại ung thư biểu mô tế bào nhú thận (PRCC-Papillary Renal Cell Carcinoma) di truyền và trong 13% PRCC ngẫu nhiên (Schmidt et al., Oncogene 18: 2343-2350, 1999). Các đột biến c-Met khu trú ở các miền semaphorin hoặc miền cận màng của c-Met thường được tìm thấy trong các loại ung thư dạ dày, đầu và cổ, gan, buồng trứng, NSCLC và tuyến giáp (Ma *và các đồng tác giả,* Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003; Sakakura *và các đồng tác giả*, Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299-305). Sự khuếch đại c-Met đã được phát hiện trong các loại ung thư não, đại trực tràng, dạ dày, và ung thư phổi, thường liên quan đến sự tiến triển của bệnh (Ma *và các đồng tác giả*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003). Khuếch đại c-Met biểu hiện lên đến 4% và 20% là ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC) và ung thư dạ dày, lần lượt, (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). Ngay cả không có khuếch đại gen, biểu hiện quá mức c-Met được quan sát thường xuyên ở ung thư phổi (Ichimura *và các đồng tác giả*, Jpn J Cancer Res, 87:1063-9, 1996). Hơn nữa, trong các mẫu lâm sàng, gần một nửa các loại ung thư mô tuyến phổi biểu hiện mức độ c-Met và HGF cao, cả hai tương quan với tốc độ tăng trưởng khối u được, di căn và tiên lượng xấu tăng cường (Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21-35, 2011; Siegfried *và các đồng tác giả*, Ann Thorac Surg 66: 1915-8, 1998).

Gần 60% tất cả khối u mà trở lên kháng lại các chất ức chế tyrosin kinaza EGFR làm tăng biểu hiện c-Met, khuếch đại c-Met, hoặc làm tăng phối tử đã biết duy nhất c-Met, HGF (Turke và các đồng tác giả, Cancer Cell, 17:77-88, 2010), cho thấy sự tồn tại của con đường bù cho EGFR qua c-Met. Khuếch đại c-Met được nhận biết trước tiên trong các tế bào được nuôi cấy mà trở nên kháng lại gefitinib, chất ức chế kinaza EGFR, và biểu hiện sự sống được tăng cường qua con đường Her3 (Engelman và các đồng tác giả, Science, 316:1039-43, 2007). Điều này còn được xác nhận trong các mẫu lâm sàng mà chín trong 43 bệnh nhân có sức đề kháng với mỗi một erlotinib hoặc gefitinib được biểu hiện sự khuếch đại c-Met, so với chỉ có hai trong số 62 bệnh nhân không được điều trị. Bốn trong số chín bệnh nhân được điều trị cũng có đột biến hoạt hóa EGFR, T790M, chứng tỏ các con đường đề kháng đồng thời (Beat *và các đồng tác giả*, Proc Natl Acad Sci U S A, 104:20932-7, 2007).

Các vai trò riêng của cả EGFR và c-Met trong ung thư được thiết lập tốt, làm các đích hấp dẫn cho liệu pháp kết hợp. Cả hai tín hiệu các thụ thể thông qua các con đường sống và con đường kháng apoptotic (ERK và AKT); do đó, sự ức chế các cặp trong sự kết hợp có thể giới hạn tiềm năng hoạt hoá con đường bù nhờ đó nâng cao tính hiệu quả tổng thể. Các liệu pháp kết hợp nhắm trúng đích EGFR và c-Met được kiểm tra trong các thử nghiệm lâm sàng với Tarceva® (erlotinib) trong kết hợp với kháng thể kháng c-Met hóa trị một cho NSCLC (Spigel *và các đồng tác giả*, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011, Journal of Clinical Oncology: Chicago, IL. p. 7505) and Tarceva (erlotinib) trong kết hợp với ARQ-197, chất ức chế phân tử nhỏ của c-Met (Adjei *và các đồng tác giả*, Oncologist, 16:788-99, 2011). Các liệu pháp kết hợp hoặc các phân tử kháng EGFR/c-Met đặc hiệu kép đã được bộc lộ ới ví dụ trong: Công bố Patent Quốc tế các Số. WO2008/127710, WO2009/111691, WO2009/126834, WO2010/039248, WO2010/115551 và Công bố Patent Mỹ Số. US2009/0042906.

Các phương pháp tiếp cận liệu pháp điều trị phân tử lớn và phân tử nhỏ hiện tại để đối kháng các con đường tín hiệu EGFR và/hoặc c-Met cho liệu pháp có thể dưới mức tối ưu khiến có thể thiếu độ đặc hiệu, tiềm năng hoạt tính không đúng đích và độc tính hạn chế liều lượng có thể gặp ở các chất ức chế phân tử nhỏ. Các kháng thể hóa trị hai đặc hiệu đơn thông thườngcó thể thu được trong phân cụm của các thụ thể gắn màng và hoạt tính không mong muốn của các con đường tín hiệu ở phía dưới. Các kháng thể hóa trị một có các chuỗi nặng có chiều dài toàn bộ (một nửa các nhánh) gây phức tạp và chi phí đáng kể cho quá trình sản xuất.

Do đó cần thiết phải có sự bổ sung các chất ức chế c-Met và/hoặc EGFR đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép đối với cả mục đích liệu pháp điều trị và chẩn đoán.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một phương án sáng chế đề xuất thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì đặc hiệu kép phân lập (EGFR)/ kháng thụ thể (c-Met) của yếu tố tăng trưởng tế bào gan, bao gồm:

chuỗi nặng thứ nhất (HC1) bao gồm miền cố định HC1 3 (HC1 CH3) và vùng biến đổi HC1 1 (VH1);

chuỗi nặng thứ hai (HC2) bao gồm miền cố định HC2 3 (HC2 CH3) và vùng biến đổi HC2 2 (VH2);

chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1) bao gồm chuỗi nhẹ vùng biến đổi 1 (VL1); và

chuỗi nhẹ thứ hai (LC2) bao gồm chuỗi nhẹ vùng biến đổi 2 (VL2), trong đó cặp VH1 và VL1 tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR, cặp VH2 và VL2 tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met, HC1 bao gồm ít nhất một sự thay thế trong HC1 CH3 và HC2 bao gồm ít nhất một sự thay thế trong HC2 CH3, và sự thay thế trong HC1 CH3 và sự thay thế trong HC2 CH3 xảy ra ở các vị trí gốc axit amin khác nhau, khi số gốc theo chỉ số EU.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép, trong đó kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của các kinaza được điều hòa bởi tín hiệu ngoại bào 1 và 2 (ERK1/2) trong dòng tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc SKMES-1 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 10 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 20 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 30 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 40 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 50 lần hoặc nhỏ hơn ít nhất khoảng 60 lần khi so với trị số IC_{50} ức chế sự phosphoryl hóa ERK1/2 trong các dòng tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc SKMES-1 có hỗn hợp kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm chuỗi nặng 3 (HC3) và chuỗi nhẹ 3 (LC3) và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm chuỗi nặng 4 (HC4) và chuỗi nhẹ 4 (LC4), trong đó HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 có các trình tự axit amin lần lượt tương đồng, trong đó sự phosphoryl hóa ERK1/2 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể kháng photpho ERK1/2 làm kháng thể bắt và kháng thể gắn với ERK1/2 được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép, trong đó kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của protein kinaza B (AKT) ở Ser473 trong dòng tế bào NCI-H1975 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 70 lần khi so với với trị số IC_{50} ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Ser473 trong dòng tế bào NCI-H1975 với hỗn hợp kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm HC3 và LC3 và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm HC4 và LC4, trong đó HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng , trong đó sự phosphoryl hóa AKT ở Ser473 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể gắn với AKT được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa làm kháng

thể bắt và kháng thể AKT Ser473 kháng photpho được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép mà gắn kết EGFR có SEQ ID SỐ: 73 ở các gốc EGFR K489, 1491, K467 và S492 và c-Met ở các gốc PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID SỐ: 238) và FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID SỐ: 239).

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép mà ức chế sự tăng trưởng của các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 300 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 400 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 500 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 600 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 700 lần hoặc nhỏ hơn ít nhất khoảng 800 lần khi so với với trị số IC_{50} ức chế sự phát triển các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 with cetuximab, khi các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 được phát triển trong các điều kiện kèm theo thấp.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép mà ức chế sự tăng trưởng của u tế bào SKMES-1 biểu hiện HGF ở chuột SCID Beige với tỷ lệ phần trăm (%) trị số T/C là nhỏ hơn ít nhất 500 lần trong ngày 36 khi so với cetuximab, khi kháng thể đặc hiệu kép và cetuximab được dùng ở liều lượng 20 mg/kg.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép trong đó HC1 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc F405L và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc F405L, trong đó số gốc theo chỉ số EU.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ CDR, VH1, VL1, VH2, VL2, HC1, LC1, HC2 và LC2 nhất định.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 hoặc LC2 theo sáng chế.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất vectơ bao gồm polynucleotit theo sáng chế.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm vectơ theo sáng chế.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập, bao gồm:

kết hợp kháng thể kháng EGFR hóa trị hai đặc hiệu đơn được phân lập bao gồm hai chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 199 và hai chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 200 và kháng thể kháng c-Met hóa trị hai đặc hiệu đơn được phân lập bao gồm hai chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 201 và hai chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 202 thành hỗn hợp có tỷ lệ mol khoảng 1:1;
đưa chất khử vào hỗn hợp;
ủ hỗn hợp khoảng chín mươi phút đến sáu giờ;
loại bỏ chất khử; và
tinh chế kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng thứ nhất có SEQ ID SỐ: 199 và chuỗi nặng thứ hai có SEQ ID SỐ: 201, chuỗi nhẹ thứ nhất có SEQ ID SỐ: 200 và chuỗi nhẹ thứ hai có SEQ ID SỐ: 202, trong đó chuỗi nặng thứ nhất có SEQ ID SỐ: 199 ghép cặp với chuỗi nhẹ thứ nhất có SEQ ID SỐ: 200 để tạo thành miền gắn kết thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR, và chuỗi nặng thứ hai có SEQ ID SỐ: 201 ghép cặp với chuỗi nhẹ thứ hai có SEQ ID SỐ: 202 để tạo thành miền gắn kết thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép hữu hiệu về liệu pháp điều trị theo sáng chế cho bệnh nhân có nhu cầu để đủ thời gian điều trị ung thư.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển hoặc sự tăng sinh của các tế bào mà biểu hiện EGFR và/hoặc c-Met, bao gồm sự tiếp xúc các tế bào với kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển hoặc di căn của EGFR và/hoặc c-Met biểu hiện khối u hoặc các tế bào ung thư trong đối tượng bao gồm dùng cho đối tượng lượng kháng thể đặc hiệu kép hữu hiệu theo sáng chế để ức chế sự phát triển hoặc di căn của EGFR và/hoặc c-Met biểu hiện khối u hoặc các tế bào ung thư.

Mô tả vắn 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 đóng khung ở các gốc 22-28 và 75-86 có SEQ ID SỐ: 18. Một số biến thể bao gồm các sự thay thế L17A, N46K và E86I cải thiện tính ổn định nhiệt (số gốc theo Tencon SEQ ID SỐ: 1).

Fig.2. Việc sắp xếp trình tự của giàn Tencon27 (SEQ ID SỐ: 99) và thư viện TCL14 (SEQ ID SỐ: 100) có bề mặt xen kẽ C-CD-F-FG ngẫu nhiên. Các gốc vòng được đóng khung. Các vòng và các sợi C được chỉ ra trên các trình tự.

Fig.3. Sự sắp xếp trình tự của các miền FN3 gắn c-Met. Vòng C và sợi CD và vòng F và sợi FG được đóng khung và nối các gốc từ 29 đến 43 và từ 65 đến 81.

Fig. 4. Sự ức chế phosphoryl hóa c-Met trong các tế bào NCI-H292 được điều trị trước bằng các phân tử chứa miền FN3 đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép và được kích thích bằng HGF được thể hiện. Việc tăng đáng kể về sự hiệu nghiệm của phân tử đặc hiệu kép EGFR/c-Met (ECB1) được quan sát khi so với miền FN3 gắn c-Met đặc hiệu đơn (P114AR5P74-A5, được thể hiện là A5 trong Hình vẽ) trên chính nó hoặc trong sự kết hợp với miền FN3 gắn kết EGFR (P54AR4-83v2, được thể hiện là 83v2 trong Hình vẽ).

Fig.5. Sự ức chế phosphoryl hóa EGFR và c-Met trong các tế bào được xử lý trước bằng miền các phân tử chứa FN3 đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép. Trong các dòng tế bào biểu hiện các mức cao của EGFR, NCI-H292 (Fig.5A) và H596 (Fig. 5B), miền FN3 đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép kháng EGFR chứa các phân tử có hiệu nghiệm như nhau ở việc làm giảm sự phosphoryl hóa EGFR. Trong các dòng tế bào biểu hiện các mức thấp của EGFR tương đối với c-Met, NCI-H441 (Fig.5C), các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép cải thiện sự hiệu nghiệm đối với việc ức chế phosphoryl hóa EGFR so với riêng miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn. Trong các dòng tế bào có các mức thấp của c-Met, tương đối với EGFR, NCI-H292 (Fig.5D) và H596 (Fig.5E), sự ức chế phosphoryl hóa c-Met có khả năng đáng kể với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chỉ so với miền FN3 gắn c-Met các phân tử đặc hiệu đơn được sử dụng trong nghiên cứu là: ECB5 đặc hiệu kép (được thể hiện là 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 dược lý trong các khối u được phân lập từ chuột được dùng thuốc theo liều với các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép trong khoảng thời gian 6 giờ hoặc 72 giờ. Tất cả các phân tử làm giảm đáng kể sự phosphoryl hóa c-Met, EGFR và ERK tại 6 giờ hoặc 72 giờ, mức độ nếu ức chế phụ thuộc vào ái lực của các miền FN3 đối với EGFR và/hoặc c-Met. Các phân tử đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách nối miền FN3

gắn kết EGFR có ái lực cao ("83" trong Hình vẽ là p54AR4-83v2) hoặc trung bình ("17v2" trong hình vẽ là P53A1R5-17v2) với miền FN3 gắn c-Met có ái lực cao ("A3" trong Hình vẽ là P114AR7P94-A3) hoặc trung bình ("A5" trong hình vẽ là P114AR5P74-A5).

Fig.7. Sự tích lũy huyết tương (hình trên) và khối u (hình dưới) của các phân tử EGFR/cMet đặc hiệu kép có các ái lực biến đổi được liên kết với miền gắn albumin (ABD) được thể hiện là 6 giờ (trái) và 72 giờ (phải) sau khi dùng IP. Sáu giờ sau khi dùng, sự tích lũy khối u là tối đa ở chuột được dùng thuốc theo liều với phân tử đặc hiệu kép chứa miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình (17v2) hoặc miền gắn kết EGFR có ái lực cao (83v2). Các phân tử đặc hiệu kép được gắn các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc EGFR có ái lực trung bình hoặc cao như sau đây: 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 dùng để chỉ p54AR4-83v2; 17v2 dùng để chỉ p53A1R5-17v2; A3 dùng để chỉ p114AR7P94-A3 và A5 dùng để chỉ p114AR5P74-A5.

Fig.8. Các kiểu ghép ngoại lai khối u H292-HGF được cấy vào chuột SCID Beige. Khi các khối u đạt thể tích trung bình khoảng chừng 80 mm^3, chuột được dùng thuốc theo liều ba lần mỗi tuần với các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép (25 mg/kg) hoặc chất dẫn thuốc PBS. Tất cả các phân tử đặc hiệu kép làm giảm sự tăng trưởng khối u, sự ức chế tăng trưởng khối u (TGI- Tumor Growth Inhibition) phụ thuộc vào các ái lực của các phân tử đối với c-Met và EGFR (cMet cao-EGFR cao dùng để chỉ p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); EGFR cao- cMet trung bình dùng để chỉ p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); EGFR trung bình- cMet cao dùng để chỉ p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3 (ECB39); EGFR trung bình-cMet trung bình dùng để chỉ p53A1R5-17-p114AR5P74-A 5 (ECB28)).

Fig.9. Các kiểu ghép ngoại lai khối u H292-HGF được cấy vào chuột SCID Beige và chúng được điều trị bằng các liệu pháp khác nhau. Hoạt tính kháng u của các liệu pháp được thể hiện (phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép dùng để chỉ p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3-ABD (ECB38); các liệu pháp khác là crizotinib, erlotinib, cetuximab, và sự kết hợp của crizotinib và erlotinib).

Fig.10. Các kiểu ghép ngoại lai khối u SKMES-HGF được cấy vào chuột SCID Beige và chuột được điều trị bằng các liệu pháp khác nhau. Hoạt tính kháng u của các

liệu pháp được thể hiện như là sự thay đổi về kích thước khối u (mm^3) theo thời gian. Kháng thể EGFR/c-Met EM1-mAb đặc hiệu kép được dùng thuốc theo liều qua màng bụng (i.p.) hai lần một tuần hoặc ở liều lượng là 20 mg/kg, 5 mg/kg, hoặc 1 mg/kg; cetuximab được dùng thuốc theo liều i.p. hai lần một tuần ở liều lượng 20 mg/kg. Các mũi tên trong hình vẽ thể hiện các ngày dùng. Số các kháng thể được chỉ ra theo liều lượng được dùng thuốc theo liều.

Fig.11. Các kiểu ghép ngoại lai khối u HCC827 được cấy vào chuột thiếu hụt miễn dịch và chuột được điều trị bằng erlotinib hoặc EM1-mAb ở các liều lượng được chỉ định. EM1-mAb được dùng hai tuần một lần và erlotinib một lần một ngày trong khoảng bốn tuần. Các mũi tên trong hình vẽ thể hiện các ngày dùng. Hoạt tính kháng u của các liệu pháp được thể hiện như là sự thay đổi về kích thước khối u (mm^3) theo thời gian.

Fig.12. Các kiểu ghép ngoại lai khối u SNU-5 được cấy vào chuột CB17/SCID và chuột được điều trị với liều lượng 10 mg/kg cetuximab hoặc 10 mg/kg hoặc 1 mg/kg EM1-mAb. Các kháng thể được dùng thuốc theo liều hai tuần một lần trong khoảng bốn tuần. Các mũi tên trong hình vẽ thể hiện các ngày dùng. Hoạt tính kháng u của các liệu pháp được thể hiện như là sự thay đổi về kích thước khối u (mm^3) theo thời gian.

Fig.13. Các kiểu ghép ngoại lai khối u H1975-HGF được cấy vào chuột thiếu hụt miễn dịch và chuột được điều trị với liều lượng 10 mg/kg cetuximab, 10 mg/kg EM1-mAb, 50 mg/kg erlotinib, 15 mg/kg afatinib, hoặc sự kết hợp của 10 mg/kg EM1-mAb và 15 mg/kg afatinib. Các kháng thể được dùng thuốc theo liều hai tuần một lần và các phân tử nhỏ một lần một ngàytrong khoảng ba tuần. Các mũi tên trong hình vẽ thể hiện các ngày dùng. Hoạt tính kháng u của các liệu pháp được thể hiện như là sự thay đổi về kích thước khối u (mm^3) theo thời gian.

Fig.14. Các kiểu ghép ngoại lai khối u HCC827-ER1 được cấy vào chuột thiếu hụt miễn dịch và chuột được điều trị với 10 mg/kg EM1-mAb, 25 mg/kg erlotinib, hoặc sự kết hợp của cả hai. EM1-mAb được dùng thuốc theo liều hai tuần một lần và erlotinib một lần một ngày trong khoảng 19 ngày. Các mũi tên trong hình vẽ thể hiện các ngày dùng. Việc hoạt tính kháng u của các liệu pháp được thể hiện như là sự thay đổi về kích thước khối u (mm^3) theo thời gian.

Fig.15. Các mức độ EGFR và c-Met trung bình trong các hợp chất dung giải tế bào khối u được phân lập từ các kiểu ghép ngoại lai khối u H1975 HGF được cấy vào

chuột SCID Beige sau khi dùng liều duy nhất là 20 mg/kg EM1-mAb. Các mức độ thụ thể được thể hiện theo % đối chứng PBS tại các lần chỉ định điều trị tiếp theo.

Fig.16. Các kiểu ghép ngoại lai khối u H1975-HGF được cấy vào chuột thiếu hụt miễn dịch và chuột được điều trị với 10 mg/kg EM1-mAb hoặc10 mg/kg EM1-mAb biến thể IgG2V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S không có sự gắn kết thụ thể Fc và thiếu các chức năng cơ quan tác động. Các kháng thể được dùng thuốc theo liều hai tuần một lần tại các ngày chỉ định. Hoạt tính kháng u của các liệu pháp được thể hiện như là sự thay đổi về kích thước khối u (mm^3) theo thời gian.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền fibronectin tuýp III (FN3- Fibronectin type III)" (miền FN3) dùng để chỉ miền xuất hiện thường xuyên trong các protein bao gồm các fibronectin, tenasxin, các protetin cytoskeletal nội bào, các thụ thể cytokin và các enzym prokaryotic (Bork and 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). Để ví dụ về các miền FN3 là 15 miền FN3 khác nhau có trong tenasxin C ở người, 15 miền FN3 khác nhau có trong fibronectin ở người (FN- Human Fibronectin), và các miền FN3 tổng hợp không tự nhiên như được mô tả ví dụ trong Công bố Paten Mỹ Số. 2010/0216708. Các miền FN3 riêng lẻ được gọi bằng số miền và tên protein, ví dụ, miền FN3 thứ 3 của tenasxin (TN3), hoặc miền FN3 thứ 10 của fibronectin (FN10).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thay thế" hoặc "được thay thế" hoặc 'đột biến" hoặc "bị đột biến" dùng để chỉ sự thay đổi, xóa hoặc chèn một hoặc nhiều axit amin hoặc nucleotit trong trình tự polypeptit hoặc polynucleotit để tạo ra biến thể của trình tự này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự ngẫu nhiên hóa" hoặc "được ngẫu nhiên hóa" hoặc "được đa dạng hóa" hoặc "sự đa dạng" dùng để chỉ việc thực hiện ít nhất một sự thay thế, sự chèn hoặc xóa trong trình tự polynucleotit hoặc polypeptit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến thể" dùng để chỉ polypeptit hoặc polynucleotit mà khác với polypeptit tham chiếu hoặc polynucleotit tham chiếu bởi một hoặc nhiều cải biến ví dụ như, các sự thay thế, chèn hoặc xóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "các gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu" dùng để chỉ khả năng của miền FN3, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met, hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế để gắn kết kháng nguyên được xác định trước với hằng số phân ly (K_D) là khoảng $1x10^{-6}$ M hoặc nhỏ hơn, ví dụ khoảng $1x10^{-7}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-10}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-11}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-12}$ M hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng $1x10^{-13}$ M hoặc nhỏ hơn. Điển hình về các miền FN3, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế gắn kết kháng nguyên được xác định trước (tức là EGFR hoặc c-Met) với K_D mà nhỏ hơn ít nhất mười lần K_D của nó đối với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ BSA hoặc cazein) như được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng ví dụ như thiết bị Proteon Instrument (BioRad). Do đó, phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu mỗi EGFR và c-Met với ái lực gắn kết (K_D) ít nhất là khoảng $1x10^{-6}$ M hoặc nhỏ hơn, ví dụ khoảng $1x10^{-7}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-10}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-11}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-12}$ M hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng $1x10^{-13}$ M hoặc nhỏ hơn. phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế mà có thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên được xác định trước, tuy nhiên, có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ kháng nguyên được xác định trước tương tự với loài khác (các đồng đẳng).

Thuật ngữ "thư viện" dùng để chỉ tập hợp của các biến thể. Thư viện có thể bao gồm các biến thể polypeptit hoặc polynucleotit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tính ổn định" dùng để chỉ khả năng của phân tử để duy trì trạng thái gập trong các điều kiện sinh lý sao cho nó giữ được ít nhất một trong các hoạt tính chức năng bình thường của nó, ví dụ, gắn kết kháng nguyên được xác định trước như EGFR hoặc c-Met.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì" hoặc "EGFR" dùng để chỉ EGFR ở người (còn được gọi là HER1 hoặc ErbB1 (Ullrich *và các đồng tác giả*, Nature 309:418-425, 1984) có trình tự axit amin được thể hiện

trong SEQ ID SỐ: 73 và trong số truy cập ngân hàng gen NP_005219, cũng như các biến thể dạng tự nhiên của nó. Các biến thể này bao gồm EGFRvIII đã biết và các biến thể được ghép xen kẽ theo cách khác (ví dụ, như được nhận biết bởi các số Truy cập wissProt P00533-1 (loại dại; đồng nhất với SEQ ID SỐ: 73 và NP_005219), P00533-2 (F404L/L405S), P00533-3 (628-705: CTGPGLEGCgP... GEAPNQALLR →PGNESLKAML...SVIITASSCH và 706-1210 được xóa), P00533-4 (C628S và 629-1210 được xóa), các biến thể GlnQ98, R266, K521, I674, G962, và P988 (Livingston *và các đồng tác giả*, NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478), T790M, L858R/T790M and del(E746, A750).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phối tử EGFR" bao gồm tất cả (ví dụ, sinh lý học) các phối tử cho EGFR, bao gồm EGF, TGFα, heparin gắn kết EGF (HB-EGF), amphiregulin (AR), và epiregulin (EPI).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "yếu tố tăng trưởng biểu bì" (EGF-Epidermal Growth Factor) dùng để chỉ EGF ở người có 53 axit amin đã biết có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 74.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan" hoặc "c-Met" dùng để chỉ c-Met ở người có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 101 hoặc trong Số Truy Cập Ngân hàng Gen: NP_001120972 và các biến thể tự nhiên của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "yếu tố tăng trưởng tế bào gan" (HGF-Hepatocyte Growth Factor) dùng để chỉ HGF ở người đã biết có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 102 mà được tách để tạo thành lưỡng phân gồm chuỗi alpha và chuỗi beta được liên kết bằng liên kết disunfit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phong bế gắn kết" hoặc "ức chế gắn kết", có thể hoán đổi cho nhau dùng để chỉ khả năng các miền FN3, phân tử chứa miền EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế để phong bế hoặc ức chế sự gắn kết của phối tử EGFR như EGF với EGFR và/hoặc HGF với c-Met, và bao gồm cả sự phong bế/ức chế một phần và hoàn toàn. Sự phong bế/ức chế phối tử EGFR như EGF với EGFR và/hoặc HGF với c-Met bởi các miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép chứa phân tử, chất đặc hiệu kép mà gắn kết EGFR và c-Met một cách đặc hiệu hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế làm giảm một phần hoặc hoàn toàn mức độ bình thường

của tín hiệu EGFR và/hoặc tín hiệu c-Met khi so với phối tử EGFR gắn kết với EGFR và/hoặc HGF gắn kết với c-Met mà không phong bế hoặc ức chế. Các miền FN3, phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế "sự phong bế gắn kết" của phối tử EGFR như EGF với EGFR và/hoặc HGF với c-Met khi ức chế 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%. Sự ức chế gắn kết có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, ví dụ bằng cách đo sự ức chế gắn kết của EGF được biotinylat hóa trên các tế bào A431 biểu hiện EGFR tiếp xúc với phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bằng cách sử dụng FACS, và bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, hoặc đo sự ức chế gắn kết của HGF được biotinylat hóa trên miền ngoại bào c-Met bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "tín hiệu EGFR" dùng để chỉ sự dẫn truyền tín hiệu được gây ra bởi phối tử EGFR gắn kết với EGFR dẫn đến tự phosphoryl hóa ít nhất một gốc tyroxin trong EGFR. Ví dụ về phối tử EGFR là EGF.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự "vô hiệu hóa tín hiệu EGFR" dùng để chỉ khả năng của các miền FN3, phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế để ức chế tín hiệu EGFR gây ra do bị cảm ứng bởi phối tử EGFR như EGF 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% .

Thuật ngữ "tín hiệu c-Met" dùng để chỉ sự dẫn truyền tín hiệu gây ra do cảm ứng bởi HGF gắn kết với c-Met dẫn đến sự tự phosphoryl hóa ít nhất một gốc tyroxin trong c-Met. Thông thường ít nhất một gốc tyroxin ở các vị trí 1230, 1234, 1235 hoặc 1349 là tự phosphoryl hóa trong lúc gắn kết HGF.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự "vô hiệu hóa tín hiệu c-Met" dùng để chỉ khả năng của miền FN3, phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế để ức chế tín hiệu c-Met được gây ra do cảm ứng bởi HGF 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%.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "biểu hiện quá mức", "có biểu hiện quá mức" và "sự biểu hiện quá mức" có thể hoán đổi cho nhau dùng để chỉ tế bào ung thư hoặc té bào ác tính mà có các mức độ EGFR và/hoặc c-Met cao hơn đo được trên bề mặt so với tế bào bình thường của các loại mô giống nhau. Sự biểu hiện quá mức này có thể được gây ra do khuếch đại gen hoặc do tăng sự phiên mã hoặc dịch mã. Biểu hiện và biểu hiện quá mức EGFR và/hoặc c-Met có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết ví dụ bằng cách sử dụng ELISA, miễn dịch huỳnh quang, đo dòng tế bào hoặc thử nghiệm phóng xạ miễn dịch trên các tế bào sống hoặc được tế bào được dung giải. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, các mức độ của các phân tử axit nucleich mã hóa EGFR và/hoặc c-Met có thể được đánh giá trong tế bào ví dụ bằng cách sử dụng lai *in situ* huỳnh quang, Southern blotting, hoặc các kỹ thuật PCR. EGFR và/hoặc c-Met có biểu hiện quá mức khi mức độ EGFR và/hoặc c-Met trên bề mặt tế bào cao hơn ít nhất 1,5 lần khi so với tế bào bình thường.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "Tencon" dùng để chỉ miền fibronectin tuýp III tổng hợp FN3) có trình tự được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 1 và được mô tả trong Công bố đơn Sáng chế Mỹ Số. US2010/0216708.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào ung thư" hoặc "tế bào khối u" dùng để chỉ tế bào mắc bệnh ung thư, tiền ung thư hoặc bị biến nạp, một trong hai *in vivo, ex vivo,* và trong nuôi cấy mô, mà có thay đổi kiểu hình tự phát hoặc do cảm ứng mà không cần thiết bao gồm việc hấp thu vật liệu di truyền mới. Mặc dù sự biến đổi có thể phát sinh do sự tiêm virut biến đổi và sự kết hợp của axit nucleic hệ gen mới, hoặc sự hấp thu của axit nucleic ngoại sinh, nó cũng có thể phát sinh tự phát hoặc sau khi tiếp xúc với chất gây ung thư, do đó làm đột biến gen nội sinh. Sự biến đổi/ung thư được minh họa bằng, ví dụ, các sự thay đổi hình thái, các tế bào bất diệt, đối chứng tăng trưởng khác thường, sự hình thành ổ bệnh, sự tăng sinh, ác tính, các mức độ đánh dấu đặc hiệu khối u, tính xâm nhập, sự tăng trưởng khối u hoặc sự ngăn phong bế ở các vật chủ động vật phù hợp như chuột thiếu hụt miễn dịch, và các loài động vật tương tự, *in vitro, in vivo,* và *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Thuật ngữ "vectơ" được hiểu là polynucleotit có khả năng được nhân đôi trong hệ thống sinh học hoặc có thể chuyển dịch giữa các hệ thống này. Vectơ polynucleotit thông thường chứa các yếu tố, như các nguồn gốc sao chép, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc các dấu chuẩn chọn lọc mà có chức năng tạo thuận lợi nhân đôi hoặc duy trì các polynucleotit trong hệ thống sinh học. Các ví dụ về các hệ thống sinh học này có thể bao gồm tế bào, virut, động vật, thực vật, và các hệ thống sinh học được tái tạo dùng các thành phần sinh học có khả năng nhân đôi vectơ. Polynucleotit bao gồm vectơ có thể là các phân tử ADN hoặc ARN hoặc dạng lai của chúng.

Thuật ngữ "vectơ biểu hiện" được hiểu là vectơ mà có thể được dùng trong hệ thống sinh học hoặc trong hệ thống sinh học được tái tạo để định hướng sự dịch mã của polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit có mặt trong vectơ biểu hiện.

Thuật ngữ "polynucleotit" được hiểu là phân tử bao gồm chuỗi các nucleotit cộng hóa trị được liên kết bởi mạch khung đường-phosphat hoặc các liên kết hóa học cộng hóa trị tương đương khác. Các ADN và các ARN sợi đơn hoặc kép là các ví dụ điển hình về polynucleotit.

Thuật ngữ "ADN bổ sung" hoặc "cADN" dùng để chỉ polynucleotit tổng hợp đã biết mà chia sự sắp xếp của trình tự các yếu tố được tìm thấy ở các loài mRNA trưởng thành bản địa với các vùng ngoại liền kề, với các vùng nội xen vào có mặt trong ADN ngoại sinh được loại bỏ. Các codon mã hóa methionin khởi đầu có thể hoặc không có mặt trong cADN. cADN có thể được tổng hợp ví dụ bằng cách phiên mã ngược hoặc ghép gen tổng hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "sự tổng hợp" hoặc "không tự nhiên" hoặc "nhân tạo" dùng để chỉ phân tử polynucleotit hoặc polypeptit không có mặt trong tự nhiên.

Thuật ngữ "polypeptit" hoặc "protein" được hiểu là phân tử mà bao gồm ít nhất hai gốc axit amin được liên kết bởi liên kết peptit để tạo thành polypeptit. Các polypeptit nhỏ có ít hơn khoảng 50 axit amin có thể được gọi là "các peptit".

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép" hoặc "phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép" dùng để chỉ phân tử bao gồm miền FN3 gắn kết EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met khác biệt mà có đồng hóa trị được liên kết với nhau một cách trực tiếp hoặc thông qua mối liên kết. Phân gắn kết

EGFR/ c-Met đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu EGFR và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu c-Met.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "hóa trị" dùng để chỉ sự có mặt của số các vị trí gắn kết đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử. Như vậy, các thuật ngữ "hóa trị một", "hóa trị hai", "hóa trị bốn", và "hóa trị sáu" lần lượt dùng để chỉ sự có mặt của một, hai, bốn và sáu vị trí gắn kết, đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "hỗn hợp" dùng để chỉ mẫu hay tiêu bản thành phần của hai hoặc nhiều miền FN3 không đồng hóa trị được liên kết với nhau. Hỗn hợp có thể gồm hai hoặc nhiều miền FN3 tương đồng hoặc nhiều miền FN3 khác biệt. Như được sử dụng trong bản mô tả này, hỗn hợp cũng dùng để chỉ mẫu hay sự tạo thành hai hoặc nhiều kháng thể hóa trị một mà có hóa trị một đối với EGFR và/hoặc hóa trị một đối với c-Met.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met" dùng để chỉ phân tử bao gồm miền thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR và miền thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met. Ví dụ về chất mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met là kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ về chất đặc hiệu kép khác mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met là phân tử bao gồm miền FN3 gắn kết EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met khác biệt. Chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met có thể gồm polypeptit đơn hoặc nhiều hơn một polypeptit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể kháng EGFR/c-Met đặc hiệu kép" hoặc "kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép" dùng để chỉ kháng thể đặc hiệu kép có miền thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR và miền thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met. Các miền gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met thông thường là các cặp VH/VL, và kháng thể kháng EGFR/c-Met đặc hiệu kép có hóa trị một về mặt gắn kết với EGFR và c-Met.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "các kháng thể" được hiểu theo nghĩa rộng và bao gồm các phân tử globulin miễn dịch chứa các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng bao gồm các kháng thể đơn dòng ở chuột, ở người, được thích ứng ở người, được nhân hóa và được khảm, các phân đoạn kháng thể, đặc hiệu kép hoặc các kháng thể đa đặc hiệu, các kháng thể lưỡng phân, tứ phân hoặc đa phân, và các kháng thể chuỗi đơn.

Các globulin miễn dịch có thể được phân thành năm lớp chính, gọi là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, phụ thuộc vào trình tự axit amin có miền cố định chuỗi nặng. IgA và IgG còn được phân lớp phụ là các lớp kháng thể IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các chuỗi nhẹ kháng thể của bất kỳ loại động vật có xương sống nào có thể được phânn thành một hoặc hai loại khác biệt rõ ràng, gọi là kapa (κ) and lamda (λ), dựa trên các trình tự axit amin của các miền cố định của chúng.

Thuật ngữ "các phân đoạn kháng thể" dùng để chỉ một phần của globulin miễn dịch phân tử mà giữ được các vị trí gắn kết kháng nguyên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, như các vùng xác định tính bổ khuyết chuỗi nặng (HCDR- Heavy chain Complementarity Determining Region) 1, 2 và 3, các vùng xác định tính bổ khuyết chuỗi nhẹ (LCDR- Light chain Complementarity Determining Region) 1, 2 và 3, vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Các phân đoạn kháng thể bao gồm phân đoạn Fab, phân đoạn hóa trị một gồm các miền VL, VH, CL và CHI; phân đoạn $F(ab)_2$, phân đoạn hóa trị hai bao gồm hai phân đoạn Fab được liên kết bởi cầu disunfit ở vùng bản lề; phân đoạn Fd gồm các miền VH và CHI; phân đoạn Fv gồm các miền VL và VH ở nhánh đơn của kháng thể; phân đoạn kháng thể miền (dAb- domain antibody) (Ward *và các đồng tác giả* (1989) Nature 341:544- 546), mà gồm miền VH. Các miền VH và VL có thể được thiết kế và được liên kết với nhau thông qua mối liên kết tổng hợp để tạo thành các loại khác nhau của các kiểu kháng thể chuỗi đơn mà các miền VH/VL ghép cặp trong phân tử, hoặc giữa các phân tử trong các trường hợp khi các miền VH và VL được biểu hiện bởi các cấu trúc kháng thể chuỗi đơn riêng biệt, để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên hóa trị một, như chuỗi đơn Fv (scFv- single chain Fv) hoặc thể đôi; được mô tả ví dụ trong Công bố đơn quốc tế PCT các số. WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804, và WO1992/01047. Các phân đoạn kháng thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết được biết bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành, và các phân đoạn được sàng lọc để hữu dụng trong cùng phương pháp khi các kháng thể có chiều dài toàn bộ.

Cụm từ "kháng thể được phân lập" dùng để chỉ kháng thể hoặc phân đoạn kháng thể mà về cơ bản không có các kháng thể khác có các độ đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met về cơ bản không có các kháng thể mà gắn kết đặc hiệu các kháng nguyên khác so với EGFR và c-Met ở người). Kháng thể được phân lập mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met, tuy

nhiên, có thể có phản ứng chéo với khác kháng nguyên khác, như các đồng đẳng thích hợp của EGFR và/hoặc c-Met ở người, như EGFR và/hoặc c-Met ở *Khỉ đuôi dài* (cynomolgus). Hơn nữa, kháng thể được phân lập về cơ bản có thể không có các vật liệu và/hoặc các chất hóa học cấu tạo bằng tế bào khác.

Vùng biến đổi kháng thể bao gồm vùng "khung" bị ngắt bởi ba "vị trí gắn kết kháng nguyên". Các vị trí gắn kết kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng các thuật ngữ khác nhau: (i) Các vùng Xác định Tính bổ khuyết (CDRs- Complementarity Determining Regions), ba trong số VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3), và ba trong số VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), được dựa trên sự biến đổi trình tự (Wu and Kabat ~~(1970)~~ J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat *và các đồng tác giả*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) "Các vùng siêu biến", "HVR", hoặc "HV", ba trong số VH (H1, H2, H3) và ba trong số VL (L1, L2, L3), dùng để chỉ các vùng của các miền biến đổi kháng thể mà siêu biến đổi về cấu trúc như được xác định bởi Chothia and Lesk (Chothia and Lesk Mol Biol 196:901-17, 1987). Các thuật ngữ khác bao gồm "IMGT-CDRs" (Lefranc *và các đồng tác giả*, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) và "Cách dùng Gốc Xác định Độ đặc hiệu" (SDRU- Specificity Determining Residue Usage) (Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). Cơ sở dữ liệu (IMGT- International ImMunoGeneTics) (http://www_imgt_org) cung cấp số lượng đã chuẩn hóa và định rõ các vị trí gắn kết kháng nguyên. Sự tương ứng giữa các phác họa CDRs, HVs và IMGT là được mô tả theo Lefranc và các đồng tác giả, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "các gốc Chothia" là các gốc VL và VH của kháng thể được đánh số theo Al-Lazikani (Al-Lazikani và các đồng tác giả, J Mol Biol 273:927-48, 1997).

Cụm từ "khung" hoặc "các trình tự khung" là các trình tự còn lại của vùng biến đổi khác so với các vùng được xác định là các vị trí gắn kết kháng nguyên. Bởi vì các vị trí gắn kết kháng nguyên có thể được xác định bằng các thuật ngữ khác nhau được mô tả ở trên, trình tự axit amin chính xác của khung phụ thuộc vào các cách mà vị trí gắn kết kháng nguyên được xác định.

Cụm từ "kháng thể nhân hóa" dùng để chỉ kháng thể trong đó các vị trí gắn kết kháng nguyên được dẫn xuất từ các loài không phải con người và các khung vùng biến đổi được dẫn xuất từ các trình tự globulin miễn dịch ở người. Các kháng thể nhân hóa

có thể bao gồm các sự thay thế trong các vùng biến đổi khung sao cho khung không thể là bản sao chính xác của globulin miễn dịch ở người được biểu hiện hoặc các trình tự gen dòng mầm.

Các kháng thể "được gắn ở người" hoặc các kháng thể "được gắn g khung ở người (HFA- Human Framework Adapted)" dùng để chỉ các kháng thể nhân hóa được gắn theo các phương pháp được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Số. US2009/0118127. Các kháng thể được gắn ở người được nhân hóa bằng cách chọn lọc các khung ở người có chất nhận dựa trên các sự tương đồng CDR và FR tối đa, các sự tương hợp về chiều dài và các sự tương đồng về trình tự của các vòng CDR1 và CDR2 và một phần các vòng CDR3 chuỗi nhẹ.

Cụm từ "kháng thể người" dùng để chỉ kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó cả khung và các vị trí gắn kết kháng nguyên được dẫn xuất từ các trình tự có nguồn gốc ở người. Nếu kháng thể chứa vùng cố định, vùng cố định cũng được dẫn xuất từ các trình tự có nguồn gốc ở người.

Kháng thể người bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ mà có các trình tự "được dẫn xuất từ " nguồn gốc ở người nếu các vùng biến đổi của kháng thể thu được từ hệ thống mà sử dụng gen globulin miễn dịch dòng mầm ở người hoặc gen globulin miễn dịch được sắp xếp lại. Các hệ thống này bao gồm các thư viện gen globulin miễn dịch ở người được biểu hiện trên thể thực khuẩn, và các động vật không phải người biến đổi gen như chuột mang các vị trí globulin miễn dịch ở người như được mô tả trong bản mô tả này. "Kháng thể người" có thể chứa axit amin khác nhau khi so với các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm hoặc được sắp xếp lại ở người ví dụ do các đột biến soma dạng tự nhiên hoặc sự cố ý đưa các sự thay thế vào khung hoặc vị trí gắn kết kháng nguyên. Thông thường, "kháng thể người" ít nhất là khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% tương đồng về trình tự axit amin với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm ở người hoặc được sắp xếp lại. Trong một số trường hợp, "kháng thể người" có thể chứa các trình tự khung liên ứng được dẫn xuất từ các sự phân tích khung trình tự ở người, ví dụ như được mô tả theo Knappik và các đồng tác giả, J Mol Biol 296:57-86, 2000), hoặc HCDR3 tổng hợp gắn vào các thư viện gen globulin miễn dịch ở người được biểu hiện trên thể thực khuẩn, ví dụ như được mô tả theo Shi và các đồng tác giả, J Mol Biol 397:385-96, 2010 và Công bố Patent Quốc tế Số.

WO2009/085462). Các kháng thể mà trong đó các vị trí gắn kết kháng nguyên được dẫn xuất từ các loài không phải con người không bao gồm trong định nghĩa về "kháng thể người".

Các kháng thể nhân hóa được phân lập có thể được tổng hợp. Các kháng thể người, mặc dù được dẫn xuất từ các trình tự globulin miễn dịch ở người, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các hệ thống như biểu hiện thể thực khuẩn gắn vào khung tổng hợp CDRs và/hoặc khung tổng hợp, hoặc có thể được đưa vào gây đột biến *in vitro* để cải thiện các đặc tính kháng thể, dẫn đến các kháng thể không tồn tại tự nhiên trong danh mục dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp" bao gồm tất cả các kháng thể mà được tạo thành, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bởi sự tái tổ hợp được hiểu, như các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà có sự chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch ở người hoặc dạng tế bào lai được tạo thành từ đó (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ bị biến đổi để biểu hiện kháng thể, các kháng thể được phân lập từ tái tổ hợp này, thư viện kháng thể tổ hợp, và các kháng thể được tạo thành, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng bất kỳ cách thức nào khác mà gồm có việc nối các trình tự gen globulin miễn dịch ở người với các trình tự ADN khác, hoặc các kháng thể mà được tạo ra *in vitro* bằng cách sử dụng sự trao đổi nhánh Fab.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" dùng để chỉ sự tạo thành các phân tử kháng thể của thành phần phân tử đơn. Thành phần kháng thể đơn dòng biểu hiện độ đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực đối với epitop cụ thể, hoặc trong trường hợp của kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép, độ đặc hiệu gắn kết kép với hai epitop khác biệt.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự tương đồng về cơ bản" được hiểu là hai trình tự axit amin ở vùng biến đổi kháng thể được so với sự tương đồng hoặc có "các sự khác nhau ít ỏi". Các sự khác nhau ít ỏi là các sự thay thế 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin trong trình tự ở vùng biến đổi kháng thể mà không có ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính kháng thể. Các trình tự axit amin về cơ bản tương đồng với các trình tự vùng biến đổi được bộc lộ trong bản mô tả này là trong phạm vi sáng chế. Theo một số phương án, trình tự đồng nhất có thể là khoảng 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn. Phần trăm đồng nhất có thể được xác định ví dụ bằng cách sắp hàng từng cặp sử dụng các thiết lập măc định trong môđun AlignX của Vectơ NTI v,9,0,0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Các trình tự protein theo sáng chế có thể được sử dụng làm trình tự truy vấn để thực hiện tìm kiếm dựa vào các cơ sở dữ liệu sáng chế hoặc công cộng, ví dụ, nhận biết các trình tự liên quan. Ví dụ các chương trình được sử dụng để thực hiện các tìm kiếm này là các chương trình XBLAST hoặc BLASTP (http_//www_ncbi_nlm/nih_gov), hoặc dãy GenomeQuestTM (GenomeQuest, Westborough, MA) bằng cách sử dụng các thiết lập mặc định.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop" được hiểu là một phần của kháng nguyên mà kháng thể gắn kết đặc hiệu với nó. Các Epitop thường gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học (như phân cực, không cực hoặc kỵ nước) của các gốc như chuỗi các axit amin hoặc chuỗi bên polysacarit và có thể có các đặc trưng cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc trưng tích điện đặc hiệu. Epitop có thể bao gồm các axit amin liền kề và/hoặc không liền kề mà tạo nên đơn vị không gian. Đối với epitop không liền kề, các axit amin từ các phần khác nhau của trình tự thẳng của kháng nguyên đến rất gần không gian 3 chiều nhờ sự gập của phân tử protein.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trong kết hợp với” được hiểu là hai hoặc nhiều liệu pháp điều trị có thể được dùng cho vật chủ cùng trong hỗn hợp, đồng thời là các đơn chất hoặc liên tục như các đơn chất theo bất kỳ trật tự nào.

Số lượng các gốc axit amin trong vùng cố định kháng thể trong đặc điểm kỹ thuật được thực hiện theo chỉ số EU như được mô tả theo Kabat và các đồng tác giả, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), trừ khi có quy định khác một cách rõ ràng.

Các thành phần của chất

Sáng chế đề xuất các chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met. Sáng chế cũng đề xuất các polypeptit and polynucleotit mã hóa các chất đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các axit nucleic bổ sung của nó, các vectơ, các tế bào chủ, và các phương pháp tạo ra và sử dụng chúng.

Các phân tử gắn kết chứa miền FN3 EGFR và/hoặc c-Met đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép

Các phân tử gắn kết chứa miền FN3 EGFR đặc hiệu đơn

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

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

Một phương án theo sáng chế là miền fibronectin tuýp III (FN3) được phân lập mà gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) và phong bế gắn kết của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) với EGFR.

Các miền FN3 theo sáng chế có thể phong bế EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} là nhỏ hơn khoảng $1x10^{-7}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-9}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-10}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-11}$ M, hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-12}$ M trong thử nghiệm cạnh tranh dùng các tế bào A431 và phát hiện lượng huỳnh quang từ gắn kết EGF được biotinylat hóa bằng cách sử dụng streptavidin-phycoerythrin tiếp hợp ở 600 nM trên các tế bào A431 được ủ có hoặc không có các miền FN3 theo sáng chế. Ví dụ các miền FN3 có thể phong bế EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} giữa khoảng từ $1x10^{-9}$ M đến $1x10^{-7}$ M, như các miền FN3 gắn kết EGFR có trình tự axit amin là các SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, hoặc 122-137. Các miền FN3 theo sáng chế có thể phong bế EGF gắn kết với EGFR 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 so với với sự gắn kết của EGF vào EGFR khi không có các miền FN3 theo sáng chế bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Miền FN3 theo sáng chế có thể ức chế tín hiệu EGFR 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 so với mức độ tín hiệu khi không có các miền FN3 theo sáng chế bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Sự gắn kết của phối tử như EGF với EGFR kích thích lưỡng phân hóa thụ thể, sự tự phosphoryl hóa, hoạt tính bên trong của thụ thể, miền kinaza tyroxin bào tương,

và khởi đầu các con đường truyền nhiều tín hiệu và con đường hoạt chuyển được bao gồm trong sự điều tiết tổng hợp ADN (hoạt hóa gen) và sự tiến triển hoặc phân chia chu kỳ tế bào. Sự ức chế tín hiệu EGFR có thể dẫn đến sự ức chế trong một hoặc nhiều các con đường tín hiệu xuôi dòng EGFR và do đó vô hiệu hóa EGFR có thể có các tác dụng khác nhau, bao gồm ức chế sư tăng sinh tế bào và sự biệt hóa, sự tạo mạch, sự vận động và di căn của tế bào.

Tín hiệu EGFR có thể được đánh giá 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 các thyroxin Y1068, Y1148, và Y1173 (Downward *và các đồng tác giả*, Nature 311:483-5, 1984) và/hoặc sự phosphoryl hóa của các cơ chất tự nhiên hoặc tổng hợp. Sự phosphoryl hóa có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết như thử nghiệm ELISA hoặc western plot bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu phosphotyroxin. Ví dụ về các thử nghiệm có thể được tìm thấy 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 trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF ở vị trí gốc Tyroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $2,5x10^{-6}$ M, ví dụ nhỏ hơn khoảng $1x10^{-6}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-7}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-9}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-10}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-11}$ M, hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-12}$ M khi đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế ức chế EGF gây sự phosphoryl hóa EGFR ở gốc EGFR vị trí Tyroxin 1173 có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng từ $1,8 \times 10^{-8}$ M đến $2,5 \times 10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người. Ví dụ các miền FN3 này là các miền có trình tự axit amin là các số SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, hoặc 122-137.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế gắn kết EGFR ở người có hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, ví dụ nhỏ hơn khoảng 1x10-^{9} M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-10}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-11}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-12}$ M, hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-13}$ M như được xác định bởi phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc Kinexa, được thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực chuyên ngành. Theo một số phương án, miền FN3 theo sáng chế gắn kết EGFR ở người có K_D nằm

giữa khoảng từ $2x10^{-10}$ đến $1x10^{-8}$ M. Ái lực của miền FN3 đối với EGFR có thể được xác định qua thực nghiệm bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp nào. (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 and Company: New York, NY (1992); và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này). Ái lực đo được của sự tương tác miền FN3–kháng nguyên cụ thể có thể thay đổi nếu được đánh giá trong các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ mol, độ pH). Do đó, các phép đo ái lực và các thông số gắn kết kháng nguyên khác (ví dụ, K_D, K_{on}, K_{off}) tốt hơn là được thực hiện với các giải pháp chuẩn hóa giàn protein và kháng nguyên, và dung dịch đệm chuẩn hóa, như dung dịch đệm được mô tả trong bản mô tả này.

Ví dụ các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết EGFR bao gồm các miền FN3 có các số SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, hoặc 122-137.

Theo một phương án khác, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu EGFR bao gồm trình tự axit amin tương đồng ít nhất 87% với trình tự axit amin có SEQ ID SỐ: 27.

Theo một phương án khác, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu EGFR bao gồm

vòng FG bao gồm trình tự $HNVYKDTNX_9RGL$ (SEQ ID SỐ: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDVML (SEQ ID SỐ: 180), trong đó X9 là M hoặc I; và

vòng BC bao gồm trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID SỐ: 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;

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.

Các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu EGFR và ức chế sự tự phosphoryl hóa của EGFR có thể bao gồm như đặc điểm cấu trúc vòng FG bao gồm trình tự $HNVYKDTNX_9RGL$ (SEQ ID SỐ: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDVML (SEQ ID SỐ: 180), trong đó X_9 là M hoặc I. Các miền FN3 này có thể còn bao gồm vòng BC có 8 hoặc 9 axit amin theo chiều dài và được xác định bởi trình tự

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID SỐ: 181), và ức chế sự tự phosphoryl hóa EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $2,5x10^{-6}$ M, hoặc có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng từ $1,8x10^{-8}$ M đến $2,5x10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người.

Các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu EGFR và ức chế sự tự phosphoryl hóa của EGFR còn bao gồm trình tự của

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLT VP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX_9RGLPLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 182), hoặc trình tự

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX1X2X3X4X5X6X7X8DSFLIQYQESEKVGEAIN LTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 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;

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 và được kiểm tra 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 trong bản mô tả này.

Phương án khác theo sáng chế là miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu EGFR, trong đó miền FN3 bao gồm trình tự được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, hoặc 122-137.

Theo một số phương án, các miền FN3 gắn kết EGFR bao gồm methionin khởi đầu (Met) được liên kết với đầu cuối N hoặc cystein (Cys) được liên kết với đầu C của

miền FN3 cụ thể, ví dụ để tạo thuận lợi biểu hiện và/hoặc tiếp hợp của các phân tử kéo dài chu kỳ bán hủy.

Phương án khác theo sáng chế là miền fibronectin loại III (FN3) được phân lập mà gắn kết đặc hiệu EGFR và phong bế 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 SỐ: 1.

Các phân tử gắn kết chứa miền FN3 c-Met Đặc hiệu đơn

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

Các miền FN3 theo sáng chế gắn kết c-Met có ái lực cao và ức chế tín hiệu c-Met, và có thể tạo ra lợi ích về độ đặc hiệu và làm giảm độc tố ngoài đích khi so với các chất ức chế c-Met phân tử nhỏ, và cải thiện sự thâm nhập mô khi so với các liệu pháp kháng thể thông thường. Các miền FN3 theo sáng chế có hóa trị một, do đó ngăn phong bế phân cụm thụ thể không mong muốn và sự hoạt hóa mà có thể xảy ra với các phân tử hóa trị hai khác.

Một phương án theo sáng chế là miền fibronectin tuýp III (FN3) được phân lập mà gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) và phong bế gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met.

Các miền FN3 theo sáng chế có thể phong bế gắn kết HGF với c-Met có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $1x10^{-7}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-9}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-10}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-11}$ M, hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-12}$ M trong thử nghiệm phát hiện sự ức chế của gắn kết HGF được biotinylat hóa với protein dung hợp c-Met-Fc trong sự có mặt của các miền FN3 theo sáng chế. Ví dụ về các miền FN3 có thể phong bế gắn kết HGF với c-Met có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng từ $2x10^{-10}$ M đến $6x10^{-8}$ M. Các miền FN3 theo sáng chế có thể phong bế gắn kết 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 so với sự gắn kết của HGF với c-Met mà không có của các miền FN3 theo sáng chế bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Miền FN3 theo sáng chế có thể ức chế tín hiệu 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 so với mức độ tín hiệu mà không có các miền FN3 theo sáng chế bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Sự gắn kết của HGF với c-Met kích thích lưỡng phân hóa thụ thể, tự phosphoryl hóa, hoạt hóa bên trong thụ thể, miền tyroxin kinaza bào tương, và khởi đầu các con đường truyền nhiều tín hiệu và con đường hoạt chuyển tham gia điều tiết tổng hợp ADN (hoạt hóa gen) và sự tiến triển hoặc phân chia chu kỳ tế bào. Sự ức chế tín hiệu c-Met có thể dẫn đến sự ức chế một hoặc nhiều các con đường tín hiệu xuôi dòng c-Met và do đó vô hiệu hóa c-Met có thể có các tác dụng khác nhau, bao gồm sự ức chế tăng sinh tế bào và sự biệt hóa, tạo mạch, sự vận động và di căn của tế bào.

Tín hiệu c-Met có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết, ví dụ đo sự tự phosphoryl hóa của thụ thể trên ít nhất một các gốc tyroxin Y1230, Y1234,Y1235 hoặc Y1349 và/hoặc sự phosphoryl hóa của các cơ chất tự nhiên hoặc tổng hợp. Sự phosphoryl hóa có thể được phát hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu đối với phosphotyroxin trong thử nghiệm ELISA hoặc trên western blot. Các thử nghiệm đối với hoạt động tyroxin kinaza được mô tả ví dụ như theo: 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 trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF ở vị trí gốc 1349 của c-Met có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $1x10^{-6}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-7}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-9}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-10}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-11}$ M, hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-12}$ M khi đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL tái tổ hợp HGF ở người.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF ở tyroxin Y1349 của c-Met có trị số IC_{50} giữa khoảng $4x10^{-9}$ M đến $1x10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF ở người tái tổ hợp.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế gắn kết c-Met ở người có hằng số phân ly (K_D) là bằng hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-7}$ M, 1x10-8 M, $1x10^{-9}$ M, $1x10^{-10}$ M, $1x10^{-11}$ M, $1x10^{-12}$ M, $1x10^{-13}$ M, $1x10^{-14}$ M, hoặc $1x10^{-15}$ M như được xác định

bởi phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc phương pháp Kinexa, được thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực chuyên ngành. Theo một số phương án, miền FN3 theo sáng chế gắn kết c-Met ở người có K_D nằm giữa khoảng từ $3x10^{-10}$ M đến $5x10^{-8}$ M. Ái lực của miền FN3 đối với c-Met có thể được xác định qua thực nghiệm bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp thích hợp nào. (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 and Company: New York, NY (1992); và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này). Việc đo ái lực của sự tương tác miền FN3- kháng nguyên cụ thể có thể thay đổi nếu đo trong các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ mol, độ pH). Do đó, các phép đo ái lực và các thông số gắn kết kháng nguyên khác (ví dụ, K_D, K_{on}, K_{off}) tốt hơn là được thực hiện với các giải pháp chuẩn hóa giàn protein và kháng nguyên, và dung dịch đệm chuẩn hóa, như dung dịch đệm được mô tả trong bản mô tả này.

