(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월11일
(11) 등록번호 10-2795571
(24) 등록일자 2025년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7044846(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년11월21일
심사청구일자 2023년12월26일
(85) 번역문제출일자 2023년12월26일
(65) 공개번호 10-2024-0005211
(43) 공개일자 2024년01월11일
(62) 원출원 특허 10-2022-7007572
원출원일자(국제) 2013년11월21일
심사청구일자 2022년04월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/071288
(87) 국제공개번호 WO 2014/081954
국제공개일자 2014년05월30일
(30) 우선권주장
61/728,912 2012년11월21일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2011131746 A2
KR1020110126748 A

(73) 특허권자
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국, 펜실베니아주 19044, 호샴, 릿지뷰 드라이브 800
(72) 발명자
치우 마크
미국 19477 펜실베니아주 스프링 하우스 매킨 로드 1400
무어스 셰리
미국 19477 펜실베니아주 스프링 하우스 매킨 로드 1400
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

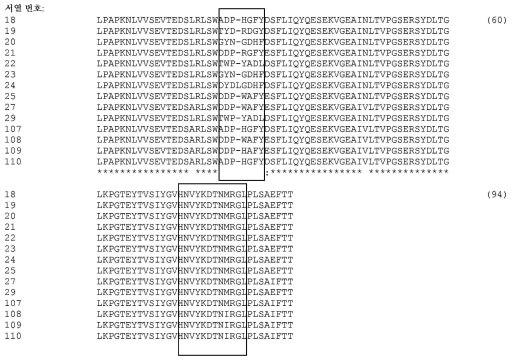
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 **이중특이성 EGFR/c-Met 항체**

(57) 요 약

이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 이러한 분자의 제조 및 사용 방법. 표피 성장 인자 수용체(EGFR, ErbB1 또는 HER1)는 c-erbB1 원발암유전자에 의해 암호화되는 170 kDa의 I형 막횡단 당단백질이다. EGFR은 HER2(ErbB2), HER3(ErbB3) 및 HER4(ErbB4)를 포함하는 수용체 티로신 키나제(RTK)의 인간 표피 성장 인자 수용체(HER) 패밀리의 구성원이다. EGFR 신호전달은 리간드 결합에 의해 개시된 후, 입체구조 변화, 이 수용체의 호모이량체화 또는 다른 ErbB 패밀리 구성원들과의 헤테로이량체화를 유도한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
(72) 발명자
나이즈쎈 주스트
네덜란드 엔엘-3854 울트레흐트 얄레란 60
파렌 파울
네덜란드 엔엘-3854 울트레흐트 얄레란 60
슈우만 자니네
네덜란드 엔엘-3854 울트레흐트 얄레란 60

(30) 우선권주장
61/782,550 2013년03월14일 미국(US)
61/809,541 2013년04월08일 미국(US)
61/864,717 2013년08월12일 미국(US)
61/892,797 2013년10월18일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

단리된 이중특이성 표피 성장 인자 수용체(EGFR)/간세포 성장 인자 수용체(c-Met) 항체로서,

a) 제1 중쇄(HC1) 불변 도메인 3(HC1 CH3) 및 HC1 가변 영역 1(VH1)을 포함하는 제1 중쇄(HC1);

b) 제2 중쇄(HC2) 불변 도메인 3(HC2 CH3) 및 HC2 가변 영역 2(VH2)를 포함하는 제2 중쇄(HC2);

c) 경쇄 가변 영역 1(VL1)을 포함하는 제1 경쇄(LC1); 및

d) 경쇄 가변 영역 2(VL2)를 포함하는 제2 경쇄(LC2)를 포함하며, 상기 VH1과 상기 VL1은 쌍을 이루어, EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하고, 상기 VH2와 상기 VL2는 쌍을 이루어, c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하고, 상기 HC1은 상기 HC1 CH3 내에 적어도 하나의 치환을 포함하고, 상기 HC2는 상기 HC2 CH3 내에 적어도 하나의 치환을 포함하고, 상기 HC1 CH3 내에서의 치환 및 상기 HC2 CH3 내에서의 치환은 상이한 아미노산 잔기 위치들에서 일어나며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따르고

VH1, VL1, VH2 및 VL2은 각각 서열번호 189, 서열번호 190, 서열번호 193 및 서열번호 194의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 HC1 CH3이 K409R 또는 F405L 치환을 포함하고, HC2 CH3이 K409R 또는 F405L 치환을 포함하는 것인,

이중특이성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, HC1 및 HC2가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 동종형인 것인, 이중특이성 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, HC1 및 HC2가 IgG1 동종형인 것인, 이중특이성 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체는 푸코스 함량이 1% 내지 15%인 바이안테나리 글리칸 구조를 갖는 것인, 이중특이성 항체.

청구항 5

제1항에 따른 이중특이성 항체의 HC1, HC2, LC1 및 LC2를 암호화하는 단리된 합성 폴리뉴클레오티드로서, 여기서 HC1, LC1, HC2 및 LC2가 각각, 서열번호 189의 제1 중쇄, 서열번호 190의 제1 경쇄, 서열번호 193의 제2 중쇄, 서열번호 194의 제2 경쇄를 포함하는 것인, 단리된 합성 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제5항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 7

제6항에 따른 벡터를 포함하는 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

제1항에 따른 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 생성 방법으로서,

a) 서열번호 189를 포함하는 2개의 중쇄 및 서열번호 190을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 단일특이성 2가 항-EGFR 항체, 및 서열번호 193을 포함하는 2개의 중쇄 및 서열번호 194를 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는

단리된 단일특이성 2가 항-c-Met 항체를 1:1 몰비의 혼합물로 배합하는 단계;

b) 혼합물 내로 환원제를 도입시키는 단계;

c) 90분 내지 6시간 동안 혼합물을 인큐베이팅하는 단계;

d) 환원제를 제거하는 단계; 및

e) 서열번호 189를 포함하는 제1 중쇄 및 서열번호 193을 포함하는 제2 중쇄, 서열번호 190을 포함하는 제1 경쇄 및 서열번호 194를 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 정제하되, 여기서 서열번호 189를 포함하는 제1 중쇄는 서열번호 190을 포함하는 제1 경쇄와 쌍을 이루어서 EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인을 형성하고, 서열번호 193을 포함하는 제2 중쇄는 서열번호 194를 포함하는 제2 경쇄와 쌍을 이루어서 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 형성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항의 이중특이성 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 10

암을 치료하기 위한 방법에 사용하기 위한, 제1항에 따른 이중특이성 항체로서,

상기 방법은 암을 치료하기 위해 이를 필요로 하는 환자에게 치료적 유효량의, 제1항에 따른 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함하는 것인, 이중특이성 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 방법이 제2 요법제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 이중특이성 항체.

청구항 12

EGFR 및/또는 c-Met를 발현하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 시험관 내 (*in vitro*) 방법으로서, 상기 세포를 제1항에 따른 이중특이성 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 시험관내 방법.

청구항 13

대상체에서 EGFR 및/또는 c-Met 발현 종양 또는 암 세포의 성장 또는 전이를 억제하는 방법에 사용하기 위한, 제1항에 따른 이중특이성 항체로서, 상기 방법은 EGFR 및/또는 c-Met 발현 종양 또는 암 세포의 성장 또는 전이를 억제하도록 제1항에 따른 유효량의 이중특이성 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인, 이중특이성 항체.

청구항 14

암을 치료하기 위한 요법에 사용하기 위한 것인, 제1항에 따른 이중특이성 항체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 이러한 분자의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 표피 성장 인자 수용체(EGFR, ErbB1 또는 HER1)는 c-erbB1 원발암유전자에 의해 암호화되는 170 kDa의 I형 막횡단 당단백질이다. EGFR은 HER2(ErbB2), HER3(ErbB3) 및 HER4(ErbB4)를 포함하는 수용체 티로신 키나제(RTK)의 인간 표피 성장 인자 수용체(HER) 패밀리의 구성원이다. EGFR 신호전달은 리간드 결합에 의해 개시된 후, 입체 구조 변화, 이 수용체의 호모이량체화 또는 다른 ErbB 패밀리 구성원들과의 헤테로이량체화, 및 이 수용체의 자가인산화 전이(trans-autophosphorylation)를 유도하는데(문헌[Ferguson *et al.*, Annu Rev Biophys, 37: 353-73, 2008]), 이는 세포 증식 및 생존을 포함하는 매우 다양한 세포 기능들에 궁극적으로 영향을 주는 신호 전달 캐스케이드를 개시한다. EGFR의 발현 또는 키나제 활성의 증가는 인간의 다양한 암과 연관되어 왔으며, 이는

EGFR을 치료적 개입을 위한 매력적인 표적이 되게 한다[문헌(Mendelsohn *et al.*, Oncogene 19: 6550-6565, 2000]; 문헌[Grünwald *et al.*, J Natl Cancer Inst 95: 851-67, 2003]; 문헌[Mendelsohn *et al.*, Semin Oncol 33: 369-85, 2006]). EGFR 유전자 카피수 및 단백질 발현 둘 모두의 증가는 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)에서 EGFR 티로신 키나제 억제제인 이레사(IRESSA)™(게피티닙)에 대한 유리한 반응과 관련되어 왔다(문헌[Hirsch *et al.*, Ann Oncol 18:752-60, 2007]).

[0003] EGFR 요법은 결직장암, 췌장암, 두경부암, 및 비소세포 폐암(NSCLC)의 치료를 위해 승인된, 소분자 및 항-EGFR 항체 둘 모두를 포함한다(문헌[Baselga and Arteaga, J Clin Oncol 23:2445-2459 (20005]; 문헌[Gill *et al.*, J Biol Chem, 259:7755-7760, 1984]; 문헌[Goldstein *et al.*, Clin Cancer Res, 1:131 1-1318; 1995]; 문헌[Prewett *et al.*, Clin Cancer Res, 4:2957-2966,1998]).

[0004] 항-EGFR 요법의 효능(efficacy)은 종양 유형 및 종양에서의 EGFR 돌연변이/증폭 상태에 좌우될 수 있다. 현재 치료제의 부작용은 피부 독성을 포함할 수 있다(문헌[De Roock *et al.*, Lancet Oncol 11 :753-762, 2010]; 문헌[Linardou *et al.*, Nat Rev Clin Oncol, 6: 352-366, 2009]; 문헌[Li and Perez-Soler, Targ Oncol 4: 107-119, 2009]). EGFR 티로신 키나제 억제제(TKI)는 비소세포 폐암(NSCLC)을 위한 2차 요법(2^{nd} line therapy)으로서 일반적으로 사용되지만, 종종 내성 경로로 인해 12개월 이내에 투여를 중단한다(문헌[Riely *et al.*, Clin Cancer Res 12: 839-44, 2006]).

[0005] c-Met는 막횡단 티로신 키나제 수용체를 암호화한다. c-Met는 1984년에 원발암유전자로서 최초로 확인되었는데, 이는 발암물질에 의한 처리가 구성적으로 활성인 융합 단백질 TPR-MET를 생성하는 것으로 밝혀진 후였다(문헌[Cooper *et al.*, Nature 311:29-33, 1984]). c-Met의 리간드인 간세포 성장 인자(HGF)에 의한 c-Met의 활성화는 성장, 운동, 침습, 전이, 상피-중간엽 이행, 혈관생성/상처 치유, 및 조직 재생을 포함하는 다양한 세포 과정들을 자극한다(문헌[Christensen *et al.*, Cancer Lett 225:1-26, 2005]; 문헌[Peters and Adjei, Nat Rev Clin Oncol 9:314-26, 2012]). c-Met는 단일쇄 단백질로서 합성되며, 이러한 단일쇄 단백질은 이황화물 결합에 의해 연결된 50 kDa 알파- 및 140 kDa 베타-하위단위로 단백질 분해에 의해 절단된다(문헌[Ma *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003]). c-Met는 Ron 및 Sea와 같은 다른 막 수용체들과 구조적으로 유사하다. HGF:c-Met 결합의 정확한 화학량론은 분명하지 않지만, 2개의 HGF 분자가 2개의 c-Met 분자에 결합하며, 이는 수용체 이량체화 및 티로신 1230, 1234, 및 1235에서의 자가인산화로 이어지는 것으로 일반적으로 여겨진다(문헌[Stamos *et al.*, The EMBO Journal 23: 2325-2335, 2004]). 리간드-비의존성 c-Met 자가인산화가 또한 유전자 증폭, 돌연변이 또는 수용체 과발현으로 인해 일어날 수 있다.

[0006] c-Met는 위암, 폐암, 결장암, 유방암, 방광암, 두경부암, 난소암, 전립선암, 갑상선암, 췌장암, 및 CNS 암을 포함하는 많은 유형의 암에서 자주 증폭되거나, 돌연변이되거나, 또는 과발현된다. 전형적으로 이 키나제 도메인에 국재화된 미스센스 돌연변이(missense mutation)가 유전성 유두상 신장 세포 암종(papillary renal cell carcinoma, PRCC)에서 그리고 산발성 PRCC의 13%에서 흔히 발견된다(문헌[Schmidt *et al.*, Oncogene 18: 2343-2350, 1999]). c-Met의 세마포린(semaphorin) 또는 막근접(juxtamembrane) 도메인에 국재화된 c-Met 돌연변이는 위암, 두경부암, 간암, 난소암, NSCLC 암 및 갑상선암에서 자주 발견된다(문헌[Ma *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003]; 문헌[Sakakura *et al.*, Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299-305]). c-Met 증폭이 뇌암, 결직장암, 위암, 및 폐암에서 검출되어 왔는데, 이는 종종 질병 진행과 상관된다(문헌[Ma *et al.*, Cancer and Metastasis Reviews, 22: 309-325, 2003]). 비소세포 폐암(NSCLC) 및 위암에 대해 각각 최대 4% 및 20%가 c-Met 증폭을 나타낸다(문헌[Sakakura *et al.*, Chromosomes and Cancer, 1999. 24:299-305]; 문헌[Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21-35, 2011]). 심지어 유전자 증폭의 부재 하에서도, c-Met 과발현이 폐암에서 자주 관찰된다(문헌[Ichimura *et al.*, Jpn J Cancer Res, 87:1063-9, 1996]). 더욱이, 임상 샘플에서, 폐 선암종의 거의 절반이 고수준의 c-Met 및 HGF를 나타내었는데, 이들 둘 모두는 증진된 종양 성장 속도, 전이 및 나쁜 예후와 상관되었다(문헌[Sierra and Tsao, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 3:S21-35, 2011]; 문헌[Siegfried et al., Ann Thorac Surg 66: 1915-8, 1998]).

[0007] EGFR 티로신 키나제 억제제에 내성을 나타내게 되는 모든 종양의 거의 60%가 c-Met 발현을 증가시키거나, c-Met를 증폭시키거나, 또는 c-Met의 유일하게 알려진 리간드인 HGF를 증가시키는데(문헌[Turke *et al.*, Cancer Cell, 17:77-88, 2010]), 이는 c-Met를 통한 EGFR에 대한 보상적인 경로의 존재를 시사한다. c-Met 증폭은 EGFR 키나제 억제제인 게피티닙에 내성을 나타내게 된 배양 세포에서 최초로 확인되었으며, Her3 경로를 통해 증진된 생존을 나타내었다(문헌[Engelman *et al.*, Science, 316:1039-43, 2007]). 이는 임상 샘플에서 추가로

검증되었는데, 여기서는 에를로티닙 또는 게피티닙에 대해 획득 내성(acquired resistance)을 가진 43명의 환자들 중 9명이 c-Met 증폭을 나타낸 것과 비교하여, 62명의 비처리 환자들 중에서는 단지 2명만이 그러하였다. 9명의 처리된 환자들 중 4명은 또한 EGFR 활성화 돌연변이, T790M을 획득하였는데, 이는 동시적 내성 경로들을 입증하는 것이었다(문헌[Beat *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 104:20932-7, 2007]).

[0008] 암에서의 EGFR 및 c-Met 둘 모두의 개별적인 역할은 잘 확립되어 있으며, 이는 이들 표적을 병용 요법에 매력적이게 한다. 두 수용체 모두는 동일한 생존 경로 및 항-아폽토시스 경로(ERK 및 AKT)를 통해 신호전달하며; 이에 따라, 이 쌍을 조합해서 억제하는 것은 보상적인 경로 활성화에 대한 잠재성을 제한하며, 그럼으로써 전체 효능을 개선할 수 있다. EGFR과 c-Met를 표적으로 하는 병용 요법을 임상 시험에서 시험하는데, 이러한 임상 시험에서는 NSCLC에 대한 항-c-Met 1가 항체와 병용하여 타르세바(Tarceva)®(에를로티닙)를 사용하고(문헌[Spigel *et al.*, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011, Journal of Clinical Oncology: Chicago, IL. p. 7505]), 그리고 c-Met의 소분자 억제제인 ARQ-197과 병용하여 타르세바(에를로티닙)를 사용한다(문헌[Adjei *et al.*, Oncologist, 16:788-99, 2011]). 병용 요법 또는 이중특이성 항-EGFR/c-Met 분자는, 예를 들어 국제 특허 공개 WO2008/127710호, WO2009/111691호, WO2009/126834호, WO2010/039248호, WO2010/115551호 및 미국 특허 출원 공개 US2009/0042906호에 개시되어 있다.

[0009] 요법을 위하여 EGFR 및/또는 c-Met 신호전달 경로에 길항하기 위한 현재의 소분자 및 대분자 치료적 접근은 소분자 억제제에서 일어날 수 있는 가능한 특이성 결여, 잠재적인 탈표적(off-target) 활성 및 용량-제한(dose-limiting) 독성으로 인해 최적 미만(sub-optimal)일 수 있다. 전형적인 단일특이성 2가 항체는 막에 결합된 수용체들의 클러스터화(clustering) 및 하류 신호전달 경로들의 원치 않는 활성화를 가져올 수 있다. 전 길이 중쇄를 갖는 1가 항체(하프 아암(half arm))는 제조 공정에 대한 상당한 복잡성 및 비용을 제기한다.

[0010] 따라서, 치료적 목적 및 진단적 목적 둘 모두를 위한 추가의 단일특이성 및 이중특이성 EGFR 및/또는 c-Met 억제제에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명의 일 실시 형태는 단리된 이중특이성 표피 성장 인자 수용체(EGFR)/간세포 성장 인자 수용체(c-Met) 항체로서, 본 이중특이성 항체는

[0012] 제1 중쇄(HC1) 불변 도메인 3(HC1 CH3) 및 HC1 가변 영역 1(VH1)을 포함하는 제1 중쇄(HC1);

[0013] 제2 중쇄(HC2) 불변 도메인 3(HC2 CH3) 및 HC2 가변 영역 2(VH2)를 포함하는 제2 중쇄(HC2);

[0014] 경쇄 가변 영역 1(VL1)을 포함하는 제1 경쇄(LC1); 및

[0015] 경쇄 가변 영역 2(VL2)를 포함하는 제2 경쇄(LC2)를 포함하며, VH1과 VL1은 쌍을 이루어, EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하고, VH2와 VL2는 쌍을 이루어, c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하고, HC1은 HC1 CH3 내에 적어도 하나의 치환을 포함하고, HC2는 HC2 CH3 내에 적어도 하나의 치환을 포함하고, HC1 CH3 내에서의 치환 및 HC2 CH3 내에서의 치환은 상이한 아미노산 잔기 위치들에서 일어나며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0016] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 이중특이성 EGFR/c-Met 항체로서, 본 항체는, 중쇄 3(HC3) 및 경쇄 3(LC3)을 포함하는 대조군 1가 EGFR 항체와 중쇄 4(HC4) 및 경쇄 4(LC4)를 포함하는 대조군 1가 c-Met 항체의 혼합물에 의한 NCI-H292, NCI-H1975 또는 SKMES-1 세포주(cell line)에서의 세포외 신호-관련 키나제 1 및 2(ERK1/2)의 인산화의 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, NCI-H292, NCI-H1975 또는 SKMES-1 세포주에서 적어도 약 10배 미만, 적어도 약 20배 미만, 적어도 약 30배 미만, 적어도 약 40배 미만, 적어도 약 50배 미만 또는 적어도 약 60배 미만인 IC_{50} 값으로 ERK1/2의 인산화를 억제하며, HC3과 HC1, LC3과 LC1, HC4와 HC2, 및 LC4와 LC2는 각각 동일한 아미노산 서열을 갖고, ERK1/2의 인산화는, 포획 항체로서 항-포스포ERK1/2 항체를 사용하고 검출 항체로서 전기화학발광 화합물과 접합된 비인산화 및 인산화된 ERK1/2에 결합하는 항체를 사용하여 샌드위치 면역검정을 사용하여 전 세포 용해물(whole cell lysate)에서 측정되는, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0017] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 이중특이성 EGFR/c-Met 항체로서, 본 항체는, HC3 및 LC3을 포함하는 대조군 1가 EGFR 항체와 HC4 및 LC4를 포함하는 대조군 1가 c-Met 항체의 혼합물에 의한 NCI-H1975 세포주에서의 Ser473에서의 단백질 키나제 B(AKT)의 인산화의 억제의 IC50 값과 비교할 때, NCI-H1975 세포주에서 적어도 약 70배 미만인 IC_{50} 값으로 Ser473에서의 AKT의 인산화를 억제하며, HC3과 HC1, LC3과 LC1, HC4와 HC2, 및 LC4와

LC2는 각각 동일한 아미노산 서열을 갖고, Ser473에서의 AKT의 인산화는, 포획 항체로서 비인산화 및 인산화된 AKT에 결합하는 항체를 사용하고 검출 항체로서 전기화학발광 화합물에 접합된 항-포스포AKT Ser473 항체를 사용하여 샌드위치 면역검정을 사용하여 전 세포 용해물에서 측정되는, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0018] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 EGFR 잔기 K489, I491, K467 및 S492에서 서열 번호 73의 EGFR에 결합하고, 잔기 PEFRDSYPIKYVHAF(서열 번호 238) 및 FAQSKPDSAEPMDRSA(서열 번호 239)에서 c-Met에 결합하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0019] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 NCI-H292 또는 NCI-H1975 세포가 낮은 부착 조건에서 성장되는 경우, 세툭시맙에 의한 NCI-H292 또는 NCI-H1975 세포의 성장 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, 적어도 약 300배 미만, 적어도 약 400배 미만, 적어도 약 500배 미만, 적어도 약 600배 미만, 적어도 약 700배 미만 또는 적어도 약 800배 미만인 IC_{50} 값으로 NCI-H292 또는 NCI-H1975 세포의 성장을 억제하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0020] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 이중특이성 항체 및 세툭시맙이 20 mg/kg 용량으로 투여되는 경우, 세툭시맙과 비교할 때, 일수 36에서 적어도 500배 미만의 T/C 값[백분율(%)]으로 SCID 베이지(Beige) 마우스에서의 HGF-발현 SKMES-1 세포 종양의 성장을 억제하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0021] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 HC1 CH3이 K409R 또는 F405L 치환을 포함하고, HC2 CH3이 K409R 또는 F405L 치환을 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따르는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0022] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 소정의 중쇄 및 경쇄 CDR, VH1, VL1, VH2, VL2, HC1, LC1, HC2 및 LC2 서열을 포함하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다.

[0023] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 HC1, HC2, LC1 또는 LC2를 암호화하는 단리된 합성 폴리뉴클레오티드이다.

[0024] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터이다.

[0025] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포이다.

[0026] 본 발명의 다른 실시 형태는 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 생성 방법으로서,

[0027] 서열 번호 199의 2개의 중쇄 및 서열 번호 200의 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 단일특이성 2가 항-EGFR 항체와 서열 번호 201의 2개의 중쇄 및 서열 번호 202의 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 단일특이성 2가 항-c-Met 항체를 약 1:1 몰비의 혼합물로 배합하는 단계;

[0028] 혼합물 내로 환원제를 도입시키는 단계;

[0029] 약 90분 내지 약 6시간 동안 혼합물을 인큐베이팅하는 단계;

[0030] 환원제를 제거하는 단계; 및

[0031] 서열 번호 199의 제1 중쇄 및 서열 번호 201의 제2 중쇄, 서열 번호 200의 제1 경쇄 및 서열 번호 202의 제2 경쇄를 포함하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 정제하는 단계를 포함하며, 서열 번호 199의 제1 중쇄는 서열 번호 200의 제1 경쇄와 쌍을 이루어서 EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인을 형성하고, 서열 번호 201의 제2 중쇄는 서열 번호 202의 제2 경쇄와 쌍을 이루어서 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 형성한다.

[0032] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 이중특이성 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0033] 본 발명의 다른 실시 형태는 암을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, 본 치료 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0034] 본 발명의 다른 실시 형태는 EGFR 및/또는 c-Met를 발현하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법으로서, 본 억제 방법은 세포를 본 발명의 이중특이성 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0035] 본 발명의 다른 실시 형태는 대상체에서 EGFR 및/또는 c-Met 발현 종양 또는 암 세포의 성장 또는 전이를 억제하는 방법으로서, 본 방법은 EGFR 및/또는 c-Met 발현 종양 또는 암 세포의 성장 또는 전이를 억제하도록 유효

량의 본 발명의 이중특이성 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1a 및 도 1b는 EGFR-결합 FN3 도메인의 아미노산 정렬. BC 및 FG 루프는 서열 번호 18의 잔기 22-28 및 75-86에서 박스로 표시되어 있다. 일부 변이체는 열 안정성 개선(thermal stability improving) L17A, N46K 및 E86I 치환(텐콘 서열 번호 1에 따른 잔기 넘버링)을 포함한다.

도 2는 무작위화된 C-CD-F-FG 대체 표면을 갖는 텐콘27 스캐폴드(서열 번호 99) 및 TCL14 라이브러리(서열 번호 100)의 서열 정렬. 루프 잔기는 박스로 표시되어 있다. 루프 및 가닥은 서열 위에 표시되어 있다.

도 3은 c-Met-결합 FN3 도메인의 서열 정렬. C 루프 및 CD 가닥 및 F 루프 및 FG 가닥은 박스로 표시되어 있으며, 잔기 29-43 및 잔기 65-81에 걸쳐 이어져 있다.

도 4는 단일특이성 또는 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자로 전처리되고 HGF로 자극된 NCI-H292 세포에서의 c-Met 인산화의 억제가 나타나 있다. 단독으로의 또는 EGFR-결합 FN3 도메인(P54AR4-83v2, 도면에서 83v2로 나타냄)과 조합된 단일특이성 c-Met-결합 FN3 도메인(P114AR5P74-A5, 도면에서 A5로 나타냄)과 비교할 때, 이중특이성 EGFR/c-Met 분자(ECB1)의 효력(potency)의 실질적인 증가가 관찰되었다.

도 5는 단일특이성 또는 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자로 전처리된 세포에서의 EGFR 및 c-Met 인산화의 억제. 높은 수준의 EGFR을 발현하는 세포주, NCI-H292(도 5a) 및 H596(도 5b)에서, 항-EGFR 단일특이성 및 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자는 EGFR 인산화를 감소시키는 데 동일한 효력을 나타낸다. c-Met에 대해 낮은 수준의 EGFR을 발현하는 세포주, NCI-H441(도 5c)에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 단독으로의 단일특이성 EGFR-결합 FN3 도메인과 비교하여 EGFR 인산화의 억제에 대한 효력을 개선한다. EGFR에 대해 낮은 수준의 c-Met를 갖는 세포주, NCI-H292(도 5d) 및 H596(도 5e)에서, c-Met 인산화의 억제는 단독으로의 단일특이성 c-Met-결합 FN3 도메인과 비교하여 이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의해 유의하게 효력이 강화되어 있다. 이 연구에서 사용된 분자들은 하기와 같았다: 이중특이성 ECB5(도면에서 17-A3으로 나타냄), 단일특이성 EGFR-결합 FN3 도메인 P53A1R5-17(도면에서 "17"로 나타냄), 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 ECB3(도면에서 83-H9로 나타냄), 및 단일특이성 c-Met 결합 FN3 도메인 P114AR7P93-H9(도면에서 H9로 나타냄).

도 6은 6시간 또는 72시간 동안 이중특이성 EGFR/c-Met 분자를 투여한 마우스로부터 단리된 종양에서의 약력학적 신호전달. 모든 분자들은 6시간 및 72시간에서 c-Met, EGFR 및 ERK 인산화를 유의하게 감소시켰으며, 억제의 정도는 EGFR 및/또는 c-Met에 대한 FN3 도메인의 친화도에 의존하였다. 고(도면에서 "83"은 p54AR4-83v2임) 또는 중간(도면에서 "17v2"는 P53A1R5-17v2임) 친화도를 갖는 EGFR-결합 FN3 도메인을 고(도면에서 "A3"은 P114AR7P94-A3임) 또는 중간(도면에서 "A5"는 P114AR5P74-A5임) 친화도를 갖는 c-Met-결합 FN3 도메인에 결합시킴으로써 이중특이성 분자를 생성하였다.

도 7은 알부민 결합 도메인(albumin binding domain, ABD)에 연결된 가변 친화도를 갖는 이중특이성 EGFR/cMet 분자의 혈장(상측) 및 종양(하측) 축적률(accumulation)이 IP 투여 후 6시간째(좌측) 및 72시간째(우측)에 대해 나타나 있다. 투여 후 6시간째에서는, 중간 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인(17v2) 또는 고 친화도 EGFR 결합 도메인(83v2)을 보유하는 이중특이성 분자를 투여한 마우스에서 종양 축적률이 최대이다. 이중특이성 분자들은 다음과 같이 고 또는 중간 친화도 EGFR 또는 c-Met 결합 FN3 도메인을 포함하였다: 83v2-A5-ABD(ECB18; EGFR/cMet에 대해 고/중간), 83v2-A3-ABD(ECB38; 고/고), 17v2-A5(ECB28; 중간/중간), 17v2-A3-ABD(ECB39; 중간/고). 도면에서, 83v2는 p54AR4-83v2를 지칭하고; 17v2는 p53A1R5-17v2를 지칭하고; A3은 p114AR7P94-A3을 지칭하고; A5는 p114AR5P74-A5를 지칭한다.

도 8은 H292-HGF 종양 이종이식편을 SCID 베이지 마우스 내로 이식하였다. 종양이 대략 80 ㎟의 평균 부피에 도달했을 때, 마우스에 이중특이성 EGFR/c-Met 분자(25 mg/kg) 또는 PBS 비히클을 주당 3회 투여하였다. 모든 이중특이성 분자들은 종양 성장을 감소시켰으며, 종양 성장 억제(TGI)는 c-Met 및 EGFR에 대한 이들 분자의 친화도에 의존하였다(고 EGFR-고 cMet는 p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3(ECB38)을 지칭하고; 고 EGFR-중간 cMet는 p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5(ECB18)를 지칭하고; 중간 EGFR-고 cMet는 p53A1R5-17v2-p114AR7P94-A3(ECB39)을 지칭하고; 중간 EGFR-중간 cMet는 p53A1R5-17-p114AR5P74-A5(ECB28)를 지칭한다).

도 9는 H292-HGF 종양 이종이식편을 SCID 베이지 마우스 내로 이식하였으며, 이들을 상이한 요법들로 처리하였다. 이들 요법의 항종양 활성이 나타나 있다(이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3-ABD(ECB38)를 지칭하고; 다른 요법들은 크리조티닙, 에를로티닙, 세툭시맙, 및 크리조티닙과 에를로티닙의 병용

이다).

도 10은 SKMES-HGF 종양 이종이식편을 SCID 베이지 마우스 내로 이식하였으며, 이들 마우스를 상이한 요법들로 처리하였다. 이들 요법의 항종양 활성이 시간 경과에 따른 종양 크기(㎟)의 변화로서 나타나 있다. 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 EM1-mAb를 20 mg/kg, 5 mg/kg, 또는 1 mg/kg으로 주 2회 복막내(i.p.) 투여하였으며; 세툭시맙을 20 mg/kg으로 주 2회 i.p. 투여하였다. 도면에서의 화살표는 투여 일수를 나타낸다. 항체 뒤에 나오는 숫자는 투여된 용량을 나타내었다.

도 11은 HCC827 종양 이종이식편을 누드 마우스 내로 이식하였으며, 이들 마우스를 표시된 용량으로 에를로티닙 또는 EM1-mAb로 처리하였다. EM1-mAb는 4주 동안 주 2회 투여하였으며, 에를로티닙은 일일 1회 투여하였다. 도면에서의 화살표는 투여 일수를 나타낸다. 이들 요법의 항종양 활성이 시간 경과에 따른 종양 크기(㎟)의 변화로서 나타나 있다.

도 12는 SNU-5 종양 이종이식편을 CB17/SCID 마우스 내로 이식하였으며, 이들 마우스를 10 mg/kg의 세툭시맙 또는 10 mg/kg 또는 1 mg/kg의 EM1-mAb로 처리하였다. 항체는 4주 동안 주 2회 투여하였다. 도면에서의 화살표는 투여 일수를 나타낸다. 이들 요법의 항종양 활성이 시간 경과에 따른 종양 크기(㎟)의 변화로서 나타나 있다.