Ví dụ các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết c-Met bao gồm các miền FN3 có các trình tự axit amin là SEQ ID SỐ: 32-49 hoặc 111-114.

Theo một phương án khác, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu c-Met bao gồm trình tự axit amin tương đồng ít nhất 83% với trình tự axit amin có SEQ ID SỐ: 41.

Theo một phương án khác, miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu c-Met bao gồm

sợi C và vòng CD bao gồm trình tự $DSFX_{10}IRYX_{11}E\ X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$ (SEQ ID SỐ: 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 $TEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}V\ KGGX_{21}X_{22}SX_{23}$ (SEQ ID SỐ: 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

X_{23} là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Các miền FN3 theo sáng chế mà gắn kết đặc hiệu c-Met và ức chế sự tự phosphoryl hóa c-Met còn bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$VKGG$X_{21}X_{22}SX_{23}$PLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 186),

trong đó

X_{10} là W, F hoặc V; và

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;

X_{16} là E hoặc D;

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

X_{23} là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Phương án khác theo sáng chế là 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 SỐ: 32-49 hoặc 111-114.

Phương án khác theo sáng chế là miền fibronectin loại III (FN3) được phân lập mà gắn kết đặc hiệu c-Met và phong bế gắn kết của HGF với c-Met, trong đó miền FN3 là được phân lập từ thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon có SEQ ID SỐ: 1. Sự phân lập của các miền FN3 EGFR hoặc c-Met từ thư viện dựa trên trình tự Tencon

Tencon (SEQ ID SỐ: 1) là miền fibronectin tuýp III (FN3) dạng không tự nhiên được thiết kế từ trình tự liên ứng của mười năm miền FN3 từ tenasxin-C ở người (Jacobs và các đồng tác giả Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; Công bố Patent Mỹ Số. 2010/0216708). Cấu trúc tinh thể của Tencon thể hiện sáu vòng lộ bề mặt mà nối bảy sợi beta như là đặc trưng đối với các miền FN3, các sợi beta được gọi là A, B, C, D, E, F và G, và các vòng được gọi là các vòng AB, BC, CD, DE, EF, và FG (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; Patent Mỹ Số. 6,673,901). Các vòng, hoặc các gốc được chọn lọc trong mỗi vòng, có thể được ngẫu nhiên hóa để cấu tạo các thư viện của các miền fibronectin loại III (FN3) mà có thể được sử dụng để lựa chọn các phân tử lạ thường mà gắn kết EGFR hoặc c-Met. Bảng 1 thể hiện các vị trí và trình tự của mỗi vòng và sợi beta trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1).

Do đó, thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon có thể có vòng FG được ngẫu nhiên hóa, hoặc các vòng BC và FG được ngẫu nhiên hóa, như các thư viện TCL1 hoặc TCL2 như được mô tả dưới đây. Vòng Tencon BC có độ dài 7 axit amin, do đó 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin có thể được ngẫu nhiên hóa trong thư viện được đa dạng hóa ở vòng BC và được thiết kế dựa trên trình tự Tencon. Vòng Tencon FG có độ dài 7 axit amin, do đó 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin có thể được ngẫu nhiên hóa trong thư viện được đa dạng hóa ở vòng FG và được thiết kế dựa trên trình tự Tencon. Sự đa dạng hơn ở các vòng trong các thư viện Tencon có thể đạt được bằng cách chèn và/hoặc xóa các gốc ở các vòng. Ví dụ, các vòng FG và/hoặc BC có thể được kéo dài bởi từ 1 đến 22 axit amin, hoặc được giảm bởi từ 1 đến 3 axit amin. Vòng FG trong Tencon có độ 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 nên sự đa dạng tối đa, vòng FG có thể được đa dạng về trình tự cũng như chiều dài 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 về chiều dài bằng cách kéo dài vòng bằng cách bổ sung 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin.

Thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon có thể cũng được ngẫu nhiên hóa các bề mặt thay thế mà tạo thành trên một phía của miền FN3 và bao gồm hai hoặc nhiều sợi beta, và ít nhất một vòng. Một bề mặt thay thế như vậy được tạo thành bởi các axit amin trong các sợi beta C và F và các vòng CD và FG (bề mặt C-CD-F-FG). Thiết kế thư viện dựa trên bề mặt C-CD-F-FG thay thế Tencon và được thể hiện trong Fig.1 và

sự tạo các thư viện này chi tiết được mô tả trong Công bố Patent Mỹ số. US2013/0226834.

Thư viện được thiết kế dựa trên trình tự Tencon cũng bao gồm các thư viện được thiết kế dựa trên các biến thể Tencon, như các biến thể Tencon có các sự thay thế ở các các vị trí gốc 11, 14, 17, 37, 46, 73, hoặc 86 (số gốc tương ứng với SEQ ID SỐ: 1), và các biến thể biểu hiện tính ổn định nhiệt được cải thiện. Ví dụ các biến thể Tencon được mô tả trong Công bố Paten Mỹ Số. 2011/0274623, và bao gồm Tencon27 (SEQ ID SỐ: 99) có các sự thay thế E11R, L17A, N46V và E86I khi so với Tencon có SEQ ID SỐ: 1.

Bảng 1.

Miền FN3	Tencon (SEQ ID SỐ: 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

Các thư viện dựa trên trình tự Tencon và FN3 khác có thể được ngẫu nhiên hóa ở các vị trí gốc được chọn bằng cách sử dụng tập hợp ngẫu nhiên hoặc tập hợp được xác định của các axit amin. Ví dụ, các biến thể trong thư viện có các sự thay thế ngẫu nhiên có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các codon NNK, mà mã hóa tất cả 20 axit amin dạng tự niên. Theo các sơ đồ đa dạng hóa khác, các codon DVK có thể được sử dụng để mã hóa các axit amin Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, and

Cys. Theo cách khác, các codon NNS có thể được sử dụng để làm tăng tất cả 20 gốc axit amin và đồng thời làm giảm tần số của các codon kết thúc. Các thư viện các miền FN3 có sự phân bố axit amin bị lệch ở các vị trí được đa dạng có thể được tổng hợp ví dụ bằng cách sử dụng kỹ thuật Slonomics® (http:_//www_sloning_com). Công nghệ này sử dụng thư viện của bộ ba tạo sợi kép thực hiện trước mà đóng vai trò làm các khối khối tổng thể đủ cho hàng ngàn quá trình tổng hợp gen. Bộ ba thư viện đại diện cho tất cả các sự kết hợp trình tự có thể cần thiết để cấu tạo bất kỳ phân tử ADN mong muốn. Các ký hiệu codon là theo mã IUB đã biết.

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu EGFR hoặc c-Met theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách tạo thư viện FN3 như thư viện Tencon bằng cách sử dụng biểu hiện *cis* để nôia các phân đoạn ADN mã hóa các giàn protein với phân đoạn ADN mã hóa RepA để tạo ra nhóm các phức hợp protein-ADN được tạo thành sau khi dịch mã *in vitro* trong đó mỗi protein được ghép 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 việc thử nghiệm thư viện đối để gắn kết đặc hiệu với EGFR và/hoặc c-Met bằng bất kỳ phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả trong Ví dụ. Ví dụ về các phương pháp đã biết có thể được sử dụng là ELISA, các thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa, và các thử nghiệm cạnh tranh và cạnh tranh (xem, ví dụ, Ausubel *và các đồng tác giả*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Các miền FN3 được nhận dạng gắn kết đặc hiệu EGFR hoặc c-Met còn có khác biệt đối với khả năng phong bế phối tử EGFR như EGF gắn kết với EGFR, hoặc HGF gắn kết với c-Met, và đối với khả năng của chúng để ức chế EGFR và/hoặc tín hiệu c-Met bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu với EGFR hoặc c-Met theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng bất kỳ miền FN3 làm khuôn để tạo ra thư viện và sàng lọc thư viện cho các phân tử gắn kết đặc hiệu EGFR hoặc c-Met bằng cách sử dụng các phương pháp có trong đó. Các miền FN3 mẫu có thể được sử dụng là miền FN3 thứ ba của tenasxin C (TN3-) (SEQ ID SỐ: 75), Fibcon (SEQ ID SỐ: 76), và miền FN3 thứ mười của fibronectin (FN10-) (SEQ ID SỐ: 77). Các kỹ thuật biểu hiện và nhân bản vô tính tiêu chuẩn được sử dụng để tách dòng vô tính các thư viện vào vectơ hoặc các băng cAND tạo sợi kép tổng hợp của thư viện, để biểu hiện, hoặc để dịch mã các thư viện *in vitro*. Ví dụ biểu hiện ribosome (Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94,

4937-4942, 1997), biểu hiện mRNA (Roberts and 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 như các protein dung hợp được biểu hiện trên bề mặt ví dụ ở thể thực khuẩn thích hợp bất kỳ. Các phương pháp để biểu hiện các polypeptit dung hợp trên bề mặt thể thực khuẩn đã được biết (Công bố Patent Mỹ Số. 2011/0118144; Công bố Patent 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 EGFR hoặc c-Met theo sáng chế có thể được biến đổi để cải thiện các đặc tính của chúng như cải thiện tính ổn định nhiệt và tính thuận nghịch về sự gập hoặc không gập do nhiệt. Một số phương pháp đã được áp dụng để làm tăng tính ổn định nhiệt rõ ràng của các protein và các enzym, bao gồm thiết kế hợp lý dựa trên sự so với các trình tự chịu nhiệt tương tự cao, thiết kế các liên kết disunfit ổn định, các đột biến làm tăng khuynh hướng xoắn alpha, xử lý các cầu muối, sự biến đổi tích điện bề mặt của protein, sự tiến triển định hướng, và thành phần của các trình tự liên ứng (Lehmann and Wyss, Curr Opin Biotechnol, 12, 371-375, 2001). Tính ổn định nhiệt cao có thể làm tăng năng suất của các protein được biểu hiện, cải thiện độ hòa tan hoặc hoạt tính, giảm khả năng tạo miễn dịch, và giảm thiểu sự cần thiết của chuỗi lạnh trong sản xuất. Các gốc mà có thể được thay thế để cải thiện tính ổn định nhiệt của Tencon (SEQ ID SỐ: 1) là các vị trí gốc 11, 14, 17, 37, 46, 73, hoặc 86, và được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Số. 2011/0274623. Các sự thay thế tương ứng với các gốc có thể được gắn với các phân tử chứa miền FN3 hoặc miền FN3 đặc hiệu kép theo sáng chế.

Phương án khác theo sáng chế là miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu EGFR và phong bế sự gắn kết của EGF với EGFR, bao gồm trình tự được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, 122-137, còn bao gồm các sự thay thế ở một hoặc nhiều các vịtrí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1).

Phương án khác theo sáng chế là miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu c-Met và phong bế sự gắn kết của HGF với c-Met, bao gồm trình tự được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 32-49 hoặc 111-114, còn bao gồm các sự thay thế ở một hoặc nhiều

các vị trí gốc tương ứng với các vị trí 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1).

Ví dụ các sự thay thế có các sự thay thế E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y và E86I (việc đánh số theo SEQ ID SỐ: 1).

Theo một số phương án, các miền FN3 theo sáng chế bao gồm các sự thay thế tương ứng với các sự thay thế L17A, N46V, và E86I trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1).

Các miền FN3 gắn kết đặc hiệu EGFR (Fig.1) có vòng FG được kéo dài khi so với Tencon (SEQ ID SỐ: 1). Do đó, các gốc tương ứng với các gốc 11, 14, 17, 37, 46, 73, và 86 trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1) là các gốc 11, 14, 17, 37, 46, 73 và 91 trong các miền FN3 EGFR được thể hiện trong Fig.1A và Fig.1B ngoại trừ đối với miền FN3 có SEQ ID SỐ: 24, trong đó các gốc tương ứng là các gốc 11, 14, 17, 38, 74, và 92 do sự chèn của một axit amin trong vòng BC.

Phương án khác theo sáng chế là miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu EGFR và phong bế sự gắn kết của EGF với EGFR bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, hoặc 122-137, có các sự thay thế tùy chọn tương ứng với các sự thay thế L17A, N46V, và E86I trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1).

Phương án khác theo sáng chế là miền FN3 được phân lập mà gắn kết đặc hiệu c-Met và phong bế gắn kết của HGF với c-Met bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 32-49 hoặc 111-114, có các sự thay thế tùy chọn tương ứng với các sự thay thế L17A, N46V, và E86I trong Tencon (SEQ ID SỐ: 1).

Việc đo tính ổn định protein và tính không bền protein có thể được xem như là các khía cạnh giống hoặc khác về sự toàn vẹn của protein. Các Protein nhạy cảm hoặc "không bền" làm sự biến tính được gây ra do nhiệt, do tia cực tím hoặc bức xạ ion hóa, làm thay đổi nồng độ mol và độ pH trong môi trường xung quanh nếu trong dung dịch lỏng, lực đẩy cơ học được tác dụng bởi việc lọc kích thước lỗ nhỏ, bức xạ do tia cực tím, bức xạ ion hóa, như bằng cách chiếu xạ gamma, khử nước bằng nhiệt hoặc hóa chất, hoặc bất kỳ hoạt động hoặc lực khác mà có thể gây đứt đoạn cấu trúc protein. Tính ổn định của phân tử có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, tính ổn định của phân tử có thể được xác định bằng cách đo nhiệt độ nóng chảy nhiệt ("TM"- Thermal Melting), nhiệt độ theo ° Celsius (°C) mà tại đó một nửa các phân tử là không bị gập, bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Thông thường, TM

cao hơn, thì phân tử ổn định hơn. Ngoài nhiệt, các môi trường hóa học cũng thay đổi khả năng của protein để duy trì cấu trúc ba chiều đặc biệt.

Theo một phương án khác, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc c-Met theo sáng chế biểu hiện làm tăng tính ổn định ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% hoặc nhiều hơn so với miền tương đồng trước khi thiết kế đo bởi sự gia tăng trong TM.

Sự biến tính hóa học có thể được đánh giá tương tự bằng nhiều phương pháp. Chất làm biến tính hóa học bao gồm guanidini hydroclorit, guanidini thioxyanat, ure, axeton, các dung môi 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 các hydrua, như natri borohydrua), các chất tẩy rửa có ion và không có ion, các axit (ví dụ axit hydrocloric (HCl), axit axetic (CH3COOH), axit axetic halogen hóa), các phân tử kỵ nước (ví dụ các phosopholipit), và các chất làm biến tính có đích. Định lượng về mức độ biến tính có thể dựa vào sự mất đặc tính chức năng, như khả năng gắn kết phân tử đích, hoặc bởi các đặc tính hóa lý, như xu hướng tập hợp, sự tiếp xúc của các gốc không thể tiếp cận dung dịch dung môi trước, hoặc sự đứt đoạn hoặc sự tạo thành các liên kết disunfit.

Theo một phương án khác, miền FN3 theo sáng chế gắn kết EGFR hoặc c-Met biểu hiện làm tăng tính ổn định ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% hoặc nhiều hơn so với cùng giàn trước khi thiết kế, được đánh giá bằng cách sử dụng guanidini hydroclorua làm chất làm biến tính hóa học. Sự tăng tính ổn định có thể được đánh giá như làm giảm chức năng huỳnh quang tryptophan trong lúc điều trị với sự tăng các nồng độ của guanidine hydroclorit bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Các miền FN3 theo sáng chế có thể được tạo ra như các đơn phân, các lưỡng phân, hoặc các đa phân, ví dụ, như được hiểu là để làm tăng hóa trị và do đó làm tăng ái lực gắn kết phân tử đích, hoặc để tạo ra các giàn đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu gắn kết đồng thời hai hoặc nhiều các phân tử đích khác nhau. Các lưỡng phân và các đa phân có thể được tạo ra bằng cách liên kết các giàn protein đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, ví dụ, bằng thể vùi của mối liên kết axit amin, ví dụ mối liên kết chứa poly-glyxin, glyxin và serin, hoặc alanin và prolin. Ví dụ mối liên kết bao gồm $(GS)_2$, (SEQ ID SỐ: 78), $(GGGGS)_5$ (SEQ ID SỐ: 79), $(AP)_2$ (SEQ ID SỐ: 80), $(AP)_5$ (SEQ ID SỐ:

81), $(AP)_{10}$ (SEQ ID SỐ: 82), $(AP)_{20}$ (SEQ ID SỐ: 83) và $A(EAAAK)_5AAA$ (SEQ ID SỐ: 84), các mối liên kết. Các lưỡng phân và các đa phân có thể được liên kết với với nhau theo hướng từ N tới C. Việc sử dụng các mối liên kết peptit xuất hiện tự nhiên cũng như nhân tạo để nối các polypeptit vào các polypeptit dung hợp được liên kết mới đã được biết trong tài liệu (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 chất đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met

Các chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met theo sáng chế có thể tạo ra lợi ích về độ đặc hiệu và làm giảm độc tố ngoài đích khi so với các chất ức chế EGFR và/hoặc c-Met phân tử nhỏ. Sáng chế này được dựa trên ít nhất một phần vào sự phát hiện đáng ngạc nhiên mà các chất đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met tạo ra tác dụng ức chế hiệp đồng đượcc ải thiện đáng kể khi so với hỗn hợp các chất đặc hiệu đơn gắn kết EGFR và gắn kết c-Met. Các phân tử có thể được điều chỉnh để ái lực đặc hiệu hướng về cả EGFR và c-Met để tối đa hóa sự thâm nhập và duy trì khối u. Các chất đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met tạo ra sự ức chế hiệu quả hơn các con đường tín hiệu EGFR và/hoặc c-Met và ức chế sự tăng trưởng khối u một cách hiệu quả hơn so với cetuximab (Erbitux®).

Các chất đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu EGFR và c-Met có thể được tạo thành bằng bất kỳ polypeptit hoặc polypeptit đa phân mà bao gồm miền gắn kết EGFR và miền gắn kết c-Met. Các miền gắn kết EGFR và c-Met có thể có vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể, cặp VH/VL của kháng thể, hoặc loại phân tử gắn kết khác như miền dựa trên miền fibronectin tuýp III (FN3), miền fibronectin tuýp IX (FN9), hoặc bất kỳ sự kết hợp của chúng.

Các polypeptit gắn kết EGFR và c-Met có thể được dẫn xuất từ các polypeptit gắn kết EGFR và c-Met đặc hiệu đơn có sẵn hoặc có thể là *de novo* được phân lập.

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

Một phương án khác theo sáng chế là miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập chứa phân tử bao gồm miền fibronectin tuýp III (FN3) thứ nhất và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) và phong bế sự gắn kết yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ

hai gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) và phong bế sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF) với c-Met.

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

Theo một phương án khác, miền FN3 thứ nhất của phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF ở gốc Tyroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $2,5x10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người, và miền FN3 thứ hai của phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF ở gốc Tyroxin 1349 của c-Met với trị số IC_{50} là nhỏ hơn khoảng $1,5x10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF ở người.

Theo phương án khác, miền FN3 thứ nhất của phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF ở gốc Tyroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} là nằm giữa khoảng từ $1,8 \times 10^{-8}$ M đến khoảng $2,5x10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào A431 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người, và miền FN3 thứ hai của phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF ở gốc Tyroxin 1349 của c-Met có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng từ $4x10^{-9}$ M đến khoảng $1,5x10^{-6}$ M khi đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF ở người.

Theo phương án khác, miền FN3 thứ nhất của phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép gắn kết EGFR ở người có hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, và miền FN3 thứ hai của phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép gắn kết c-Met ở người có K_D nhỏ hơn khoảng $5 x10^{-8}$ M.

Trong phân tử đặc hiệu kép gắn kết cả EGFR và c-Met, miền FN3 thứ nhất gắn kết EGFR ở người có KD nằm giữa khoảng từ $2x10^{-10}$ đến khoảng $1x10^{-8}$ M, và miền FN3 thứ hai gắn kết c-Met ở người có K_D nằm giữa khoảng $3x10^{-10}$ đến khoảng $5 x10^{-8}$ 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 ở trên 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 phong bế EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng $1x10^{-9}$ M đến $1,5x10^{-7}$ M trong thử nghiệm dùng các tế bào A431 và phát hiện lượng huỳnh quang từ gắn kết EGF được biotinylat hóa bằng cách sử dụng streptavidin-phycoerythrin tiếp hợp ở 600 nM trên các tế bào A431 được ủ mà 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 phong bế EGF gắn kết với EGFR 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 so với sự gắn kết của EGF với EGFR mà không có các miền FN3 thứ nhất bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Miền FN3 thứ hai trong phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể phong bế HGF gắn kết với c-Met có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng $2x10^{-10}$ M đến $6x10^{-8}$ M trong thử nghiệm phát hiện sự ức chế gắn kết của HGF được biotinylat hóa với protein dung hợp c-Met-Fc trong sự có mặt của miền FN3 thứ hai. Miền FN3 thứ hai trong phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép có thể phong bế HGF gắn kết 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 so với sự gắn kết của HGF với c-Met mà không có miền FN3 thứ hai bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể ức chế tín hiệu EGFR và/hoặc 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 so với mức độ của tín hiệu mà không có phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

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

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu EGFR và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu c-Met tạo ra sự ức chế hiệp đồng được tăng lên đáng kể của tín hiệu EGFR và c-Met và sự tăng sinh tế bào khối u 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

phosphoryl hóa ERK bằng các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép và bằng hỗn hợp của hai phân tử đặc hiệu đơn, một gắn kết EGFR và một gắn kết c-Met. Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể ức chế sự phosphoryl hóa ERK nhỏ hơn ít nhất khoảng 100 lần, ví dụ nhỏ hơn ít nhất 500, 1,000, 5,000 hoặc 10,000 lần khi so với trị số IC_{50} đối với hỗn hợp của hai miền FN3 đặc hiệu đơn, thể hiện sự hiệu nghiệm được tăng ít nhất 100 lần đối với các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép khi so với hỗn hợp của hai miền FN3 đặc hiệu đơn. Ví dụ về các phân tử chứa miền FN3 EGFR-c-Met đặc hiệu kép có thể ức chế sự phosphoryl hóa ERK có trị số IC_{50} là khoảng $5x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn. Sự phosphoryl hóa ERK có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể ức chế sự tăng sinh tế bào NCI-H292 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất 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 FN3 thứ hai, trong đó sự tăng sinh tế bào bị cảm ứng với môi trường chứa 10% FBS được bổ sung 7,5 ng/mL HGF. Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể ức chế sự tăng sinh tế bào khối u có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn khoảng 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, hoặc khoảng 1,000 lần khi so với trị số IC_{50} của sự ức chế tăng sinh tế bào khối u với hỗn hợp của miền FN3 thứ nhất và miền FN3 thứ hai. Sự ức chế tăng sinh tế bào khối u có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Phương án khác theo sáng chế là phân tử chứa miền FN3 đặc hiệu kép bao gồm miền fibronectin loại III (FN3) thứ nhất và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) và phong bế sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và phong bế sự 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 $HNVYKDTNX_9RGL$ (SEQ ID SỐ: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDVML (SEQ ID SỐ: 180), trong đó X_9 là M hoặc I; và

vòng BC bao gồm trình tự $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (SEQ ID SỐ: 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;

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 DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$ (SEQ ID SỐ: 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 TEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$V KGG$X_{21}X_{22}SX_{23}$ (SEQ ID SỐ: 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

X_{23} là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

Theo phương án khác, phân tử đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ nhất mà gắn kết EGFR bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLT VP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX_9RGL PLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 182), hoặc trình tự

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$
DSFLIQYQESEKVGEAINLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV
LGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 183),
trong đó trong các SEQ ID SỐ: 182 và 183;
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;
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;
X$_8$ là Y, F hoặc L; và
X$_9$ là M hoặc I.
Theo phương án khác, phân tử đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ hai mà gắn kết c-Met bao gồm trình tự
LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX$_{10}$IRYX$_{11}$E
X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG
TEYX$_{17}$VX$_{18}$IX$_{19}$X$_{20}$VKGGX$_{21}$X$_{22}$SX$_{23}$PLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 186),
trong đó
X$_{10}$ là W, F hoặc V; và
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;
X$_{16}$ là E hoặc D;
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

X_{23} là V, T, H, I, P, Y, T hoặc L.

Ví dụ về các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 50-72, 106, 118-121, hoặc 138-167.

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các đặc trưng cấu trúc nhất định được kết hợp với các đặc trưng chức năng của chúng, như sự ức chế tự phosphoryl hóa EGFR, như vòng FG của miền FN3 thứ nhất mà gắn kết EGFR bao gồm trình tự HNVYKDTNX$_9$RGL (SEQ ID SỐ: 179) hoặc trình tự LGSYVFEHDVML (SEQ ID SỐ: 180), trong đó X_9 là M hoặc I.

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

ức chế sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF ở các gốc Tyroxin 1173 của EGFR có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $8x10^{-7}$ M khi đo trong các tế bào H292 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người;

ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF ở gốc Tyroxin 1349 của c-Met có trị số IC_{50} nhỏ hơn khoảng $8,4x10^{-7}$ M khi đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF ở người;

ức chế tăng sinh tế bào NCI-H292 do cảm ứng HGF có trị số IC_{50} là nhỏ hơn khoảng $9,5x10^{-6}$M trong đó sự tăng sinh tế bào bị cảm ứng có 10% FBS chứa 7,5 ng HGF;

gắn kết EGFR có K_D nhỏ hơn khoảng $2,0x10^{-8}$ M; hoặc

gắn kết c-Met có K_D nhỏ hơn khoảng $2,0x10^{-8}$ M.

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

ức chế sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF ở các gốc Tyroxin 1173 của EGFR có IC_{50} nằm giữa khoảng $4,2x10^{-9}$ M và $8x10^{-7}$ M khi đo trong các tế bào H292 bằng cách sử dụng 50 ng/mL EGF ở người;

ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF ở các gốc Tyroxin 1349 của c-Met có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng từ $2,4x10^{-8}$ M đến $8,4x10^{-7}$ M khi đo trong các tế bào NCI-H441 bằng cách sử dụng 100 ng/mL HGF ở người;

ức chế sự tăng sinh tế bào NCI-H292 do cảm ứng HGF có trị số IC_{50} nằm giữa khoảng từ $2,3x10^{-8}$ M đến $9,5x10^{-6}$M trong đó sự tăng sinh tế bào bị cảm ứng có 10% FBS chứa 7,5 ng HGF;

gắn kết EGFR có K_D nằm giữa khoảng từ $2x10^{-10}$ M đến $2,0x10^{-8}$ M; hoặc

gắn kết c-Met có K_D nằm giữa khoảng từ $1x10^{-9}$ M đến $2,0x10^{-8}$ M.

Theo một phương án khác, các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 gắn kết EGFR bao gồm trình tự LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLT VP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV HNVYKDTNX$_9$RGL PLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 182), trong đó

X_1 là D;

X_2 là D;

X_3 là P;

X_4 là không có;

X_5 là H hoặc W;

X_6 là A;

X_7 là F

X_8 là Y; và

X_9 là M hoặc I; và

miền FN3 gắn c-Met bao gồm trình tự LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX$_{10}$IRYX$_{11}$E X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX$_{17}$VX$_{18}$IX$_{19}$X$_{20}$VKGGX2$_1$X$_{22}$SX$_{23}$ PLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 186),

trong đó

X_{10} là W;

X_{11} là F;

X_{12} là F;

X_{13} là V hoặc L;

X_{14} là G hoặc S;

$X1_5$ là S hoặc K;

X_{16} là E hoặc D;

X_{17} là V;

X_{18} là N;

X_{19} là L hoặc M;

X_{20} là G hoặc S;

X_{21} là S hoặc K;

X_{22} là I; và

X_{23} là P.

Ví dụ về các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép là các phân tử có trình tự được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 và 68.

Các phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể còn bao gồm các sự thay thế ở 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 SỐ: 1) như được mô tả ở trên, và sự thay thế ở vị trí 29. Ví dụ về các sự thay thế là các sự thay thế E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y, E86I và D29E (đánh số theo SEQ ID SỐ: 1). Các chuyên gia trong lĩnh vực chuyên ngành sẽ đánh giá các axit amin khác có thể được sử dụng cho các sự thay thế, như các axit amin trong họ các axit amin mà có liên quan theo các chuỗi bên của chúng như được mô tả *infra*. Các biến thể được tạo ra có thể được kiểm tra về tính ổn định của chúng và sự gắn kết với EGFR và/hoặc c-Met bằng cách sử dụng các phương pháp trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR và miền FN3 thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met, trong đó miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự:
LPAPKNLVVSX$_{24}$VTX$_{25}$DSX$_{26}$RLSWDDPX$_{27}$AFYX$_{28}$SFLIQYQX$_{29}$SEKVGEAIX$_{30}$
LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX$_{31}$VHNVYKDTNX$_{32}$RGLPLSAX$_{33}$FTT
(SEQ ID SỐ: 187), trong đó

X_{24} là E, N hoặc R;

X_{25} là E hoặc P;

X_{26} là L hoặc A;

X_{27} là H hoặc W;

X_{28} là E hoặc D;

X_{29} là E hoặc P;

X_{30} là N hoặc V;

X_{31} là G hoặc Y;

X_{32} là M hoặc I; và

X_{33} là E hoặc I;

và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự:

LPAPKNLVVSX$_{34}$VTX$_{35}$DSX$_{36}$RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX$_{37}$FX$_{38}$X$_{39}$X$_{40}$GX$_{41}$A IX$_{42}$LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX$_{43}$X$_{44}$VKGGX$_{45}$ISPPLSAX$_{46}$FTT (SEQ ID SỐ: 188); trong đó

X_{34} là E, N hoặc R;

X_{35} là E hoặc P;

X_{36} là L hoặc A;

X_{37} là E hoặc P;

X_{38} là V hoặc L;

X_{39} là G hoặc S;

X_{40} là S hoặc K;

X_{41} là E hoặc D;

X_{42} là N hoặc V;

X_{43} là L hoặc M;

X_{44} là G hoặc S;

X_{45} là S hoặc K; và

X_{46} là E hoặc I.

Theo các phương án khác, phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm miền FN3 thứ nhất bao gồm trình tự axit amin ít nhất là 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với trình tự axit amin có SEQ ID SỐ: 27, và miền FN3 thứ hai bao gồm trình tự axit amin ít nhất là 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 SỐ: 41.

Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được điều chỉnh để ái lực đặc hiệu hướng về EGFR và c-Met nhằm tối đa hóa sự tích lũy khối u.

Phương án khác theo sáng chế là phân tử chứa miền FN3 đặc hiệu kép được phân lập bao gồm miền fibronectin tuýp III (FN3) thứ nhất và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) và phong bế sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ

hai gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và phong bế sự 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 có SEQ ID SỐ: 1.

Phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo ra bằng ghép đồng 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 mối liên kết, ví dụ mối liên kết chứa poly-glyxin, glyxin và serin, hoặc alanin và prolin. Ví dụ về mối liên kết bao gồm $(GS)_2$, (SEQ ID SỐ: 78), $(GGGGS)_5$ (SEQ ID SỐ: 79), $(AP)_2$ (SEQ ID SỐ: 80), $(AP)_5$ (SEQ ID SỐ: 81), $(AP)_{10}$ (SEQ ID SỐ: 82), $(AP)_{20}$ (SEQ ID SỐ: 83), $A(EAAAK)_5AAA$ (SEQ ID SỐ: 84), các mối liên kết. Sử dụng các mối liên kết peptit dạng tự nhiên cũng như nhân tạo để nối các polypeptit vào các polypeptit dung hợp được liên kết mới đã được biết đến trong tài liệu (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 có thể được liên kết với nhau từ đầu cuối C của miền FN3 thứ nhất tới đầu cuối N của miền FN3 thứ hai, hoặc từ đầu cuối C của miền FN3 thứ hai tới đầu cuối 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. Ví dụ về các miền FN3 gắn kết EGFR là các miền có trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, và 122-137, và ví dụ về các miền FN3 gắn kết c-Met là các miền có trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 32-49 và 111-114. Các miền FN3 gắn kết EGFR cần được ghép với phân tử đặc hiệu kép ngoài ra có thể bao gồm methionin khởi đầu (Met) ở đầu cuối N của chúng.

Các biến thể của các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép là nằm trong phạm vi sáng chế. Ví dụ, các sự thay thế có thể được thực hiện trong phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép miễn là biến thể thu được giữ lại tính chọn lọc và sự hiệu nghiệm tương tự đối với EGFR và c-Met khi so với phân tử gốc. Ví dụ về các cải biến có ví dụ như các sự thay thế bảo tồn mà sẽ dẫn đến các biến thể có các đặc trưng tương tự như của các phân tử gốc. Các sự thay thế bảo tồn là các sự thay thế mà diễn ra trong họ các axit amin mà có liên quan theo các chuỗi bên của chúng. Các axit amin được mã hóa về mặt di truyền có thể có thể được chia thành bốn họ: (1) axit (aspartat,

glutamat); (2) bazơ (lysin, arginin histidin); (3) không phân cực (alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan); và (4) không tích điện phân cực (glyxin, asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, tyroxin). Phenylalanin, tryptophan, và tyroxin đôi khi được phân loại cùng nhau như các axit amin acromatic. Ngoài ra, danh mục axit amin có thể được nhóm lại là (1) axit (aspartate, glutamate); (2) bazơ (lysin, arginin histidin), (3) aliphatic (glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin), với serin và threonin tùy chọn được nhóm riêng biệt là hydroxyl béo; (4) aromatic (phenylalanin, tyroxin, tryptophan); (5) amit (asparagin, glutamin); và (6) chứa lưu huỳnh (cystein và methionin) (Stryer (ed.), Biochemistry, 2nd ed, WH Freeman and Co., 1981). Các sự thay thế không bảo tồn có thể được thực hiện để phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép mà gồm các sự thay thế các gốc axit giữa các lớp khác nhau của các axit amin cải thiện các đặc tính của các phân tử đặc hiệu kép. Dù sự thay đổi trình tự axit amin của polypeptit hoặc phân đoạn của nó dẫn đến chức năng đồng đẳng có thể được xác định dễ dàng bằng cách đánh giá khả năng của polypeptit hoặc phân đoạn bị biến đổi để tạo ra phản ứng theo cách tương tự với polypeptit hoặc phân đoạn không bị biến đổi bằng cách sử dụng các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này. Các peptit, polypeptit hoặc protein trong đó nhiều hơn một sự thay thế đã xảy ra có thể được kiểm tra dễ dàng theo cùng một cách.

Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo ra là các lưỡng phân hoặc các đa phân, ví dụ, như được hiểu là để làm tăng hóa trị và do đó tăng ái lực của việc gắn kết phân tử đích. Các đa phân có thể được tạo ra bằng cách liên kết một hoặc nhiều miền FN3 gắn kết EGFR và một hoặc nhiều miền FN3 gắn kết c-Met để tạo thành các phân tử bao gồm ít nhất ba miền miền FN3 riêng lẻ mà có ít nhất sự đặc hiệu kép đối với một trong hai EGFR hoặc c-Met, ví dụ là thể vùi của mối liên kết axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Phương án khác theo sáng chế là phân tử chứa miền FN3 đặc hiệu kép bao gồm miền fibronectin loại III (FN3) thứ nhất và miền FN3 thứ hai, trong đó miền FN3 thứ nhất gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) và phong bế sự gắn kết của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) với EGFR, và miền FN3 thứ hai gắn kết đặc hiệu thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met), và phong bế sự 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 SỐ: 50-72,106 hoặc 138-165.

Các gốc kéo dài chu kỳ bán hủy

Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép hoặc các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc c-Met đặc hiệu đơn theo sáng chế có thể gắn vào các đơn vị con khác ví dụ thông qua tương tác cộng hóa trị. Ở một khía cạnh khác theo sáng chế, các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế còn bao gồm gốc kéo dài chu kỳ bán hủy. Ví dụ về chu kỳ bán hủy kéo dài các gốc là albumin, các biến thể albumin, các protein và/hoặc các miền gắn kết albumin, transferrin và các phân đoạn và các chất tương tự của nó, và các miền Fc. Ví dụ về miền gắn kết albumin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 117.

Tất cả hoặc một phần của vùng cố định kháng thể có thể được gắn vào các phân tử theo sáng chế để truyền các đặc tính giống kháng thể, đặc biệt là những đặc tính được kết hợp với vùng Fc, như các chức năng cơ quan tác động Fc như gắn kết C1q, gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC- Complement Dependent Cytotoxicity), gắn kết thụ thể Fc, gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC- Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), sự thực bào, giảm sự điều tiết của các thụ thể ở bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể của tế bào B; BCR), và có thể còn được biến đổi bằng các gốc biến đổi trong Fc gây ra đối với các hoạt tính (xem lại; xem Strohl, *Curr Opin Biotechnol*. 20, 685-691, 2009).

Các gốc bổ sung có thể gắn vào các phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế như các phân tử polyethylen glycol (PEG), như PEG5000 hoặc PEG20,000, các axit béo và các este axit béo có chiều dài chuỗi khác nhau, ví dụ laurate, myristat, stearat, arachidat, behenat, oleat, arachidonat, axit octanedioic, axit tetradecanedioic, axit octadecanedioic, axit docosanedioic, và các chất tương tự, polylysin, octan, các carbohydrat (dextran, xenluloza, oligo- hoặc các polisaccarit) đối với các đặc tính mong muốn. Các gốc này có thể được dung hợp trực tiếp với các trình tự mã hóa giàn protein và có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật dòng vô tính biểu hiện tiêu chuẩn. Ngoài ra, đã biết các phương pháp ghép hóa học có thể được sử dụng để gắn các gốc vào các phân tử tạo tái tổ hợp theo sáng chế.

Ví dụ về gốc pegyl có thể được bổ sung vào các phân tử đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn theo sáng chế bằng cách gắn gốc cystein vào đầu cuối C của phân tử và gắn nhóm pegyl vào cystein bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ các phân tử

đặc hiệu kép có đầu C cystein là các phân tử có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ IN SỐ: 170-178.

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

Các polynucleotit, các vectơ, các tế bào chủ

Sáng chế đề xuất các axit nucleic mã hóa các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc gắn kết c-Met hoặc các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế như các polynucleotit được phân lập hoặc như các phần của các vectơ biểu hiện hoặc như các phần của các trình tự ADN thẳng, bao gồm các trình tự ADN thẳng được sử dụng cho phiên mã/dịch mã *in vitro*, các vectơ tương hợp có sự biểu hiện thể thực khuẩn prokaryotic, eukaryotic hoặc dạng sợi, bài tiết và/hoặc biểu hiện của các thành phần hoặc các chất gây đột biến định hướng của nó. Một số ví dụ về polynucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này, tuy nhiên, các polynucleotit khác mà, quy định sự suy thoái mã di truyền hoặc các sự ưu tiên codon trong hệ thống biểu hiện được quy định, mã hóa các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc gắn kết c-Met hoặc các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi sáng chế này.

Một phương án theo sáng chế là polynucleotit được phân lập mã hóa miền FN3 gắn kết đặc hiệu EGFR có trình tự axit amin có các SEQ ID SỐ: 18-29, 107-110, hoặc 122-137.

Một phương án theo sáng chế là polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự polynucleotit có các SEQ ID SỐ: 97-98 hoặc 168-169.

Một phương án theo sáng chế là polynucleotit được phân lập mã hóa miền FN3 gắn kết đặc hiệu c-Met có trình tự axit amin là trình tự được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 32-49 hoặc 111-114.

Một phương án theo sáng chế là polynucleotit được phân lập mã hóa phần tử chứa miền FN3 EGFR/-c-Met đặc hiệu kép có trình tự axit amin có các SEQ ID SỐ: 50-72, 106, 118-121 hoặc 138-165.

Một phương án theo sáng chế là polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự polynucleotit có các SEQ ID SỐ: 115-116 hoặc 166-167.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học như tổng hợp polynucleotit pha rắn trên bộ tổng hợp polynucleotit tự động và được ghép vào các phân tử dạng sợi đơn hoặc sợi kép hoàn toàn. Ngoài ra, polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác như PCR sau đó là nhân bản theo quy trình. Các kỹ thuật để tạo ra hoặc thu được polynucleotit của trình tự đã biết được đưa ra trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một trình tự không mã hóa, như trình tự vùng khởi đầu hoặc trình tự vùng tăng cường, vùng nội, tín hiệu polyadenyl hóa, trình tự *cis* tạo điều kiện thuận lợi gắn kết RepA, và các trình tự tương tự. Các trình tự polynucleotit có thể cũng bao gồm các trình tự bổ sung mã hóa các axit amin bổ sung mà ví dụ mã hóa một chất đánh dấu hoặc trình tự đánh dấu như histidin tag hoặc HA tag để tạo thuận lợi tinh chế hoặc phát hiện protein, trình tự tín hiệu, thành phần dung hợp protein như RepA, Fc hoặc thể thực khuẩn vỏ protein như pIX hoặc pIII.

Phương án khác theo sáng chế là vectơ bao gồm ít nhất một polynucleotit theo sáng chế. Như các vectơ có thể là các vectơ plasmit, các vectơ virut, các vectơ biểu hiện baculovirus, các vectơ dựa trên hoặc bất kỳ vectơ phù hợp khác để đưa polynucleotit theo sáng chế vào nền tảng di truyền hoặc hoặc sinh vật nhất định được hiểu theo bất kỳ cách nào. Các vectơ này có thể là các vectơ biểu hiện bao gồm các yếu tố có trình tự axit nucleic mà có thể kiểm soát, điều tiết, gây ra hoặc cho phép biểu hiện của polypeptit được mã hóa bằng vectơ này. Các yếu tố như vậy có thể bao gồm các vị trí gắn kết tăng cường vùng tăng cường phiên mã, các vị trí khởi đầu polymeraza RNA, các vị trí gắn kết ribosom, và các vị trí khác mà tạo thuận lợi biểu hiện cho các polypeptit được mã hóa trong hệ thống biểu hiện quy định. Các hệ thống biểu hiện này có thể dựa trên tế bào, hoặc các hệ thống không có tế bào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành.

Phương án khác theo sáng chế là tế bào chủ bao gồm vectơ theo sáng chế. Miền FN3 gắn kết EGFR hoặc gắn kết c-Met đặc hiệu đơn hoặc phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo ra tùy chọn bằng dòng tế bào,

hỗn hợp dòng tế bào, tế bào bất tử hoặc quần thể dòng của các tế bào bất tử, 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, *et al.,* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *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 Các proteincience, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Tế bào chủ được chọn để biểu hiện có thể có nguồn gốc từ lớp thú hoặc có thể được chọn lọc từ COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, He G2, SP2/0, HeLa, u tủy, u lympho, men, côn trùng hoặc các tế bào thực vật, hoặc bất kỳ dẫn xuất nào, tế bào bất tử hoặc biến nạp của nó. Theo cách khác, tế bào chủ có thể được chọn lọc từ các loài hoặc sinh vật không có khả năng của các polypeptit glycosylate hóa, ví dụ tế bào hoặc sinh vật prokaryotic, như BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), và bất kỳ các sợi *E. coli spp, Klebsiella spp.,* hoặc *Pseudomonas spp* dạng tự nhiên hoặc được thiết kế.

Phương án khác theo sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra miền FN3 được phân lập gắn kết đặc hiệu EGFR hoặc c-Met theo sáng chế hoặc phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập 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 EGFR hoặc c-Met hoặc phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập được biểu hiện, và việc tinh chế miền hoặc phân tử.

Miền FN3 gắn kết đặc hiệu EGFR hoặc c-Met hoặc phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập theo sáng chế có thể được tinh chế từ việc nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp đã biết, ví dụ bằng cách tinh chế protein A, kết tủa ammoni sulfat hoặc etanol, tách chiết axit, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký phosphoxenlulosa, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký lectin, hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC- High Performance Liquid Chromatography).

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép có thể được tạo ra *de novo* hoặc có thể được thiết kế từ các kháng thể kháng EGFR và kháng c-Met đặc hiệu đơn có sẵn.

Ví dụ về các kháng thể kháng EGFR mà có thể được sử dụng để thiết kế các phân tử đặc hiệu kép ví dụ như panitumumab (ABX-EGF), nimotuzumab, nexitumumab, matuzumab, và các kháng thể được mô tả ví dụ trong: Patent Mỹ Số. US7,595,378, Patent Mỹ Số. US7,247,301, Công bố Patent Mỹ Số. US2011/0256142, Patent Mỹ số. US5,891,996, Patent Mỹ Số. US5,212,290, Patent Mỹ Số. US5,558,864, hoặc Patent Mỹ Số. US7,589,180. Ví dụ, miền VH kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 189 hoặc 191 và miền VL kháng thể có các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 190 hoặc 192 có thể được sử dụng.

Ví dụ về các kháng thể kháng c-Met mà có thể được sử dụng để thiết kế các phân tử đặc hiệu kép are ví dụ Rilotumumab, Onartuzumab, Ficlatuzumab, và các kháng thể được mô tả ví dụ trong Công bố Quốc tế PCT Số. WO2011/110642, Công bố Patent Mỹ Số. US2004/0166544, Công bố Quốc tế PCT Số. WO2005/016382, hoặc Công bố Quốc tế PCT Số. WO2006/015371. Ví dụ, miền VH kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 193 hoặc 195 và miền VL kháng thể có các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 194 hoặc 196 có thể được sử dụng. Các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể được định danh bởi các tên được Hoa Kỳ thông qua (USAN- United States AdopteADNmes) của chúng có sẵn thông qua Hiệp hội Y khoa Hoa Kỳ ở http://_www_ama-assn_org hoặc thông qua đăng ký CAS.

Các miền biến đổi gắn kết EGFR và c-Met đặc hiệu đơn có thể được chọn lọc *de novo* ví dụ từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn, nơi mà thể thực khuẩn được thiết kế để biểu hiện các globulin miễn dịch ở người hoặc cá phần của nó như các Fab, các kháng thể chuỗi đơn (scFv), các vùng biến đổi kháng thể hoặc không ghép cặp hoặc ghép cặp (Knappik *và các đồng tác giả*, J Mol Biol 296:57-86, 2000; Krebs *và các đồng tác giả*, J Immunol Meth 254:67-84, 2001; Vaughan *và các đồng tác giả*, Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; Sheets *và các đồng tác giả*, PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J Mol Biol 227:381, 1991; Marks *và các đồng tác giả*, J Mol Biol 222:581, 1991), và sau đó được thiết kế thành dạng đặc hiệu kép. Các miền biến đổi gắn kết EGFR và c-Met đặc hiệu đơn có thể được phân lập ví dụ từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn biểu hiện các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể như các protein dung hợp với protein vỏ pIX thể thực khuẩn như được mô tả trong Shi *và các đồng tác giả* (2010) J. Mol. Biol. 397:385-96 và Công bố Quốc tế PCT Số. WO09/085462). Các thư viện kháng thể được sàng lọc để gắn kết với miền các ngoại

bào EGFR hoặc c-Met ở người và các dòng vô tính dương tính thu được còn được đặc trưng hơn nữa và các Fab được phân lập từ việc các hợp chất dung giải tế bào dòng vô tính. Các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn này để phân lập các kháng thể ở người được thiết lập trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem ví dụ: Patent Mỹ Số. 5,223,409; Patent Mỹ Số. 5,403,484; và Patent Mỹ Số. 5,571,698, Patent Mỹ Số. 5,427,908, Patent Mỹ Số. 5, 580,717, Patent Mỹ Số. 5,969,108, Patent Mỹ Số. 6,172,197, Patent Mỹ Số. 5,885,793; Patent Mỹ Số. 6,521,404; Patent Mỹ Số. 6,544,731; Patent Mỹ Số. 6,555,313; Patent Mỹ Số. 6,582,915 và Patent Mỹ Số. 6,593,081. Các vùng biến đổi *de novo* thu được gắn kết EGFR hoặc c-Met được thiết kế với các dạng đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Các định dạng kháng thể đặc hiệu kép

Các kháng thể theo sáng chế có hai hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên và là các kháng thể đặc hiệu kép đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các kháng thể có cấu trúc kháng thể có chiều dài toàn bộ.

"Kháng thể có chiều dài toàn bộ" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng kháng thể có chiều dài toàn bộ và hai chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài toàn bộ. Kháng thể chuỗi nặng có chiều dài toàn bộ (HC) bao gồm các miền cố định và biến đổi chuỗi nặng đã biết VH, CH1, CH2, và CH3. Kháng thể chuỗi nhẹ có chiều dài toàn bộ (LC) các miền cố định và biến đổi chuỗi nhẹ đã biết VL và CL. Kháng thể có chiều dài toàn bộ có thể thiếu Lyzin đầu C (K) ở một trong hai hoặc cả hai chuỗi nặng.

Thuật ngữ "nhánh Fab "hoặc "nửa phân tử" dùng để chỉ một cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên.

Các kháng thể đặc hiệu kép có chiều dài toàn bộ theo sáng chế ví dụ có thể được tạo ra bằng cách sử dụng sự trao đổi nhánh Fab (hoặc sự trao đổi nửa phân tử) giữa hai kháng thể hóa trị hai đặc hiệu đơn bằng cách đưa vào các sự thay thế ở bề mặt chung CH3chuỗi nặng trong mỗi nửa phân tử để ưu tiên tạo thành dị lưỡng phân của hai nửa phân tử kháng thể có khác biệt độ đặc hiệu hoặc trong môi trường không có tế bào *in vitro* hoặc bằng cách sử dụng đồng biểu hiện. Phản ứng trao đổi nhánh Fab là kết quả của phản ứng đồng phân hóa liên kết disunfit và sự phân ly-liên hợp của các miền CH3. Các liên kết disunfit chuỗi nặng ở các vùng bản lề của các kháng thể đặc hiệu đơn gốc được làm giảm. Các cysteine không thu được của một trong các kháng thể đặc hiệu đơn

gốc tạo thành liên kết disunfit giữa chuỗi nặng có các gốc cystein của phân tử kháng thể đặc hiệu đơn gốc thứ hai và đồng thời các miền CH3 của các kháng thể gốc giải phóng và tái tạo bởi sự phân ly-liên hợp. Các miền CH3 của các nhánh Fab có thể được thiết kế để ưu tiên dị lưỡng phân hơn đồng lưỡng phân hóa. Sản phẩm thu được là kháng thể đặc hiệu kép có hai nhánh Fab hoặc nửa các phân tử mà mỗi gắn kết epitop khác biệt, tức là một epitop trên EGFR và một epitop trên c-Met.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ "đồng lưỡng phân hóa" dùng để chỉ tương tác của hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 tương đồng. "Đồng lưỡng phân" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 tương đồng.

Như được sử dụng trong bản mô tả, cụm từ "dị lưỡng phân hóa" dùng để chỉ tương tác của hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 không tương đồng. "Dị lưỡng phân" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 không tương đồng.

Chiến lược "u bướu-trong-lỗ" (xem, ví dụ, Công bố Quốc tế PCT Số. WO 2006/028936) có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép có chiều dài toàn bộ. Tóm lại, các axit amin được chọn lọc tạo thành bề mặt chung của các miền CH3 trong IgG ở người có thể bị đột biến ở các vị trí tác động đến các tương tác miền CH3 để thúc đẩy tạo thành dị lưỡng phân. Axit amin có chuỗi bên nhỏ (lỗ) được đưa vào chuỗi nặng của kháng thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên thứ nhất và axit amin có chuỗi bên lớn (u bướu) được đưa vào chuỗi nặng của kháng thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên thứ hai. Sau sự đồng biểu hiện của hai các kháng thể, dị lưỡng phân được tạo thành là kết quả tương tác ưu tiên của chuỗi nặng với "lỗ" có chuỗi nặng có "u bướu". Ví dụ về các cặp thay thế CH3 tạo thành u bướu và lỗ (được biểu hiện như vị trí được biến đổi trong miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất/vị trí được biến đổi trong miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai) là: T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S and T366W/T366S_L368A_Y407V.

Các chiến lược khác như thúc đẩy dị lưỡng phân chuỗi nặng bằng cách sử dụng các tương tác tĩnh điện bằng cách thay thế các gốc tích điện dương ở một bề mặt CH3 và các gốc tích điện âm ở bề mặt CH3 thứ hai có thể được sử dụng, như được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Số. US2010/0015133; Công bố Patent Mỹ Số.

US2009/0182127; Công bố Patent Mỹ Số. US2010/028637 hoặc Công bố Patent Mỹ Số. US2011/0123532. Theo các chiến lược khác, dị lưỡng phân có thể được thúc đẩy bằng các sự thay thế sau đây (được biểu hiện là vị trí được biến đổi trong miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất/vị trí được biến đổi trong miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, hoặc T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_ K392L_T394W như được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Số. US2012/0149876 hoặc Công bố Patent Mỹ Số. US2013/0195849.

Ngoài các phương pháp được mô tả ở trên, các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo *in vitro* trong môi trường không có tế bào bằng cách đưa các đột biến không đối xứng vào các vùng CH3 của hai kháng thể đồng lưỡng phân đặc hiệu đơn và tạo thành kháng thể dị lưỡng phân đặc hiệu kép từ hai kháng thể đồng lưỡng phân đặc hiệu đơn gốc trong việc giảm bớt các điều kiện cho phép đồng phân hóa liên kết disunfit theo các phương pháp được mô tả trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2011/131746. Theo các phương pháp này, kháng thể hóa trị hai đặc hiệu đơn thứ nhất (ví dụ, kháng thể kháng c-Met) và kháng thể hóa trị hai đặc hiệu đơn thứ hai (ví dụ, kháng thể kháng EGFR) được thiết kế để có các sự thay thế nhất định ở miền CH3 mà khởi đầu tính ổn định dị lưỡng phân; các kháng thể được ủ với nhau trong các điều kiện khử đầy đủ để cho phép các cystein trong vùng bản lề bị đồng phân hóa liên kết disunfit; do đó sự tạo ra kháng thể đặc hiệu kép bằng sự trao đổi nhánh Fab. Các điều kiện ủ tối ưu có thể được phục hồi để không cần khử. Ví dụ về các chất khử mà có thể được sử dụng là 2- mercaptoethylamin (2-MEA), dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), glutathione, tris(2-cacboxyetyl)photphin (TCEP), L-cystein và beta-mercaptoetanol, tốt hơn là chất khử được chọn từ nhóm bao gồm: 2- mercaptoetylamin, dithiothreitol and tris(2-cacboxyetyl) photphin. Ví dụ, ủ khoảng ít nhất 90 phút ở nhiệt độ ít nhất là 20°C mà có mặt ít nhất 25 mM 2-MEA hoặc có mặt ít nhất là 0,5 mM dithiothreitol ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 8, ví dụ độ pH là 7,0 hoặc ở độ pH là 7,4 có thể được sử dụng.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể tạo ra lợi ích về độ đặc hiệu và làm giảm độc tố ngoài đích khi so với các chất ức chế EGFR và/hoặc c-Met phân tử nhỏ. Sáng chế này được dựa trên ít nhất một phần vào sự phát hiện đáng ngạc nhiên mà các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế tạo ra tác dụng ức chế hiệp đồng được cải thiện đáng kể khi so với hỗn hợp của các kháng thể đặc hiệu đơn gắn kết EGFR và gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép được đưa ra. Phụ thuộc vào thử nghiệm, hiệu ứng hiệp đồng được quan sát sự thay đổi nằm giữa khoảng từ 14 đến hơn 800 lần. Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế tạo ra nhiều hiệu quả ức chế các con đường tín hiệu EGFR và c-Met và ức chế sự tăng trưởng khối u một cách hiệu quả hơn cetuximab (Erbitux®). Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế ức chế tín hiệu EGFR trong các khối u và/hoặc các dòng tế bào khối u có các đột biến hoạt hóa EGFR và/hoặc các đột biến trong EGFR mà được biết là dẫn đến sức đề kháng để điều trị bằng chất ức chế các tyrosin kinaza như gefitinib, và ức chế con đường tín hiệu c-Met, con đường được nhận dạng để gia tăng điều chỉnh và tạo ra tín hiệu bù trong lúc điều trị bằng các chất ức chế tyrosin kinaza EGFR trong các loại ung thư như NSCLC. Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế, ngoài việc trực tiếp ức chế tín hiệu EGFR và c-Met, biểu hiện hoạt tính kháng u thông qua kháng thể được tăng cường phụ thuộc tế bào gây độc tế bào (ADCC) và sự thoái biến của các thụ thể EGFR và c-Met. Ngược lại với các liệu pháp EGFR hiện tại (cetuximab và panitumumab), các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm, thông qua ADCC được tăng cường, tiêu diệt các tế bào khối u có các đột biến KRAS.

Công bố Patent Quốc tế Số. WO2010/115551 đã mô tả kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép (BSAB01) được thiết kế trong dạng IgG-scFv bằng cách sử dụng cặp VH/VL gắn kết EGFR của cetuximab, và cặp VH/VL gắn kết c-Met của kháng thể 5D5 (MetMab, onartuzumab) hiện đang trong các thử nghiệm giai đoạn Phase III. BSAB01 chứng tỏ sự ức chế tăng sinh tế bào A431 được tăng lên (cộng hợp) khoảng chừng hai lần khi so với the các kháng thể gốc (Ví dụ 7, Fig.8b trong WO2010/115551), và ức chế sự tăng sinh tế bào Ovarc-8 cộng hợp vừa phải (Fig.10a, Ví dụ 16 trong WO2010/115551) khi so với sự kết hợp của hai kháng thể gốc (15% với 10% sự ức chế). Do đó, đáng ngạc nhiên và bất ngờ là, sáng chế đề xuất các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép mà chứng tỏ hiệu ứng hiệp đồng đáng kể trong việc ức chế tín hiệu EGFR và

c-Met, sự sống của tế bào ung thư và sự tăng trưởng khối u. Vì không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, người ta cho rằng hiệu ứng hiệp đồng đáng kể của các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế ít nhất một phần các kết quả từ độ đặc hiệu epitop của cả hai nhánh gắn kết EGFR và c-Met, có thể dẫn đến sự ức chế tín hiệu thông qua không chỉ các đồng lưỡng phân EGFR và c-Met mà còn các dị lưỡng phân EGFR/HERx.

Một phương án theo sáng chế là thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì đặc hiệu kép được phân lập (EGFR)/ kháng thụ thể (c-Met) của yếu tố tăng trưởng tế bào gan, bao gồm:

a) chuỗi nặng thứ nhất (HC1) bao gồm miền cố định HC1 3 (HC1 CH3) và vùng biến đổi HC1 1 (VH1);

b) chuỗi nặng thứ hai (HC2) bao gồm miền cố định HC2 3 (HC2 CH3) và vùng biến đổi HC2 2 (VH2);

c) chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1) bao gồm chuỗi nhẹ vùng biến đổi 1 (VL1); và chuỗi nhẹ thứ hai (LC2) bao gồm chuỗi nhẹ vùng biến đổi 2 (VL2), trong đó cặp VH1 và VL1 để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR và cặp VH2 và VL2 để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met, trong đó HC1 bao gồm ít nhất một sự thay thế trong HC1 CH3 và HC2 bao gồm ít nhất một sự thay thế trong HC2 CH3, trong đó sự thay thế trong HC1 CH3 và sự thay thế trong HC2 CH3 xảy ra ở các vị trí gốc axit amin khác nhau, khi số gốc theo chỉ số EU.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa của các kinaza được điều hòa bởi tín hiệu ngoại bào 1 và 2 (ERK1/2) trong dòng tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc SKMES-1 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 10 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 20 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 30 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 40 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 50 lần hoặc nhỏ hơn ít nhất khoảng 60 lần khi so với có trị số IC_{50} ức chế sự phosphoryl hóa của ERK1/2 trong dòng tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc SKMES-1 có hỗn hợp của kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm chuỗi nặng 3 (HC3) và chuỗi nhẹ 3 (LC3) và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm chuỗi nặng 4 (HC4) và chuỗi nhẹ 4 (LC4), trong đó HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng, và sự phosphoryl hóa of ERK1/2 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa

bằng cách sử dụng kháng thể kháng photpho ERK1/2 làm kháng thể bắt và kháng thể gắn với được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa ERK1/2 được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện. Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế tạo ra hiệp đồng sự ức chế tín hiệu EGFR và c-Met rõ rệt hơn khi so với sự kết hợp của các kháng thể EGFR đặc hiệu đơn và các kháng thể c-Met đặc hiệu đơn, khi sự ức chế được đánh giá bằng sự ức chế phosphoryl hóa của ERK1/2. Như ví dụ về kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép là kháng thể EM1-mAb theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ " kháng thể EGFR đặc hiệu đơn đối chứng " dùng để chỉ kháng thể có nhánh Fab thứ nhất mà gắn kết EGFR tương đồng về trình tự axit amin với nhánh Fab gắn kết EGFR của kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kiểm tra, và có nhánh Fab thứ hai là "mất hoạt tính" và gắn kết kháng nguyên không liên quan/không thích hợp, virut gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV- human immunodeficiency virut) gp120. Nhánh Fab thứ hai có chuỗi nhẹ có trình tự là SEQ ID SỐ: 209 và chuỗi nặng có trình tự là SEQ ID SỐ: 198 trong các trường hợp khi nhánh Fab gắn kết EGFR trong kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kiểm tra bao gồm sự thay thế F405L. Nhánh Fab thứ hai có chuỗi nhẹ có trình tự là SEQ ID SỐ: 209 và chuỗi nặng có trình tự là SEQ ID SỐ: 197 trong các trường hợp khi nhánh Fab gắn kết EGFR trong kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kiểm tra bao gồm sự thay thế K409R.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể c-Met đặc hiệu đơn đối chứng" dùng để chỉ kháng thể mà có nhánh Fab thứ nhất mà gắn kết c-Met tương đồng về trình tự axit amin với nhánh Fab gắn kết c-Met của kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kiểm tra, và có nhánh Fab thứ hai mà "mất hoạt tính" và gắn kết kháng nguyên HIV không liên quan/không thích hợp gp120. Nhánh Fab thứ hai có chuỗi nhẹ có trình tự là SEQ ID SỐ: 209 và chuỗi nặng có trình tự là SEQ ID SỐ: 198 trong các trường hợp khi nhánh Fab gắn kết c-Met trong kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kiểm tra bao gồm sự thay thế F405L. Nhánh Fab trơ thứ hai có chuỗi nhẹ có trình tự là SEQ ID SỐ: 209 và chuỗi nặng có trình tự là SEQ ID SỐ: 197 trong các trường hợp khi nhánh Fab gắn kết c-Met trong kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kiểm tra bao gồm sự thay thế K409R.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa của ERK1/2 có trị số IC_{50} là khoảng $2x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn, khoảng $1x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng $1x10^{-10}$ M hoặc nhỏ hơn.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, ERK1 bị phosphoryl hóa ở các gốc Thr202 và Tyr204, và ERK2 được phosphoryl hóa ở các gốc Thr185 và Tyr197.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa của protein kinaza B (AKT) ở Ser473 trong dòng tế bào NCI-H1975 có trị số IC_{50} nhỏ hơn ít nhất khoảng 70 lần khi so với có trị số IC50 ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Ser473 trong dòng tế bào NCI- H1975 có hỗn hợp kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm HC3 và LC3 và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm HC4 và LC4, trong đó HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng, trong đó sự phosphoryl hóa AKT ở Ser473 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể gắn với AKT được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa làm kháng thể bắt và kháng thể kháng photpho AKT Ser473 được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa của protein kinaza B (AKT) ở Thr308 trong dòng tế bào NCI- H1975 có trị số IC_{50} nhỏ hơn ít nhất khoảng 100 lần khi so với có trị số IC_{50} ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Thr308 trong dòng tế bào NCI- H1975 có hỗn hợp kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm HC3 và LC3 và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm HC4 và LC4, trong đó HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng, trong đó sự phosphoryl hóa AKT ở Thr308 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể gắn với AKT được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa làm kháng thể bắt và kháng thể kháng photpho AKT Thr308 được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế tạo ra sự ức chế hiệp đồng rõ rệt hơn của tín hiệu EGFR và c-Met khi so với sự kết hợp của các kháng thể EGFR

đặc hiệu đơn và các kháng thể c-Met đặc hiệu đơn, khi sự ức chế được đánh giá bằng sự ức chế phosphoryl hóa AKT. Ví dụ về kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép này là kháng thể EM1-mAb theo sáng chế.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa AKT ở Ser473 hoặc ở Thr308 có trị số IC_{50} là khoảng $1x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép gắn kết EGFR có SEQ ID SỐ: 73 ở các gốc K489, I491, K467 và S492 của EGFR và c-Met ở các gốc PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID SỐ: 238) và FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID SỐ: 239). Ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép này EM1-mAb. Kháng thể EM-1 đặc hiệu kép gắn kết EGFR và c-Met ở các epitop khác biệt khi so với kháng thể BSAB01 như được mô tả ở trên và trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2010/115551. Nhánh gắn kết EGFR gốc (cetuximab) của BSAB01 gắn kết các gốc axit amin R353, Q384, Q408, H409, F412, S418, S440, K443, K465, I467, S468, and N473 của EGFR EGFR trưởng thành, tương ứng với các gốc R367, Q408, Q432, H433, F436, S442, S464, K467, K489, I491, S492 và N497 của EGFR có chiều dài toàn bộ có SEQ ID SỐ: 73 (Li *và các đồng tác giả*, Cancer Cell 7:301-311, 2005). Nhánh gắn kết c-Met gốc của BSAB01 (mAb 5D5) gắn kết các gốc c-Met 325-340 PGAQLARQIGASLNDD (SEQ ID SỐ: 240). Việc lập bản đồ Epitop của kháng thể gốc gắn kết EGFR (2F8) của EM1-mAb được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Số. US2011/0256142A1. Cetuximab và kháng thể 2F8 gốc gắn kết một phần chồng chéo nhưng khác biệt các epitop.

Việc lập bản đồ Epitop có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, khi các cấu trúc của cả hai thành phần riêng lẻ đã biết, trong cầu nối protein-protein silico có thể được thực hiện để để nhận dạng các vị trí tương hợp của tương tác. Sự trao đổi hyđrô-đoteri (H/D) có thể được thực hiện với kháng nguyên và kháng thể phức hợp để lập bản đồ các vùng về kháng nguyên mà có thể được gắn bằng kháng thể. Việc gây đột biến đoạn và đột biến điểm của kháng nguyên có thể được sử dụng để xác định vị trí các axit amin quan trọng đối với sự gắn kết kháng thể.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép trung hòa tín hiệu EGFR và c-Met.

Kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể trung hòa tín hiệu EGFR và 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 so với mức độ tín hiệu mà không có phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Sự gắn kết phối tử như EGF với EGFR kích thích lưỡng phân hóa thụ thể, tự phosphoryl hóa, hoạt tính bên trong thụ thể, miền tyroxin kinaza bào tương, và khởi đầu của sự truyền nhiều tín hiệu và các con đường chuyểnhoạt tính gồm điều tiết sự tổng hợp ADN (gen hoạt tính) và sự sự tiến triển hoặc phân chia chu kỳ tế bào. Sự trung hòa tín hiệu EGFR có thể dẫn đến sự ức chế trong một hoặc nhiều con đường tín hiệu xuôi dòng EGFR và do đó việc vô hiệu hóa EGFR có thể có các tác dụng khác nhau, bao gồm sự ức chế tăng sinh và biệt hóa tế bào, tạo mạch, sự vận động và di căn của tế bào, và sự ức chế của các con đường tín hiệu xuôi dòng.

Tín hiệu EGFR và sự trung hòa tín hiệu EGFR có thể được đánh giá 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 thyroxin Y1068, Y1148, và Y1173 (Downward *và các đồng tác giả*, Nature 311:483-5, 1984) và/hoặc sự phosphoryl hóa của các cơ chất tự nhiên hoặc tổng hợp, và sự ức chế tự phosphoryl hóa và/hoặc sự phosphoryl hóa cơ chất tự nhiên hoặc tổng hợp bởi các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế. Sự phosphoryl hóa có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết như thử nghiệm ELISA hoặc western plot bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu phosphotyroxin. Ví dụ về các thử nghiệm có thể tìm thấy 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 như được mô tả trong bản mô tả này.

Sự gắn kết của HGF với c-Met kích thích lưỡng phân hóa thụ thể, tự phosphoryl hóa, hoạt hóa miền tyroxin kinaza bào tương của thụ thể, và khởi đầu của sự truyền nhiều tín hiệu và con đường chuyển hoạt tính gồm điều tiết sự tổng hợp ADN (gen hoạt tính) và sự tiến triển hoặc phân chia chu kỳ tế bào. Sự ức chế tín hiệu c-Met có thể dẫn đến sự ức chế trong một hoặc nhiều các con đường tín hiệu xuôi dòng c-Met và do đó việc vô hiệu hóa c-Met có thể có các tác dụng khác nhau, bao gồm sự ức chế tăng sinh và biệt hóa tế bào, tạo mạch, sự vận động và di căn của tế bào.

Tín hiệu c-Met và sự trung hòa tín hiệu c-Met có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau, ví dụ đo sự tự phosphoryl hóa của thụ thể trên ít nhất một trong các gốc tyroxin Y1230, Y1234,Y1235 hoặc Y1349, và/hoặc sự phosphoryl hóa các cơ chất tự nhiên hoặc tổng hợp. Sự phosphoryl hóa có thể được phát hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu phosphotyroxin trong thử nghiệm ELISA hoặc trên western blot. Ví dụ về các thử nghiệm có thể được tìm thấy 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 như được mô tả trong bản mô tả này.

Tín hiệu EGFR và c-Met có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết khác nhau như được mô tả trong bản mô tả này, như đo sự ức chế phosphoryl hóa ERK1/2 và AKT. Sự ức chế phosphoryl hóa ERK1 ở Thr202 và Tyr204 và phosphoryl hóa ERK2 ở Thr185 và Tyr187 và sự ức chế AKT ở Ser473 hoặc Thr308 có thể được đánh giá ví dụ trong các hợp chất dung giải tế bào NCI-H1975 dùng thử nghiệm kẹp giữa với kháng thể bắt được bọc trên giá đỡ rắn, và kháng thể phát hiện được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang như Meso Scale Discover (MSD) nhãn SULFO-TAG, tiếp theo được phát hiện tín hiệu bằng thiết bị đọc dạng tấm.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phát triển của các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 có trị số IC_{50} nhỏ hơn ít nhất khoảng 300 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 400 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 500 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 600 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 700 lần hoặc nhỏ hơn ít nhất khoảng 800 lần khi so với có trị số IC50 của sự ức chế phát triển các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 có cetuximab, khi các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 được tăng trưởng trong các điều kiện gắn kèm thấp.

Sự ức chế tăng trưởng tế bào có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, các tế bào có thể được gieo trong các đĩa được phủ bằng các hydrogen hoặc các polymer phỏng sinh học (ví dụ các đĩa Gắn Cực Thấp của Corning) để tránh hoặc làm giảm tế bào gắn kèm, và tác dụng của các kháng thể trên 7,5 ng/mL sự tăng trưởng tế bào do cảm ứng HGF có thể được đánh giá bằng cách đo phần trăm khả năng sống được của tế bào sau khi ủ trong khoảng thời gian 72 giờ bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế tạo ra sự ức chế hiệp đồng rõ rệt hơn của EGFR và/hoặc các tế bào ung thư biểu hiện c-Met khi so với sự kết hợp

của các kháng thể EGFR đặc hiệu đơn và các kháng thể c-Met đặc hiệu đơn và theo tiêu chuẩn của cetuximab được quan tâm. Ví dụ về kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép này là kháng thể EM1-mAb theo sáng chế. Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế ức chế các tế bào ung thư mà biểu hiện EGFR loại dại và c-Met loại dại, và còn các tế bào ung thư mà biểu hiện thể đột biến EGFR L858R/T790M, mà sự đột biến được nhận dạng để góp phần vào sức đề kháng để điều trị với chất ức chế tyrosin kinazas phân tử nhỏ (TKIs) như gefitinib. Do đó các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể tạo lợi ích theo nghĩa rộng ở nhóm bệnh nhân khi so với cetuximab và TKIs.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phát triển của khối u tế bào SKMES-1 biểu hiện HGF ở chuột SCID Beige với tỷ lệ phần trăm (%) trị số T/C nhỏ hơn ít nhất 500 lần trong ngày 36 khi so với cetuximab, khi kháng thể đặc hiệu kép và cetuximab được dùng ở liều lượng 20 mg/kg.

Các mô hình kiểu khối u ghép ngoại lai sử dụng ở chuột SCID Beige đã được biết đến. Các tế bào SKMES-1có thể được thiết kế để biểu hiện HGF ở người bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Thông thường, ở chuột SCID Beige có thể được tiêm truyền dưới da có các tế bào SKMES-1biểu hiện HGF ở người được gắn trong nền ngoại bào như Nuôi cấy ở sườn lưng của mỗi con vật. Một tuần sau khi cấy, chuột có thể được phân vào các nhóm có các thể tích khối u tương đương, và sau đó được dùng thuốc theo liều ví dụ ba lần mỗi tuần với các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế, các kháng thể đối chứng hoặc kháng thể chuẩn hoặc các phân tử nhỏ. Các thể tích khối u có thể được ghi lại hai lần một tuần, và sự ức chế tăng trưởng khối u (TGI) có thể được quan sát bằng cách tính toán tỷ lệ phần trăm (%) trị số T/C. Trị số % T/C biểu thị tính hiệu quả kháng u. T và C là các thể tích trung bình lần lượt của nhóm đối chứng và nhóm được điều trị, vào một ngày nhất định.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế tạo ra tính hiệu quả được cải thiện đáng kể trong việc tiêu diệt khối u *in vivo* khi so với tiêu chuẩn của cetuximab được quan tâm, và do đó có thể tạo ra lợi ích ở nhóm bệnh nhân khi so với cetuximab.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm HC1 và HC2 của lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm HC1 và HC2 của lớp kháng thể IgG1.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép HC1 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám sự thay thế ở các vị trí gốc 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 hoặc 409, khi số gốc theo chỉ số EU.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép HC1 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế ở các vị trí gốc 350, 370, 405 hoặc 409, khi số gốc theo chỉ số EU.

Các miền kháng thể và số lượng đã được biết đến. Hai miền CH3 (hoặc các vùng CH3) là không tương đồng khi chúng khác ít nhất một sự thay thế axit amin from với mỗi cái khác. Vùng IgG1 CH3 thông thường bao gồm các gốc từ 341-446 trên IgG1 (số gốc theo chỉ số EU). Ví dụ về vùng cố định IgG1 được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 203. Các miền CH3 kéo dài các gốc từ 224-329 của SEQ ID SỐ: 203, và tương ứng với các gốc từ 341-446 theo chỉ số EU.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép HC1 CH3 bao gồm ít nhất một sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm ít nhất một sự thay thế ở các vị trí gốc 405 hoặc 409, khi số gốc theo chỉ số EU.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép HC1 CH3 bao gồms a K409R hoặc a F405L sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc F405L, trong đó số gốc theo chỉ số EU.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép HC1 CH3 bao gồm sự thay thế F405L và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, các sự thay thế HC1 CH3 và HC2 CH3 là các sự thay thế ở vị trí 366, 368, 370, 399, 405, 407 hoặc 409 (số theo chỉ số EU). Các vị trí này tương ứng với các vị trí gốc thẳng lần lượt là 248, 250, 252, 281, 287, 289 và 291, trong vùng cố định chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 203 và 204.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, vị trí 409 của HC1 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met và vị trí 405 của HC2 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Phe.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, vị trí 405 của HC1 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Phe và vị trí 409 của HC2 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, vị trí 409 của HC1 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met và vị trí 405 của HC2 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Phe, Arg hoặc Gly.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, vị trí 405 của HC1 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Phe, Arg hoặc Gly và vị trí 409 của HC2 CH3 có sự thay thế axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Phe ở vị trí 405 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có axit amin khác với Phe ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Phe ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Phe ở vị trí 405 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Phe ở vị trí 405 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có sự thay thế khác với Phe, Arg hoặc Gly ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có sự thay thế khác với Phe, Arg hoặc Gly ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Phe ở vị trí 405 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Phe ở vị trí 405 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Leu ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Leu ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Phe ở vị trí 405 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Phe ở vị trí 405 và Arg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có axit amin khác với Phe, Arg hoặc Gly ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Phe, aArg hoặc Gly ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Phe ở vị trí 405 và Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Phe ở vị trí 405 và Arg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Leu ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Leu ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Phe ở vị trí 405 và Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Phe ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Leu ở vị trí 405 và aArg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Leu ở vị trí 405 và aArg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Phe ở vị trí 405 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Lys ở vị trí 409, Thr ở vị trí 370 và Leu ở vị trí 405.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Lys ở vị trí 409, Thr ở vị trí 370 và Leu ở vị trí 405 và HC2 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Arg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Lys ở vị trí 409, Thr ở vị trí 370 và Leu ở vị trí 405.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Lys ở vị trí 409, Thr ở vị trí 370 và Leu ở vị trí 405 và HC2 CH3 có Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Lys ở vị trí 370, Phe ở vị trí 405 và aArg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Lys ở vị trí 409, Thr ở vị trí 370 và Leu ở vị trí 405.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Lys ở vị trí 409, Thr ở vị trí 370 và Leu ở vị trí 405 và HC2 CH3 có Lys ở vị trí 370, Phe ở vị trí 405 và aArg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có axit amin khác với Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser hoặc Thr ở vị trí 407.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser hoặc Thr ở vị trí 407 và HC2 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val hoặc Trp ở vị trí 407.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val hoặc Trp ở vị trí 407 và HC2 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, the HC1 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Gly, Leu, Met, Asn hoặc Trp ở vị trí 407.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Gly, Leu, Met, Asn hoặc Trp ở vị trí 407 và HC2 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có axit amin khác với Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser hoặc Thr ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser hoặc Thr ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 has Tyr ở vị trí 407 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Gly, Leu, Met, Asn hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Gly, Leu, Met, Asn hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và Arg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có axit amin khác với Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser hoặc Thr ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser hoặc Thr ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và Arg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và Arg ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Gly, Leu, Met, Asn hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Gly, Leu, Met, Asn hoặc Trp ở vị trí 407 và Lys ở vị trí 409 và HC2 CH3 có Tyr ở vị trí 407 và Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409, và HC2 CH3 có (i) một axit amin khác với Phe, Leu và Met ở vị trí 368, hoặc (ii) một Trp ở vị trí 370, hoặc (iii) một axit amin khác với Asp, Cys, Pro, Glu hoặc Gln ở vị trí 399.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có (i) một axit amin khác với Phe, Leu và Met ở vị trí 368, hoặc (ii) một Trp ở vị trí 370, hoặc (iii) một axit amin khác với Asp, Cys, Pro, Glu hoặc Gln ở vị trí 399 và HC2 CH3 có một axit amin khác với Lys, Leu hoặc Met ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Arg, Ala, His hoặc Gly ở vị trí 409, và HC2 CH3 có (i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile,

Asn, Arg, Ser, Thr, Val, hoặc Trp ở vị trí 368, hoặc (ii) Trp ở vị trí 370, hoặc (iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg hoặc Tyr ở vị trí 399.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có (i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, hoặc Trp ở vị trí 368, hoặc (ii) Trp ở vị trí 370, hoặc (iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg hoặc Tyr ở vị trí 399 and HC2 CH3 có Arg, Ala, His hoặc Gly ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có Arg ở vị trí 409, và HC2 CH3 có (i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, hoặc Trp ở vị trí 368, hoặc (ii) Trp ở vị trí 370, hoặc (iii) Phe, His, Lys, Arg hoặc Tyr ở vị trí 399.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 có (i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, hoặc Trp ở vị trí 368, hoặc (ii) Trp ở vị trí 370, hoặc (iii) Phe, His, Lys, Arg hoặc Tyr ở vị trí 399 và HC2 CH3 có Arg ở vị trí 409.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc sự thay thế F405L và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc sự thay thế F405L, trong đó số gốc theo chỉ số EU.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, HC1 CH3 bao gồm sự thay thế F405L và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R.

Các sự thay thế thông thường được thực hiện ở mức độ ADN với phân tử như miền cố định của kháng thể bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm VH1 và VL1, trong đó

VH1 bao gồm vùng xác định tính bổ khuyết chuỗi nặng (HCDR) 1 (HCDR1), HCDR 2 (HCDR2) và các trình tự axit amin của HCDR 3 (HCDR3) lần lượt có các SEQ ID SỐ: 210, 211 và 212; và

VL1 bao gồm vùng xác định tính bổ khuyết chuỗi nhẹ (LCDR) 1 (LCDR1), LCDR 2 (LCDR2) và các trình tự axit amin của LCDR 3 (LCDR3) lần lượt có các SEQ ID SỐ: 213, 214 và 215.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm VH2 và VL2, trong đó

VH2 bao gồm các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2, và HCDR3 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 216, 217 và 218; và

VL2 bao gồm các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 219, 220 và 221.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm các trình tự axit amin của VH1, VL1, VH2 và VL2 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 189, 190, 193 và 194.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm các trình tự axit amin của HC1, LC1, HC2 và LC2 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 199, 200, 201 và 202, tùy chọn có lyzin đầu C được loại bỏ khỏi HC1, HC2, hoặc cả hai HC1 và HC2.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm VH1 và VL1, trong đó

VH1 bao gồm các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2, và HCDR3 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 222, 223 và 224; và

VL1 bao gồm các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 225, 226 và 227.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm VH2 và VL2, trong đó

VH2 bao gồm các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2, và HCDR3 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 228, 229 và 230; và

VL2 bao gồm các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 231, 232 và 233.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm các trình tự axit amin của VH1, VL1, VH2 và VL2 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 191, 192, 195 và 196.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm các trình tự axit amin của HC1, LC1, HC2 và LC2 lần lượt có các SEQ ID SỐ: 234, 235, 236 và 237, tùy chọn có lyzin đầu C được loại bỏ khỏi HC1, HC2, hoặc cả hai HC1 và HC2.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép có thể phong bế EGF gắn kết với EGFR và HGF gắn kết với c-Met có trị số IC_{50} là nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-9}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-10}$ M, nhỏ hơn khoảng $1x10^{-11}$ M, hoặc nhỏ hơn khoảng $1x10^{-12}$ M trong thử nghiệm

cạnh tranh dùng các miền ngoại bào ở người EGFR tái tổ hợp hoặc c-Met ở người tái tổ hợp được phủ lên các đĩa và được ủ có hoặc không có các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế. Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này có thể phong bế gắn kết EGF với EGFR và gắn kết 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 so với gắn kết của EGF với EGFR và HGF gắn kết với c-Met mà không có các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bằng cách sử dụng cùng các điều kiện thử nghiệm.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm HC1, LC1, HC2 và LC2, trong đó HC1, LC1, HC2 và LC2 được mã hóa bởi polynucleotit tổng hợp bao gồm trình tự lần lượt có các SEQ ID SỐ: 205, 206, 207 và 208.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này, như dùng CH3 thiết kế và tạo ra các kháng thể bằng cách sử dụng sự trao đổi nhánh Fab *in vitro*. Ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra từ hai kháng thể đặc hiệu đơn bằng cách kết hợp khoảng từ 1 đến 20 mg/mL mỗi kháng thể ở tỷ lệ mol 1:1 trong PBS ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4 trong dung dịch đệm có nồng độ cuối là 75 mM 2-mercaptoethanolamine (2-MEA), ủ trong khoảng từ 2 đến 6 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 37°C, sau đó là loại bỏ 2-MEA thông qua việc thẩm tách, pha loãng, lọc dòng chảy tiếp tuyến, và lọc tế bào được xoay. Sản lượng kháng thể đặc hiệu kép có thể lớn hơn khoảng 80%, lớn hơn khoảng 90%, lớn hơn khoảng 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%.

Một số phương án được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến các phương pháp tạo ra kháng thể được phân lập EGFR/c-Met đặc hiệu kép, bao gồm:

kết hợp kháng thể kháng EGFR hóa trị hai đặc hiệu đơn được phân lập bao gồm hai chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 199 và hai chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 200 và kháng thể kháng c-Met hóa trị hai đặc hiệu đơn được phân lập bao gồm hai chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 201 và hai chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 202 trong hỗn hợp có tỷ lệ mol khoảng 1:1;

đưa chất khử vào hỗn hợp;

ủ hỗn hợp khoảng thời gian chín mươi phút đến sáu giờ;

loại bỏ chất khử; và

tinh chế kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép mà bao gồm chuỗi nặng thứ nhất có SEQ ID SỐ: 199 và chuỗi nặng thứ hai có SEQ ID SỐ: 201, chuỗi nhẹ thứ nhất có SEQ ID SỐ: 200 và chuỗi nhẹ thứ hai có SEQ ID SỐ: 202, trong đó chuỗi nặng thứ nhất có SEQ ID SỐ: 199 ghép cặp với chuỗi nhẹ thứ nhất có SEQ ID SỐ: 200 để tạo thành the miền gắn kết thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR, và chuỗi nặng thứ hai có SEQ ID SỐ: 201 ghép cặp với chuỗi nhẹ thứ hai có SEQ ID SỐ: 202 để tạo thành miền gắn kết thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, chất khử là 2-mercaptoetanolamin (2-MEA).

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, 2-MEA có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 25 mM đến 75 mM.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, bước ủ được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25° C đến 37°C.

Một số phương án được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến kháng thể EGFR/-c-Met đặc hiệu kép được phân lập bao gồm một HC1, một LC1, một HC2 và một LC2, trong đó HC1 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 199, LC1 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 200, HC2 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 201, và LC2 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 202, trong đó HC1, LC1, HC2 và/hoặc LC2 còn bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 các sự thay thế axit amin bảo tồn.

Một số phương án được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến kháng thể EGFR/-c-Met đặc hiệu kép được phân lập bao gồm HC1, LC1, HC2 và LC2, trong đó HC1 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 234, LC1 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 235, HC2 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 236, và LC2 bao gồm trình tự có SEQ ID SỐ: 237, trong đó HC1, LC1, HC2 và/hoặc LC2 còn bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 các sự thay thế axit amin bảo tồn.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép mà các trình tự axit amin của HC1, LC1, HC2 và LC2 ít khác với các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này nằm trong phạm vi theo sáng chế. Thông thường, điều này gồm một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo tồn với axit amin có sự tích điện tương tự, các đặc trưng hóa học kỵ nước, hoặc lập thể ở các vị trí gắn kết kháng nguyên hoặc trong các khung mà không các đặc tính của kháng thể thay đổi bất lợi. Các sự thay thế bảo tồn có thể cũng được thực hiện để cải thiện các

đặc tính kháng thể, ví dụ tính ổn định hoặc ái lực. Các sự thay thế 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 axit amin ví dụ có thể được thực hiện với VH1, VL1, VH2 và/hoặc VL2. Ví dụ, một "sự thay thế axit amin bảo tồn" có thể gồm một sự thay thế của gốc axit amin tự nhiên với gốc không tự nhiên sao cho có rất ít hoặc không có tác dụng về tính phân cực hoặc tích điện của gốc axit amin ở vị trí đó. Hơn nữa, bất kỳ gốc tự nhiên nào trong polypeptit có thể cũng được thay thế bằng alanin, như đã được mô tả trước đó đối với *alanin gây đột biến* trượt (MacLennan *và các đồng tác giả,* Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67, 1998; Sasaki *và các đồng tác giả,* Adv Biophys 35:1-24, 1998). Các sự thay thế axit amin mong muốn có thể được xác định bởi các chuyên gia trong lĩnh vức kỹ thuật chuyên ngành tại thời điểm các sự thay thế này được mong muốn. Ví dụ, các sự thay thế axit amin có thể được sử dụng để nhận dạng các gốc quan trọng của trình tự phân tử, hoặc để làm tăng hoặc giảm ái lực của các phân tử được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ về các sự thay thế axit amin bảo tồn được mô tả *supra*.

Các sự thay thế axit amin có thể được thực hiện ví dụ bằng cách gây đột biến PCR (Patent Mỹ Số. 4,683,195). Các thư viện của các biến thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, ví dụ bằng cách sử dụng các codon ngẫu nhiên (NNK) hoặc không ngẫu nhiên, ví dụ các codon DVK, mà mã hóa 11 axit amin (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp) và sàng lọc các thư viện cho các biến thể với các đặc tính mong muốn.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, các sự thay thế axit amin có thể được thực hiện với vùng cố định của kháng thể. Ví dụ alotyp IgG1 khác nhau có thể được sử dụng trong các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế, như alotyp G1m17, alotyp G1m3 hoặc alotyp G1m1 đã biết, hoặc hoặc sự kết hợp của chúng.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, các đặc tính dược động học của các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép có thể được tăng cường bởi các sự thay thế trong miền Fc mà điều chỉnh chu kỳ bán hủy kháng thể. Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm sự thay thế M252Y/S254T/T256E trong HC1 và/hoặc HC2, trong đó số gốc theo chỉ số EU. Các sự thay thế M252Y/S254T/T256E đã được thể hiện để làm tăng chu kỳ bán hủy kháng thể (Dall'Acqua *và các đồng tác giả,* J Biol Chem 281:23514–24, 2006).

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép có các sự thay thế bảo tồn và/hoặc các sự thay thế bổ sung trong vùng Fc của chúng được kiểm tra đối với các đặc trưng của chúng bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, các đặc tính cơ quan tác động miễn dịch của các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép có thể được tăng cường hoặc bị làm câm thông qua các cải biến Fc bằng các kỹ thuật đã biết với các chuyên gia trong lĩnh vực chuyên ngành. Ví dụ, các chức năng cơ quan tác động Fc như gắn kết C1q, gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), sự giảm điều tiết của các thụ thể ở bề mặt tế bào (ví dụ, tế bào thụ thể B; BCR), v.v... có thể được tạo ra và/hoặc được đối chứng bằng các gốc cải biến trong Fc gây ra cho các hoạt tính này.

"Sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" hoặc "ADCC" dùng để chỉ phản ứng qua trung gian tế bào trong đó các tế bào gây độc tế bào không đặc hiệu mà t biểu hiện các thụ thể Fc (FcRs) (ví dụ. các tế bào Tiêu diệt Tự nhiên (NK-Natural Killer), các bạch cầu trung tính, và các đại thực bào) nhận diện gắn kết kháng thể vào tế bào đích và sau đó gây ra sự ly giải các tế bào đích.

Khả năng của các kháng thể đơn dòng để cảm ứng ADCC có thể được tăng cường bằng cách thiết kế thành phần oligosacarit của chúng. IgG1 hoặc IgG3 ở người có N-glycosylat hóa ở Asn297 có phần lớn các glycan trong các dạng G0, G0F, G1, G1F, G2 hoặc G2F nhánh kép đã biết. Các kháng thể được tạo ra bằng các tế bào CHO không được thiết kế thông thường có hàm lượng fucoza trong glycan ít nhất là khoảng 85%. Việc loại bỏ lõi fucoza khỏi các oligosacarit loại phức hợp nhánh kép được gắn vào các vùng Fc làm tăng cường ADCC của các kháng thể thông qua gắn kết FcγRIIIa được cải thiện mà không thay đổi sự gắn kết kháng nguyên hoặc hoạt tính CDC. Các mAb này có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã được báo cáo dẫn đến sự biểu hiện của các kháng thể defucosylat hóa tương đối cao thành công mang loại phức hợp nhánh kép của các oligosacarit Fc như sự kiểm soát độ thẩm thấu nuôi cấy (Konno *và các đồng tác giả*, Cytotechnology 64(:249-65, 2012), ứng dụng dòng Lec13 của CHO biến thể như dòng tế bào chủ (Shields và các đồng tác giả, J Biol Chem 277:26733-26740, 2002), ứng dụng dòng EB66 của CHO biến thể như dòng tế bào chủ (Olivier và các đồng tác giả, MAbs ;2(4), 2010; Epub ahead of print; PMID:20562582),

ứng dụng dòng tế bào YB2/0 dạng tế bào lai ở chuột như dòng tế bào chủ (Shinkawa *và các đồng tác giả*, J Biol Chem 278:3466-3473, 2003), đưa ARN xen vào lượng nhỏ đặc hiệu đối với gen α 1,6-fucosyltrasferaza (FUT8) (Mori *và các đồng tác giả*, Biotechnol Bioeng88:901-908, 2004), hoặc sự đồng biểu hiệncủa β-1, 4-N-axetylglucosaminyltransferaza III và Golgi α-mannosidaza II hoặc chất ức chế lpha-mannosidase I hiệu nghiệm, kifunensin (Ferrara *và các đồng tác giả*, J Biol Chem281:5032-5036, 2006, Ferrara *và các đồng tác giả*, Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou *và các đồng tác giả*, Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, ADCC được suy ra bởi các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép có thể cũng được tăng cường bằng các sự thay thế nhất định trong kháng thể Fc. Ví dụ về các sự thay thế là ví dụ về các sự thay thế ở các vị trí axit amin 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 hoặc 430 (gốc đánh số theo chỉ số EU) như được mô tả trong Patent Mỹ Số. US6737056.

Theo một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có cấu trúc glycan nhánh kép với hàm lượng fucoza nằm giữa khoảng từ 1% đến 15%, ví dụ 15%, 14%, 13%, 12%, 11% 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1%. Theo một số phương án, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép có cấu trúc glycan với hàm lượng fucoza là khoảng 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, hoặc 20%.

"Hàm lượng fucoza" được hiểu là lượng fucoza monosacarit trong chuỗi đường ở Asn297. Lượng fucoza tương đối là tỷ lệ phần trăm của các cấu trúc chứa fucoza liên quan đến tất cả các cấu trúc glycol. Những điều này có thể có đặc trưng và được định lượng bằng nhiều phương pháp, ví dụ: 1) bằng cách sử dụng MALDI-TOF của mẫu được xử lý N-glycosidaza F (ví dụ, các cấu trúc phức hợp, dạng lai và oligo- và mannoza cao) như được mô tả trong Công bố Paten Số. WO2008/077546 2); 2) bằng cách giải phóng enxymatic của các glycan Asn297 với dẫn xuất tiếp theo và việc xóa/ định lượng bằng HPLC (UPLC) với sự phát hiện huỳnh quang và/hoặc HPLC-MS (UPLC-MS); 3) sự phân tích các protein nguyên vẹn của mAb tự nhiên hoặc được làm giảm, có hoặc không xử lý các glycan Asn297 với Endo S hoặc enzym khác mà tách giữa các monosacarit GlcNAc thứ nhất và thứ hai, cho phép fucoza được gắn với GlcNAc thứ nhất; 4) phân cắt mAb để cấu thành các peptit bằng enzym phân cắt (ví dụ, trypsin hoặc Lys-C endopeptidaza), và tiếp theo tách, xóa và định lượng bằng HPLC-MS (UPLC-

MS); 5) Việc tách các oligosacarit mAb ra khỏi protein mAb bằng sự deglycosylat hóa enzyme đặc hiệu với PNGase F ở Asn 297. Các oligosacarit do đó được giải phóng có thể được đánh dấu bằng chất huỳnh quang, được tách và được nhận dạng bằng cách các kỹ thuật bổ sung khác nhau mà cho phép: việc mô tả tốt của các cấu glycan bởi khối phổ ion hóa hấp thụ laser dạng ma trận (MALDI- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) bằng cách so với các khối lượng thực nghiệm với các khối lượng lý thuyết, xác định độ sialylat hóa bằng HPLC trao đổi ion (GlycoSep C), việc tách và định lượng các dạng oligosacarit theo tiêu chuẩn ưa nước bằng HPLC pha thường (GlycoSep N), và việc tách và định lượng các oligosacarit bởi huỳnh quang cảm ứng điện di laze mao mạch hiệu năng cao (HPCE-LIF- High Performance Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence).

Như được sử dụng trong ứng dụng, "fucoza thấp " hoặc " hàm lượng fucoza thấp" dùng để chỉ các kháng thể có hàm lượng fucoza nằm giữa khoảng từ 1% đến 15%.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "fucoza bình thường" hoặc 'hàm lượng fucoza bình thường" dùng để chỉ các kháng thể có hàm lượng fucoza là khoảng hơn 50%, thông thường khoảng hơn 80% hoặc hơn 85%.

Một số phương án theo sáng chế đề xuất axit nucleic tổng hợp mã hóa các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của các kháng thể gắn kết EGFR/ c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này như các polynucleotit được phân lập hoặc như các phần của các vectơ biểu hiện hoặc hoặc như các phần của các trình tự ADN thẳng, bao gồm các trình tự ADN thẳng được sử dụng cho sự phiên mã/dịch mã *in vitro*, các vectơ tương hợp với prokaryotic eukaryotic hoặc dạng sợi, biểu hiện thể thực khuẩn, sự bài tiết và/hoặc sự biểu hiện của các thành phần hoặc các chất gây đột biến định hướng của nó.

Một số phương án theo sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự polynucleotit có các SEQ ID SỐ: 205, 206, 207 hoặc 208.

Polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học như tổng hợp polynucleotit pha rắn vào bộ tổng hợp polynucleotit tự động và được ghép vào hoàn toàn các phân tử sợi kép hoặc đơn. Ngoài ra, polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác như PCR tiếp theo tách dòng theo quy trình. Các kỹ thuật để tạo ra hoặc thu được polynucleotit của các trình tự đã biết quy định là đã biết trong kỹ thuật chuyên ngành.

Polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một trình tự không mã hóa, như trình tự vùng khởi đầu hoặc vùng tăng cường, vùng nội, tín hiệu polyadenyl hóa, trình tự *cis* tạo điều kiện thuận lợi gắn kết RepA, và các dạng tương tự. Các trình tự polynucleotit có thể cũng bao gồm các trình tự bổ sung mã hóa các axit amin bổ sung mà mã hóa ví dụ chất đánh dấu hoặc trình tự đánh dấu như đánh dấu Histidine hoặc có thể đánh dấu HA để tạo thuận lợi tinh chế hoặc phát hiện protein, trình tự tín hiệu, thành phần dung hợp protein như RepA, Fc hoặc protein vỏ thể thực khuẩn như pIX hoặc pIII.

Một số phương án được mô tả trong bản mô tả này đề xuất vectơ bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Các vectơ này có thể là các vectơ plasmit, các vectơ virut, các vectơ cho biểu hiện baculovirut, các vectơ dựa trên hoặc bất kỳ vectơ khác thích hợp để đưa polynucleotit theo sáng chế vào sinh vật hoặc nền tảng di truyền quy định bằng bất kỳ phương tiện nào. Ví dụ, polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được chèn vào các vectơ biểu hiện. Chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được tách dòng trong cùng các vectơ biểu hiện hoặc khác nhau. Các chuỗi globulin miễn dịch mã hóa các đoạn ADN có thể thực hiện được liên kết để đối chứng các trình tự trong vectơ (các vectơ) biểu hiện mà đảm bảo biểu hiện polypeptit của các globulin miễn dịch. Các trình tự đối chứng này bao gồm các trình tự tín hiệu, các vùng khởi đầu (ví dụ, các vùng khởi đầu khác dạng hoặc được ghép tự nhiên), các yếu tố tăng cường, và các trình tự kết thúc phiên mã, và có thể được chọn lọc để tương hợp với tế bào chủ được chọn lọc để biểu hiện kháng thể. Khi vectơ đã gắn vào vật chủ phù hợp, vật chủ có thể được duy trì trong các điều kiện thích hợp đối với mức độ biểu hiện cao của các protein được mã hóa bằng các polynucleotit tổng hợp được gắn.

Các vectơ biểu hiện thích hợp thường có thể được sao chép trong các sinh vật chủ một trong hai là episome hoặc là một phần trong toàn bộ của nhiễm sắc thể của vật chủ ADN. Thông thường, các vectơ biểu hiện chứa chất đánh dấu lựa chọn như đề kháng ampixillin, đề kháng hygromyxin, đề kháng tetraxyclin, đề kháng kanamyxin hoặc đề kháng neomyxin để cho phép phát hiển các tế bào bị biến đổi có các trình tự ADN mong muốn.

Một số phương án được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến tế bào chủ bao gồm vectơ theo sáng chế. Thuật ngữ "tế bào chủ" dùng để chỉ một tế bào vào mà một vectơ được đưa vào. Phải hiểu rằng thuật ngữ tế bào chủ không chỉ dùng để chỉ tế bào vật chủ cụ thể mà còn thế hệ sau của tế bào này. Bởi vì các cải biến nhất định có thể xảy

ra trong các thế hệ kế tiếp hoặc do đột biến hoặc do các ảnh hưởng môi trường, các thế hệ con cháu này có thể không tương đồng với tế bào gốc, nhưng vẫn được đưa vào phạm vi thuật ngữ "tế bào chủ" như được sử dụng trong bản mô tả này. Các tế bào chủ này có thể là các tế bào eukaryotic, các tế bào prokaryotic, các tế bào thực vật hoặc các tế bào archeal.

Ví dụ về các tế bào eukaryotic có thể là động vật có vú, côn trùng, loài chim hoặc các nguồn gốc động vật khác. Các tế bào eukaryotic của động vật có vú bao gồm các dòng tế bào bất tử như các dạng tế bào lai hoặc các dòng tế bào u tủy như SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) và Ag653 (ATCC CRL-1580) ở các dòng tế bào chuột. Ví dụ về dòng tế bào u tủy ở người là U266 (ATTC CRL-TIB-196). Các dòng tế bào hữu ích khác bao gồm các dòng tế bào được dẫn xuất từ các tế bào Chinese Hamster Ovary (CHO) như CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) hoặc DG44.

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

Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR, các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sử dụng chẩn đoán, theo dõi, điều chỉnh, điều trị, làm giảm bớt, giúp ngăn ngừa tỷ lệ mắc, hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh ở người hoặc đặc hiệu các bệnh lý trong các tế bào, các mô, các cơ quan, chất lỏng, hoặc, nói chung là vật chủ. Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh động vật thuộc bất kỳ phân lớp nào. Các ví dụ về các động vật này bao gồm các động vật có vú như con người, các loài gặm nhấm, chó, mèo và các động vật nuôi trong nhà/trang trại.

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

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế là phương pháp để ức chế sự tăng trưởng hoặc di căn của khối u biểu hiện EGFR và/hoặc c-Met hoặc các tế bào ung thư trong đối tượng

bao gồm dùng cho đối tượng lượng phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập hữu hiệu, miền FN3 gắn kết EGFR, miền FN3 gắn kết c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế sao cho sự tăng trưởng hoặc di căn của khối u biểu hiện EGFR- và/hoặc c-Met hoặc tế bào ung thư tế bào bị ức chế.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế là phương pháp về điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập hữu hiệu, the Miền FN3 gắn kết EGFR về mặt liệu pháp, miền FN3 gắn kết c-Met hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế cho bệnh nhân trong nhu cầu của nó đủ thời gian để điều trị ung thư.

Phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, miền FN3 gắn kết EGFR, miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bất kỳ bệnh hoặc sự rối loạn được đặc trưng bởi hoạt tính bất thường hoặc sự tạo ra EGFR, c-Met, EGF, EGFR hòa tan được, c-Met hoặc phối tử EGFR hoặc HGF khác, hoặc rối loạn liên quan đến biểu hiện EGFR hoặc c-Met, mà có thể hoặc không thể gồm bệnh ác tính hoặc ung thư, nơi mà hoạt tính bất thường và/hoặc sự tạo ra EGFR, c-Met, EGF hoặc phối tử EGFR khác, hoặc HGF xuất hiện trong các tế bào hoặc các mô của đối tượng có, hoặc dễ mắc phải bệnh hoặc sự rối loạn này.

Các miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu c-Met và phong bế gắn kết của HGF với c-Met theo sáng chế có thể điều trị các khối u, bao gồm cả các bệnh ung thư và các khối u lành tính. Các bệnh ung thư này tuân theo việc điều trị bằng các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế bao gồm những miền biểu hiện quá mức c-Met. Ví dụ về các bệnh ung thư mà tuân theo việc điều trị bằng các miền FN3 theo sáng chế bao gồm các ung thư biểu mô tế bào, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bờ viền hậu môn, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư đầu và cổ, ung thư dạ dày, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư da, 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 tuyến ức.

Các miền FN3 mà gắn kết đặc hiệu EGFR và phong bế 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 tuân theo việc điều trị bằng các miền FN3 theo sáng chế bao gồm các miền mà biểu hiện quá mức EGFR hoặc các biến thể. Ví dụ về các bệnh ung thư mà tuân theo điều trị bằng các miền FN3 theo sáng chế bao

gồm các ung thư biểu mô tế bào, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bờ viền hậu môn, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư đầu và cổ, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư da, 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 tuyến ức. Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các khối u, baogồm các bệnh ung thư và các khối u lành tính. Ví dụ về các bệnh ung thư mà tuân theo việc điều trị bằng phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép hoặc kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm những miền biểu hiện quá mức EGFR và/hoặc c-Met, các bệnh ung thư được kết hợp với hoạt tính EGFR và/hoặc các mức độ biểu hiện được nâng cao (như, ví dụ, đột biến hoạt hóa EGFR, khuếch đại gen EGFR, hoặc hoạt tính EGFR qua trung gian phối tử) và hoạt tính c-Met được nâng cao và/hoặc các mức độ biểu hiện (như, ví dụ, đột biến hoạt hóa c-Met, khuếch đại gen c-Met, hoặc hoạt tính c-Met qua trung gian HGF).

Ví dụ về các đột biến hoạt hóa EGFR that có thể được kết hợp với ung thư bao gồm các đột biến điểm, các đột biến xóa, các đột biến chèn, các sự đảo ngược hoặc các sự khuếch đại gen mà dẫn đến làm tăng trong ít nhất một trong các hoạt tính sinh học của EGFR, như hoạt tính tyroxin kinaza được nâng cao, sự tạo thành của các thụ thể đồng lưỡng phân và dị lưỡng phân, sự gắn kết phối tử được tăng cường v.v... Các đột biến có thể được đặt ở bất kỳ phần nào của Gen EGFR hoặc vùng điều hòa được kết hợp với gen EGFR và bao gồm các đột biến trong vùng ngoại 18, 19, 20 hoặc 21 hoặc các đột biến trong miền kinaza. Ví dụ về các đột biến EGFR hoạt tính là các sự thay thế G719A, L861X (X là bất kỳ axit amin nào), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P hoặc T790M, sự xóa E746-A750, sự xóa 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 được biết đến trong lĩnh vực chuyên ngành (xem ví dụ, Công bố Patent Mỹ Số. US2005/0272083). Thông tin về các thụ thể EGFR và ErbB khác bao gồm thụ thể đồng lưỡng phân và dị lưỡng phân, các phối tử của thụ thể, các vị trí tự phosphoryl hóa, và các phân tử truyền tín hiệu gồm tín hiệu qua trung gian ErbB đã được biết đến trong lĩnh vực chuyên ngành (xem ví dụ, Hynes and Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341-354, 2005).

Ví dụ về các đột biến hoạt hóa c-Met bao gồm các đột biến điểm, các đột biến xóa, các đột biến chèn, các đảo ngược hoặc khuếch đại gen mà dẫn đến làm tăng ít nhất một hoạt tính sinh học của protein c-Met, như hoạt tính tyroxin kinaza được nâng cao, sự hình thành các thụ thể đồng lưỡng phân và các dị lưỡng phân, được tăng cường phối tử gắn kết v.v... Các sự đột biến có thể nằm trong bất kỳ một phần của gen c-Met hoặc các vùng điều hòa liên quan đến gen, như các đột biến trong miền kinaza của c-Met. Ví dụ về các đột biến hoạt hóa c-Met có các đột biến ở các vị trí gốc N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 và E168. Các phương pháp để phát hiện EGFR và đột biến c-Met hoặc các gen khuếch đại đã được biết đến.

Ví dụ về các bệnh ung thư mà tuân theo việc điều trị bằng các phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế như các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các ung thư biểu mô tế bào, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, không phải tế bảo nhỏ ung thư phổi (NSCLC- Non Small Cell Lung Cancer), ung thư mô tuyến phổi, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư đại trực tràng, ung thư bờ viền hậu môn, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư đầu và cổ, ung thư họng, ung thư mũi, ung thư tuyến tụy, ung thư da, ung thư miệng, ung thư lưỡi, 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 tuyến ức, ung thư ruột kết, ung thư tuyến giáp, ung thư gan (ung thư biểu mô tế bào gan (HCC-Hepatocellular Carcinoma)) hoặc ung thư biểu mô tế bào nhú thận di truyền hoặc ngẫu nhiên (PRCC- Papillary Renal Cell Carcinoma).

Khía cạnh khác theo sáng chế là phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép hữu hiệu được phân lập theo sáng chế về liệu pháp điều trị cho bệnh nhân có nhu cầu để đủ thời gian điều trị ung thư, trong đó đối tượng là các đồng hợp tử cho phenylalanin ở vị trí 158 của CD16 (kiểu gen FcγRIIIa-158F/F) hoặc các dị hợp tử cho valin và pheynylalanin ở vị trí 158 của CD16 (kiểu gen FcγRIIIa-158F/V). CD16 còn được gọi là thụ thể gamma IIIa của Fc (FcγRIIIa) hoặc thụ thể III-A của vùng Fc gamma globulin miễn dịch có ái lực nhỏ đồng dạng. Valin/phenylalanin (V/F) polymorpHism at FcγRIIIa protein gốc vị trí 158 has been shown to ảnh hưởng FcγRIIIa ái lực đối với IgG ở người. Thụ thể có FcγRIIIa-158F/F hoặc các đa hình FcγRIIIa-158F/V chứng tỏ sự tham gia của Fc bị giảm và do đó ADCC được giảm khi so với FcγRIIIa-158V/V. Sự thiết hụt hoặc lượng fucoza thấp trên các oligosacarit liên kết N ở người cải thiện khả năng của các kháng thể để cảm ứng

ADCC do gắn kết của các kháng thể với FcγRIIIa (CD16) ở người được cải thiện (Shields et al., J Biol Chem 277:26733-40, 2002). Các kháng thể theo sáng chế có hàm lượng fucoza được làm giảm nằm giữa khoảng từ 1% đến 10%. Theo một số phương án, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép có cấu trúc glycan với hàm lượng fucoza là khoảng 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1%. Do đó, các kháng thể theo sáng chế có thể hiệu nghiệm hơn trong việc điều trị bệnh nhân với các kiểu gen FcγRIIIa-158F/F hoặc FcγRIIIa-158F/V. Bệnh nhân có thể được phân tích đối với FcγRIIIa polymorpHism của chúngbằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

Theo một số phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư mà có sức đề kháng hoặc đã kháng lại để điều trị với một hoặc nhiều chất ức chế EGFR. Ví dụ về Các chất ức chế EGFR mà bệnh ung thư có thể có sức đề kháng là các kháng thể kháng EGFR cetuximab (Erbitux®), pantinumumab (Vectibix®), matuzumab, nimotuzumab, các chất ức chế EGFR phân tử nhỏ Tarceva® (erlotinib), IRESSA (gefitinib), EKB-569 (pelitinib, EGFR TKI không thể phục hồi), pan-ErbB và các chất ức chế tyrosin kinaza của thụ thể khác, lapatinib (EGFR và chất ức chế HER2), pelitinib (EGFR và chất ức chế HER2), vandetanib (ZD6474, ZACTIMA™, EGFR, VEGFR2 và RET TKI), PF00299804 (dacomitinib, pan-ErbB TKI không thể phục hồi) , CI-1033 (pan-erbB TKI không thể phục hồi), afatinib (BIBW2992, pan-ErbB TKI không thể phục hồi), AV-412 (EGFR kép và chất ức chế ErbB2), EXEL-7647 (EGFR, ErbB2, GEVGR và chất ức chế EphB4), CO-1686 (đột biến có chọn lọc EGFR TKI không thể phục hồi), AZD9291 (đột biến có chọn lọc EGFR TKI không thể phục hồi), và HKI-272 (neratinib, chất ức chế EGFR/ErbB2 không thể phục hồi). Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị ung thư mà có sức đề kháng để điều trị với gefitinib, erlotinib, afatinib, CO-1686, AZD9291 và/hoặc cetuximab. Ví dụ về kháng thể có thể được sử dụng là EM1-mAb.

Khía cạnh khác theo sáng chế là phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập hữu hiệu theo sáng chế về liệu pháp điều trị cho bệnh nhân có nhu cầu để đủ thời gian điều trị ung thư, trong đó đối tượng có sức đề kháng hoặc có được sức đề kháng để điều trị với erlotinib, gefitinib, afatinib, CO-1686, AZD9291 hoặc cetuximab.

Các phương pháp định tính và/hoặc định lượng khác nhau có thể được sử dụng để xác định nếu đối tượng có sức đề kháng, đã được phát triển hoặc dễ phát triển sức đề kháng để điều trị với chất ức chế EGFR. Các triệu chứng mà có thể được kết hợp với sức đề kháng đối với chất ức chế EGFR bao gồm, ví dụ, sự suy giảm hoặc ổn định của sức khỏe bệnh nhân, làm tăng kích thước khối u, được hãm lại hoặc làm chậm sự suy giảm về sự tăng trưởng của khối u, và/hoặc sự lan rộng của các tế bào ung thư trong cơ thể từ một vị trí tới các cơ quan, các mô hoặc các tế bào khác. Sự tái thiết lập hoặc xấu đi của các triệu chứng khác nhau liên quan đến ung thư với to các chất ức chế EGFR, như chán ăn, rối loạn chức năng nhận thức, trầm cảm, 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 liên quan đến bệnh ung thư có thể thay đổi theo loại ung thư. Ví dụ, các triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư cổ tử cung có thể bao gồm chảy máu bất thường, dịch tiết âm đạo nặng bất thường, đau vùng chậu mà không liên quan tới chu kỳ kinh nguyệt bình thường, đau bàng quang hoặc đau khi đi tiểu, và chảy máu giữa các kỳ kinh nguyệt thường xuyên, sau khi quan hệ tình dục, sự thụt rửa, hoặc khám phụ khoa. Các triệu chứng liên quan đến ung thư phổi có thể bao gồm ho dai dẳng, ho ra máu, thở dốc, đau ngực thở khò khè, chán ăn, sút cân ngoài sự mong muốn và mệt mỏi. Các triệu chứng đối với ung thư gan có thể bao gồm chán ăn và sút cânt, đau bụng, cụ thể ở phần trên bên phải của bụng mà có thể kéo dài sang lưng và vai, buồn nôn và ói mửa, thể trạng yếu ớt và mệt mỏi nói chung, gan lớn, sung bụng (cổ trướng), và đổi màu vàng ra và các tròng trắng của mắt (bệnh vàng da). Một chuyên gia về u bướu học có thể sẵn sàng nhận biết các triệu chứng liên quan đến loại ung thư cụ thể.

Được hiểu theo các nghĩa khác là xác định nếu đối tượng đã được phát triển sức đề kháng với chất ức chế EGFR bao gồm việc kiểm nghiệm sự phosphoryl hóa EGFR, sự phosphoryl hóa ERK1/2 và/hoặc sự phosphoryl hóa AKT trong các tế bào ung thư, nơi sự phosphoryl hóa được làm tăng có thể biểu thị rằng đối tượng đã được phát triển hoặc là dễ phát triển sức đề kháng với chất ức chế EGFR. Các phương pháp xác định sự phosphoryl hóa EGFR, ERK1/2 và/hoặc AKT đã được biết đến và được mô tả trong bản mô tả này. Việc nhận biết đối tượng đã được phát triển sức đề kháng với chất ức chế EGFR có thể gồm sự phát hiện các mức độ biểu hiện c-Met được nâng cao hoặc hoạt tính c-Met được nâng cao, ví dụ, phát sinh từ các mức độ được tăng của HGF luân chuyển, sự đột biến hoạt hóa của gen c-Met hoặc khuếch đại gen c-Met.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều trị NSCLC ở bệnh nhân có khối u NSCLC hoặc khối u di căn có đột biến EGFR hoạt hóa hoặc khuếch đại gen EGFR, bao gồm dùng cho bệnh nhân lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu hữu hiệu kép theo sáng chế về liệu pháp điều trị.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị ung thư phổi không phải tế bảo nhỏ (NSCLC), mà bao gồm ung thư biểu mô tế bào có vảy, ung thư biểu mô tuyến, và ung thư biểu mô tế bào lớn. Theo một số phương án, các tế bào của NSCLC có kiểu hình biểu mô. Theo một số phương án, NSCLC có sức đề kháng để điều trị với một hoặc nhiều chất ức chế EGFR.