도 13은 H1975-HGF 종양 이종이식편을 누드 마우스 내로 이식하였으며, 이들 마우스를 10 mg/kg의 세툭시맙, 10 mg/kg의 EM1-mAb, 50 mg/kg의 에를로티닙, 15 mg/kg의 아파티닙, 또는 10 mg/kg의 EM1-mAb와 15 mg/kg의 아파티닙의 병용으로 처리하였다. 항체는 3주 동안 주 2회 투여하였으며, 소분자는 일일 1회 투여하였다. 도면에서의 화살표는 투여 일수를 나타낸다. 이들 요법의 항종양 활성이 시간 경과에 따른 종양 크기(㎟)의 변화로서 나타나 있다.

도 14는 HCC827-ER1 종양 이종이식편을 누드 마우스 내로 이식하였으며, 이들 마우스를 10 mg/kg의 EM1-mAb, 25 mg/kg의 에를로티닙, 또는 이들 둘의 병용으로 처리하였다. EM1-mAb는 19일 동안 주 2회 투여하였으며, 에를로티닙은 일일 1회 투여하였다. 도면에서의 화살표는 투여 일수를 나타낸다. 이들 요법의 항종양 활성이 시간 경과에 따른 종양 크기(㎟)의 변화로서 나타나 있다.

도 15는 20 mg/kg의 EM1-mAb의 단회 용량의 투여 후 SCID 베이지 마우스 내로 이식된 H1975 HGF 종양 이종이식편으로부터 단리된 종양 용해물 중의 평균 EGFR 및 c-Met 수준. 표시된 처리 후 시간에서 PBS 대조군의 %로서 수용체 수준이 나타나 있다.

도 16은 H1975-HGF 종양 이종이식편을 누드 마우스 내로 이식하였으며, 이들 마우스를 EM1-mAb 10 mg/kg 또는 Fc 수용체 결합을 갖지 않고 효과기 기능이 결여된 EM1-mAb 변이체 IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S 10 mg/kg으로 처리하였다. 항체를 표시된 일수에 주 2회 투여하였다. 이들 요법의 항종양 활성이 시간 경과에 따른 종양 크기(㎟)의 변화로서 나타나 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "피브로넥틴 III형(FN3) 도메인"(FN3 도메인)은 피브로넥틴, 테나신, 세포내 세포골격 단백질, 사이토카인 수용체 및 원핵생물성 효소를 포함하는 단백질에서 자주 나타나는 도메인을 지칭한다(문헌[Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci USA 89: 8990-8994, 1992]; 문헌[Meinke *et al.*, J Bacteriol 175:1910-1918, 1993]; 문헌[Watanabe *et al.*, J Biol Chem 265:15659-15665, 1990]). 예시적인 FN3 도메인은 인간 테나신 C에 존재하는 15개의 상이한 FN3 도메인, 인간 피브로넥틴(FN)에 존재하는 15개의 상이한 FN3 도메인, 및 예를 들어 미국 특허 출원 공개 제2010/0216708호에 기재된 바와 같은 비천연 합성 FN3 도메인이다. 개별적인 FN3 도메인은 도메인 번호 및 단백질 명칭(예를 들어, 테나신의 제3 FN3 도메인(TN3), 또는 피브로넥틴의 제10 FN3 도메인(FN10))에 의해 지칭된다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치환하는" 또는 "치환된" 또는 "돌연변이화하는" 또는 "돌연변이화된"은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 내에 그 서열의 변이체를 생성시키기 위해 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드를 변경, 결실, 또는 삽입하는 것을 지칭한다.

[0039] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "무작위화하는" 또는" 무작위화된" 또는 "다양화된(diversified)" 또는 "다양화하는"은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열 내에 적어도 하나의 치환, 삽입, 또는 결실을 실행하는 것을 지칭한다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "변이체"는 하나 이상의 변형(modification), 예를 들어 치환, 삽입, 또는 결실에 의해 기준 폴리펩티드 또는 기준 폴리뉴클레오티드와 상이한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

[0041] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적 결합"은 본 발명의 FN3 도메인, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체가 일정 해리 상수(K_D)를 갖고서 사전결정된 항원에 결합하는 능력을 지칭하는데, 이때 해리 상수는 약 1×10^{-6} M 이하, 예를 들어 약 1×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-12} M 이하, 또는 약 1×10^{-13} M 이하이다. 전형적으로, 본 발명의 FN3 도메인, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 예를 들어 프로테온(Proteon) 기기(바이오라드(BioRad))를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)에 의해 측정할 때 비특이적 항원(예를 들어, BSA 또는 카세인)에 대한 그의 K_D보다 적어도 10배 더 적은 K_D를 갖고서 사전결정된 항원(즉, EGFR 또는 c-Met)에 결합한다. 따라서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 적어도 약 1×10^{-6} M 이하, 예를 들어 약 1×10^{-7} M 이하, 약 1×10^{-8} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 약 1×10^{-12} M 이하, 또는 약 1×10^{-13} M 이하의 결합 친화도(K_D)를 갖고서 각각의 EGFR 및 c-Met 에 특이적으로 결합한다. 그러나, 사전결정된 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 다른 관련 항원들과의, 예를 들어 다른 종으로부터의 동일한 사전결정된 항원(상동체)과의 교차-반응성을 가질 수 있다.

[0042] 용어 "라이브러리"는 변이체들의 수집을 지칭한다. 라이브러리는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 변이체들로 구성될 수 있다.

[0043] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "안정성"은 분자가 그의 정상적인 기능적 활성들 중 적어도 하나, 예를 들어 EGFR 또는 c-Met와 같은 사전결정된 항원에 결합하는 활성을 유지하도록, 생리학적 조건 하에서 접힌 상태를 유지하는 분자의 능력을 지칭한다.

[0044] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "표피 성장 인자 수용체" 또는 "EGFR"은 서열 번호 73에 그리고 진뱅크(GenBank) 기탁 번호 NP_005219에 나타낸 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 천연 발생 변이체도 갖는 인간 EGFR(HER1 또는 ErbB1로도 알려짐)(문헌[Ullrich *et al.*, Nature 309:418-425, 1984])을 지칭한다. 그러한 변이체는 잘 알려진 EGFRvIII 및 (예를 들어, 스위스프로트(SwissProt) 기탁 번호 P00533-1(야생형; 서열 번호 73 및 NP_005219와 동일함), P00533-2(F404L/L405S), P00533-3(628-705: CTGPGLEGCP…GEAPNQALLR → PGNESLKAML...SVIITASSCH 및 706-1210 결실됨), P00533-4(C628S 및 629-1210 결실됨), 변이체 GlnQ98, R266, K521, I674, G962, 및 P988(문헌[Livingston *et al.*,NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478]), T790M, L858R/T790M 및 del(E746, A750)에 의해 확인된 바와 같은) 다른 대안적으로 스플라이싱된 변이체를 포함한다.

[0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "EGFR 리간드"는 EGFR에 대한 모든(예를 들어, 생리학적) 리간드를 포함하는데, 이는 EGF, TGFα, 헤파린 결합 EGF(HB-EGF), 암피레귤린(amphiregulin, AR), 및 에피레귤린(epiregulin, EPI)을 포함한다.

[0046] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "표피 성장 인자"(EGF)는 서열 번호 74에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 잘 알려진 53 아미노산 인간 EGF를 지칭한다.

[0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "간세포 성장 인자 수용체" 또는 "c-Met"는 서열 번호 101에 또는 진뱅크 기탁 번호 NP_001120972에 나타낸 아미노산 서열 및 이의 천연 변이체를 갖는 인간 c-Met를 지칭한다.

[0048] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "간세포 성장 인자"(HGF)는 서열 번호 102에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 잘 알려진 인간 HGF를 지칭하는데, 이는 절단되어서 이황화물 결합에 의해 연결된 알파 및 베타 쇄의 이량체를 형성한다.

[0049] 본 명세서에 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, "결합을 차단한다" 또는 "결합을 억제한다"는, 본 발명의 FN3 도메인, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용

제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체가 EGFR에 대한 EGFR 리간드, 예컨대 EGF의 결합 및/또는 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단 또는 억제하는 능력을 지칭하며, 부분 차단/억제 및 완전 차단/억제 둘 모두를 포함한다. 본 발명의 FN3 도메인, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 의한 EGFR 리간드, 예컨대 EGF의 EGFR에 대한 그리고/또는 HGF의 c-Met에 대한 차단/억제는, 차단 또는 억제를 갖지 않는 EGFR에 대한 EGFR 리간드 결합 및/또는 c-Met에 대한 HGF의 결합과 비교할 때, EGFR 신호전달 및/또는 c-Met 신호전달의 정상 수준을 부분적으로 또는 완전히 감소시킨다. 본 발명의 FN3 도메인, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 억제율이 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 경우, EGFR 리간드, 예컨대 EGF의 EGFR에 대한 그리고/또는 HGF의 c-Met에 대한 "결합을 차단한다". 결합의 억제율은 잘 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있는데, 예를 들어, FACS를 사용하고 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 본 발명의 FN3 도메인, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 노출된 EGFR 발현 A431 세포 상에의 비오티닐화 EGF의 결합의 억제를 측정함으로써 측정되거나, 또는 잘 알려진 방법 및 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 c-Met 세포외 도메인 상에의 비오티닐화 HGF의 결합의 억제를 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0050] 용어 "EGFR 신호전달"은 EGFR에 결합하는 EGFR 리간드에 의해 유도되는 신호 전달(signal transduction)을 지칭하는데, 이러한 신호 전달은 EGFR 내의 적어도 하나의 티로신 잔기의 자가인산화로 이어진다. 예시적인 EGFR 리간드는 EGF이다.

[0051] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "EGFR 신호전달을 무력화(neutralize)한다"는 것은 본 발명의 FN3 도메인, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체가 EGFR 리간드, 예컨대 EGF에 의해 유도되는 EGFR 신호전달을 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 억제하는 능력을 지칭한다.

[0052] 용어 "c-Met 신호전달"은 c-Met에 결합하는 HGF에 의해 유도되는 신호 전달을 지칭하는데, 이러한 신호 전달은 c-Met 내의 적어도 하나의 티로신 잔기의 자가인산화로 이어진다. 전형적으로, 위치 1230, 1234, 1235 또는 1349의 적어도 하나의 티로신 잔기가 HGF 결합시에 자가인산화된다.

[0053] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "c-Met 신호전달을 무력화한다"는 것은 본 발명의 FN3 도메인, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체가 HGF에 의해 유도되는 c-Met 신호전달을 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 억제하는 능력을 지칭한다.

[0054] 본 명세서에 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, "과발현", "과발현된" 및 "과발현하는"은 동일한 조직 유형의 정상 세포와 비교하여 표면 상에 측정가능할 정도로 더 높은 수준의 EGFR 및/또는 c-Met를 갖는 암 또는 악성 세포를 지칭한다. 그러한 과발현은 유전자 증폭에 의해 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 야기될 수 있다. EGFR 및/또는 c-Met의 발현 및 과발현은 잘 알려진 검정을 사용하여, 예를 들어 살아 있거나 또는 용해된 세포에 대해 ELISA, 면역형광, 유세포측정 또는 방사면역검정을 사용하여 측정될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, EGFR 및/또는 c-Met-암호화 핵산 분자의 수준이, 예를 들어 형광 계내 혼성화(*in situ* hybridization), 서던 블롯팅(Southern blotting), 또는 PCR 기법을 사용하여 세포에서 측정될 수 있다. 세포의 표면 상에서의 EGFR 및/또는 c-Met의 수준이 정상 세포와 비교할 때 적어도 1.5배 초과인 경우, EGFR 및/또는 c-Met는 과발현된다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "텐콘"은 서열 번호 1에 나타내고 미국 특허 출원 공개 US2010/0216708호에 기재된 서열을 갖는 합성 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 지칭한다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "암 세포" 또는 "종양 세포"는 생체내(*in vivo*)에서의, 생체외(*ex vivo*)에서의, 그리고 조직 배양물에서의 암성, 전-암성(pre-cancerous) 또는 형질전환된 세포를 지칭하며, 이러한 세포는 자발적 또는 유도된 표현형 변화를 갖는데, 이러한 변화는 반드시 새로운 유전 물질의 흡수를 수반하지는 않는다. 형질전환이 형질전환 바이러스에 의한 감염 및 새로운 게놈 핵산의 도입, 또는 외인성 핵산의 흡수로부터 일어날 수 있기는 하지만, 이는 또한 자발적으로 또는 발암물질에 대한 노출 후에 일어날 수 있으며, 그럼으로써 내인성 유전자를 돌연변이화할 수 있다. 형질전환/암은, 예를 들어, 시험관내에서, 생체내에서, 그리고 생

체외에서 누드 마우스 등과 같은 적합한 동물 숙주에서 형태학적 변화, 세포의 불멸화, 비정상 성장 제어, 병소 형성, 증식, 악성종양, 종양 특이적 마커 수준, 침습성, 종양 성장 또는 억제에 의해 예시된다(문헌[Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)]).

[0057] 용어 "벡터"는 생물 시스템 내에서 복제될 수 있거나 그러한 시스템들 사이에서 이동할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 전형적으로 벡터 폴리뉴클레오티드는 생물 시스템에서 이들 폴리뉴클레오티드의 복제 또는 유지를 용이하게 하는 기능을 하는 복제 기점, 폴리아데닐화 신호 또는 선택 마커와 같은 요소들을 포함한다. 그러한 생물 시스템의 예는 벡터를 복제할 수 있는 생물 구성요소들을 이용하는 세포 시스템, 바이러스 시스템, 동물 시스템, 식물 시스템 및 재구성된 생물 시스템을 포함할 수 있다. 벡터를 포함하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA 분자 또는 이들의 혼성체일 수 있다.

[0058] 용어 "발현 벡터"는 발현 벡터 내에 존재하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 번역을 유도하기 위하여 생물 시스템 또는 재구성된 생물 시스템에서 이용될 수 있는 벡터를 의미한다.

[0059] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 당-포스페이트 골격 또는 다른 등가의 공유결합적 화학적 특성에 의해 공유 결합된 뉴클레오티드의 쇄를 포함하는 분자를 의미한다. 이중 가닥 및 단일 가닥 DNA 및 RNA가 폴리뉴클레오티드의 전형적인 예이다.

[0060] "상보적 DNA" 또는 "cDNA"는, 연속적인 엑손들을 갖고 게놈성 DNA에 존재하는 개재 인트론들이 제거된 천연 성숙 mRNA 종에서 발견되는 서열 요소들의 배열을 공유하는 잘 알려진 합성 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 개시자 메티오닌을 암호화하는 코돈은 cDNA에 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. cDNA는, 예를 들어 역전사 또는 합성 유전자 조립에 의해 합성될 수 있다.

[0061] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "합성" 또는 "비천연" 또는 "인공"은 천연에 존재하지 않는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 분자를 지칭한다.

[0062] 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 폴리펩티드를 형성하도록 펩티드 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. 약 50개 미만의 아미노산의 작은 폴리펩티드는 "펩티드"로 지칭될 수 있다.

[0063] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "이중특이성 EGFR/c-Met 분자" 또는 "이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자"는 직접적으로 또는 링커(linker)를 통해 함께 공유결합적으로 연결된, EGFR 결합 FN3 도메인과 별개의 c-Met 결합 FN3 도메인을 포함하는 분자를 지칭한다. 예시적인 이중특이성 EGFR/c-Met 결합 분자는 EGFR과 특이적으로 결합하는 제1 FN3 도메인 및 c-Met와 특이적으로 결합하는 제2 FN3 도메인을 포함한다.

[0064] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "결합가(valent)"는 분자 내의 항원에 특이적인 명시된 숫자의 결합 부위의 존재를 지칭한다. 그렇기 때문에, 용어 "1가", "2가", "4가", 및 "6가"는 분자 내의 항원에 특이적인 각각 1개, 2개, 4개, 및 6개의 결합 부위의 존재를 지칭한다.

[0065] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "혼합물"은 함께 공유결합적으로 연결되지 않은 2개 이상의 FN3 도메인의 샘플 또는 조제물을 지칭한다. 혼합물은 2개 이상의 동일한 FN3 도메인 또는 별개의 FN3 도메인으로 이루어질 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 혼합물은 또한 EGFR에 대해 1가이고/이거나 c-Met에 대해 1가인 2개 이상의 1가 항체의 샘플 또는 조제물을 지칭한다.

[0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "EGFR과 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제"는 EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 도메인 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하는 분자를 지칭한다. EGFR과 c-Met에 특이적으로 결합하는 예시적인 작용제는 이중특이성 항체이다. EGFR과 c-Met에 특이적으로 결합하는 다른 예시적인 이중특이성 작용제는 EGFR 결합 FN3 도메인 및 별개의 c-Met 결합 FN3 도메인을 포함하는 분자이다. EGFR과 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제는 단일 폴리펩티드 또는 하나 초과의 폴리펩티드로 구성될 수 있다.

[0067] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "이중특이성 항-EGFR/c-Met 항체" 또는 "이중특이성 EGFR/c-Met 항체"는 EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 도메인 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 갖는 이중특이성 항체를 지칭한다. EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 도메인들은 전형적으로 VH/VL 쌍이며, 이중특이성 항-EGFR/c-Met 항체는 EGFR 및 c-Met에 결합한다는 측면에서 1가이다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 넓은 의미로 의미되며, 다중클론 항체, 뮤린, 인간, 인간-적응화(human-adapted), 인간화 및 키메라 단일클론 항체를 포함하는 단일클론 항체, 항체 단편, 이중특이성 또는

다중특이성 항체, 이량체성, 사량체성, 또는 다량체성 항체, 및 단일쇄 항체를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0069] 면역글로불린은 중쇄 불변 도메인 아미노산 서열에 따라, 5개의 주요 부류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 정해질 수 있다. IgA 및 IgG는 동종형(isotype) IgA_1, IgA_2, IgG_1, IgG_2, IgG_3 및 IgG_4로 추가로 하위-분류된다. 임의의 척추동물 종의 항체 경쇄는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 명확하게 별개인 2개의 유형, 즉 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나로 정해질 수 있다.

[0070] 용어 "항체 단편"은 중쇄 및/또는 경쇄 항원 결합 부위, 예컨대 중쇄 상보성 결정 영역(heavy chain complementarity determining region, HCDR) 1, 2, 및 3, 경쇄 상보성 결정 영역(light chain complementarity determining region, LCDR) 1, 2, 및 3, 중쇄 가변 영역(VH), 또는 경쇄 가변 영역(VL)을 보유하는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 항체 단편은 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; 힌지(hinge) 영역에서 이황화물 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab)_2$ 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; VH 도메인으로 이루어진 도메인 항체(dAb) 단편(문헌[Ward *et al* (1989) *Nature* 341:544- 546])을 포함한다. VH 및 VL 도메인은 조작되고(engineered) 합성 링커를 통해 함께 연결되어 다양한 유형의 단일쇄 항체 설계를 형성할 수 있으며, 여기서 VH/VL 도메인은 VH 및 VL 도메인이 별도의 단일쇄 항체 작제물에 의해 발현되는 경우에 분자내에서, 또는 분자간에 쌍을 이루어서 1가 항원 결합 부위, 예컨대 단일쇄 Fv(scFv) 또는 이중항체(diabody)를 형성하며, 이는, 예를 들어 PCT 국제 공개 WO1998/44001호, WO1988/01649호, WO1994/13804호, 및 WO1992/01047호에 기재되어 있다. 이들 항체 단편은 당업자에게 잘 알려진 기법을 사용하여 얻어지며, 이들 단편은 전 길이 항체와 동일한 방식으로 유용성을 위해 스크리닝된다.

[0071] 어구 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체들이 사실상 없는 항체 또는 항체 단편을 지칭한다(예를 들어, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 단리된 이중특이성 항체에는 인간 EGFR 및 c-Met 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 사실상 없다). 그러나, EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원들, 예컨대 인간 EGFR 및/또는 c-Met의 오르토상동체(ortholog), 예컨대 마카카 파시큘라리스(*Macaca fascicularis*)(원숭이(cynomolgus)) EGFR 및/또는 c-Met와의 교차-반응성을 가질 수 있다. 게다가, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 사실상 없을 수 있다.

[0072] 항체 가변 영역은 3개의 "항원 결합 부위"가 개재된 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 항원 결합 부위는 다양한 용어를 사용하여 정의된다: (i) 상보성 결정 영역(CDR) - VH에서 3개(HCDR1, HCDR2, HCDR3), 및 VL에서 3개(LCDR1, LCDR2, LCDR3) - 은 서열 가변성에 기초한다(문헌[Wu and Kabat (1970) J Exp Med 132:211-50, 1970]; 문헌[Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]). (ii) "초가변 영역(hypervariable region)", "HVR", 또는 "HV" - VH에서 3개(H1, H2, H3), 및 VL에서 3개(L1, L2, L3) - 는, 초티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)에 의해 정의된 바와 같이, 구조가 초가변성인 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다(문헌[Chothia and Lesk Mol Biol 196:901-17, 1987]). 다른 용어는 "IMGT-CDR"(문헌[Lefranc *et al.*, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003]) 및 "특이성 결정 잔기 용법(Specificity Determining Residue Usage)"(SDRU)(문헌[Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004])을 포함한다. 인터내셔널 이뮤노진틱스(International ImMunoGeneTics, IMGT) 데이터베이스(http://www_imgt_org)는 항원-결합 부위의 표준화된 넘버링과 정의를 제공한다. CDR, HV, 및 IMGT 도해 사이의 관련성은 문헌[Lefranc *et al.*, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003]에 기재되어 있다.

[0073] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "초티아 잔기"는 알-라지카니(Al-Lazikani)에 따라 넘버링된 항체 VL 및 VH 잔기이다(문헌[Al-Lazikani *et al.*, J Mol Biol 273:927-48, 1997]).

[0074] "프레임워크" 또는 "프레임워크 서열"은 항원 결합 부위인 것으로 규정된 것 이외의 가변 영역의 나머지 서열이다. 항원 결합 부위가 전술된 바와 같은 다양한 용어에 의해 정의될 수 있기 때문에, 프레임워크의 정확한 아미노산 서열은 항원 결합 부위가 어떻게 정의되는지에 따라 달라진다.

[0075] "인간화 항체"는 항원 결합 부위가 인간 이외의 종으로부터 유래되고 가변 영역 프레임워크가 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 프레임워크 영역 내에 치환을 포함할 수 있으므로, 프레임워크는 발현된 인간 면역글로불린 또는 생식세포계열 유전자 서열의 정확한 카피가 아닐 수 있다.

[0076] "인간-적응화" 항체 또는 "인간 프레임워크 적응화(human framework adapted, HFA)" 항체는 미국 특허 출원 공

개 US2009/0118127호에 기재된 방법에 따라 적응된 인간화 항체를 지칭한다. 인간-적응화 항체는 최대 CDR 및 FR 유사성, 길이 적합성(length compatibility), 및 CDR1 및 CDR2 루프와 경쇄 CDR3 루프의 일부분의 서열 유사성에 기초하여 억셉터 인간 프레임워크를 선택함으로써 인간화된다.

[0077] "인간 항체"는 프레임워크 및 항원 결합 부위 둘 모두가 인간 기원의 서열로부터 유래되는, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 이 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, 불변 영역 또한 인간 기원의 서열로부터 유래된다.

[0078] 인간 항체는, 항체의 가변 영역이 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어지는 경우, 인간 기원의 서열"로부터 유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템은, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 파지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리, 및 인간 면역글로불린 유전자자리를 담지하는 유전자도입 인간 이외의 동물, 예컨대 마우스를 포함한다. "인간 항체"는 인간 생식세포계열 또는 재배열된 면역글로불린 서열과 비교할 때 아미노산 차이를 포함할 수 있는데, 이는 예를 들어 천연 발생 체세포 돌연변이 또는 프레임워크 또는 항원 결합 부위 내의 치환의 의도적 도입에 기인한다. 전형적으로, "인간 항체"는 인간 생식세포계열 또는 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. 일부 경우에, "인간 항체"는, 예를 들어 문헌[Knappik *et al.*, J Mol Biol 296:57-86, 2000]에 기재된 바와 같이 인간 프레임워크 서열 분석으로부터 유래되는 공통 프레임워크 서열을 함유하거나, 또는, 예를 들어 문헌[Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010] 및 국제 특허 공개 WO2009/085462호에 기재된 바와 같이 파지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리 내로 도입된 합성 HCDR3을 함유할 수 있다. 항원 결합 부위가 인간 이외의 종으로부터 유래되는 항체는 "인간 항체"의 정의에 포함되지 않는다.

[0079] 단리된 인간화 항체는 합성 항체일 수 있다. 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 인간 항체는, 합성 CDR 및/또는 합성 프레임워크를 도입시킨 파지 디스플레이와 같은 시스템을 사용하여 생성될 수 있거나, 또는 시험관내 돌연변이생성(mutagenesis)을 거쳐서 항체 특성을 개선하여, 그 결과 생체내에서 인간 항체 생식세포계열 레퍼토리 내에는 천연적으로 존재하지 않는 항체를 생성할 수 있다.

[0080] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 항체를 포함하는데, 이러한 항체는, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자를 위해 유전자도입 또는 염색체도입된(transchromosomal) 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체 또는 그로부터 제조된 하이브리도마(hybridoma)(하기에 추가로 기술됨), 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터 단리된 항체, 재조합된 조합 항체 라이브러리(recombinant, combinatorial antibody library)로부터 단리된 항체, 및 다른 DNA 서열에 대해 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체, 또는 Fab 아암 교환을 사용하여 시험관내에서 생성되는 항체이다.

[0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "단일클론 항체"는 단일 분자 조성의 항체 분자의 제조를 지칭한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프(epitope)에 대해 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내거나, 또는 이중특이성 단일클론 항체의 경우에는, 2개의 별개의 에피토프에 대해 이중 결합 특이성을 나타낸다.

[0082] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "사실상 동일한"은 비교하는 2개의 항체 가변 영역 아미노산 서열이 동일하거나 또는 "미미한(insubstantial) 차이"를 갖는 것을 의미한다. 미미한 차이는, 항체 특성에 불리한 영향을 주지 않는, 항체 가변 영역 서열 내의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 또는 15개의 아미노산의 치환이다. 본 명세서에 개시된 가변 영역 서열과 사실상 동일한 아미노산 서열은 본 발명의 범주 내에 있다. 일부 실시 형태에서, 서열 동일성은 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상일 수 있다. 동일성(%)은, 예를 들어 벡터(Vector) NTI v.9.0.0의 얼라인엑스(AlignX) 모듈(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠(Invitrogen))의 디폴트 세팅(default setting)을 사용하여 페어와이즈 정렬(pairwise alignment)에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 단백질 서열을 질의 서열(query sequence)로 사용하여, 예를 들어 관련 서열을 확인하기 위해 공개 데이터베이스 또는 특허 데이터베이스에 대한 검색을 수행할 수 있다. 그러한 검색을 수행하기 위해 사용되는 예시적인 프로그램은, 기본 설정을 사용하는 XBLAST 또는 BLASTP 프로그램(http_//www_ncbi_nlm/nih_gov), 또는 게놈퀘스트(GenomeQuest)™(미국 매사추세츠주 웨스트보로우 소재의 게놈퀘스트) 스위트(suite)이다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합하는 항원의 부분을 의미한다. 에피토프는 아미노산 또는 다당 측쇄와 같은 모이어티(moiety)의 화학적으로 활성(예컨대, 극성, 비극성 또는 소

수성)인 표면 그룹화(grouping)로 통상 이루어지며, 특이적인 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 입체구조 공간 단위(conformational spatial unit)를 형성하는 연속 및/또는 불연속 아미노산으로 구성될 수 있다. 불연속 에피토프의 경우, 항원의 선형 서열의 상이한 부분으로부터의 아미노산이 단백질 분자의 접힘을 통해 3차원 공간에서 아주 근접하게 된다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "와 병용하여"는 둘 이상의 치료제가 대상체에게 혼합물 상태로 함께 투여되거나, 단제(single agent)로서 동시에 투여되거나, 또는 단제로서 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있음을 의미한다.

[0085] 본 명세서 전체에 걸쳐 항체 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은, 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따라 수행된다.

[0086] **대상 조성물**

[0087] 본 발명은 EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제를 제공한다. 본 발명은 본 발명의 이중특이성 작용제를 암호화하는 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 또는 이들의 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 및 이들의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

[0088] **단일특이성 및 이중특이성 EGFR 및/또는 c-Met FN3 도메인 함유 결합 분자**

[0089] **단일특이성 EGFR FN3 도메인 함유 결합 분자**

[0090] 본 발명은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 표피 성장 인자(EGF)의 결합을 차단하며, 이에 따라 치료적 및 진단적 응용에 널리 사용될 수 있는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 제공한다. 본 발명은 본 발명의 FN3 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 및 이들의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

[0091] 본 발명의 FN3 도메인은 고 친화도로 EGFR에 결합하여 EGFR 신호전달을 억제하며, 소분자 EGFR 억제제와 비교할 때 특이성 및 감소된 탈표적 독성의 측면에서, 그리고 종래의 항체 치료제와 비교할 때 개선된 조직 침투의 측면에서 이득을 제공할 수 있다.

[0092] 본 발명의 일 실시 형태는 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 표피 성장 인자(EGF)의 결합을 차단하는 단리된 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인이다.

[0093] 본 발명의 FN3 도메인은, A431 세포를 채용하고 본 발명의 FN3 도메인과 함께 또는 이것 없이 인큐베이팅된 A431 세포 상에서 600 nM에서 스트렙타비딘-피코에리트린 접합체를 사용하여 결합된 비오티닐화 EGF로부터의 형광의 양을 검출하는 경쟁 검정에서, 약 1×10^{-7} M 미만, 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 또는 약 1×10^{-12} M 미만의 IC_{50} 값으로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단할 수 있다. 예시적인 FN3 도메인은 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-7} M의 IC_{50} 값으로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단할 수 있으며, 예컨대 서열 번호 18-29, 107-110, 또는 122-137의 아미노산 서열을 갖는 EGFR 결합 FN3 도메인이다. 본 발명의 FN3 도메인은, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 발명의 FN3 도메인의 부재 하에서의 EGFR에 대한 EGF의 결합과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단할 수 있다.

[0094] 본 발명의 FN3 도메인은, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 발명의 FN3 도메인의 부재 하에서의 신호전달의 수준과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 EGFR 신호전달을 억제할 수 있다.

[0095] EGFR에 대한 리간드, 예컨대 EGF의 결합은 수용체 이량체화, 자가인산화, 수용체의 내부 세포질 티로신 키나제 도메인의 활성화, 및 DNA 합성(유전자 활성화) 및 세포 주기 진행 또는 분열의 조절에 관여하는 다수의 신호 전달 및 전사활성화(transactivation) 경로들의 개시를 자극한다. EGFR 신호전달의 억제는 하나 이상의 EGFR 하류 신호전달 경로의 억제를 가져올 수 있으며, 이에 따라 EGFR을 무력화하는 것은 세포 증식 및 분화, 혈관생성, 세포 운동성 및 전이의 억제를 포함하는 다양한 효과를 가질 수 있다.

[0096] EGFR 신호전달은 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있는데, 예를 들어 티로신 Y1068, Y1148, 및 Y1173 중 임의의 것에서의 수용체의 자가인산화(문헌[Downward *et al.*, Nature 311:483-5, 1984]) 및/또는 천

연 또는 합성 기질의 인산화를 측정하여 측정될 수 있다. 인산화는 포스포티로신 특이적 항체를 사용하여 ELISA 검정 또는 웨스턴 블롯과 같은 잘 알려진 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예시적인 검정은 문헌[Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997] 및 문헌[Batley *et al.*, Life Sci 62:143-50, 1998]에서, 그리고 본 명세서에 기재된 검정에서 찾을 수 있다.

[0097] 일 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 A431 세포에서 측정할 때, 약 2.5 $\times 10^{-6}$ M 미만, 예를 들어 약 1×10^{-6} M 미만, 약 1×10^{-7} M 미만, 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 또는 약 1×10^{-12} M 미만의 IC_{50} 값으로 EGFR 잔기 위치 티로신 1173에서의 EGF-유도 EGFR 인산화를 억제한다.

[0098] 일 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 A431 세포에서 측정할 때, 약 1.8 $\times$ 10^{-8} M 내지 약 2.5 $\times$ 10^{-6} M의 IC_{50} 값으로 EGFR 잔기 위치 티로신 1173에서의 EGF-유도 EGFR 인산화를 억제한다. 그러한 예시적인 FN3 도메인은 서열 번호 18-29, 107-110, 또는 122-137의 아미노산 서열을 갖는 것들이다.