Trong NSCLC, các đột biến đặc hiệu trong gen EGFR liên quan đến các tốc độ phản ứng cao (từ 70 đến 80%) với các chất ức chế tyrosin kinaza EGFR (EGFR- -TKIs). Việc xóa 5 axit amin trong vùng ngoại 19 hoặc đột biến điểm L858R trong EGFR liên quan đến độ nhạy EGFR-TKI (Nakata and Gotoh, Expert Opin Ther Targets 16 :771-781, 2012). Các đột biến này dẫn đến hoạt hóa tính hoạt tính kinaza EGFR phụ thuộc phối tử. Các đột biến EGFR xuất hiện ở 10 đến 30% bệnh nhân NSCLC và thường nhiều hơn đáng kể ở Đông Á, phụ nữ, những người không hút thuốc, và bệnh nhân mắc bệnh ung thư biểu mô tuyến về mô học (Janne and Johnson Clin Cancer Res 12(14 Suppl): 4416s-4420s, 2006). Sự khuếch đại gen EGFR cũng có tương quan mạnh mẽ đến 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 bệnh nhân NSCLC có các đột biến EGFR ban đầu đáp ứng với liệu pháp EGFR TKI, gần như tất cả có sức đề kháng mà ngăn chặn sự đáp ứng lâu bền. Khoảng 50 đến 60% bệnh nhân có sức đề kháng do đột biến điểm vị trí thứ hai trong miền kinaza của EGFR (T790M). Gần 60% tất cả các khối u mà có sức đề kháng với các chất ức chế tyrosin kinaza EGFR làm tăng biểu hiện c-Met, khuếch đại gen c-Met, hoặc làm tăng duy nhất phối tử đã biết của nó, HGF (Turke *và các đồng tác giả,* Cancer Cell, 17:77-88, 2010).

Các Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều trị ở bệnh nhân có bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép hữu hiệu theo sáng chế về liệu pháp điều trị cho bệnh nhân có nhu cầu để đủ thời gian điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư liên quan đến đột biến hoạt hóa EGFR, khuếch đại gen EGFR,

làm tăng các mức độ của HGF luân chuyển, đột biến hoạt hóa c-Met, khuếch đại gen c-Met hoặc thể đột biến KRAS.

Theo một số phương án, đột biến hoạt hóa EGFR là sự thay thế G719A, G719X (X là bất kỳ axit amin nào), L861X (X là bất kỳ axit amin nào), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P hoặc T790M, sự xóa E746-A750, sự xóa R748-P753, sự chèn của Ala (A) giữa M766 và A767, sự chèn cảu 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 đề xuất phương pháp điều trị ở bệnh nhân có bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép hữu hiệu theo sáng chế về liệu pháp điều trị cho bệnh nhân có nhu cầu để đủ thời gian điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư liên quan đến sự đột biến L858R, T790M hoặc sự xóa các gốc E746-A750 (del(E746, A750)), sự khuếch đại EGFR hoặc khuếch đại c-Met của EGFR.

Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến EGFR loại dại và c-Met loại dại.

Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến loại dại EGFR và sự khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến các đột biến L858R và T790M của EGFR và c-Met loại dại.

Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến sự xóa del (E764, A750) của EGFR và c-Met loại dại.

Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến sự xóa del(E764, A750) của EGFR và khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến sự xóa del(E764, A750) của EGFR, sự khuếch đại EGFR và khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân có NSCLC liên quan đến các đột biến L858R và T790M của EGFR và c-Met loại dại.

Theo một số phương án, bệnh nhân có NSCLC liên quan đến sự khuếch đại EGFR và c-Met loại dại.

Theo một số phương án, bệnh nhân có NSCLC liên quan đến sự khuếch đại EGFR và khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân có NSCLC liên quan đến sự xóa del(E764, A750) của EGFR và c-Met loại dại.

Theo một số phương án, bệnh nhân có NSCLC liên quan đến sự xóa del(E764, A750) của EGFR và khuếch đại c-Met.

Theo một số phương án, bệnh nhân được điều trị với EM1-mAb theo sáng chế. EM1-mAb theo sáng chế thể hiệntính hiệu quả trong *in vivo* các mô hình động vật có khối u, khi các khối u liên quan đến L858R, T790M, del(E746, A750) EGFR, sự khuếch đại EGFR, c-Met loại dại và/hoặc khuếch đại c-Met. Sự khuếch đại của EGFR hoặc c-Met có thể được đánh giá bằng các phương pháp tiêu chuẩn, ví dụ bằng cách xác định số lượng bản sao của gen EGFR hoặc c-Met bởi southern blotting, FISH, hoặc so sánh lai gen (CGH- Comparative Genomic Hybridization).

Một số Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh ung thư, bao gồm việc dùng lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép hữu hiệu theo sáng chế về liệu pháp điều trị cho bệnh nhân có nhu cầu để đủ thời gian để điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư liên quan đến các đột biến L858R, T790M hoặc sự xóa gốc E746-A750 (del(E746, A750)) của EGFR, sự khuếch đại EGFR hoặc khuếch đại c-Met, và thể đột biến KRAS.

Theo một số phương án, thể đột biến KRAS có sự thay thế G12V. KRAS thuộc họ các gen tiền ung thư RAS mã hóa các triphotphataza guanosin (GTPases- Guanosine Triphosphatases), và làm trung gian truyền tín hiệu EGFR xuôi dòng của thụ thể. Các khối u có các đột biến gen tiền ung thư KRAS như đột biến G12V hoặc G12C hoạt hóa do đó sẽ không được mong đợi có thể điều trị bằng các kháng thể EGFR. Các nghiên cứu lâm sàng với các kháng thể kháng EGFR cetuximab hoặc panitumumab đã chứng minh rằng ở các bệnh nhân có các khối u đại trực tràng bị đột biến KRAS không đáp ứng các chất này (Van Cutsem *và các đồng tác giả*, N Eng J Med 360:1408-1417, 2009; Lievre *và các đồng tác giả*, J Clin Oncol 26:374-379, 2008; Amado *và các đồng tác giả*, J Clin Oncol 26:1626-1634m 2008). Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế làm trung gian tiêu diệt dòng tế bào có đột biến KRAS thông qua ADCC hữu hiệu, và do đó, ngược lại với các liệu pháp kháng EGFR hiện tại, có thể có hiệu nghiệm trong việc điều trị các bệnh nhân mà mắc bệnh ung thư liên quan đến các đột biến hoạt hóa KRAS. Ví dụ về kháng thể này là EM1-mAb.

Các thuật ngữ "điều trị" hoặc "sự điều trị" dùng để chỉ cả việc điều trị liệu pháp điều trị và các biện pháp dự phòng và phòng ngừa, trong đó đối tượng được ngăn ngươà hoặc làm chậm (làm giảm) sự thay đổi hoặc rối loạn sinh lý không mong muốn, như sự phát triển hoặc sự lan rộng của bệnh ung thư. Đối với các mục đích theo sáng chế này, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không bị giới hạn, làm giảm các triệu chứng, giảm bớt sự kéo dài bệnh, tình trạng bệnh ổn định (tức là, không xấu đi), trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, sự cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và sự thuyên giảm (một phần hay là toàn bộ), có phát hiện được hoặc không phát hiện được. Việc "điều trị" có thể cũng được hiểu là kéo dài sự sống so với sự sống được dự kiến nếu không nhận sự điều trị. Những bệnh nhân cần điều trị bao gồm những bệnh nhân đã mắc tình trạng hoặc bị loạn cũng như những bệnh nhân dễ mắc tình trạng hoặc bị rối loạn hoặc những bệnh nhân mà trong đó tình trạng hoặc sự rối loạn được ngăn chặn.

Một "lượng hữu hiệu điều trị" dùng để chỉ một lượng hữu hiệu, ở các liều lượng và khoảng thời gian cần thiết, để đạt kết quả liệu pháp điều trị mong muốn. Lượng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép hữu hiệu về mặt liệu pháp điều trị theo sáng chế có thể biến đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, trọng lượng của từng cá thể, và khả năng của kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế để suy ra sự đáp ứng mong muốn ở từng cá thể. Ví dụ về các chất chỉ dẫn của liệu pháp điều trị EGFR/c-Met hữu hiệu mà có thể làm suy giảm hoặc dịu bớt liên quan đến sức đề kháng bao gồm, ví dụ, sức khỏe bệnh nhân được cải thiện, sự làm giảm hoặc sự co lại của kích thước khối u, hãm lại hoặc làm chậm sự phát triển của khối u, và/hoặc không có sự di căn của các tế bào ung thư đến các vị trí khác trong cơ thể.

Cách sử dụng/ các dược phẩm

Sáng chế đề xuất cho các dược phẩm bao gồm kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế và chất mang dược dụng. Đối với việc sử dụng liệu pháp điều trị, các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR, các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được điều chế làm các dược phẩm chứa lượng miền, phân tử hoặc kháng thể hữu hiệu làm thành phần hoạt động trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang" dùng để chỉ chất pha loãng, chất phụ, tá dược, hoặc chất dẫn thuốc mà hợp chất hoạt động được dùng. Các chất dẫn thuốc này trong các dược khoa có thể là các chất lỏng,

như nước hoặc các loại dầu, bao gồm trong đó có nguồn gốc từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc được tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, dầu vừng và các loại dầu tương tự. Ví dụ, nước muối 0,4% và glyxin 0,3% có thể được sử dụng. Các dung dịch này là vô trùng và thông thường không có vật chất dạng hạt. Chúng có thể được tiệt trùng bằng cách thông thường, các kỹ thuật tiệt trùng đã biết (ví dụ, phương pháp lọc). Các thành phần có thể chứa các cơ chất phụ mang dược dụng theo yêu cầu gần với các điều kiện sinh lý như các chất đệm và điều chỉnh độ pH, các chất làm ổn định, làm cô đặc, làm bôi trơn hoặc tạo màu v.v... Nồng độ của các phân tử hoặc các kháng thể theo sáng chế trong công thức dược này có thể biến đổi rộng rãi, tức là, từ nhỏ hơn khoảng 0,5%, thường ít nhất là khoảng 1% đến lớn bằng 15 hoặc 20% theo trọng lượng và sẽ được chọn lọc chủ yếu dựa trên liều lượng yêu cầu, các thể tích chất lỏng, các độ nhớt, v.v…, theo mô hình của thể của các dùng được lựa chọn. Chất dẫn thuốc thích hợp trong các dược khoa và các công thức, gồm cả các protein khác ở người, ví dụ, albumin huyết thanh ở người, được mô tả, ví dụ, trong ví dụ như Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, See especitall pp. 958-989.

Chế độ dùng về liệu pháp điều trị sử dụng các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR, các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể có bất kỳ lộ trình thích hợp nào mà truyền hóa chất tới vật chủ, như dùng qua đường ngoài ruột, ví dụ như, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch hoặc dưới da, phôi, chuyển niêm mạc (miệng, trong mũi, trong âm đạo, trực tràng), bằng cách sử dụng công thức theo dạng viên, viên nang, dung dịch, bột, gel, hạt; và được chứa trong một ống tiệm, thiết bị cấy ghép, bơm thẩm thấu, hộp, bơm nhỏ; hoặc các phương tiện khác được đánh giá cao bởi chuyên gia, như đã được biết trong lĩnh vực chuyên ngành. Việc dùng ở điểm chuyên biệt có thể đạt được bằng cách ví dụ trong khớp, cuống phổi, trong bụng, trong nang, trong sụn, trong khoang, trong khoang cơ thể, trong tiểu não, trong não thất, trong kết tràng, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong tâm vị, trong xương, trong chậu hông, trong tĩnh mạch màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong cột sống, trong

bao hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong mạch, trong bang quang, trong bướu, âm đạo, trực tràng, má, dưới lưỡi, trong mũi, hoặc thẩm thấu qua da.

Do đó, dược phẩm theo sáng chế để tiêm vào trong cơ có thể được điều chế để chứa 1 ml nước đệm vô trùng, và nằm giữa khoảng từ 1 ng đến 100 mg/kg, ví dụ, nằm trong khoảng từ 50 ng đến 30 mg/kg hoặc tốt hơn là, nằm trong khoảng 5 mg đến 25 mg/kg, của các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc các miền FN3 gắn kết c-Met theo sáng chế.

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được dùng được dùng qua đường ngoài ruột cho bệnh nhân bằng bất kỳ lộ trình thích hợp nào, ví dụ bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch (IV) hoặc tiêm nhanh một liều thuốc, tiêm dưới bắp hoặc dưới da hoặc trong màng bụng. Việc tiêm truyền IV có thể được chỉ định hơn ít nhất là 15 phút, nhưng thường trong thời gian 30 phút, 60 phút, 90 phút hoặc thậm chí là 2 hoặc 3 giờ. Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể cũng được tiêm trực tiếp vào vị trí mắc bệnh (ví dụ, vào chính khối u). Liều lượng được chỉ định cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư là đủ để làm giảm bớt hoặc ít nhất hãm một phần bệnh đang được điều trị ("lượng hữu hiệu điều trị") và đôi khi có thể là từ 0,1 đến 10 mg/kg cân nặng cơ thể, ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 mg/kg, nhưng thậm chí có thể cao hơn, ví dụ 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 mg/kg. Ví dụ, liều lượng đơn vị cố định cũng có thể được quy định là 50, 100, 200, 500 hoặc 1000 mg, hoặc liều lượng có thể được dựa trên diện tích bề mặt của bệnh nhân, ví dụ, 400, 300, 250, 200, hoặc 100 mg/m^2. Thông thường 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 ung thư, nhưng 10, 12, 20 hoặc nhiều liều lượng hơn có thể được đưa ra. Việc dùng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được lặp lại sau 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. Các quá trình được lặp lại việc điều trị cũng là có thể, như là dùng thành thói quen. Cách dùng được lặp lại có thể là ở cùng liều lượng hoặc khác liều lượng.

Ví dụ, dược phẩm bao gồm kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế để tiêm truyền tĩnh mạch có thể được thực hiện để chứa khoảng 200 ml dung dịch Ringe vô trùng, 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 để dùng cho bệnh nhân 80 kg. Các phương pháp điều chế các thành phần có thể dùng qua đường ngoài ruột đã được biết đến và được mô tả trong nhiều tài liệu, ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publlàhing Companmenon, PA.

Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR, các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được làm khô lạnh để lưu trữ và được hoàn nguyên trong chất mang thích hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã thể hiện có sự hữu hiệu với các tiêu bản thành phần protein thông thường và các kỹ thuật làm khô lạnh và hoàn nguyên có thể được sử dụng.

Các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR, các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với chất liệu pháp điều trị thứ hai đồng thời, tuần tự hoặc riêng rẽ. Chất liệu pháp điều trị thứ hai có thể chất hóa liệu pháp điều trị hoặc điều trị kháng ung thư đích.

Kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép có thể được dùng với nhau có bất kỳ một hoặc nhiều thuốc hóa liệu pháp điều trị hoặc các liệu pháp điều trị kháng ung thư khác đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực chuyên ngành. Chất hóa liệu pháp điều trịs (chất hóa trị liệu) là các hợp chất hóa học hữu ích trong việc điều trị ung thư và bao gồm các chất ức chế sự tăng trưởng hoặc các chất gây độc tế bào khác và bao gồm các chất alkyl, các chất kháng chuyển hóa, các chất ức chế kháng vi quản, chất ức chế topoisomerase, các chất ức chế tyrosin kinaza của thụ thể, các chất ức chế sự tạo mạch và các chất tương tự. Các ví dụ về các chất hóa liệu pháp điều trị bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepa và cyclosphosphamit (CYTOXAN®); các sunfonat alkyl như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; các etylenimin và các metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenthiophosphaoramit và trimethylolomelamin; các mù tạc nitơ như clorambuxil, clornaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamit, mecloretamin, hydroclorua oxit mecloretamin, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamit, uracil mustard; các nitrosurea như carmustin, clorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các chất kháng sinh như các aclacinomyxin, actinomyxin, authramyxin, azaserin, các bleomyxin, cactinomyxin, calicheamixin,

carabixin, carminomyxin, carzinophilin, các chromomyxin, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin, epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomyxin, các mitomyxin, axit mycophenolic, nogalamyxin, các olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin, quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất kháng chuyển hóa như methotrexat và 5-FU; các chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprie, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin anxitabin, azaxitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin; các kích thích tố nam như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolactone; anti-adrenals như aminoglutethimide, mitotane, trilostane; chất độn axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquon; elfornithin; elliptinium axetat; etogluxit; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK®; razoxan; sizofiran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2′,2″-triclorotrietylamin; uretan; vindesin; daxarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosin; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamit; thiotepa; các thành phần họ taxoid hoặc taxan, như paclitaxel (TAXOL®docetaxel (TAXOTERE®) và các chất tương tự của nó; clorambuxin; gemxitabin; 6-tioguaninemercaptopurin; metotrexate; các chất tương tự platin như cisplatin và carboplatin; vinblastin; platin; etoposit (VP-16); ifosfamit; mitomyxin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposit; daunomyxin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeras RFS 2000; difloromethylornitin (DMFO); axit retinoic; các esperamixin; capexitabin; các chất ức chế các tyrosin kinaza thụ thể và/hoặc sự tạo 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 mang dược dụng, các axit hoặc các dẫn xuất của bất kỳ chất nào ở trên. Cũng được bao gồm trong việc xác định này là các chất kháng

hocmon mà đóng vai trò điều chỉnh hoặc ức chế hoạt động của hocmon trên các khối u như các chất kháng estrogen bao gồm ví dụ tamoxifen, raloxifen, 4(5)-các imidazole ức chế aromatas, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY 117018, onapriston, và toremifen (FARESTON®); và các chất kháng kích thích tố nam như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; và các muối mang dược dụng, các axit hoặc các dẫn xuất của bất kỳ chất nào ở trên. Các hợp chất hóa học gây độc thế bào thông thường khác như các hợp chất được bộc lộ trong Wiemann *và các đồng tác giả,* 1985, in *Medical Oncology* (Calabresi et aL, eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, cũng áp dụng được với các phương pháp theo sáng chế.

Ví dụ về các chất mà có thể được sử dụng kết hợp với các phân tử chứa miền FN3 EGFR/c-Met đặc hiệu kép, các miền FN3 gắn kết EGFR, các miền FN3 gắn kết c-Met hoặc các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các chất ức chế tyrosin kinaza và các liệu pháp kháng ung thư đích Iressa® (gefitinib) và Tarceva (erlotinib) và các chất đối kháng khác của HER2, HER3, HER4 hoặc VEGF. Ví dụ về HER2 các chất đối kháng bao gồm CP-724-714, HERCEPTIN™ (trastuzumab), OMNITARG™ (pertuzumab), TAK-165, lapatinib (chất ức chế EGFR và HER2), và GW-282974. Ví dụ về các chất đối kháng của HER3 bao gồm các kháng thể kháng Her3 (xem ví dụ, Công bố Patent Mỹ Số. US2004/0197332). Ví dụ về các chất đối kháng của siRNAs kháng HER4 (xem ví dụ, Maatta *et al.,* Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006). Ví dụ về chất đối kháng của VEGF là Bevacizumab (Avastin™).

Khi một phân tử nhỏ được sử dụng kết hợp với kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế, thông thường được dùng nhiều, tốt hơn là một lần một ngày, nhưng cũng có thể là 2, 3, 4 hoặc nhiều lần hơn một ngày, như là cứ hai ngày, hàng tuần hoặc ở các khoảng thời gian khác. Các thuốc phân tử nhỏ thường được dùng qua đường miệng nhưng cũng có thể được dùng qua đường ngoài ruột, ví dụ, bằng cách tiêm truyền IV hoặc tiêm tĩnh mạch nhan hoặc dưới da hoặc trong cơ. Các liều lượng của thuốc phân tử nhỏ thông thường có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 1000 mg, hoặc khoảng 100, 150, 200 hoặc 250 mg.

Khi kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế được dùng kết hợp với chất liệu pháp điều trị thứ hai, sự kết hợp có thể diễn ra trong khung thời gian thuận tiện bất kỳ. Ví dụ, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép và chất liệu pháp điều trị thứ hai có thể được dùng cho bệnh nhân trong cùng một ngày, thậm chí trong cùng đường truyền

tĩnh mạch. Tuy nhiên, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép và chất liệu pháp điều trị thứ hai có thể cũng được dùng vào các ngày xen kẽ hoặc các tuần xen kẽ, hai tuần lễ hoặc hàng tháng, và v.v…Theo một số phương pháp, kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép và chất liệu pháp điều trị thứ hai được dùng trong thời gian đủ gần mà chúng có mặt đồng thời (ví dụ, trong huyết thanh) ở các mức độ phát hiện được trong bệnh nhân đang được điều trị. Theo một số phương pháp, toàn bộ lộ trình điều trị kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép gồm số liều trong một khoảng thời gian là trước hoặc lộ trình điều trị của chất điều trị thứ hai cũng gồm cùng số liều. Theo một số phương pháp, việc điều trị bằng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được dùng thứ hai được bắt đầu nếu bệnh nhân có sức đề kháng hoặc phát triển sức đề kháng với chất liệu pháp điều trị thứ hai được dùng ban đầu. Bệnh nhân có thể chỉ tiếp nhận lộ trình đơn hoặc nhiều lộ trình điều trị với một hoặc cả hai kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép và chất liệu pháp điều trị thứ hai. Khoảng thời gian phục hồi là 1, 2 hoặc vài ngày hoặc vài tuần có thể được sử dụng giữa việc dùng kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép và chất liệu pháp điều trị thứ hai. Khi chế độ điều trị thích hợp đã được thiết lập cho chất liệu pháp điều trị thứ hai, mà việc điều trị có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép theo sáng chế. Ví dụ, Tarceva® (erlotinib) được lấy là 100 mg hoặc 150 mg viên thuốc một lần một ngày, and Iressa® (gefitinib) được lấy là 250 mg viên nén hàng ngày.

Kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép, tùy chọn kết hợp với chất liệu pháp điều trị thứ hai có thể được dùng với nhau với bất kỳ hình thức xạ trị bao gồm xạ trị bằng tia ngoài, xạ trị điều biến liều (IMRT- intensity modulated radiation therapy) và bất kỳ hình thức phẫu xạ trị bao gồm Gamma Knife, Cyberknife, Linac, và xạ trị kẽ (ví dụ các hạt phóng xạ được cấy ghép, GliaSite balloon), và/hoặc bằng phẫu thuật. Sự kết hợp với xạ trị có thể thích hợp cụ thể với bệnh ung thư đầu và cổ và các khối u não.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Cấu tạo của các thư viện Tencon

Tencon (SEQ ID SỐ: 1) là giàn giống globulin miễn dịch, miền fibronectin tuýp III (FN3), được thiết kế từ trình tự liên ứng của mười năm miền FN3 từ tenasxin-C ở người (Jacobs và các đồng tác giả, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-

117, 2012; Công bố Patent Mỹ Số. 2010/0216708). Cấu trúc tinh thể của Tencon thể hiện sáu vòng lộ bề mặt mà nối bảy sợi beta. Các vòng này, hoặc các gốc được chọn lọc trong mỗi vòng, có thể được ngẫu nhiên hóa để cấu tạo các thư viện của các miền fibronectin tuýp III (FN3) mà có thể được sử dụng để chọn các phân tử mới mà gắn kết với các đích đặc hiệu.

Tencon:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID SỐ 1):

Cấu tạo của thư viện TCL1

Thư viện được thiết kế để ngẫu nhiên hóa duy nhất vòng FG của Tencon (SEQ ID SỐ: 1), TCL1, được cấu tạo để sử dụng với hệ thống biểu hiện *cis* (Jacobs *và các đồng tác giả*, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012). Trong hệ thống này, trình tự gắn ADN sợi đơn cho vùng khởi đầu Tac, trình tự mã hóa thư viện Tencon, trình tự mã hóa RepA, yếu tố cis, và yếu tố ori được tạo ra. Nhờ biểu hiện trong hệ thống phiên mã/dịch mã *in vitro*, một phức hợp là sự tạo ra của protein dung hợp Tencon-RepA gắn kết trong *cis* với ADN mà từ đó nó được mã hóa. Các phức hợp mà gắn kết với phân tử đích sau đó được phân lập và được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR- Polymerase Chain Reaction), như được mô tả dưới đây.

Sự cấu tạo của thư viện TCL1 để sử dụng với sự biểu hiện *cis* đạt được bằng các chu kỳ liên tiếp của PCR để tạo ra mạch thẳng cuối cùng, các phân tử ADN sợi kép trong hai nửa; phân đoạn 5' chứa vùng khởi đầu và các trình tự Tencon, trong khi phân đoạn 3' chứa gen repA và các yếu tố *cis* và ori. Cả hai nửa này được kết hợp bằng cách phân cắt giới hạn để tạo ra toàn bộ cấu tạo. Thư viện TCL1 được thiết kế để gắn ngẫu nhiên các axit amin duy nhất trong vòng FG của Tencon, KGGHRSN (SEQ ID SỐ: 86). Các codon NNS được sử dụng trong sự cấu tạo của thư viện này, dẫn đến có thể việc gắn tất cả 20 axit amin và một codon dừng vào vòng FG. Thư viện TCL1 chứa sáu thư viện con riêng biệt, mỗi thư viện con có chiều dài vòng FG được ngẫu nhiên hóa khác nhau, từ 7 đến 12 gốc, để làm tăng thêm sự đa dạng. Việc thiết kế các thư viện dựa trên Tencon được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2.

	Thiết kế vòng	
Thư viện	BC	Thiết kế vòng FG
Tencon WT	TAPDAAFD*	KGGHRSN**
TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXX
		XXXXXXXX
		XXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXX
TCL2	########	#####S##

*TAPDAAFD: các gốc từ 22 đến 28 của SEQ ID SỐ: 1;

**KGGHRSN: SEQ ID SỐ: 86

X dùng để chỉ sự thoái hóa các axit amin được mã hóad bởi các codon NNS.

dùng để chỉ "sự phân bố của các axit amin được thiết kế" được mô tả trong văn bản.

Đối với cấu tạo thư viện TCL1, chu kỳ liên tiếp của PCR được thực hiện để gắn vùng khởi đầu Tac, sự suy thoái cấu trúc vào vòng FG, và bổ sung các vị trí thu hẹp cho việc ghép cuối cùng. Thứ nhất, trình tự ADN chứa trình tự vùng khởi đầu và trình tự Tencon 5' của vòng FG được tạo ra bằng PCR theo hai bước. ADN tương ứng với trình tự gen Tencon đầy đủ được sử dụng làm khuôn PCR có các đoạn mồi POP2220 (SEQID SỐ: 2) và TC5'toFG (SEQID SỐ: 3). Sản phẩm PCR thu được từ phản ứng này được sử dụng làm khuôn cho chu kỳ mới của sự khuếch đại PCR với các đoạn mồi 130mer (SEQID SỐ: 4) và Tc5'toFG để hoàn thành việc gắn các trình tự 5' và vùng khởi đầu với Tencon. Tiếp theo, sự đa dạng được đưa vào vòng FG bằng cách khuếch đại sản phẩm ADN được tạo ra trong bước thứ nhất với đoạn mồi POP2222 ở phía trước (SEQID SỐ: 5), và đảo ngược các đoạn mồi TCF7 (SEQID SỐ: 6), TCF8 (SEQID SỐ: 7), TCF9 (SEQID SỐ: 8), TCF10 (SEQID SỐ: 9), TCF11 (SEQID N SỐ: 10), hoặc TCF12 (SEQID SỐ: 11), mà chứa các nucleotit thoái hóa. Ít nhất tám phản ứng PCR 100 µL được thực hiện đối với mỗi thư viện con để giảm thiểu các chu kỳ PCR và tối đa hóa sự đa dạng của thư viện. Ít nhất 5 µg của sản phẩm PCR này được tinh chế qua gel và được sử dụng trong bước PCR tiếp theo, có các đoạn mồi POP2222 (SEQ ID SỐ: 5) và

POP2234 (SEQID SỐ: 12), dẫn đến việc gắn 6xHis tag và vị trí giới hạn NotI vào đầu 3' của trình tự Tencon. Phản ứng PCR này được thực hiện bằng cách sử dụng chỉ mười lăm chu kỳ PCR và ít nhất 500 ng của khuôn ADN. Sản phẩm PCR thu được được tinh chế qua gel, được phân cắt bằng enzym giới hạn NotI, và được tinh chế bằng cột Qiagen.

Phân đoạn 3' của thư viện là trình tự ADN cố định chứa các yếu tố để biểu hiện, bao gồm vị trí giới hạn PspOMI, vùng mã hóa của gen repA, và các yếu tố cis và ori. Các phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng plasmit (pCR4Blunt) (Invitrogen) chứa phân đoạn ADN này với các đoạn mồi M13 Forward và M13 Đảo ngược. Các sản phẩm PCR thu được được phân cắt bằng PspOMI qua đêm và được tinh chế qua gel. Để nối phần 5' của thư viện ADN vào ADN 3' chứa gen repA, 2 pmol của ADN 5' được nối để lượng mol cân bằng của ADN *repA* 3' mà có mặt các enzym NotI và PspOMI và ligaza T4. Sau khi nối để qua đêm ở 37°C, một phần nhỏ của được nối ADN được thực hiện trên gel để kiểm tra hiệu quả nối. Sản phẩm thư viện được nối được chia thành mười hai sự khuếch đại PCR và 12 chu kỳ phản ứng PCR được thực hiện với cặp đoạn mồi POP2250 (SEQID SỐ: 13) và DidLigRev (SEQID SỐ: 14). Sản lượng ADN đối với mỗi thư viện con của thư viện TCL1 nằm trong phạm vi từ 32 đến 34 µg.

Để đánh giá chất lượng của thư viện, một phần nhỏ của thư viện làm việc được khuếch đại bằng các đoạn mồi Tcon5new2 (SEQID SỐ: 15) và Tcon6 (SEQID SỐ: 16), và được tách dòng vào vectơ pET được biến đổi thông qua việc tác dòng không phụ thuộc với ligaza. ADN plasmit được chuyển vào BL21-GOLD (DE3) các tế bào khả nạp (Stratagene) và 96 khuẩn lạc được tuyển chọn ngẫu nhiên được sắp xếp theo trình tự bằng cách sử dụng đoạn mồi vùng khởi đầu T7. Các trình tự không trùng lặp được được phát hiện. Nhìn chung, khoảng chừng từ 70 đến 85% dòng vô tính có vùng khởi đầu hoàn toàn và trình tự mã hóa Tencon mà không có đột biến xê dịch khung. Tỷ lệ trình tự chức năng, mà không loại trừ các dòng vô tính có các ác codon kết thúc, là nằm giữa 59% và 80%.

Cấu tạo của thư viện TCL2

Thư viện TCL2 được cấu tạo trong đó cả hai vòng BC và FG của Tencon được ngẫu nhiên hóa và sự phân bố của các axit amin ở mỗi vị trí được đối chứng chặt chẽ. Bảng 3 thể hiện sự phân bố axit amin ở các vị trí vòng mong muốn trong thư viện TCL2 thư viện. Sự phân bố axit amin được thiết kế có hai nhánh. Thứ nhất, thư viện bị lệch hướng về các gốc được dự đoán có cấu trúc quan trọng để gập Tencon và tính ổn định

dựa trên sự phân tích cấu trúc tinh thể Tencon và/hoặc từ mô hình hóa đồng đẳng. Ví dụ, vị trí 29 được cố định là tập hợp con của các axit amin kỵ nước, như gốc này chứa trong trong lõi kỵ nước core của nếp gập Tencon. Lớp thứ hai của sự thiết kế được bao gồm sự phân bố axit amin lệch hướng về các gốc ưu tiên được phát hiện trong chuỗi nặng HCDR3 của các kháng thể, để tạo ra các chất gắn kết có ái lực cao hiệu quả (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). Hướng tới mục tiêu này, "sự phân bố được bố trí" của Bảng 3 dùng để chỉ sự bố trí như sau đây: 6% alanin, 6% arginin, 3,9% asparagin, 7,5% axit aspartic, 2,5% axit glutamic, 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% tyroxin, và 4% valin. Sự bố trí này là tránh methionin, cystein, 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 bố trí
23	A	sự phân bố được bố trí
24	P	50% P + sự phân bố được bố trí
25	D	sự phân bố được bố trí
26	A	20% A + 20% G + sự phân bố được bố trí
27	A	sự phân bố được bố trí
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 bố trí
76	G	sự phân bố được bố trí
77	G	sự phân bố được bố trí
78	H	sự phân bố được bố trí
79	R	sự phân bố được bố trí
80	S	100% S
81	N	sự phân bố được bố trí
82	P	50% P + sự phân bố được bố trí

*việc đánh số gốc là dựa trên trình tự Tencon có SEQ ID SỐ: 1

Phân đoạn 5' của thư viện TCL2 chứa vùng khởi đầu và vùng mã hóa của Tencon (SEQ ID SỐ: 1), mà được tổng hợp hóa học làm thư viện nhóm (Công nghệ sinh học Tách dòng-Sloning Biotechnology). Nhóm này của ADN chứa ít nhất 1 x 1011 các thành phần khác. Ở cuối phân đoạn, vị trí giới hạn BsaI được bao gồm trong sự thiết kế để nối vào RepA.

Phân đoạn 3' của thư viện có trình tự ADN cố định chứa các yếu tố để biểu hiện bao gồm 6xHis tag, vùng mã hóa của gen repA, và yếu tố *cis*. ADN được điều chế bằng phản ứng PCR bằng cách sử dụng khuôn ADN có sẵn (nêu trên), và các đoạn mồi LS1008 (SEQID SỐ: 17) và DidLigRev (SEQID SỐ: 14). Để ghép thư viện TCL2 hoàn toàn, tổng số 1 µg của 5' được phân cắt bằng BsaI Tencon thư viện ADN được nối với 3,5 µg của phân đoạn 3' mà được điều chế bằng cách giới hạn sự phân cắt với cùng enzyme. Sau khi nối để qua đêm, ADN được tinh chế bằng cột Qiagen và ADN được định lượng bằng cách đo độ hấp thụ ở 260 nm. Sản phẩm thư viện được nối được khuếch đại bằng 12 chu kỳ phản ứng PCR với cặp đoạn mồi POP2250 (SEQID SỐ: 13) và DidLigRev (SEQID SỐ: 14). Tổng số 72 phản ứng được thực hiện, mỗi phản ứng chứa 50 ng của các sản phẩm ADN được nối làm khuôn. Tổng sản lượng của ADN trong thư viện TCL2 là khoảng 100 µg. Một phần nhỏ của thư viện làm việc được tách dòng con và được giải trình tự, như được mô tả ở trên đối với thư viện TCL1. Các trình tự không lặp lại được phát hiện. Khoảng 80% các trình tự chứa hoàn toàn vùng khởi đầu và các trình tự mã hóa Tencon mà không xê dịch khung các đột biến.

Cấu tạo của thư viện TCL14

Vòng đầu (BC, DE, và FG) và vòng cuối (AB, CD, và EF), ví dụ, các bề mặt gắn kết được báo cáo trong các miền FN3 được tách bằng các sợi beta mà tạo thành trung tâm của cấu trúc FN3. Các bề mặt thay thế nằm trên hai "phía" của các miền FN3 có các hình dạng khác nhau mà các bề mặt được tạo thành bởi các vòng duy nhất được tạo thành ở một phía của miền FN3 bởi hai sợi beta đối song song, các sợi beta C và F, và các vòng CD và FG, và trong bản mô tả này được gọi là bề mặt C-CD-F-FG.

Thư viện ngẫu nhiên hóa bề mặt thay thế của Tencon được tạo ra bởi các gốc lộ bề mặt chọn ngẫu nhiên của các sợi C và F, cũng như các phần của vòng CD và FG như được thể hiện trong Fig.1. Biến thể Tencon, Tencon27 (SEQ ID SỐ: 99) có các sự thay

thế sau đây khi so với Tencon (SEQ ID SỐ: 1) được sử dụng để tạo thư viện; E11R L17A, N46V, E86I. Sự mô tả đầy đủ của các phương pháp được sử dụng để cấu tạo thư viện này được mô tả trong Công bố Paten Mỹ Số. US2013/0226834.

Ví dụ 2: Sự lựa chọn các miền fibronectin tuýp III (FN3) mà gắn kết EGFR và ức chế sự gắn kết EGF

Sàng lọc thư viện

Biểu hiện *cis* được sử dụng để chọn các miền gắn kết EGFR từ các thư viện TCL1 và TCL2. Miền ngoại bào ở người tái tổ hợp của GFR fđược sử dụng với IgG1 Fc (Các hệ thống R&D) được biotinylat hóa bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn và được sử dụng để phân tích trọng lượng (các gốc 25-645 của EGFR có chiều dài toàn bộ có SEQ ID SỐ: 73). Đối với việc phiên mã và dịch mã (ITT) *in vitro*, 2-6 µg thư viện ADN được ủ với 0,1 mM toàn bộ các axit amin, các thành phần trộn lẫn từ trước 1X S30, và 30 µL của dịch chiết S30 (Promega) trong tổng số thể tích 100 µL và được ủ tại nhiệt độ 30°C. Sau 1 giờ, dung dịch phong bế 450 µL (PBS có độ pH 7,4, được bổ sung 2% albumin huyết thanh bò, 100 µg/mL ADN tinh dịch cá tríc, và 1 mg/mL heparin) được bổ sung và sự phản ứng được ủ vào nước đá trong khoảng thời gian 15 phút. Các phức hợp EGFR-Fc:EGF được ghép ở các tỷ lệ mol là 1:1 và 10:1 EGFR với EGF bằng cách trộn EGF ở người tái tổ hợp (Các hệ thống R&D) với EGFR-Fc tái tổ hợp được biotinylat hóa trong dung dịch phong bế khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Đối với sự gắn kết, 500 µL của các phản ứng ITT được phong bế được trộn với 100 µL các phức hợp EGFR-Fc:EGF và được ủ khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau khi các phức hợp gắn kết được kéo xuống với các hạt neutravidin hoặc streptavidin có từ tính (Seradyne). Các thành phần thư viện không gắn kết các thành phần được loại bỏ theo liên tiếp được rửa bằng PBST và PBS. Sau khi rửa, ADN được rửa giải khỏi các phức hợp gắn kết bằng cách gia nhiệt đến nhiệt độ 65°C trong khoảng 10 phút, được khuếch đại bằng PCR, và được gắn với phân đoạn ADN mã hóa RepA bằng cách phân cắt giới hạn và nối cho các chu kỳ tiếp theo của sự phân tích trọng lượng. Các chất gắn kết có ái lực cao được phân lập bằng cách liên tục làm giảm nồng độ của EGFR-Fc đích trong suốt mỗi chu kỳ từ 200 nM đến 50 nM và làm tăng sự rửa kỹ. Ở các chu kỳ 4 và 5, các miền FN3 gắn kết yêu hoặc không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa mà có mol gấp 10 lần vượt quá của EGF R-Fc được biotinylat hóa qua đêm trong PBS.

Sau khi phân tích trọng lượng, các miền FN3 được chọn lọc được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng các oligonucleotit Tcon5new2 (SEQID SỐ: 15) và Tcon6 (SEQID SỐ: 16), tạo dòng phụ vào vectơ pET được biến đổi để bao gồm vị trí tách dòng không phụ thuộc ligaze, và được chuyển vào các tế bào BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) để hòa tan được biểu hiện trong E. coli bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Trình tự gen mã hóa đầu cuối C poly-Histidine tag được bổ sung vào mỗi miền FN3 cho phép tinh chế và phát hiện. Các sự nuôi cấy được tăng trưởng với mật độ quang học nằm trong khoảng từ 0,6 đến 0,8 trong môi trường 2YT được bổ sung 100 µg/mL carbenixillin trong 1 mL các khối 96 giếng ở nhiệt độ 37°C trước khi bổ sung IPTG với 1 mM, mà ở đó thời điểm nhiệt độ được giảm xuống 30°C. Các tế bào được thu hoạch sau khoảng 16 giờ bằng cách ly tâm và kết đông -20°C. Sự ly giải tế bào đạt được bằng cách ủ mỗi viên trong 0,6 mL dung dịch đệm ly giải BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) với việc lắc ở nhiệt độ phòng trong khoảng 45 phút.

Chọn lọc các miền FN3 mà gắn kết EGFR vào các tế bào

Để đánh giá khả năng của các miền FN3 khác nhau để gắn kết EGFR trong nhiều thuộc tính sinh lý học, 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) biểu hiện quá mức EGFR có ~2 x 10^6 thụ thể trong mỗi tế bào. Các tế bào được gieo với mật độ 5,000/giếng trong các đĩa có 96 giếng màu đen mờ đục và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C, trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các hợp chất dung giải tế bào có vi khuẩn biểu hiện miền FN3 được pha loãng 1,000 lần vào dung dịch đệm nhuộm màu FACS (Becton Dickinson) và được ủ trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong bộ ba các đĩa. Các hợp chất dung giải tế bào được loại bỏ và các tế bào được rửa 3 lần với 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm màu 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 ở tỷ lệ 1:100 trong dung dịch đệm nhuộm màu FACS trong khoảng 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa 3 lần với 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm màu FACS, sau đó các giếng được lấp đầy với 100 µL dung dịch đệm nhuộm màu FACS và đọc huỳnh quang ở 488 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc Acumen eX3. Các hợp chất dung giải tế bào có vi khuẩn chứa các miền FN3 được sàng lọc về khả năng của chúng để gắn kết các tế bào A431 (các hợp chất dung giải tế bào vi khuẩn thô 1320 cho các thư viện TCL1 và TCL2) và 516 dòng vô tính dương tính được nhận dạng, nơi mà gắn kết là > trên 10 lần

tín hiệu nền. 300 hợp chất dung giải tế bào từ thư viện TCL14 được sàng lọc để gắn kết, dẫn đến 58 trình tự có miền FN3 duy nhất mà gắn kết với EGFR.

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

Để mô tả tốt hơn về cơ chế gắn kết EGFR, khả năng của các dòng vô tính miền FN3 được nhận dạng khác nhau để gắn kết EGFR theo cách cạnh tranh EGF-được đánh giá bằng cách sử dụng các tế bào A431 và thực hiện đồng thời với sự sàng lọc thử nghiệm gắn kết A431. Các tế bào A431 được gieo với mật độ 5,000/giếng các đĩa màu đen mờ đục có 96 giếng và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các tế bào được ủ với 50 µL/giếng hợp chất dung giải tế bào có vi khuẩn được pha loãng ở tỷ lệ 1:1,000 trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong bộ ba các đĩa. EGF được biotinylat hóa (Invitrogen, cat. #E-3477) được bổ sung vào mỗi giếng cho nồng độ cuối là 30 ng/mL và được ủ trong khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm nhuộm màu FACS 150 µL/giếng. 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 màu FACS trong khoảng 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa 3 lần với dung dịch đệm nhuộm màu FACS 150 µL/giếng, sau đó các giếng được lấp đầy với 100 µL dung dịch đệm nhuộm màu FACS và đọc huỳnh quang ở 600 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc Acumen eX3.

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

Sự biểu hiện và tinh chế các miền FN3 được xác định gắn kết EGFR

Các miền FN3 được đánh dấu *His* được tinh chế từ các hợp chất dung giải tế bào E. coli được lọc 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 imidazole ở độ pH 7,4. Các mẫu được tinh chế được chuyển đổi vào PBS có độ pH 7,4 để phân tích bằng cách sử dụng các đĩa PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare).

Sự phân tích Sắc ký Loại trừ theo Kích thước

Sắc ký loại trừ theo kích thước được sử dụng để xác định trạng thái kết tụ của các miền FN3 gắn kết EGFR. Các phần mẫu đại diện (10 µL) của mỗi miền FN3 được tinh chế được tiêm vào cột Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) ở tốc độ dòng 0,3 mL/phút

trong pha động PBS có độ pH 7,4. Việc rửa giải khỏi cột được theo dõi bằng độ hấp thụ ở 280 nm. Các miền FN3 mà biểu hiện các mức độc cao của sự kết tụ bằng SEC được loại trừ mà không phân tích thêm.

Sự phân ly của Các miền FN3 gắn kết EGFR được lựa chọn từ EGFR-Fc

Các miền FN3 gắn kết EGFR được lựa chọn được sàng lọc để nhận dạng **các** miền có hằng số phân ly (k_{off}) nhỏ trong sự gắn kết với EGFR-Fc vào thiết bị ProteOn XPR-36 (Bio-Rad) để tạo thuận lợi cho sự lựa chọn các chất gắn kết có ái lực cao. IgG của Fc kháng người của dê (các hệ thống R&D), ở nồng độ 5 µg/mL, được giữ cố định trực tiếp thông qua việc ghép amin (ở độ pH 5,0) trên tất cả 6 kênh phối tử theo hướng ngang trên chip với tốc độ dòng 30 µL/phút trong PBS chứa 0,005% Tween-20. Các mật độ cố định trung bình khoảng 1500 Đơn vị Đáp ứng (RU- Response Unit) với sự thay đổi nhỏ hơn 5% trong số các kênh khác nhau. EGFR-Fc được thu nạp trên bề mặt kháng Fc IgG ở người với mật độ khoảng 600 RU theo định hướng phối tử dọc. Tất cả các miền FN3 được kiểm tra được chuẩn hóa đến nồng độ 1 µM và được kiểm tra đối với sự gắn kết của chúng theo hướng ngang. Tất cả 6 kênh có chất phân tích được sử dụng cho các miền FN3 để tối đa hóa năng suất sàng lọc. Pha phân ly được theo dõi trong khoảng 10 phút ở tốc độ dòng 100 µL/phút. Các tín hiệu gắn kết giữa các điểm được sử dụng khi tham chiếu đến sự theo dõi gắn kết không đặc hiệu giữa các chất phân tích và bề mặt IgG cố định, và được trừ ra khỏi tất cả các sự đáp ứng gắn kết. Dữ liệu gắn kết được xử lý được khớp cục bộ với mô hình gắn kết Langmuir đơn giản 1:1 để tách chiết k_{off} cho mỗi miền FN3 gắn kết với EGFR-Fc được thu nạp.

Sự ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF

Các miền FN3 gắn kết EGFR được tinh chế được kiểm tra về khả năng để ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF của chúng trong các tế bào A431 ở nồng độ duy nhất. Sự phosphoryl hóa EGFR được theo dõi bằng cách sử dụng kit EGFR phosphor (Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Các tế bào được gieo với mật độ 20,000/giếng trong các đĩa đã xử lý nuôi cấy mô có 96 giếng toàn bộ (Nunc) trong 100 µL/giếng của Môi trường RPMI (Gibco) chứa GlutaMAX™ với 10% huyết thanh thai bò (FBS- huyết thanh thai bò) (Gibco) và và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào bị bỏ đói qua đêm trong 100 µL/giếng của môi trường không chứa FBS ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các tế bào sau đó được xử lý

100 µL/giếng với môi trường bỏ đói (37°C) được làm ấm trước chứa các miền FN3 gắn kết EGFR ở nồng độ 2 µM trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các đối chứng được xử lý với môi trường bỏ đói duy nhất. Các tế bào được kích thích bằng cách bổ sung và trộn nhẹ nhàng 100 µL/giếng ở môi trường bỏ đói (37°C) được làm ấm trước chứa 100 ng/mL EGF ở người tái tổ hợp (Các hệ thống R&D, cat. #236-EG), cho các nồng độ cuối là 50 ng/mL EGF và 1 µM miền FN3 gắn kết EGFR, và ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO_2 trong khoảng 15 phút. Một tập hợp các giếng đối chứng được để không bị kích thích làm các đối chứng âm. Môi trường được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào được ly giải bằng 100 µL/giếng Dung dịch đệm Ly giải Hoàn toàn (Meso Scale Discovery) trong khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng có lắc, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đĩa thử nghiệm được tạo kết cấu để đo EGFR bị phosphorylat hóa trên tyroxin 1173 (Meso Scale Discovery) bị phong bế bằng dung dịch phong bế được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất ở nhiệt độ phòng trong khoảng từ 1,5 đến 2 giờ. Các đĩa sau đó được rửa 4 lần bằng 200 µL/giếng Dung dịch đệm Rửa Tris 1X (Meso Scale Discovery). Các phần mẫu đại diện của hợp chất dung giải tế bào (30 µL/giếng) được chuyển vào các đĩa thử nghiệm, mà được phủ bằng màng bịt kín bằng đĩa (VWR) và được ủ ở nhiệt độ phòng với lắc trong khoảng 1 giờ. Các đĩa thử nghiệm được rửa 4 lần bằng 200 µL/giếng Dung dịch đệm Rửa Tris, sau đó 25 µL Dung dịch chứa Kháng thể Phát hiện được làm lạnh bằng nước đá (Meso Scale Discovery) được bổ sung vào mỗi giếng, cần cẩn thận để không vào các bong bóng. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng với việc lắc trong khoảng 1 giờ, sau đó là 4 lần rửa bằng 200 µL/giếng Dung dịch đệm Rửa Tris. Các tín hiệu được phát hiện bằng cách bổ sung 150 µL/giếng Dung dịch đệm Đọc (Meso Scale Discovery) và đọc trên SECTOR® Imager 6000 thiết bị (Meso Scale Discovery) bằng cách sử dụng các thiết lập mặc định thử nghiệm đặc hiệu được nhà sản xuất cài đặt sẵn. Phần trăm ức chế tín hiệu điều khiển tích cực do cảm ứng EGF được tính toán cho mỗi miền FN3 gắn kết EGFR.

Sự ức chế phosphoryl hóa do cảm ứng EGF được đánh giá cho 232 dòng vô tính được nhận dạng từ các thư viện TCL1 và TCL2. 22 g dòng vô tính này ức chế sự phosphoryl hóa EGFR bằng >50% ở nồng độ 1 µM. Sau khi loại bỏ các dòng vô tính hoặc là được biểu hiện kém hoặc hoặc được đánh giá là đa phân bằng sắc ký loại trừ theo kích thước, chín dòng vô tính được mang ra trước để mô tả thêm tính sinh học. Các trình tự vòng BC và FG của các dòng vô tính này được thể hiện trong Bảng 4. Tám trong

số chin dòng vô tính được lựa chọn có trình tự vòng FG thông thường (HNVYKDTNMRGL; SEQ ID SỐ: 95) và các diện tích tương đồng đáng kể được thấy giữa một vài dòng vô tính trong trình tự vòng BC của chúng.

Bảng 4.

Miền FN3		Vòng BC		Vòng FG	
ID dòng vô tính	SEQ ID SỐ:	Trình tự	SEQ ID SỐ:	Trình tự	SEQ ID SỐ:
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 các miền FN3 gắn kết EGFR mà ức chế gắn kết EGF

Biểu hiện quy mô lớn, Sự tinh chế, và Loại bỏ Nội độc tố

Các miền FN3 được thể hiện trong Bảng 4 được nhân rộng để tạo ra nhiều vật liệu để mô tả chi tiết. Việc nuôi cấy qua đêm chứa mỗi biến thể của miền FN3 gắn kết EGFR được sử dụng để tiêm truyền 0,8 L môi trường nước Terrific được bổ sung 100 µg/mL ampixillin ở dung dịch loãng tỷ lệ 1/80 của việc nuôi cấy qua đêm vào môi trường tươi, và được ủ với việc lắc ở nhiệt độ 37°C. Việc nuôi cấy do cảm ứng khi mật độ quang học ở 600 nm đạt ~1,2-1,5 bằng cách bổ sung IPTG với nồng độ cuối 1 mM và nhiệt độ được giảm xuống 30°C. Sau 4 giờ, các tế bào được thu thập bằng cách ly tâm và viên tế bào được lưu trữ ở -80°C đến khi cần thiết.

Đối với sự ly giải tế bào, viên dạng tan bị tái huyền phù trong 1X BugBuster® được bổ sung với 25 U/mL Benzonase® (Sigma-Aldrich) và 1 kU/mL rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) ở tỷ lệ 5 mL BugBuster® mỗi gram của viên. Sự ly giải được tiến hành trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng với việc khuấy nhẹ nhàng, sau đó là ly tâm ở 56,000 x g trong khoảng 50 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi trên mặt được thu thập và được lọc qua bộ lọc 0,2 µm, sau đó được nạp vào cột 5-mL HisTrap FF cân bằng

trước bằng Dung dịch đệm A (50 mM Tris-HCl có độ pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole) bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký GE Healthcare ÄKTAexplorer 100s. Cột được rửa với 20 thể tích cột của Dung dịch đệm A và còn được rửa bằng 16 % Dung dịch đệm B (50 mM Tris-HCl độ pH 7,5, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole) cho 6 thể tích cột. Các miền FN3 được rửa giải bằng 50% B cho 10 thể tích cột, sau đó là gradien từ 50 đến 100% B trên 6 thể tích cột. Các đoạn chứa protein miền FN3 được gộp nhóm, được cô đặc bằng cách sử dụng máy cô đặc Millipore 10K MWCO, và được lọc trước khi nạp vào cột HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare) cân bằng trước với PBS. Đỉnh protein đơn phân rửa giải khỏi cột loại trừ theo kích thước được giữa lại.

Các nội độc tố được loại bỏ bằng cách sử dụng loạt phương pháp với 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 nhiệt độ 37°C (hoặc qua đêm ở nhiệt độ 4°C) và được rửa kỹ bằng PBS đến khi độ pH được ổn định ~7 khi đo bằng giấy chỉ thị độ pH. Protein được tinh chế được lọc thông qua bộ lọc 0,2 µm trước khi bổ sung vào 1 mL nhựa Etox ở tỷ lệ 10 mL protein với 1 mL nhựa. Sự gắn kết của nội độc tố vào nhựa được phép tiến hành ở nhiệt độ phòng ít nhất trong khoảng 2 giờ với xoay nhẹ nhàng. Nhựa được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 500 x g trong khoảng 2 phút và the protein nổi trên mặt được giữ lại. Các mức độ Nội độc tố được đánh giá bằng cách sử dụng các hộp EndoSafe®-PTS™ và được phân tích trên thiết bị đọc EndoSafe®-MCS (Charles River). Nếu các mức độ nội độc tố là trên 5 EU/mg sau khi điều trị Etox lần thứ nhất, phương thức nêu trên được lặp lại đến khi các mức độ nội độc tố được làm giảm >5 EU/mg. Trong các trường hợp mà mức độ nội độc tố là trên 5 EU/mg và được ổn định sau hai lần điều trị liên tiếp với Etox, các điều kiện sắc ký trao đổi anion hoặc tương tác kỵ nước được thiết lập đối với protein để loại bỏ các nội độc tố còn lại.

Xác định Ái lực của Các miền FN3 gắn kết EGFR Được lựa chọn với EGFR-Fc (Ái lực EGFR-Fc)

Ái lực gắn kết của các miền FN3 gắn kết EGFR được lựa chọn với miền ngoại bào EGFR tái tổ hợp còn được định rõ đặc điểm bằng các phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng thiết bị Proteon Instrument (BioRad). Việc thiết lập thử nghiệm (chuẩn bị chip, thu nạp EGFR-Fc) là tương tự như được mô tả ở trên cho sự phân tích phân ly. Các miền FN3 gắn kết EGFR được lựa chọn được kiểm tra ở nồng độ 1 µM trong các loạt pha loãng gấp 3 lần theo hướng ngang. Mẫu dung dịch đệm cũng

được tiêm vào để theo dõi tính ổn định của đường chuẩn. Pha phân ly cho tất cả các nồng độ của mỗi miền FN3 gắn kết EGFR được theo dõi ở tốc độ dòng 100 µL/phút trong khoảng 30 phút (for those with k_{off} ~10^{-2} s^{-1} từ việc sàng lọc phân ly), hoặc 1 giờ (for those with k_{off}~10^{-3} s^{-1} hoặc chậm hơn). Hai tập hợp dữ liệu tham chiếu được trừ ra khỏi dữ liệu đáp ứng: 1) Các tín hiệu giữa các điểm để hiệu chỉnh đối với các tương tác không đặc hiệu giữa miền FN3 gắn kết EGFR và bề mặt IgG cố định; 2) các tín hiệu kênh dung dịch đệm để hiệu chỉnh đối với việc lệch đường chuẩn do sự phân ly của bề mặt EGFR-Fc được thu nạp theo thời gian. Dữ liệu gắn kết được xử lý ở tất cả các nồng độ cho mỗi miền FN3 được khớp toàn bộ với mô hình gắn kết Langmuir 1:1 với dịch chiết ước tính của hằng số động học (k_{on}, k_{off}) và hằng số ái lực (K_D). Bảng 5 thể hiện các hằng số động học khác nhau cho mỗi cấu trúc, có ái lực thay đổi nằm trong khoảng từ 200 pM đến 9,6 nM.

Sự gắn kết của các miền FN3 gắn kết EGFR được lựa chọn với EGFR trên các tế bào ("Thử nghiệm Gắn kết Tế bào A431")

Các tế bào A431 được gieo với mật độ 5,000/giếng trong các đĩa có 96 giếng màu đen mờ đục và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C, trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các miền FN3 gắn kết EGFR được tinh chế (nằm trong khoảng từ 1,5 nM đến 30 µM) được bổ sung vào các tế bào (trong 50 uL) trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng bộ ba các đĩa. Dịch nổi trên mặt được loại bỏ và các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 µL/giếng của dung dịch đệm nhuộm màu FACS. Các tế bào được ủ bằng 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 màu FACS trong khoảng 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa 3 lần bằng 150 µL/giếng dung dịch đệm nhuộm màu FACS, sau đó các giếng được lấp đầy bằng 100 µL dung dịch đệm nhuộm màu FACS và đọc huỳnh quang ở 488 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc Acumen eX3. Dữ liệu đặc vẽ như là tín hiệu huỳnh quang thô dựa vào logarit của nồng độ mol miền FN3 và được khớp với đường cong đáp ứng liều lượng hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (Phần mềm GraphPad) để tính toán các trị số EC_{50}. Bảng 5 thể hiện EC_{50} cho mỗi cấu trúc nằm trong phạm vi từ 2,2 nM đến > 20 µM.

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

Các tế bào A431 được gieo với mật độ 5,000/giếng các đĩa màu đen mờ đục có 96 giếng và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C, trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các miền FN3 gắn kết EGFR được tinh chế (nằm trong khoảng từ 1,5 nM đến 30 μM) được bổ sung vào các tế bào (50 μL/giếng) trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong bộ ba các đĩa. EGF được biotinylat hóa (Invitrogen, Cat #: E-3477) được bổ sung vào mỗi giếng cho nồng độ cuối là 30 ng/mL và được ủ trong khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa 3 lần với 150 μL/giếng dung dịch đệm nhuộm màu 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 màu FACS trong khoảng 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được rửa 3 lần với 150 μL/giếng dung dịch đệm nhuộm màu FACS, sau đó các giếng được lấp đầy bằng 100 μL dung dịch đệm nhuộm màu FACS và đọc huỳnh quang ở 600 nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc Acumen eX3. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị như tín hiệu huỳnh quang thô dựa vào logarit của nồng độ mol miền FN3 được khớp với đường cong đáp ứng liều lượng hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (Phần mềm GraphPad) để tính toán các trị số IC_{50}. Bảng 5 thể hiện các trị số IC_{50} nằm trong phạm vi từ 1,8 nM đến 121 nM.

Ức chế sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EGF (thử nghiệm EGFR Phospho)

Các miền FN3 được lựa chọn mà sự phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG được ức chế đáng kể được đánh giá hoàn toàn hơn bằng cách đo các trị số IC_{50} đối với sự ức chế. Sự ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG được đánh giá ở các nồng độ miền FN3 thay đổi (nằm trong khoảng từ 0,5 nM đến 10 μM) như được mô tả ở trên về "sự ức chế EGF phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG". Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị như là tín hiệu điện hóa phát quang dựa vào logarit của nồng độ mol miền FN3 và các trị số IC_{50} được xác định bằng cách khớp dữ liệu với đường cong đáp ứng liều lượng hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (Phần mềm GraphPad). Bảng 5 thể hiện các 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 sự tăng trưởng NCI-H292 và sự tăng trưởng NCI-H322)

Sự ức chế tăng trưởng tế bào phụ thuộc EGFR được đánh giá bằng cách đo khả năng sống được của các dòng tế bào khối u ở người có biểu hiện quá mức, NCI-H292

và NCI-H322 (American Type Culture Collection, cat. #CRL-1848 & #CRL-5806, respectively), tiếp theo tiếp xúc với các miền FN3 gắn kết EGFR. Các tế bào được gieo với mật độ 500 tế bào/giếng (NCI-H292) hoặc 1,000 tế bào/giếng (NCI-H322) trong các đĩa được xử lý nuôi cấy mô có 96 giếng mờ đục (Nunc) trong 100µL/giếng ở môi trường RPMI (Gibco) chứa GlutaMAX™ và 10mM HEPES, được bổ sung với 10% huyết thành thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt (Gibco) và 1% penixillin/streptomyxin (Gibco), và cho phép gắn qua đêm ở 37°C trong môi trường CO_2 5% được làm ẩm. Các tế bào được xử lý bằng cách bổ sung 5µL/giếng dung dịch muối đệm phosphat (PBS-Phosphate Buffered Saline) chứa khoảng nồng độ của các miền FN3 gắn kết EGFR. Các đối chứng được xử lý với 5µL/giếng chỉ có PBS hoặc 25 mM axit etylendiamintetraaxetic trong PBS. Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong khoảng 120 giờ. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách bổ sung 75µL/giếng thuốc thử CellTiter-Glo® (Promega), sau đó là trộn vào máy lắc đĩa trong khoảng 2 phút, và ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 10 phút nữa. Các đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa M5 (Các thiết bị Phân tử -Các thiết bị phân tử) được thiết lập chế phát quang, với thời gian đọc là 0,5 giây/giếng dựa vào phôi của môi trường duy nhất. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị là tỷ lệ phần trăm sự tăng trưởng tế bào được xử lý PBS dựa vào logarit của nồng độ mol miền FN3. Các trị số IC_{50} được xác định bằng cách khớp dữ liệu vào hệ thức về sự đáp ứng liều hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (Phần mềm GraphPad). Bảng 5 thể hiện các trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 5,9 nM đến 1,15 µM và 9,2 nM đến > 3,1 µM, bằng cách sử dụng lần lượt các tế bào NCI-H292 và NCI-H322. Bảng 5 thể hiện sự tóm tắt các đặc tính sinh học của các miền FN3 gắn kết EGFR cho mỗi thử nghiệm.

Bảng 5

ID dòng vô tính của miền FN3	SEQ ID SỐ:	Ái lực EGFR-Fc (nM)	Sự gắn kết tế bào A431	Sự cạnh tranh EGF của tế bào A431	Phospho-EGFR	Sự tăng trưởng NCI-H292	Sự tăng trưởng NCI-H322
			EC_{50} (nM)	IC_{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

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

Tập hợp con của các miền FN3 gắn kết EGFR được thiết kế để làm tăng tính ổn định về hình dạng của mỗi phân tử. Các sự đột biến L17A, N46V, và E86I đã được chứng minh là để cải thiện tính ổn định của miền FN3 (được mô tả trong Công bố Patent Mỹ Số. US2011/0274623) được gắn vào các dòng vô tính P54AR4-83, P54CR4-31, và P54AR4-37 bằng cách tổng hợp ADN. Các thể đột biến mới, P54AR5-83v2, P54CR431-v2, và P54AR4-37v2 được biểu hiện và được tinh chế như được mô tả ở trên. Việc quét nhiệt vi sai trong PBS được sử dụng để đánh giá tính ổn định của mỗi thể đột biến để so với nó với tính ổn định của phân tử gốc tương ứng. Bảng 6 thể hiện rằng mỗi biến thể phân tử được ổn định đáng kể, với mức tăng trung bình theo T_m là 18,5°C.

Bảng 6.

Dòng vô tính của miền FN3	SEQID SỐ:	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

Phân tính định lượng trên c-Met ở người

Thư viện TCL14 được sàng lọc dựa vào miền ngoại bào của c-Met ở người được biotinylat hóa (bt-c-Met) để nhận dạng các miền FN3 có khả năng gắn kết đặc hiệu c-Met. Đối với các lựa chọn, 3 µg thư viện TCL14 được phiên mã và dịch mã (IVTT) *in vitro* trong Dịch chiết Thẳng E. Coli S30 (Promega, Madison, WI) và thư viện biểu hiện được phong bế bằng Cis Block (2% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 µg/ml ADN Tinh dịch Cá trích (Promega), 1 mg/mL heparin (Sigma-Aldrich)). Đối với các lựa chọn, bt-c-Met được bổ sung ở các nồng độ là 400 nM (Chu kỳ 1), 200 nM (Các chu kỳ 2 và 3) và 100 nM (Các chu kỳ 4 và 5). Các thành viên thư viện gắn kết được thu hồi bằng cách sử dụng các hạt từ tính neutravidin (Thermo Fisher, Rockford, IL) (Các chu kỳ 1, 3, và 5) hoặc các hạt từ tính streptavidin (Promega) (Các chu kỳ 2 và 4) và các

thành viên thư viện không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa các hạt từ 5 đến 14 lần bằng 500 uL PBS-T sau đó là 2 lần rửa bằng 500 µL PBS.

Các chu kỳ lựa chọn bổ sung được thực hiện để nhận dạng các phân tử có các miền FN3 có các ái lực được cải thiện. Tóm lại, các lượng ra từ chu kỳ 5 được điều chế như được mô tả ở trên và đưa vào các chu kỳ lặp lại bổ sung có lựa chọn với các sự thay đổi sau: việc ủ với bt-c-Met được giảm từ 1 giờ xuống 15 phút và việc thu nạp hạt được giảm từ 20 phút xuống 15 phút, bt-c-Met được giảm xuống 25 nM (Các chu kỳ 6 và 7) hoặc 2,5 nM (Các chu kỳ 8 và 9), và việc rửa 1 giờ bổ sung được thực hiện mà có mặt quá mức của c-Met không được biotinylat hóa. Mục đích của các sự thay đổi này là để lựa chọn đồng thời cho các chất gắn kết với khả năng tái hợp nhanh hơn và năng suất phân ly chậm hơn về cơ bản KD nhỏ hơn.

Các lượng ra các chu kỳ 5, 7 và 9 được tách dòng PCR vào vectơ pET15 được biến đổi (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ) chứa vị trí tách dòng không phụ thuộc ligaza (pET15-LIC) bằng cách sử dụng các đoạn mồi TCON6 (SEQID No. 30) và TCON5 E86I ngắn (SEQID No. 31), và các protein được biểu hiện là các protein được đánh dấu His6 đầu cuối C sau các sự biến đổi và cảm ứng IPTG (1 mM cuối, 30°C trong khoảng 16 giờ) bằng cách sử dụng các phác đồ tiêu chuẩn. Các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm và sau đó được ly giải bằng Bugbuster HT (EMD Biosciences) được bổ sung với 0,2 mg/mL Chicken Egg White Lysozyme (Sigma-Aldrich). Các hợp chất dung giải tế bào có vi khuẩn được lọc bằng cách ly tâm và các dịch nổi trên mặt được chuyển vào các đĩa có 96 giếng sâu 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 về khả năng để ức chế HGF gắn kết với miền ngoại bào c-Met được tinh chế của chúng trong định dạng sinh hóa. Thể ghép c-Met Fc ở người tái tổ hợp (0,5 µg/mL in PBS, 100 µL/giếng) được phủ trên các Đĩa Maxisorp màu trắng có 96 giếng (Nunc) và được ủ qua đêm ở 4°C. Các đĩa được rửa hai lần bằng 300 µl/giếng dung dịch muối đệm Tris với 0,05% Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich) trên máy rửa đĩa Biotek. Các đĩa thử nghiệm được phong bế bằng StartingBlock T20 (200 µL/giếng, Thermo Fisher Scientific, Rockland, IL) trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ phòng (RT- room temperature) với việc lắc và được rửa lại hai lần bằng 300 µl of TBS-T. Các hợp chất dung giải tế bào miền FN3 được pha loãng trong StartingBlock T20 (tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:100,000)

bằng cách sử dụng các hệ thống Hamilton STARplus. Các hợp chất dung giải tế bào (50 µL/giếng) được ủ trên các đĩa thử nghiệm trong khoảng 1 giờ ở RT với việc lắc. Nếu không rửa các đĩa, bt-HGF (1 µg/mL trong Starting Block T20, 50 µL/giếng, được biotinylat hóa) được bổ sung vào đĩa trong khoảng 30 phút ở RT trong khi lắc. Các giếng đối chứng chứa các hợp chất dung giải tế bào Tencon27 nhận được hoặc Starting Block T20 hoặc bt-HGF được pha loãng. Các đĩa sau đó được rửa bốn lần bằng 300 µl/giếng TBS-T và được ủ với 100 µl/giếng Streptavidin-HRP (1:2000 trong TBS-T, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) trong khoảng từ 30 đến 40 phút ở RT với việc lắc. Các đĩa được rửa lại bốn lần bằng TBS-T. Để phát triển tín hiệu, Cơ chất Hóa phát quang POD (50 µL/giếng, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), được điều chế theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, được bổ sung vào đĩa và trong khoảng chừng 3 phút sự phát quang được đọc trên Các thiết bị phân tử M5 bằng cách sử dụng SoftMax Pro. Phần trăm sự ức chế được xác định bằng cách sử dụng tính toán sau đây: 100-((RLU$_{mẫu}$ –Mean RLU$_{Không\ có\ đối\ chứng\ bt\text{-}HGF}$)/(Mean RLU$_{đối\ chứng\ bt\text{-}HGF}$ -Mean RLU$_{Không\ có\ đối\ chứng\ bt\text{-}HGFl}$)*100). Phần trăm các trị số ức chế là 50% hoặc lớn hơn được coi là các hit.

Biểu hiện và sự tinh chế số lượng lớn của các miền FN3

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

Xác định IC_{50} của sự Ức chế Gắn kết HGF với c-Met

Các miền FN3 được chọn còn được mô tả trong thử nghiệm cạnh tranh HGF. Các đường cong về sự đáp ứng liều đối với các miền FN3 được tinh chế được tạo ra dùng thử nghiệm được mô tả ở trên (các nồng độ bắt đầu là 5 µM). Phần trăm các trị số sự ức chế được tính toán. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị là % sự ức chế dựa vào logarit của các nồng độ mol miền FN3 và các trị số IC_{50} được xác định bằng cách khớp dữ liệu với sự đáp ứng liều hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4.

35 trình tự duy nhất được nhận dạng từ Chu kỳ 5 để biểu lộ hoạt tính ở các độ pha loãng là 1:10, có các trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1500 nM. Chu kỳ 7 có sản lượng 39 trình tự duy nhất có hoạt tính ở các độ pha loãng là 1:100 và các trị số IC_{50}

nằm trong khoảng từ 0,16 đến 2,9 nM. 66 trình tự duy nhất được nhận dạng từ Chu kỳ 9, mà các hit được xác định được hoạt hóa ở các độ 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 lựa chọn với c-Met-Fc (Ái lực EGFR-Fc)

Các ái lực được xác định đối với các miền FN3 gắn kết c-Met được lựa chọn như được mô tả trong Ví dụ 3 để xác định ái lực các miền FN3 gắn kết EGFR được lựa chọn, ngoại trừ rằng 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 chế như được mô tả ở trên trong Ví dụ 2. Sắc ký loại trừ theo kích thước và việc phân tích động học được thực hiện như được mô tả ở trên lần lượt trong các Ví dụ 1 và 2. Bảng 7 thể hiện các trình tự của Sợi C, Vòng CD, Sợi F, và Vòng FG, và SEQ ID SỐ: đối với trình tự axit amin cho mỗi miền.

Bảng 7

Dòng vô tính		Vòng C	Sợi CD	Vòng F	Dải FG
Tên	SEQ ID SỐ:				
P114AR5P74-A5	32	FDSFWIRYDE	VVVGGE	TEYYVNILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYWVTILGV	KGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNILGV	KGGGLSV
P114AR7P92-G8	36	FDSFVIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P92-H5	37	FDSFWIRYLE	FLLGGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P93-D11	38	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVGINGV	KGGYISY
P114AR7P93-G8	39	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYGVTINGV	KGGRVST
P114AR7P93-H9	40	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIIGV	KGGHISL
P114AR7P94-A3	41	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV
P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LLSTGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP

các gốc vòng C tương ứng với các gốc từ 28 đến 37 của SEQ ID SỐ được thể hiện các gốc sợi CD tương ứng với các gốc từ 38 đến 43 của SEQ ID SỐ được thể hiện
các gốc vòng F tương ứng với các gốc từ 65 đến 74 của SEQ ID SỐ được thể hiện
các gốc sợi FG tương ứng với các gốc từ 75 đến 81 của SEQ ID SỐ được thể hiện
Sự Gắn kết các Miền FN3 gắn kết c-Met được Lựa 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) được gieo với mật độ 20,000 tế bào mỗi giếng trong coated black clear bottom các đĩa có 96 giếng có đáy toàn bộ màu đen được phủ Poly-D-lysine (BD Biosciences, San Jose, CA) và cho phép gắn qua đêm ở 37°C, CO_2 5%. Các miền FN3 được tinh chế (50 µL/giếng; từ 0 đến 1000 nM) được bổ sung vào các tế bào trong khoảng 1 giờ ở 4°C trong các đĩa giống nhau. Dịch nổi trên mặt được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch đệm nhuộm màu FACS (150 µL/giếng, BD Biosciences, cat # 554657). Các tế bào được ủ với kháng thể HIS kháng bị biotinylat hóa (được pha loãng 1:160 trong dung dịch đệm nhuộm màu FACS, 50 µL/giếng, Các hệ thống R&D, cat # BAM050) trong khoảng 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch đệm nhuộm màu FACS (150 µL/giếng), sau đó các giếng được ủ bằng kháng thể được tiếp hợp IgG1-Alexa 488 kháng chuột (được pha loãng với tỷ lệ 1:80 in FACS dung dịch đệm nhuộm màu, 50 µL/giếng, Life Technologies, cat # A21121) trong khoảng 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch đệm nhuộm màu FACS (150 µL/giếng) và để trong dung dịch đệm nhuộm màu FACS (50 µL/giếng). Tổng lượng huỳnh quang được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đọc Acumen eX3. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị là tín hiệu huỳnh quang thô dựa vào logarit của nồng độ mol miền FN3 và được khớp với đường cong liều lượng- đáp ứng hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4 (Phần mềm GraphPad) để tính toán các trị số EC50. Các miền FN3 được phát hiện để biểu lộ khoảng các hoạt tính gắn kết, có các trị số EC50 nằm giữa khoảng 1,4 nM và 22,0 nM, như được thể hiện trong Bảng 8.

Ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF

Các miền FN3 được tinh chế được kiểm tra về khả năng để ức chế sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng của chúng HGF trong NCI-H441, bằng cách sử dụng kit c-Met phospho(Tyr1349) từ Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD). Các tế bào được gieo

với mật độ 20,000/giếng trong các đĩa được xử lý nuôi cấy mô có 96 giếng toàn bộ trong 100 µL/giếng ở môi trường RPMI (chứa Glutamax và HEPES, Life Technologies) có 10% huyết thanh thai bò (FBS; Life Technologies) và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5%. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào bị bỏ đói qua đêm trong môi trường RPMI không có huyết thanh (100 µL/giếng) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5%. Các tế bào sau đó được bổ sung với môi trường RPMI không có huyết thanh tươi (100 µL/giếng) chứa các miền FN3 ở nồng độ là 20 µM và dưới khoảng 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5%. Các đối chứng được xử lý với môi trường duy nhất. Các tế bào được kích thích với 100 ng/mL HGF ở người tái tổ hợp (100 µL/giếng, R&D Systems cat # 294-HGN) và được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong khoảng 15 phút. Một tập hợp các giếng đối chứng được để không kích thíchd làm các đối chứng âm. Sau đó, môi trường được loại bỏ hoàn toàn và các tế bào được ly giải bằng Dung dịch đệm Ly giải Hoàn toàn (50 µL/giếng, Meso Scale Discovery) trong khoảng 10 phút ở RT với việc lắc, như theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đĩa thử nghiệm được tạo kết cấu để đo c-Met được phosphorylat hóa được phong bế bằng dung dịch phong bế được tạo ra theo các hướng dẫn của nhà sản xuất ở nhiệt độ phòng trong khoảng 1 giờ. Các đĩa sau đó được rửa ba lần bằng Dung dịch đệm Rửa Tris (200 µL/giếng, Meso Scale Discovery). Các hợp chất dung giải tế bào (30 µL/giếng) được chuyển vào các đĩa thử nghiệm, và được ủ ở RT với việc lắc trong khoảng 1 giờ. Các đĩa thử nghiệm sau đó được rửa bốn lần bằng Dung dịch đệm Rửa Tris, sau đó Kháng thể phát hiện Dung dịch được làm lạnh bằng nước đá (25 µL/giếng, Meso Scale Discovery) được bổ sung vào mỗi giếng trong khoảng 1 giờ ở RT với việc lắc. Các đĩa được tráng lại bốn lần bằng Dung dịch đệm Rửa Tris. Các tín hiệu được phát hiện bằng cách bổ sung 150 Dung dịch đệm Đọc (150 µL/giếng, Meso Scale Discovery) và đọc trên thiết bị SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) bằng cách sử dụng các thiết lập mặc định thử nghiệm-đặc hiệu được các nhà sản xuất cài đặt. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị là tín hiệu dựa điện hóa phát quang vào logarit nồng độ mol miền FN3 và các trị số IC_{50} được xác định bằng cách khớp dữ liệu với sự đáp ứng liều hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4. Các miền FN3 được phát hiện để ức chế c-Met được phosphorylat hóa có các trị số IC_{50} 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 hoặc Khả năng sống được ở Người

Sự ức chế sự tăng trưởng tế bào phụ thuộc c-Met được đánh giá bằng cách đo khả năng sống được của các tế bào U87-MG (American Type Culture Collection, cat # HTB-14), sau đó tiếp xúc với các miền FN3 gắn kết c-Met. Các tế bào được gieo với mật độ 8000 tế bào mỗi giếng vào các đĩa được xử lý nuôi cấy mô có 96 giếng màu trắng mờ đục (Nunc) trong 100 µL/giếng môi trường RPMI, được bổ sung với 10% FBS và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5%. Sau khi gieo hai bốn giờ, môi trường được hút ra và các tế bào được bổ sung với môi trường RPMI không có huyết thanh. Hai bốn giờ sau khi bị bỏ đói, các tế bào được xử lý bằng cách bổ sung môi trường không có serum chứa các miền FN3 gắn kết c-Met (30 µL/giếng). Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong khoảng 72 giờ. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách bổ sung 100 µL/giếng CellTiter-Glo® thuốc thử (Promega), sau đó là trộn vào máy lắc đĩa trong khoảng10 phút. Các đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa SpectraMax M5 (Các thiết bị phân tử) được thiết lập ở chế độ phát quang, với thời gian đọc là 0,5 giây/giếng. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị là các đơn vị phát quang thô (RLU) dựa vào logarit nồng độ mol của miền FN3. Các trị số IC_{50} được xác định bằng cách khớp dữ liệu vào hệ thức về sự đáp ứng liều hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng GraphPad Prism 4. Bảng 8 thể hiện các trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 1 nM đến >1000 nM. Các đặc trưng của các miền FN3 gắn kết c-Met được tóm tắt trong Bảng 8.

Bảng 8.

Dòng vô tính		Ái lực (Kd, nM)	IC_{50} có cạnh tranh HGF (nM)	Sự gắn kết tế bào H441 (EC_{50}, nM)	Sự ức chế pMet trong các tế bào H441 (IC_{50}, nM)	Sự ức chế tăng sinh của các tế bào U87-MG (IC_{50}, nM)
Tên	SEQ ID SỐ:					
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

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

Việc quét nhiệt vi sai trong PBS được sử dụng để đánh giá tính ổn định của mỗi miền FN3. Các kết quả thực nghiệm được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9.

Dòng vô tính		Tính ổn định nhiệt (Tm, C)
Tên	SEQ ID SỐ:	
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. Sự tạo ra và Đặc trưng của các phân tử kháng EGFR/c-Met Đặc hiệu kép

Sự tạo ra các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Nhiều sự kết hợp của các miền FN3 gắn kết EGFR và c-Met được mô tả trong các Ví dụ từ 1 đến 6 được nối vào các phân tử đặc hiệu kép có khả năng gắn kết với cả 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 SỐ: 107-110 và các miền FN3 gắn kết c-Met có các trình tự axit amin được thể hiện trong các SEQ ID SỐ: 111-114 được thực hiện và được nối vào

các phân tử đặc hiệu kép. Các gen tổng hợp được tạo ra để mã hóa các trình tự axit amin được mô tả trong các SEQ ID SỐ: 50-72 và 106 (Bảng 10) sao cho định dạng sau được duy trì: miền FN3 gắn kết EGFR sau đó là mối liên kết peptit sau đó là miền FN3 gắn kết c-Met. Chất đánh dấu poly-histidin được gắn ở đầu cuối C để hỗ trợ sự tinh chế. Ngoài các phân tử được mô tả trong Bảng 10, mối liên kết giữa hai miền FN3 được thay đổi theo chiều dài, thành phần trình tự và cấu trúc theo những phân tử được liệt kê trong Bảng 11. Có thể hình dung rằng số lượng các mối liên kết có thể được sử dụng để liên kết các miền FN3 có các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép này được biểu hiện và được tinh chế từ E. coli như đã được mô tả đối với các miền FN3 đặc hiệu đơn EGFR hoặc c-Met bằng cách sử dụng các bước sắc ký lọc qua gel và IMAC.

Bảng 10

Phân tử c-Met/EGFR đặc hiệu kép		Miền FN3 gắn kết EGFR		Miền FN3 gắn kết c-Met		Mối liên kết	
ID dòng vô tính	SEQ ID SỐ:	ID dòng vô tính	SEQ ID SỐ:	ID dòng vô tính	SEQ ID SỐ:	Trình tự	SEQ ID SỐ:
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

Bảng 11.

Mối liên kết	SEQ ID SỐ:	Chiều dài mối liên kết trong các axit amin	Cấu trúc
GS	78	2	Bị rối loạn
GGGGS	105	5	Bị rối loạn
$(GGGGS)_4$	79	20	Bị rối loạn

$(AP)_2$	80	4	Bền vững
$(AP)_5$	81	5	Bền vững
$(AP)_{10}$	82	20	Bền vững
$(AP)_{20}$	83	40	Bền vững
$A(EAAAK)_5AAA$	84	29	α-helical

Các phân tử EGFR/c-Met Đặc hiệu kép tăng cường sự hiệu nghiệm so với các phân tử đặc hiệu đơn duy nhất, thể hiện ái lực

Các tế bào NCI-H292 được gieo trong các đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS. Sau 24 giờ, môi trường được thay thế bằng RPMI không có huyết thanh. 24 giờ sau khi bị bỏ đói, các tế bào được xử lý có các nồng độ của ác miền FN3 thay đổi: một trong hai miền FN3 EGFR đặc hiệu đơn có ái lực cao (P54AR4-83v2), miền FN3 c-Met đặc hiệu đơn có ái lực yếu (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 bao gồm miền FN3 c-Met có ái lực nhỏ được liên kết với miền FN3 EGFR ái lực cao (ECB1). Các tế bào được xử lý trong khoảng 1 giờ với các phân tử đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép và sau đó được kích thích bằng EGF, HGF, hoặc sự kết hợp của EGF và HGF trong khoảng 15 phút ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5%. Các tế bào được ly giải bằng Dung dịch đệm Ly giải MSD và tín hiệu tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng các đĩa thử nghiệm MSD phù hợp, theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, như được mô tả ở trên.

Miền FN3 c-Met có ái lực nhỏ ức chế sự phosphoryl hóa của c-Met có IC_{50} là 610 nM (Fig. 4). Như dự kiến miền FN3 EGFR không có khả năng để ức chế c-Met sự phosphoryl hóa và hỗn hợp của các phân tử đặc hiệu đơn được xem tương đồng với riêng miền FN3 c-Met. Tuy nhiên, phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép ức chế sự phosphoryl hóa của c-Met có IC_{50} là 1 nM (Fig. 4), tạo ra nhiều hơn sự thay đổi 2-log về cải thiện sự hiệu nghiệm tương đối với riêng c-Met đặc hiệu đơn.

Khả năng phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép để tăng cường sự ức chế c-Met và/hoặc sự phosphoryl hóa EGFR thông qua hiệu quả ái lực được đánh giá trong các loại tế bào đa bào có các mật độ và các tỷ lệ c-Met và EGFR có thể thay đổi (Fig.5). Các tế bào NCI-H292, NCI-H441, hoặc NCI-H596 được gieo trong các đĩa có 96 giếng trong môi trường RPMI chứa 10% FBS. Sau 24 giờ, môi trường được thay thế bằng RPMI không có huyết thanh. 24 giờ sau khi bị bỏ đó, các tế bào được xử lý có các nồng độ

thay đổi của một trong hai 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, bao gồm P53A1R5-17v2 và P114AR7P94-A3). Các tế bào được xử lý trong khoảng 1h với các phân tử đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép và sau đó được kích thích bằng EGF, HGF, hoặc sự kết hợp của EGF và HGF trong khoảng 15 phút at 37°C, CO_2 5%. Các tế bào được ly giải bằng Dung dịch đệm Ly giải MSD và tín hiệu tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng phù hợp các đĩa Thử nghiệm MSD, theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, như được mô tả ở trên.

Fig.5 (A-C) thể hiện sự ức chế EGFR bằng cách sử dụng miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn so với phân tử EGFR/c-Met 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) được so với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép chứa cùng miền FN3 gắn kết EGFR được liên kết miền FN3 gắn kết c-Met có với ái lực cao (0,4 nM) (P114AR7P94-A3). Trong các tế bào NCI-H292 và H596, sự ức chế phosphoryl hóa EGFR có thể so với các phân tử đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép (Các Fig.5A và Fig.5B), có khả năng bởi vì các dòng tế bào này có tỷ lệ thụ thể EGFR cao so với thụ thể c-Met. Để kiểm tra giả định này, sự ức chế phosphoryl hóa EGFR được đánh giá trong các tế bào NCI-H441 mà biểu lộ nhiều thụ thể c-Met hơn EGFR. Việc xử lý các tế bào NCI-H441 với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép làm giảm IC_{50} đối với sự ức chế phosphoryl hóa EGFR so với miền FN3 gắn kết EGFR đặc hiệu đơn là 30 lần (Fig.5C).

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

Đã được kiểm nghiệm rằng việc tăng cường hiệu nghiệm đối với sự ức chế phosphoryl hóa EGFR và c-Met bằng các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được dịch vào sự ức chế tín hiệu và sự tăng sinh được tăng cường. Đối với các thực nghiệm này, hỗn hợp các miền FN3 gắn kết EGFR và gắn kết c-Met được so với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép. Như được mô tả trong các Bảng 12 và 13, các trị số IC_{50} của sự phosphoryl hóa ERK (Bảng 12) và sự tăng sinh của các tế bào NCI-H292 (Bảng 13)

được làm giảm khi các tế bào được xử lý với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép so với hỗn hợp của các chất gắn kết đặc hiệu đơn. Trị số IC_{50} cho sự ức chế phosphoryl hóa ERK đối với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép nhỏ hơn 143 lần tương đối với hỗn hợp của hai miền FN3 EGFR và c-Met đặc hiệu đơn, thể hiện tác dụng ái lực với sự hiệu nghiệm của các phân tử trong thử nghiệm này. Trong Bảng 12, các miền FN3 gắn kết EGFR và c-Met đặc hiệu đơn không ức chế toàn bộ hoạt tính và do đó các trị số IC_{50} được thể hiện nên được coi là các giới hạn dưới. Thử nghiệm về sự tăng sinh được hoàn thành bằng cách sử dụng các sự kết hợp các miền FN3 gắn kết EGFR và c-Met khác nhau hoặc là hỗn hợp hoặc được liên kết trong định dạng đặc hiệu kép. Trị số IC_{50} cho sự ức chế tăng sinh đối với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép nhỏ hơn từ 34 đến 236 lần tương đối với hỗn hợp của các miền FN3 gắn kết EGFR hoặc c-Met gốc đặc hiệu đơn. Điều này khẳng định rằng tác dụng ái lực được quan sát ở mức độ của các thụ thể (Fig.4 và Fig.5) được dịch vào sự cải thiện về ức chế tín hiệu tế bào (Bảng 12) và sự tăng sinh tế bào (Bảng 13).

Bảng 12.

Độ đặc hiệu của phân tử chứa miền FN3	Tên dòng vô tính	Loại	IC_{50} (nM) (sự phosphoryl hóa ERK)
EGFR	P54AR4-83v2	đặc hiệu đơn	>10,000
c-Met	P114AR5P74-A5	đặc hiệu đơn	2366
EGFR hoặc c-Met	P54AR4-83v2 + P114AR5P74-A5	hỗn hợp của 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)	IC_{50} đối với hỗn hợp các phân tử đặc hiệu đơn (nM)	IC_{50} đối với phân tử đặc hiệu kép (nM)	Số lần tăng IC_{50} đối với hỗn hợp đặc hiệu đơn/ đặc hiệu kép

P54AR4-83v2 (0,26 nM)	P114ARP94-A3 (0,4 nM)	36,5	1,04	35
P54AR4-83v2 (0,26 nM)	P114AR7P93-H9 (3,3 nM)	274,5	8,05	34
P54AR4-83v2 (0,26 nM)	P114AR5P74-A5 (10,1 nM)	1719	7,29	236

Các kiểu ghép ngoại lai khối u *In vivo*: PK/PD

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

Chuột SCID Beige được tiêm truyền dưới da với các tế bào NCI-H292 biểu hiện HGF ở người ($2,0x10^6$ tế bào trong Cultrex (Trevigen) trong thể tích 200 µL) trên sườn lưng của mỗi con vật. Các phép đo khối u được thực hiện hai lần một tuần đến khi các thể tích khối u nằm trong khoảng giữa 150 và 250 mm^3. Sau đó, chuột được quy định liều lượng i.p các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép đơn (được liên kết với miền gắn kết albumin để làm tăng chu kỳ bán hủy) hoặc chất dẫn thuốc PBS trong dược khoa. Ở thời điểm 6h hoặc 72h sau khi dùng thuốc theo liều, các khối u bị tách ra và ngay lập tức đóng băng trong nitơ lỏng. Các mẫu máu được thu thông qua việc chích thuốc kích thích tim vào 3,8% xitrat chứa các chất ức chế proteaza. Ngay sau khi thu, các mẫu máu được ly tâm và huyết tương thu được được chuyển vào các ống chứa mẫu và được lưu trữ ở -80°C. Các khối u được cân, cắt thành các phần nhỏ, và được ly giải trong các ống Nền Ly giải A (LMA- Lysing Matrix A) chứa dung dịch đệm RIPA có các chất ức chế proteaza/phosphataza HALT (Pierce), 50 mM natri florua (Sigma), 2 mM sodium orthovanadat được hoạt hóa (Sigma), và 1 mM PMSF (Meso Scale Discovery). Các hợp chất dung giải tế bào được loại bỏ khỏi nền LMA và được ly tâm để loại bỏ protein không hòa tan. Protein khối u hòa tan được được định lượng bằng thử nghiệm protein

BCA và được pha loãng đến các mức độ protein tương đương trong dung dịch đệm ly giải khối u. C-Met được phosphorylat hóa, EGFR và ERK được đánh giá bằng cách sử dụng các đĩa thử nghiệm từ Meso Scale Discovery (theo phác đồ của nhà sản xuất và như được mô tả ở trên).

Fig.6 thể hiện các kết quả của các thực nghiệm. Mỗi phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép làm giảm đáng kể các mức độ c-Met, EGFR và EKR bị phosphorylat hóa, và ERK vào cả lúc 6 giờ hoặc 72 giờ. Dữ liệu được thể hiện trong Fig.6 thể hiện tầm quan trọng của việc ức chế cả c-Met và EGFR đồng thời và cách tạo ái lực của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép với mỗi thụ thể đóng một vai trò trong sự ức chế của dòng xuôi ERK. Các phân tử chứa các miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực cao (P54AR4-83v2; được thể hiện là "8" trong Fig., K_D=0,26 nM) sự phosphoryl hóa EGFR bị ức chế đến quy mô lớn hơn so với các phân tử chứa các miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình (P53A1R5-17v2; được thể hiện là "17" trong Fig. K_D =1,9 nM) vào cả lúc 6 giờ hoặc 72 giờ. Tất cả bốn các phân tử đặc hiệu kép được kiểm tra ức chế hoàn toàn sự phosphoryl hóa ERK tại thời điểm 6 giờ, không chú ý tới ái lực. Tại thời điểm 72 giờ, các phân tử chứa miền gắn kết c-Met có ái lực mạnh (P114AR7P94-A3; được thể hiện là "A3" trong Fig. K_D =0,4 nM) ức chế đáng kể sự phosphoryl hóa ERK so với miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực trung bình (P114AR5P74-A5; được thể hiện là "A5" trong Fig.; K_D =10,1 nM; Fig.6).

Nồng độ của mỗi phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được đánh giá vào lúc 6 giờ và 72 giờ sau khi dùng thuốc trong máu và trong khối u (Fig.7). Điều thú vị là, phân tử đặc hiệu kép chứa 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 đáng kể ở 6 giờ tương đối so với các phân tử khác, trong khi sự khác biệt được giảm bớt vào lúc 72 giờ. Có thể đưa ra giả thuyết rằng các tế bào bên ngoài khối u có các mức độ nhỏ hơn ở cả hai sự biểu hiện bề mặt EGFR và c-Met và do đó the ái lực trung bình EGFR phân tử không gắn kết chặt với mô bình thường so với miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực cao hơn. Do đó, có nhiều miền FN3 gắn kết EGFR ái lực trung bình có sẵn để gắn kết trong khối u. Do đó, sự nhận dạng các ái lực phù hợp với mỗi thụ thể có thể cho phép nhận biết liệu pháp điều trị có độc tính toàn thân giảm đi và sự tích lũy khối u được tăng lên.

Các nghiên cứu tính hiệu quả của khối u có các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

Chuột SCID Beige được tiêm truyền dưới da các tế bào NCI-H292 biểu hiện HGF ở người ($2,0x10^6$ tế bào trong Cultrex (Trevigen) trong 200 µL) ở sườn lưng của mỗi con vật. Một tuần sau khi cấy ghép, chuột được phân thành các nhóm với các thể tích khối u tương đương (nghĩa là thể tích khối u =77,9+/-1,7mm^3). Chuột được dùng thuốc theo liều ba lần mỗi tuần với các phân tử đặc hiệu kép và các thể tích khối u được ghi lại hai lần một tuần. Sự ức chế tăng trưởng khối (TGI) được quan sát với bốn phân tử đặc hiệu kép khác nhau, có các ái lực có thể thay đổi đối với c-Met và EGFR. Fig.8 thể hiện lợi ích của việc ức chế cả hai c-Met và EGFR để trì hoãn sự tăng trưởng khối u được quan sát ở chuột được điều trị với các phân tử chứa miền FN3 ái lực cao gắn kết EGFR so với miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực trung bình khi miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực trung bình (các bộ ba mở với đóng, P54AR4-83v2- P114AR5P74-A5 so với P53A1R5-17- P114AR5P74-A5). Ngoài ra, dữ liệu thể hiện tầm quan trọng của việc có miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao như các phân tử đặc hiệu kép chứa một trong hai miền FN3 gắn kết EGFR có ái lực cao hoặc ái lực trung bình nhưng miền FN3 gắn kết c-Met có ái lực cao thể hiện tính hiệu quả nhất (các đường chấm màu đen và màu xám, P54AR4-83v2- P114AR7P94-A3 và P53A1R5-17v2- P114AR7P94-A3).

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

Các tính 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 cái là chất đơn, và sự kết hợp của crizotinib và erlotinib được đánh giá trong việc điều trị ung mô hình ghép ngoại lai thư phổi ở người H292-HGF qua đường dưới da ở chuột SCID Beige.

Các tế bào H292-HGF được duy trì *in vitro* trong môi trường RPMI1640 được bổ sung huyết thanh thai bò (10% thể tích/thể tích), và L-glutamin (2 mM) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường có CO_2 5% trong không khí. Các tế bào được nuôi cấy đều đặn hai lần một tuần bằng cách xử lý trypsin-EDTA. Các tế bào phát triển trong giai đoạn tăng trưởng theo cấp số nhân được thu hoạch và được đếm để tiêm truyền khối u.

Mỗi con chuột được tiêm truyền dưới da ở vùng sườn bên phải các tế bào khối u H292-HGF (2×10^6) trong 0,1 ml PBS với Cultrex (tỷ lệ 1:1) để phát triển khối u. Các sự điều trị được bắt đầu khi kích thước khối u trung bình đạt 139 mm^3. Việc dùng vật dụng kiểm tra và số lượng động vật trong mỗi nhóm nghiên cứu được thể hiện trong

Bảng thiết kế thực nghiệm sau đây. Ngày tiêm truyền tế bào khối u được ký hiệu là ngày 0. Bảng 14 thể hiện các nhóm điều trị.

Bảng 14.

Nhóm	N	Sự điều trị	Liều lượng (mg/kg)	Lộ trình liều lượng	Lịch phân tích trọng lượng	Lịch thực tế
1	10	Chất dẫn thuốc Đối chứng	0	*i.p.*	QD×3 tuần	QD×3 tuần
2	10	Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép	25	*i.p.*	3 lần/tuần ×3 tuần	3 lần/tuần ×3 tuần
3	10	crizotinib	50	*p.o.*	QD×3 tuần	QD×17 ngày
4	10	erlotinib	50	*p.o.*	QD×2 tuần	QD×3 tuần
5	10	crizotinib	50	*p.o.*	QD×3 tuần	QD×3 tuần
6	10	cetuximab	1 mg/chuột	*i.p.*	Q4d*6	Q4d*6

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

QD: một lần hàng ngày Q4d: mỗi một lần trong bốn ngày; khoảng thời gian kết hợp crizotinib và erlotinib là 0,5 giờ; thể tích liều được điều chỉnh dựa trên cân nặng cơ thể (10 l/g); : liều lượng được quy định vào ngày 14 bố trí nhóm.

Trước khi bắt đầu điều trị, tất cả các con vật được cân và thể tích các khối u được đánh giá. Vì thể tích khối u có thể ảnh hưởng đến tính hiệu quả của bất kỳ việc điều trị nhất định, những con chuột được phân thành các nhóm bằng cách sử dụng bố trí khối ngẫu nhiên dựa vào các thể tích khối u của chúng. Điều này đảm bảo rằng tất cả các nhóm có thể so với ở tại đường chuẩn. Sự bố trí khối ngẫu nhiên được sử dụng để phân các con vật thực nghiệm vào các nhóm. Thứ nhất, các con vật thực nghiệm được chia thành các khối đồng nhất theo thể tích khối u ban đầu của chúng. Thứ hai, trong mỗi khối, tiến hành lấy ngẫu nhiên các con vật thực nghiệm để điều trị. Bằng cách sử dụng

bố trí khối ngẫu nhiên đ để phân các con vật thực nghiệm đảm bảo rằng mỗi con vật có cùng xác xuất được phân vào sự điều trị nhất định và do đó sai số hệ thống được giảm.

Ở thời điểm theo dõi hàng này, các con vật được kiểm tra cho bất kỳ tác động tăng trưởng khối u và điều trị về cách hành vi bình thường, như khả năng di chuyển, sự đánh giá bằng mắt về mức tiêu thụ thức ăn và nước, cân nặng cơ thể tăng cân/sút cân (các cân nặng cơ thể được đánh giá hai lần một tuần), tác động mắt/thảm lông và bất kỳ tác động bất thường nào khác.

Ở thời điểm cuối hoặc sự tăng trưởng khối u có thể được trì hoãn hoặc chuột mang khối u có thể được chữa khỏi. Kích thước khối u được đánh giá hai lần một tuần theo hai chiều bằng cách sử dụng thước cặp, và thể tích được biểu hiện theo mm^3 bằng cách sử dụng công thức: V = 0,5 a x b2 trong đó a và b lần lượt là các đường kính dài ngắn của khối u. Kích thước khối u sau đó được sử dụng cho các tính toán cả hai trị số T-C và T/C. T-C được tính toán với T là thời gian (trong ngày) cần thiết cho kích thước khối u trung bình của nhóm điều trị đạt tới 1000 mm^3, và C là thời gian (trong ngày) cho kích thước khối u trung bình của nhóm đối chứng đạt tới cùng kích thước. Trị số T/C (theo phần trăm) thể hiện tính hiệu quả kháng u; T và C là thể tích khối u trung bình lần lượt của các nhóm được điều trị và nhóm đối chứng, vào một ngày nhất định. Toàn bộ khối u hồi quy (CR- Complete Tumor Regression) được xác định là các khối u mà bị giảm xuống mức giới hạn sờ nắn (62,5 mm^3). Một phần khối u hồi quy (PR- Partial Tumor Regression) được xác định là các khối u mà được làm giảm từ thể tích khối u ban đầu. Khoảng thời gian tối thiểu của CR hoặc PR trong 3 hoặc nhiều phép đo khối u liên tiếp là cần thiết cho CP hoặc PR được xem là lâu bền.

Những con vật mà cân nặng cơ thể sụt quá 20%, hoặc có kích thước khối u trung bình của nhóm vượt quá 2000 mm^3 được trợ tử. Các nghiên cứu được chấm dứt sau hai tuần quan sát sau liều cuối cùng.

Các thống kê tóm tắt, bao gồm số trung bình và sai số chuẩn của số trung bình (SEM- Tiêu chuẩn Error of the Mean), được cung cấp cho thể tích khối u của mỗi nhóm ở mỗi time thời điểm được thể hiện trong Bảng 15. Các phân tích thống kê sự khác nhau về thể tích khối u trong số các nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng ANOVA một chiều sau đó là các so với cá thể bằng cách sử dụng Games-Howell (phương sai bằng nhau không được đánh giá). Tất cả dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng SPSS 18,0. $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Bảng 15

Các ngày	Thể tích khối u (mm^3)a					
	Chất dẫn thuốc	Phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép ở 25mg/kg	crizotinib ở 50mg/kg	erlotinib ở 50mg/kg	crizotinib; erlotinib ở 50mg/kg; 50mg/kg	cetuximab ở 1 mg/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 thước khối u trung bình của nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc (Nhóm 1) đạt 1,758 mm^3 ở ngày 23 sau khi ghép khối u. Việc điều trị với phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép ở mức độ liều 25 mg/kg (Nhóm 2) dẫn tới toàn bộ khối u hồi quy (CR) trong tất cả con chuột là lâu bền trong >3 các phép đo khối u liên tiếp (trung bình TV=23 mm^3, trị số T/C = 1%, p= 0,004 được so với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc ở ngày 23).

Việc điều trị bằng crizotinib là chất duy nhất ở mức độ liều 50 mg/kg (Nhóm 3) đã thể hiện không có hoạt tính kháng u; kích thước khối u trung bình là 2,102 mm^3 ở ngày 23 (trị số T/C =120%, p= 0,944 so với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc).

Việc điều trị bằng erlotinib là chất duy nhất ở mức độ liều 50 mg/kg (Nhóm 4) đã thể hiện hoạt tính kháng u nhỏ, nhưng không có sự khác nhau đáng kể được phát hiện so với nhóm chất dẫn thuốc; kích thước khối u trung bình là 1,122 mm^3 ở ngày 23 (trị số T/C =64%, p= 0,429 so với nhóm chất dẫn thuốc), với 4 ngày trì hoãn tăng trưởng khối u ở lúc kích thước khối u là 1,000 mm^3 so với nhóm chất dẫn thuốc.

Sự kết hợp của crizotinib (50 mg/kg, Nhóm 5) và erlotinib (50 mg/kg, Nhóm 5) đã thể hiện hoạt tính kháng u đáng kể; kích thước khối u trung bình là 265 mm^3 ở ngày 23 (T/C=15%; p= 0,008), với 17 ngày trì hoãn sự tăng trưởng khối u ở lúc kích thước khối u là 1,000 mm^3 so với nhóm chất dẫn thuốc.

Cetuximab ở mức độ liều 1 mg/con chuột là chất duy nhất (Nhóm 6) đã thể hiện các hoạt tính kháng u đáng kể; kích thước khối u trung bình là 485 mm^3 ở ngày 23 (T/C=28%; p=0,018), với 17 ngày trì hoãn sự tăng trưởng khối u ở lúc kích thước khối u là 1,000 mm3 so với nhóm chất dẫn thuốc. Fig.15 và Bảng 16 thể hiện các hoạt tính kháng u của các liệu pháp khác nhau.

Bảng 16

Sự điều trị	Kích thước khối u (mm^3) ở ngày 23	T/C (%)	T-C (các ngày) ở 1000 mm^3	*Trị số P*
Chất dẫn thuốc	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/chuột)	485±61	28	17	0,018

Trung bình về sự sụt cân nặng cơ thể trầm trọng được quan sát trong nhóm chất dẫn thuốc mà có thể là do sự tăng của cụm khối u; 3 con chuột bị chết và 1 con chuột được trợ tử khi BWL>20% vào ngày 23. Độc tố nhẹ của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được quan sát trong Nhóm 2; 3 con chuột được trợ tử khi BWL>20% trong suốt thời gian điều trị; cân nặng cơ thể được hồi phục dần dần khi việc điều trị được bỏ trong suốt 2 tuần của thời gian quan sát. Việc sụt cân nặng cơ thể trầm trọng hơn được quan sát trong nhóm liệu pháp đơn crizotinib hoặc erlotinib so với với nhóm chất dẫn thuốc.

cho thấy độc tố liên quan tới việc điều trị. Sự kết hợp của crizotinib và erlotinib thường được được điều chỉnh trong suốt giai đoạn cho uống thuốc, nhưng cân nặng cơ thể sụt nghiêm trong được quan sát ở cuối quá trình nghiên cứu, mà có thể là do sự khôi phục tăng trưởng khối u nhanh chóng trong suốt thời gian không điều trị. Liệu pháp đơn cetuximab được điều chỉnh tốt trong nghiên cứu; việc sụt cân nặng cơ thể được quan sát duy nhất ở cuối quá trình nghiên cứu do sự hồi phục lại 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) tạo ra sự đáp ứng hoàn toàn trong mô hình ghép ngoại lai ung thư phổi ở người H292-HGF ở chuột SCID Beige. Việc điều trị được điều chỉnh ở 7 trong số 10 con chuột chuột, và dẫn đến sự sụt cân nặng cơ thể trầm trọng ở 3 trong số 10 con chuột. Fig.9 thể hiện tác động của các liệu pháp khác nhau trên kích thước khối u trong các thời điểm sau khi điều trị.

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

Nhiều phương pháp đã được mô tả để làm giảm việc lọc thận và do đó kéo dài chu kỳ bán hủy huyết thanh của các protein bao gồm việc biến đổi polyetylen glycol (PEG) hoặc các polymer khác, sự gắn kết với albumin, sự dung hợp với các miền protein mà gắn kết to albumin hoặc các protein huyết thanh khác, sự dung hợp có tính chất di truyền với albumin, sự dung hợp với các miên IgG Fc, và dung hợp với các trình tự axit amin không được cấu trúc, dài.

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được biến đổi với PEG để làm tăng bán kính thủy động bằng cách gắn cystein tự do ở đầu cuối C của phân tử. Thông thường nhất, nhóm thiol tự do của gốc cystein được sử dụng để gắn các phân tử PEG mà được chức hóa với các nhóm maleimit hoặc iodoaxetemit 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 mạch thẳng có 1000, 2000, 5000, 10,000, 20,000, hoặc 40,000 kDa. Các phân tử PEG được phân nhánh gồm các trọng lượng phân tử này có thể cũng được sử dụng cho sự biến đổi. Các nhóm PEG có thể cũng được gắn thông qua các amin bậc một trong các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép trong một số trường hợp.

Ngoài PEGylation, chu kỳ bán hủy của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được kéo dài bằng cách tạo ra các protein làm các phân tử dung hợp có miền gắn albumin huyết thanh bó 3 xoắn dạng tự nhiên (ABD) hoặc miền gắn albumin liên ứng (ABDCon-consensus albumin binding domain). Các miền protein này được liên kết với đầu cuối C

của miền FN3 gắn kết c-Met thông bất kỳ mối liên kết nào được mô tả trong Bảng 12. Miền ABD hoặc ABDCon có thể cũng được đặt giữa miền FN3 gắn kết EGFR và miền FN3 gắn kết c-Met theo trình tự bậc một.

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

Các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép được lựa chọn đặc trưng cho ái lực của chúng với cả hai EGFR và c-Met, khả năng để ức chế EGFR và c-Met tự phosphoryl hóa của chúng, và tác dụng của chúng lên sự tăng sinh của các tế bào HGF. Sự gắn kết ái lực của các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép với EGFR tái tổ hợp và/hoặc miền ngoại bào c-Met còn được đánh giá bằng các phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng Thiết bị Proteon (BioRad) theo phác đồ được mô tả trong Ví dụ 3. Các kết quả đặc trưng được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 17.

	K_D (EGFR, nM)	K_D (c-Met, nM)	Sự ức chế pMet trong các tế bào H441 (IC_{50}, nM)	Sự ức chế H292 pEGFR trong các tế bào H292 (IC_{50}, nM)	Ức chế sự tăng sinh H292-HGF trong các tế bào H292 do cảm ứng 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

Ví dụ 10. Sự tạo ra các kháng thể EGFR/-c-Met đặc hiệu kép

Một số các kháng thể EGFR và c-Met đặc hiệu đơn được biểu hiện như IgG1, kappa, có các sự thay thế K409R hoặc F405L của Fc (việc đánh số theo chỉ số EU) trong các vùng Fc của chúng. Các kháng thể đặc hiệu đơn được biểu hiện trong hai dòng tế

bào CHO, một dòng tế bào đã làm giảm khả năng fucosylat hóa dẫn đến các kháng thể có từ 1 đến 15% hàm lượng fucoza trong chuỗi polysaccharit kháng thể.

Các kháng thể đặc hiệu đơn được tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn bằng cách sử dụng cột Protein A (cột HiTrap MabSelect SuRe). Sau khi rửa giải, các nhóm được thẩm tách thành D-PBS, độ pH 7,2

Các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách kết hợp EGFR mAb đặc hiệu đơn và c-Met mAb đặc hiệu đơn trong trao đổi nhánh Fab *in vitro* (như được mô tả trong WO2011/131746). Tóm lại, tại nồng độ khoảng từ 1 đến 20 mg/ml ở tỷ lệ mol là 1:1 của mỗi kháng thể trong PBS, độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,4 và 75 mM 2-mercaptoetanolamin (2-MEA) được trộn với nhau và được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 37°C trong khoảng thời gian từ 2 đến 6 giờ, sau đó là loại bỏ 2-MEA thông qua việc thẩm tách, pha loãng, lọc dòng chảy tiếp tuyến và/hoặc lọc tế bào được zoay bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Một số kháng thể kháng EGFR và kháng thể kháng c-Met đặc hiệu đơn được kết hợp trong nền trong sự trao đổi nhánh Fab *in vitro* để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép mà sau đó được mô tả thêm. Các kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra được xếp loại bằng cách sử dụng chiến lược bốn bước bằng cách sử dụng các thử nghiệm như sau: Bước 1: gắn kết với các tế bào NCI-H441, NCI-H1975 và A549 trong thử nghiệm FACS. Bước 2: ức chế sự phosphoryl hóa pMet trong các tế bào A549. Bước 3: ức chế sự tăng sinh trong các tế bào NCI-H1975, KP4 và NCI-H441. Bước 4: ức chế sự phosphoryl hóa EGFR trong các tế bào A549 và SNU-5. Đáng chú ý, các đặc trưng của các kháng thể gốc không được lưu giữ trong kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ, sự có mặt của các nhóm gắn kết EGFR nhất định trong kháng thể đặc hiệu kép dẫn đến mất hoặc làm giảm sự ức chế, hoặc sự phosphoryl hóa c-Met được tăng cường. Dựa trên các nghiên cứu nghiên cứu đặc trưng lựa chọn các cặp được chọn.

Kháng thể kháng EGFR E1-K409R hóa trị hai đặc hiệu đơn được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng EGFR 2F8 có VH có SEQ ID SỐ: 189 và VL có SEQ ID SỐ: 190 (kháng thể 2F8 là được mô tả trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2002/100348) và vùng cố định IgG1 với sự thay thế K409R.

Kháng thể kháng EGFR E1-F405L hóa trị hai đặc hiệu đơn được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng EGFR 2F8 có VH có SEQ ID SỐ: 189 và VL

có SEQ ID SỐ: 190 (kháng thể 2F8 được mô tả trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2002/100348) và vùng cố định IgG1 có sự thay thế F405L.

Kháng thể kháng EGFR E2-K409R hóa trị hai đặc hiệu đơn được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng EGFR 018 có VH có SEQ ID SỐ: 191 và VL có SEQ ID SỐ: 192 (kháng thể 018 được mô tả trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2009/030239) và vùng cố định IgG1 với sự thay thế K409R.

Kháng thể kháng EGFR E2-F405L hóa trị hai đặc hiệu đơn được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng EGFR 018 có VH có SEQ ID SỐ: 191 và VL có SEQ ID SỐ: 192 (kháng thể 018 được mô tả trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2009/030239) và vùng cố định IgG1 có sự thay thế F405L.

Kháng thể kháng c-Met M1-K409R hóa trị hai đặc hiệu đơn được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng c-Met 069 có VH có SEQ ID SỐ: 193 và VL có SEQ ID SỐ: 194 (kháng thể 069 được mô tả trong WO2011/110642) và vùng cố định IgG1 với sự thay thế K409R.

Kháng thể kháng c-Met M1-F405L hóa trị hai đặc hiệu đơn được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng c-Met 069 có VH có SEQ ID SỐ: 193 và VL có SEQ ID SỐ: 194 (kháng thể 069 được mô tả trong WO2011/110642) và vùng cố định IgG1 có sự thay thế F405L.

Kháng thể kháng c-Met đặc hiệu đơn M2-K409R được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL của kháng thể kháng c-Met 058 có VH có SEQ ID SỐ: 195 và VL có SEQ ID SỐ: 196 (kháng thể 058 được mô tả trong WO2011/110642) và vùng cố định IgG1 với sự thay thế K409R.

Kháng thể kháng c-Met đặc hiệu đơn M2-F405L được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL ocủa kháng thể kháng c-Met 058 có VH có SEQ ID SỐ: 195 và VL có SEQ ID SỐ: 196 (kháng thể 058 được mô tả trong WO2011/110642) và vùng cố định IgG1 có sự thay thế F405L.

Các trình tự VH, VL, HC và LC của các kháng thể được thể hiện dưới đây:

>SEQ ID SỐ: 189 EGFR mAb E1 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIT
MVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 190EGFR mAb E1 VL
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSL
ESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

>SEQ ID SỐ: 191 EGFR mAb E2 VH
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA
PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRADNKNSLY LQMNSLRAED
TAVYYCARDL GWGWGWYFDL WGRGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 192 EGFR mAb E2 VL
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ
GTKVEIK

>SEQ ID SỐ: 193 cMet mAb M1 VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWI
SAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRG
TNYFDYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 194 cMet mAb M1VL
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASS
LLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP-ITFGQGTRLEIK

>SEQ ID SỐ: 195 cMet mAb M2 VH
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATIS
DDGSYTYYPDSVKGRFTISRADNKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYY
YGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 196 cMet mAb M2 VL
QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK
>SEQ ID SỐ: 199EM1-mAb H1 (kháng EGFR,405L)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIT
MVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 200EM-1 mAb L1
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSL
ESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>SEQ ID SỐ: 201 EM-1 mAb H2 (K409R, kháng cMet)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWI
SAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRG
TNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 202 EM-1 mAb L2
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASS
LLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>SEQ ID SỐ: 234 E2 mAb HC1 (EGFR-F405L)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRADNKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV L TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFLLYSK LTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

>SEQ ID SỐ: 235E2 mAb LC1 (EGFR)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV ADN LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVT KSFNRGEC

>SEQ ID SỐ: 236 E2 mAb HC2 (c-Met- K409R)

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYYMYWVRQT PEKRLEWVAT IS DDGSYTYYPD SVKGRFTISR ADNKNNLYLQ MSSLKSEDTA MYYCAREGLY Y YGSGSYYNQD YWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV L TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

>SEQ ID SỐ: 237

E2 mAb LC2 (cMet)

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Các kháng thể kháng EGFR và c-Met đặc hiệu đơn được tạo ra được trộn để trao đổi nhánh Fab *in vitro* trong nền và được mô tả trong các thử nghiệm khác nhau. Kháng thể EM1-mAb đặc hiệu kép bao gồm nhánh gắn kết EGFR của mAb E1-F405L và nhánh gắn kết c-Met của mAb M1-K409R. Kháng thể đặc hiệu kép EM2-mAb bao gồm nhánh gắn kết EGFR của mAb E2-F405L và nhánh gắn kết c-Met của mAb M2-K409R. Kháng thể đặc hiệu kép EM3-mAb bao gồm nhánh gắn kết EGFR của mAb E1-K409R và nhánh gắn kết c-Met của mAb M1-F405L. Kháng thể đặc hiệu kép EM4-mAb bao gồm nhánh gắn kết EGFR của mAb E2-K409R và nhánh gắn kết c-Met của mAb M2-F405L. EM1-mAb và EM3-mAb có các đặc trưng so với được.