[0099] 일 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은, 당업자에 의해 실시되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명 또는 키넥사 방법(Kinexa method)에 의해 결정할 때, 약 1×10^{-8} M 미만, 예를 들어 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 약 1×10^{-12} M 미만, 또는 약 1×10^{-13} M 미만의 해리 상수(K_D)를 갖고서 인간 EGFR에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은 약 2×10^{-10} 내지 약 1×10^{-8} M의 K_D를 갖고서 인간 EGFR에 결합한다. EGFR에 대한 FN3 도메인의 친화도는 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984)]; 문헌[Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992)]; 및 본 명세서에 기재된 방법 참조). 특정 FN3 도메인-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예를 들어, 삼투성, pH) 하에서 측정된다면 변동될 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원-결합 파라미터(예를 들어, K_D, K_{on}, K_{off})의 측정은 바람직하게는 단백질 스캐폴드 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충액, 예컨대 본 명세서에 기재된 완충액을 사용하여 행해진다.

[0100] EGFR에 결합하는 본 발명의 예시적인 FN3 도메인은 서열 번호 18-29, 107-110, 또는 122-137의 FN3 도메인을 포함한다.

[0101] 일 실시 형태에서, EGFR에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 서열 번호 27의 아미노산 서열과 87% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0102] 일 실시 형태에서, EGFR에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은

[0103] 서열 HNVYKDTNX$_9$RGL(서열 번호 179) 또는 서열 LGSYVFEHDVML(서열 번호 180)(여기서, X_9는 M 또는 I임)을 포함하는 FG 루프; 및

[0104] 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(서열 번호 181)(여기서,

[0105] X_1은 A, T, G 또는 D이고;

[0106] X_2는 A, D, Y 또는 W이고;

[0107] X_3은 P, D 또는 N이고;

[0108] X_4는 L 또는 부재하고;

[0109] X_5는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0110] X_6은 G, D 또는 A이고;

[0111] X_7은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0112] X_8은 Y, F 또는 L임)을 포함하는 BC 루프를 포함한다.

[0113] EGFR에 특이적으로 결합하여 EGFR의 자가인산화를 억제하는 본 발명의 FN3 도메인은, 구조적 특징으로서, 서열 HNVYKDTNX$_9$RGL(서열 번호 179) 또는 서열 LGSYVFEHDVML(서열 번호 180)(여기서, X_9는 M 또는 I임)을 포함하는 FG 루프를 포함할 수 있다. 그러한 FN3 도메인은, 8개 또는 9개의 아미노산 길이를 갖고 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$(서열 번호 181)에 의해 규정된 BC 루프를 추가로 포함하여, 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 A431 세포에서 측정할 때, 약 2.5×10^{-6} M 미만의 IC_{50} 값으로, 또는 약 1.8×10^{-8} M 내지 약 2.5×10^{-6} M의 IC_{50} 값으로 EGFR 자가인산화를 억제할 수 있다.

[0114] EGFR에 특이적으로 결합하여 EGFR의 자가인산화를 억제하는 본 발명의 FN3 도메인은 서열

[0115] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX$_9$RGLPLSAEFTT (서열 번호 182), 또는 서열

[0116] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKePGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (서열 번호 183)

[0117] (여기서,

[0118] X_1은 A, T, G 또는 D이고;

[0119] X_2는 A, D, Y 또는 W이고;

[0120] X_3은 P, D 또는 N이고;

[0121] X_4는 L 또는 부재하고;

[0122] X_5는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0123] X_6은 G, D 또는 A이고;

[0124] X_7은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0125] X_8은 Y, F 또는 L이고;

[0126] X_9는 M 또는 I임)를 추가로 포함한다.

[0127] EGFR 결합 FN3 도메인은 잘 알려진 방법 및 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생성되고 EGFR 자가인산화를 억제하는 그의 능력에 대해 시험될 수 있다.

[0128] 본 발명의 다른 실시 형태는 EGFR에 특이적으로 결합하는 단리된 FN3 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 18-29, 107-110, 또는 122-137에 나타낸 서열을 포함한다.

[0129] 일부 실시 형태에서, EGFR 결합 FN3 도메인은, 예를 들어 반감기 연장 분자의 발현 및/또는 접합을 용이하게 하기 위하여 특정 FN3 도메인의 N-말단에 연결된 개시자 메티오닌(Met) 또는 C-말단에 연결된 시스테인(Cys)을 포함한다.

[0130] 본 발명의 다른 실시 형태는 EGFR에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단하는 단리된 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 1의 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리로부터 단리된다.

[0131] **단일특이성 c-Met FN3 도메인 함유 결합 분자**

[0132] 본 발명은 간세포 성장 인자 수용체(c-Met)에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 간세포 성장 인자(HGF)의 결합을 차단하며, 이에 따라 치료적 및 진단적 응용에 널리 사용될 수 있는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인을 제공한다. 본 발명은 본 발명의 FN3 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 및 이들의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

[0133] 본 발명의 FN3 도메인은 고 친화도로 c-Met에 결합하여 c-Met 신호전달을 억제하며, 소분자 c-Met 억제제와 비교할 때 특이성 및 감소된 탈표적 독성의 측면에서, 그리고 종래의 항체 치료제와 비교할 때 개선된 조직 침투의 측면에서 이득을 제공할 수 있다. 본 발명의 FN3 도메인은 1가이며, 이에 따라 다른 2가 분자들에서 일어날 수 있는 원치 않는 수용체 클러스터화 및 활성화를 방지한다.

[0134] 본 발명의 일 실시 형태는 간세포 성장 인자 수용체(c-Met)에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 간세포 성장 인자(HGF)의 결합을 차단하는, 단리된 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인이다.

[0135] 본 발명의 FN3 도메인은, 본 발명의 FN3 도메인의 존재 하에서의 c-Met-Fc 융합 단백질에 대한 비오티닐화 HGF의 결합의 억제를 검출하는 검정에서, 약 1×10^{-7} M 미만, 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 또는 약 1×10^{-12} M 미만의 IC_{50} 값으로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다. 예시적인 FN3 도메인은 약 2×10^{-10} M 내지 약 6×10^{-8} M의 IC_{50} 값으로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다. 본 발명의 FN3 도메인은, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 발명의 FN3 도메인의 부재 하에서의 c-Met에 대한 HGF의 결합과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다.

[0136] 본 발명의 FN3 도메인은, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 발명의 FN3 도메인의 부재 하에서의 신호전달의 수준과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 c-Met 신호전달을 억제할 수 있다.

[0137] c-Met에 대한 HGF의 결합은 수용체 이량체화, 자가인산화, 수용체의 내부 세포질 티로신 키나제 도메인의 활성화, 및 DNA 합성(유전자 활성화) 및 세포 주기 진행 또는 분열의 조절에 관여하는 다수의 신호 전달 및 전사활성화 경로들의 개시를 자극한다. c-Met 신호전달의 억제는 하나 이상의 c-Met 하류 신호전달 경로의 억제를 가져올 수 있으며, 이에 따라 c-Met를 무력화하는 것은 세포 증식 및 분화, 혈관생성, 세포 운동성 및 전이의 억제를 포함하는 다양한 효과를 가질 수 있다.

[0138] c-Met 신호전달은 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있는데, 예를 들어 적어도 하나의 티로신 잔기 Y1230, Y1234, Y1235 또는 Y1349 상에서의 수용체의 자가인산화, 및/또는 천연 또는 합성 기질의 인산화를 측정하여 측정될 수 있다. 인산화는, 예를 들어, ELISA 검정에서 또는 웨스턴 블롯 상에서 포스포티로신에 특이적인 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 티로신 키나제 활성에 대한 검정이, 예를 들어 문헌[Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997] 및 문헌[Batley *et al.*, Life Sci 62:143-50, 1998]에 기재되어 있고, 본 명세서에 기재된 검정이다.

[0139] 일 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은, 100 ng/mL의 재조합 인간 HGF를 사용하여 NCI-H441 세포에서 측정할 때, 약 1×10^{-6} M 미만, 약 1×10^{-7} M 미만, 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 또는 약 1×10^{-12} M 미만의 IC_{50} 값으로 c-Met 잔기 위치 1349에서의 HGF-유도 c-Met 인산화를 억제한다.

[0140] 일 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은, 100 ng/mL의 재조합 인간 HGF를 사용하여 NCI-H441 세포에서 측정할 때, 약 4×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-6} M의 IC_{50} 값으로 c-Met 티로신 Y1349에서의 HGF-유도 c-Met 인산화를 억제한다.

[0141] 일 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은, 당업자에 의해 실시되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명 또는 키넥사 방법에 의해 결정할 때, 약 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M, 또는 1×10^{-15} M 이하의 해리 상수(K_D)를 갖고서 인간 c-Met에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은 약 3×10^{-10} M 내지 약 5×10^{-8} M의 K_D를 갖고서 인간 c-Met에 결합한다. c-Met에 대한 FN3 도메인의 친화도는 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984))]; 문헌[Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992)]; 및 본 명세서에 기재된 방법 참조). 특정 FN3 도메인-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예를 들어, 삼투

성, pH) 하에서 측정된다면 변동될 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원-결합 파라미터(예를 들어, K_D, K_{on}, K_{off})의 측정은 바람직하게는 단백질 스캐폴드 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충액, 예컨대 본 명세서에 기재된 완충액으로 행해진다.

[0142] c-Met에 결합하는 본 발명의 예시적인 FN3 도메인은 서열 번호 32-49 또는 111-114의 아미노산 서열을 갖는 FN3 도메인을 포함한다.

[0143] 일 실시 형태에서, c-Met에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은 서열 번호 41의 아미노산 서열과 83% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0144] 일 실시 형태에서, c-Met에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인은

[0145] 서열 $DSFX_{10}IRYX_{11}E\ X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}$(서열 번호 184)(여기서,

[0146] X_{10}은 W, F 또는 V이고;

[0147] X_{11}은 D, F 또는 L이고;

[0148] X_{12}는 V, F 또는 L이고;

[0149] X_{13}은 V, L 또는 T이고;

[0150] X_{14}는 V, R, G, L, T 또는 S이고;

[0151] X_{15}는 G, S, A, T 또는 K이고;

[0152] X_{16}은 E 또는 D임)을 포함하는 C 가닥 및 CD 루프; 및

[0153] 서열 $TEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}V\ KGGX_{21}X_{22}SX_{23}$(서열 번호 185)(여기서,

[0154] X_{17}은 Y, W, I, V, G 또는 A이고;

[0155] X_{18}은 N, T, Q 또는 G이고;

[0156] X_{19}는 L, M, N 또는 I이고;

[0157] X_{20}은 G 또는 S이고;

[0158] X_{21}은 S, L, G, Y, T, R, H 또는 K이고;

[0159] X_{22}는 I, V 또는 L이고;

[0160] X_{23}은 V, T, H, I, P, Y 또는 L임)을 포함하는 F 가닥 및 FG 루프를 포함한다.

[0161] c-Met에 특이적으로 결합하여 c-Met의 자가인산화를 억제하는 본 발명의 FN3 도메인은 서열:

[0162] $LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX_{10}IRYX_{11}EX_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}VKGGX_{21}X_{22}SX_{23}PLSAEFTT$(서열 번호 186)

[0163] (여기서,

[0164] X_{10}은 W, F 또는 V이고;

[0165] X_{11}은 D, F 또는 L이고;

[0166] X_{12}는 V, F 또는 L이고;

[0167] X_{13}은 V, L 또는 T이고;

[0168] X_{14}는 V, R, G, L, T 또는 S이고;

[0169] X_{15}는 G, S, A, T 또는 K이고;

[0170] X_{16}은 E 또는 D이고;

[0171] X_{17}은 Y, W, I, V, G 또는 A이고;

[0172] X_{18}은 N, T, Q 또는 G이고;

[0173] X_{19}는 L, M, N 또는 I이고;

[0174] X_{20}은 G 또는 S이고;

[0175] X_{21}은 S, L, G, Y, T, R, H 또는 K이고;

[0176] X_{22}는 I, V 또는 L이고;

[0177] X_{23}은 V, T, H, I, P, Y 또는 L임)를 추가로 포함한다.

[0178] 본 발명의 다른 실시 형태는 c-Met에 특이적으로 결합하는 단리된 FN3 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 32-49 또는 111-114에 나타낸 서열을 포함한다.

[0179] 본 발명의 다른 실시 형태는 c-Met에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단하는 단리된 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 1의 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리로부터 단리된다.

[0180] **텐콘 서열에 기초한 라이브러리로부터의 EGFR 또는 c-Met FN3 도메인의 단리**

[0181] 텐콘(서열 번호 1)은 인간 테나신-C로부터의 15개의 FN3 도메인의 공통 서열로부터 설계된 비천연 발생 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인이다(문헌[Jacobs *et al.*, Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012]; 미국 특허 출원 공개 제2010/0216708호). 텐콘의 결정 구조는 FN3 도메인들에 특징적인 바와 같은 7개의 베타-가닥을 연결시키는 6개의 표면-노출된 루프를 보여주며, 이때 베타-가닥은 A, B, C, D, E, F, 및 G로 지칭되고, 루프는 AB, BC, CD, DE, EF, 및 FG 루프로 지칭된다(문헌[Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992]; 미국 특허 제6,673,901호). 이들 루프, 또는 각각의 루프 내의 선택된 잔기들은 EGFR 또는 c-Met에 결합하는 신규한 분자들을 선택하는 데 사용될 수 있는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인의 라이브러리를 작제하기 위하여 무작위화될 수 있다. 표 1은 텐콘(서열 번호 1) 내의 각각의 루프 및 베타-가닥의 위치 및 서열을 나타낸다.

[0182] 따라서, 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리는 무작위화된 FG 루프, 또는 무작위화된 BC 및 FG 루프를 가질 수 있으며, 예컨대 하기에 기재된 바와 같은 라이브러리 TCL1 또는 TCL2이다. 텐콘 BC 루프는 7개의 아미노산 길이이며, 이에 따라 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 아미노산이, BC 루프에서 다양화되고 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리에서 무작위화될 수 있다. 텐콘 FG 루프는 7개의 아미노산 길이이며, 이에 따라 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 아미노산이, FG 루프에서 다양화되고 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리에서 무작위화될 수 있다. 텐콘 라이브러리 내의 루프들에서의 추가의 다양성(diversity)이 루프들에서의 잔기들의 삽입 및/또는 결실에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, FG 및/또는 BC 루프는 1 내지 22개의 아미노산만큼 연장되거나, 또는 1 내지 3개의 아미노산만큼 감소될 수 있다. 텐콘 내의 FG 루프는 7개의 아미노산 길이인 반면에, 항체 중쇄 내의 상응하는 루프는 4 내지 28개 잔기의 범위이다. 최대 다양성을 제공하기 위하여, FG 루프는 서열에 있어서 뿐만 아니라 4 내지 28개 잔기의 항체 CDR3 길이 범위에 상응하도록 길이에 있어서도 다양화될 수 있다. 예를 들어, FG 루프는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 추가 아미노산에 의해 루프를 연장시킴으로써 길이에 있어서 추가로 다양화될 수 있다.

[0183] 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리는 또한, FN3 도메인의 일측에 형성되고 2개 이상의 베타 가닥과 적어도 하나의 루프를 포함하는 무작위화된 대체 표면들을 가질 수 있다. 하나의 그러한 대체 표면은 C 및 F 베타-가닥과 CD 및 FG 루프 내의 아미노산들에 의해 형성된다(C-CD-F-FG 표면). 텐콘 대체 C-CD-F-FG 표면에 기초하여 설계된 라이브러리가 도 1에 나타나 있으며, 그러한 라이브러리들의 생성에 관한 상세한 설명이 미국 특허 출원 공개 US2013/0226834호에 기재되어 있다.

[0184] 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리는 또한 텐콘 변이체들, 예컨대 잔기 위치 11, 14, 17, 37, 46, 73, 또

는 86(잔기 넘버링은 서열 번호 1에 상응함)에서 치환을 갖는, 개선된 열 안정성을 나타내는 텐콘 변이체들에 기초하여 설계된 라이브러리들을 포함한다. 예시적인 텐콘 변이체가 미국 특허 출원 공개 제2011/0274623호에 기재되어 있으며, 서열 번호 1의 텐콘과 비교할 때 치환 E11R, L17A, N46V 및 E86I를 갖는 텐콘27(서열번호 99)을 포함한다.

[0185] [표 1]

FN3 도메인	텐콘(서열 번호 1)
A 가닥	1-12
AB 루프	13-16
B 가닥	17-21
BC 루프	22-28
C 가닥	29-37
CD 루프	38-43
D 가닥	44-50
DE 루프	51-54
E 가닥	55-59
EF 루프	60-64
F 가닥	65-74
FG 루프	75-81
G 가닥	82-89

[0186]

[0187] 텐콘 및 다른 FN3 서열 기반 라이브러리들은, 무작위 또는 규정된 세트의 아미노산들을 사용하여, 선택된 잔기 위치들에서 무작위화될 수 있다. 예를 들어, 20개의 천연 발생 아미노산 모두를 암호화하는 NNK 코돈을 사용하여 무작위 치환을 갖는 라이브러리 내의 변이체를 생성할 수 있다. 다른 다양화 스킴(scheme)에서는, DVK 코돈을 사용하여 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys를 암호화할 수 있다. 대안적으로, NNS 코돈을 사용하여 20개의 아미노산 잔기 모두를 발생시킴과 동시에 정지 코돈의 빈도를 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 슬로노믹스(Slonomics)® 기술(http:_//www_sloning_com)을 사용하여, 다양화하고자 하는 위치에 편향된 아미노산 분포를 가진 FN3 도메인의 라이브러리를 합성할 수 있다. 이 기술은, 수천 개의 유전자 합성 과정에 충분한 보편적 구성 요소(building block)로서 작용하는 사전제조된 이중 가닥 트리플렛(pre-made double stranded triplet)들의 라이브러리를 사용한다. 트리플렛 라이브러리는 임의의 원하는 DNA 분자를 구성하는 데 필요한 모든 가능한 서열 조합을 나타낸다. 코돈 표기는 잘 알려진 IUB 코드에 따른다.

[0188] EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 본 발명의 FN3 도메인은, *cis* 디스플레이를 사용하여 스캐폴드 단백질들을 암호화하는 DNA 단편들을 RepA를 암호화하는 DNA 단편에 연결하여, 시험관내 번역 후에 형성되는 단백질-DNA 복합체들의 풀(pool) - 여기서, 각각의 단백질은 그것을 암호화하는 DNA와 안정하게 회합됨 - 을 생성함으로써 텐콘 라이브러리와 같은 FN3 라이브러리를 생성하고(미국 특허 제7,842,476호; 문헌[Odegrip *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2806-2810, 2004]), 당업계에 알려지고 실시예에 기재된 임의의 방법에 의해 EGFR 및/또는 c-Met에 대한 특이적 결합에 대해 라이브러리를 검정함으로써 단리될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 잘 알려진 방법은 ELISA, 샌드위치 면역검정, 및 경쟁적 및 비경쟁적 검정이다(예를 들어, 문헌[Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York] 참조). EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 확인된 FN3 도메인은, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여, EGFR에 대한 EGFR 리간드, 예컨대 EGF의 결합, 또는 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단하는 그의 능력에 대해, 그리고 EGFR 및/또는 c-Met 신호전달을 억제하는 그의 능력에 대해 추가로 특성화된다.

[0189] EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 본 발명의 FN3 도메인은, 템플릿으로서 임의의 FN3 도메인을 사용하여 라이브러리를 생성하고, 내부에 제공된 방법을 사용하여 EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 분자들을 위해 라이브러리를 스크리닝함으로써 생성될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 FN3 도메인은 테나신 C의 제3 FN3 도메인(TN3)(서열 번호 75), 피브콘(Fibcon)(서열 번호 76), 및 피브로넥틴의 제10 FN3 도메인(FN10)(서열 번호 77)이다. 표준 클로닝 및 발현 기법을 사용하여 라이브러리를 벡터 내로 클로닝하거나 또는 라이브러리의

이중 가닥 cDNA 카세트를 합성하거나, 라이브러리를 시험관내에서 번역하거나, 또는 발현시킨다. 예를 들어, 리보솜 디스플레이(문헌[Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997]), mRNA 디스플레이(문헌[Roberts and Szostak, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 12297-12302, 1997]), 또는 다른 무세포(cell-free) 시스템(미국 특허 제5,643,768호)이 사용될 수 있다. FN3 도메인 변이체의 라이브러리는, 예를 들어 임의의 적합한 박테리오파지의 표면 상에 디스플레이되는 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 박테리오파지의 표면 상에 융합 폴리펩티드를 디스플레이하는 방법은 잘 알려져 있다(미국 특허 출원 공개 제2011/0118144호; 국제 특허 공개 WO2009/085462호; 미국 특허 제6,969,108호; 미국 특허 제6,172,197호; 미국 특허 제5,223,409호; 미국 특허 제6,582,915호; 미국 특허 제6,472,147호).

[0190] EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 본 발명의 FN3 도메인은 그의 특성을 개선하도록, 예컨대 열 안정성 및 열 접힘과 풀림의 가역성을 개선하도록 변형될 수 있다. 단백질 및 효소의 겉보기 열 안정성을 증가시키기 위하여 몇몇 방법이 적용되어 왔으며, 이는 고도로 유사한 열안정성 서열들에 대한 비교를 기반으로 하는 합리적인 설계, 이황화물 가교를 안정화하는 설계, 알파-나선 성향을 증가시키는 돌연변이, 염 가교의 조작, 단백질의 표면 전하의 변경, 지향 진화(directed evolution), 및 공통 서열들의 조성을 포함한다(문헌[Lehmann and Wyss, Curr Opin Biotechnol, 12, 371-375, 2001]). 높은 열 안정성은 발현 단백질의 수율을 증가시키고, 용해도 또는 활성을 개선하고, 면역원성을 감소시키고, 제조 중에 콜드 체인(cold chain)의 필요성을 최소화할 수 있다. 텐콘(서열 번호 1)의 열 안정성을 개선하기 위해 치환될 수 있는 잔기는 잔기 위치 11, 14, 17, 37, 46, 73, 또는 86이며, 미국 특허 출원 공개 제2011/0274623호에 기재되어 있다. 이들 잔기에 상응하는 치환이 본 발명의 FN3 도메인 또는 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자에 도입될 수 있다.

[0191] 본 발명의 다른 실시 형태는 EGFR에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단하는 단리된 FN3 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 18-29, 107-110, 122-137에 나타낸 서열을 포함하며, 텐콘(서열 번호 1) 내의 위치 11, 14, 17, 37, 46, 73, 및 86에 상응하는 하나 이상의 잔기 위치에서의 치환을 추가로 포함한다.

[0192] 본 발명의 다른 실시 형태는 c-Met에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단하는 단리된 FN3 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 32-49 또는 111-114에 나타낸 서열을 포함하고, 텐콘(서열 번호 1) 내의 위치 11, 14, 17, 37, 46, 73, 및 86에 상응하는 하나 이상의 잔기 위치에서의 치환을 추가로 포함한다.

[0193] 예시적인 치환은 치환 E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y 및 E86I(서열 번호 1에 따른 넘버링)이다.

[0194] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 FN3 도메인은 텐콘(서열 번호 1) 내의 치환 L17A, N46V, 및 E86I에 상응하는 치환을 포함한다.

[0195] EGFR에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인(도 1)은 텐콘(서열 번호 1)과 비교할 때 연장된 FG 루프를 갖는다. 따라서, 텐콘(서열 번호 1) 내의 잔기 11, 14, 17, 37, 46, 73, 및 86에 상응하는 잔기는, 서열 번호 24의 FN3 도메인 - 여기서는, BC 루프 내에의 하나의 아미노산의 삽입으로 인해 상응하는 잔기가 잔기 11, 14, 17, 38, 74, 및 92임 - 을 제외하고는, 도 1a 및 도 1b에 나타낸 EGFR FN3 도메인 내의 잔기 11, 14, 17, 37, 46, 73 및 91이다.

[0196] 본 발명의 다른 실시 형태는 EGFR에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단하는 단리된 FN3 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 18-29, 107-110, 또는 122-137에 나타낸 아미노산 서열을 포함하며, 선택적으로 텐콘(서열 번호 1) 내의 치환 L17A, N46V 및 E86I에 상응하는 치환을 갖는다.

[0197] 본 발명의 다른 실시 형태는 c-Met에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단하는 단리된 FN3 도메인이며, 본 FN3 도메인은 서열 번호 32-49 또는 111-114에 나타낸 아미노산 서열을 포함하며, 선택적으로 텐콘(서열 번호 1) 내의 치환 L17A, N46V 및 E86I에 상응하는 치환을 갖는다.

[0198] 단백질 안정성 및 단백질 불안정성의 측정은 단백질 완전성(integrity)의 동일하거나 상이한 양상이라고 볼 수 있다. 단백질은 열에 의해, 자외 또는 이온화 방사선, 액체 용액 중에 있는 경우에는 주위 삼투성 및 pH의 변화, 작은 기공-크기 여과에 의해 부과되는 기계적 전단력, 자외 방사선, 이온화 방사선, 예컨대 감마 조사에 의한 이온화 방사선, 화학적 탈수 또는 열 탈수, 또는 단백질 구조 붕괴를 야기할 수 있는 임의의 다른 작용 또는 힘에 의해 야기되는 변성에 민감하거나 또는 "불안정"하다. 분자의 안정성은 표준 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 표준 방법을 사용하여 열 용융("TM") 온도 - 분자의 절반이 풀리게 되는 섭씨 도(℃) 단위의 온도 - 를 측정함으로써 분자의 안정성을 결정할 수 있다. 전형적으로, TM이 높을수록 분자가 더 안정하다. 열에 부가하여, 화학적 환경 또한 단백질이 특정 3 차원 구조를 유지하는 능력을 변화시킨다.

[0199] 일 실시 형태에서, EGFR 또는 c-Met에 결합하는 본 발명의 FN3 도메인은, TM의 증가에 의해 측정할 때, 조작 전

의 동일한 도메인과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 또는 그 이상으로 증가된 안정성을 나타낸다.

[0200] 화학적 변성을 다양한 방법에 의해 마찬가지로 측정할 수 있다. 화학적 변성제는 구아니디늄 하이드로클로라이드, 구아니디늄 티오시아네이트, 우레아, 아세톤, 유기 용매(DMF, 벤젠, 아세토니트릴), 염(황산암모늄, 브롬화리튬, 염화리튬, 브롬화나트륨, 염화칼슘, 염화나트륨); 환원제(예를 들어, 다이티오트레이톨, 베타-메르캅토에탄올, 다이니트로티오벤젠, 및 수소화물, 예컨대 붕수소화나트륨), 비이온성 및 이온성 세제, 산(예를 들어, 염산(HCl), 아세트산(CH_3COOH), 할로겐화 아세트산), 소수성 분자(예를 들어, 인지질), 및 표적화 변성제를 포함한다. 변성 정도의 정량화는 기능적 특성, 예컨대 표적 분자에 결합하는 능력의 손실에 의존할 수 있거나, 또는 물리화학적 특성, 예컨대 응집에 대한 경향, 이전에는 용매에 접근 불가능했던 잔기의 노출, 또는 이황화물 결합의 붕괴 또는 형성에 의해 행할 수 있다.

[0201] 일 실시 형태에서, EGFR 또는 c-Met에 결합하는 본 발명의 FN3 도메인은, 화학적 변성제로서 구아니디늄 하이드로클로라이드를 사용함으로써 측정할 때, 조작 전의 동일한 스캐폴드와 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 또는 그 이상으로 증가된 안정성을 나타낸다. 증가된 안정성은, 잘 알려진 방법을 사용하여, 증가하는 농도의 구아니딘 하이드로클로라이드로 처리시에 감소되는 트립토판 형광의 함수로서 측정될 수 있다.

[0202] 예를 들어 결합가(valency)를 증가시킴으로써 표적 분자 결합의 결합력(avidity)을 증가시키기 위한 수단으로서, 또는 2개 이상의 상이한 표적 분자에 동시에 결합하는 이중특이성 또는 다중특이성 스캐폴드를 생성하기 위하여, 본 발명의 FN3 도메인을 단량체, 이량체, 또는 다량체로서 생성할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 링커, 예를 들어 폴리-글리신, 글리신 및 세린, 또는 알라닌 및 프롤린을 함유하는 링커의 포함에 의해 단일특이성, 이중특이성, 또는 다중특이성 단백질 스캐폴드를 연결함으로써 이량체 및 다량체를 생성할 수 있다. 예시적인 링커는 $(GS)_2$(서열 번호 78), $(GGGGS)_5$(서열 번호 79), $(AP)_2$(서열 번호 80), $(AP)_5$ (서열 번호 81), $(AP)_{10}$(서열 번호 82), $(AP)_{20}$(서열 번호 83) 및 $A(EAAAK)_5AAA$(서열 번호 84) 링커를 포함한다. 이량체들 및 다량체들은 N으로부터 C로의 방향으로 서로 연결될 수 있다. 폴리펩티드를 신규의 연결된 융합 폴리펩티드 내로 연결하기 위하여 천연 발생 펩티드 링커뿐만 아니라 인공 펩티드 링커를 사용하는 것에 대해서도 문헌에 잘 알려져 있다(문헌[Hallewell *et al., J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989]; 문헌[Alfthan *et al., Protein Eng.* 8, 725-731, 1995]; 문헌[Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996]; 미국 특허 제5,856,456호).

[0203] **EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제**

[0204] EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 본 발명의 이중특이성 작용제는 소분자 EGFR 및/또는 c-Met 억제제와 비교할 때 특이성 및 감소된 탈표적 독성의 측면에서 이득을 제공할 수 있다. 본 발명은 EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제가, EGFR-결합 단일특이성 작용제와 c-Met-결합 단일특이성 작용제의 혼합물과 비교할 때, 유의하게 개선된 상승적 억제 효과를 제공한다는 의외의 발견에 적어도 부분적으로 기초한다. 이러한 분자는 종양 침투 및 체류를 최대화하기 위하여 EGFR 및 c-Met 둘 모두에 대한 특이적 친화도에 맞추어질 수 있다. EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제는 EGFR 및/또는 c-Met 신호전달 경로의 더 효율적인 억제를 제공하고, 세툭시맙(에르비툭스(Erbitux)®)보다 더 효율적으로 종양 성장을 억제한다.

[0205] EGFR 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 이중특이성 작용제는 EGFR 결합 도메인 및 c-Met 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 다량체성 폴리펩티드에 의해 형성될 수 있다. EGFR 및 c-Met 결합 도메인은 항체의 항원 결합 부위, 항체의 VH/VL 쌍, 또는 다른 유형의 결합 분자, 예컨대 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인, 피브로넥틴 IX형(FN9) 도메인, 또는 이들의 임의의 조합을 기반으로 한 도메인일 수 있다.

[0206] EGFR 및 c-Met 결합 폴리펩티드는 기존의 단일특이성 EGFR 및 c-Met 결합 폴리펩티드로부터 유래될 수 있거나 또는 드 노보(*de novo*) 단리될 수 있다.

[0207] **이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자**

[0208] 본 발명의 일 실시 형태는 제1 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인 및 제2 FN3 도메인을 포함하며, 제1 FN3 도메인은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 표피 성장 인자(EGF)의 결합을 차단하고, 제2 FN3 도메인은 간세포 성장 인자 수용체(c-Met)에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 간세포 성장 인자(HGF)의 결합을 차단하는, 단리된 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자이다.

[0209] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 본 발명의 임의의 EGFR-결합 FN3 도메인과 임의의 c-

Met-결합 FN3 도메인을 직접적으로 또는 링커를 통해 공유결합적으로 연결함으로써 생성될 수 있다. 따라서, 이중특이성 분자의 제1 FN3 도메인은 EGFR-결합 FN3 도메인에 대해 전술된 바와 같은 특성들을 가질 수 있고, 이중특이성 분자의 제2 FN3 도메인은 c-Met-결합 FN3 도메인에 대해 전술된 바와 같은 특성들을 가질 수 있다.

[0210] 일 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 제1 FN3 도메인은, 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 A431 세포에서 측정할 때, 약 2.5×10^{-6} M 미만의 IC_{50} 값으로 EGFR 잔기 티로신 1173에서의 EGF-유도 EGFR 인산화를 억제하고, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 제2 FN3 도메인은, 100 ng/mL의 인간 HGF를 사용하여 NCI-H441 세포에서 측정할 때, 약 1.5×10^{-6} M 미만의 IC_{50} 값으로 c-Met 잔기 티로신 1349에서의 HGF-유도 c-Met 인산화를 억제한다.

[0211] 다른 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 제1 FN3 도메인은, 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 A431 세포에서 측정할 때, 약 1.8×10^{-8} M 내지 약 2.5×10^{-6} M의 IC_{50} 값으로 EGFR 잔기 티로신 1173에서의 EGF-유도 EGFR 인산화를 억제하고, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 제2 FN3 도메인은, 100 ng/mL의 인간 HGF를 사용하여 NCI-H441 세포에서 측정할 때, 약 4×10^{-9} M 내지 약 1.5×10^{-6} M의 IC_{50} 값으로 c-Met 잔기 티로신 1349에서의 HGF-유도 c-Met 인산화를 억제한다.