EM1-mAb đặc hiệu kép được nuôi cấy trong dòng tế bào CHO có khả năng fucosylat hóa của các protein glycol được làm giảm, và sau đó có hàm lượng fucosyl nằm trong khoảng từ 1 đến 15%. Việc loại bỏ lõi fucoza khỏi các oligosacarit loại phức hợp nhánh kép được gắn vào các vùng Fc được tăng cường đáng kể ADCC của các kháng thể thông qua gắn kết FcγRIIIa được cải thiện mà không thay đổi sự gắn kết kháng nguyên hoặc hoạt tính CDC. Các mAb này có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã được báo cáo dẫn đến biểu hiện thành công của các kháng thể liệu pháp điều trị tái fucosylat hóa tương đối cao mang loại phức hợp nhánh kép của các oligosacarit Fc và được mô tả ở trên.

Ví dụ 11. Tinh chế các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép

EM1-mAb đặc hiệu kép còn được tinh chế sau khi trao đổi nhánh Fab *in vitro* bằng cách sử dụng sắc ký tương tác kỵ nước để giảm thiểu các kháng thể c-Met và EGFR gốc dư bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Ví dụ 12. Đặc trưng của các kháng thể GFR/c-Met đặc hiệu kép

Kháng thể đặc hiệu kép EGFR/c-Met EM1-mAb được kiểm tra trong các thử nghiệm khác nhau cho các đặc trưng của nó bao gồm sự ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG, sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF, sự phosphoryl hóa ERK1/2, sự phosphoryl hóa AKT, sự ức chế gắn kết phối tử và khả năng sống được của tế bào. Các đặc trưng của EM1-mAb được so với các kháng thể gắn kết EGFR hoặc c-

Met hóa trị một đối chứng, và với các chất ức chế EGFR đã biết như erlotinib (CAS 183321-74-6; chất ức chế tyrosin kinaza) và cetuximab (CAS 205923-56-4).

Như các kháng thể gốc của các kháng thể EM-1 mAb có hóa trị hai, các kháng thể EGFR và c-Met hóa trị một đối chứng được tạo ra trong định dạng đặc hiệu kép được kết hợp với nhánh Fab mà gắn kết với kháng nguyên không liên quan/không thích hợp để so với chính xác sự hiệp đồng và ái lực của EM1-mAb đặc hiệu kép trong so với hỗn hợp của các phân tử hóa trị một đối chứng tương ứng.

Để tạo ra các kháng thể EGFR và c-Met hóa trị một đối chứng, kháng thể kháng HIV gp120 đặc hiệu đơn gp120-K409R được tạo ra bao gồm chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 198 và chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 209. Kháng thể kháng HIV gp120 đặc hiệu đơn gp120-F405L được tạo ra bao gồm chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 197 và chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 209.

mAb E1-F405L-gp120-K409R kháng EGFR hóa trị một đối chứng được tạo ra bằng cách trao đổi nhánh Fab *in vitro* giữa E1-F405L và gp120-K409R, và mAb M1-K409R -gp120- F405L kháng cMet hóa trị một đối chứng được tạo ra bằng cách trao đổi nhánh Fab *in vitro* giữa M1- K409R và gp120- F405L và được tinh chế như được mô tả trước đó.

Các dòng tế bào sau đó được sử dụng trong sự mô tả các kháng thể đặc hiệu kép: NCI-H292 (American Type Culture Collection (ATCC), Cat. No. CRL-1848), NCI-H1975 (ATCC Cat. No.CRL-5908), SKMES-1 (ATCC Cat. No.HTB-58), A431 (ATCC Cat. No. CRL-1555), NCI-H441 (ATCC Cat. No.HTB-174), NCI-H3255 (nguồn khối u/ dòng tế bào DCTD, NCI, Frederick, NCI-Navy Medical oncology Cell Line supplement. J Cell Biochem suppl 24, 1996; Tracy S. cancer Res 64:7241-4, 2004; Shimamura T. cancer Res 65:6401-8, 2005) và HCC-827 (ATCC Cat. No. CRL-2868). Các tế bào NCI-H292 và SKMES-1 biểu hiện cả hai loại dại EGFR và loại dại c-Met. NCI-3255 biểu hiện thể đột biến L858R EGFR và biểu hiện EGFR và sự khuếch đại c-Met. H1975 biểu hiện thể đột biến L858R/T790M EGFR và loại dại c-Met. HCC-827 biểu hiện Δ (E746, A750) EGFR và biểu hiện sự khuếch đại EGFR. Dòng tế bào NCI-H292, NCI-H975, NCI-H441 and NCI-H3255 có thể hoán đổi cho nhau được gọi tắt lần lượt là H292, H975, H441 và H3255, trong các đặc điểm kỹ thuật.

Sự Gắn kết các kháng thể EGFR/-c-Met đặc hiệu kép với EGFR và c-Met trên các tế bào (Thử nghiệm Gắn kết Tế bào A431)

Kháng thể EGFR/c-Met EM1-mAb đặc hiệu kép được kiểm tra đối với sự gắn kết với EGFR và c-Mettrên các tế bào bằng cách sử dụng phác đồ được mô tả trong Ví dụ 3 ("Thử nghiệm Gắn kết Tế bào A431") và Ví dụ 6 ("Thử nghiệm Gắn kết Tế bào H441"). Cetuximab và kháng thể hóa trị một đối chứng đối với EGFR E1-F405L-gp120-K409R được sử dụng làm các đối chứng cho các tế bào A431. Cetuximab có trị số EC_{50} là 5,0 nM. Bảng 18 thể hiện các trị số EC_{50} cho sự gắn kết. EM1-mAb đã chứng minh sự giảm 1,9 lần (các tế bào A431) và 2,3 lần (các tế bào H441) trong sự gắn kết khi so với các kháng thể đối chứng gốc đặc hiệu đơn hóa trị hai. Cetuximab được so với các kháng thể đối chứng hóa trị hai gốc. EM1-mAb biểu hiện các trị số gắn kết EC_{50} cao hơn các trị số cho các mAb gốc do sự gắn kết của EGFR và c-Met hóa trị một. EM1-mAb có các trị số gắn kết EC_{50} tương tự như mAbs hóa trị một đặc hiệu kép có nhánh E1/nhánh trơ và E2/nhánh trơ đơn.

Bảng 18.

	Sự gắn kết EC_{50} (nM) với các tế bào		
	EM1-mAb	Các mAb gốc	E1-F405L-gp120-K409R (các tế bào A431) hoặc M1-K409R -gp120- F405L (các tế bào H441)
A431 (thử nghiệm đối với gắn kết EGFR)	9,6 ± 3	5,1 ± 0,3	10,1 ± 0,6
H441 (thử nghiệm đối với gắn kết c-Met)	1,5 ± 0,7	0,65 ± 0,1	1,0 ± 0,3

Sự ức chế phối tử gắn kết với thụ thể

Các kháng thể đặc hiệu kép được kiểm tra về khả năng phong bế gắn kết của EGF với EGFR miền ngoại bào và HGF với miền ngoại bào c-Met của chúng trong thử nghiệm ELISA. EGF R-Fc ở người tái tổ hợp (Các hệ thống R&D, Cat #: 344-ER-050) hoặc HGF ở người (Các hệ thống R&D, Cat #: 294-HGN-025/CF) được phủ lên trên các đĩa MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) trong khoảng 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch đệm MSD Blocker A (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong khoảng 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Các đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch đệm HEPES 0,1 M, độ pH 7,4, sau

đó là bổ sung hỗn hợp của EGF được đánh dấu dy huỳnh quang khác (MSD) hoặc các protein HGF được biotinylat hóa với các nồng độ khác nhau của các kháng thể. Protein EGF được đánh dấu Ruteni được ủ trong khoảng 30 phút ở RT với việc tăng các nồng độ của các kháng thể khác nhau, từ 1 nM đến 4 μM. Sau 2 giờ ử với lắc nhẹ nhàng ở nhiệt độ phòng, các đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm HEPES 0,1M (độ pH 7,4). Dung dịch đệm MSD Đọc T được pha loãng và bị tái huyền phù và các tín hiệu được phân tích bằng SECTOR Imager 6000. các thử nghiệm ức chế HGF được thực hiện như các thử nghiệm ức chế EGF/EGFR ngoại trừ 10 nM HGF được biotinylat hóa được ủ trong khoảng 30 phút ở RT với việc tăng các nồng độ của các kháng thể khác nhau, nằm trong khoảng từ 1 nM đến 2 μM.

EM1-mAb ức chế EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} là 10,7 nM + 1,2 trong sự có mặt 50 nM EGF và có trị số IC_{50} là 10,6 + 1,5 nM trong sự có mặt 80 nM EGF. Kháng thể hóa trị hai gốc ức chế EGF gắn kết với EGFR có trị số IC_{50} là 0,14 + 1,5 nM trong sự có mặt 50 nM EGF và có trị số IC_{50} là 1,7 + 1,4 nM trong sự có mặt 80 nM EGF. EM1 mAb có sự ức chế gắn kết EGF với miền ngoại bào EGFR yếu hơn bởi vì sự gắn kết hóa trị một của EM1 mAb khi so với mAb hóa trị hai gốc.

EM1-mAb ức chế HGF gắn kết với c-Met có trị số IC_{50} là 29,9 + 1,5 nM. kháng thể hóa trị hai gốc ức chế HGF gắn kết với c-Met có IC_{50} là 14,8 + 1,6 nM. EM1 mAb có sự ức chế HGF gắn kết với miền ngoại bào cMet yếu hơn bởi vì sự gắn kết hóa trị một của EM1-mAbkhi so với mAb hóa trị hai gốc.

Sự ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG và Sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF

Các kháng thể được kiểm tra để xác định các trị số IC_{50} cho sự ức chế phosphoryl hóa EGFR và c-Met. Sự ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG và sự phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF được đánh giá ở các nồng độ kháng thể thay đổi (0,035 – 700 nM cuối) như được mô tả trong Ví dụ 2 ("Sự ức chế phosphoryl hóa EGFR do cảm ứng EFG") và Ví dụ 6 ("Sự ức chế phosphoryl hóa c-Met do cảm ứng HGF"). Trong một số thực nghiệm, cả EGF và HGF được bổ sung vào sự phosphoryl hóa EGFR và c-Met.

mAb kháng EGFR E1-F405L-gp120-K409R hóa trị một đối chứng cho EGFRvà kháng thể hóa trị hai gốc kháng EGFR có hàm lượng fucoza thấp được sử dụng làm các kháng thể đối chứng. Bảng 19 thể hiện các trị số IC_{50} của các thử nghiệm.

Bảng 19.

	pEGFR (IC_{50}, nM)		pMet (IC_{50}, nM)	
Dòng tế bào	H292	H1975	H292	H1975
Kháng thể				
EM1-mAb	8,6-29	1,5	0,55 – 0,83	0,64
E1-F405L-gp120-K409R	10,9-13,1	ND	0,7-4	ND
EGFR (F405L)mAb* Gốc	1,5	ND	Không ảnh hưởng	ND

Sự ức chế pERK và pAKT được tăng cường với EM1-mAb So với Hỗn hợp Các kháng thể hóa trị một (thử nghiệm mAb pERK) (thử nghiệm mAb pAKT)

Khả năng để sự hiệu nghiệm được tăng cường với kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được đánh giá bằng cách đánh giá các ảnh hưởng mAb trên tín hiệu xuôi dòng pERK và pAKT. Đối với các thực nghiệm này, hỗn hợp EGFR đối chứng hóa trị một và các kháng thể c-Met đối chứng hóa trị một được so với EM1-mAb đặc hiệu kép. Các tế bào được gieo trong toàn bộ các đĩa có 96 giếng được xử lý nuôi cấy mô (Nunc) trong môi trường RPMI 100 µL/giếng chứa GlutaMAX và 25 mM Hepes (Invitrogen), được bổ sung 1 mM natri pyruvate (Gibco), 0,1 mM NEAA (Gibco), 10% huyết thanh thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt (Gibco), và 7,5 ng/mL HGF (Các hệ thống R&D cat # 294-HGN) và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong môi trường CO2 5% được làm ẩm. Các tế bào bị bỏ đói huyết thanh. Các tế bào được xử lý trong khoảng 30 phút (thử nghiệm pERK) hoặc 1 giờ (thử nghiệm pAkt) có các nồng độ thay đổi (từ 0,11 đến 700 nM cuối) của các kháng thể hoặc EM1-mAb đối chứng hóa trị một.

Các tế bào được đánh giá về các mức độ pERK hoặc pAKT bằng cách sử dụng các kit sau đây và theo các hướng dẫn của nhà sản xuất từ Meso Scale Discovery: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; Thr185/Tyr187) Kit Thủy phân Tế bào Toàn bộ dùng cho Thử nghiệm (cat# K151DWD, Phospho-Akt (Ser473) Kit Thủy phân Tế bào Toàn bộ dùng cho Thử nghiệm (cat#K151CAD), Phospho-Akt (Thr308) Kit Thủy phân Tế bào Toàn bộ dùng cho Thử nghiệm (cat#K151DYD). Đối với thử nghiệm pERK, các tế bào được ly giải, và toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào được bổ sung vào các đĩa được phủ bằng kháng thể kháng phospho-ERK1/2 (nhận diện ERK1 bị phosphoryat hóa

ở các gốc Thr202 và Tyr204 và ERK2 bị phosphorylate hóa ở các gốc Thr185 và Tyr187), và ERK1/2 bị phosphorylate hóa được phát hiện bằng kháng thể kháng tổng số ERK1/2 được tiếp hợp với thuốc thử MSD SULFO-TAGTM. Đối với thử nghiệm pAKT Ser473, kháng thể bắt là kháng thể kháng toàn bộ AKT và kháng thể phát hiện kháng thể kháng pAKT Ser473 được tiếp hợp với thuốc thử MSD SULFO-TAGTM. Đối với thử nghiệm pAKT Thr308, kháng thể bắt là kháng thể kháng toàn bộ AKT và kháng thể phát hiện kháng thể kháng pAKT Thr308 được tiếp hợp với thuốc thử MSD SULFO-TAGTM.

Các đĩa được đọc trên thiết bị SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) bằng cách sử dụng các thiết lập mặc định thử nghiệm-đặc hiệu nhà sản xuất cài đặt. Dữ liệu được biểu diễn bằng đồ thị là tín hiệu điện hóa phát quang dựa vào logarit của nồng độ kháng thể và các trị số IC_{50} được xác định bằng cách khớp dữ liệu với sự đáp ứng liều hình xichma có độ dốc thay đổi bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5. Các dòng tế bào NCI-H292, H1975 và SKMES-1 được sử dụng trong các thử nghiệm này.

Trị số IC_{50} cho sự ức chế phosphoryl hóa ERK bằng EM1-mAb đặc hiệu kép nhỏ hơn khoảng từ 14 đến 63 lần tương đối với hỗn hợp hai kháng thể đối chứng hóa trị một, phụ thuộc vào dòng tế bào được kiểm tra(Bảng 20). Sự hiệu nghiệm được cải thiện của EM1-mAb so với hỗn hợp hai kháng thể đối chứng hóa trị một thể hiện tác dụng hiệp đồng hoặc tác dụng ái lực do sự gắn kết của EM1-mAb với các dòng tế bào này được tăng cường. IC_{50} cho sự ức chế phosphoryl hóa Ser475 (pAKTS475) và Thr308 (pAKTT308) AKT trong dòng tế bào NCI- H1975 nhỏ hơn lần lượt khoảng 75 lần và 122 lần, khi so với hỗn hợp hai kháng thể đối chứng hóa trị một (Bảng 21). Sự hiệu nghiệm của EM1-mAb được cải thiện so với hỗn hợp hai kháng thể đối chứng hóa trị một thể hiện tác dụng hiệp đồng hoặc tác dụng ái lực do sự gắn kết của EM1-mAb vào các dòng tế bào này được tăng cường. Do đó, bản chất đặc hiệu kép của EM1-mAb dẫn đến tác dụng được tăng cường trên các cơ quan tác động tín hiệu xuôi dòng.

Bảng 20.

	IC_{50} (nM) pERK		
	Kháng thể		
Dòng tế bào	EM1-mAb đặc hiệu kép	Hỗn hợp của E1-F405L-gp120-K409R và M1-K409R-gp120-F405L	Nếp gấp thay đổi đặc hiệu kép với hỗn hợp hai kháng thể đối chứng hóa trị một
H292	0,64	34,94	55
H1975	1,67	106	63

Bảng 21.

Kháng thể	IC_{50} (nM) pAKTS473	IC_{50} (nM) pAKTT308
EM1-mAb đặc hiệu kép	0,87	0,96
Hỗn hợp của E1-F405L-gp120-K409R và M1-K409R-gp120-F405L	65	117
Nếp gấp thay đổi của hỗn hợp gồm hai đặc hiệu đơn với đặc hiệu kép	75	122

Ức chế sự Tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người hoặc Khả năng sống được bằng các Kháng thể

Sự ức chế sự tăng trưởng tế bào phụ thuộc c-Met được đánh giá bằng cách đo khả năng sống được của các tế bào khối u khác nhau sau khi tiếp xúc với EM1-mAb đặc hiệu kép. Các tế bào NCI-H292, SKMES-1, NCI-H1975 và NCI-H3255 được sử dụng trong các nghiên cứu.

Các tế bào được nuôi cấy theo tiêu chuẩn 2D và các dạng gắn thấp. Erlotinib và cetuximab được sử dụng làm các đối chứng. Bảng 22 tóm tắt các trị số IC_{50} về thử nghiệm.

Ức chế sự Tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người hoặc Khả năng sống được bằng các Kháng thể –định dạng tiêu chuẩn 2D

Sự ức chế tăng trưởng tế bào được đánh giá bằng cách đo khả năng sống được của NCI-H292 và NCI-H1975 sau khi tiếp xúc với các dạng các kháng thể trong hai. Các tế bào đối với dạng tiêu chuẩn 2D được gieo trong các đĩa có 96 giếng được xử lý nuôi cấy mô màu trắng mờ đục (PerkinElmer) trong môi trường RPMI chứa GlutaMAX và 25 mM Hepes (Invitrogen), được bổ sung với 1 mM natri pyruvate (Gibco), 0,1mM NEAA (Gibco), và 10% huyết thanh thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt (Gibco), và cho phép gắn qua đêm ở nhiệt độ 37°C, CO2 5%. Các tế bào được xử lý có các nồng độ các kháng thể thay đổi (từ 0,035 đến 700 nM cuối), cùng với HGF (7,5 ng/mL, Các hệ thống R&D cat #294-HGF), sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong khoảng 72 giờ. Một số giếng được để không điều trị với một trong hai HGF hoặc các kháng thể làm các đối chứng. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách sử dụng Tế bàoTiter-Glo® thuốc thử (Promega), và dữ liệu được phân tích như được mô tả trong Ví dụ 3 trong "Sự ức chế Tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người (thử nghiệm sự tăng trưởng NCI-H292 và sự tăng trưởng NCI-H322)".

Ức chế Sự tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người hoặc Khả năng sống được bằng các Kháng thể – Dạng gắn thấp

To đánh giá sự sống trong các điều kiện gắn thấp, các tế bào được gieo trong các đĩa gắn cực thấp (Ultra Low Attachment) có 96 giếng (Corning Costar) trong môi trường RPMI 50 µL/giếng (Invitrogen) chứa GlutaMAX và 25mM Hepes, được bổ sung 1 mM natri pyruvate (Gibco), 0,1 mM NEAA (Gibco), và 10% huyết thanh thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt (Gibco), và cho phép gắn qua đêm ở 37°C, CO_2 5%. Các tế bào được xử lý với các nồng độ các kháng thể thay đổi (từ 0,035 đến 700 nM cuối), cùng với HGF (7,5 ng/mL, Các hệ thống R&D cat# 294-HGN), sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong khoảng 72 giờ. Một số giếng được để không điều trị với một trong hai HGF hoặc các kháng thể làm các đối chứng. Các tế bào có thể sống được phát hiện bằng cách sử dụng thuốc thử Tế bàoTiter-Glo® (Promega), và dữ liệu được phân tích như được mô tả ở trên trong "Sự ức chế tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người (thử nghiệm sự tăng trưởng NCI-H292 và sự tăng trưởng NCI-H322)" trong Ví dụ 3, ngoại trừ các hợp chất dung giải tế bào được chuyển vào các đĩa có 96 giếng màu trắng mờ đục được xử lý nuôi cấy mô (PerkinElmer) trước khi đọc phát quang.

Theo tiêu chuẩn 2D nuôi cấy, EM1-mAb ức chế sự tăng trưởng NCI-H292 có IC_{50} là 31 nM, và trong các điều kiện gắn thấp có IC_{50} là 0,64 nM. EM-1 mAb ức chế

sự tăng trưởng tế bào NCI-H1975 có IC_{50} là >700 nM và từ 0,8 đến 1,35 nM theo tiêu chuẩn 2D và nuôi cấy gắn thấp, lần lượt. Trong các tế bào NCI-H292 biểu hiện cả hai loại dại EGFR và cMet, EM1-mAb có sự hiệu nghiệm được cải thiện hơn 22 lần theo tiêu chuẩn 2D và sự hiệu nghiệm được cải thiện khoảng 330 lần trong các điều kiện nuôi cấy gắn thấp khi so với cetuximab. Trong tế bào NCI-H1975, mà biểu hiện L858R, thể đột biến EGFR T790M và c-Met loại dại, EM-1 mAb có sự hiệu nghiệm được cải thiện ít nhất 518 lần khi so với cetuximab các điều kiện nuôi cấy gắn thấp. Bảng 22 thể hiện tóm tắt các thử nghiệm.

Bảng 22.

Dòng tế bào	Tình trạng EGFR	Tình trạng cMet	Nuôi cấy tiêu chuẩn 2D EM1-mAb có IC_{50} (nM)	Sự gắn thấp EM1-mAb có IC_{50} (nM)	Nuôi cấy tiêu chuẩn 2D Cetuximab có IC_{50} (nM)	Sự gắn thấp Cetuximab có IC_{50} (nM)
NCI-H292	WT	WT	31	0,64	>700	212
NCI-H1975	L858R, T790M	WT	>700	0,8-1,35	>700	>700

Sự kết hợp của Erlotinib và EM1-mAb là hữu hiệu trong sự ức chế tăng trưởng các dòng tế bào có thể đột biến EGFR

Sự ức chế tăng trưởng tế bào bằng cách kết hợp của erlotinib plus EM1-mAb được đánh giá trong cả hai điều kiện nuôi cấy tiêu chuẩn 2D và trong dạng gắn thấp. Các tế bào NCI-H3255 và HCC-827 được gieo như được mô tả ở trên trong "Sự ức chế Tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người hoặc Khả năng sống được bằng các Kháng thể". HGF (7,5 ng/mL, Các hệ thống R&D cat # 294-HGN) được bổ sung vào các tế bào cùng với điều trị với các kháng thể. Các tế bào được xử lý có các nồng độ các kháng thể thay đổi (từ 0,11 đến 700 nM cuối), hoặc erlotinib (từ 0,46 đến 3000 nM cuối), hoặc sự kết hợp của kháng thể cùng với erlotinib, bằng cách sử dụng các lượng tăng dần của mỗi kháng thể theo tỷ lệ cố định (ví dụ. nồng độ kết hợp nhỏ nhất = nồng độ kháng thể nhỏ nhất (0,11 nM) + nồng độ erlotinib nhỏ nhất (0,46 nM)). Một số giếng được để không điều trị với một trong hai HGF hoặc các kháng thể làm các đối chứng. Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong khoảng 72 giờ, sau đó các tế bào có thể sống được

phát hiện bằng cách sử dụng Tế bàoTiter-Glo® thuốc thử (Promega), và dữ liệu được phân tích như được mô tả ở trên trong "Sự ức chế Tăng trưởng Tế bào Khối u ở Người (thử nghiệm sự tăng trưởng NCI-H292 và sự tăng trưởng NCI-H322)". Bảng 23 tóm tắt các kết quả thực nghiệm. Trong Bảng, các trị số IC_{50} cho các sự kết hợp có liên quan đến một trong hai kháng thể, hoặc erlotinib, phụ thuộc vào những gì được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

Trong cả hai tế bào NCI-H3255 và HCC-827 (các dòng tế bào có thể đột biến EGFR) bổ sung EM1-mAb để erlotinib tăng cả sự hiệu nghiệm ức chế khả năng sống được của tế bào và hữu hiệu hơn dẫn đến các tế bào có thể sống ít hơn tổng thể. Trong các tế bào NCI-H3255 bằng cách sử dụng n các điều kiện 2Dtiêu chuẩ, IC_{50} cho riêng erlotinib là 122 nM, trong khi kết hợp là 49 nM. Tương tự, trong các tế bào HCC-827, IC_{50} cho riêng erlotinib là 27 nM, trong khi kết hợp là 15 nM. Ngoài ra, sự kết hợp của EM1-mAb cùng với erlotinib là hữu hiệu hơn so với sự kết hợp của cetuximab cùng với erlotinib. Do đó, trong sự có mặt HGF, việc bổ sung EM1-mAb làm tăng tính hiệu quả của erlotinib trong thử nghiệm này.

Các tế bào NCI-H3255 biểu hiện thể đột biến L858R của EGFR và được khuếch đại cMet. Các tế bào HCC-827 biểu hiện các biến thể EGFR có các sự xóa ở các vị trí axit amin 746 và 750 và c-Met loại dại. EM1-mAb có tác dụng mạnh hơn về khả năng sống được của HCC-827 và NCI-3255 trong sự có mặt của erlotinib so với riêng erlotinib trong một trong hai tiêu chuẩn hoặc các nuôi cấy gắn thấp.

Bảng 23.

Các mẫu	EM1 mAb + erlotinib IC_{50} (nM)	erlotinib IC_{50} (nM)
NCI-H3255, nuôi cấy theo tiêu chuẩn 2D	49,0	122
NCI-H3255, nuôi cấy có sự gắn thấp	10,6	47,1
HCC-827, nuôi cấy tiêu chuẩn 2D	14,6	27,4
HCC-827, nuôi cấy có sự gắn thấp	3,5	9,5

Ví dụ 13. Gây độc tế bào qua trung gian kháng thể (ADCC) của EM1-mAb trong các dòng tế bào *in vitro*.

Các thử nghiệm ADCC được thực hiện như được mô tả trước đó (Scallon *et al.*, Mol Immunol 44:1524-1534 2007). Tóm lại, các PBMC được tinh chế từ máu người bằng các gradien Ficoll và được sử dụng làm cơ quan tác động các tế bào cho các thử nghiệm ADCC. Các tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc NCI-H441 được sử dụng làm các tế bào đích với tỷ lệ 1 tế bào đích với 50 cơ quan tác động các tế bào. Các tế bào đích được đánh dấu trước bằng BATDA (PerkinElmer) trong khoảng 20 phút ở nhiệt độ 37°C, được rửa hai lần và tái huyền phù trong DMEM, 10% FBS bị bất hoạt bằng nhiệt, 2 mM L-glutamin (tất cả từ Invitrogen). Đích ($1x10^4$ tế bào) và cơ quan tác động các tế bào ($0,5x10^6$ tế bào) được kết hợp và 100µl các tế bào được bổ sung vào các giếng của các đĩa đáy dạng chữ U có 96 giếng. Việc bổ sung 100µl được bổ sung có hoặc không có loại dại và các cấu trúc mAb kháng proteaza. Tất cả các mẫu được thực hiện trùng lặp. Các đĩa được ly tâm ở 200g trong khoảng 3 phút, được ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2 giờ, và sau đó được ly tâm lại 200g trong khoảng 3 phút. Tổng số 20µl dịch nổi trên mặt được loại bỏ trong mỗi giếng và sự ly giải tế bào được đánh giá bằng cách bổ sung 200µl thuốc thử dựa trên DELPHIA Europium (PerkinElmer). Sự huỳnh quang được đánh giá bằng cách sử dụng thiết bị đọc Envision 2101 Multilabel Reader (PerkinElmer). Dữ liệu được chuẩn hóa tới tối đa khả năng gây độc tế bào bằng 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) và đối chứng tối thiểu được xác địnhd bằng sự giải phóng tự phát BATDA khỏi các tế bào đích mà không có bất kỳ kháng thể nào bằng cách sử dụng hệ thức sau đây: (giải phóng theo thực nghiệm – giải phóng tự phát/(giải phóng tối đa–giải phóng tự phát) x 100%. Dữ liệu được khớp mô hình liều lượng-đáp ứng hình xichma bằng cách sử dụng GraphPad Prism v5.

Các kết quả ADCC cho các EM1 mAb và bộ so sánh được tóm tắt trong Bảng 24 (Các tế bào NCI-H292), Bảng 25 (Các tế bào NCI-H1975) và Bảng 26 (Các tế bào NCI-H441) và Bảng 27 (Các tế bào NCI-H1993) liệt kê các trị số EC_{50} và sự ly giải tối đa đạt được. Các tế bào NCI-H292 biểu hiện loại dại (WT) EGFR, WT c-Met, và WT KRAS; các tế bào NCI-H1975 biểu hiện thể đột biến EGFR (L858R T790M), WT cMet và WT KRAS; NCI-H441 biểu hiện WT EGFR, WT cMet, và thể đột biến KRAS (G12V), và các tế bào NCI-H1993 biểu hiện WT EGFR, được khuếch đại cMet, WT KRAS. KRAS còn được gọi là GTPase KRas và như đồng đẳng gen ung thư virut mắc bệnh ung thư mô liên kết ở chuột V-Ki-ras2 Kirsten.

EM1-mAb có sự hiệu nghiệm của các đáp ứng ADCC cao hơn cetuximab và phiên bản fucoza bình thường của EM1-mAb như được thể hiện bởi có các trị số EC_{50} thấp hơn. EM1 mAb có tính hiệu quả về mặt ly giải tối đa đạt được cao hơn cetuximab và mAb đặc hiệu kép fucoza tiêu chuẩn. Từ các biên dạng trên các Bảng từ 24 đến 27, EM-1 mAb có hoạt tính ADCC trên các tế bào mà có thể đột biến và WT EGFR, WT có các mức độ cMet bình thường và được khuếch đại, và WT và thể đột biến KRAS.

Bảng 24.

mAb	Sự hiệu nghiệm (EC_{50} µg/ml)	R^2	Tính hiệu quả (sự ly giải tối đa đạt được)
EM1 mAb	0,0058	0,93	19%
Kháng EGFR x mAb đặc hiệu kép có fucoza tiêu chuẩn của cMet	0,22	0,85	13%
Cetuximab	0,0064	0,94	12%

Bảng 25.

mAb	Sự hiệu nghiệm (EC_{50} µg/ml)	R^2	Tính hiệu quả (sự ly giải tối đa đạt được)
EM1 mAb	0,022	0,91	19%
Kháng EGFR x mAb đặc hiệu kép có fucoza tiêu chuẩn của cMet	1,8	0,79	13%
Cetuximab	0,029	0,70	11%

Bảng 26.

mAb	Sự hiệu nghiệm (EC_{50} µg/ml)	R^2	Tính hiệu quả (sự ly giải tối đa đạt được)
EM1 mAb	0,022	0,97	24%
Kháng EGFR x mAb đặc hiệu kép có fucoza tiêu chuẩn của cMet	0,52	0,87	7,9%
Cetuximab	0,013	0,85	15%

Bảng 27

mAb	Sự hiệu nghiệm (EC_{50} µg/ml)	R^2	Tính hiệu quả (sự ly giải tối đa đạt được)
EM1 mAb	0,0013	0,95	27%
Kháng EGFR x mAb đặc hiệu kép có fucoza tiêu chuẩn của cMet	0,054	0,87	17%
Cetuximab	0,0042	0,76	21%

Ví dụ 14. Các nghiên cứu tính hiệu quả khối u với EM1-mAb

Tính hiệu quả của EM1 mAb dựa vào sự tăng trưởng khối u được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 7 "các nghiên cứu tính hiệu quả Khối u với các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép". Tóm lại, các tế bào NCI- H292-HGF được cấy dưới da (s.c.) với Cultrex at $2x10^6$ vào chuột SCID Beige cái. Chuột được phân nhóm theo thể tích khối u 7 ngày sau khi cấy vào 5 nhóm với 10 con chuột mỗi nhóm. The dosing bắt đầu sau khi thể tích khối u trung bình ban đầu của mỗi nhóm nằm trong khoảng từ 62 đến 66 mm^3 (các khối u nhỏ). PBS hoặc việc liệu pháp điều trị được dùng trong màng bụng (i.p.) 2 lần mỗi tuần.

Việc đánh giá về tính hiệu quả cũng sử dụng SKMES-HGF, ung thư biểu mô tế bào có vảy ở người mà được chuyển nạp với HGF ở người (yếu tố tăng trưởng tế bào gan). Các tế bào này được cấy s.c. ở $10x10^6$ vào chuột SCID Beige cái. Những con chuột này được phân nhóm theo thể tích khối u 12 ngày sau khi cấy vào 5 nhóm với 8 con chuột mỗi nhóm. Nghiên cứu đầu tiên bắt đầu với thể tích khối u trung bình ban đầu của mỗi nhóm nằm trong khoảng từ 98 đến 101 mm^3 (các khối u lớn). PBS hoặc các liệu pháp điều trị được dùng i.p. 2x/tuần trong khoảng 4 tuần. Trong nghiên cứu khối u có kích thước lớn hơn, những con chuột được phân nhóm sau khi các thể tích khối u nằm trong khoảng từ 200 đến 300mm^3 bằng cách chia thành 2 nhóm. Những con chuột sau đó được điều trị với một trong hai cetuximab (20 mg/kg) hoặc EM1-mAb (20 mg/kg), i.p., 2x/tuần (3 tuần).

Phần tóm tắt dữ liệu được thể hiện trong Bảng 28. Fig.10 thể hiện tính hiệu quả của các phân tử theo thời gian. EM1-mAb có biên dạng tránh khối u được cải thiện khi so với cetuximab trong mô hình khối u nhỏ H292-HGF và trong mô hình khối u SKMES-HGF nhỏ và lớn.

Bảng 28.

Mẫu và thời gian	Dòng tế bào	Liều lượng ở mg trên kg	Hồi quy từng phần	Hồi quy toàn bộ
EM1 ở ngày 35	khối u nhỏ H292-HGF	20	10/10	10/10
		5	10/10	10/10
		1	0/10	0/10
Cetuximab ở ngày 35	khối u nhỏ H292-HGF	20	0/10	0/10
EM1 ở ngày 67	SKMES - HGF khối u nhỏ	20	0/8	8/8
		5	1/8	6/8
		1	2/8	4/8
Cetuximab ở ngày 67		20	0/8	6/8
EM1 ở ngày 70	Khối u lớn SKMES – HGF	20	4/7	3/7
Cetuximab ở ngày 35		20	0/7	0/7

Bảng 29 thể hiện các kích thước khối u trong các nhóm điều trị từ các khối u SKMES-HGF, và Bảng 30 thể hiện hoạt tính kháng u.

EM1-mAb ức chế sự tăng trưởng khối u trong mô hình SKMES-HGF 97% hoặc lớn hơn ở nhiều liều lượng xuống còn 1 mg/kg. Mặc dù ban đầu cetuximab rất hữu hiệu (88% TGI ở 20 mg/kg), sau khi việc dùng thuốc kết thúc các khối u được điều trị bằng cetuximab phát triển trở lại. Ngược lại, các khối u được điều trị với EM1-mAb ở một trong hai liều lượng 5 hoặc 20 mg/kg không phát triển trở lại trong quá trình nghiên cứu (> 2 tháng).

Bảng 29

Các ngày	Thể tích khối u (mm^3)				
	Chất dẫn thuốc	EM1 đặc hiệu kép ở 20mg/kg	EM1 đặc hiệu kép ở 5mg/kg	EM1 đặc hiệu kép ở 1mg/kg	Cetuximab ở 20mg/kg
1	99±6	99±7	101±6	101±6	98±5
8	146±14	48±10	49±9	49±10	60±8
15	192±21	9±1	22±10	41±13	44±23
22	326±43	3±2	17±12	33±15	42±23
29	577±55	2±1	15±9	38±17	85±60
36	994±114	0,2±0,1	13±9	26±14	125±62
50	--	0,04±0,04	10±7	18±9	423±115
57	--	0,1±0,2	3±2	21±10	650±116
67	--	0±0	8±7	34±22	1257±151

Bảng 30

Điều trị	Kích thước khối u (mm^3)a ở ngày 36	T/C (%)	T-C (các ngày) ở 1000 mm^3	*Trị số P*
Chất dẫn thuốc	994±114	--	--	--
EM1 đặc hiệu kép ở 20mg/kg	0,19±0,12	0,02	--	

EM1 đặc hiệu kép ở 5mg/kg	13±9	1,3	--	
EM1 đặc hiệu kép ở 1mg/kg	26±14	2,6	--	
Cetuximab (20mg/kg)	125±62	13	31	

Ví dụ 15. Ức chế sự di căn tế bào với EM1-mAb *in vitro*

Phương pháp

Tác dụng của EM- mAb và các kháng thể hóa trị một đối chứng ức chế sự di căn khối u tế bào được đánh giá trong các tế bào NIH-1650. Dòng tế bào thể đột biến EGFR H1650 (Các tế bào ung thư biểu mô vách phế nang phổi chứa đột biến vùng ngoại 19 [xóa E746, A750]) được nuôi cấy trong bình nuôi cấy mô trong các điều kiện nuôi cấy bình thường (nhiệt độ 37°C, CO_2 5%, độ ẩm 95%). Tất cả các môi trường và sự bổ sung là theo gợi ý của các nhà cung cấp các tế bào (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

Các khối hình cầu được tạo ra bằng cách gieo các tế bào khối u phổi H1650 ở mật độ 10,000các tế bào/giếng vào các đĩa có 96 giếng Ultra Low đáy dạng chữ U Adherence (ULA) (Corning, Tewksbury, USA) at 200 µl/giếng. Các đĩa này sự hình thành kích thích tự phát của khối hình cầu đơn của các tế bào trong 24 giờ (trong lúc ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5%) và các khối hình cầu được nuôi trong khoảng bốn ngày trong các điều kiện nuôi cấy bình thường.

Các đĩa có 96 giếng đáy tròn (BD Bioscience) được phủ với 0,1% gelatin (EMD Millipore, Billerica, USA) trong nước vô trùng trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Đối với các nghiên cứu đánh giá hợp chất, 10,000 khối hình cầu tế bào khối u ngày thứ 4 (H1650 và NCI-H1975) được chuyển vào các đĩa đáy tròn được phủ và được điều trị với EM1-mAb, mAb E1-F405L-gp120-K409R kháng EGFR hóa trị một đối chứng có hàm lượng fucoza thấp, mAb M1- K409R -gp120- F405L kháng cMet hóa trị một đối chứng có hàm lượng fucoza thấp, và sự kết hợp của hai kháng thể hóa trị một E1-F405L-gp120-K409R và M1- K409R -gp120- F405L (được tạo ra theo fucoza thấp) trong các loạt pha loãng với 20 ng/ml HGF (các hệ thống R&D). Các đối chứng được xử lý bằng chất dẫn thuốc mà đối chứng lớp kháng thể kappa IgG1 (nồng độ cân bằng với các tế

bào được điều trị bằng thuốc). Các tác dụng của các hợp chất được phân tích tại 48 giờ bằng cách đo diện tích được phủ bởi các tế bào di chuyển bằng cách sử dụng các hình ảnh trường sáng trong hệ thống hình ảnh dung lượng cao Operetta tự động toàn bộ (Perkin Elmer) có ống kính 2x. Sự ức chế tế bào di chuyển (tổng diện tích) do tác dụng điều trị được đánh giá bằng dữ liệu chuẩn hóa bằng cách chia cho các môi trường đối chứng duy nhất để tạo ra tỷ lệ phần trăm tế bào di chuyển để đối chứng. Do đó, trị số nhỏ hơn 1 sẽ chất ức chế sự di căn tế bào.

Các kết quả

EM1-mAb đã chứng minh sự ức chế hiệp đồng hiệu nghiệm của sự di căn tế bào trong các tế bào (thể đột biến EGFR L858R) và H1975 (thể đột biến EGFR L858R/T790M) khi so với sự kết hợp của các kháng thể kháng EGRF hóa trị một đối chứng và kháng thể kháng c-Met E1-F405L-gp120-K409R và M1- K409R -gp120-F405L. Trong các tế bào, sáu nồng độ EM1-mAb cao nhất ức chế sự di chuyển tế bào kể ($p<0,001$) so với đối chứng lớp kháng thể. Trị số EC_{50} cho EM1-mAb là 0,23 nM, trong khi trị số EC_{50} cho sự kết hợp của các kháng thể đối chứng đặc hiệu đơn là 4,39 nM. Do đó, EM1-mAb hữu hiệu hơn khoảng 19 một lần trong việc ức chế sự di chuyển tế bào H1650 khi so với sự kết hợp của các kháng thể đối chứng hóa trị một. Mức độ ức chế sự di chuyển tế bào của EM1-mAb là ưu việt hơn với sự kết hợp của các mAb đối chứng đặc hiệu đơn cho các tế bào H1650 và H1975. Bảng 31 thể hiện các trị số EC_{50} cho thử nghiệm.

Bảng 31.

Các mẫu	H1650		H1975
	EC_{50} (nM)	Sự ức chế ở 30 nM	Sự ức chế ở 30 nM
EM1-mAb	0,23	64%	38%
Hỗn hợp của E1-F405L-gp120-K409R* và M1-K409R-gp120-F405L*	4,39	59%	20%
E1-F405L - gp120-K409R*	5,44	15%	7%
M1-K409R-gp120-F405L*	7,36	43	10%

*các kháng thể có hàm lượng fucoza thấp

Ví dụ 16. Lập bản đồ Epitop của kháng thể 069 và 5D5 kháng c-Met

Epitop gắn kết mAb 069 kháng c-Met được lập bản đồ bằng cách sử dụng kỹ thuật peptit CLIPS được cưỡng bức và mạch thẳng. Các peptit được quét các miền SEMA, PSI, và Ig của c-Met ở người. Các peptit CLIPS và mạch thẳng được tổng hợp bằng cách sử dụng trình tự axit amin của cMet nói trên bằng cách sử dụng hóa học Fmoc tiêu chuẩn và được khử bảo vệ bằng cách sử dụng axit trifloric với các vật ăn xác thối. Các peptit được cưỡng bức được tổng hợp trên các giàn hóa học để tái tạo lại về hình dạng các epitop bằng cách sử dụng Kỹ thuật các Peptit được liên kết Hóa học trên các Giàn (CLIPS) (Timmerman et al., J Mol Recognition 20:283, 2007). Các peptit được cưỡng bức và có mạch thẳng được ghép vào các thẻ PEPSCAN và được sàng lọc bằng cách sử dụng ELISA dựa trên PEPSCAN (Slootstra *và các đồng tác giả,* Molecular Diversity 1, 87-96, 1996). Epitop gắn kết mab 069 kháng c-Met là epitop không liên tục gồm các axit amin c-Met 239-253 PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID SỐ: 238) và 346-361 FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID SỐ: 239). Trình tự axit amin c-Met là được thể hiện trong SEQ ID SỐ: 201.

Các phương pháp tương tự được sử dụng để lập bản đồ epitop mAb 5D5 (MetMab, Onartuzumab). mAb 5D5 gắn kết các gốc c-Met 325-340 PGAQLARQIGASLNDD (SEQ ID SỐ: 240).

Ví dụ 17. Các nghiên cứu tính hiệu quả khối u *In vivo* với EM1-mAb

Tính hiệu quả của EM1 mAb dựa vào sự tăng trưởng khối u được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 7 "Các nghiên cứu tính hiệu quả khối u với các phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép" và Ví dụ 14 dùng bổ sung các dòng tế bào khối u có đột biến EGFR hoặc các khuếch đại EGFR và/hoặc c-Met. Tóm lại, các tế bào SNU-5, H1975, HCC827, các tế bào H1975 biểu hiện HGF ở người, hoặc dòng vô tính của các tế bào HCC827 được lựa chọn để sức đề kháng của nó với erlotinib (các tế bào HCC827-ER1) được cấy dưới da (s.c.) vào chuột cái thiếu hụt miễn dịch, ngoại trừ các tế bào SNU-5 được cấy vào chuột CR17/SCID. Chuột được dùng thuốc theo liều qua màng bụng với PBS hoặc EM1-mAb, cetuximab (CAS 205923-56-4), erlotinib (CAS 183321-74-6), afatinib (CAS 439081-18-2), hoặc sự kết hợp của EM-1 mAb và afatinib và EM-1 mAb và erlotinib ở liều lượng chỉ định và lịch được thể hiện trong Bảng 32. Tính hiệu quả kháng u được đánh giá là %TGI (ức chế sự tăng trưởng khối u) được tính toàn là 100- %T/C (T= kích thước khối u trung bình của nhóm điều trị; C= kích thước khối u trung nình của nhóm đối chứng vào ngày nhất định như được mô tả trong Ví dụ 7).

Trong các khối u có các đột biến hoạt hóa EGFR chính (không có sức đề kháng với các TKI EGFR): (khối u HCC827, EGFR del(E746, A750)), EM1-mAb có liều lượng 10 mg/kg ức chế sự tăng trưởng khối u là 82%. Erlotinib có sự hữu hiệu tương tự trong mô hình này, như là sự kết hợp của erlotinib và EM1-mAb. Fig. 11 thể hiện tính hiệu quả của của các liệu pháp điều trị theo thời gian trong mô hình khối u HCC827.

Trong các khối u có khuếch đại gen EGFR và c-Met loại dại (mô hình SNU-5 ung thư dạ dày), EM1-mAb đã thể hiện hoạt tính kháng u có khối u hồi quy toàn bộ (98% TGI, ở ngày 34 $p<0,01$, so với chất dẫn thuốc bằng cách sử dụng ANOVA một chiều sau đó là các so với riêng lẻ bằng cách sử dụng Games-Howell). Hoạt tính kháng u của mAb cetuximab kháng EGFR là nhỏ hơn, 49% ở ngày 34, trong mô hình này. Fig.12 thể hiện tính hiệu quả của các liệu pháp điều trị theo thời gian trong mô hình SNU-5.

EM1-mAb được kiểm tra trong mô hình NSCLC chứa đột biến hoạt hóa EGFR chính và đột biến EGFR T790M mà làm cho các khối u kháng lại EGFR TKIs thế hệ 1 (mô hình H1975). EM1-mAb ức chế sự tăng trưởng khối u có 57% TGI trong mô hình dòng tế bào H1975 được cấy trong chuột thiếu hụt miễn dịch ($p<0,0001$, so với chất dẫn thuốc PBS bằng cách sử dụng phân tích Logrank with Prism 3,03). Theo dự kiến, erlotinib không hữu hiệu trong mô hình này có sự đột biến T790M. Afatinib đều hữu hiệu như EM1-mAb (57% TGI). Cetuximab và sự kết hợp của EM1-mAb with afatinib là hữu hiệu nhất, các khối u hồi quy có sự ức chế tăng trưởng khối u lần lượt là 91% và 96%, ($p<0,0001$ cho cả cetuximab so với PBS và EM1-mAb + afatinib so với các nhóm chất dẫn thuốc PBS + afatinib bằng cách sử dụng phân tích Logrank với Prism 3,03). Các con đường tín hiệu c-Met không được hoạt hóa trong mô hình này như HGF ở chuột không gắn kết với c-Met ở người.

EM1-mAb được kiểm tra trong một số model mà được thiết kế để biểu hiện HGF ở người bằng cách sử dụng hệ thống tải nạp virut chậm. Điều này cho phép mô hình hóa hoạt tính phối tử của con đường c-Met *in vivo* bởi vì HGF ở chuột không hoạt hóa c-Met ở người trên các tế bào khối u ở người được cấy. Các kết quả với mô hình SKMES-HGF được thể hiện trong Ví dụ 14 và Fig.10, và %TGI được tóm tắt trong Bảng 32. EM1-mAb ức chế sự tăng trưởng khối u trong mô hình H1975-HGF 71% ($p<0,0001$, so với chất dẫn thuốc PBS bằng cách sử dụng phân tích Logrank với Prism 3,03). Afatinib, erlotinib và cetuximab là ít hiệu nghiệm trong mô hình này. Sự kết hợp của EM1-mAb

và afatinib là rất hữu hiệu (96% TGI, p<0,0001, so với nhóm các chất dẫn thuốc PBS + afatinib bằng cách sử dụng phân tích Logrank với Prism 3,03). Fig.13 thể hiện tính hiệu quả của các phân tử theo thời gian trong mô hình H1975-HGF l. Erlotinib, afatinib và cetuximab do đó mất tính hiệu quả kháng u trong trong các mô hình khối u trong đó con đường c-Met được hoạt hóa.

EM1-mAb được kiểm tra trong mô hình khối u model được đặc trưng bởi đột biến hoạt hóa EGFR chính và tăng sức đề kháng được với TKI EGFR thế hệ thứ nhất (erlotinib) do sự khuếch đại gen c-Met (mô hình HCC827-ER1). EM1-mAb được định liều ở 10 mg/kg một phần các khối u HCC827-ER1 được hồi quy được cấy 86% TGI ở ngày 25, và có hiệu nghiệm hơn riêng erlotinib (65% TGI ở ngày 25). Sự kết hợp của EM1-mAb và erlotinib không cải thiện thêm tính hiệu quả. Fig.14 thể hiện tính hiệu quả của các phân tử theo thời gian.

Do đó EM1-mAb đã chứng minh tính hiệu quả trong các mô hình khối u có EGFR loại dại, có các đột biến EGFR hoạt hóa chính, có đột biến T790M của EGFR liên quan đến sức đề kháng với các liệu pháp điều trị EGFR, cũng như trong các mô hình mà c-Met được hoạt hóa theo một trong hai phương pháp (khuếch đại gen c-Met) không phụ thuộc phối tử hoặc phụ thuộc phối tử (biểu hiện HGF autocrin). Sự kết hợp của EM1-mAb có erlotinib hoặc afatinib có thể cải thiện tính hiệu quả trong một số mô hình khối u.

Bảng 32.

Loại khối u	EGFR	cMet	Điều trị (Liều lượng theo mg/kg), lịch	% TGI (ngày nghiên cứu); so với chất dẫn thuốc PBS
Phổi có vảy HGF	WT	WT	EM1-mAb (20), BIWx4wk	100 (36)
			cetuximab (20), BIWx4wk	88 (36)
Dạ dày SNU-5	WT	AMP	EM1-mAb (10), BIWx4wk	98 (34)
			cetuximab (10), BIWx4wk	49 (34)

H1975 NSCLC	L858R; T790M	WT	EM1-mAb (10), BIWx3wk	57 (18)
			cetuximab (10), BIWx3wk	91 (18)
			erlotinib (50), QDx21d	9 (18)
			afatinib (15), QDx21d	57 (18)
			EM1-mAb (10), BIWx3wk + afatinib (15), QDx21d	96 (18)
H1975-HGF NSCLC	L858R; T790M	WT	EM1-mAb (10), BIWx3wk	71 (16)
			cetuximab (10), BIWx3wk	42 (16)
			erlotinib (50), QDx21d	20 (16)
			afatinib (15), QDx21d	29 (16)
			EM1-mAb (10), BIWx3wk + afatinib (15), QDx21d	96 (16)
HCC827 NSCLC	del (E746, A750); AMP	WT	EM1-mAb (10), BIWx4wk	82 (35)
			erlotinib (25), QDx28d	79 (35)
			EM1-mAb (10), BIWx3wk + erlotinib (25), QDx28d	78 (35)

HCC827-ER1 NSCLC	del (E746, A750); AMP	AMP	EM1-mAb (10), BIWx4wk	86 (25)
			erlotinib (25), QDx28d	65 (25)
			EM1-mAb (10), BIWx3wk + erlotinib (25), QDx28d	87 (25)

BIW= hai tuần một lần

QD= một lần mỗi ngày

WT= loại dại

AMP=được khuếch đại

Ví dụ 18. Sự thoái biến EGFR và c-Met do cảm ứng EM1 mAb *in vivo*

Để chứng minh sự tham gia của cả hai EGFR và c-Met bằng EM1-mAb trong khối u, các mẫu được lấy từ các khối u H1975-HGF ở các lần khác sau liều đơn là 20 mg/kg các hợp chất dung giải tế Khối u bào EM1-mAb được điều chws, được chuẩn hóa với tổng số protein, và các mẫu được thực hiện trên các gel SDS-PAGE. Các gel được chuyển vào nitroxenluloza và Western blotted cho mỗi EGFR (Chuột (mAb) Kháng EGFR ở người (EGF-R2); Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-73511) hoặc c-Met (Chuột (mAb) kháng Met ở người (L41G3); Kỹ thuật Tín hiệu Tế bào, Cat# 3148). Các mức độ EGFR được chuẩn hóa với GAPDH; các mức độ c-Met được chuẩn hóa với actin. Các mức độ của các thụ thể từ các khối u được điều trị EM1-mAb được so với những cái có các khối u được điều trị PBS để đạt % tổng số thụ thể. Việc điều trị EM1-mAb làm giảm tổng số các mức độ thụ thể EGFR và cMet trong các khối u H1975-HGF đến giữa khoảng từ 20% đến 60% của mẫu đối chứng, phụ thuộc vào thời điểm được phân tích. Fig.15 thể hiện các mức độ thụ thể trung bình so với PBS theo thời gian. pEGFR, pc-Met và pAKT cũng được giảm vào lúc 72 giờ sau liều lượng đơn của EM1.

Ví dụ 19. So sánh hoạt tính chống khối u IgG1 và IgG2σ dạng đồng phân biến thể của EGFR/c-Met đặc hiệu kép mAbs

Để hiểu rõ hơn về sự đóng góp của chức năng cơ quan tác động với tính hiệu quả được quan sát trong mô hình H1975-HGF, một sự so với được thực hiện giữa EM1-

mAb và biến thể của EM1-mAb có IgG2 Fc với các sự thay thế làm câm cơ quan tác động V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S on IgG2 (các sự thay thế được mô tả trong Công bố Patent Quốc tế Số. WO2011/066501) (việc đánh số theo chỉ số EU). Kháng thể IgG2 có các sự thay thế V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S không tương tác với các thụ thể Fc hoặc các tế bào cơ quan tác động (như các tế bào NK và các đại thực bào). Sự mất hoạt tính bất kỳ được quan sát với biến thể IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S của EM1-mAb do đó có thể đại diện cho hoạt tính kháng u được đóng góp bởi các cơ chế qua trung gian cơ quan tác động như ADCC và/hoặc ADCP. Sau 32 ngày bố trí cấy tế bào trong mô hình H1975-HGF được mô tả ở trên, có dất hiệu mất hoạt tính kháng u có biến thể IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S của EM1-mAb khi so với gốc EM1-mAb, cho thấy các cơ chế qua trung gian cơ quan tác động góp phần vào chức năng của EM-1 mAb. Fig.16 thể hiện hoạt tính kháng u của các phân tử.