[0212] 다른 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 제1 FN3 도메인은 약 1×10^{-8} M 미만의 해리 상수(K_D)를 갖고서 인간 EGFR에 결합하고, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 제2 FN3 도메인은 약 5×10^{-8} M 미만의 K_D를 갖고서 인간 c-Met에 결합한다.

[0213] EGFR 및 c-Met 둘 모두에 결합하는 이중특이성 분자에서, 제1 FN3 도메인은 약 2×10^{-10} 내지 약 1×10^{-8} M의 K_D를 갖고서 인간 EGFR에 결합하고, 제2 FN3 도메인은 약 3×10^{-10} 내지 약 5×10^{-8} M의 K_D를 갖고서 인간 c-Met에 결합한다.

[0214] EGFR 및 c-Met에 대한 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 친화도는 단일특이성 분자에 대해 전술된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0215] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 내의 제1 FN3 도메인은, A431 세포를 채용하고 제1 FN3 도메인과 함께 또는 이것 없이 인큐베이팅된 A431 세포 상에서 600 nM에서 스트렙타비딘-피코에리트린 접합체를 사용하여 결합된 비오티닐화 EGF로부터의 형광의 양을 검출하는 검정에서, 약 1×10^{-9} M 내지 약 1.5×10^{-7} M의 IC_{50} 값으로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단할 수 있다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 내의 제1 FN3 도메인은, 동일한 검정 조건을 사용하여 제1 FN3 도메인의 부재 하에서의 EGFR에 대한 EGF의 결합과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단할 수 있다.

[0216] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 내의 제2 FN3 도메인은, 제2 FN3 도메인의 존재 하에서의 c-Met-Fc 융합 단백질에 대한 비오티닐화 HGF의 결합의 억제를 검출하는 검정에서, 약 2×10^{-10} M 내지 약 6×10^{-8} M의 IC_{50} 값으로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다. 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 내의 제2 FN3 도메인은, 동일한 검정 조건을 사용하여 제2 FN3 도메인의 부재 하에서의 c-Met에 대한 HGF의 결합과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다.

[0217] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 부재 하에서의 신호전달의 수준과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 EGFR 및/또는 c-Met 신호전달을 억제할 수 있다.

[0218] EGFR 및 c-Met 신호전달은 단일특이성 분자에 대해 전술된 바와 같은 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0219] EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 FN3 도메인 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 FN3 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는, 제1 FN3 도메인과 제2 FN3 도메인의 혼합물에 의해 관찰된 상승적 억제와 비교할 때, EGFR 및 c-Met 신호전달 및 종양 세포 증식의 유의하게 증가된 상승적 억제를 제공한다. 상승적 억제는, 예를 들어 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자에 의한 그리고 2개의 단일특이성 분자들 - 하나는 EGFR에 결합하고 다른 하나는 c-Met에 결합함 - 의 혼합물에 의한 ERK 인산화의 억제를 측정함으로써 평가될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는, 2개의 단일특이성 FN3 도메인들의 혼합물에 대한 IC_{50} 값과 비교할 때, 적어도 약 100배 더 작은, 예를 들어 적어도 500, 1000, 5000 또는 10,000배 더 작은 IC_{50} 값으로 ERK 인산화를 억제할 수 있는데, 이는 2개의 단일특이성 FN3 도메인들의 혼합물과 비교할 때 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자에 대한 적어도 100배 증가된 효력을 나타낸다. 예시적인 이중특이성 EGFR-c-Met FN3 도메인 함유 분자는 약 5×10^{-9} M 이하의 IC_{50} 값으로 ERK 인산화를 억제할 수 있다. ERK 인산화는 표준 방법 및 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0220] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는, 제1 FN3 도메인과 제2 FN3 도메인의 혼합물에 의한 NCI-H292 세포 성장의 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때 적어도 30배 미만인 IC_{50} 값으로 NCI-H292 세포 증식을 억제할 수 있으며, 여기서 세포 증식은 7.5 ng/mL의 HGF로 보충된 10% FBS를 함유하는 배지를 사용하여 유도된다. 본 발명의 이중특이성 분자는, 제1 FN3 도메인과 제2 FN3 도메인의 혼합물에 의한 종양 세포 증식의 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, 약 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 또는 약 1000배 미만인 IC_{50} 값으로 종양 세포 증식을 억제할 수 있다. 종양 세포 증식의 억제는 표준 방법 및 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0221] 본 발명의 다른 실시 형태는 제1 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인 및 제2 FN3 도메인이며, 제1 FN3 도메인은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 표피 성장 인자(EGF)의 결합을 차단하고, 제2 FN3 도메인은 간세포 성장 인자 수용체(c-Met)에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 간세포 성장 인자(HGF)의 결합을 차단하는, 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자를 제공하며, 여기서

[0222] 제1 FN3 도메인은

[0223] 서열 HNVYKDTNX$_9$RGL (서열 번호 179) 또는 서열 LGSYVFEHDVML(서열 번호 180)(여기서, X$_9$는 M 또는 I임)을 포함하는 FG 루프; 및

[0224] 서열 X$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$(서열 번호 181)(여기서,

[0225] X$_1$은 A, T, G 또는 D이고;

[0226] X$_2$는 A, D, Y 또는 W이고;

[0227] X$_3$은 P, D 또는 N이고;

[0228] X$_4$는 L 또는 부재하고;

[0229] X$_5$는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0230] X$_6$은 G, D 또는 A이고;

[0231] X$_7$은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0232] X$_8$은 Y, F 또는 L임)을 포함하는 BC 루프를 포함하고;

[0233] 제2 FN3 도메인은

[0234] 서열 DSFX$_{10}$IRYX$_{11}$EX$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$(서열 번호 184)(여기서,

[0235] X$_{10}$은 W, F 또는 V이고;

[0236] X$_{11}$은 D, F 또는 L이고;

[0237] X_{12}는 V, F 또는 L이고;

[0238] X_{13}은 V, L 또는 T이고;

[0239] X_{14}는 V, R, G, L, T 또는 S이고;

[0240] X_{15}는 G, S, A, T 또는 K이고;

[0241] X_{16}은 E 또는 D임)을 포함하는 C 가닥 및 CD 루프; 및

[0242] 서열 $TEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}VKGGX_{21}X_{22}SX_{23}$(서열 번호 185)(여기서,

[0243] X_{17}은 Y, W, I, V, G 또는 A이고;

[0244] X_{18}은 N, T, Q 또는 G이고;

[0245] X_{19}는 L, M, N 또는 I이고;

[0246] X_{20}은 G 또는 S이고;

[0247] X_{21}은 S, L, G, Y, T, R, H 또는 K이고;

[0248] X_{22}는 I, V 또는 L이고;

[0249] X_{23}은 V, T, H, I, P, Y 또는 L임)을 포함하는 F 가닥 및 FG 루프를 포함한다.

[0250] 다른 실시 형태에서, 이중특이성 분자는 서열:

[0251] $LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8DSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX_9RGLPLSAEFTT$ (서열 번호 182), 또는 서열

[0252] $LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8DSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT$ (서열 번호 183)를 포함하는, EGFR에 결합하는 제1 FN3 도메인을 포함하며,

[0253] 여기서 서열 번호 182 및 183에서,

[0254] X_1은 A, T, G 또는 D이고;

[0255] X_2는 A, D, Y 또는 W이고;

[0256] X_3은 P, D 또는 N이고;

[0257] X_4는 L 또는 부재하고;

[0258] X_5는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0259] X_6은 G, D 또는 A이고;

[0260] X_7은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0261] X_8은 Y, F 또는 L이고;

[0262] X_9는 M 또는 I이다.

[0263] 다른 실시 형태에서, 이중특이성 분자는 서열

[0264] $LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX_{10}IRYX_{11}EX_{12}X_{13}X_{14}X_{15}GX_{16}AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX_{17}VX_{18}IX_{19}X_{20}VKGGX_{21}X_{22}SX_{23}PLS$ AEFTT(서열 번호 186)를 포함하는, c-Met에 결합하는 제2 FN3 도메인을 포함하며,

[0265] 여기서,

[0266] X_{10}은 W, F 또는 V이고;

[0267] X_{11}은 D, F 또는 L이고;

[0268] X_{12}는 V, F 또는 L이고;

[0269] X_{13}은 V, L 또는 T이고;

[0270] X_{14}는 V, R, G, L, T 또는 S이고;

[0271] X_{15}는 G, S, A, T 또는 K이고;

[0272] X_{16}은 E 또는 D이고;

[0273] X_{17}은 Y, W, I, V, G 또는 A이고;

[0274] X_{18}은 N, T, Q 또는 G이고;

[0275] X_{19}는 L, M, N 또는 I이고;

[0276] X_{20}은 G 또는 S이고;

[0277] X_{21}은 S, L, G, Y, T, R, H 또는 K이고;

[0278] X_{22}는 I, V 또는 L이고;

[0279] X_{23}은 V, T, H, I, P, Y, T또는 L이다.

[0280] 예시적인 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 서열 번호 50-72, 106, 118-121, 또는 138-167에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다.

[0281] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 그의 기능적 특성, 예컨대 EGFR 자가인산화의 억제와 관련된 소정의 구조적 특성, 예컨대 서열 HNVYKDTNX$_9$RGL(서열 번호 179) 또는 서열 LGSYVFEHDVML(서열 번호 180)(여기서, X_9는 M 또는 I임)을 포함하는, EGFR에 결합하는 제1 FN3 도메인의 FG 루프를 포함한다.

[0282] 일 실시 형태에서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는

[0283] 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 H292 세포에서 측정할 때, 약 8×10^{-7} M 미만의 IC_{50} 값으로 EGFR 잔기 티로신 1173에서의 EGF-유도 EGFR 인산화를 억제하거나;

[0284] 100 ng/mL의 인간 HGF를 사용하여 NCI-H441 세포에서 측정할 때, 약 8.4×10^{-7} M 미만의 IC_{50} 값으로 c-Met 잔기 티로신 1349에서의 HGF-유도 c-Met 인산화를 억제하거나;

[0285] 약 9.5×10^{-6} M 미만의 IC_{50} 값으로 HGF-유도 NCI-H292 세포 증식을 억제하며, 여기서 세포 증식은 7.5 ng의 HGF를 함유하는 10% FBS를 사용하여 유도되거나;

[0286] 약 2.0×10^{-8} M 미만의 K_D를 갖고서 EGFR에 결합하거나; 또는

[0287] 약 2.0×10^{-8} M 미만의 K_D를 갖고서 c-Met에 결합한다.

[0288] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는

[0289] 50 ng/mL의 인간 EGF를 사용하여 H292 세포에서 측정할 때, 약 4.2×10^{-9} M 내지 8×10^{-7} M의 IC_{50}으로 EGFR 잔기 티로신 1173에서의 EGF-유도 EGFR 인산화를 억제하거나;

[0290] 100 ng/mL의 인간 HGF를 사용하여 NCI-H441 세포에서 측정할 때, 약 2.4×10^{-8} M 내지 약 8.4×10^{-7} M의 IC_{50} 값

으로 c-Met 잔기 티로신 1349에서의 HGF-유도 c-Met 인산화를 억제하거나;

[0291] 약 2.3×10^{-8} M 내지 약 9.5×10^{-6}M의 IC_{50} 값으로 HGF-유도 NCI-H292 세포 증식을 억제하며, 여기서 세포 증식은 7.5 ng의 HGF를 함유하는 10% FBS를 사용하여 유도되거나;

[0292] 약 2×10^{-10} M 내지 약 2.0×10^{-8} M의 K_D를 갖고서 EGFR에 결합하거나; 또는

[0293] 약 1×10^{-9} M 내지 약 2.0×10^{-8} M의 K_D를 갖고서 c-Met에 결합한다.

[0294] 일 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 서열

[0295] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX$_9$RGLPLSAEFTT (서열 번호 182)(여기서,

[0296] X$_1$은 D이고;

[0297] X$_2$는 D이고;

[0298] X$_3$은 P이고;

[0299] X$_4$는 부재하고;

[0300] X$_5$는 H 또는 W이고;

[0301] X$_6$은 A이고;

[0302] X$_7$은 F이고;

[0303] X$_8$은 Y이고;

[0304] X$_9$는 M 또는 I임)를 포함하는 EGFR-결합 FN3 도메인; 및

[0305] 서열

[0306] LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX$_{10}$IRYX$_{11}$EX$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYX$_{17}$VX$_{18}$IX$_{19}$X$_{20}$VKGGX$_{21}$X$_{22}$SX$_{23}$PLSAEFTT(서열 번호 186)

[0307] (여기서,

[0308] X$_{10}$은 W이고;

[0309] X$_{11}$은 F이고;

[0310] X$_{12}$는 F이고;

[0311] X$_{13}$은 V 또는 L이고;

[0312] X$_{14}$는 G 또는 S이고;

[0313] X$_{15}$는 S 또는 K이고;

[0314] X$_{16}$은 E 또는 D이고;

[0315] X$_{17}$은 V이고;

[0316] X$_{18}$은 N이고;

[0317] X$_{19}$는 L 또는 M이고;

[0318] X_{20}은 G 또는 S이고;

[0319] X_{21}은 S 또는 K이고;

[0320] X_{22}는 I이고;

[0321] X_{23}은 P임)를 포함하는 c-Met-결합 FN3 도메인을 포함한다.

[0322] 예시적인 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 서열 번호 57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 및 68에 나타낸 서열을 갖는 것들이다.

[0323] 본 발명의 이중특이성 분자는, 전술된 바와 같은 텐콘(서열 번호 1) 내의 위치 11, 14, 17, 37, 46, 73 및 86에 상응하는 제1 FN3 도메인 및/또는 제2 FN3 도메인 내의 하나 이상의 잔기 위치에서의 치환, 및 위치 29에서의 치환을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 치환은 치환 E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y, E86I 및 D29E(서열 번호 1에 따른 넘버링)이다. 당업자는 다른 아미노산들이 치환에 사용될 수 있음을 이해할 것이며, 이는 예컨대 하기에 기재된 바와 같은 측쇄에 관련된 아미노산 패밀리에 속하는 아미노산이다. 생성된 변이체는 본 명세서에 있는 방법을 사용하여 그의 안정성 및 EGFR 및/또는 c-Met에 대한 그의 결합에 대해 시험될 수 있다.

[0324] 일 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 FN3 도메인 및 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 FN3 도메인을 포함하며, 여기서 제1 FN3 도메인은 서열:

[0325] LPAPKNLVVSX$_{24}$VTX$_{25}$DSX$_{26}$RLSWDDPX$_{27}$AFYX$_{28}$SFLIQYQX$_{29}$SEKVGEAIX$_{30}$LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX$_{31}$VHNVYKDTNX$_{32}$RGLPLSAX$_{33}$FTT(서열 번호 187)(여기서,

[0326] X_{24}는 E, N 또는 R이고;

[0327] X_{25}는 E 또는 P이고;

[0328] X_{26}은 L 또는 A이고;

[0329] X_{27}은 H 또는 W이고;

[0330] X_{28}은 E 또는 D이고;

[0331] X_{29}는 E 또는 P이고;

[0332] X_{30}은 N 또는 V이고;

[0333] X_{31}은 G 또는 Y이고;

[0334] X_{32}는 M 또는 I이고;

[0335] X_{33}은 E 또는 I임)를 포함하고;

[0336] 제2 FN3 도메인은 서열:

[0337] LPAPKNLVVSX$_{34}$VTX$_{35}$DSX$_{36}$RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX$_{37}$FX$_{38}$X$_{39}$X$_{40}$GX$_{41}$AIX$_{42}$LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX$_{43}$X$_{44}$VKGGX$_{45}$ISPPLSAX$_{46}$FTT(서열 번호 188)(여기서,

[0338] X_{34}는 E, N 또는 R이고;

[0339] X_{35}는 E 또는 P이고;

[0340] X_{36}은 L 또는 A이고;

[0341] X_{37}은 E 또는 P이고;

[0342] X_{38}은 V 또는 L이고;

[0343] X_{39}는 G 또는 S이고;

[0344] X_{40}은 S 또는 K이고;

[0345] X_{41}은 E 또는 D이고;

[0346] X_{42}는 N 또는 V이고;

[0347] X_{43}은 L 또는 M이고;

[0348] X_{44}는 G 또는 S이고;

[0349] X_{45}는 S 또는 K이고;

[0350] X_{46}은 E 또는 I임)를 포함한다.

[0351] 다른 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 서열 번호 27의 아미노산 서열과 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제1 FN3 도메인, 및 서열 번호 41의 아미노산 서열과 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제2 FN3 도메인을 포함한다.

[0352] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 종양 축적률을 최대화하기 위해 EGFR 및 c-Met에 대한 특이적 친화도에 맞추어질 수 있다.

[0353] 본 발명의 다른 실시 형태는 제1 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인 및 제2 FN3 도메인이며, 제1 FN3 도메인은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 표피 성장 인자(EGF)의 결합을 차단하고, 제2 FN3 도메인은 간세포 성장 인자 수용체(c-Met)에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 간세포 성장 인자(HGF)의 결합을 차단하며, 여기서 제1 FN3 도메인 및 제2 FN3 도메인은 서열 번호 1의 텐콘 서열에 기초하여 설계된 라이브러리로부터 단리되는, 단리된 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자를 제공한다.

[0354] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 잘 알려진 방법을 사용하여 본 발명의 EGFR-결합 FN3 도메인과 c-Met 결합 FN3 도메인을 공유결합적으로 커플링함으로써 생성될 수 있다. 이들 FN3 도메인은 링커, 예를 들어 폴리-글리신, 글리신 및 세린, 또는 알라닌 및 프롤린을 함유하는 링커를 통해 연결될 수 있다. 예시적인 링커는 $(GS)_2$(서열 번호 78), $(GGGGS)_5$(서열 번호 79), $(AP)_2$(서열 번호 80), $(AP)_5$ (서열 번호 81), $(AP)_{10}$(서열 번호 82), $(AP)_{20}$(서열 번호 83), $A(EAAAK)_5AAA$(서열 번호 84) 링커를 포함한다. 폴리펩티드를 신규의 연결된 융합 폴리펩티드 내로 연결하기 위하여 천연 발생 펩티드 링커뿐만 아니라 인공 펩티드 링커를 사용하는 것에 대해서도 문헌에 잘 알려져 있다(문헌[Hallewell *et al., J Biol Chem* 264, 5260-5268, 1989]; 문헌[Alfthan *et al., Protein Eng.* 8, 725-731, 1995]; 문헌[Robinson & Sauer, *Biochemistry* 35, 109-116, 1996]; 미국 특허 제5,856,456호). 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 제1 FN3 도메인의 C-말단으로부터 제2 FN3 도메인의 N-말단으로, 또는 제2 FN3 도메인의 C-말단으로부터 제1 FN3 도메인의 N-말단으로 함께 연결될 수 있다. 임의의 EGFR-결합 FN3 도메인은 c-Met-결합 FN3 도메인에 공유결합적으로 연결될 수 있다. 예시적인 EGFR-결합 FN3 도메인은 서열 번호 18-29, 107-110, 및 122-137에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 도메인이고, 예시적인 c-Met 결합 FN3 도메인은 서열 번호 32-49 및 111-114에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 도메인이다. 이중특이성 분자에 커플링하고자 하는 EGFR-결합 FN3 도메인은 그의 N-말단에서 개시자 메티오닌(Met)을 추가로 포함할 수 있다.

[0355] 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 변이체가 본 발명의 범주 내에 있다. 예를 들어, 생성된 변이체가 부모 분자와 비교할 때 EGFR 및 c-Met에 대한 유사한 선택성 및 효력을 유지하는 한, 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자에서 치환이 이루어질 수 있다. 예시적인 변형은, 예를 들어, 부모 분자의 특성과 유사한 특성을 갖는 변이체를 생성하게 될 보존적 치환이다. 보존적 치환은 측쇄에서 관련된 아미노산 패밀리 내에서 일어나는 것들이다. 유전적으로 암호화된 아미노산은 하기 4개의 패밀리로 나눌 수 있다: (1) 산성(아스파르테이트, 글루타메이트); (2) 염기성(라이신, 아르기닌, 히스티딘); (3) 비극성(알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판); 및 (4) 비하전 극성(글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신). 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 때때로 방향족 아미노산으로 공동으로 분류된다. 대안적으로, 아미노산 레퍼토리(repertoire)는 하기로 그룹화될 수 있다: (1) 산성(아스파르테이

트, 글루타메이트); (2) 염기성(라이신, 아르기닌, 히스티딘), (3) 지방족(글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 세린, 트레오닌) - 이때, 세린 및 트레오닌은 별도로 지방족-하이드록실로서 선택적으로 분류함 -; (4) 방향족(페닐알라닌, 티로신, 트립토판); (5) 아미드(아스파라긴, 글루타민); 및 (6) 황-함유(시스테인 및 메티오닌)(문헌[Stryer (ed.), Biochemistry, 2nd ed, WH Freeman and Co., 1981]). 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자에 대해 비보존적 치환이 이루어질 수 있는데, 비보존적 치환은 이중특이성 분자의 특성을 개선하기 위하여 상이한 아미노산 부류들 사이에서의 아미노산 잔기의 치환을 포함한다. 폴리펩티드 또는 그의 단편의 아미노산 서열의 변화가 기능적 상동체를 생성하는지는 본 명세서에 기재된 검정을 사용하여 변형 폴리펩티드 또는 단편이 비변형 폴리펩티드 또는 단편과 유사한 방식으로 반응을 생성하는 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 하나 초과의 대체가 일어난 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질은 동일한 방식으로 용이하게 시험될 수 있다.

[0356] 예를 들어 결합가를 증가시킴으로써 표적 분자 결합의 결합력을 증가시키기 위한 수단으로서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자를 이량체 또는 다량체로서 생성할 수 있다. 다량체는, 예를 들어 잘 알려진 방법을 사용하여 아미노산 링커의 포함에 의해, 하나 이상의 EGFR-결합 FN3 도메인과 하나 이상의 c-Met-결합 FN3 도메인을 연결하여, 적어도 3개의 개별 FN3 도메인을 포함하고 EGFR 또는 c-Met에 대해 적어도 이중특이성인 분자를 형성함으로써 생성될 수 있다.

[0357] 본 발명의 다른 실시 형태는 제1 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인 및 제2 FN3 도메인이며, 제1 FN3 도메인은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 표피 성장 인자(EGF)의 결합을 차단하고, 제2 FN3 도메인은 간세포 성장 인자 수용체(c-Met)에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 간세포 성장 인자(HGF)의 결합을 차단하며, 서열 번호 50-72,106 또는 138-165에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는, 이중특이성 FN3 도메인 함유 분자를 제공한다.

[0358] **반감기 연장 모이어티(half-life extending moiety)**

[0359] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자 또는 단일특이성 EGFR 또는 c-Met 결합 FN3 도메인은, 예를 들어 공유결합성 상호작용을 통해 다른 하위단위들을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 태양에서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 반감기 연장 모이어티를 추가로 포함한다. 예시적인 반감기 연장 모이어티는 알부민, 알부민 변이체, 알부민-결합 단백질 및/또는 도메인, 트랜스페린 및 그의 단편 및 유사체, 및 Fc 영역이다. 예시적인 알부민-결합 도메인은 서열 번호 117에 나타나 있다.

[0360] 항체 불변 영역의 전부 또는 일부를 본 발명의 분자에 부착하여 항체-유사 특성, 특히 Fc 영역과 관련된 특성, 예컨대 Fc 효과기 기능, 예컨대 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 식작용, 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절을 부여할 수 있으며, 이들 활성을 담당하는 Fc 내의 잔기를 변형시킴으로써 추가로 변형시킬 수 있다(검토를 위해서는 문헌[Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* 20, 685-691, 2009] 참조).

[0361] 원하는 특성을 위해 추가 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자, 예컨대 PEG5000 또는 PEG20,000, 상이한 쇄 길이의 지방산 및 지방산 에스테르, 예를 들어 라우레이트, 미리스테이트, 스테아레이트, 아라키데이트, 베헤네이트, 올레에이트, 아라키도네이트, 옥탄이산, 테트라데칸이산, 옥타데칸이산, 도코산이산 등, 폴리라이신, 옥탄, 탄수화물(덱스트란, 셀룰로스, 올리고당 또는 다당)을 본 발명의 이중특이성 분자 내로 도입시킬 수 있다. 이들 모이어티는 단백질 스캐폴드 암호화 서열과의 직접 융합일 수 있으며, 표준 클로닝 및 발현 기법에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 잘 알려진 화학적 커플링 방법을 사용하여 본 발명의 재조합적으로 생성된 분자에 이러한 모이어티를 부착할 수 있다.

[0362] 예를 들어, 시스테인 잔기를 분자의 C-말단에 도입시키고 잘 알려진 방법을 사용하여 페길 기를 시스테인에 부착함으로써, 페길 모이어티를 본 발명의 이중특이성 또는 단일특이성 분자에 부가할 수 있다. C-말단 시스테인을 갖는 예시적인 이중특이성 분자는 서열 번호 170-178에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 것들이다.

[0363] 추가 모이어티를 도입시킨 본 발명의 단일특이성 및 이중특이성 분자는 몇몇 잘 알려진 검정에 의해 기능성에 대해 비교될 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인 및/또는 Fc 도메인 변이체의 도입으로 인해 변경된 단일특이성 및/또는 이중특이성 분자의 특성은, Fc 수용체 결합 검정에서, 가용성 형태의 수용체, 예컨대 FcγRI, FcγRII, FcγRIII 또는 FcRn 수용체를 사용하여, 또는, 예를 들어 ADCC 또는 CDC를 측정하거나 또는 생체내 모델에서 본 발명의 분자의 약동학적 특성을 평가하는 잘 알려진 세포-기반 검정을 사용하여 검정될 수 있다.

[0364] **폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포**

[0365] 본 발명은 단리된 폴리뉴클레오티드로서 또는 발현 벡터의 일부분으로서 또는 선형 DNA 서열의 일부분으로서 본 발명의 EGFR-결합 또는 c-Met-결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자를 암호화하는 핵산을 제공하며, 이때 선형 DNA 서열은 시험관내 전사/번역에 사용되는 선형 DNA 서열, 즉 그러한 조성 또는 그의 유도 돌연변이원의 원핵생물성, 진핵생물성 또는 사상(filamentous) 파지 발현, 분비 및/또는 디스플레이에 적합한 벡터를 포함한다. 소정의 예시적인 폴리뉴클레오티드가 본 명세서에 개시되지만, 주어진 발현 시스템에서의 유전 코드 또는 코돈 선호도의 축퇴를 고려했을 때, 본 발명의 EGFR-결합 또는 c-Met-결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자를 암호화하는 다른 폴리뉴클레오티드들이 또한 본 발명의 범주 내에 있다.

[0366] 본 발명의 일 실시 형태는 서열 번호 18-29, 107-110, 또는 122-137의 아미노산 서열을 갖는, EGFR에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0367] 본 발명의 일 실시 형태는 서열 번호 97-98 또는 168-169의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0368] 본 발명의 일 실시 형태는 서열 번호 32-49 또는 111-114에 나타낸 서열의 아미노산 서열을 갖는, c-Met에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0369] 본 발명의 일 실시 형태는 서열 번호 50-72, 106, 118-121 또는 138-165의 아미노산 서열을 갖는 이중특이성 EGFR/-c-Met FN3 도메인 함유 분자를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0370] 본 발명의 일 실시 형태는 서열 번호 115-116 또는 166-167의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0371] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 자동화 폴리뉴클레오티드 합성기 상에서 고상(solid phase) 폴리뉴클레오티드 합성과 같은 화학적 합성에 의해 제조되고 완전한 단일 또는 이중 가닥 분자로 조립될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR 후의 일상적인 클로닝과 같은 다른 기법에 의해 생성될 수 있다. 주어진 알려진 서열의 폴리뉴클레오티드를 생성하거나 얻는 기법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0372] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 비암호화 서열, 예컨대 프로모터 또는 인핸서 서열, 인트론, 폴리아데닐화 신호, RepA 결합을 촉진시키는 *cis* 서열 등을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열은 또한, 예를 들어, 마커 또는 태그 서열, 예컨대 단백질의 정제 또는 검출을 용이하게 하기 위한 히스티딘 태그 또는 HA 태그, 신호 서열, 융합 단백질 파트너, 예컨대 RepA, Fc 또는 박테리오파지 외피 단백질, 예컨대 pIX 또는 pIII을 암호화하는 추가 아미노산을 암호화하는 추가 서열을 포함할 수 있다.

[0373] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터이다. 그러한 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 배큘로바이러스(baculovirus) 발현용 벡터, 트랜스포손(transposon) 기반 벡터, 또는 임의의 수단에 의해 주어진 유기체 또는 유전적 백그라운드(genetic background) 내로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입시키기에 적합한 임의의 다른 벡터일 수 있다. 그러한 벡터는 그러한 벡터에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 발현을 제어하거나, 조절하거나, 야기하거나, 허용할 수 있는 핵산 서열 요소를 포함하는 발현 벡터일 수 있다. 그러한 요소는 전사 인핸서 결합 부위, RNA 폴리머라제 개시 부위, 리보솜 결합 부위, 및 주어진 발현 시스템에서 암호화된 폴리펩티드의 발현을 용이하게 하는 기타 부위를 포함할 수 있다. 그러한 발현 시스템은 당업계에 잘 알려진 세포 기반 시스템 또는 무세포 시스템일 수 있다.

[0374] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포이다. 본 발명의 단일특이성 EGFR-결합 또는 c-Met-결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는, 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 선택적으로 세포주, 혼합 세포주, 불멸화 세포 또는 불멸화 세포들의 클론 집단에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, *et al.,* ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001)]; 문헌[Sambrook, *et al.,* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Colligan, *et al.,* eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan *et al.,* Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)]을 참조한다.

[0375] 발현용으로 선택된 숙주 세포는 포유류 기원의 것일 수 있거나, 또는 COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-

1, He G2, SP2/0, HeLa, 골수종, 림프종, 효모, 곤충 또는 식물 세포, 또는 이들의 임의의 유도체, 불멸화 또는 형질전환 세포로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포는, 폴리펩티드를 글리코실화할 수 없는 종 또는 유기체, 예를 들어 원핵 세포 또는 유기체, 예컨대 BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), 및 천연 또는 조작된 E. 콜리 종(*E. coli spp.*), 클렙시엘라 종(*Klebsiella spp.*), 또는 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*) 균주 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있다.

[0376] 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 단리된 FN3 도메인, 또는 본 발명의 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자를 생성하는 방법으로서, 본 방법은 EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 단리된 FN3 도메인 또는 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자가 발현되도록 하는 조건 하에서 본 발명의 단리된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 도메인 또는 분자를 정제하는 단계를 포함한다.

[0377] 본 발명의 EGFR 또는 c-Met에 특이적으로 결합하는 FN3 도메인 또는 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자는 잘 알려진 방법에 의해, 예를 들어 단백질 A 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피, 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 재조합 세포 배양물로부터 정제될 수 있다.

[0378] **이중특이성 EGFR/c-Met 항체**

[0379] 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 드 노보 생성될 수 있거나 또는 기존의 단일특이성 항-EGFR 및 항-c-Met 항체로부터 조작될 수 있다.

[0380] 이중특이성 분자를 조작하는 데 사용될 수 있는 예시적인 항-EGFR 항체는, 예를 들어 파니투무맙(ABX-EGF), 니모투주맙, 네시투무맙, 마투주맙, 및 예를 들어 미국 특허 US7,595,378호, 미국 특허 US7,247,301호, 미국 특허 출원 공개 US2011/0256142호, 미국 특허 US5,891,996호, 미국 특허 US5,212,290호, 미국 특허 US5,558,864호, 또는 미국 특허 US7,589,180호에 기재된 것들이다. 예를 들어, 서열 번호 189 또는 191에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 항체 VH 도메인 및 서열 번호 190 또는 192에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 항체 VL 도메인이 사용될 수 있다.

[0381] 이중특이성 분자를 조작하는 데 사용될 수 있는 예시적인 항-c-Met 항체는, 예를 들어 릴로투무맙, 오나르투주맙, 피클라투주맙, 및 예를 들어 PCT 국제 공개 WO2011/110642호, 미국 특허 출원 공개 US2004/0166544호, PCT 국제 공개 WO2005/016382호, 또는 PCT 국제 공개 WO2006/015371호에 기재된 것들이다. 예를 들어, 서열 번호 193 또는 195에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 항체 VH 도메인 및 서열 번호 194 또는 196에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 항체 VL 도메인이 사용될 수 있다. 미국 일반명(United States Adopted Names, USAN)으로 식별되는 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은, http://_www_ama-assn_org에서 미국 의료 협회(American Medical Association)를 통해, 또는 CAS 레지스트리를 통해 입수가능하다.

[0382] 단일특이성 EGFR 및 c-Met 결합 가변 도메인은, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리로부터 드 노보 선택될 수 있으며, 여기서 파지는 인간 면역글로불린 또는 그의 부분들, 예컨대 Fab, 단일쇄 항체(scFv), 또는 쌍을 이루지 않거나 쌍을 이룬 항체 가변 영역들(문헌[Knappik *et al.*, J Mol Biol 296:57-86, 2000]; 문헌[Krebs *et al.*, J Immunol Meth 254:67-84, 2001]; 문헌[Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 14:309-314, 1996]; 문헌[Sheets *et al.*, PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998]; 문헌[Hoogenboom and Winter, J Mol Biol 227:381, 1991]; 문헌[Marks *et al.*, J Mol Biol 222:581, 1991])을 발현시키도록 조작되고, 이어서 이중특이성 포맷으로 조작된다. 단일특이성 EGFR 및 c-Met 결합 가변 도메인은, 예를 들어 문헌[Shi *et al* (2010) *J. Mol. Biol.* 397:385-96] 및 PCT 국제 공개 WO09/085462호에 기재된 바와 같이 박테리오파지 pIX 외피 단백질과의 융합 단백질로서 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 항체 라이브러리는 인간 EGFR 또는 c-Met 세포외 도메인에 대한 결합에 대해 스크리닝되고, 얻어진 양성 클론은 추가로 특성화되고 클론 용해물로부터 Fab가 단리된다. 인간 항체를 단리하기 위한 그러한 파지 디스플레이 방법은 당업계에 확립되어 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,223,409호; 미국 특허 제5,403,484호; 및 미국 특허 제5,571,698호, 미국 특허 제5,427,908호, 미국 특허 제5,580,717호, 미국 특허 제5,969,108호, 미국 특허 제6,172,197호, 미국 특허 제5,885,793호; 미국 특허 제6,521,404호; 미국 특허 제6,544,731호; 미국 특허 제6,555,313호; 미국 특허 제6,582,915호 및 미국 특허 제6,593,081호를 참조한다. EGFR 또는 c-Met에 결합하는, 얻어진 드 노보 가변 영역은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 이중특이성 포맷으로 조작된다.

[0383] **이중특이성 항체 포맷**

[0384] 본 발명의 항체는 2개 이상의 항원 결합 부위를 가지며, 이중특이성이다. 본 발명의 이중특이성 항체는 전 길이 항체 구조를 갖는 항체를 포함한다.

[0385] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "전 길이 항체"는 2개의 전 길이 항체 중쇄 및 2개의 전 길이 항체 경쇄를 갖는 항체를 지칭한다. 전 길이 항체 중쇄(HC)는 잘 알려진 중쇄 가변 및 불변 도메인 VH, CH1, CH2, 및 CH3으로 이루어진다. 전 길이 항체 경쇄(LC)는 잘 알려진 경쇄 가변 및 불변 도메인 VL 및 CL로 이루어진다. 전 길이 항체는 어느 하나 또는 둘 모두의 중쇄에 C-말단 라이신(K)이 결여되어 있을 수 있다.

[0386] 용어 "Fab-아암(Fab-arm)" 또는 "하프 분자(half molecule)"는 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 중쇄-경쇄 쌍을 지칭한다.

[0387] 본 발명의 전 길이 이중특이성 항체는, 예를 들어 2개의 단일특이성 2가 항체들 사이에서의 Fab 아암 교환(또는 하프 분자 교환)을 사용하여 생성될 수 있는데, 이는 공발현을 사용하는, 또는 무세포 환경에서의 시험관내에서의, 별개의 특이성을 갖는 2개의 항체 하프 분자의 헤테로이량체 형성을 유리하게 하기 위하여, 각각의 하프 분자 내의 중쇄 CH3 계면에 치환을 도입함으로써 행해진다. Fab 아암 교환 반응은 이황화물-결합 이성화 반응 및 CH3 도메인의 해리-회합의 결과이다. 부모 단일특이성 항체의 힌지 영역 내의 중쇄 이황화물 결합은 환원된다. 부모 단일특이성 항체들 중 하나의, 생성된 유리 시스테인은, 제2 부모 단일특이성 항체 분자의 시스테인 잔기와 중쇄간 이황화물 결합을 형성하고, 동시에 부모 항체의 CH3 도메인이 해리-회합에 의해 방출 및 재형성된다. Fab 아암의 CH3 도메인은 호모이량화에 비하여 헤테로이량화에 유리하도록 조작될 수 있다. 생성된 산물은, 각각이 별개의 에피토프, 즉 EGFR 상의 에피토프 및 c-Met 상의 에피토프에 결합되는 2개의 Fab 아암 또는 하프 분자를 갖는 이중특이성 항체이다.

[0388] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "호모이량화"는 동일한 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄의 상호작용을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "호모이량체"는 동일한 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0389] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "헤테로이량화"는 동일하지 않은 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄의 상호작용을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "헤테로이량체"는 동일하지 않은 CH3 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0390] "노브-인-홀(knob-in-hole)" 전략(예를 들어 PCT 국제 공개 WO 2006/028936호 참조)이 전 길이 이중특이성 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 간략하게 말해서, 인간 IgG 내의 CH3 도메인의 계면을 형성하는 선택된 아미노산이 CH3 도메인 상호작용에 영향을 주는 위치에서 돌연변이되어 헤테로이량체 형성을 촉진할 수 있다. 작은 측쇄(홀)를 갖는 아미노산이 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 내로 도입되고, 큰 측쇄(노브)를 갖는 아미노산이 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 내로 도입된다. 2개의 항체의 공발현 후에, "홀"을 갖는 중쇄와 "노브"를 갖는 중쇄의 우선적인 상호작용의 결과로서 헤테로이량체가 형성된다. 노브와 홀을 형성하는 예시적인 CH3 치환 쌍은 다음과 같다(제1 중쇄의 제1 CH3 도메인 내의 변형된 위치/제2 중쇄의 제2 CH3 도메인 내의 변형된 위치로서 표현됨): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S 및 T366W/T366S_L368A_Y407V.

[0391] 하나의 CH3 표면에서 양으로 하전된 잔기를, 그리고 또 하나의 CH3 표면에서 음으로 하전된 잔기를 치환함으로써 정전기 상호작용을 사용하여 중쇄 헤테로이량화를 촉진하는 것과 같은 다른 전략이 사용될 수 있는데, 이는 미국 특허 출원 공개 US2010/0015133호; 미국 특허 출원 공개 US2009/0182127호; 미국 특허 출원 공개 US2010/028637호 또는 미국 특허 출원 공개 US2011/0123532호에 기재된 바와 같다. 다른 전략에서는, 미국 특허 출원 공개 US2012/0149876호 또는 미국 특허 출원 공개 US2013/0195849호에 기재된 바와 같은 하기의 치환(제1 중쇄의 제1 CH3 도메인 내의 변형된 위치/제2 중쇄의 제2 CH3 도메인 내의 변형된 위치로서 표현됨)에 의해 헤테로이량화가 촉진될 수 있다: 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, 또는 T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W.

[0392] 전술된 방법에 더하여, 본 발명의 이중특이성 항체는, 2개의 단일특이성 호모이량체성 항체의 CH3 영역 내에 비대칭 돌연변이를 도입시키고, 이황화물 결합 이성화를 가능하게 하는 환원성 조건에서 2개의 부모 단일특이성 호모이량체성 항체로부터 이중특이성 헤테로이량체성 항체를 형성함으로써 무세포 환경에서 시험관내에서 생성될 수 있는데, 이는 국제 특허 출원 공개 WO2011/131746호에 기재된 방법에 따른 것이다. 이들 방법에서, 제1

단일특이성 2가 항체(예를 들어, 항-c-Met 항체) 및 제2 단일특이성 2가 항체(예를 들어, 항-EGFR 항체)는 CH3 도메인에서 헤테로이량체 안정성을 촉진하는 소정의 치환을 갖도록 조작되며; 이들 항체는 힌지 영역 내의 시스테인이 이황화물 결합 이성화를 거칠 수 있게 하기에 충분한 환원성 조건 하에서 함께 인큐베이팅되고; 그럼으로써 Fab 아암 교환에 의해 이중특이성 항체를 생성한다. 인큐베이션 조건은 비환원성 상태로 최적으로 회복될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 환원제는 2-메르캅토에틸아민(2-MEA), 다이티오트레이톨(DTT), 다이티오에리트리톨(DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토에탄올이며, 바람직하게는 환원제는 2-메르캅토에틸아민, 다이티오트레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, pH 5 내지 8에서, 예를 들어 pH 7.0에서 또는 pH 7.4에서 적어도 25 mM 2-MEA의 존재 하에서 또는 적어도 0.5 mM 다이티오트레이톨의 존재 하에서 20℃ 이상의 온도에서 90분 이상 동안의 인큐베이션이 사용될 수 있다.

[0393] **이중특이성 EGFR/c-Met 항체**

[0394] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 소분자 EGFR 및/또는 c-Met 억제제와 비교할 때 특이성 및 감소된 탈표적 독성의 측면에서 이득을 제공할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체가, EGFR-결합 단일특이성 항체와 c-Met-결합 단일특이성 항체의 혼합물 또는 공개된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 비교할 때, 유의하게 개선된 상승적 억제 효과를 제공한다는 의외의 발견에 적어도 부분적으로 기초한다. 검정에 따라, 관찰된 상승적 효과는 약 14배 내지 약 800배를 초과하여 변동되었다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 EGFR 및 c-Met 신호전달 경로의 더 효율적인 억제를 제공하고, 세툭시맙(에르비툭스®)보다 더 효율적으로 종양 성장을 억제한다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 EGFR 활성화 돌연변이 및/또는 티로신 키나제 억제제, 예컨대 게피티닙에 의한 치료에 대해 내성을 가져오는 것으로 알려진 EGFR에서의 돌연변이를 갖는 종양 및/또는 종양 세포주에서의 EGFR 신호전달을 억제하고, 암, 예컨대 NSCLC에서 EGFR 티로신 키나제 억제제에 의한 치료시에 상향조절되고 상보적 신호전달을 제공하는 것으로 확인된 경로인 c-Met 신호전달 경로를 억제한다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, EGFR 및 c-Met 신호전달을 직접 억제하는 것에 더하여, 향상된 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC), 그리고 EGFR 및 c-Met 수용체의 분해를 통해 항종양 활성을 나타낸다. 현재의 EGFR 요법(세툭시맙 및 파니투무맙)과 대조적으로, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 향상된 ADCC를 통해 KRAS 돌연변이를 갖는 종양 세포의 사멸을 유도한다.

[0395] 국제 특허 공개 WO2010/115551호는, 현재 III상 시험에 있는, 세툭시맙의 EGFR 결합 VH/VL 쌍, 및 항체 5D5(메트맙(MetMab), 오나르투주맙)의 c-Met 결합 VH/VL 쌍을 사용하여 IgG-scFv 포맷에서 조작된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체(BSAB01)를 기재한다. BSAB01은 부모 항체들과 비교할 때 A431 세포 증식(WO2010/115551호에서 실시예 7, 도 8b)의 대략 2배(부가적)로 증가된 억제율을 입증하고, 2개의 부모 항체들의 병용과 비교할 때 Ovarc-8 세포 증식(WO2010/115551호에서 도 10a, 실시예 16)의 미약한 부가적 억제를 입증한다(15% 대 10% 억제율). 따라서, 의외로 그리고 예기치 않게, 본 발명은 EGFR 및 c-Met 신호전달, 암 세포 생존 및 종양 성장의 억제에서 유의한 상승적 효과를 입증하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공한다. 어떠한 이론에 의해서도 구애되고자 함이 없이, 본 발명의 이중특이성 항체의 유의한 상승적 효과는 EGFR 결합 아암 및 c-Met 결합 아암 둘 모두의 에피토프 특이성으로부터 적어도 부분적으로 기인되며, 그 결과 가능하게는 EGFR 및 c-Met 호모이량체뿐만 아니라 EGFR/HERx 헤테로이량체를 통한 신호전달의 억제를 가져오는 것으로 여겨진다.

[0396] 본 발명의 일 실시 형태는 단리된 이중특이성 표피 성장 인자 수용체(EGFR)/간세포 성장 인자 수용체(c-Met) 항체로서, 본 이중특이성 항체는

[0397] a) 제1 중쇄(HC1) 불변 도메인 3(HC1 CH3) 및 HC1 가변 영역 1(VH1)을 포함하는 제1 중쇄(HC1);

[0398] b) 제2 중쇄(HC2) 불변 도메인 3(HC2 CH3) 및 HC2 가변 영역 2(VH2)를 포함하는 제2 중쇄(HC2);

[0399] c) 경쇄 가변 영역 1(VL1)을 포함하는 제1 경쇄(LC1); 및

[0400] 경쇄 가변 영역 2(VL2)를 포함하는 제2 경쇄(LC2)를 포함하며, VH1과 VL1은 쌍을 이루어, EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 형성하고, VH2와 VL2는 쌍을 이루어, c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 형성하고, HC1은 HC1 CH3 내에 적어도 하나의 치환을 포함하고, HC2는 HC2 CH3 내에 적어도 하나의 치환을 포함하고, HC1 CH3 내에서의 치환 및 HC2 CH3 내에서의 치환은 상이한 아미노산 잔기 위치들에서 일어나며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0401] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 중쇄 3(HC3) 및 경쇄 3(LC3)을 포함하는 대조군 1가 EGFR 항체와 중쇄 4(HC4) 및 경쇄 4(LC4)를 포함하는 대조군 1가 c-Met 항체의 혼합물에 의한

NCI-H292, NCI-H1975 또는 SKMES-1 세포주에서의 세포외 신호-관련 키나제 1 및 2(ERK1/2)의 인산화의 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, NCI-H292, NCI-H1975 또는 SKMES-1 세포주에서 적어도 약 10배 미만, 적어도 약 20배 미만, 적어도 약 30배 미만, 적어도 약 40배 미만, 적어도 약 50배 미만 또는 적어도 약 60배 미만인 IC_{50} 값으로 ERK1/2의 인산화를 억제하며, HC3과 HC1, LC3과 LC1, HC4와 HC2, 및 LC4와 LC2는 각각 동일한 아미노산 서열을 갖고, ERK1/2의 인산화는, 포획 항체로서 항-포스포ERK1/2 항체를 사용하고 검출 항체로서 전기화학발광 화합물과 접합된 비인산화 및 인산화된 ERK1/2에 결합하는 항체를 사용하여 샌드위치 면역검정을 사용하여 전 세포 용해물에서 측정된다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 억제를 ERK1/2 인산화의 억제에 의해 평가하는 경우, 단일특이성 EGFR 항체와 단일특이성 c-Met 항체의 병용과 비교할 때, EGFR 및 c-Met 신호전달의 상승적인 더 현저한 억제를 제공한다. 그러한 예시적인 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 본 발명의 항체 EM1-mAb이다.

[0402] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대조군 단일특이성 EGFR 항체"는 시험하고자 하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 EGFR-결합 Fab 아암과 아미노산 서열이 동일한 EGFR에 결합하는 제1 Fab 아암을 갖고, 무관계/무관련(unrelated/irrelevant) 항원인 인간 면역결핍 바이러스(HIV) gp120에 결합하고 "불활성"인 제2 Fab 아암을 갖는 항체를 지칭한다. 시험하고자 하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 내의 EGFR 결합 Fab 아암이 F405L 치환을 포함하는 경우에, 제2 Fab 아암은 서열 번호 209의 서열을 갖는 경쇄 및 서열 번호 198의 서열을 갖는 중쇄를 갖는다. 시험하고자 하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 내의 EGFR 결합 Fab 아암이 K409R 치환을 포함하는 경우에, 제2 Fab 아암은 서열 번호 209의 서열을 갖는 경쇄 및 서열 번호 197의 서열을 갖는 중쇄를 갖는다.

[0403] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대조군 단일특이성 c-Met 항체"는 시험하고자 하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 c-Met-결합 Fab 아암과 아미노산 서열이 동일한 c-Met에 결합하는 제1 Fab 아암을 갖고, 무관계/무관련 항원인 HIV gp120에 결합하고 "불활성"인 제2 Fab 아암을 갖는 항체를 지칭한다. 시험하고자 하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 내의 c-Met 결합 Fab 아암이 F405L 치환을 포함하는 경우에, 제2 Fab Fab 아암은 서열 번호 209의 서열을 갖는 경쇄 및 서열 번호 198의 서열을 갖는 중쇄를 갖는다. 시험하고자 하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 내의 c-Met 결합 Fab 아암이 K409R 치환을 포함하는 경우에, 제2 불활성 Fab 아암은 서열 번호 209의 서열을 갖는 경쇄 및 서열 번호 197의 서열을 갖는 중쇄를 갖는다.

[0404] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 약 2×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-9} M 이하, 또는 약 1×10^{-10} M 이하의 IC_{50} 값으로 ERK1/2의 인산화를 억제한다.

[0405] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, ERK1은 잔기 Thr202 및 Tyr204에서 인산화되고, ERK2는 잔기 Thr185 및 Tyr197에서 인산화된다.

[0406] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, HC3 및 LC3을 포함하는 대조군 1가 EGFR 항체와 HC4 및 LC4를 포함하는 대조군 1가 c-Met 항체의 혼합물에 의한 NCI-H1975 세포주에서의 Ser473에서의 단백질 키나제 B(AKT)의 인산화의 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, NCI-H1975 세포주에서 적어도 약 70배 미만인 IC_{50} 값으로 Ser473에서의 AKT의 인산화를 억제하며, HC3과 HC1, LC3과 LC1, HC4와 HC2, 및 LC4와 LC2는 각각 동일한 아미노산 서열을 갖고, Ser473에서의 AKT의 인산화는, 포획 항체로서 비인산화 및 인산화된 AKT에 결합하는 항체를 사용하고 검출 항체로서 전기화학발광 화합물에 접합된 항-포스포AKT Ser473 항체를 사용하여 샌드위치 면역검정을 사용하여 전 세포 용해물에서 측정된다.

[0407] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, HC3 및 LC3을 포함하는 대조군 1가 EGFR 항체와 HC4 및 LC4를 포함하는 대조군 1가 c-Met 항체의 혼합물에 의한 NCI-H1975 세포주에서의 Thr308에서의 단백질 키나제 B(AKT)의 인산화의 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, NCI-H1975 세포주에서 적어도 약 100배 미만인 IC_{50} 값으로 Thr308에서의 AKT의 인산화를 억제하며, HC3과 HC1, LC3과 LC1, HC4와 HC2, 및 LC4와 LC2는 각각 동일한 아미노산 서열을 갖고, Thr308에서의 AKT의 인산화는, 포획 항체로서 비인산화 및 인산화된 AKT에 결합하는 항체를 사용하고 검출 항체로서 전기화학발광 화합물에 접합된 항-포스포AKT Thr308 항체를 사용하여 샌드위치 면역검정을 사용하여 전 세포 용해물에서 측정된다.

[0408] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 억제를 AKT 인산화의 억제에 의해 평가하는 경우, 단일특이성 EGFR 항체와 단일특이성 c-Met 항체의 병용과 비교할 때, EGFR 및 c-Met 신호전달의 상승적인 더 현저한 억제를 제공한다. 그러한 예시적인 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 본 발명의 항체 EM1-mAb이다.

[0409] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 약 1×10^{-9} M 이하의 IC_{50} 값으로 Ser473 또는 Thr308에서의 AKT의 인산화를 억제한다.

[0410] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 EGFR 잔기 K489, I491, K467 및 S492에서 서열 번호 73의 EGFR에 결합하고, 잔기 PEFRDSYPIKYVHAF(서열 번호 238) 및 FAQSKPDSAEPMDRSA(서열 번호 239)에서 c-Met에 결합한다. 그러한 예시적인 이중특이성 항체는 EM1-mAb이다. 이중특이성 EM-1 항체는 전술된 바와 같고 국제 특허 공개 WO2010/115551호에 있는 항체 BSAB01과 비교할 때 별개의 에피토프들에서 EGFR 및 c-Met에 결합한다. BSAB01의 부모 EGFR 결합 아암(세툭시맙)은 성숙 EGFR 내의 EGFR 아미노산 잔기 R353, Q384, Q408, H409, F412, S418, S440, K443, K465, I467, S468, 및 N473에 결합하는데, 이는 서열 번호 73의 전 길이 EGFR의 잔기 R367, Q408, Q432, H433, F436, S442, S464, K467, K489, I491, S492 및 N497에 상응하는 것이다(문헌[Li *et al.*, Cancer Cell 7:301-311, 2005]). BSAB01의 부모 c-Met 결합 아암(mAb 5D5)은 c-Met 잔기 325-340 PGAQLARQIGASLNDD(서열 번호 240)에 결합한다. EM1-mAb의 EGFR 결합 부모 항체(2F8)의 에피토프 맵핑(mapping)이 미국 특허 출원 공개 US2011/0256142A1호에 기재되어 있다. 세툭시맙 및 부모 2F8 항체는, 부분적으로 중첩되지만 별개인 에피토프들에 결합된다.

[0411] 에피토프 맵핑은 표준 방법을 사용하여 행해질 수 있다. 예를 들어, 개별 성분들 둘 모두의 구조가 알려져 있는 경우에, 컴퓨터 모의실험(*in silico*) 단백질-단백질 도킹(docking)을 수행하여, 양립가능한 상호작용 부위를 확인할 수 있다. 항원 및 항체 복합체를 사용하여 수소-중수소(H/D) 교환을 수행하여, 항체에 의해 결합될 수 있는 항원 상의 영역을 맵핑할 수 있다. 항원의 절편 및 점 돌연변이생성을 사용하여, 항체 결합에 중요한 아미노산의 위치를 찾을 수 있다.

[0412] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 EGFR 및 c-Met 신호전달을 무력화한다.

[0413] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 부재 하에서의 신호전달의 수준과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 EGFR 및 c-Met 신호전달을 무력화할 수 있다.

[0414] EGFR에 대한 리간드, 예컨대 EGF의 결합은 수용체 이량체화, 자가인산화, 수용체의 내부 세포질 티로신 키나제 도메인의 활성화, 및 DNA 합성(유전자 활성화) 및 세포 주기 진행 또는 분열의 조절에 관여하는 다수의 신호 전달 및 전사활성화 경로들의 개시를 자극한다. EGFR 신호전달의 무력화는 하나 이상의 EGFR 하류 신호전달 경로의 억제를 가져올 수 있으며, 이에 따라 EGFR을 무력화하는 것은 세포 증식 및 분화, 혈관생성, 세포 운동성 및 전이의 억제, 그리고 하류 신호전달 경로의 억제를 포함하는 다양한 효과를 가질 수 있다.

[0415] EGFR 신호전달 및 EGFR 신호전달의 무력화는 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있는데, 예를 들어 티로신 Y1068, Y1148, 및 Y1173 중 임의의 것에서의 수용체의 자가인산화(문헌[Downward *et al.*, Nature 311:483-5, 1984]) 및/또는 천연 또는 합성 기질의 인산화를, 그리고 본 발명의 이중특이성 항체에 의한 자가인산화 및/또는 천연 또는 합성 기질의 인산화의 억제를 측정하여 측정될 수 있다. 인산화는 포스포티로신 특이적 항체를 사용하여 ELISA 검정 또는 웨스턴 블롯과 같은 잘 알려진 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예시적인 검정은 문헌[Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997] 및 문헌[Batley *et al.*, Life Sci 62:143-50, 1998]에서 찾을 수 있으며, 본 명세서에 기재된 바와 같을 수 있다.

[0416] c-Met에 대한 HGF의 결합은 수용체 이량체화, 자가인산화, 수용체의 세포질 티로신 키나제 도메인의 활성화, 및 DNA 합성(유전자 활성화) 및 세포 주기 진행 또는 분열의 조절에 관여하는 다수의 신호 전달 및 전사활성화 경로들의 개시를 자극한다. c-Met 신호전달의 억제는 하나 이상의 c-Met 하류 신호전달 경로의 억제를 가져올 수 있으며, 이에 따라 c-Met를 무력화하는 것은 세포 증식 및 분화, 혈관생성, 세포 운동성 및 전이의 억제를 포함하는 다양한 효과를 가질 수 있다.

[0417] c-Met 신호전달 및 c-Met 신호전달의 무력화는 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있는데, 예를 들어 적어도 하나의 티로신 잔기 Y1230, Y1234, Y1235 또는 Y1349 상에서의 수용체의 자가인산화, 및/또는 천연 또는 합성 기질의 인산화를 측정하여 측정될 수 있다. 인산화는, 예를 들어, ELISA 검정에서 또는 웨스턴 블롯 상에서 포스포티로신에 특이적인 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 예시적인 검정은 문헌[Panek *et al.*, J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997] 및 문헌[Batley *et al.*, Life Sci 62:143-50, 1998]에서 찾을 수 있으며, 본 명세서에 기재된 바와 같을 수 있다.

[0418] EGFR 및 c-Met 신호전달은 본 명세서에 기재된 바와 같은 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여, 예컨대 ERK1/2 및 AKT 인산화의 억제를 측정하여 측정될 수 있다. Thr202 및 Tyr204에서의 ERK1 인산화 및 Thr185 및 Tyr187에서의 ERK2 인산화의 억제 및 Ser473 또는 Thr308에서의 AKT의 억제는, 예를 들어, 고체 지지체 상에 코팅된 포획 항체, 및 전기화학발광 화합물, 예컨대 메조 스케일 디스커버(Meso Scale Discover, MSD) 설포-태그(SULFO-TAG) 표지와 접합된 후 플레이트 판독기에 의한 신호의 검출이 행해지는 검출 항체를 사용하여 샌드위치 검정을 이용하여 NCI-H1975 세포 용해물에서 측정될 수 있다.

[0419] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, NCI-H292 또는 NCI-H1975 세포가 낮은 부착 조건에서 성장되는 경우, 세툭시맙에 의한 NCI-H292 또는 NCI-H1975 세포의 성장 억제의 IC_{50} 값과 비교할 때, 적어도 약 300배 미만, 적어도 약 400배 미만, 적어도 약 500배 미만, 적어도 약 600배 미만, 적어도 약 700배 미만 또는 적어도 약 800배 미만인 IC_{50} 값으로 NCI-H292 또는 NCI-H1975 세포의 성장을 억제한다.

[0420] 세포 성장의 억제는 알려진 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 세포 부착을 방지 또는 감소시키기 위하여, 세포는 하이드로겔 또는 생체모방(biomimetic) 중합체로 코팅된 플레이트(예를 들어, 코닝(Corning)에 의한 초저 부착(Ultra Low Attachment) 플레이트) 내에서 평판배양될 수 있으며, 표준 방법을 사용하여 72시간 동안의 인큐베이션 후에 세포 생존력(%)을 측정함으로써 7.5 ng/mL의 HGF-유도 세포 성장에 대한 항체의 효과를 평가할 수 있다.

[0421] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 단일특이성 EGFR 항체와 단일특이성 c-Met 항체의 병용과 비교할 때, 그리고 표준 치료(standard of care)인 세툭시맙과 비교할 때, EGFR 및/또는 c-Met 발현 암 세포의 상승적인 더 현저한 억제를 제공한다. 그러한 예시적인 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 본 발명의 항체 EM1-mAb이다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 야생형 EGFR 및 야생형 c-Met를 발현하는 암 세포를 억제하며, 또한 EGFR L858R/T790M 돌연변이체를 발현하는 암세포를 억제하는데, 이때 이러한 돌연변이는 소분자 티로신 키나제 억제제(TKI), 예컨대 게피티닙에 의한 치료에 대한 내성에 기여하는 것으로 확인된다. 따라서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 세툭시맙 및 TKI와 비교할 때 더 광범위한 환자 집단에서 이득을 제공할 수 있다.

[0422] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 이중특이성 항체 및 세툭시맙이 20 mg/kg 용량으로 투여되는 경우, 세툭시맙과 비교할 때, 일수 36에서 적어도 500배 미만의 T/C 값[백분율(%)]으로 SCID 베이지 마우스에서의 HGF-발현 SKMES-1 세포 종양의 성장을 억제한다.

[0423] SCID 베이지 마우스를 사용하는 종양 이종이식편 모델은 잘 알려져 있다. 표준 방법을 사용하여 인간 HGF를 발현하도록 SKMES-1 세포를 조작할 수 있다. 전형적으로, SCID 베이지 마우스에, 컬투렉스(Culturex)와 같은 세포외 매트릭스 중에 매립된 인간 HGF를 발현하는 SKMES-1 세포를 각각의 동물의 등 옆부분에 피하 접종할 수 있다. 이식 후 1주째에, 마우스를 등가의 종양 부피를 갖는 집단으로 층별화할 수 있으며, 이후에, 예를 들어 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체, 대조군 또는 벤치마크 항체 또는 소분자를 주당 3회 투여할 수 있다. 종양 부피는 매주 2회 기록할 수 있으며, T/C 값[백분율(%)]을 계산함으로써 종양 성장 억제(TGI)를 관찰할 수 있다. T/C 값(%)은 항종양 효능의 지표이다. T 및 C는 주어진 날에 대한 각각 처리군 및 대조군의 평균 부피이다.

[0424] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 표준 치료인 세툭시맙과 비교할 때, 생체내 종양 사멸에 있어서 유의하게 개선된 효능을 제공하며, 이에 따라 세툭시맙과 비교할 때 환자 집단에서 이득을 제공할 수 있다.

[0425] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 동종형의 HC1 및 HC2를 포함한다.

[0426] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 IgG1 동종형의 HC1 및 HC2를 포함한다.

[0427] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 잔기 위치 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 또는 409에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 HC1 CH3이 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 치환을 포함하고, HC2 CH3이 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 치환을 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0428] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 잔기 위치 350, 370, 405 또는 409에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 HC1 CH3이 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환을 포함하고, HC2 CH3이 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 치환을 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0429] 항체 도메인 및 넘버링은 잘 알려져 있다. 2개의 CH3 도메인(또는 CH3 영역)은 이들이 적어도 하나의 아미노산 치환에 의해 서로 상이할 때 동일하지 않다. IgG1 CH3 영역은 전형적으로 IgG1 상의 잔기 341-446으로 이루어진다(잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따름). 예시적인 IgG1 불변 영역이 서열 번호 203에 나타나 있다. CH3 도메인은 서열 번호 203의 잔기 224-329에 걸쳐 이어져 있으며, EU 인덱스에 따르면 잔기 341-446에 상응한다.

[0430] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 잔기 위치 405 또는 409에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 HC1 CH3이 적어도 1개의 치환을 포함하고, HC2 CH3이 적어도 1개의 치환을 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0431] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 HC1 CH3은 K409R 또는 F405L 치환을 포함하고, HC2 CH3은 K409R 또는 F405L 치환을 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0432] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 HC1 CH3은 F405L 치환을 포함하고, HC2 CH3은 K409R 치환을 포함한다.

[0433] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3 및 HC2 CH3 치환은 위치 366, 368, 370, 399, 405, 407 또는 409에서의 치환이다(넘버링은 EU 인덱스에 따름). 이들 위치는 서열 번호 203 및 204의 중쇄 불변 영역 내의 선형 잔기 위치 248, 250, 252, 281, 287, 289 및 291에 각각 상응한다.

[0434] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3의 위치 409는 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산 치환을 갖고, HC2 CH3의 위치 405는 Phe 이외의 아미노산 치환을 갖는다.

[0435] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3의 위치 405는 Phe 이외의 아미노산 치환을 갖고, HC2 CH3의 위치 409는 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산 치환을 갖는다.

[0436] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3의 위치 409는 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산 치환을 갖고, HC2 CH3의 위치 405는 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산 치환을 갖는다.

[0437] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3의 위치 405는 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산 치환을 갖고, HC2 CH3의 위치 409는 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산 치환을 갖는다.

[0438] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0439] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0440] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 치환을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0441] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3는 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 치환을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0442] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Leu를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0443] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Leu를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0444] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0445] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0446] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2

CH3은 위치 405에서 Leu를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0447] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Leu를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0448] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Leu를 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0449] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 405에서 Leu를 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 405에서 Phe를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0450] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys를, 위치 370에서 Thr을, 그리고 위치 405에서 Leu를 갖는다.

[0451] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys를, 위치 370에서 Thr을, 그리고 및 위치 405에서 Leu를 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0452] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys를, 위치 370에서 Thr을, 그리고 위치 405에서 Leu를 갖는다.

[0453] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys를, 위치 370에서 Thr을, 그리고 위치 405에서 Leu를 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0454] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 370에서 Lys를, 위치 405에서 Phe를, 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys를, 위치 370에서 Thr을, 그리고 위치 405에서 Leu를 갖는다.

[0455] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys를, 위치 370에서 Thr을, 그리고 위치 405에서 Leu를 갖고, HC2 CH3은 위치 370에서 Lys를, 위치 405에서 Phe를, 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0456] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 갖는다.

[0457] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0458] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 갖는다.

[0459] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0460] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 갖는다.