SEQ ID SỐ:	Loại	Các kiểu	Mô tả	Trình tự
1	PRT	Nhân tạo	Tencon	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	ADN	Nhân tạo	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	ADN	Nhân tạo	TC5'toFG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	ADN	Nhân tạo	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	ADN	Nhân tạo	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	ADN	Nhân tạo	TCF7	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	ADN	Nhân tạo	TCF8	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	ADN	Nhân tạo	TCF9	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	ADN	Nhân tạo	TCF10	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	ADN	Nhân tạo	TCF11	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	ADN	Nhân tạo	TCF12	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
12	ADN	Nhân tạo	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG
13	DNA	Nhân tạo	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	DNA	Nhân tạo	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	DNA	Nhân tạo	Tcon5new2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGGT GACCACCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG
16	DNA	Nhân tạo	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	DNA	Nhân tạo	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCCAAC TGATCTTCACCAAAC
18	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

19	PRT	Nhân tạo	P54AR4-17 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Nhân tạo	P54AR4-47 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	Nhân tạo	P54AR4-48 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Nhân tạo	P54AR4-37 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	Nhân tạo	54AR4-74 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Nhân tạo	P54AR4-81 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHN VYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83 không có met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSY VFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v2 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31v2 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSY VFEHDVMLPLSAIFTT
29	PRT	Nhân tạo	P54AR4-73v2 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	ADN	Nhân tạo	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC GAA AAA C
31	ADN	Nhân tạo	TCON5 E86Ishort	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	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	Nhân tạo	P114AR5P75-E9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFL RSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGL VSTPLSAIFTT
34	PRT	Nhân tạo	P114AR7P92-F3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVNIMGVKGGSI SHPLSAIFTT

35	PRT	Nhân tạo	P114AR7P92-F6	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36	PRT	Nhân tạo	P114AR7P92-G8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
37	PRT	Nhân tạo	P114AR7P92-H5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38	PRT	Nhân tạo	P114AR7P93-D11	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT
39	PRT	Nhân tạo	P114AR7P93-G8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTDLKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40	PRT	Nhân tạo	P114AR7P93-H9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41	PRT	Nhân tạo	P114AR7P94-A3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
42	PRT	Nhân tạo	P114AR7P94-E5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT
43	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-B9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQILGVKGGSISVPLSAIFTT
44	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-D3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT
45	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-D4	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT
46	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-E3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
47	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-F10	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
48	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT

49	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-H8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT
50	PRT	Nhân tạo	ECB1	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
51	PRT	Nhân tạo	ECB2	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
52	PRT	Nhân tạo	ECB3	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
53	PRT	Nhân tạo	ECB4	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
54	PRT	Nhân tạo	ECB5	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
55	PRT	Nhân tạo	ECB6	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
56	PRT	Nhân tạo	ECB7	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT

57	PRT	Nhân tạo	ECB15	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Nhân tạo	ECB27	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
59	PRT	Nhân tạo	ECB60	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPKNLVVSRVT EDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
60	PRT	Nhân tạo	ECB37	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
61	PRT	Nhân tạo	ECB94	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
62	PRT	Nhân tạo	ECB95	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
63	PRT	Nhân tạo	ECB96	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
64	PRT	Nhân tạo	ECB97	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT

65	PRT	Nhân tạo	ECB106	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
66	PRT	Nhân tạo	ECB107	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
67	PRT	Nhân tạo	ECB108	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
68	PRT	Nhân tạo	ECB109	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
69	PRT	Nhân tạo	ECB118	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT
70	PRT	Nhân tạo	ECB119	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
71	PRT	Nhân tạo	ECB120	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
72	PRT	Nhân tạo	ECB121	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT

SEQ ID SỐ: 73, PRT, Loài người, EGFR (bao gồm trình tự tín hiệu là 24 aa. protein trưởng thành bắt đầu ở gốc 25)

1 MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS LQRMFNNCEV

61 VLGNLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP LENLQIIRGN MYYENSYALA

121 VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF

181 QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW GAGEENCQKL TKIICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC

241 TGPRESDCLV CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV

301 VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS INATNIKHFK

361 NCTSISGDLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE ITGFLLIQAW PENRTDLHAF

421 ENLEIIRGRT KQHGQFSLAV VSLNITSLGL RSLKEISDGD VIISGNKNLC YANTINWKKL

481 FGTSGQKTKI ISNRGENSCK ATGQVCHALC SPEGCWGPEP RDCVSCRNVS RGRECVDKCN

541 LLEGEPREFV ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCPAGVM

601 GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGCTG PGLEGCPTNG PKIPSIATGM VGALLLLLVV

661 ALGIGLFMRR RHIVRKRTLR RLLQERELVE PLTPSGEAPN QALLRILKET EFKKIKVLGS

721 GAFGTVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLLGI

781 CLTSTVQLIT QLMPFGCLLD YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA

841 RNVLVKTPQH VKITDFGLAK LLGAEEKEYH AEGGKVPIKW MALESILHRI YTHQSDVWSY

901 GVTVWELMTF GSKPYDGIPA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC WMIDADSRPK

961 FRELIIEFSK MARDPQRYLV IQGDERMHLP SPTDSNFYRA LMDEEDMDDV VDADEYLIPQ

1021 QGFFSSPSTS RTPLLSSLSA TSNNSTVACI DRNGLQSCPI KEDSFLQRYS SDPTGALTED

1081 SIDDTFLPVP EYINQSVPKR PAGSVQNPVY HNQPLNPAPS RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN

1141 TVQPTCVNST FDSPAHWAQK GSHQISLDNP DYQQDFFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV

1201 APQSSEFIGA

74	PRT	Loài người	EGF	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIG ERCQYRDLKWWELR

SEQ ID SỐ: 75, PRT, Loài người, Tenasxin-C

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvyniklpv

61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfqeh tvdgenqivf thriniprra cgcaaapdvk

121 ellsrleele nlvsslreqc tagagcclqp atgrldtrpf csgrgnfste gcgcvcepgw

181 kgpncsepec pgnchlrgrc idgqcicddg ftgedcsqla cpsdcndqgk cvngvcicfe

241 gyagadcsre icpvpcseeh gtcvdglcvc hdgfagddcn kplclnncyn rgrcvenecv

301 cdegftgedc selicpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq

361 cvcdegfagv dcsekrcpad chnrgrcvdg rcecddgftg adcgelkcpn gcsghgrcvn

421 gqcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsdmsc pndchqhgrc

481 vngmcvcddg ytgedcrdrq cprdcsnrgl cvdgqcvced gftgpdcael scpndchgqg

541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgq grcvdgqcic hegftgldcg qhscpsdcnn

601 lgqcvsgrci cnegysgedc sevsppkdlv vtevteetvn lawdnemrvt eylvvytpth

661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapeglkf

721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifrnmn kedegeitks lrrpetsyrq tglapgqeye

781 islhivknnt rgpglkrvtt trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltygik

841 dvpgdrttid ltedenqysi gnlkpdteye vslisrrgdm ssnpaketft tgldaprnlr

901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte

961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla kfdryrlnys

1021 lptgqwvgvq lprnttsyvl rglepgqeyn vlltaekgrh kskparvkas teqapelenl

1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy
1141 tvsiygviqg yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda lklnwtapeg ayeyffiqvq
1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve vlteevpdmg
1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt
1321 pytvtlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dglrlnwtaa dnayehfviq
1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls aeastakepe
1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrlle tveynisgae rtahisglpp
1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm asenafdsfl
1561 vtvvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp lraeivteae
1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vlkirdtkkq sepleitlla pertrditgl
1681 reateyeiel ygiskgrrsq tvsaiattam gspkevifsd itensatvsw raptaqvesf
1741 rityvpitgg tpsmvtvdgt ktqtrlvkli pgveylvsii amkgfeesep vsgsfttald
1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekvpe itrtvsgntv eyaltdlepa
1861 teytlrifae kgpqksstit akfttdldsp rdltatevqs etalltwrpp rasvtgyllv
1921 yesvdgtvke vivgpdttsy sladlspsth ytakiqalng plrsnmiqti fttigllypf
1981 pkdcsqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfcdmtsdg ggwivflrrk ngrenfyqnw
2041 kayaagfgdr reefwlgldn lnkitaqgqy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk
2101 lkvegysgta gdsmayhngr sfstfdkdtd saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd
2161 nnhsqgvnwf hwkghehsiq faemklrpsn frnlegrrkr a

76	PRT	Nhân tạo	Fibcon	Ldaptdlqvtnvtdtsitvswtppsatitgyritytpsngpgeqkeltvppsatsv tltgltpgveyvvsiyalkdnqespplvgtqtt
77	PRT	Nhân tạo	Miền fibronectin FN3 thứ 10 (FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	GSGS
79	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
80	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	APAP
81	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	APAPAPAPAP
82	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	APAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPA PAP

84	PRT	Nhân tạo	Mối liên kết	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	Nhân tạo	Vòng Tencon BC	TAPDAAFD
86	PRT	Nhân tạo	Vòng Tencon CF	KGGHRSN
87	PRT	Nhân tạo	Vòng P53A1R5-17 BC	ADPHGFYD
88	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-47 BC	TYDRDGYD
89	PRT	Nhân tạo	Vòng P54AR4-47 BC	WDPFSFYD
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	Vòng FG của EGFR	HNVYKDTNNRGL
96	PRT	Nhân tạo	Vòng FG của EGFR	LGSYVFEHDVM
97	ADN	Nhân tạo	> phần EGFR của ECB97; P54AR4-83v22	Atgttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccatttttcaccacc
98	ADN	Nhân tạo	> phần EGFR của ECB15; P54AR4-83v2	Atgctgccagccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagac accaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
99	PRT	Nhân tạo	tencon 27	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	Nhân tạo	thư viện TCL 14	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

>SEQ ID SỐ: 101

PRT

Loài người

cMet

1 mkapavlapg ilvllftlvq rsngeckeal aksemnvnmk yqlpnftaet piqnvilheh

61 hiflgatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanlsgg vwkdninmal

121 vvdtyyddql làcgsvnrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc ifspqieeps qcpdcvvsal

181 gakvlssvkd rfinffvgnt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdgfmflt dqsyidvlpe

241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriir fcsinsglhs ymemplecil

301 tekrkkrstk kevfnilqaa yvskpgaqla rqigaslndd ilfgvfaqsk pdsaepmdrs

361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvrclqhfy gpnhehcfnr tllrnssgce arrdeyrtef

421 ttalqrvdlf mgqfsevllt sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvvsrs gpstphvnfl

481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplnglgc rhfqscsqcl sappfvqcgw

541 chdkcvrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf rrnnkfdlkk

601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhfnmsiii snghgttqys tfsyvdpvit

661 sispkygpma ggtlltltgn ylnsgnsrhi siggktctlk svsnsilecy tpaqtistef

721 avklkidlan retsifsyre dpivyeihpt ksfistwwke plnivsflfc fasggstitg

781 vgknlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsnseiicct tpslqqlnlq lplktkaffm

841 ldgilskyfd liyvhnpvfk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg evlkvgnksc

901 enihlhseav lctvpndllk lnselniewk qaisstvlgk vivqpdqnft gliagvvsis

961 tallllgff lwlkkrkqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvsnesvd

1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdisspllqntvh idlsalnpel

1081 vqavqhvvig psslivhfne vigrghfgcv yhgtlldndg kkihcavksl nritdigevs

1141 qfltegiimk dfshpnvlsl lgiclrsegs plvvlpymkh gdlrnfirne thnptvkdli

1201 gfglqvakgm kylaskkfvh rdlaarncml dekftvkvad fglardmydk eyysvhnktg

1261 aklpvkwmal eslqtqkftt ksdvwsfgvl lwelmtrgap pypdvntfdi tvyllqgrrl

1321 lqpeycpdpl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrlàaifs tfigehyvhv natyvnvkcv

1381 apypsllsse ADNddevdtr pasfwets

102	PRT	Loài người	HGF	QRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMS SGVKKEFGHEFDLYE NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG KDLQENYCRNP RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDH TESGKICQRWDHQTP HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIK TCADNTMNDTDVPL ETTECIQGQGEGYRGTVNTIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKC KDLRENYCRNPDGS ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQT RSGLTCSMWDKNME DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPIS RCEGDTTPTIVNL DHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESW VLTARQCFPSRD LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLAR PAVLDDFVSTIDLP NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRG KVTLNESEICAG AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFV RVAYYAKWIHKII LTYKVPQS
103	ADN	Nhân tạo	>Phần ECB97P114AR7P95-C5v2 của cMET	Ctgccggctccgaagaacttggtggtgagccgtgttaccgaagatagc gcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttcgatagcttctgg attcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggcaattgttctgacggtgcc gggctctgaacgctcctacgatttgaccggtctgaaaccgggcaccga gtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
104	ADN	Nhân tạo	>Phần ECB15P114AR7P94-A3 của cMET	Ctgccggcaccgaagaacctggttgtcagccgtgtgaccgaggatag cgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagcctttgacagcttctgga ttcgttactttgaatttctgggtagcggtgaggcgatcgttctgacggtgccg ggctctgaacgcagctatgatttgacgggcctgaagccgggtactgagt acgtggttaacatcatgggcgttaagggtggtaaaatcagcccgccatt gtccgcgatctttaccacg
105	PRT	Nhân tạo	mối liên kết	GGGGS
106	PRT	Nhân tạo	ECB91	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
107	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v2	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

108	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v22	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
109	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v23	lpapknlvvsevtedsarlswddphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
110	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v22	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
111	PRT	Nhân tạo	P114AR7P94-A3v22	lpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersyd ltglkpgteyvvnilgvkggkisppIsaiftt
112	PRT	Nhân tạo	P114AR9P121-A6v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
113	PRT	Nhân tạo	P114AR9P122-A7v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDA IVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
114	PRT	Nhân tạo	P114AR7P95-C5v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
115	ADN	Nhân tạo	ECB97	atgttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccatttttcaccaccgcaccggc accggctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtg agccgtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccgga tgcggcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcggtga ggcaattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccg gtctgaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgttaaggg cggtagcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
116	ADN	Nhân tạo	ECB15	atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggac agcgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcct gattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgac cgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccggg tacggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagaca ccaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgcctgc gccagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgt cagccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccgga tgcagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtg aggcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacg ggcctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaagg gtggtaaaatcagcccgccattgtccgcgatctttaccacg
117	PRT	Nhân tạo	miền gắn kết albumin	tidewllkeakekaieelkkagitsdyyfdlinkaktvegvnalkdeilka

118	PRT	Nhân tạo	ECB18	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
119	PRT	Nhân tạo	ECB28	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
120	PRT	Nhân tạo	ECB38	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv pgsersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
121	PRT	Nhân tạo	ECB39	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapa paplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltv pgsersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapl aeakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
122	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Nhân tạo	P54AR4-17 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Nhân tạo	P54AR4-47 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
125	PRT	Nhân tạo	P54AR4-48 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
126	PRT	Nhân tạo	P54AR4-73 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	Nhân tạo	54AR4-74 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
128	PRT	Nhân tạo	P54AR4-81 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQ YQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSI YGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

130	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT
131	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v2 có	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
132	PRT	Nhân tạo	P54CR4-31v2 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
133	PRT	Nhân tạo	P54AR4-73v2 có Met	MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQY QESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
134	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v2 có Met	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt
135	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v22 có Met	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
136	PRT	Nhân tạo	P54AR4-83v23 có Met	mlpapknlvvsevtedsarlswddphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
137	PRT	Nhân tạo	P53A1R5-17v22 không có Met	mlpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgser sydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaiftt
138	PRT	Nhân tạo	ECB1 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
139	PRT	Nhân tạo	ECB2 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
140	PRT	Nhân tạo	ECB3 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT

141	PRT	Nhân tạo	ECB4 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
142	PRT	Nhân tạo	ECB5 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
143	PRT	Nhân tạo	ECB6 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
144	PRT	Nhân tạo	ECB7 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
145	PRT	Nhân tạo	ECB15 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
146	PRT	Nhân tạo	ECB27 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSI SVPLSAIFTT
147	PRT	Nhân tạo	ECB60 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPMLPAPK NLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGS GEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGG KISPPLSAIFTT
148	PRT	Nhân tạo	ECB37 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSI SVPLSAIFTT

149	PRT	Nhân tạo	ECB94 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	Nhân tạo	ECB95 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	Nhân tạo	ECB96 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
152	PRT	Nhân tạo	ECB97 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT
153	PRT	Nhân tạo	ECB106 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
154	PRT	Nhân tạo	ECB107 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Nhân tạo	ECB108 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
156	PRT	Nhân tạo	ECB109 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT

157	PRT	Nhân tạo	ECB118 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Nhân tạo	ECB119 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Nhân tạo	ECB120 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
160	PRT	Nhân tạo	ECB121 không có Met	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT
161	PRT	Nhân tạo	ECB91 không có Met	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAPK NLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
162	PRT	Nhân tạo	ECB18 không có Met	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltv pgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
163	PRT	Nhân tạo	ECB28 không có Met	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltvp gsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
164	PRT	Nhân tạo	ECB38 không có Met	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvp gsersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp

165	PRT	Nhân tạo	ECB39 không có Met	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpg sersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkalldeilaalp
166	ADN	Nhân tạo	ECB97 không có Met	ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccaccgcaccggcaccg gctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtgagcc gtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcg gcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggc aattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtct gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggt agcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
167	ADN	Nhân tạo	ECB15 không có Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgcctgcgc cagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgtca gccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatg cagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtgag gcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggg cctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaagggtg gtaaaatcagcccgccattgtccgcgatctttaccacg
168	ADN	Nhân tạo	>Phần ECB97 của EGFR; P54Å4-83v2 không có Met	ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
169	ADN	Nhân tạo	>Phần ECB15 của EGFR; P54Å4-83v2 không có Met	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
170	PRT	Nhân tạo	ECB94 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
171	PRT	Nhân tạo	ECB95 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC

172	PRT	Nhân tạo	ECB96 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	Nhân tạo	ECB97 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSIS PPLSAIFTTC
174	PRT	Nhân tạo	ECB106 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
175	PRT	Nhân tạo	ECB107 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
176	PRT	Nhân tạo	ECB108 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
177	PRT	Nhân tạo	ECB109 có cystein đầu cuối C	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSIS PPLSAIFTTC
178	PRT	Nhân tạo	ECB91 có cystein đầu cuối C	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTTC

>SEQ ID SỐ: 179

PRT

Nhân tạo

Vòng FG của miền FN3 gắn kết EGFR

HNVYKDTNX$_9$RGL;

trong đó X$_9$ là M hoặc I

>SEQ ID SỐ: 180

PRT

Nhân tạo

Vòng FG là miền FN3 gắn kết EGFR

LGSYVFEHDVML (SEQ ID SỐ: 180),

>SEQ ID SỐ: 181

PRT

Nhân tạo

vòng BC của miền FN3 gắn kết EGFR

X$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$ (SEQ ID SỐ: 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;

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.

>SEQ ID SỐ: 182

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 gắn kết EGFR

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLT VP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX9RGLPLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 182),

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;

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;

X_8 là Y, F hoặc L; và

X_9 là M hoặc I

>SEQ ID SỐ: 183

PRT

Nhân tạo

Miền FN3 gắn kết EGFR

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLT VP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 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;

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.

>SEQ ID SỐ: 184

PRT

Nhân tạo

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

DSFX$_{10}$IRYX$_{11}$E X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$ (SEQ ID SỐ: 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 SỐ: 185

PRT

Nhân tạo

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

TEYX$_{17}$VX$_{18}$IX$_{19}$X$_{20}$V KGGX$_{21}$X$_{22}$SX$_{23}$ (SEQ ID SỐ: 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

X$_{23}$ là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

>SEQ ID SỐ: 186

PRT

Nhân tạo

miền FN3 gắn kết c-Met

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX$_{10}$IRYX$_{11}$E X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX$_{17}$VX$_{18}$IX$_{19}$X$_{20}$VKGGX$_{21}$X$_{22}$SX$_{23}$PLSAEFTT (SEQ ID SỐ: 186),

trong đó

X_{10} là W, F hoặc V; và

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;

X_{16} là E hoặc D;

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

X_{23} là V, T, H, I, P, Y hoặc L.

>SEQ ID SỐ: 187

PRT

Nhân tạo

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

LPAPKNLVVSX$_{24}$VTX$_{25}$DSX$_{26}$RLSWDDPX$_{27}$AFYX$_{28}$SFLIQYQX$_{29}$SEKVGEAIX$_{30}$LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX$_{31}$VHNVYKDTNX$_{32}$RGLPLSAX$_{33}$FTT

(SEQ ID SỐ: 187), trong đó

X_{24} là E, N hoặc R;

X_{25} là E hoặc P;

X_{26} là L hoặc A;

X_{27} là H hoặc W;

X_{28} là E hoặc D;

X_{29} là E hoặc P;

X_{30} là N hoặc V;

X_{31} là G hoặc Y;

X_{32} là M hoặc I; và

X_{33} là E hoặc I;

>SEQ ID SỐ: 188

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

LPAPKNLVVSX$_{34}$VTX$_{35}$DSX$_{36}$RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX$_{37}$FX$_{38}$X$_{39}$X$_{40}$GX$_{41}$A IX$_{42}$LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX$_{43}$X$_{44}$VKGGX$_{45}$ISPPLSAX$_{46}$FTT (SEQ ID SỐ: 188); trong đó

X$_{34}$ là E, N hoặc R;

X$_{35}$ là E hoặc P;

X$_{36}$ là L hoặc A;

X$_{37}$ là E hoặc P;

X$_{38}$ là V hoặc L;

X$_{39}$ là G hoặc S;

X$_{40}$ là S hoặc K;

X$_{41}$ là E hoặc D;

X$_{42}$ là N hoặc V;

X$_{43}$ là L hoặc M;

X$_{44}$ là G hoặc S;

X$_{45}$ là S hoặc K; và

X$_{46}$ là E hoặc I.

>SEQ ID SỐ: 189

EGFR mAb E1 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLY

LQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 190

EGFR mAb E1 VL

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSL ESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQP

EDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

>SEQ ID SỐ: 191

EGFR mAb E2 VH

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY

61 VDSVKGRFTI SRADNKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL WGRGTLVTVS

121 S

>SEQ ID SỐ: 192

EGFR mAb E2 VL

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK

>SEQ ID SỐ: 193

cMet mAb M1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGLÀWVRQAPGHGLEWMGW LÀAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLR GTNYFDYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 194

cMet mAb M1VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASS LLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP-ITFGQGTRLEIK

>SEQ ID SỐ: 195

cMet mAb M2 VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATIS DDGSYTYYPDSVKGRFTISRADNKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYY YGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID SỐ: 196

cMet mAb M2 VL

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK

>SEQ ID SỐ: 197

Gp120 chuỗi nặng có F405L

qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapgqrfewmgwinpyngnkefsakfqdrvtftadtsa
ntaymelrslrsadtavyycarvgpyswddspqdnyymdvwgkgttvivssastkgpsvfplapsskstsggtaalgc
lvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdktht
cppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv
vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektlàkakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiave
wesngqpennykttppvldsdgsfllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

>SEQ ID SỐ: 198

Gp120 chuỗi nặng có K409R

qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapgqrfewmgwinpyngnkefsakfqdrvtftadtsa
ntaymelrslrsadtavyycarvgpyswddspqdnyymdvwgkgttvivssastkgpsvfplapsskstsggtaalgc
lvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdktht
cppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv
vsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektlàkakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiave
wesngqpennykttppvldsdgsfflysrltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

>SEQ ID SỐ: 199

EM1-mAb H1 (kháng EGFR,405L)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WDDGSYKYYGDSVKGRFTLÀRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIT
MVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTLÀKAKGQPREPQVYTLPPSREE

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 200
EM-1 mAb L1
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSL
ESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>SEQ ID SỐ: 201
EM-1 mAb H2 (K409R, kháng cMet)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWL
ÀAYNGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRG
TNYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTLÀKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 202
EM-1 mAb L2
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASS
LLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

>SEQ ID SỐ: 203

Vùng cố định H1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 204

Vùng cố định H2

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 205

EM1-mAb H1 cADN pdr000015499

caggtgcagctggtcgagagcggcggaggggtggtgcagcccggcagaagcctgaggctgtcctgcgccgccagcgg
cttcaccttcagcacctacggcatgcactgggtgcggcaggccccaggcaagggcctggagtgggtggccgtgatctggg
acgacggcagctacaagtactacggcgacagcgtgaagggcaggttcaccatcagcagggacaacagcaagaacaccc
tgtacctgcagatgaacagcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagggacggcatcaccatggtgcg
gggcgtgatgaaggactacttcgactactggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgccagcaccaagggccc
aagcgtgttccccctggcccccagcagcaagagcaccagcggcggcacagccgccctgggctgcctggtgaaggacta
cttccccgagccagtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagag
cagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgaccgtgcccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccc
ctgcccagccccagagctgctgggcggacccagcgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagca
ggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgagccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacgg

cgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgac
cgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaatacaagtgcaaggtctccaacaaggccctgccagcccccatcgaa
aagaccatcagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacaccctgcccccccagccgggaggagatgac
caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggcc
agcccgagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagcttcctcctgtacagcaagctgaccgt
ggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccag
aagtccctgagcctgagccccggcaaatga

>SEQ ID SỐ: 206

EM1-mAb L1 cADN pDR000015499

atccagctgacccagagccccagcagcctgagcgccagcgtgggcgaccgggtgaccatcacctgccgggccagccag
gacatcagcagcgccctggtctggtatcagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgacgccagctccct
ggaaagcggcgtgcccagccggttcagcggcagcgagagcggcaccgacttcaccctgaccatcagcagcctgcagcc
cgaggacttcgccacctactactgccagcagttcaacagctacccccctgacctttggcggcggaacaaaggtggagatcaa
gcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccccagcgacgagcagctgaagagcggcaccgccagcgtggtgt
gcctgctgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagcc
aggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgact
acgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggg
gcgagtgctga

>SEQ ID SỐ: 207

EM-1 mAb H2 cADN pDR000016584

caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcgagacttctggttaca
cctttaccagctatggtatcagctgggtgcgacaggcccctggacacgggcttgagtggatgggatggatcagcgcttaca
atggttacacaaactatgcacagaagctccagggcagggtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatg
gagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagatctgagaggaactaactactttgactact
ggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccaagcgtgttcctctggccccagcagcaa
gagcacatctggcggaacagccgccctgggctgcctggtgaaagactacttccccgagcccgtgaccgtgtcctggaact
ctggcgccctgaccagcggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgtccagcgtggtg
accgtgcccagcagctccctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggaca
agcgggtggaacccaagagctgcgacaagacccacacctgtccccctgccctgccctgaactgctgggcggaccctc
cgtgttcctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatcagccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggacgt

gtcccacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccaga
gaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagt
acaagtgcaaggtctccaacaaggccctgcctgctcccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccccgcga
gcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaaaggctt
ctaccccagcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggacagcccgagaacaactacaagaccacccccccctgtgctg
gacagcgacggctccttcttcctgtactctcggctgaccgtggacaagagccggtggcagcagggaaacgtgttcagctgc
agcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccgggaagtga

>SEQ ID SỐ: 208
EM-1 mAb L2 cADN pDR000016584
gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtccgcctctgtgggcgacagagtgaccatcacctgtcgggcctcccag
ggcatctccaactggctggcctggttccagcacaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccgcctcctccctg
ctgtccggcgtgccctccagattctccggctctggctccggcaccgacttcaccctgaccatctccagcctgcagcccgagg
acttcgccacctactactgccagcaggccaactccttccccatcaccttcggccagggcacccggctggaaatcaagcgta
cggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccccagcgacgagcagctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgcctg
ctgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggag
agcgtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgactacgaga
agcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtg
ctga

>SEQ ID SỐ: 209
Chuỗi nhẹ Gp120
Eivltqspgtlslspgeratfscrsshsirsrrvawyqhkpgqaprlvihgvsnrasgisdrfsgsgsgtdftltitrvepedfa
lyycqvygassytfgqgtklerkrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvADNlqsgnsqes
vteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

>SEQ ID SỐ: 210
E1 HC1 HCDR1
TYGMH

>SEQ ID SỐ: 211
E1 HC1 HCDR2

VIWDDGSYKYYGDSVKG

>SEQ ID SỐ: 212
E1 HC1 HCDR3
DGITMVRGVMKDYFDY

>SEQ ID SỐ: 213
E1 LC1 LCDR1
RASQDISSALV

>SEQ ID SỐ: 214
E1 LC1 LCDR2
DASSLES

>SEQ ID SỐ: 215
E1 LC1 LCDR3
QQFNSYPLT

>SEQ ID SỐ: 216
E1 HC2 HCDR1
SYGIS

>SEQ ID SỐ: 217
E1 HC2 HCDR2
WISAYNGYTNYAQKLQG

>SEQ ID SỐ: 218
E1 HC2 HCDR3
DLRGTNYFDY

>SEQ ID SỐ: 219
E1 LC2 LCDR1

RASQGISNWLA

>SEQ ID SỐ: 220
E1 LC2 LCDR2
AASSLLS

>SEQ ID SỐ: 221
E1 LC2 LCDR3
QQANSFPIT

>SEQ ID SỐ: 222
E2 mAB HC1 HCDR1
SYWMN

>SEQ ID SỐ: 223
E2 mAb HC1 HCDR2
NIKKDGSEKYYVDSVKG

>SEQ ID SỐ: 224
E2 mAb HC1 HCDR3
DLGWGWGWYFDL

>SEQ ID SỐ: 225
E2 mAB LC1 LCDR1
RASQSVSSYLA

>SEQ ID SỐ: 226
E2 mAb LC1 LCDR2
DASNRAT

>SEQ ID SỐ: 227
E2 mAb LC1 LCDR3

QQRSNWPPT

>SEQ ID SỐ: 228
E2 mAB HC2 HCDR1
DYYMY

>SEQ ID SỐ: 229
E2 mAb HC2 HCDR2
TISDDGSYTYYPDSVKG

>SEQ ID SỐ: 230
E2 mAb HC2 HCDR3
EGLYYYGSGSYYNQDY

>SEQ ID SỐ: 231
E2 mAB LC2 LCDR1
RASQGLSSALA

>SEQ ID SỐ: 232
E2 mAb LC2 LCDR2
DASSLES

>SEQ ID SỐ: 233
E2 mAb LC2 LCDR3
QQFTSYPQIT

>SEQ ID SỐ: 234
E2 mAb HC1 (EGFR-F405L)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRADNKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL

WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 235

E2 mAb LC1 (EGFR)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

>SEQ ID SỐ: 236

E2 mAb HC2 (c-Met- K409R)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATIS
DDGSYTYYPDSVKGRFTISRADNKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYY
YGSGSYYNQDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID SỐ: 237

E2 mAb LC2 (cMet)

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

>SEQ ID SỐ: 238
epitop không liên tục c-Met của mAb 069
PEFRDSYPIKYVHAF

>SEQ ID SỐ: 239
Epitop không liên tục c-Met của mAb 069
FAQSKPDSAEPMDRSA

>SEQ ID SỐ: 240
epitop 5D5 mAb
PGAQLARQIGASLNDD

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể của thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR- epidermal growth factor receptor)/thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (c-Met) đặc hiệu kép được phân lập, bao gồm:

a) chuỗi nặng thứ nhất (HC1) bao gồm miền cố định HC1 3 (HC1 CH3) và vùng biến đổi HC1 1 (VH1);

b) chuỗi nặng thứ hai (HC2) bao gồm miền cố định HC2 3 (HC2 CH3) và vùng biến đổi HC2 2 (VH2);

c) chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ 1 (VL1); và

d) chuỗi nhẹ thứ hai (LC2) bao gồm chuỗi nhẹ vùng biến đổi 2 (VL2), trong đó cặp VH1 và VL1 để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR, cặp VH2 và VL2 để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met, HC1 bao gồm ít nhất một sự thay thế trong HC1 CH3 và HC2 bao gồm ít nhất sự thay thế trong HC2 CH3, và sự thay thế trong HC1 CH3 và sự thay thế trong HC2 CH3 xảy ra ở các vị trí gốc axit amin khác nhau, khi số gốc là theo chỉ số EU, và trong đó VH1, VL1, VH2 và VL2 bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID SỐs: 189, 190, 193 194 tương ứng.

2. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó:

a) HC1, LC1, HC2 và LC2 bao gồm các trình tự axit amin gồm các SEQ ID SỐ: 199, 200, 201 và 202, lần lượt, tùy chọn có lyzin đầu C được loại bỏ khỏi HC1, HC2, hoặc cả hai HC1 và HC2; và/hoặc

b) kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của kinaza được điều hòa bởi tín hiệu ngoại bào 1 và 2 (ERK1/2) trong dòng tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc SKMES-1 có trị số IC50 mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 10 lần, ít nhất 20 lần, ít nhất 30 lần, ít nhất 40 lần, ít nhất 50 lần hoặc ít nhất 60 lần khi so với có trị số IC_{50} ức chế phosphoryl hóa của ERK1/2 trong các dòng tế bào NCI-H292, NCI-H1975 hoặc SKMES-1 với hỗn hợp của kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm chuỗi nặng 3 (HC3) và chuỗi nhẹ 3 (LC3) và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm chuỗi nặng 4 (HC4) và chuỗi nhẹ 4 (LC4), trong đó

HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng, và

i) sự phosphoryl hóa của ERK1/2 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể kháng photphoERK1/2 làm kháng thể bắt và kháng thể gắn với ERK1/2 được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện, một cách tùy ý trong đó:

kháng thể ức chế phosphoryl hóa của ERK1/2 có trị số IC_{50} là khoảng $2x10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $1x10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn; và/hoặc

ii) ERK1 được phosphoryl hóa ở các gốc Thr202 và Tyr204, và ERK2 được phosphoryl hóa ở các gốc Thr185 và Tyr197.

iii) HC1, LC1, HC2 và LC2 được mã hóa bởi polynucleotit tổng hợp bao gồm trình tự là các SEQ ID SỐ: 205, 206, 207 và 208, lần lượt,

và/hoặc;

c) kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của protein kinaza B (AKT) ở Ser473 trong dòng tế bào NCI-H1975 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 70 lần khi so với trị số IC_{50} ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Ser473 trong dòng tế bào NCI- H1975 với hỗn hợp kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm HC3 và LC3 và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm HC4 và LC4, trong đó:

HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng, và

sự phosphoryl hóa của AKT ở Ser473 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết với AKT được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa làm kháng thể bắt và kháng thể kháng photpho AKT Ser473 được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện, tùy ý trong đó kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Ser473 có trị số IC_{50} là $1x10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; và/hoặc

d) kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Thr308 trong dòng tế bào NCI-H1975 có trị số IC_{50} mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 100 lần khi so với trị số IC_{50} ức chế sự phosphoryl hóa của AKT ở Thr308 trong dòng tế bào NCI-H1975 với hỗn hợp kháng thể EGFR hóa trị một đối chứng bao gồm HC3 và LC3 và kháng thể c-Met hóa trị một đối chứng bao gồm HC4 và LC4, trong đó

HC3 và HC1, LC3 và LC1, HC4 và HC2, và LC4 và LC2 lần lượt có các trình tự axit amin tương đồng, và

sự phosphoryl hóa của AKT ở Thr308 được đánh giá trong toàn bộ các hợp chất dung giải tế bào bằng thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa bằng cách sử dụng kháng thể gắn với AKT được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa làm kháng thể bắt và kháng thể kháng photpho AKT Thr308 được tiếp hợp với hợp chất điện hóa phát quang làm kháng thể phát hiện, tùy ý trong đó kháng thể ức chế sự phosphoryl hóa của AKT Thr308 có trị số IC50 là 1x10-9 M hoặc nhỏ hơn; và/hoặc

e) kháng thể đặc hiệu kép gắn EGFR có trình tự axit amin shown trong SEQ ID SỐ: 73 ở các gốc EGFR K489, 1491, K467 và S492 và c-Met ở các gốc PEFRDSYPIKYVHAF (SEQ ID SỐ: 238) và FAQSKPDSAEPMDRSA (SEQ ID SỐ: 239); và/hoặc

f) kháng thể ức chế sự tăng trưởng của các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 có trị số IC50 mà nhỏ hơn ít nhất khoảng 300 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 400 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 500 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 600 lần, nhỏ hơn ít nhất khoảng 700 lần hoặc nhỏ hơn ít nhất khoảng 800 lần khi so với với trị số IC50 ức chế sự phát triển các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 with cetuximab, khi các tế bào NCI-H292 hoặc NCI-H1975 được phát triển trong các điều kiện kèm theo thấp; và/hoặc

g) ức chế sự tăng trưởng của u tế bào SKMES-1 biểu hiện HGF ở chuột SCID Beige với tỷ lệ phần trăm (%) trị số T/C là nhỏ hơn ít nhất 500 lần trong ngày 36 khi so với cetuximab, khi kháng thể đặc hiệu kép và cetuximab được dùng ở liều lượng 20 mg/kg; và/hoặc;

h) kháng thể trung hòa tín hiệu EGFR và c-Met.

3. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó HC1 và HC2 của lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, ví dụ trong đó HC1 và HC2 là của lớp IgG1; tùy ý trong đó HC1 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám sự thay thế ở các vị trí gốc 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 hoặc 409, khi số gốc theo chỉ số EU, như

a) trong đó HC1 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm ít nhất một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế ở các vị trí gốc 350, 370, 405 hoặc 409 ;

b) trong đó HC1 CH3 bao gồm ít nhất một sự thay thế và HC2 CH3 bao gồm ít nhất một sự thay thế ở các vị trí gốc 405 hoặc 409 ;

c) trong đó HC1 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc F405L và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R hoặc F405L; hoặc

d) trong đó HC1 CH3 bao gồm sự thay thế F405L và HC2 CH3 bao gồm sự thay thế K409R.

4. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kháng thể này còn bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 các sự thay thế axit amin bảo tồn trong HC1, LC1, HC2 hoặc LC2 bao gồm sự thay thế M252Y/S254T/T256E trong HC1 và/hoặc HC2, trong đó số gốc theo chỉ số EU.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể có cấu trúc glycan nhánh kép với hàm lượng fucoza nằm trong khoảng từ 1% đến 15%.

6. Polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 và/hoặc LC2 của kháng thể dặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó HC1, LC1, HC2 và LC2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID SỐ: 205, 206, 207 hoặc 208.

7. Vectơ bao gồm polynucleotit theo điểm 6.

8. Tế bào chủ được phân lập bao gồm vectơ theo điểm 7.

9. Phương pháp tạo ra kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép được phân lập theo điểm 2(a), bao gồm:

a) kết hợp kháng thể kháng EGFR hóa trị hai đặc hiệu đơn được phân lập bao gồm hai chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 199 và hai chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 200 và kháng thể kháng c-Met hóa trị hai đặc hiệu đơn được phân lập bao gồm hai chuỗi nặng có SEQ ID SỐ: 201 và hai chuỗi nhẹ có SEQ ID SỐ: 202 theo hỗn hợp với tỷ lệ mol 1:1;

b) đưa chất khử vào hỗn hợp;

c) ủ hỗn hợp khoảng chín mươi phút đến sáu giờ;

d) loại bỏ chất khử; và

e) tinh chế kháng thể EGFR/c-Met đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng thứ nhất có SEQ ID SỐ: 199 và chuỗi nặng thứ hai có SEQ ID SỐ: 201, chuỗi nhẹ thứ nhất có SEQ ID SỐ: 200 và chuỗi nhẹ thứ hai có SEQ ID SỐ: 202, trong đó chuỗi nặng thứ nhất của các cặp SEQ ID SỐ: 199 với chuỗi nhẹ thứ nhất có SEQ ID SỐ: 200 để tạo thành miền gắn kết thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu EGFR, và chuỗi nặng thứ hai của các cặp có SEQ ID SỐ: 201 với chuỗi nhẹ thứ hai có SEQ ID SỐ: 202 để tạo thành miền gắn kết thứ hai mà gắn kết đặc hiệu c-Met,

tùy ý trong đó:

i) chất khử là 2-mercaptoetanolamin (2-MEA), trong đó 2-MEA có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng 25 mM đến 75 mM, và

ii) bước ủ được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25° C đến 37°C

10. Dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất mang dược dụng.

11. Phương pháp ức chế sự phát triển hoặc sự tăng sinh của các tế bào *in vitro* mà biểu hiện EGFR và/hoặc c-Met, bao gồm sự tiếp xúc các tế bào với kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 2(a) hoặc 2(b).

Fig.1A

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

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

```
             ************** . *   :   ***** ***
```

Fig.1B

```
SEQ ID
SỐ:

26          LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAP-DAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTG     (60)
28          LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAP-DAAFDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG
            ***************** ************************** **************

26          LKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT                               (94)
28          LKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
            ***************************************** ***
```

Fig.2

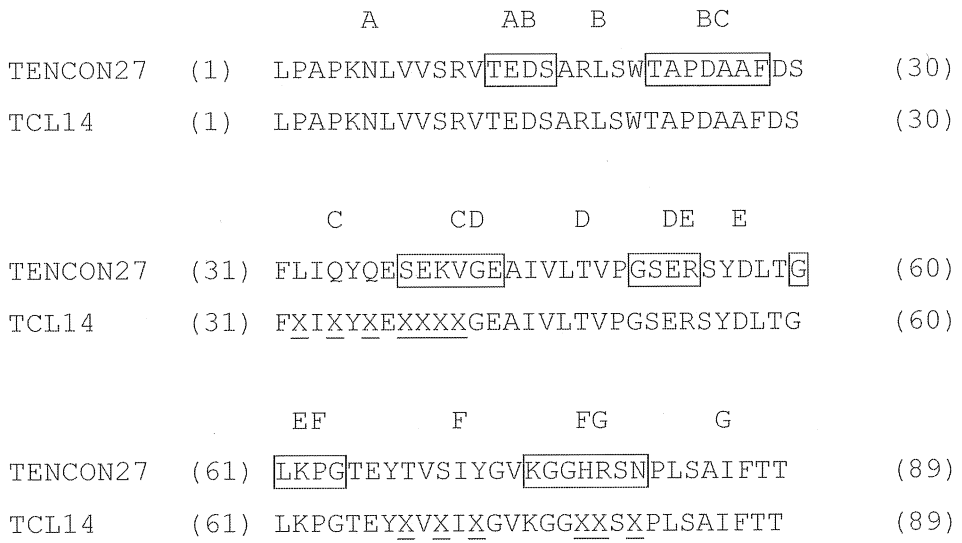

A AB B BC
TENCON27 (1) LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS (30)
TCL14 (1) LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS (30)
C CD D DE E
TENCON27 (31) FLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
TCL14 (31) FXIXYXEXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
EF F FG G
TENCON27 (61) LKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT (89)
TCL14 (61) LKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSAIFTT (89)

Fig.3

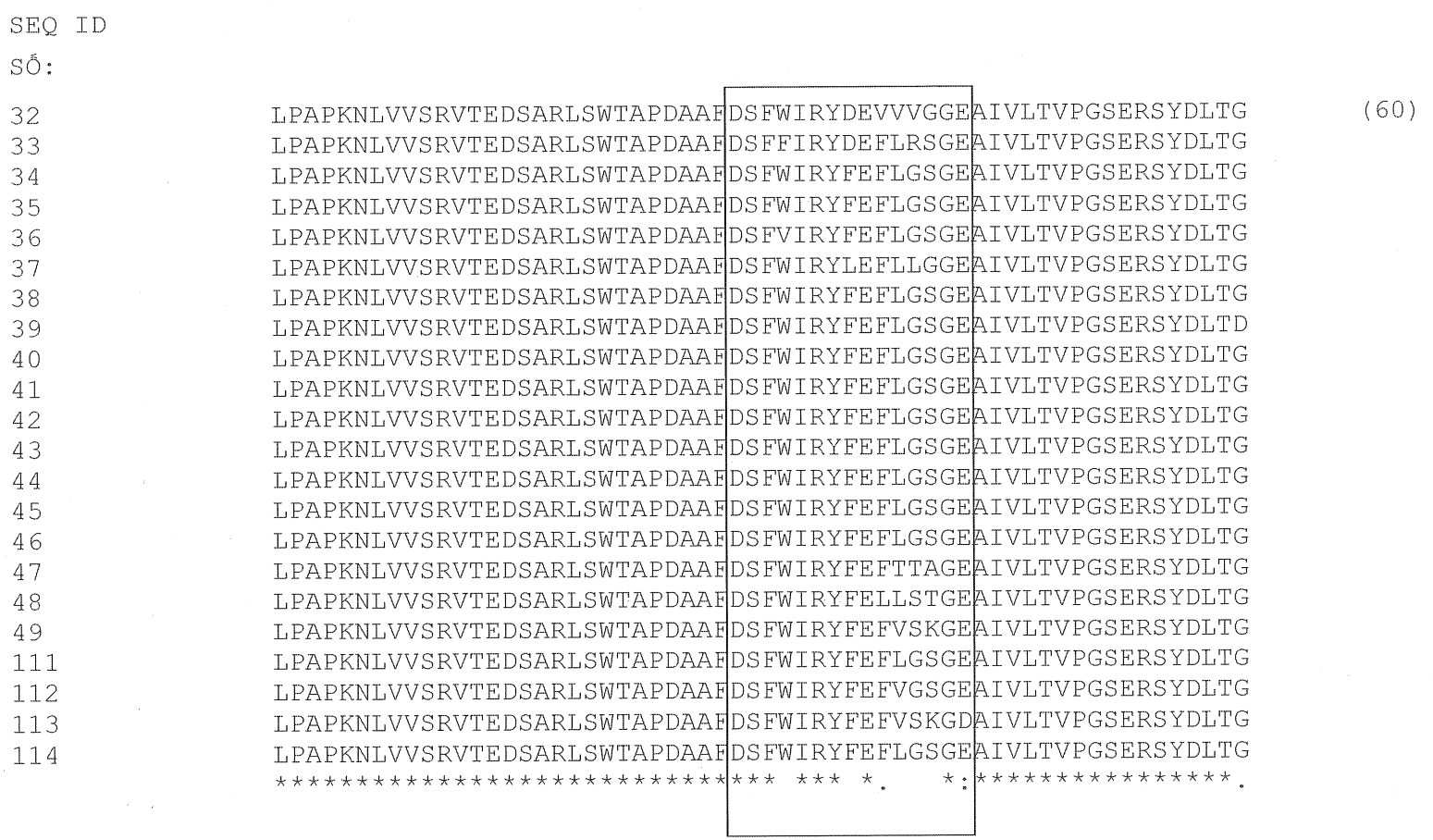

SEQ ID
SỐ:
32 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
33 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
34 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
35 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
36 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
37 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFLLGGEAIVLTVPGSERSYDLTG
38 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
39 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTD
40 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
41 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
42 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
43 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
44 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
45 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
46 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
47 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG
48 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG
49 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG
111 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
112 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
113 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTG
114 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG

Fig.3

SEQ ID SỐ:		
32	LKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT	(89)
33	LKPGTEYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT	
34	LKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT	
35	LKPGTEYVVNILGVKGGGLSVPLSAIFTT	
36	LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT	
37	LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT	
38	LKPGTEYVVGINGVKGGYISYPLSAIFTT	
39	LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT	
40	LKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT	
41	LKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT	
42	LKPGTEYAVNIMGVKGGRVSVPLSAIFTT	
43	LKPGTEYVVQILGVKGGSISVPLSAIFTT	
44	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISYPLSAIFTT	
45	LKPGTEYVVQILGVKGGYISIPLSAIFTT	
46	LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT	
47	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT	
48	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT	
49	LKPGTEYVVNIMGVKGGSISPPLSAIFTT	
111	LKPGTEYVVNILGVKGGKISPPLSAIFTT	
112	LKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT	
113	LKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT	
114	LKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT	
	******** * * .**** :* ********	

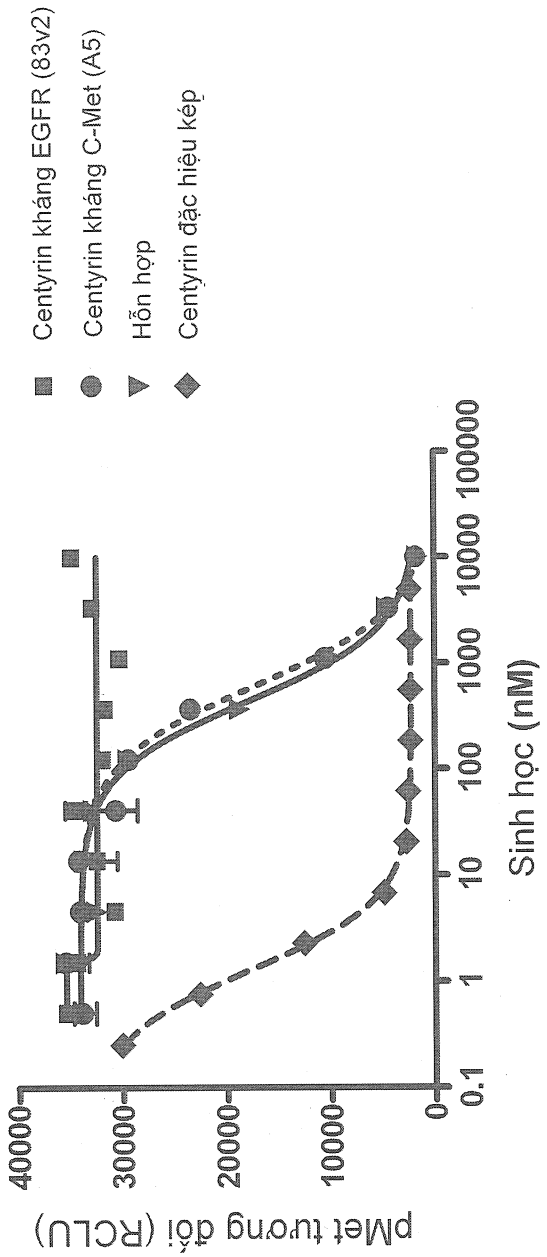
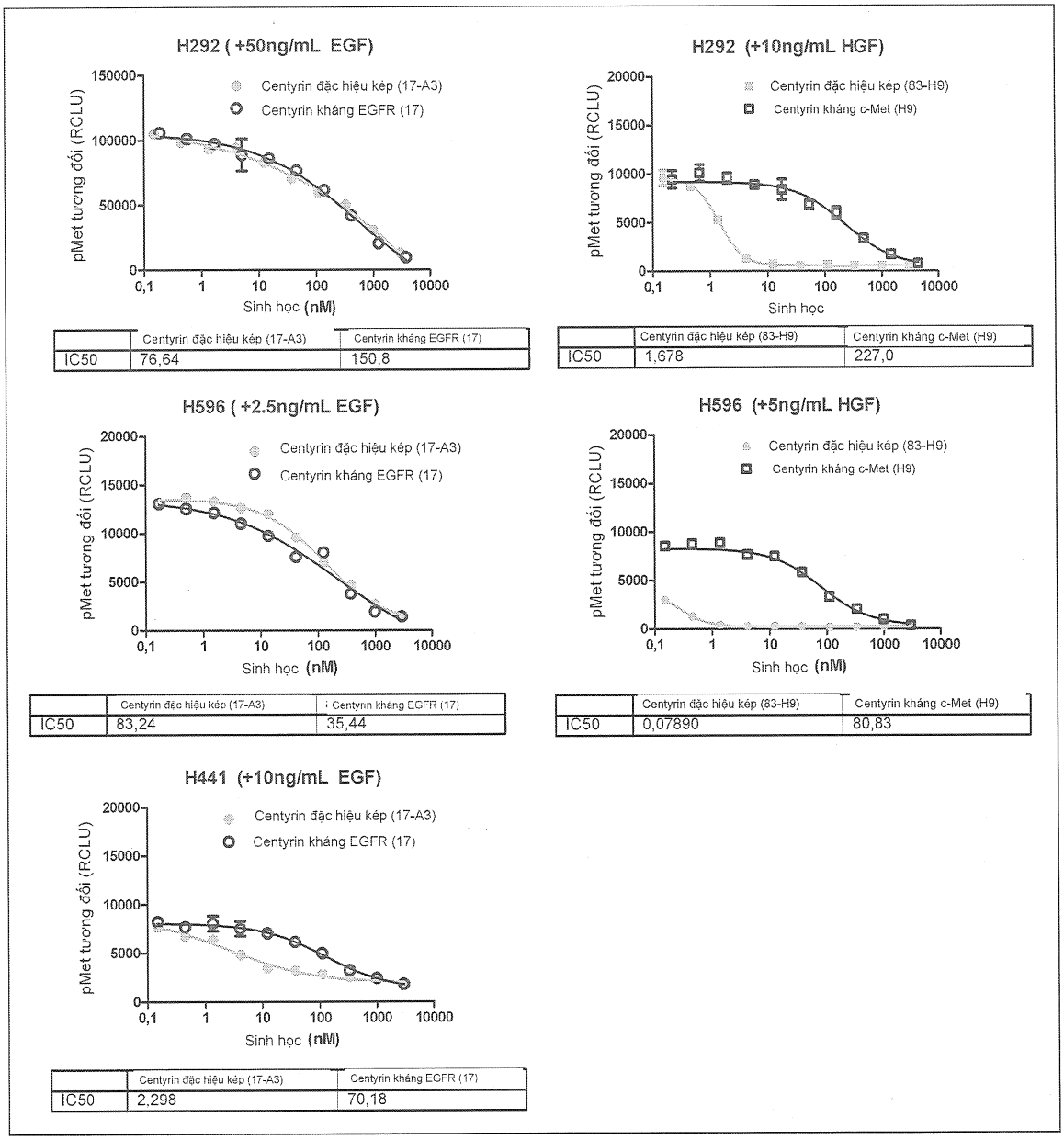

Centyrin kháng EGFR (83v2)
Centyrin kháng C-Met (A5)
Hỗn hợp
Centyrin đặc hiệu kép
pMet tương đối (RCLU)
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
Sinh học (nM)

Fig.4

Fig.5



	Centyrin đặc hiệu kép (17-A3)	Centyrin kháng EGFR (17)
IC50	76,64	150,8

	Centyrin đặc hiệu kép (83-H9)	Centyrin kháng c-Met (H9)
IC50	1,678	227,0

	Centyrin đặc hiệu kép (17-A3)	Centynn kháng EGFR (17)
IC50	83,24	35,44

	Centyrin đặc hiệu kép (83-H9)	Centyrin kháng c-Met (H9)
IC50	0,07890	80,83

	Centyrin đặc hiệu kép (17-A3)	Centyrin kháng EGFR (17)
IC50	2,298	70,18

Fig.6

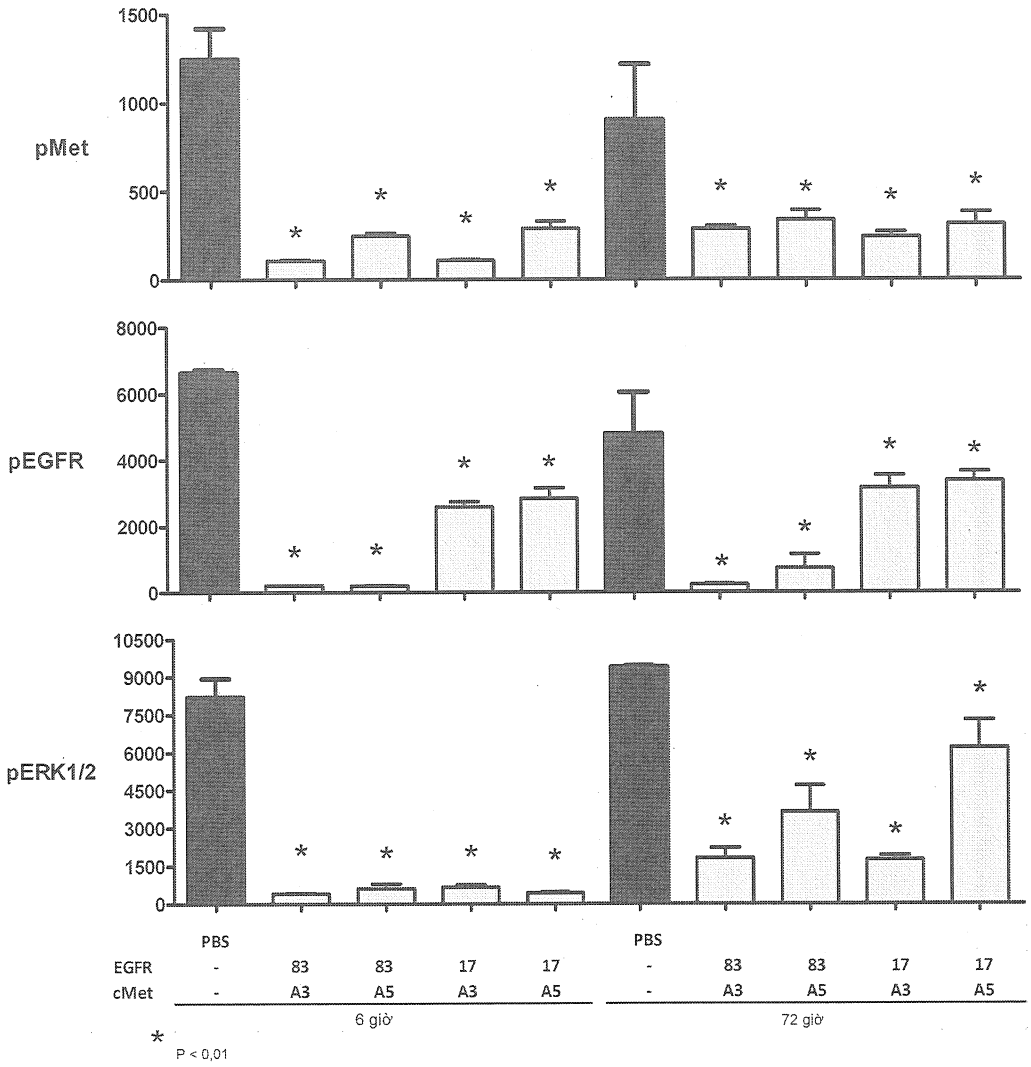
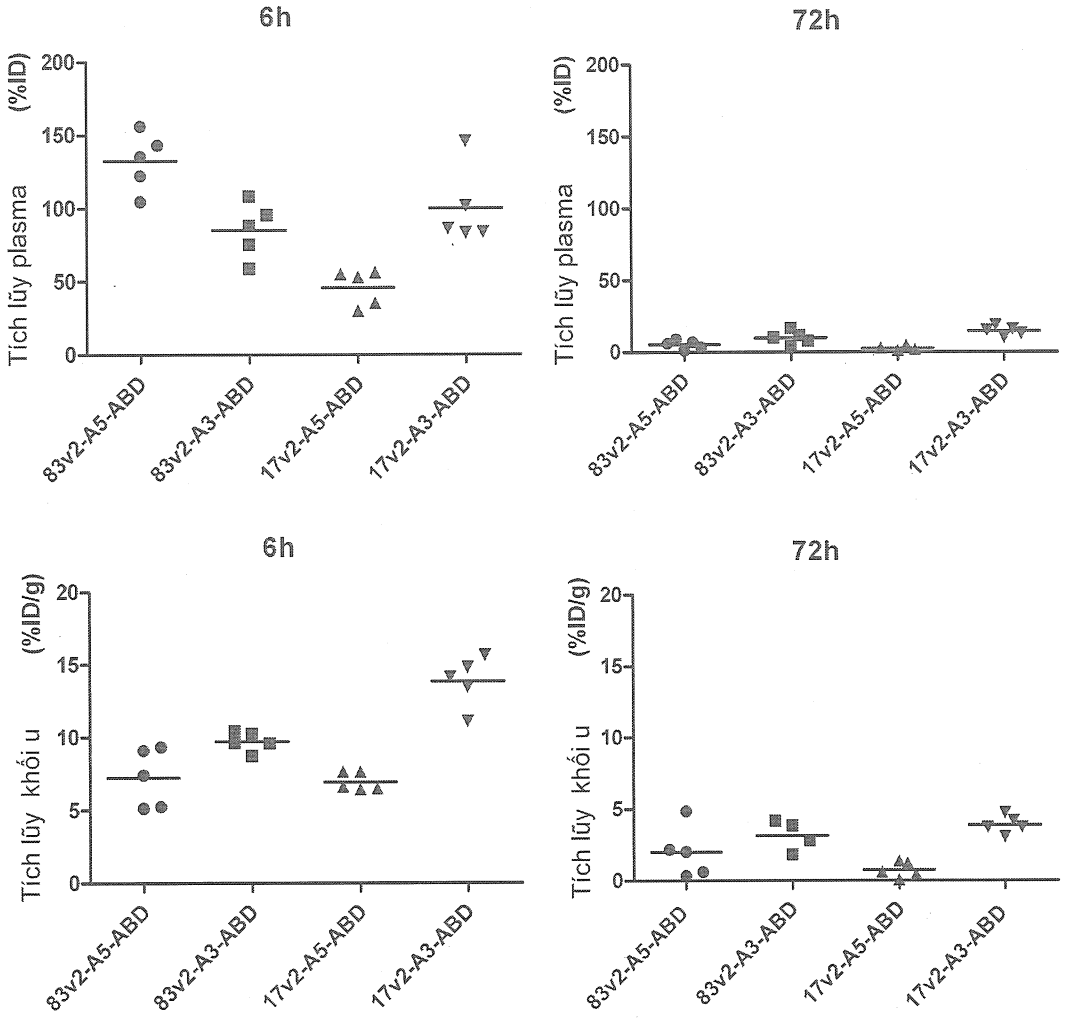

pMet
pEGFR
pERK1/2
1500
1000
500
0
8000
6000
4000
2000
0
10500
9000
7500
6000
4500
3000
1500
0
PBS
EGFR - 83 83 17 17
cMet - A3 A5 A3 A5
6 giờ
PBS
- 83 83 17 17
- A3 A5 A3 A5
72 giờ
* P < 0,01

Fig.7


6h
72h
Tích lũy plasma (%ID)
Tích lũy khối u (%ID/g)
200
150
100
50
0
20
15
10
5
83v2-A5-ABD
83v2-A3-ABD
17v2-A5-ABD
17v2-A3-ABD