[0461] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0462] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0463] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0464] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0465] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0466] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0467] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0468] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0469] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0470] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0471] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0472] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0473] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 그리고 위치 409에서 Lys를 갖고, HC2 CH3은 위치 407에서 Tyr을 그리고 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0474] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 (i) 위치 368에서 Phe, Leu 및 Met 이외의 아미노산을, 또는 (ii) 위치 370에서 Trp를, 또는 (iii) 위치 399에서 Asp, Cys, Pro, Glu 또는 Gln 이외의 아미노산을 갖는다.

[0475] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 (i) 위치 368에서 Phe, Leu 및 Met 이외의 아미노산을, 또는 (ii) 위치 370에서 Trp를, 또는 (iii) 위치 399에서 Asp, Cys, Pro, Glu 또는 Gln 이외의 아미노산을 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는다.

[0476] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Arg, Ala, His 또는 Gly를 갖고, HC2 CH3은 (i) 위치 368에서 Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp를, 또는 (ii) 위치 370에서 Trp를, 또는 (iii) 위치 399에서 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr을 갖는다.

[0477] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 (i) 위치 368에서 Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp를, 또는 (ii) 위치 370에서 Trp를, 또는 (iii) 위치 399에서 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr을 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Arg, Ala, His 또는 Gly를 갖는다.

[0478] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 위치 409에서 Arg를 갖고, HC2 CH3은 (i) 위치 368에서 Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp를, 또는 (ii) 위치 370에서 Trp를, 또는 (iii) 위치 399에서 Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr를 갖는다.

[0479] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 (i) 위치 368에서 Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp를, 또는 (ii) 위치 370에서 Trp를, 또는 (iii) 위치 399에서 Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr을 갖고, HC2 CH3은 위치 409에서 Arg를 갖는다.

[0480] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 K409R 치환 또는 F405L 치환을 포함하고, HC2 CH3은 K409R 치환 또는 F405L 치환을 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0481] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, HC1 CH3은 F405L 치환을 포함하고, HC2 CH3은 K409R 치환을 포함한다.

[0482] 치환은 전형적으로 표준 방법을 사용하여 항체의 불변 도메인과 같은 분자에 대해 DNA 수준에서 이루어진다.

[0483] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 VH1 및 VL1을 포함하며, 여기서

[0484] VH1은 서열 번호 210, 211 및 212 각각의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 1(HCDR1), HCDR 2(HCDR2) 및 HCDR 3(HCDR3) 아미노산 서열 각각을 포함하고;

[0485] VL1은 서열 번호 213, 214 및 215 각각의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 1(LCDR1), LCDR 2(LCDR2) 및 LCDR 3(LCDR3) 아미노산 서열 각각을 포함한다.

[0486] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 VH2 및 VL2를 포함하며, 여기서

[0487] VH2는 서열 번호 216, 217 및 218 각각의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열 각각을 포함하고;

[0488] VL2는 서열 번호 219, 220 및 221 각각의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열 각각을 포함한다.

[0489] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 서열 번호 189, 190, 193 및 194 각각의 VH1, VL1, VH2 및 VL2 아미노산 서열 각각을 포함한다.

[0490] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 서열 번호 199, 200, 201 및 202 각각의 HC1, LC1, HC2 및 LC2 아미노산 서열 각각을 포함하며, 선택적으로 HC1, HC2, 또는 HC1 및 HC2 둘 모두로부터 C-말단 라이신이 제거되어 있다.

[0491] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 VH1 및 VL1을 포함하며, 여기서

[0492] VH1은 서열 번호 222, 223 및 224 각각의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열 각각을 포함하고;

[0493] VL1은 서열 번호 225, 226 및 227 각각의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열 각각을 포함한다.

[0494] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 VH2 및 VL2를 포함하며, 여기서

[0495] VH2는 서열 번호 228, 229 및 230 각각의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열 각각을 포함하고;

[0496] VL2는 서열 번호 231, 232 및 233 각각의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열 각각을 포함한다.

[0497] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 서열 번호 191, 192, 195 및 196 각각의 VH1, VL1, VH2 및 VL2 아미노산 서열 각각을 포함한다.

[0498] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 서열 번호 234, 235, 236 및 237 각각의 HC1, LC1, HC2 및 LC2 아미노산 서열 각각을 포함하며, 선택적으로 HC1, HC2, 또는 HC1 및 HC2 둘 모두로부터 C-말단 라이신이 제거되어 있다.

[0499] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 플레이트 상에 코팅되고 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 함께 또는 이것 없이 인큐베이팅된 재조합 인간 EGFR 또는 재조합 인간 c-Met 세포외 도메인을 채용하는 경쟁 검정에서, 약 1×10^{-8} M 미만, 약 1×10^{-9} M 미만, 약 1×10^{-10} M 미만, 약 1×10^{-11} M 미만, 또는 약 1×10^{-12} M 미만의 IC_{50} 값으로 EGFR에 대한 EGF의 결합 및 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다. 본 명세서에 기재된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 동일한 검정 조건을 사용하여 본 명세서에 기재된 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 부재 하에서의 EGFR에 대한 EGF의 결합 및 c-Met에 대한 HGF의 결합과 비교할 때, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 EGFR에 대한 EGF의 결합 및 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단할 수 있다.

[0500] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 HC1, LC1, HC2 및 LC2를 포함하며, 여기서 HC1, LC1, HC2 및 LC2는 각각 서열 번호 205, 206, 207 및 208의 서열을 포함하는 합성 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된다.

[0501] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 본 명세서에 기재된 기법을 사용하여 생성될 수 있으며, 예컨대 CH3을 조작하고 시험관내 Fab 아암 교환을 사용하여 항체를 생성하는 것을 이용하여 생성될 수 있다. 2개의 단일특이성 항체로부터 예시적인 이중특이성 항체를 생성할 수 있는데, 이는 75 mM 2-메르캅토에탄올아민(2-MEA)의 최종 농도를 갖는 완충액 중에서 pH 7.0 내지 7.4의 PBS 중에서 약 1 내지 20 mg/mL의 각각의 항체를 1:1 몰비로 배합하고, 25 내지 37℃에서 2 내지 6시간 동안 인큐베이팅한 후 투석, 투석여과, 접선 유동 여과, 및 스핀 세포여과(spinned cell filtration)를 통해 2-MEA를 제거함으로써 행해진다. 이중특이성 항체의 수율은 약 80% 초과, 약 90% 초과, 약 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 초과일 수 있다.

[0502] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태는 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 생성 방법을 제공하며, 본 생성 방법은

[0503] 서열 번호 199의 2개의 중쇄 및 서열 번호 200의 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 단일특이성 2가 항-EGFR 항체와 서열 번호 201의 2개의 중쇄 및 서열 번호 202의 2개의 경쇄를 포함하는 단리된 단일특이성 2가 항-c-Met 항체를 약 1:1 몰비의 혼합물로 배합하는 단계;

[0504] 혼합물 내로 환원제를 도입시키는 단계;

[0505] 약 90분 내지 약 6시간 동안 혼합물을 인큐베이팅하는 단계;

[0506] 환원제를 제거하는 단계; 및

[0507] 서열 번호 199의 제1 중쇄 및 서열 번호 201의 제2 중쇄, 서열 번호 200의 제1 경쇄 및 서열 번호 202의 제2 경쇄를 포함하는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 정제하는 단계를 포함하며, 서열 번호 199의 제1 중쇄는 서열 번호 200의 제1 경쇄와 쌍을 이루어서 EGFR에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인을 형성하고, 서열 번호 201의 제2 중쇄는 서열 번호 202의 제2 경쇄와 쌍을 이루어서 c-Met에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 형성한다.

[0508] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 환원제는 2-메르캅토에탄올아민(2-MEA)이다.

[0509] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 2-MEA는 약 25 mM 내지 약 75 mM의 농도로 존재한다.

[0510] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 인큐베이팅 단계는 약 25℃ 내지 약 37℃의 온도에서 수행된다.

[0511] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태는 HC1, LC1, HC2 및 LC2를 포함하는 단리된 이중특이성 EGFR/-c-Met 항체를 제공하며, 여기서 HC1은 서열 번호 199의 서열을 포함하고, LC1은 서열 번호 200의 서열을 포함하고, HC2는 서열 번호 201의 서열을 포함하고, LC2는 서열 번호 202의 서열을 포함하며, 여기서 HC1, LC1, HC2 및/또는 LC2는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 보존적 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0512] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태는 HC1, LC1, HC2 및 LC2를 포함하는 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 제공하며, 여기서 HC1은 서열 번호 234의 서열을 포함하고, LC1은 서열 번호 235의 서열을 포함하고, HC2는 서열 번호 236의 서열을 포함하고, LC2는 서열 번호 237의 서열을 포함하며, 여기서 HC1, LC1, HC2 및/또는 LC2는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 보존적 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0513] HC1, LC1, HC2 및 LC2 아미노산 서열이 본 명세서에 개시된 항체들과 미미하게 상이한 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 본 발명의 범주 내에 포함된다. 전형적으로, 이는 항체의 특성을 불리하게 변경시키지 않고서 항원-결합 부위 내에서의 또는 프레임워크 내에서의 유사한 전하, 소수성, 또는 입체화학 특성을 갖는 아미노산에 의한 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 보존적 치환은 항체 특성, 예를 들어 안정성 또는 친화성을 개선하도록 이루어질 수 있다. 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 또는 15개의 아미노산 치환이 예를 들어 VH1, VL1, VH2 및/또는 VL2에 대해 이루어질 수 있다. 예를 들어, "보존적 아미노산 치환"은, 그 위치에서 아미노산 잔기의 극성 또는 전하에 대한 영향이 거의 또는 전혀 없도록 하는, 천연 아미노산 잔기의 비천연 잔기로의 치환을 수반할 수 있다. 더욱이, 폴리펩티드 내의 임의의 천연 잔기는 또한 알라닌으로 치환될 수 있는데, 이는 알라닌 스캐닝 돌연변이생성(alanine scanning mutagenesis)에 대해 이전에 기재된 바와 같다(문헌[MacLennan *et al.*, Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67, 1998]; 문헌[Sasaki *et al.*, Adv Biophys 35:1-24, 1998]). 원하는 아미노산 치환은 그러한 치환이 요구되는 때에 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 분자 서열의 중요한 잔기를 확인하거나, 또는 본 명세서에 기재된 분자의 친화도를 증가 또는 감소시키기 위해 아미노산 치환을 사용할 수 있다. 예시적인 보존적 아미노산 치환은 전술되어 있다.

[0514] 아미노산 치환은, 예를 들어 PCR 돌연변이생성에 의해 행해질 수 있다(미국 특허 제4,683,195호). 변이체의 라이브러리를 잘 알려진 방법을 사용하여 생성할 수 있는데, 예를 들어, 무작위(NNK) 또는 비무작위 코돈, 예를 들어 DVK 코돈 - 이는 11개의 아미노산(Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp)을 암호화함 - 을 사용하고, 원하는 특성을 갖는 변이체에 대한 라이브러리를 스크리닝하여 생성할 수 있다.

[0515] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 아미노산 치환은 항체의 불변 영역에 대해 이루어질 수 있다. 예를

들어, 상이한 IgG1 동종이형(allotype)들이 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 사용될 수 있는데, 예컨대 잘 알려진 G1m17 동종이형, G1m3 동종이형 또는 G1m1 동종이형, 또는 이들의 조합이다.

[0516] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 약동학적 특성이, 항체 반감기를 조절하는 Fc 도메인 내에서의 치환에 의해 향상될 수 있다. 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 HC1 및/또는 HC2 내에 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하며, 이때 잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따른다. M252Y/S254T/T256E 치환은 항체 반감기를 증가시키는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Dall'Acqua *et al.*, J Biol Chem 281:23514－24, 2006]).

[0517] Fc 영역 내에서의 보존적 치환 및/또는 부가적 치환을 갖는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 그들의 특성에 대해 시험된다.

[0518] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 면역 효과기 특성이 당업자에게 알려진 기법에 의해 Fc 변형을 통해 향상되거나 또는 사일런싱될(silenced) 수 있다. 예를 들어, Fc 효과기 기능, 예컨대 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포-매개 식작용(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP), 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등이, 이들 활성을 담당하는 Fc 내의 잔기를 변형시킴으로써 제공 및/또는 제어될 수 있다.

[0519] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고, 이어서 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 지칭한다.

[0520] ADCC를 유도하는 단일클론 항체의 능력은 그의 올리고당 성분을 조작함으로써 향상될 수 있다. 인간 IgG1 또는 IgG3는 잘 알려진 바이안테나리(biantennary) G0, G0F, G1, G1F, G2 또는 G2F 형태의 글리칸의 대부분에 의해 Asn297에서 N-글리코실화된다. 비조작된 CHO 세포에 의해 생성된 항체는 전형적으로 약 85% 이상의 글리칸 푸코스 함량을 갖는다. Fc 영역에 부착된 바이안테나리 복합형(complex-type) 올리고당으로부터의 코어(core) 푸코스의 제거는, 항원 결합 또는 CDC 활성을 변경시키지 않고서, 개선된 FcɣRIIIa 결합을 통해 항체의 ADCC를 향상시킨다. 그러한 mAb는 바이안테나리 복합형의 Fc 올리고당을 담지하는 비교적 고도로 탈푸코실화된 항체의 성공적인 발현으로 이어지는 것으로 보고된 상이한 방법들을 사용하여 달성될 수 있는데, 이러한 방법에는, 예컨대 다음과 같은 것이 있다: 배양물 삼투압 몰농도(osmolality)의 제어(문헌[Konno *et al.*, Cytotechnology 64(:249-65, 2012]), 숙주 세포주로서의 변이체 CHO 세포주 Lec13의 적용(문헌[Shields *et al.*, J Biol Chem 277:26733-26740, 2002]), 숙주 세포주로서의 변이체 CHO 세포주 EB66의 적용(문헌[Olivier *et al.*, MAbs; 2(4), 2010; Epub ahead of print; PMID:20562582]), 숙주 세포주로서의 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0의 적용(문헌[Shinkawa *et al.*, J Biol Chem 278:3466-3473, 2003]), 특이적으로 α 1,6-푸코실트랜스퍼라제(*FUT8*) 유전자에 대한 짧은 간섭(small interfering) RNA의 도입(문헌[Mori *et al.*, Biotechnol Bioeng88:901-908, 2004]), 또는 β-1,4-*N*-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III과 골지(Golgi) α-만노시다제 II 또는 강력한 알파-만노시다제 I 억제제인 키푸넨신(kifunensine)의 공발현(문헌[Ferrara *et al.*, J Biol Chem281:5032-5036, 2006], 문헌[Ferrara *et al.*, Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006]; 문헌[Xhou *et al.*, Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008]).

[0521] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 의해 유도되는 ADCC는 또한 항체 Fc 내에서의 소정의 치환에 의해 향상될 수 있다. 예시적인 치환은, 예를 들어 미국 특허 US6737056호에 기재된 바와 같은 아미노산 위치 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 또는 430(잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따름)에서의 치환이다.

[0522] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 푸코스 함량이 약 1% 내지 약 15%, 예를 들어 15%, 14%, 13%, 12%, 11% 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%인 바이안테나리 글리칸 구조를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 푸코스 함량이 약 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 또는 20%인 글리칸 구조를 갖는다.

[0523] "푸코스 함량"은 Asn297에서의 당쇄(sugar chain) 내의 푸코스 단당의 양을 의미한다. 푸코스의 상대량은 모든 당구조(glycostructure)에 대한 푸코스-함유 구조의 백분율이다. 이들은, 예를 들어 하기와 같은 다수의 방법에 의해 특성화 및 정량화될 수 있다: 1) 국제 특허 공개 WO2008/077546호에 기재된 바와 같이 N-글리코시다제 F 처리된 샘플(예를 들어, 복합, 혼성, 및 올리고- 및 고-만노스 구조)의 MALDI-TOF를 사용하는 방법; 2) Asn297 글리칸의 효소적 방출을 행하고, 이어서, 유도체화하고, 형광 검출을 사용하는 HPLC(UPLC) 및/또는

HPLC-MS(UPLC-MS)에 의해 검출/정량화함에 의한 방법; 3) 엔도(Endo) S, 또는 제1 GlcNAc 단당과 제2 GlcNAc 단당 사이를 절단하여 푸코스가 제1 GlcNAc에 부착된 상태로 남겨 두는 다른 효소로 Asn297 글리칸을 처리하거나 처리하지 않고서, 천연 또는 환원된 mAb의 온전한 단백질을 분석하는 방법; 4) 효소적 분해(예를 들어, 트립신 또는 엔도펩티다제 Lys-C)에 의해 mAb를 구성 펩티드들로 효소분해하고, 이어서 HPLC-MS(UPLC-MS)에 의해 분리, 검출 및 정량화하는 방법; 5) Asn 297에서의 PNGase F에 의한 특이적인 효소적 탈글리코실화에 의해 mAb 단백질로부터 mAb 올리고당을 분리하는 방법. 이렇게 방출된 올리고당은 형광단으로 표지되고, 하기를 가능하게 하는 다양한 상보적 기법에 의해 분리 및 확인될 수 있다: 실험 질량과 이론 질량의 비교에 의한 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) 질량 분석에 의한 글리칸 구조의 미세한 특성화, 이온 교환 HPLC(글리코셉(GlycoSep) C)에 의한 시알릴화도(degree of sialylation)의 결정, 순상 HPLC(글리코셉 N)에 의한 친수성 기준에 따른 올리고당 형태의 분리 및 정량화, 및 고성능 모세관 전기영동-레이저 유도 형광(high performance capillary electrophoresis-laser induced fluorescence, HPCE-LIF)에 의한 올리고당의 분리 및 정량화.

[0524] 본 출원에 사용되는 바와 같이, "저 푸코스" 또는 "저 푸코스 함량"은 푸코스 함량이 약 1% 내지 15%인 항체를 지칭한다.

[0525] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "정상 푸코스" 또는 "정상 푸코스 함량"은 푸코스 함량이 약 50% 초과, 전형적으로 약 80% 초과 또는 85% 초과인 항체를 지칭한다.

[0526] 본 발명의 일부 실시 형태는 단리된 폴리뉴클레오티드로서 또는 발현 벡터의 일부분으로서 또는 선형 DNA 서열의 일부분으로서 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 결합 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 합성 핵산을 제공하며, 이때 선형 DNA 서열은 시험관내 전사/번역에 사용되는 선형 DNA 서열, 즉 그러한 조성 또는 그의 유도 돌연변이원의 원핵생물성, 진핵생물성 또는 사상(filamentous) 파지 발현, 분비 및/또는 디스플레이에 적합한 벡터를 포함한다.

[0527] 본 발명의 일부 실시 형태는 서열 번호 205, 206, 207 또는 208의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0528] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 자동화 폴리뉴클레오티드 합성기 상에서 고상 폴리뉴클레오티드 합성과 같은 화학적 합성에 의해 제조되고 완전한 단일 또는 이중 가닥 분자로 조립될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR 후의 일상적인 클로닝과 같은 다른 기법에 의해 생성될 수 있다. 주어진 알려진 서열의 폴리뉴클레오티드를 생성하거나 얻는 기법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0529] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 비암호화 서열, 예컨대 프로모터 또는 인핸서 서열, 인트론, 폴리아데닐화 신호, RepA 결합을 촉진시키는 *cis* 서열 등을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열은 또한, 예를 들어, 마커 또는 태그 서열, 예컨대 단백질의 정제 또는 검출을 용이하게 하기 위한 히스티딘 태그 또는 HA 태그, 신호 서열, 융합 단백질 파트너, 예컨대 RepA, Fc 또는 박테리오파지 외피 단백질, 예컨대 pIX 또는 pIII을 암호화하는 추가 아미노산을 암호화하는 추가 서열을 포함할 수 있다.

[0530] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 그러한 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 배큘로바이러스 발현용 벡터, 트랜스포손 기반 벡터, 또는 임의의 수단에 의해 주어진 유기체 또는 유전적 백그라운드 내로 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 도입시키기에 적합한 임의의 다른 벡터일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중특이성 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 경쇄 및 중쇄는 동일하거나 상이한 발현 벡터 내에 클로닝될 수 있다. 면역글로불린 쇄를 암호화하는 DNA 절편은 면역글로불린 폴리펩티드의 발현을 보장하는 발현 벡터(들) 내의 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 그러한 제어 서열은 신호 서열, 프로모터(예를 들어, 천연 관련 프로모터 또는 이종 프로모터), 인핸서 요소, 및 전사 종결 서열을 포함하며, 항체를 발현하도록 선택된 숙주 세포에 적합하도록 선택될 수 있다. 일단 벡터가 적절한 숙주 내로 도입되었으면, 숙주는 도입된 합성 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 단백질의 고수준 발현에 적합한 조건 하에서 유지될 수 있다.

[0531] 적합한 발현 벡터는 전형적으로 숙주 유기체 내에서 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 필수 부분으로서 복제가능하다. 일반적으로, 발현 벡터는 선택 마커, 예컨대 암피실린-내성, 하이그로마이신-내성, 테트라사이클린 내성, 카나마이신 내성 또는 네오마이신 내성을 함유하여 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 가능하게 한다.

[0532] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태는 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 용어 "숙주 세포"는

벡터가 내부에 도입된 세포를 지칭한다. 용어 숙주 세포는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 지칭하고자 함이 이해된다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 소정의 변형이 일어날 수 있기 때문에, 그러한 후손은 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 포함된다. 그러한 숙주 세포는 진핵 세포, 원핵 세포, 식물 세포 또는 고세균(archeal) 세포일 수 있다.

[0533] 예시적인 진핵 세포는 포유류, 곤충, 조류 또는 다른 동물 기원의 것일 수 있다. 포유류 진핵 세포는 불멸화 세포주, 예컨대 하이브리도마 또는 골수종 세포주, 예컨대 SP2/0(미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC(American Type Culture Collection), CRL-1581), NS0(영국 윌트셔주 솔즈베리 소재의 ECACC(European Collection of Cell Cultures), ECACC 번호 85110503), FO(ATCC CRL-1646) 및 Ag653(ATCC CRL-1580) 뮤린 세포주를 포함한다. 예시적인 인간 골수종 세포주는 U266(ATTC CRL-TIB-196)이다. 다른 유용한 세포주는 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포, 예컨대 CHO-K1SV(미국 매릴랜드주 워커스빌 소재의 론자 바이올로직스(Lonza Biologics)), CHO-K1(ATCC CRL-61) 또는 DG44로부터 유래된 것들을 포함한다.

[0534] **본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, 이중특이성 EGFR/-c-Met 항체 및 EGFR-결합 또는 c-Met-결합 FN3 도메인의 용도**

[0535] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 결합 FN3 도메인, c-Met 결합 FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR-c-Met 항체는 인간 질병 또는 세포, 조직, 기관, 체액, 또는 일반적으로 숙주에서의 특정 병상의 증상을 진단하거나, 모니터링하거나, 조절하거나, 치료하거나, 경감시키거나, 그의 발생의 방지를 돕거나, 또는 감소시키는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 임의의 분류에 속하는 동물 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 동물의 예에는 포유동물, 예컨대 인간, 설치류, 개, 고양이 및 가축/집짐승이 포함된다.

[0536] 본 발명의 일 태양은 EGFR 및/또는 c-Met를 발현하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하기 위한 방법으로서, 본 방법은 이러한 세포를 본 발명의 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 결합 FN3 도메인, c-Met 결합 FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0537] 본 발명의 다른 태양은 대상체에서 EGFR- 및/또는 c-Met-발현 종양 또는 암 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 방법으로서, 본 방법은 EGFR- 및/또는 c-Met-발현 종양 또는 암 세포의 성장 또는 전이가 억제되도록 유효량의 본 발명의 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 결합 FN3 도메인, c-Met 결합 FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0538] 본 발명의 다른 태양은 암을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 결합 FN3 도메인, c-Met 결합 FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0539] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 결합 FN3 도메인, c-Met 결합 FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 EGFR, c-Met, EGF, 가용성 EGFR, 가용성 c-Met 또는 다른 EGFR 리간드 또는 HGF의 비정상 활성화 또는 생성을 특징으로 하는 임의의 질병 또는 장애, 또는 EGFR 또는 c-Met 발현과 관련된 장애 - 이러한 질병 또는 장애는 악성종양 또는 암을 포함할 수 있거나 그렇지 않을 수 있음 - 를 치료하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 EGFR, c-Met, EGF 또는 다른 EGFR 리간드, 또는 HGF의 비정상 활성화 및/또는 생성은 이러한 질병 또는 장애를 갖거나 또는 이에 취약한 대상체의 세포 또는 조직 중에서 발생되고 있다.

[0540] c-Met에 특이적으로 결합하여 c-Met에 대한 HGF의 결합을 차단하는 본 발명의 FN3 도메인은 암 및 양성 종양을 포함하는 종양의 치료를 위한 것일 수 있다. 본 발명의 c-Met 결합 FN3 도메인에 의해 치료하기에 적합한 암은 c-Met를 과발현하는 것들을 포함한다. 본 발명의 FN3 도메인에 의해 치료하기에 적합한 예시적인 암은 상피 세포암, 유방암, 난소암, 폐암, 결직장암, 항문암, 전립선암, 신장암, 방광암, 두경부암, 위암, 난소암, 췌장암, 피부암, 구강암, 식도암, 질암, 자궁경부암, 비장암, 고환암, 및 흉선암을 포함한다.

[0541] EGFR에 특이적으로 결합하여 EGFR에 대한 EGF의 결합을 차단하는 본 발명의 FN3 도메인은 암 및 양성 종양을 포함하는 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 FN3 도메인에 의해 치료하기에 적합한 암은 EGFR 또는 변이체를 과발현하는 것들을 포함한다. 본 발명의 FN3 도메인에 의해 치료하기에 적합한 예시적인 암은 상피 세포암, 유방암, 난소암, 폐암, 결직장암, 항문암, 전립선암, 신장암, 방광암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 피부암, 구강암, 식도암, 질암, 자궁경부암, 비장암, 고환암, 및 흉선암을 포함한다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 암 및 양성 종양을 포함하는 종양의 치료

에 사용될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 의해 치료하기에 적합한 예시적인 암은 EGFR 및/또는 c-Met를 과발현하는 것들, 즉 상승된 EGFR 활성 및/또는 발현 수준(예컨대, 이를테면, EGFR 활성화 돌연변이, EGFR 유전자 증폭, 또는 리간드 매개 EGFR 활성화) 및 상승된 c-Met 활성 및/또는 발현 수준(예컨대, 이를테면, c-Met 활성화 돌연변이, c-Met 유전자 증폭, 또는 HGF 매개 c-Met 활성화)과 관련된 암을 포함한다.

[0542] 암과 관련될 수 있는 예시적인 EGFR 활성화 돌연변이는 점 돌연변이, 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이, 역위 또는 유전자 증폭을 포함하는데, 이들은 EGFR의 적어도 하나의 생물학적 활성의 증가, 예컨대 상승된 티로신 키나제 활성, 수용체 호모이량체 및 헤테로이량체의 형성, 증진된 리간드 결합 등으로 이어진다. 돌연변이는 EGFR 유전자의 임의의 부분 또는 EGFR 유전자와 관련된 조절 영역에 위치될 수 있으며, 엑손 18, 19, 20 또는 21에서의 돌연변이 또는 키나제 도메인에서의 돌연변이를 포함한다. 예시적인 EGFR 활성화 돌연변이는 G719A, L861X(X는 임의의 아미노산임), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P 또는 T790M 치환, E746-A750의 결실, R748-P753의 결실, M766과 A767 사이에의 Ala의 삽입, S768과 V769 사이에의 SVA(Ser, Val, Ala)의 삽입, 및 P772와 H773 사이에의 NS(Asn, Ser)의 삽입이다. EGFR 활성화 돌연변이의 다른 예가 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 US2005/0272083호 참조). 수용체 호모이량체 및 헤테로이량체, 수용체 리간드, 자가인산화 부위, 및 ErbB 매개 신호전달에 관여하는 신호전달 분자를 포함하는 EGFR 및 다른 ErbB 수용체에 대한 정보가 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Hynes and Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341-354, 2005] 참조).

[0543] 예시적인 c-Met 활성화 돌연변이는 점 돌연변이, 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이, 역위 또는 유전자 증폭을 포함하는데, 이들은 c-Met 단백질의 적어도 하나의 생물학적 활성의 증가, 예컨대 상승된 티로신 키나제 활성, 수용체 호모이량체 및 헤테로이량체의 형성, 증진된 리간드 결합 등으로 이어진다. 돌연변이는 c-Met 유전자의 임의의 부분 또는 그 유전자와 관련된 조절 영역에 위치될 수 있으며, 예컨대 c-Met의 키나제 도메인에서의 돌연변이이다. 예시적인 c-Met 활성화 돌연변이는 잔기 위치 N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 및 E168에서의 돌연변이이다. EGFR 및 c-Met 돌연변이 또는 유전자 증폭을 검출하기 위한 방법은 잘 알려져 있다.

[0544] 본 발명의 이중특이성 분자, 예컨대 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 의해 치료하기에 적합한 예시적인 암은 상피 세포암, 유방암, 난소암, 폐암, 비소세포 폐암(NSCLC), 폐 선암종, 소세포 폐암, 결직장암, 항문암, 전립선암, 신장암, 방광암, 두경부암, 인두암, 코암, 췌장암, 피부암, 구강암, 설암, 식도암, 질암, 자궁경부암, 비장암, 고환암, 위암, 흉선암, 결장암, 갑상선암, 간암(간세포 암종(HCC)), 또는 산발성 또는 유전성 유두상 신장 세포 암종(PRCC)을 포함한다.

[0545] 본 발명의 다른 태양은 암을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 대상체는 CD16(FcγRIIIa-158F/F 유전자형)의 위치 158에서의 페닐알라닌에 대해 동형접합성이거나, 또는 CD16(FcγRIIIa-158F/V 유전자형)의 위치 158에서의 발린 및 페닐알라닌에 대해 이형접합성이다. CD16은 또한 Fc 감마 수용체 IIIa(FcγRIIIa) 또는 저 친화도 면역글로불린 감마 Fc 영역 수용체 III-A 동형체(isoform)로서 알려져 있다. FcγRIIIa 단백질 잔기 위치 158에서의 발린/페닐알라닌(V/F) 다형성(polymorphism)은 인간 IgG에 대한 FcγRIIIa 친화도에 영향을 주는 것으로 밝혀져 있다. FcγRIIIa-158F/F 또는 FcγRIIIa-158F/V 다형성을 갖는 수용체는 FcγRIIIa-158V/V와 비교할 때 감소된 Fc 결합 및 이에 따른 감소된 ADCC를 입증한다. 인간 N-연결 올리고당 상에 푸코스가 결여되어 있거나 그 양이 적은 경우, 이는 인간 FcγRIIIa(CD16)에 대한 항체의 개선된 결합으로 인해 ADCC를 유도하는 항체의 능력을 개선한다(문헌[Shields *et al.*, J Biol Chem 277:26733-40, 2002]). 본 발명의 항체는 1% 내지 약 10%의 감소된 푸코스 함량을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 푸코스 함량이 약 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%인 글리칸 구조를 갖는다. 따라서, 본 발명의 항체는 FcγRIIIa-158F/F 또는 FcγRIIIa-158F/V 유전자형을 갖는 환자의 치료에 더 효능이 있을 수 있다. 환자는 일상적인 방법을 사용하여 그의 FcγRIIIa 다형성에 대해 분석될 수 있다.

[0546] 본 명세서에 기재된 일부 방법에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 EGFR 억제제에 의한 치료에 대해 내성을 나타내거나 또는 획득 내성을 갖는 암을 가진 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다. 암이 내성을 획득할 수 있는 예시적인 EGFR 억제제는 항-EGFR 항체인 세툭시맙(에르비툭스®), 판티누무맙(벡티빅스(Vectibix)®), 마투주맙, 니모투주맙, 소분자 EGFR 억제제인 타르세바®(에를로티닙), 이레사(게피티닙), EKB-569(펠리티닙, 비가역적

EGFR TKI), pan-ErbB 및 다른 수용체 티로신 키나제 억제제인 라파티닙(EGFR 및 HER2 억제제), 펠리티닙(EGFR 및 HER2 억제제), 반데타닙(ZD6474, 작티마(ZACTIMA)™, EGFR, VEGFR2 및 RET TKI), PF00299804(다코미티닙, 비가역적 pan-ErbB TKI), CI-1033(비가역적 pan-erbB TKI), 아파티닙(BIBW2992, 비가역적 pan-ErbB TKI), AV-412(이중 EGFR 및 ErbB2 억제제), EXEL-7647(EGFR, ErbB2, GEVGR 및 EphB4 억제제), CO-1686(비가역적 돌연변이-선택적 EGFR TKI), AZD9291(비가역적 돌연변이-선택적 EGFR TKI), 및 HKI-272(네라티닙, 비가역적 EGFR/ErbB2 억제제)이다. 본 명세서에 기재된 방법은 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙, CO-1686, AZD9291 및/또는 세툭시맙에 의한 치료에 대해 내성을 나타내는 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 항체는 EM1-mAb이다.

[0547] 본 발명의 다른 태양은 암을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 단리된 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 대상체는 에를로티닙, 게피티닙, 아파티닙, CO-1686, AZD9291 또는 세툭시맙에 의한 치료에 대해 내성을 나타내거나 또는 획득 내성을 갖는다.

[0548] 대상체는 EGFR 억제제에 의한 치료에 대해 내성을 나타내거나, 내성이 발생되었거나, 또는 내성 발생에 취약한지를 결정하기 위해 다양한 정성적 및/또는 정량적 방법이 사용될 수 있다. EGFR 억제제에 대한 내성과 관련될 수 있는 증상은, 예를 들어 환자의 웰빙(well-being)의 감소 또는 정체, 종양 크기의 증가, 종양 성장의 정지성 또는 지연성 감소, 및/또는 체내에서 한 위치로부터 다른 기관, 조직 또는 세포로의 암성 세포의 확산을 포함한다. 암과 관련된 다양한 증상의 재확립 또는 악화는 또한, 대상체가 EGFR 억제제에 대해 내성이 발생되었거나 또는 내성 발생에 취약하다는 것을 나타낼 수 있으며, 예컨대 식욕부진, 인지 기능이상, 우울증, 호흡곤란, 피로, 호르몬 교란, 호중구감소증, 통증, 말초 신경병증, 및 성기능이상이다. 암과 관련된 증상은 암의 유형에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 자궁경부암과 관련된 증상은 비정상 출혈, 비정상적인 심한 질 분비물, 정상 월경 주기에 관계 없는 골반 통증, 방광 통증 또는 배뇨 동안의 통증, 그리고 정기적인 월경 기간들 사이의, 성교 후의, 질세척 후의, 또는 골반 조사 후의 출혈을 포함할 수 있다. 폐암과 관련된 증상은 지속적인 기침, 객혈, 숨참, 천명, 흉통, 식욕 상실, 시도 없이도 체중 감량, 및 피로를 포함할 수 있다. 간암에 대한 증상은 체중 및 식욕 상실, 복통, 특히 등 및 어깨에 미칠 수 있는 복부의 우측 상부에서의 통증, 구역 및 구토, 전신 쇠약 및 피로, 종대된 간, 복부 종창(복수), 및 피부 및 눈 흰자위의 황변(황달)을 포함할 수 있다. 종양학에서 숙련된 자는 특정 암 유형과 관련된 증상을 용이하게 확인할 수 있다.

[0549] 대상체가 EGFR 억제제에 대해 내성이 발생되었는지를 결정하기 위한 다른 수단은 암 세포에서의 EGFR 인산화, ERK1/2 인산화 및/또는 AKT 인산화를 검사하는 것을 포함하는데, 여기서는 증가된 인산화가, 대상체가 EGFR 억제제에 대해 내성이 발생되었거나 또는 내성 발생에 취약하다는 것을 나타낼 수 있다. EGFR, ERK1/2 및/또는 AKT 인산화를 결정하는 방법은 잘 알려져 있으며 본 명세서에 기재되어 있다. EGFR 억제제에 대해 내성이 발생된 대상체의 확인은, 예를 들어 순환 HGF의 증가된 수준, c-Met 유전자의 활성화 돌연변이 또는 c-Met 유전자 증폭으로부터 비롯되는 상승된 c-Met 발현 수준 또는 상승된 c-Met 활성의 검출을 포함할 수 있다.

[0550] 본 발명의 다른 실시 형태는 EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭을 갖는 NSCLC 종양 또는 종양 전이를 가진 환자에서 NSCLC를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0551] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 비소세포 폐암(NSCLC)을 치료하는 데 사용될 수 있으며, 비소세포 폐암은 편평 세포 암종, 선암종, 및 대세포 암종을 포함한다. 일부 실시 형태에서, NSCLC의 세포는 상피 표현형을 갖는다. 일부 실시 형태에서, NSCLC는 하나 이상의 EGFR 억제제에 의한 치료에 대해 획득 내성을 갖는다.

[0552] NSCLC에서, EGFR 유전자에서의 특정 돌연변이는 EGFR 티로신 키나제 억제제(EGFR-TKI)에 대한 고반응률(70 내지 80%)과 관련된다. 엑손 19에서의 5 아미노산 결실 또는 EGFR에서의 점 돌연변이 L858R은 EGFR-TKI 감수성과 관련된다(문헌[Nakata and Gotoh, Expert Opin Ther Targets 16 :771-781, 2012]). 이들 돌연변이는 EGFR 키나제 활성의 리간드-비의존성 활성화를 가져온다. EGFR 활성화 돌연변이는 NSCLC 환자의 10 내지 30%에서 일어나며, 동아시아인, 여성, 흡연 미경험자, 및 선암종 병력을 가진 환자에서 상당히 더 흔하다(문헌[Janne and Johnson Clin Cancer Res 12(14 Suppl): 4416s-4420s, 2006]). 또한, EGFR 유전자 증폭은 EGFR-TKI 치료 후의 반응과 강하게 상관된다(문헌[Cappuzzo *et al.*, J Natl Cancer Inst 97:643-55, 2005]).

[0553] EGFR 돌연변이를 가진 NSCLC 환자의 대부분은 초기에는 EGFR TKI 요법에 반응할지라도, 사실상 전부가 지속적인 반응을 방해하는 내성을 획득한다. 환자들의 50 내지 60%가 EGFR의 키나제 도메인에서의 제2-부위 점 돌연변이(second-site point mutation)(T790M)로 인한 내성을 획득한다. EGFR 티로신 키나제 억제제에 대해 내성을 나

타내게 되는 모든 종양의 거의 60%가 c-Met 발현을 증가시키거나, c-Met 유전자를 증폭시키거나, 또는 그의 유일하게 알려진 리간드인 HGF를 증가시킨다(문헌[Turke *et al.*, Cancer Cell, 17:77-88, 2010]).

[0554] 본 발명의 다른 실시 형태는 암을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 암은 EGFR 활성화 돌연변이, EGFR 유전자 증폭, 순환 HGF의 증가된 수준, c-Met 활성화 돌연변이, c-Met 유전자 증폭 또는 돌연변이체 KRAS와 관련된다.

[0555] 일부 실시 형태에서, EGFR 활성화 돌연변이는 G719A, G719X(X는 임의의 아미노산임), L861X(X는 임의의 아미노산임), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P 또는 T790M 치환, E746-A750의 결실, R748-P753의 결실, M766과 A767 사이에의 Ala(A)의 삽입, S768과 V769 사이에의 Ser, Val 및 Ala(SVA)의 삽입, 및 P772와 H773 사이에의 Asn 및 Ser(NS)의 삽입이다.

[0556] 본 발명의 다른 실시 형태는 암을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 암은 EGFR 돌연변이 L858R, T790M 또는 잔기 E746-A750의 결실(del(E746, A750)), EGFR 증폭 또는 c-Met 증폭과 관련된다.

[0557] 일부 실시 형태에서, 암은 야생형 EGFR 및 야생형 c-Met와 관련된다.

[0558] 일부 실시 형태에서, 암은 야생형 EGFR 및 c-Met 증폭과 관련된다.

[0559] 일부 실시 형태에서, 암은 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 및 야생형 c-Met와 관련된다.

[0560] 일부 실시 형태에서, 암은 EGFR 결실 del(E764, A750) 및 야생형 c-Met와 관련된다.

[0561] 일부 실시 형태에서, 암은 EGFR 결실 del(E764, A750) 및 c-Met 증폭과 관련된다.

[0562] 일부 실시 형태에서, 암은 EGFR 결실 del(E764, A750), EGFR 증폭 및 c-Met 증폭과 관련된다.

[0563] 일부 실시 형태에서, 환자는 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 및 야생형 c-Met와 관련된 NSCLC를 가진다.

[0564] 일부 실시 형태에서, 환자는 EGFR 증폭 및 야생형 c-Met와 관련된 NSCLC를 가진다.

[0565] 일부 실시 형태에서, 환자는 EGFR 증폭 및 c-Met 증폭과 관련된 NSCLC를 가진다.

[0566] 일부 실시 형태에서, 환자는 EGFR 결실 del(E764, A750) 및 야생형 c-Met와 관련된 NSCLC를 가진다.

[0567] 일부 실시 형태에서, 환자는 EGFR 결실 del(E764, A750) 및 c-Met 증폭과 관련된 NSCLC를 가진다.

[0568] 일부 실시 형태에서, 환자는 본 발명의 EM1-mAb로 치료된다. 본 발명의 EM1-mAb는 종양이 L858R, T790M, del(E746, A750) EGFR, EGFR 증폭, 야생형 c-Met 및/또는 c-Met 증폭과 관련되는 경우, 생체내 종양 동물 모델에서 효능을 보여준다. EGFR 또는 c-Met의 증폭은 표준 방법에 의해, 예를 들어 서던 블롯팅, FISH, 또는 비교 게놈 혼성화(comparative genomic hybridization, CGH)에 의해 EGFR 또는 c-Met 유전자의 카피수를 결정함으로써 평가될 수 있다.

[0569] 본 발명의 다른 실시 형태는 암을 가진 환자를 치료하는 방법으로서, 본 방법은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 암을 치료하기에 충분한 시간 동안 치료적 유효량의 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 암은 EGFR 돌연변이 L858R, T790M 또는 잔기 E746-A750의 결실(del(E746, A750)), EGFR 증폭 또는 c-Met 증폭, 및 돌연변이체 KRAS와 관련된다.

[0570] 일부 실시 형태에서, 돌연변이체 KRAS는 G12V 치환을 갖는다. KRAS는 RAS 원발암유전자 암호화 구아노신 트라이포스파타제(GTPase)의 패밀리에 속하고, 수용체의 EGFR 신호 전달 하류를 매개한다. 따라서, 원발암유전자성 KRAS 돌연변이, 예컨대 G12V 또는 G12C 활성화 돌연변이를 갖는 종양은 EGFR 항체에 의해 치료가능할 것으로 예측되지 않을 것이다. 항-EGFR 항체인 세툭시맙 또는 파니투무맙에 의한 임상 연구는 KRAS-돌연변이된 결직장 종양을 가진 환자가 이들 작용제에 반응하지 않는다는 것을 입증하였다(문헌[Van Cutsem *et al.*, N Eng J Med 360:1408-1417, 2009]; 문헌[Lievre *et al.*, J Clin Oncol 26:374-379, 2008]; 문헌[Amado *et al.*, J Clin Oncol 26:1626-1634m 2008]). 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 효과적인 ADCC를 통한 KRAS 돌연변이체 세포주 사멸을 매개하며, 이에 따라 현재의 항-EGFR 요법과 대조적으로, 암이 KRAS 활성화 돌연변이와 관련된 환자의 치료에 효능이 있을 수 있다. 그러한 예시적인 항체는 EM1-mAb이다.

[0571] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치료적 치료 및 예방학적 또는 예방적 조치 둘 모두를 지칭하며, 여기서 목적은 원치 않는 생리적 변화 또는 장애, 예컨대 암의 발생 또는 확산을 예방 또는 둔화(감퇴)시키는 것이다. 본 발명의 목적을 위하여, 유익하거나 원하는 임상 결과는, 검출가능하든 검출 불가능하든 어느 것이든 간에, 증상의 경감, 질병 정도의 저하, 안정화된(즉, 악화되지 않는) 질병 상태, 질병 진행의 지연 또는 감속, 질병 상태의 개선 또는 고식, 및 관해(부분 또는 전체 어느 것이든)를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않을 경우에 예측되는 생존과 비교할 때 연장되는 생존을 의미할 수 있다. 치료가 필요한 자들은 이미 질환 또는 장애를 가진 자들뿐만 아니라 질환 또는 장애를 갖기 쉬운 자들 또는 질환 또는 장애가 예방되어야 하는 자들을 포함한다.

[0572] "치료적 유효량"은 필요한 투여량에서 그리고 필요한 시간 동안 원하는 치료 결과를 달성하는 데 유효한 양을 지칭한다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 치료적 유효량은 개체의 질병 상태, 연령, 성별, 및 체중, 그리고 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체가 개체에서 원하는 반응을 유도하는 능력과 같은 인자들에 따라 변동될 수 있다. 내성과 관련하여 감소 또는 약화시킬 수 있는 유효한 EGFR/c-Met 치료제의 예시적인 지표는, 예를 들어 환자의 개선된 웰빙, 종양 크기의 감소 또는 축소, 종양의 정지성 또는 지연성 성장, 및/또는 체내의 다른 위치로의 암 세포의 전이의 부재를 포함한다.

[0573] **투여/약제학적 조성물**

[0574] 본 발명은 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 치료적 용도를 위하여, 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR-결합 FN3 도메인, c-Met-결합 FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 약제학적으로 허용되는 담체 중에 활성 성분으로서 유효량의 이러한 도메인, 분자, 또는 항체를 함유하는 약제학적 조성물로서 제조될 수 있다. 용어 "담체"는 활성 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애쥬번트, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 비히클은 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 것들, 예컨대 낙화생유, 대두유, 광유, 참기름 등을 포함하는, 물 및 오일과 같은 액체일 수 있다. 예를 들어, 0.4% 염수 및 0.3% 글리신이 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균성이고 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들은 종래의 잘 알려진 멸균 기법(예를 들어, 여과)에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조정제 및 완충제, 안정제, 증점제, 윤활제 및 착색제 등과 같은 생리적 조건에 근접시키기 위하여 필요한, 약제학적으로 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 그러한 약제학적 제형에서 본 발명의 분자 또는 항체의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.5 중량% 미만부터, 통상 적어도 약 1 중량%까지, 많게는 15 또는 20 중량%까지 변동될 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식에 따라, 필요 용량, 유체 부피, 점도 등에 기초하여 주로 선택될 것이다. 다른 인간 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민을 포함하는 적합한 비히클 및 제형이, 예를 들어 문헌[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(특히 pp. 958-989 참조)]에 기재되어 있다.

[0575] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR 결합 FN3 도메인, c-Met 결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 치료적 용도를 위한 투여 방식은 이러한 작용제를 숙주에게 전달하는 임의의 적합한 경로일 수 있으며, 예컨대 비경구 투여, 예를 들어 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내 또는 피하, 폐, 경점막(구강, 비강내, 질내, 직장) 투여로서, 이러한 투여에서는 정제, 캡슐, 용액, 분말, 겔, 입자 형태이고, 주사기, 이식 디바이스, 삼투압 펌프, 카트리지, 마이크로펌프 내에 담긴 제형; 또는 당업자에 의해 인식되는 다른 수단을 사용하는데, 이는 당업계에 잘 알려진 바와 같다. 부위 특이적 투여는, 예를 들어, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 혈관내, 방광내, 병변내, 질, 직장, 협측, 설하, 비강내, 또는 경피 전달에 의해 달성될 수 있다.

[0576] 따라서, 근육내 주사를 위한 본 발명의 약제학적 조성물은 1 ml의 멸균 완충수, 및 약 1 ng 내지 약 100 mg/kg, 예를 들어 약 50 ng 내지 약 30 mg/kg, 또는 더 바람직하게는 약 5 mg 내지 약 25 mg/kg의 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR-결합 FN3 도메인 또는 c-Met-결합 FN3 도메인을 함유하도록 제조될 수 있다.

[0577] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 정맥내(IV) 주입 또는 볼루스 주사에 의해 비경구로, 근육내로 또는 피하로 또는 복막내로 환자에게 투여될 수 있다. IV 주입은 짧게는 15분에 걸쳐서, 그러나 더 흔하게는 30분, 60분, 90분 또는 심지어 2시간 또는 3시간 동안 제공될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 또한 질병(예를 들어, 종양 그 자체)의 부위 내로 직접 주사될 수 있다.

암을 가진 환자에게 제공되는 용량은 치료되는 질병을 경감시키거나 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분하며("치료적 유효량"), 때때로 0.1 내지 10 mg/kg 체중, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg/kg일 수 있지만, 더욱 더 클 수 있으며, 예를 들어 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/kg일 수 있다. 고정 단위 용량, 예를 들어 50, 100, 200, 500 또는 1000 mg이 또한 제공될 수 있거나, 또는 이러한 용량은 환자의 표면적에 기초해서, 예를 들어 400, 300, 250, 200, 또는 100 mg/m^2일 수 있다. 암을 치료하기 위해 통상 1 내지 8회(예를 들어, 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회 또는 8회)의 용량이 투여될 수 있지만, 10회, 12회, 20회 또는 그 이상의 용량이 제공될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 투여는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 5주, 6주, 7주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 그 이상 후에 반복될 수 있다. 만성 투여인 바와 같이, 반복된 치료 과정이 또한 가능하다. 반복 투여는 동일한 용량으로 또는 상이한 용량으로 행해질 수 있다.

[0578] 예를 들어, 정맥내 주입을 위한 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 80 kg의 환자에 대한 투여의 경우 약 200 ml의 멸균 링거액 및 약 8 mg 내지 약 2400 mg, 약 400 mg 내지 약 1600 mg, 또는 약 400 mg 내지 약 800 mg의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 함유하도록 구성될 수 있다. 비경구로 투여가능한 조성물을 제조하기 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌["Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA]에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0579] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR-결합 FN3 도메인, c-Met-결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 저장을 위해 동결건조되고, 사용하기 전에 적합한 담체 중에서 재구성될 수 있다. 이 기법은 종래의 단백질 제제에 유효한 것으로 밝혀져 있으며, 공지된 동결건조 및 재구성 기법이 사용될 수 있다.

[0580] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR-결합 FN3 도메인, c-Met-결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 동시적으로, 순차적으로 또는 개별적으로 제2 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 제2 치료제는 화학치료제 또는 표적화된 항암 요법일 수 있다.

[0581] 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는 당업자에게 알려진 화학치료 약물들 또는 다른 항암 치료제들 중 어느 하나 이상과 함께 투여될 수 있다. 화학치료제는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이며, 성장 억제제 또는 다른 세포독성제를 포함하고, 알킬화제, 항대사물제, 항미세관 억제제, 토포이소머라제 억제제, 수용체 티로신 키나제 억제제, 혈관생성 억제제 등을 포함한다. 화학치료제의 예에는 하기가 포함된다: 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파미드(사이톡산(CYTOXAN)®); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보퀀, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아밀아민 - 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포아미드, 트라이에틸렌티오포스포아미드 및 트라이메틸올로멜라민을 포함함 -; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 퀠라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물제, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-FU; 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 다이데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀀; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀀; 2,2′ ,2″ -트라이클로로트라이에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드 또는

탁세인 패밀리의 구성원, 예컨대 파클리탁셀(탁솔(TAXOL)®), 도세탁셀(탁소테레(TAXOTERE)®) 및 이들의 유사체; 클로람부실; 겜시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 다이플루오로메틸로르니틴(DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 소라페닙(넥사바르(NEXAVAR)®), 수니티닙(수텐트(SUTENT)®), 파조파닙(보트리엔트(VOTRIENT)™), 토세라닙(팔라디아(PALLADIA)™), 반데타닙(작티마™), 세디라닙(레센틴(RECENTIN)®), 레고라페닙(BAY 73-4506), 악시티닙(AG013736), 레스타우르티닙(CEP-701), 에를로티닙(타르세바®), 게피티닙(이레사™), BIBW 2992(토복(TOVOK)™), 라파티닙(타이케르브(TYKERB)®), 네라티닙(HKI-272) 등을 포함하는, 수용체 티로신 키나제 및/또는 혈관생성의 억제제, 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체. 이러한 정의에서는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하도록 작용하는 항-호르몬제, 예컨대 하기가 또한 포함된다: 항-에스트로겐제 - 예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜(파레스톤(FARESTON)®)을 포함함 -; 및 항-안드로겐제, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 류프롤라이드, 및 고세렐린; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체. 문헌[Wiemann et al., 1985, in *Medical Oncology* (Calabresi et aL, eds.), Chapter 10, McMillan Publishing]에 개시된 것들과 같은 다른 종래의 세포독성 화학적 화합물이 또한 본 발명의 방법에 적용가능하다.

[0582] 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자, EGFR-결합 FN3 도메인, c-Met-결합 FN3 도메인 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 병용하여 사용될 수 있는 예시적인 작용제는 티로신 키나제 억제제 및 표적화된 항암 요법, 예컨대 이레사®(게피티닙) 및 타르세바(에를로티닙) 및 HER2, HER3, HER4 또는 VEGF의 다른 길항제를 포함한다. 예시적인 HER2 길항제는 CP-724-714, 헤르셉틴(HERCEPTIN)™(트라스투주맙), 옴니타르그(OMNITARG)™(페르투주맙), TAK-165, 라파티닙(EGFR 및 HER2 억제제), 및 GW-282974를 포함한다. 예시적인 HER3 길항제는 항-Her3 항체를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 US2004/0197332호 참조). 예시적인 HER4 길항제는 항-HER4 siRNA를 포함한다(예를 들어, 문헌[Maatta *et al.,* Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006] 참조). 예시적인 VEGF 길항제는 베바시주맙(아바스틴(Avastin)™)이다.

[0583] 소분자가 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 병용하여 사용되는 경우 이는 전형적으로 더 흔히, 바람직하게는 일일 1회 투여되지만, 일일 2회, 3회, 4회 또는 그 이상이 또한 가능한데, 이는 격일, 매주 또는 어떤 다른 간격에서도 마찬가지이다. 소분자 약물은 흔히 경구 섭취되지만, 비경구 투여, 예를 들어 IV 주입 또는 볼루스 주사에 의한 투여 또는 피하 또는 근육내 투여가 또한 가능하다. 소분자 약물의 용량은 전형적으로 10 내지 1000 mg, 또는 약 100, 150, 200 또는 250 mg일 수 있다.

[0584] 본 발명의 이중특이성 항체가 제2 치료제와 병용하여 투여되는 경우 이러한 병용은 임의의 편리한 기간에 걸쳐 일어날 수 있다. 예를 들어, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 제2 치료제는 동일한 날에, 그리고 심지어는 동일한 정맥내 주입으로 환자에게 투여될 수 있다. 그러나, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 제2 치료제는 또한 하루씩 교대로 또는 1주씩, 2주씩 또는 1개월씩 교대로 등으로 투여될 수 있다. 일부 방법에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 제2 치료제는 이들이 치료되고 있는 환자에서 검출가능한 수준으로 (예를 들어, 혈청 중에) 동시적으로 존재하기에 충분한 시간 근접성을 두고서 투여된다. 일부 방법에서, 일정 기간에 걸쳐 다회의 용량들로 이루어진 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 전체 치료 과정에는 다회의 용량들로 또한 이루어진 제2 치료제의 치료 과정이 후속되거나 또는 이것이 선행된다. 일부 방법에서, 두 번째로 투여되는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 의한 치료는 환자가 초기에 투여되는 제2 치료제에 대해 내성을 갖거나 또는 내성이 발생된다면 시작한다. 환자는 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 및 제2 치료제 중 하나 또는 둘 모두에 의한 치료의 단회 과정 또는 다회 과정을 받을 수 있다. 1일, 2일 또는 수일 또는 1주 2주 또는 수주의 회복 기간이 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 제2 치료제의 투여 사이에서 사용될 수 있다. 적합한 치료 계획(treatment regiment)이 제2 치료제에 대해 이미 확립되었을 때, 이러한 계획은 본 발명의 이중특이성 EGFR/c-Met 항체와 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 타르세바®(에를로티닙)는 일일 1회 100 mg 또는 150 mg의 환제(pill)로서 섭취되고, 이레사®(게피티닙)는 매일 250 mg의 정제로서 섭취된다.

[0585] 이중특이성 EGFR/c-Met 항체는, 선택적으로 제2 치료제와 병용하여, 외부 빔 방사, 강도 조절 방사선 요법(intensity modulated radiation therapy, IMRT) 및 임의의 형태의 방사선 수술 - 감마 나이프(Gamma Knife), 사이버나이프(Cyberknife), 리낙(Linac), 및 조직내 방사(interstitial radiation)(예를 들어, 이식된 방사성 시드 글리아사이트 벌룬(GliaSite balloon)을 포함함 - 을 포함하는 임의의 형태의 방사선 요법과 함께 그리고/

또는 수술과 함께 투여될 수 있다. 방사선 요법과의 병용은 두경부암 및 뇌 종양에 특히 적절할 수 있다.

[0586] 본 발명을 일반적인 개념으로 설명하였지만, 본 발명의 실시 형태는 하기 실시예에서 추가로 개시될 것이며, 이때 실시예는 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0587] **실시예 1. 텐콘 라이브러리의 작제**

[0588] 텐콘(서열 번호 1)은 인간 테나신-C로부터의 15개의 FN3 도메인의 공통 서열로부터 설계된, 면역글로불린-유사 스캐폴드 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인이다(문헌[Jacobs *et al.,* Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012]; 미국 특허 출원 공개 제2010/0216708호). 텐콘의 결정 구조는 7개의 베타-가닥을 연결시키는 6개의 표면-노출된 루프를 보여준다. 이들 루프, 또는 각각의 루프 내의 선택된 잔기들은, 특정 표적에 결합하는 신규한 분자들을 선택하는 데 사용될 수 있는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인의 라이브러리를 작제하기 위하여 무작위화될 수 있다.

[0589] 텐콘:

[0590] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT(서열 번호 1):

[0591] **TCL1 라이브러리의 작제**

[0592] 텐콘(서열 번호 1)의 FG 루프만을 무작위화하도록 설계된 라이브러리, TCL1을 *cis*-디스플레이 시스템과 함께 사용하기 위해 작제하였다(문헌[Jacobs *et al.,* Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012]). 이 시스템에서는, Tac 프로모터를 위한 서열들, 텐콘 라이브러리 암호화 서열, RepA 암호화 서열, cis-요소, 및 ori 요소를 도입시킨 단일-가닥 DNA를 생성한다. 시험관내 전사/번역 시스템에서의 발현시에, 텐콘-RepA 융합 단백질의 복합체를 생성하는데, 이는 *cis*에서 그것을 암호화하는 DNA에 결합된다. 이어서, 표적 분자에 결합하는 복합체를 단리하고 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭시키는데, 이는 하기에 기재된 바와 같다.

[0593] PCR의 연속 라운드에 의해 *cis*-디스플레이와 함께 사용하기 위한 TCL1 라이브러리의 작제를 달성하여, 2개의 절반 부분에서 최종 선형 이중 가닥 DNA 분자를 생성하였으며; 5' 단편은 프로모터 및 텐콘 서열을 함유하며, 반면 3' 단편은 *repA* 유전자와 cis- 및 ori 요소를 함유한다. 전체 작제물을 생성하기 위하여 제한 효소분해(restriction digest)에 의해 이들 2개의 절반 부분을 조합한다. 텐콘의 FG 루프, KGGHRSN(서열 번호 86)에만 무작위 아미노산을 도입시키도록 TCL1 라이브러리를 설계하였다. 이 라이브러리의 작제에서는 NNS 코돈을 사용하였으며, 그 결과 FG 루프 내로의 모두 20개의 아미노산 및 하나의 정지 코돈의 도입이 가능하게 되었다. TCL1 라이브러리는 6개의 별개의 서브-라이브러리를 함유하며, 이들 각각은 다양성을 더욱 증가시키기 위하여 7 내지 12개 잔기의 상이한 무작위화된 FG 루프 길이를 갖는다. 텐콘-기반 라이브러리의 설계가 표 2에 나타나 있다.

[0594] [표 2]

라이브러리	BC 루프 설계	FG 루프 설계
WT 텐콘	TAPDAAFD*	KGGHRSN**
TCL1	TAPDAAFD*	XXXXXXX
		XXXXXXXX
		XXXXXXXXX
		XXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXX
		XXXXXXXXXXXX
TCL2	########	#####S##

*TAPDAAFD: 서열 번호 1 의 잔기 22-28;
**KGGHRSN: 서열 번호 86
X 는 NNS 코돈에 의해 암호화된 축퇴 아미노산을 지칭한다.
#은 본문에 기재된 "아미노산의 설계된 분포"를 지칭한다.

[0595]

[0596] TCL1 라이브러리를 작제하기 위하여, PCR의 연속 라운드를 수행하여 Tac 프로모터를 부착하고, FG 루프 내로 축퇴를 구축하고, 최종 조립체를 위해 필요한 제한 부위들을 부가한다. 먼저, PCR에 의해 2개의 단계로 FG 루프의 프로모터 서열 및 텐콘 서열 5'을 함유하는 DNA 서열을 생성하였다. 완전 텐콘 유전자 서열에 상응하는 DNA를, 프라이머 POP2220(서열 번호 2) 및 TC5'toFG(서열 번호 3)를 이용하여 PCR 템플릿으로서 사용하였다. 이 반응으로부터 생성된 PCR 생성물을 프라이머 130mer(서열 번호 4) 및 Tc5'toFG를 이용하여 PCR 증폭의 다음 라운드를 위한 템플릿으로서 사용하여 텐콘에 대한 5' 및 프로모터 서열의 부착을 완성하였다. 다음으로, 순방향 프라이머 POP2222(서열 번호 5), 및 역방향 프라이머 TCF7(서열 번호 6), TCF8(서열 번호 7), TCF9(서열 번호 8), TCF10(서열 번호 9), TCF11(서열 번호 10), 또는 TCF12(서열 번호 11) - 이들은 축퇴 뉴클레오티드를 함유함 - 를 이용하여, 첫 번째 단계에서 생성된 DNA 생성물을 증폭시킴으로써 FG 루프 내로 다양성을 도입시켰다. PCR 사이클을 최소화하고 라이브러리의 다양성을 최대화하기 위하여, 적어도 8회의 100 μL PCR 반응을 각각의 서브-라이브러리에 대해 수행하였다. 5 *μg* 이상의 이 PCR 생성물을 겔 정제하고, 프라이머 POP2222(서열 번호 5) 및 POP2234(서열 번호 12)를 이용하여 후속 PCR 단계에서 사용하였으며, 그 결과 텐콘 서열의 3' 말단에 6xHis 태그 및 NotI 제한 부위가 부착되었다. 단지 15회의 PCR 사이클 및 500 ng 이상의 템플릿 DNA를 사용하여 이 PCR 반응을 수행하였다. 생성된 PCR 생성물을 겔 정제하고, NotI 제한 효소로 효소분해하고, 퀴아젠(Qiagen) 컬럼에 의해 정제하였다.

[0597] 이 라이브러리의 3' 단편은 디스플레이를 위한 요소들을 함유하는 불변 DNA 서열이며, 이러한 요소들은 PspOMI 제한 부위, *repA* 유전자의 암호화 영역, 그리고 cis- 및 ori 요소를 포함한다. M13 순방향 및 M13 역방향 프라이머를 이용하여, 이 DNA 단편을 함유하는 플라스미드(pCR4Blunt)(인비트로젠(Invitrogen))를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 생성된 PCR 생성물을 PspOMI에 의해 하룻밤 효소분해하고 겔 정제하였다. 라이브러리 DNA의 5' 부분을 *repA* 유전자를 함유하는 3' DNA에 연결하기 위하여, NotI 및 PspOMI 효소 및 T4 리가제의 존재 하에서 2 pmol의 5' DNA를 등몰량의 3' *repA* DNA에 연결하였다. 37℃에서 하룻밤 연결 후에, 연결된 DNA의 극히 일부분을 겔 상에서 이동시켜 연결 효율을 검사하였다. 연결된 라이브러리 생성물을 12회의 PCR 증폭으로 분할하였으며, 프라이머 쌍 POP2250(서열 번호 13)과 DidLigRev(서열 번호 14)를 이용하여 12-사이클 PCR 반응을 실시하였다. TCL1 라이브러리의 각각의 서브-라이브러리에 대한 DNA 산출량은 32 내지 34 *μg*의 범위였다.

[0598] 이 라이브러리의 품질을 평가하기 위하여, 프라이머 Tcon5new2(서열 번호 15) 및 Tcon6(서열 번호 16)을 이용하여 작업 라이브러리의 극히 일부분을 증폭시켰으며, 리가제-비의존성 클로닝을 통해 변형된 pET 벡터 내로 클로닝하였다. 플라스미드 DNA를 BL21-GOLD(DE3) 컴피턴트 세포(competent cell)(스트라타진(Stratagene)) 내로 형질전환시켰으며, 96개의 무작위로 선택된 콜로니를 T7 프로모터 프라이머를 이용하여 서열화하였다. 어떠한 중복 서열도 발견되지 않았다. 전체적으로, 클론의 대략 70 내지 85%는 프레임-시프트 돌연변이 없이 완전한 프로모터 및 텐콘 암호화 서열을 가졌다. 정지 코돈을 갖는 클론을 제외한 기능적 서열 비율은 59% 내지 80%였다.