10/18

Fig.8

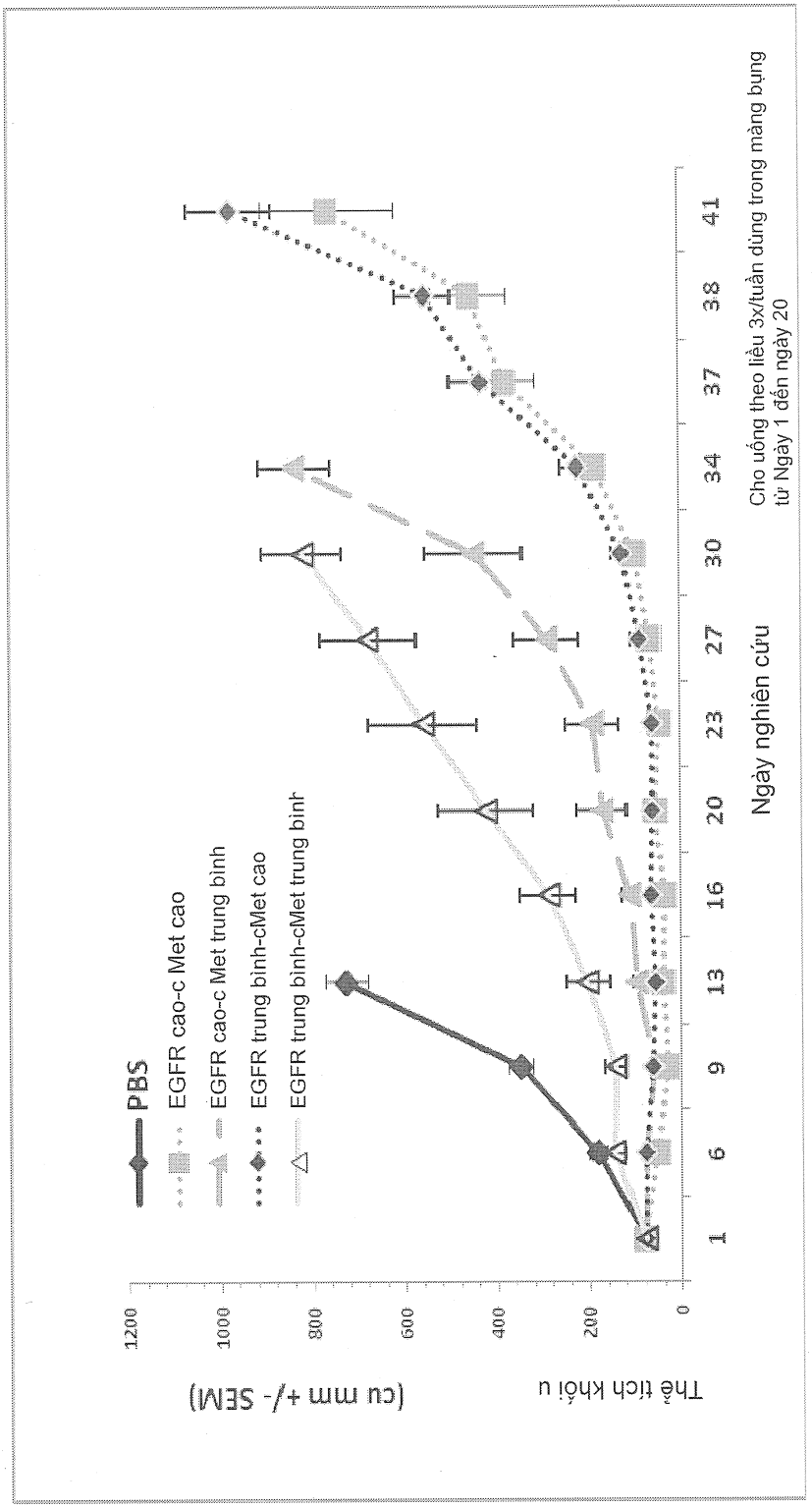
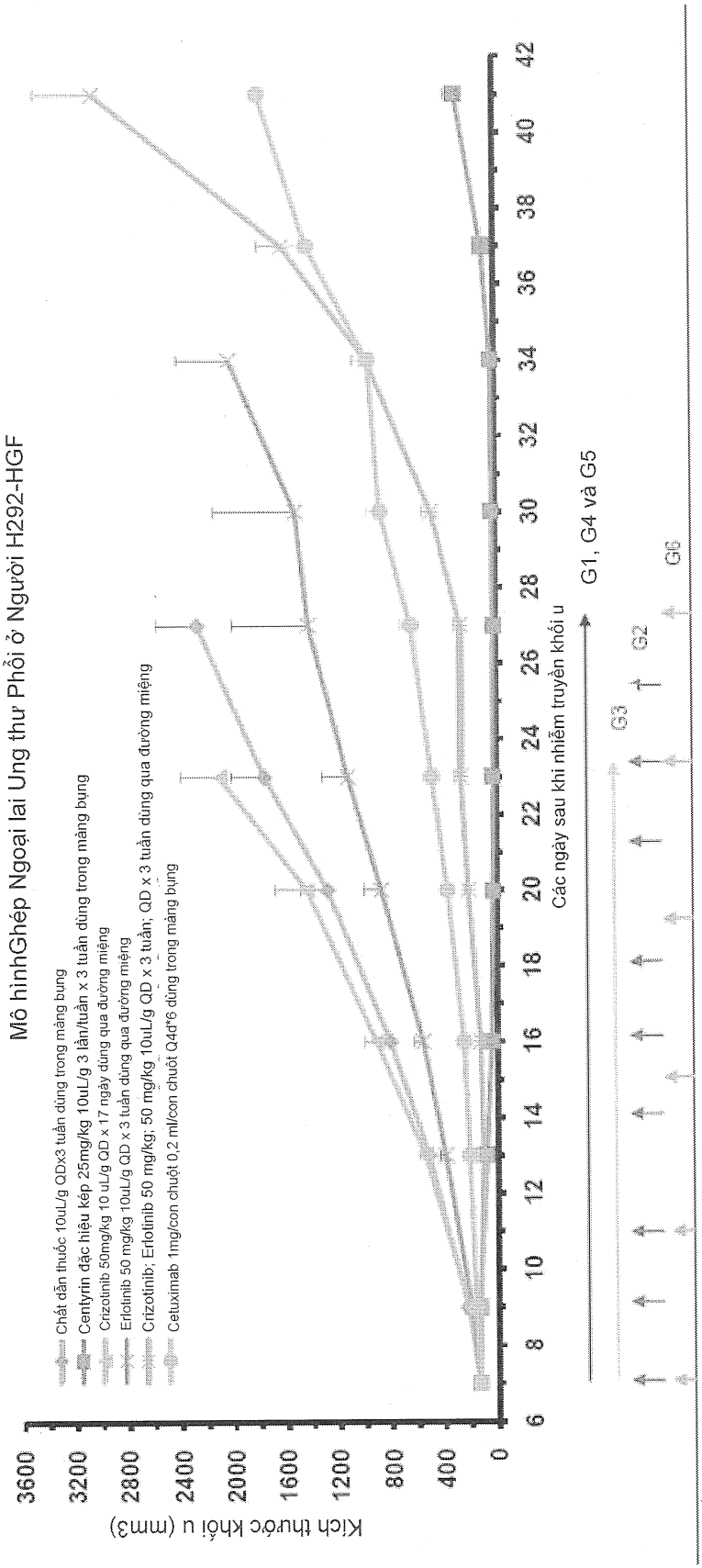

PBS
EGFR cao-c Met cao
EGFR cao-c Met trung bình
EGFR trung bình-cMet cao
EGFR trung bình-cMet trung bình
Thể tích khối u
(cu mm +/- SEM)
1200
1000
800
600
400
200
0
1
6
9
13
16
20
23
27
30
34
37
38
41
Ngày nghiên cứu
Cho uống theo liều 3x/tuần dùng trong màng bụng
từ Ngày 1 đến ngày 20

Fig.9


Mô hìnhGhép Ngoại lai Ung thư Phổi ở Người H292-HGF
Chất dẫn thuốc 10uL/g QDx3 tuần dùng trong màng bụng
Centyrin đặc hiệu kép 25mg/kg 10uL/g 3 lần/tuần x 3 tuần dùng trong màng bụng
Crizotinib 50mg/kg 10 uL/g QD x 17 ngày dùng qua đường miệng
Erlotinib 50 mg/kg 10uL/g QD x 3 tuần dùng qua đường miệng
Crizotinib; Erlotinib 50 mg/kg; 50 mg/kg 10uL/g QD x 3 tuần; QD x 3 tuần dùng qua đường miệng
Cetuximab 1mg/con chuột 0,2 ml/con chuột Q4d*6 dùng trong màng bụng
Kích thước khối u (mm3)
3600
3200
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
Các ngày sau khi nhiễm truyền khối u
G1, G4 và G5
G3
G2
G6

12/18

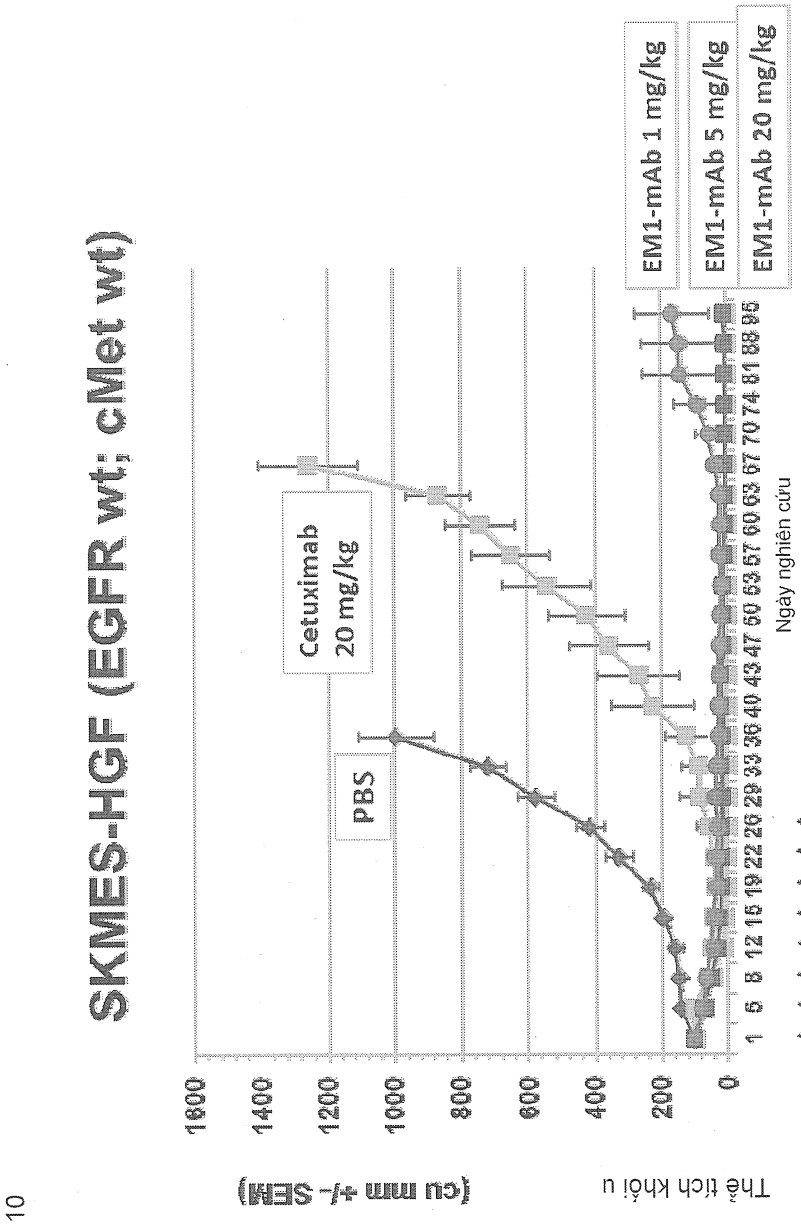
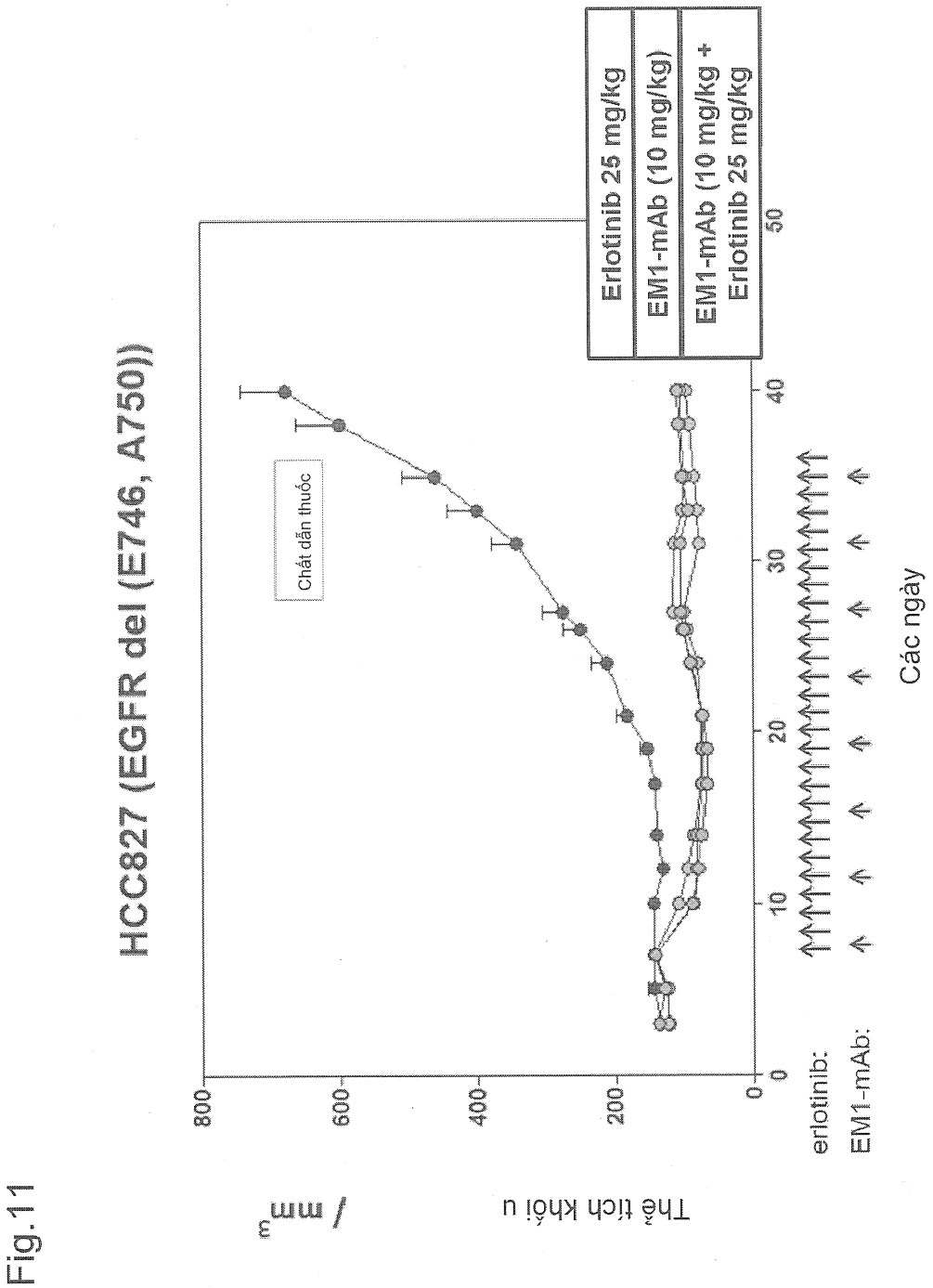

SKMES-HGF (EGFR wt; cMet wt)
Thể tích khối u (cu mm +/- SEM)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Cetuximab 20 mg/kg
PBS
EM1-mAb 1 mg/kg
EM1-mAb 5 mg/kg
EM1-mAb 20 mg/kg
1 5 8 12 15 19 22 26 29 33 36 40 43 47 50 53 57 60 63 67 70 74 81 88 95
Ngày nghiên cứu
8 liều

Fig.10

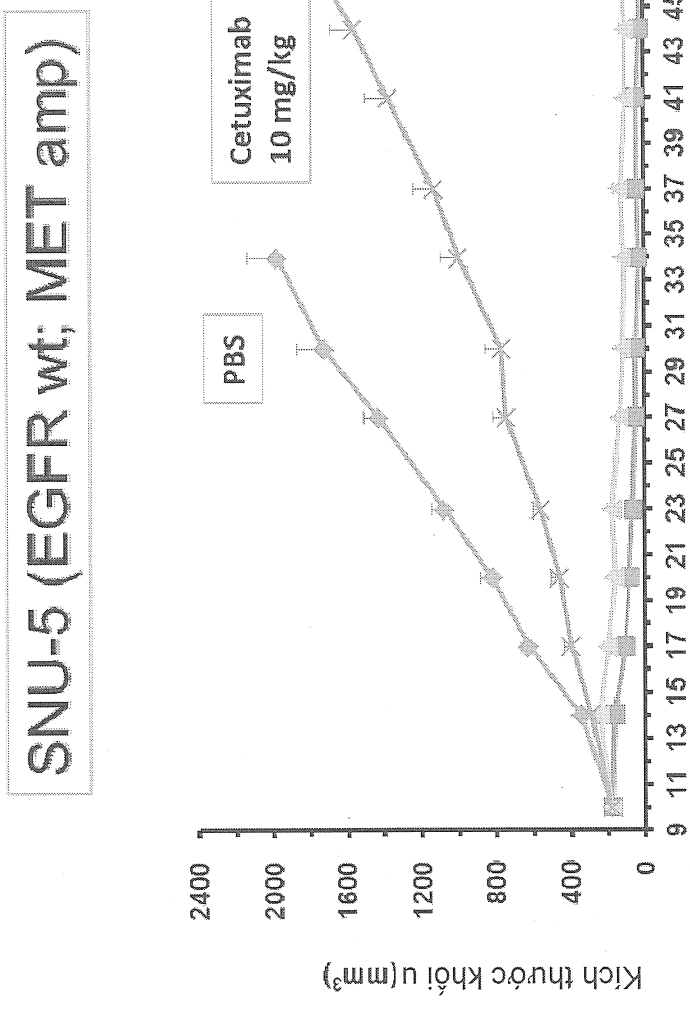
13/18

Fig.11


HCC827 (EGFR del (E746, A750))
Thể tích khối u
/ mm3
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Các ngày
erlotinib:
EM1-mAb:
Chất dẫn thuốc
Erlotinib 25 mg/kg
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg + Erlotinib 25 mg/kg

14/18

Fig.12


SNU-5 (EGFR wt; MET amp)
PBS
Cetuximab 10 mg/kg
EM1-mAb 1 mg/kg
EM1-mAb 10 mg/kg
Kích thước khối u (mm³)
2400
2000
1600
1200
800
400
0
9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
Các ngày sau khi nhiễm truyền khối u

15/18

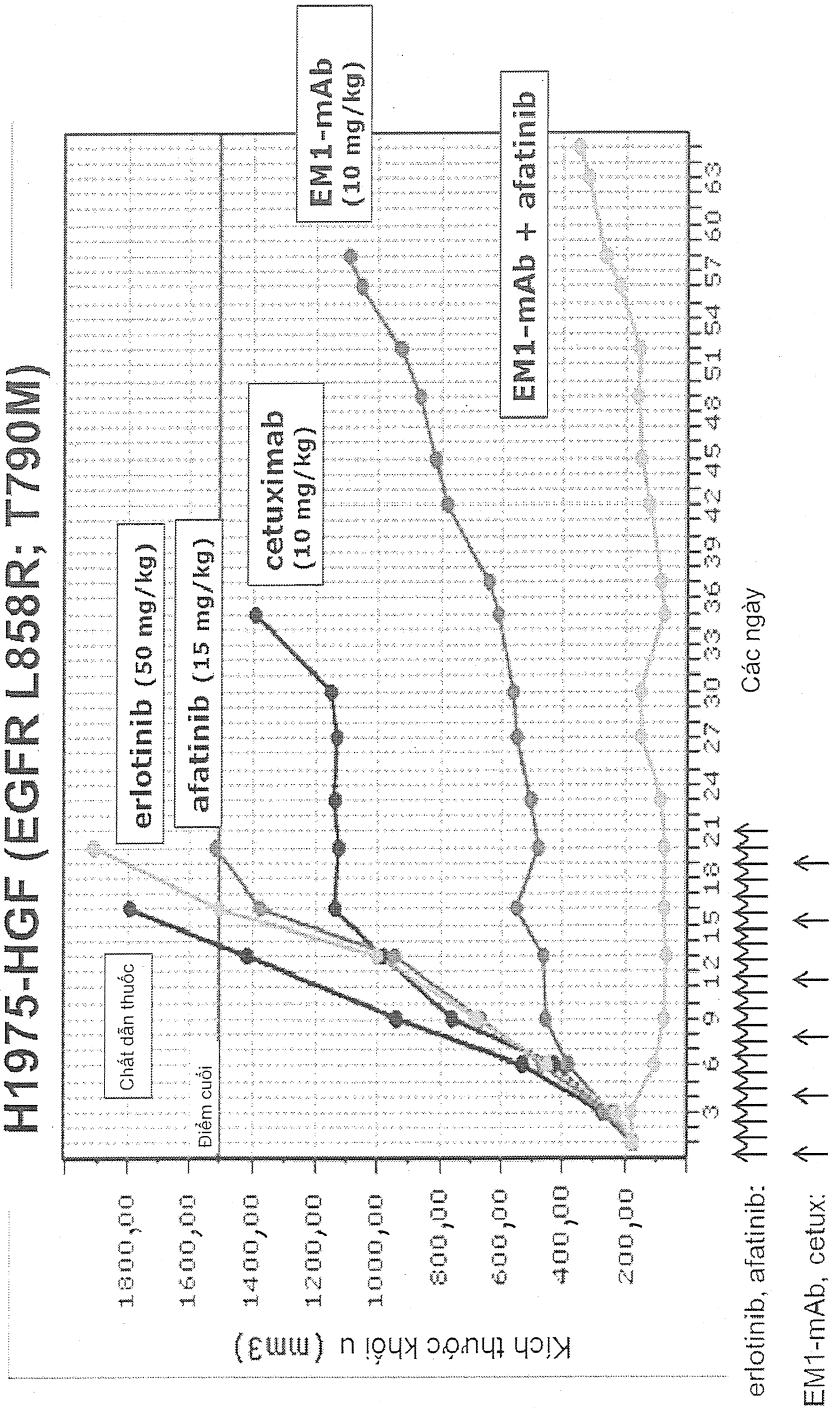

H1975-HGF (EGFR L858R; T790M)
Chất dẫn thuốc
Điểm cuối
erlotinib (50 mg/kg)
afatinib (15 mg/kg)
cetuximab (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb + afatinib
Kích thước khối u (mm3)
1800,00
1600,00
1400,00
1200,00
1000,00
800,00
600,00
400,00
200,00
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60 63
Các ngày
erlotinib, afatinib:
EM1-mAb, cetux:

Fig.13

16/18

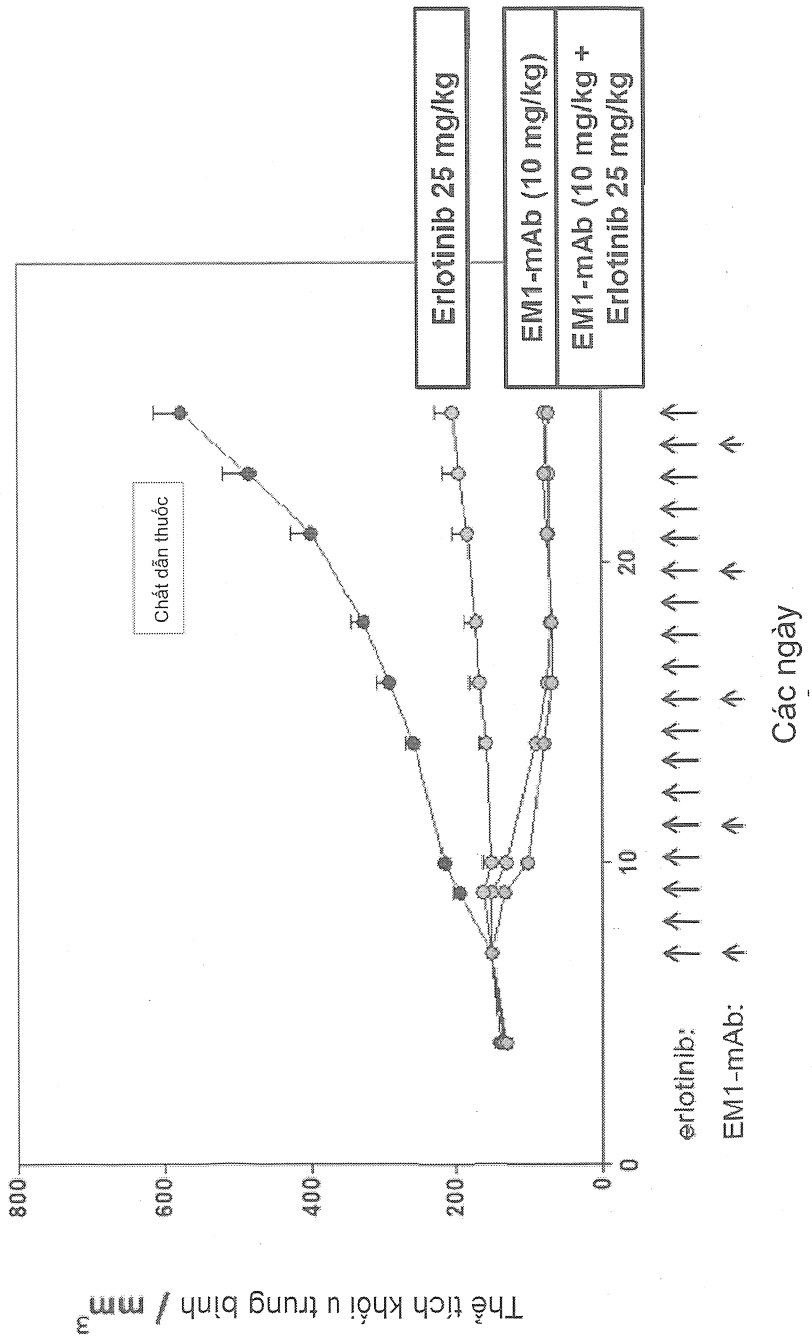
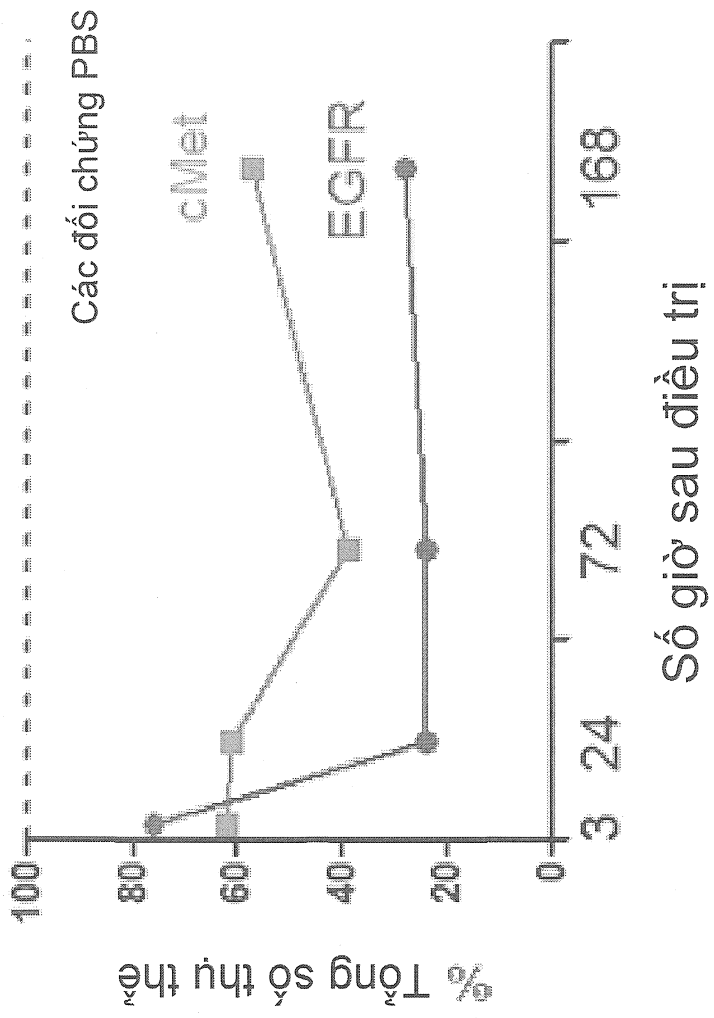

HCC827-ER1 (EGFR del (E746, A750); MET amp)
Thể tích khối u trung bình / mm3
800
600
400
200
0
0
10
20
Các ngày
Chất dẫn thuốc
Erlotinib 25 mg/kg
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg + Erlotinib 25 mg/kg
erlotinib:
EM1-mAb:

Fig.14

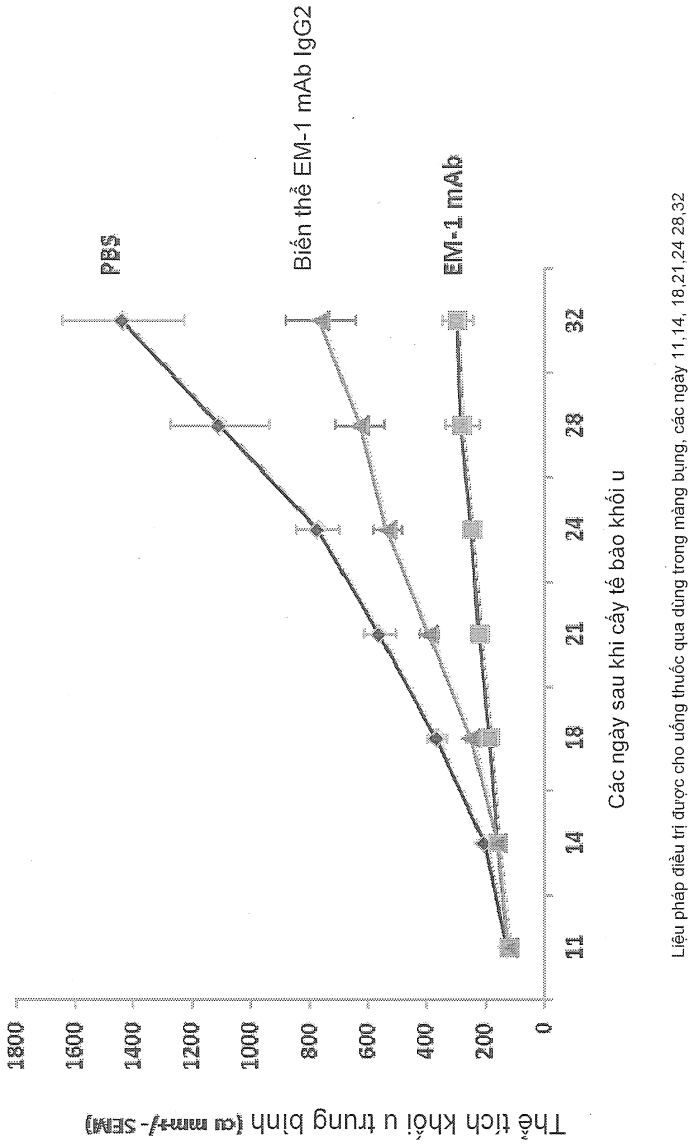
17/18

Fig.15


% Tổng số tinh thể
100
80
60
40
20
0
3
24
72
168
Số giờ sau điều trị
cMet
EGFR
Các đối chứng PBS

18/18

Fig.16


PBS
Biến thể EM-1 mAb IgG2
EM-1 mAb
Thể tích khối u trung bình (cu mm+/- SEM)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
11
14
18
21
24
28
32
Các ngày sau khi cấy tế bào khối u
Liệu pháp điều trị được cho uống thuốc qua dùng trong màng bụng, các ngày 11,14, 18,21,24 28,32

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

<120> KHÁNG THỂ EGFR/C-MET ĐẶC HIỆU KÉP, POLYNUCLEOTIT TỔNG HỢP ĐƯỢC PHÂN LẬP, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> JBI5032WOPCT

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

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

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

<150> 61/864,717
<151> 2013-08-12

<150> 61/892,797
<151> 2013-10-18

<160> 240

<170> PatentIn version 3.5

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

<220>
<223> Giàn 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 mồi

<400> 2
ggaaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgtttctg aagttacc 58

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 3
aacaccgtag atagaaacgg t 21

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

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 4
cggcggttag aacgcggcta caattaatac ataaccccat ccccctgttg 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 mồi

<400> 5
cggcggttag aacgcggcta c 21

<210> 6
<211> 66
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

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

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

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

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm

<222> (41)..(42)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm 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 mồi

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

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

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

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm

<222> (41)..(42)
<223> n là a, c, g, hoặc t

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (47)..(48)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 7
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnaa caccgtagat 60

agaaacggt 69

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

<220>
<223> đoạn mồi

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

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

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm

<222> (38)..(39)
<223> n là a, c, g, hoặc t

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (47)..(48)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (50)..(51)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 8
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta 60

gatagaaacg gt 72

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

<220>
<223> đoạn mồi

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm

<222> (32)..(33)
<223> n là a, c, g, hoặc t

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

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

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (47)..(48)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (50)..(51)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (53)..(54)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 9
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnaacacc 60

gtagatagaa acggt 75

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

<220>

<223> đoạn mồi

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (28)..(29)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (31)..(32)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (34)..(35)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (37)..(38)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (40)..(41)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (43)..(44)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (46)..(47)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (49)..(50)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (52)..(53)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm

<222> (55)..(56)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (58)..(59)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 10
rmggtggtga attccgcaga cagcggsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsnna 60

acaccgtaga tagaaacggt 80

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

<220>
<223> đoạn mồi

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

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

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

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

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm

<222> (41)..(42)
<223> n là a, c, g, hoặc t

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

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (47)..(48)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (50)..(51)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (53)..(54)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (56)..(57)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (59)..(60)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 11
ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn 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
cggcggttag 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

ctagcggccc caactgatct tcaccaaac 89

<210> 18
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn
            100                 105                 110

Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr
        115                 120                 125

Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe
    130                 135                 140

Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg
145                 150                 155                 160

Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn
                165                 170                 175
```

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

Phe Thr Thr
195

<210> 60
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<400> 61

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

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

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

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

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

```
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
                85                  90                  95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
            100                 105                 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
        115                 120                 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
                165                 170                 175

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

Thr Thr
```

<210> 62
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> phân tử gắn kết EGFR/cMet đặc hiệu kép

<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> Loài người

<400> 73

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

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

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

```
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
        115                 120                 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
    130                 135                 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
                165                 170                 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
            180                 185                 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
        195                 200                 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
    210                 215                 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225                 230                 235                 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
                245                 250                 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
            260                 265                 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
        275                 280                 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
    290                 295                 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
                325                 330                 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
            340                 345                 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
        355                 360                 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
    370                 375                 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385                 390                 395                 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
                405                 410                 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
            420                 425                 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
        435                 440                 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
    450                 455                 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465                 470                 475                 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
                485                 490                 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
            500                 505                 510
```

```
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
        515                 520                 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
    530                 535                 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545                 550                 555                 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
                565                 570                 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
            580                 585                 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
        595                 600                 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
    610                 615                 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625                 630                 635                 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
                645                 650                 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
            660                 665                 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
        675                 680                 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
    690                 695                 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705                 710                 715                 720
```

```
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
                725                 730                 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
            740                 745                 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
        755                 760                 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
    770                 775                 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785                 790                 795                 800

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser  Glu Phe Ile Gly Ala
    1205                1210
```

<210> 74
<211> 53
<212> PRT
<213> Loài người

<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> Loài người

<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>  Miền Fibcon FN3

<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> Loài người

<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> trình tự liên kết

<400> 78

Gly Ser Gly Ser
1

<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự 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> trình tự liên kết

<400> 80

Ala Pro Ala Pro
1

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự 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> trình tự liên kết

<400> 82

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro
20

<210> 83
<211> 40
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự liên kết

<400> 83

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
35 40

<210> 84
<211> 29
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự 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> vòng tencon BC

<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> vòng tencon FG

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 BC

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 FG

<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 EGFR gắn kết vòng FN3 FG

<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 EGFR gắn kết FN3 từ ECB97; P54AR4-83V22

<400> 97
atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgcgtctg 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 ccacc 285

<210> 98
<211> 285
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền EGFR gắn kết FN3 từ ECB15; P54AR4-83V2

<400> 98
atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgcctg 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 ccacc 285

<210> 99
<211> 89
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền tencon27 FN3

<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> thư viện TCL14

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (32)..(32)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (34)..(34)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (36)..(36)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (38)..(38)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (39)..(39)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (40)..(40)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (41)..(41)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (68)..(68)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (70)..(70)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (72)..(72)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (78)..(78)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (79)..(79)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> đặc điểm hiếm
<222> (81)..(81)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<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> Loài người

<400> 101

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

```
Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145                 150                 155                 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
                165                 170                 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
            180                 185                 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
        195                 200                 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
    210                 215                 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225                 230                 235                 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
                245                 250                 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
            260                 265                 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
        275                 280                 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
    290                 295                 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
                325                 330                 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
            340                 345                 350
```

```
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
        355                 360                 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
    370                 375                 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385                 390                 395                 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
                405                 410                 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
            420                 425                 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
        435                 440                 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
    450                 455                 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465                 470                 475                 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
                485                 490                 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
            500                 505                 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
        515                 520                 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
    530                 535                 540
```

```
Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545                 550                 555                 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
                565                 570                 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
            580                 585                 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
        595                 600                 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
    610                 615                 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625                 630                 635                 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
                645                 650                 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
            660                 665                 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
        675                 680                 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
    690                 695                 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705                 710                 715                 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
                725                 730                 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
            740                 745                 750
```

```
Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu
        755                 760                 765

Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn
    770                 775                 780

Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala
785                 790                 795                 800

Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile
                805                 810                 815

Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
            820                 825                 830

Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
        835                 840                 845

Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
    850                 855                 860

Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
865                 870                 875                 880

Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
                885                 890                 895

Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
            900                 905                 910

Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
        915                 920                 925

Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
    930                 935                 940
```

```
Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
945                 950                 955                 960

Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
                965                 970                 975

Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
            980                 985                 990

Val His Thr Pro His Leu Asp Arg  Leu Val Ser Ala Arg  Ser Val Ser
        995                 1000                1005

Pro Thr  Thr Glu Met Val Ser  Asn Glu Ser Val Asp  Tyr Arg Ala
    1010                1015                1020

Thr Phe  Pro Glu Asp Gln Phe  Pro Asn Ser Ser Gln  Asn Gly Ser
    1025                1030                1035

Cys Arg  Gln Val Gln Tyr Pro  Leu Thr Asp Met Ser  Pro Ile Leu
    1040                1045                1050

Thr Ser  Gly Asp Ser Asp Ile  Ser Ser Pro Leu Leu  Gln Asn Thr
    1055                1060                1065

Val His  Ile Asp Leu Ser Ala  Leu Asn Pro Glu Leu  Val Gln Ala
    1070                1075                1080

Val Gln  His Val Val Ile Gly  Pro Ser Ser Leu Ile  Val His Phe
    1085                1090                1095

Asn Glu  Val Ile Gly Arg Gly  His Phe Gly Cys Val  Tyr His Gly
    1100                1105                1110

Thr Leu  Leu Asp Asn Asp Gly  Lys Lys Ile His Cys  Ala Val Lys
    1115                1120                1125

Ser Leu  Asn Arg Ile Thr Asp  Ile Gly Glu Val Ser  Gln Phe Leu
    1130                1135                1140
```

```
Thr Glu  Gly Ile Ile Met Lys  Asp Phe Ser His Pro  Asn Val Leu
    1145                1150                1155

Ser Leu  Leu Gly Ile Cys Leu  Arg Ser Glu Gly Ser  Pro Leu Val
    1160                1165                1170

Val Leu  Pro Tyr Met Lys His  Gly Asp Leu Arg Asn  Phe Ile Arg
    1175                1180                1185

Asn Glu  Thr His Asn Pro Thr  Val Lys Asp Leu Ile  Gly Phe Gly
    1190                1195                1200

Leu Gln  Val Ala Lys Gly Met  Lys Tyr Leu Ala Ser  Lys Lys Phe
    1205                1210                1215

Val His  Arg Asp Leu Ala Ala  Arg Asn Cys Met Leu  Asp Glu Lys
    1220                1225                1230

Phe Thr  Val Lys Val Ala Asp  Phe Gly Leu Ala Arg  Asp Met Tyr
    1235                1240                1245

Asp Lys  Glu Tyr Tyr Ser Val  His Asn Lys Thr Gly  Ala Lys Leu
    1250                1255                1260

Pro Val  Lys Trp Met Ala Leu  Glu Ser Leu Gln Thr  Gln Lys Phe
    1265                1270                1275

Thr Thr  Lys Ser Asp Val Trp  Ser Phe Gly Val Leu  Leu Trp Glu
    1280                1285                1290

Leu Met  Thr Arg Gly Ala Pro  Pro Tyr Pro Asp Val  Asn Thr Phe
    1295                1300                1305

Asp Ile  Thr Val Tyr Leu Leu  Gln Gly Arg Arg Leu  Leu Gln Pro
    1310                1315                1320
```

```
Glu Tyr  Cys Pro Asp Pro Leu  Tyr Glu Val Met Leu  Lys Cys Trp
    1325                1330                1335

His Pro  Lys Ala Glu Met Arg  Pro Ser Phe Ser Glu  Leu Val Ser
    1340                1345                1350

Arg Ile  Ser Ala Ile Phe Ser  Thr Phe Ile Gly Glu  His Tyr Val
    1355                1360                1365

His Val  Asn Ala Thr Tyr Val  Asn Val Lys Cys Val  Ala Pro Tyr
    1370                1375                1380

Pro Ser  Leu Leu Ser Ser Glu  Asp Asn Ala Asp Asp  Glu Val Asp
    1385                1390                1395

Thr Arg  Pro Ala Ser Phe Trp  Glu Thr Ser
    1400                1405
```

<210> 102
<211> 697
<212> PRT
<213> Loài người

<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 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 c-Met

<400> 103
ctgccggctc cgaagaactt ggtggtgagc cgtgttaccg aagatagcgc acgcctgagc 60

tggacggcac cggatgcggc gttcgatagc ttctggattc gctattttga gtttctgggt 120

agcggtgagg caattgttct gacggtgccg ggctctgaac gctcctacga tttgaccggt 180

ctgaaaccgg gcaccgagta tgtggtgaac attctgagcg ttaagggcgg tagcatcagc 240

ccaccgctga gcgcgatctt cacgactggt ggttgc 276

<210> 104
<211> 267
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền FN3 gắn kết c-Met

<400> 104
ctgccggcac cgaagaacct ggttgtcagc cgtgtgaccg aggatagcgc acgtttgagc 60

tggaccgctc cggatgcagc ctttgacagc ttctggattc gttactttga atttctgggt 120

agcggtgagg cgatcgttct gacggtgccg ggctctgaac gcagctatga tttgacgggc 180

ctgaagccgg gtactgagta cgtggttaac atcatgggcg ttaagggtgg taaaatcagc 240

ccgccattgt ccgcgatctt taccacg 267

<210> 105
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự liên kết

<400> 105

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 106
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 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 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 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 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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<400> 115
atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgaggtta ctgaggacag cgcgcgtctg 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 ccccgctgcc ggctccgaag aacttggtgg tgagccgtgt taccgaagat 360

agcgcacgcc tgagctggac ggcaccggat gcggcgttcg atagcttctg gattcgctat 420

tttgagtttc tgggtagcgg tgaggcaatt gttctgacgg tgccgggctc tgaacgctcc 480

tacgatttga ccggtctgaa accgggcacc gagtatgtgg tgaacattct gagcgttaag 540

ggcggtagca tcagcccacc gctgagcgcg atcttcacga ctggtggttg c 591

<210> 116
<211> 582
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<400> 116
atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgcctg 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 aacctggttg tcagccgtgt gaccgaggat 360

agcgcacgtt tgagctggac cgctccggat gcagcctttg acagcttctg gattcgttac 420

tttgaatttc tgggtagcgg tgaggcgatc gttctgacgg tgccgggctc tgaacgcagc 480

tatgatttga cgggcctgaa gccgggtact gagtacgtgg ttaacatcat gggcgttaag 540

ggtggtaaaa tcagcccgcc attgtccgcg atctttacca cg 582

<210> 117
<211> 51
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền gắn kết albumin

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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 EGFR gắn kết FN3

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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>  miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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>  miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<400> 166
ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60

tgggacgatc cgtgggcgtt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120

gtcggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180

ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240

actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca ccgcaccggc accggctccg 300

gctcctgccc cgctgccggc tccgaagaac ttggtggtga gccgtgttac cgaagatagc 360

gcacgcctga gctggacggc accggatgcg gcgttcgata gcttctggat tcgctatttt 420

gagtttctgg gtagcggtga ggcaattgtt ctgacggtgc cgggctctga acgctcctac 480

gatttgaccg gtctgaaacc gggcaccgag tatgtggtga acattctgag cgttaagggc 540

ggtagcatca gcccaccgct gagcgcgatc ttcacgactg gtggttgc 588

<210> 167
<211> 579
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<400> 167
ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60

tgggacgacc cgtgggcgtt ctatgagtct ttcctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120

gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgagc gctcctacga 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 gtagcggtga ggcgatcgtt ctgacggtgc cgggctctga acgcagctat 480

gatttgacgg gcctgaagcc gggtactgag tacgtggtta acatcatggg cgttaagggt 540

ggtaaaatca gcccgccatt gtccgcgatc tttaccacg 579

<210> 168
<211> 282
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền EGFR gắn kết FN3 từ ECB97

<400> 168
ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgtctgagc 60

tgggacgatc cgtgggcgtt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa 120

gtcggtgaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt 180

ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac 240

actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca cc 282

<210> 169
<211> 282
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền EGFR gắn kết FN3 từ ECB15

<400> 169
ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc 60

tgggacgacc cgtgggcgtt ctatgagtct ttcctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa 120

gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcgagc gctcctacga tctgaccggc 180

ctgaaaccgg gtacggagta cacggtgtcc atttacggtg ttcacaatgt gtataaagac 240

accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg attttcacca cc 282

<210> 170
<211> 195
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<400> 170

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

```
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
                165                 170                 175

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

Thr Thr Cys
        195
```

<210> 171
<211> 195
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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>  Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<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> Phân tử gắn kết EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<400> 178

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

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

Thr Thr Cys
195

<210> 179
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vòng FG chung của miền FN3 gắn kết EGFR

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa có thể là 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> vòng GF của miền EGFR gắn kết FN3

<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> vòng BC đồng thuận của miền EGFR gắn kết FN3

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa có thể là Ala, Thr, Gly hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa có thể là Ala, Asp, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa có thể là Pro, Asp hoặc Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa có thể là Leu hoặc không có

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa có thể là Asp, His, Arg, Gly, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là Glu, Asp hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> Xaa có thể là Ala, Phe, Gly, His hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa có thể là 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 EGFR gắn kết trình tự đồng thuận FN3

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> Xaa có thể là Ala, Thr, Gly hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> Xaa có thể là Ala, Asp, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> Xaa có thể là Pro, Asp hoặc Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (25)..(25)
<223> Xaa có thể là Leu hoặc không có mặt

<220>
<221> VARIANT
<222> (26)..(26)
<223> Xaa có thể là Asp, His, Arg, Gly, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> Xaa có thể là Gly, Asp hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)..(28)
<223> Xaa có thể là Ala, Phe, Gly, His hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> Xaa có thể là Tyr, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (84)..(84)
<223> Xaa có thể là 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 EGFR gắn kết trình tự đồng thuận FN3

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> Xaa có thể là Ala, Thr, Gly hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> Xaa có thể là Ala, Asp, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> Xaa có thể là Pro, Asp hoặc Asn

<220>
<221> VARIANT
<222> (25)..(25)
<223> Xaa có thể là Leu hoặc không có

<220>
<221> VARIANT
<222> (26)..(26)
<223> Xaa có thể là Asp, His, Arg, Gly, Tyr hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> Xaa có thể là Gly, Asp hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)..(28)
<223> Xaa có thể là Ala, Phe, Gly, His hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> Xaa có thể là 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> trình tự đồng thuận miền FN3 gắn kết dải c-Met C và vòng CD

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Trp, Phe hoặc Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa là Asp, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa là Val, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là Val, Leu hoặc Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> Xaa là Val, Arg, Gly, Leu, Thr hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> Xaa là Gly, Ser, Ala, Thr hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> Xaa là 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> trình tự đồng thuận miền FN3 gắn kết dải c-Met F và vòng FG

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Tyr, Trp, Ile, Val, Gly hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Asn, Thr, Qln hoặc Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> Xaa là Leu, Met, Asn hoặc Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Gly hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(14)
<223> Xaa là Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> Xaa là Ile, Val hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> Xaa là 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> trình tự đồng thuận miền FN3 gắn kết c-Met

<220>
<221> VARIANT
<222> (32)..(32)
<223> Xaa là Trp, Phe hoặc Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> Xaa là Asp, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (38)..(38)
<223> Xaa là Val, Phe hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (39)..(39)
<223> Xaa là Val, Leu hoặc Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> (40)..(40)
<223> Xaa là Val, Arg, Gly, Leu, Thr hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (41)..(41)
<223> Xaa là Gly, Ser, Ala, Thr hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (43)..(43)
<223> Xaa là Glu hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (68)..(68)
<223> Xaa là Tyr, Trp, Ile, Val, Gly hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (70)..(70)
<223> Xaa là Asn, Thr, Qln hoặc Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (72)..(72)
<223> Xaa là Leu, Met, Asn hoặc Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (73)..(73)
<223> Xaa là Gly hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (78)..(78)
<223> Xaa là Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (79)..(79)
<223> Xaa là Ile, Val hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (81)..(81)
<223> Xaa là 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> miền FN3 chung EGFR của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là Glu, Asn hoặc Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(14)
<223> Xaa là Glu hoặc Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> Xaa là Leu hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (25)..(25)
<223> Xaa là His hoặc Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> Xaa là Glu hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (37)..(37)
<223> Xaa là Glu hoặc Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (46)..(46)
<223> Xaa là Asn hoặc Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (73)..(73)
<223> Xaa là Gly hoặc Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> (83)..(83)
<223> Xaa là Met hoặc Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> (91)..(91)
<223> Xaa là 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> miền FN3 chung c-Met của phân tử EGFR/c-Met đặc hiệu kép

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> Xaa là Glu, Asn hoặc Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(14)
<223> Xaa là Glu hoặc Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> Xaa là Leu hoặc Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> (37)..(37)
<223> Xaa là Glu hoặc Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (39)..(39)
<223> Xaa là Val hoặc Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> (40)..(40)
<223> Xaa là Gly hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (41)..(41)
<223> Xaa là Ser hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (43)..(43)
<223> Xaa là Glu hoặc Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (46)..(46)
<223> Xaa là Asn hoặc Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (72)..(72)
<223> Xaa là Leu hoặc Met

<220>
<221> VARIANT
<222> (73)..(73)
<223> Xaa là Gly hoặc Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> (78)..(78)
<223> Xaa là Ser hoặc Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (86)..(86)
<223> Xaa là 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> 125
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 189

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 190
<211> 107
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 190

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
            20                  25                  30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 191
<211> 121
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 191

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Asn Ile Lys Lys Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
            100                 105                 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 192
<211> 107
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 192

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 193

<211> 119
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 193

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 194
<211> 107
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 194

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 195
<211> 125
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 195

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 196
<211> 106
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 196

Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1 5 10 15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala
20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
35 40 45

Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65 70 75 80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 197
<211> 457
<212> PRT

<213> Loài người

<400> 197

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
            20                  25                  30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
            100                 105                 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala
        115                 120                 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
    130                 135                 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
                165                 170                 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
            180                 185                 190
```

```
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
        195                 200                 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
    210                 215                 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225                 230                 235                 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                245                 250                 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            260                 265                 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        275                 280                 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    290                 295                 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305                 310                 315                 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                325                 330                 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            340                 345                 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        355                 360                 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    370                 375                 380
```

```
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            420                 425                 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        435                 440                 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 198
<211> 457
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 198

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
            20                  25                  30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
            100                 105                 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala
        115                 120                 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
    130                 135                 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
                165                 170                 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
            180                 185                 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
        195                 200                 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
    210                 215                 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225                 230                 235                 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                245                 250                 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            260                 265                 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        275                 280                 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
```

```
    290                 295                 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305                 310                 315                 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                325                 330                 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            340                 345                 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        355                 360                 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    370                 375                 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            420                 425                 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        435                 440                 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 199
<211> 455
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 199

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205
```

```
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400
```

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 200
<211> 214
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 200

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

```
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 201
<211> 449
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 201

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60
```

```
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
```

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 202
<211> 214
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 202

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

```
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 203
<211> 330
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 203

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
```

```
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
```

```
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330


<210>  204
<211>  330
<212>  PRT
<213>  Loài người

<400>  204

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15


Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30


Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45


Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60


Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80


Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95


Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110


Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125


Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140


Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
```

```
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 205
<211> 1368
<212> ADN

<213> Loài người

<400> 205

caggtgcagc tggtcgagag cggcggaggg gtggtgcagc ccggcagaag cctgaggctg 60

tcctgcgccg ccagcggctt caccttcagc acctacggca tgcactgggt gcggcaggcc 120

ccaggcaagg gcctggagtg ggtggccgtg atctgggacg acggcagcta caagtactac 180

ggcgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacggc 300

atcaccatgg tgcggggcgt gatgaaggac tacttcgact actggggcca gggcaccctg 360

gtgaccgtga gcagcgccag caccaagggc ccaagcgtgt tccccctggc ccccagcagc 420

aagagcacca gcggcggcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag 480

ccagtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc 540

gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcagc 600

ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagagagtgg agcccaagag ctgcgacaag acccacacct gccccccctg cccagcccca 720

gagctgctgg gcggacccag cgtgttcctg ttcccccca agcccaagga caccctgatg 780

atcagcagga cccccgaggt gacctgcgtg gtggtggacg tgagccacga ggacccagag 840

gtgaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga 900

gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 960

tggctgaacg gcaaggaata caagtgcaag gtctccaaca aggccctgcc agcccccatc 1020

gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag ccacgggagc cccaggtgta caccctgccc 1080

cccagccggg aggagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc 1140

taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaacggcc agcccgagaa caactacaag 1200

accacccccc cagtgctgga cagcgacggc agcttcctcc tgtacagcaa gctgaccgtg 1260

gacaagtcca ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg 1320

cacaaccact acacccagaa gtccctgagc ctgagccccg gcaaatga 1368

<210> 206
<211> 642
<212> ADN
<213> Loài người

<400> 206
atccagctga cccagagccc cagcagcctg agcgccagcg tgggcgaccg ggtgaccatc 60

acctgccggg ccagccagga catcagcagc gccctggtct ggtatcagca gaagcccggc 120

aaggccccca agctgctgat ctacgacgcc agctccctgg aaagcggcgt gcccagccgg 180

ttcagcggca gcgagagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct gcagcccgag 240

gacttcgcca cctactactg ccagcagttc aacagctacc ccctgacctt tggcggcgga 300

acaaaggtgg agatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgct ga 642

<210> 207
<211> 1350
<212> ADN
<213> Loài người

<400> 207
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcgaga cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacacg ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtta cacaaactat 180

gcacagaagc tccagggcag ggtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300

agaggaacta actactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccaagcgt gttccctctg gcccccagca gcaagagcac atctggcgga 420

acagccgccc tgggctgcct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 540

ctgtacagcc tgtccagcgt ggtgaccgtg cccagcagct ccctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagcgggt ggaacccaag 660

agctgcgaca agacccacac ctgtcccccc tgccctgccc ctgaactgct gggcggaccc 720

tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgaa 780

gtgacctgcg tggtggtgga cgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac 840

gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccca gagaggaaca gtacaacagc 900

acctaccggg tggtgtccgt gctgacagtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaggccctg cctgctccca tcgagaaaac catcagcaag 1020

gccaagggcc agccccgcga gcctcaggtg tacacactgc ctcccagccg ggaagagatg 1080

accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaaaggct tctaccccag cgatatcgcc 1140

gtggaatggg agagcaacgg acagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200

gacagcgacg gctccttctt cctgtactct cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 1260

cagggaaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320

aagtccctga gcctgagccc cgggaagtga 1350

<210> 208
<211> 645
<212> ADN
<213> Loài người

<400> 208
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtccgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggcctccca gggcatctcc aactggctgg cctggttcca gcacaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gcctcctccc tgctgtccgg cgtgccctcc 180

agattctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag gccaactcct tccccatcac cttcggccag 300

ggcacccggc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccc 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga 645

<210> 209
<211> 215
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 209

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
20 25 30

Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
35 40 45

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

```
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    130                 135                 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
            180                 185                 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
        195                 200                 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215


<210>  210
<211>  5
<212>  PRT
<213>  Loài người

<400>  210

Thr Tyr Gly Met His
1               5


<210>  211
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Loài người

<400>  211

Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1               5                   10                  15


Gly
```

<210> 212
<211> 16
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 212

Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 213
<211> 11
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 213

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Val
1 5 10

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 214

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 215

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 216
<211> 5
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 216

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 217
<211> 17
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 217

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 218
<211> 10
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 218

Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 219
<211> 11
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 219

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 220
<211> 7
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 220

Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser

1 5

<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 221

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr
1 5

<210> 222
<211> 5
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 222

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 223
<211> 17
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 223

Asn Ile Lys Lys Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 224

Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 225
<211> 11
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 225

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 226
<211> 7
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 226

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 227

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 228
<211> 5
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 228

Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 229
<211> 17
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 229

Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 230
<211> 16
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 230

Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 231
<211> 11
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 231

Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 232
<211> 7
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 232

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 233
<211> 10
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 233

```
Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr
1               5                   10


<210>  234
<211>  451
<212>  PRT
<213>  Loài người

<400>  234

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45


Ala Asn Ile Lys Lys Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Arg Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
            100                 105                 110


Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125


Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140


Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
```

```
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 235
<211> 214
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 235

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210


<210>  236
<211>  455
<212>  PRT
<213>  Loài người

<400>  236

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

```
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Thr Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gln
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
```

```
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415
```

```
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 237
<211> 213
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 237

```
Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                   10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
        35                  40                  45

Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
            100                 105                 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125
```

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 238
<211> 15
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 238

Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe
1 5 10 15

<210> 239
<211> 16
<212> PRT
<213> Loài người

<400> 239

Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala
1 5 10 15

<210> 240
<211> 16

<212> PRT
<213> Loài người

<400> 240

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
1 5 10 15