[0599] **TCL2 라이브러리의 작제**

[0600] 텐콘의 BC 루프 및 FG 루프 둘 모두를 무작위화하고 각각의 위치에서의 아미노산들의 분포를 엄격하게 제어한 TCL2 라이브러리를 작제하였다. 표 3은 TCL2 라이브러리 내의 원하는 루프 위치들에서의 아미노산 분포를 나타낸다. 설계된 아미노산 분포는 2가지 목적을 가졌다. 첫째, 텐콘 결정 구조의 분석에 기초하여 그리고/또는 상동성 모델링으로부터 텐콘 접힘 및 안정성에 있어서 구조적으로 중요할 것으로 예측되는 잔기들 쪽으로 라이브러리를 편향시켰다. 예를 들어, 단지 소수성 아미노산들의 서브세트이도록 위치 29를 고정시켰는데, 이는 이 잔기를 텐콘 접힘부의 소수성 코어 내에 매립하였을 때이다. 설계의 제2 단계는, 고친화성 결합물질(high-affinity binder)을 효율적으로 생성하기 위해, 항체의 중쇄 HCDR3에서 우선적으로 발견되는 잔기들의 아미노산 분포 쪽으로 아미노산 분포를 편향시키는 것을 포함하였다(문헌[Birtalan *et al.*, J Mol Biol 377:1518-28, 2008]; 문헌[Olson *et al.*, Protein Sci 16:476-84, 2007]). 이러한 목적을 향하여, 표 3의 "설계된 분포"는 다음과 같은 분포를 지칭한다: 6% 알라닌, 6% 아르기닌, 3.9% 아스파라긴, 7.5% 아스파르트산, 2.5% 글루탐산, 1.5% 글루타민, 15% 글리신, 2.3% 히스티딘, 2.5% 아이소류신, 5% 류신, 1.5% 라이신, 2.5% 페닐알라닌, 4% 프롤린, 10% 세린, 4.5% 트레오닌, 4% 트립토판, 17.3% 티로신, 및 4% 발린. 이 분포에는 메티오닌, 시스테인, 및 정지 코돈이 없다.

[0601] [표 3]

잔기 위치*	WT 잔기	TCL2 라이브러리에서의 분포
22	T	설계된 분포
23	A	설계된 분포
24	P	50% P + 설계된 분포
25	D	설계된 분포
26	A	20% A + 20% G + 설계된 분포
27	A	설계된 분포
28	F	20% F, 20% I, 20% L, 20% V, 20% Y
29	D	33% D, 33% E, 33% T
75	K	설계된 분포
76	G	설계된 분포
77	G	설계된 분포
78	H	설계된 분포
79	R	설계된 분포
80	S	100% S
81	N	설계된 분포
82	P	50% P + 설계된 분포

[0602] *잔기 넘버링은 서열 번호 1 의 텐콘 서열에 기초한다.

[0603] TCL2 라이브러리의 5' 단편은 라이브러리 풀(슬로닝 바이오테크놀로지(Sloning Biotechnology))로서 화학적으로 합성된 텐콘(서열 번호 1)의 암호화 영역 및 프로모터를 함유하였다. 이 DNA 풀은 적어도 1 × 10^{11}개의 상이한 구성원들을 함유하였다. 이 단편의 말단에, *RepA*에 대한 연결을 위한 설계시에 BsaI 제한 부위를 포함시켰다.

[0604] 이 라이브러리의 3' 단편은 디스플레이를 위한 요소들을 함유하는 불변 DNA 서열이었으며, 이러한 요소들은 6xHis 태그, *repA* 유전자의 암호화 영역, 및 cis-요소를 포함한다. 기존의 DNA 템플릿(상기)과, 프라이머 LS1008(서열 번호 17) 및 DidLigRev(서열 번호 14)를 사용하여 PCR 반응에 의해 DNA를 제조하였다. 완전한 TCL2 라이브러리를 조립하기 위하여, 총 1 μg의 BsaI-효소분해된 5' 텐콘 라이브러리 DNA를, 동일한 효소를 이용하여 제한 효소분해에 의해 제조된 3.5 μg의 3' 단편에 연결하였다. 하룻밤 연결 후에, 퀴아젠 컬럼에 의해 DNA를 정제하였으며, 260 nm에서 흡광도를 측정함으로써 DNA를 정량화하였다. 연결된 라이브러리 생성물을 프라이머 쌍 POP2250(서열 번호 13)과 DidLigRev(서열 번호 14)를 이용하여 12-사이클 PCR 반응에 의해 증폭시켰다. 총 72회의 반응을 수행하였으며, 각각의 반응은 템플릿으로서 50 ng의 연결된 DNA 생성물을 포함하였다. TCL2 작업 라이브러리 DNA의 총 산출량은 약 100 μg이었다. 라이브러리 TCL1에 대해 전술된 바와 같이, 작업 라이브러리의 극히 일부분을 서브-클로닝하고 서열화하였다. 어떠한 중복 서열도 발견되지 않았다. 서열의 약 80%는 프레임-시프트 돌연변이 없이 완전한 프로모터 및 텐콘 암호화 서열을 함유하였다.

[0605] **TCL14 라이브러리의 작제**

[0606] 상부(BC, DE, 및 FG) 및 하부(AB, CD, 및 EF) 루프, 예를 들어 FN3 도메인 내의 보고된 결합 표면은 FN3 구조의 중심을 형성하는 베타-가닥들에 의해 분리된다. 루프들만에 의해 형성된 표면과 상이한 형상들을 갖는 FN3 도메인의 2개의 "측(side)" 상에 존재하는 대체 표면은 2개의 역평행 베타-가닥, 즉 C 및 F 베타-가닥과, CD 및 FG 루프에 의해 FN3 도메인의 일측에 형성되고, 본 명세서에서 C-CD-F-FG 표면이라 칭한다.

[0607] 도 1에 나타낸 바와 같이 C 및 F 가닥뿐만 아니라 CD 및 FG 루프의 부분들의 선택된 표면 노출된 잔기들을 무작위화함으로써 텐콘의 대체 표면을 무작위화하는 라이브러리를 생성하였다. 텐콘(서열 번호 1)과 비교할 때 하기의 치환을 갖는 텐콘27(서열 번호 99)의 텐콘 변이체를 사용하여 라이브러리를 생성하였다: E11R L17A, N46V, E86I. 이 라이브러리를 작제하는 데 사용되는 방법에 대한 충분한 설명이 미국 특허 출원 공개 US2013/0226834호에 기재되어 있다.

[0608] **실시예 2: EGFR에 결합하여 EGF 결합을 억제하는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인의 선택**

[0609] **라이브러리 스크리닝**

[0610] *cis*-디스플레이를 사용하여 TCL1 및 TCL2 라이브러리로부터 EGFR 결합 도메인을 선택하였다. IgG1 Fc에 융합된 EGFR의 재조합 인간 세포외 도메인(알앤디 시스템즈(R&D Systems))을 표준 방법을 사용하여 비오티닐화하고 패닝(panning)에 사용하였다(서열 번호 73의 전 길이 EGFR의 잔기 25-645). 시험관내 전사 및 번역(ITT)을 위해, 2 내지 6 μg의 라이브러리 DNA를, 100 μL의 총 부피로 0.1 mM의 완전 아미노산, 1X S30 프리믹스 성분들, 및 30 μL의 S30 추출물(프로메가(Promega))과 함께 30℃에서 인큐베이팅하였다. 1시간 후에, 450 μL의 블로킹 용액(blocking solution)(2% 소혈청 알부민, 100 μg/mL의 청어 정자(herring sperm) DNA, 및 1 mg/mL의 헤파린으로 보충된 PBS pH 7.4)을 첨가하였으며, 반응물을 15분 동안 얼음 상에서 인큐베이팅하였다. 실온에서 1시간 동안 블로킹 용액 중에서 재조합 인간 EGF(알앤디 시스템즈)를 비오티닐화 재조합 EGFR-Fc와 혼합함으로써 1:1 및 10:1의 EGFR 대 EGF의 몰비로 EGFR-Fc:EGF 복합체를 조립하였다. 결합을 위하여, 500 μL의 블로킹된 ITT 반응물을 100 μL의 EGFR-Fc:EGF 복합체와 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였으며, 이후에 결합된 복합체를 뉴트라비딘 또는 스트렙타비딘 자성 비드(세라딘(Seradyn))를 사용하여 아래로 끌어당겼다. 결합되지 않은 라이브러리 구성원들을 PBST 및 PBS를 사용하여 연속 세척에 의해 제거하였다. 세척 후에, 10분 동안 65℃로 가열함으로써 결합된 복합체로부터 DNA를 용출하고, PCR에 의해 증폭시키고, 패닝의 추가 라운드를 위해 제한 효소분해 및 연결에 의해 RepA를 암호화하는 DNA 단편에 부착하였다. 각각의 라운드 동안 200 nM로부터 50 nM까지 표적 EGFR-Fc의 농도를 연속해서 낮추고 세척 엄격성(washing stringency)을 증가시킴으로써 고친화성 결합물질을 단리하였다. 라운드 4 및 5에서는, PBS 중에서 하룻밤 10배 몰 과량의 비오티닐화되지 않은 EGFR-Fc의 존재 하에서 세척함으로써 결합되지 않은 FN3 도메인 및 약하게 결합된 FN3 도메인을 제거하였다.

[0611] 패닝 후에, 선택된 FN3 도메인을 올리고뉴클레오티드 Tcon5new2(서열 번호 15) 및 Tcon6(서열 번호 16)을 사용하여 PCR에 의해 증폭시키고, 리가제 비의존성 클로닝 부위를 포함하도록 변형된 pET 벡터 내로 서브클로닝하고, 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 *E. 콜리* 내에서의 가용성 발현을 위하여 BL21-GOLD(DE3)(스트라타진) 세포 내로 형질전환시켰다. C-말단 폴리-히스티딘 태그를 암호화하는 유전자 서열을 각각의 FN3 도메인에 부가하여 정제 및 검출을 가능하게 하였다. 37℃에서 1 mL 96웰 블록들 내에서, 100 μg/mL의 카르베니실린으로 보충된 2YT 배지 중에서 배양물을 0.6 내지 0.8의 광학 밀도로 성장시켰으며, 그 후에 IPTG를 1 mM까지 첨가하였으며, 이 시점에서 온도를 30℃로 감소시켰다. 세포를 원심분리에 의해 대략 16시간 후에 수거하고, -20℃에서 동결시켰다. 45분 동안 실온에서 진탕하면서 0.6 mL의 버그버스터(BugBuster)® HT 용해 완충액(노바젠 이엠디 바이오사이언시스(Novagen EMD Biosciences)) 중에서 각각의 펠릿을 인큐베이팅함으로써 세포 용해를 달성하였다.

[0612] **세포 상에서의 EGFR에 결합하는 FN3 도메인의 선택**

[0613] 더 생리적인 환경에서 상이한 FN3 도메인들이 EGFR에 결합하는 능력을 평가하기 위하여, A431 세포에 결합하는 그들의 능력을 측정하였다. A431 세포(ATCC, 카탈로그 번호 CRL-1555)는 세포당 약 2 × 10^6개의 수용체로 EGFR을 과발현시킨다. 불투명한 흑색 96웰 플레이트들 내에서 세포를 5,000개/웰로 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. FN3 도메인-발현 세균 용해물(expressing bacterial lysate)을 FACS 염색 완충액(벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson)) 중에 1,000배로 희석시키고 3개의 반복된 플레이트 내에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 용해물을 회수하였으며, 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였다. 실온에서 20분 동안 FACS 염색 완충액 중에 1:100으로 희석된 50 μL/웰의 항-펜타

히스-알렉사488(anti-penta His-Alexa488) 항체 접합체(퀴아젠)와 함께 세포를 인큐베이팅하였다. 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였으며, 이후에 웰들을 100 μL의 FACS 염색 완충액으로 충전하고, 아큐멘(Acumen) eX3 판독기를 사용하여 488 nm에서 형광을 판독하였다. FN3 도메인을 함유하는 세균 용해물을 A431 세포에 결합하는 그의 능력에 대해 스크리닝하였으며(TCL1 및 TCL2 라이브러리에 대해 1320개의 조(crude) 세포 용해물), 516개의 양성 클론을 확인하였는데, 여기서 결합은 백그라운드 신호에 비하여 10배 이상이었다. TCL14 라이브러리로부터의 300개의 용해물을 결합에 대해 스크리닝하였으며, 그 결과 58개의 특유의 FN3 도메인 서열이 EGFR에 대해 결합을 생성하였다.

[0614] **세포 상에서의 EGFR에 대한 EGF의 결합을 억제하는 FN3 도메인의 선택**

[0615] EGFR 결합의 기전을 보다 잘 특성화하기 위하여, 다양한 확인된 FN3 도메인 클론이 EGF-경쟁적 방식으로 EGFR에 결합하는 능력을 A431 세포를 사용하여 측정하였으며, A431 결합 검정 스크린과 병행하여 실시하였다. 불투명한 흑색 96웰 플레이트들 내에서 A431 세포를 5,000개/웰로 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. 3개의 반복된 플레이트 내에서 실온에서 1시간 동안 50 μL/웰의 1:1,000 희석된 세균 용해물과 함께 세포를 인큐베이팅하였다. 비오티닐화 EGF(인비트로젠, 카탈로그 번호 E-3477)를 30 ng/mL의 최종 농도가 되도록 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였다. 실온에서 20분 동안 FACS 염색 완충액 중에 1:100으로 희석된 50 μL/웰의 스트렙타비딘-피코에리트린 접합체(인비트로젠)와 함께 세포를 인큐베이팅하였다. 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였으며, 이후에 웰들을 100 μL의 FACS 염색 완충액으로 충전하고, 아큐멘 eX3 판독기를 사용하여 600 nm에서 형광을 판독하였다.

[0616] FN3 도메인을 함유하는 세균 용해물을 전술된 EGF 경쟁 검정에서 스크리닝하였다. TCL1 및 TCL2 라이브러리로부터의 1320개의 조 세균 용해물을 스크리닝하였으며, 그 결과 451개의 양성 클론이 EGF 결합을 50% 초과로 억제하게 되었다.

[0617] **EGFR에 결합하는 것으로 확인된 FN3 도메인의 발현 및 정제**

[0618] 히스 멀티트랩(His MultiTrap)™ HP 플레이트(지이 헬쓰케어(GE Healthcare))를 사용하여, 청징화된(clarified) *E. 콜리* 용해물로부터 His-태깅된 FN3 도메인을 정제하였으며, pH 7.4에서 20 mM 인산나트륨, 500 mM 염화나트륨, 및 250 mM 이미다졸을 함유하는 완충액 중에서 용출시켰다. 정제된 샘플을 PD 멀티트랩™ G-25 플레이트(지이 헬쓰케어)를 사용하여 분석을 위하여 PBS pH 7.4 중으로 교환하였다.

[0619] **크기 배제 크로마토그래피 분석**

[0620] 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 EGFR에 결합하는 FN3 도메인들의 응집 상태를 결정하였다. 각각의 정제된 FN3 도메인의 분취물들(10 μL)을 PBS pH 7.4의 이동상에서 0.3 mL/min의 유량으로 수퍼덱스(Superdex) 75 5/150 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에 주입하였다. 컬럼으로부터의 용출을 280 nm에서의 흡광도에 의해 모니터링하였다. SEC에 의해 고수준의 응집을 나타낸 FN3 도메인은 추가 분석으로부터 제외시켰다.

[0621] **EGFR-Fc로부터의 선택된 EGFR-결합 FN3 도메인의 해리-속도(off-rate)**

[0622] 선택된 EGFR-결합 FN3 도메인을 스크리닝하여, 프로테온 XPR-36 기기(바이오라드)에서 EGFR-Fc에 결합시에 느린 해리-속도(k_{off})를 갖는 것들을 확인하여 고친화성 결합물질의 선택을 용이하게 하였다. 5 ㎍/mL 농도의 염소 항-인간 Fc IgG(알앤디 시스템즈)를, 칩 상에서 수평으로 배향된 모두 6개의 리간드 채널 상에서 0.005% 트윈(Tween)-20을 함유하는 PBS 중의 30 μL/min의 유량으로 (pH 5.0에서의) 아민 커플링을 통해 직접 고정화하였다. 고정화 밀도는 상이한 채널들 사이에 5% 미만의 변동을 갖고서 약 1500 반응 단위(Response Unit, RU)의 평균을 취하였다. 항-인간 Fc IgG 표면 상에 EGFR-Fc를 수직 리간드 배향으로 약 600 RU의 밀도로 포획하였다. 시험되는 모든 FN3 도메인을 1 μM의 농도에 대해 정규화하고 수평 배향으로 그들의 결합에 대해 시험하였다. FN3 도메인에 대해 모두 6개의 분석물 채널을 사용하여 스크리닝 처리량을 최대화하였다. 해리상(dissociation phase)을 100 μL/min의 유량으로 10분 동안 모니터링하였다. 분석물과 고정화된 IgG 표면 사이의 비특이적 결합을 모니터링하기 위해 스폿간(inter-spot) 결합 신호를 기준으로 사용하였으며, 이를 모든 결합 반응으로부터 제하였다. 처리된 결합 데이터를 1:1 단순 랭뮤어 결합 모델(simple Langmuir binding model)에 국소적으로 피팅하여, 포획된 EGFR-Fc에 대한 각각의 FN3 도메인의 결합에 대한 k_{off}를 얻었다.

[0623] **EGF-자극된 EGFR 인산화의 억제**

[0624] 정제된 EGFR-결합 FN3 도메인을 단일 농도로 A431 세포에서의 EGFR의 EGF-자극된 인산화를 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. EGFR 포스포(Tyr1173) 키트(EGFR phospho(Tyr1173) kit)(메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery))를 사용하여 EGFR 인산화를 모니터링하였다. 투명한 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들(눈크(Nunc)) 내에서, 10% 소태아 혈청(FBS)(깁코(Gibco))과 함께 글루타맥스(GlutaMAX)™를 함유하는 100 μL/웰의 RPMI 배지(깁코) 중에서 세포를 20,000개/웰로 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. 배양 배지를 완전히 제거하였으며, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 FBS를 함유하지 않는 100 μL/웰의 배지 중에 세포를 하룻밤 기아상태에 두었다. 이어서, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 1시간 동안 2 μM의 농도로 EGFR-결합 FN3 도메인을 함유하는 100 μL/웰의 예비가온된(37℃) 기아 배지(starvation medium)로 세포를 처리하였다. 대조군은 단지 기아 배지만으로 처리하였다. 100 ng/mL의 재조합 인간 EGF(알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 236-EG)를 함유하는 100 μL/웰의 예비가온된(37℃) 기아 배지를, 50 ng/mL의 EGF 및 1 μM의 EGFR-결합 FN3 도메인의 최종 농도가 되도록 첨가하고 온화하게 혼합하고, 15분 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이팅함으로써 세포를 자극하였다. 일 세트의 대조군 웰을 음성 대조군으로서 자극되지 않은 채로 그대로 두었다. 배지를 완전히 제거하였으며, 제조자의 사용설명서에 따라, 진탕하면서 실온에서 10분 동안 100 μL/웰의 완전 용해 완충액(Complete Lysis Buffer)(메조 스케일 디스커버리)으로 세포를 용해시켰다. 티로신 1173 상에서 인산화된 EGFR을 측정하도록 구성된 검정 플레이트(assay plate)(메조 스케일 디스커버리)를, 1.5 내지 2시간 동안 실온에서 제조자의 사용설명서에 따라, 제공된 블로킹 용액으로 블로킹하였다. 이어서, 플레이트를 200 μL/웰의 1X 트리스 세척 완충액(1X Tris Wash Buffer)(메조 스케일 디스커버리)으로 4회 세척하였다. 세포 용해물의 분취물들(30 μL/웰)을 검정 플레이트에 옮겼으며, 이를 플레이트 밀봉 필름(브이더블유알(VWR))으로 커버하고, 1시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이팅하였다. 검정 플레이트를 200 μL/웰의 트리스 세척 완충액으로 4회 세척하였으며, 이후에 25 μL의 빙랭(ice-cold) 검출 항체 용액(Detection Antibody Solution)(메조 스케일 디스커버리)을 각각의 웰에 첨가하였는데, 이때 기포를 도입시키지 않도록 신중하게 하였다. 1시간 동안 진탕하면서 실온에서 플레이트를 인큐베이팅한 후, 200 μL/웰의 트리스 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 150 μL/웰의 판독 완충액(Read Buffer)(메조 스케일 디스커버리)을 첨가하고, 제조자-설정 검정-전용 디폴트 세팅(manufacturer-installed assay-specific default setting)을 사용하여 섹터(SECTOR)® 이미저 6000 기기(메조 스케일 디스커버리) 상에서 판독함으로써 신호를 검출하였다. EGF-자극된 양성 대조군 신호의 %억제율을 각각의 EGFR-결합 FN3 도메인에 대해 계산하였다.

[0625] EGF-자극된 EGFR 인산화의 억제를 TCL1 및 TCL2 라이브러리로부터의 232개의 확인된 클론에 대해 측정하였다. 이들 클론 중 22개는 1 μM 농도에서 EGFR 인산화를 50% 이상으로 억제하였다. 불량하게 발현되었거나 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 다량체성인 것으로 판단된 클론을 제거한 후에, 9개의 클론을 추가의 생물학적 특성화를 위해 운반하였다. 이들 클론의 BC 및 FG 루프 서열이 표 4에 나타나 있다. 9개의 선택된 클론들 중 8개는 공통 FG 루프 서열(HNVYKDTNMRGL; 서열 번호 95)을 가졌으며, 상당한 유사성을 갖는 영역들이 몇몇 클론들 사이에서 그들의 BC 루프 서열에서 관찰되었다.

[0626] [표 4]

FN3 도메인		BC 루프		FG 루프	
클론 ID	서열 번호:	서열	서열 번호:	서열	서열 번호:
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

[0627]

[0628] **실시예 3: EGF 결합을 억제하는 EGFR-결합 FN3 도메인의 특성화**

[0629] **대규모 발현, 정제, 및 내독소 제거**

[0630] 표 4에 나타낸 FN3 도메인의 규모를 확대하여 상세한 특성화를 위한 더 많은 자료를 제공하였다. 각각의 EGFR-결합 FN3 도메인 변이체를 함유하는 하룻밤 배양물(overnight culture)을 사용하여, 하룻밤 배양물의 1/80 희석

에서 100 ㎍/mL의 암피실린으로 보충된 0.8 L의 테리픽(Terrific) 브로쓰 배지를 새로운 배지 내로 접종하고, 37℃에서 진탕하면서 인큐베이팅하였다. 600 nm에서의 광학 밀도가 약 1.2 내지 1.5에 도달했을 때 IPTG를 1 mM의 최종 농도가 되도록 첨가함으로써 배양을 유도하였으며, 온도를 30℃로 감소시켰다. 4시간 후에, 원심분리에 의해 세포를 수집하였으며, 필요할 때까지 세포 펠릿을 -80℃에서 저장하였다.

[0631] 세포 용해를 위하여, 해동된 펠릿을 25 U/mL 벤조나제(Benzonase)®(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)) 및 1 kU/mL 알리소자임(rLysozyme)™(노바젠 이엠디 바이오사이언시스)로 보충된 1X 버그버스터® 중에, 펠릿 1 g당 5 mL의 버그버스터®의 비로 재현탁시켰다. 온화하게 교반하면서 실온에서 1시간 동안 용해가 진행된 후, 4℃에서 50분 동안 56,000 x g로 원심분리를 행하였다. 상청액을 수집하고 0.2 μm 필터를 통해 여과하였으며, 이어서 지이 헬쓰케어 액타익스플로러(ÄKTAexplorer) 100s 크로마토그래피 시스템을 사용하여 완충액 A(50 mM 트리스-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸)에 의해 사전평형화된 5 mL 히스트랩(HisTrap) FF 컬럼 상에 로딩하였다. 컬럼을 20 컬럼 부피의 완충액 A로 세척하고, 6 컬럼 부피에 대한 16% 완충액 B(50 mM 트리스-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 250 mM 이미다졸)로 추가로 세척하였다. FN3 도메인을 10 컬럼 부피에 대한 50% B로 용출한 후, 6 컬럼 부피에 걸쳐 50% B로부터 100% B까지의 구배를 행하였다. FN3 도메인 단백질을 함유하는 분획을 풀링하고, 밀리포어(Millipore) 10K MWCO 농축기를 사용하여 농축시키고, 여과한 후, PBS로 사전평형화된 하이로드(HiLoad)™ 16/60 수퍼덱스™ 75 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에 로딩하였다. 크기 배제 컬럼으로부터 용출되는 단백질 단량체 피크를 보유하였다.

[0632] 악티클린 에톡스(ActiClean Etox) 수지(스테로진 바이오세퍼레이션즈(Sterogene Bioseparations))를 이용하여 배치 접근(batch approach)을 사용하여 내독소를 제거하였다. 내독소 제거 전에, 37℃에서 2시간 동안(또는 4℃에서 하룻밤 동안) 1 N NaOH로 수지를 전처리하고, pH 시험지로 측정했을 때 pH가 약 7로 안정화될 때까지 PBS로 광범위하게 세척하였다. 정제된 단백질을 0.2 μm 필터를 통해 여과한 후, 1 mL의 에톡스 수지에 10 mL의 단백질 대 1 mL의 수지의 비로 첨가하였다. 수지에 대한 내독소의 결합은, 온화하게 회전시키면서 2시간 이상 동안 실온에서 진행되게 하였다. 2분 동안 500 x g로 원심분리에 의해 수지를 제거하였으며, 단백질 상청액을 보유하였다. 엔도세이프(EndoSafe)®-PTS™ 카트리지를 사용하여 내독소 수준을 측정하고, 엔도세이프®-MCS 판독기(찰스 리버(Charles River)) 상에서 분석하였다. 제1 에톡스 처리 후 내독소 수준이 5 EU/mg을 초과하였다면, 내독소 수준이 5 EU/mg 이상으로 감소될 때까지 상기 절차를 반복하였다. 에톡스에 의한 2회의 연속 처리 후에 내독소 수준이 5 EU/mg을 초과하고 안정화된 경우에는, 단백질에 대해 음이온 교환 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피 조건을 확립하여 남아 있는 내독소를 제거하였다.

[0633] **EGFR-Fc에 대한 선택된 EGFR-결합 FN3 도메인의 친화도 결정(EGFR-Fc 친화도)**

[0634] 재조합 EGFR 세포외 도메인에 대한 선택된 EGFR-결합 FN3 도메인의 결합 친화도를 프로테온 기기(바이오라드)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 방법에 의해 추가로 특성화하였다. 검정 셋업(assay set-up)(칩 제조, EGFR-Fc 포획)은 해리-속도 분석에 대해 전술된 것과 유사하였다. 선택된 EGFR 결합 FN3 도메인을 수평 배향으로 3배 희석 시리즈로 1 μM 농도에서 시험하였다. 완충액 샘플을 또한 주입하여 기준선 안정성을 모니터링하였다. 각각의 EGFR-결합 FN3 도메인의 모든 농도에 대한 해리상을 30분 동안(해리-속도 스크리닝으로부터 k_{off}가 약 10^{-2} s^{-1}인 것들의 경우), 또는 1시간 동안(k_{off}가 약 10^{-3} s^{-1} 또는 그 미만인 것들의 경우) 100 μL/min의 유량으로 모니터링하였다. 2개의 세트의 기준 데이터를 반응 데이터로부터 제하였다: 1) 스폿간 신호, 이는 EGFR-결합 FN3 도메인과 고정화된 IgG 표면 사이의 비특이적 상호작용을 보정하기 위해서 제함; 2) 완충액 채널 신호, 이는 시간 경과에 따라 포획된 EGFR-Fc 표면의 해리로 인한 기준선 변화(baseline drifting)를 보정하기 위해서 제함. 각각의 FN3 도메인에 대한 모든 농도에서의 처리된 결합 데이터를 1:1 샘플 랭뮤어 결합 모델에 전체적으로 피팅하여 속도론적 상수(kinetic constant)(k_{on}, k_{off}) 및 친화도 상수(K_D)에 대한 추산치를 얻었다. 표 5는 작제물 각각에 대한 속도론적 상수를 나타내며, 이때 친화도는 200 pM부터 9.6 nM까지 다양하다.

[0635] **세포 상에서의 EGFR에 대한 선택된 EGFR-결합 FN3 도메인의 결합("A431 세포 결합 검정")**

[0636] 불투명한 흑색 96웰 플레이트들 내에서 A431 세포를 5,000개/웰로 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. 정제된 EGFR-결합 FN3 도메인(1.5 nM 내지 30 μM)을 3개의 반복된 플레이트 내에서 실온에서 1시간 동안 (50 uL로) 세포에 첨가하였다. 상청액을 제거하였으며, 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였다. 실온에서 20분 동안 FACS 염색 완충액 중에 1:100으로 희석된 50 μL/웰의 항-펜타 히스-알렉사488 항체 접합체(퀴아젠)와 함께 세포를 인큐베이팅하였다. 세포를 150 μL/웰의

FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였으며, 이후에 웰들을 100 μL의 FACS 염색 완충액으로 충전하고, 아큐멘 eX3 판독기를 사용하여 488 nm에서 형광을 판독하였다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 원시 형광 신호로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 4(GraphPad Prism 4)(그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software))를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선에 피팅하여 EC_{50} 값을 계산하였다. 표 5에는 작제물 각각에 대한 EC_{50}이 2.2 nM 내지 20 μM 초과의 범위인 것으로 기록되어 있다.

[0637] **선택된 EGFR-결합 FN3 도메인을 사용하는, 세포 상에서의 EGFR에 대한 EGF 결합의 억제(A431 세포 EGF 경쟁 검정)**

[0638] 불투명한 흑색 96웰 플레이트들 내에서 A431 세포를 5,000개/웰로 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. 정제된 EGFR-결합 FN3 도메인(1.5 nM 내지 30 μM)을 3개의 반복된 플레이트 내에서 실온에서 1시간 동안 세포에 첨가하였다(50 μL/웰). 비오티닐화 EGF(인비트로젠, 카탈로그 번호 E-3477)를 30 ng/mL의 최종 농도를 제공하도록 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였다. 실온에서 20분 동안 FACS 염색 완충액 중에 1:100으로 희석된 50 μL/웰의 스트렙타비딘-피코에리트린 접합체(인비트로젠)와 함께 세포를 인큐베이팅하였다. 세포를 150 μL/웰의 FACS 염색 완충액으로 3회 세척하였으며, 이후에 웰들을 100 μL의 FACS 염색 완충액으로 충전하고, 아큐멘 eX3 판독기를 사용하여 600 nm에서 형광을 판독하였다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 원시 형광 신호로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 4(그래프패드 소프트웨어)를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선에 피팅하여 IC_{50} 값을 계산하였다. 표 5에는 IC_{50} 값이 1.8 nM 내지 121 nM의 범위인 것으로 기록되어 있다.

[0639] **EGF-자극된 EGFR 인산화의 억제(포스포-EGFR 검정)**

[0640] EGF-자극된 EGFR 인산화를 유의하게 억제한 선택된 FN3 도메인을 억제에 대한 IC_{50} 값을 측정함으로써 더 완벽히 평가하였다. "EGF 자극된 EGFR 인산화의 억제"에 전술된 바와 같이 다양한 FN3 도메인 농도들(0.5 nM 내지 10 μM)에서 EGF-자극된 EGFR 인산화의 억제를 평가하였다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 전기화학발광 신호로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 4(그래프패드 소프트웨어)를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량 반응에 데이터를 피팅함으로써 IC_{50} 값을 결정하였다. 표 5에는 IC_{50} 값이 18 nM 내지 2.5 μM 초과의 범위인 것으로 나타나 있다.

[0641] **인간 종양 세포 성장의 억제(NCI-H292 성장 및 NCI-H322 성장 검정)**

[0642] EGFR-결합 FN3 도메인에 대한 노출 후, EGFR 과발현 인간 종양 세포주, NCI-H292 및 NCI-H322(ATCC, 각각 카탈로그 번호 CRL-1848 및 CRL-5806)의 생존력을 측정함으로써 EGFR-의존성 세포 성장의 억제를 평가하였다. 불투명한 백색 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들(눈크) 내에서, 10% 열 불활성화 소태아 혈청(깁코) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(깁코)으로 보충된, 글루타맥스™ 및 10 mM HEPES를 함유하는 100 μL/웰의 RPMI 배지(깁코) 중에서 세포를 500 세포/웰(NCI-H292) 또는 1,000 세포/웰(NCI-H322)로 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. 일정 농도 범위의 EGFR-결합 FN3 도메인을 함유하는 5 μL/웰의 인산염 완충 식염수(PBS)를 첨가함으로써 세포를 처리하였다. 5 μL/웰의 PBS 단독 또는 PBS 중 25 mM 에틸렌다이아민테트라아세트산으로 대조군을 처리하였다. 120시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 세포를 인큐베이팅하였다. 75 μL/웰의 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)® 시약(프로메가)을 첨가한 후, 2분 동안 플레이트 진탕기(plate shaker) 상에서 혼합하고, 추가 10분 동안 실온에서 암소에서 인큐베이팅함으로써 생존 세포(viable cell)를 검출하였다. 발광 모드로 설정된 스펙트라맥스(SpectraMax) M5 플레이트 판독기(몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices)) 상에서 플레이트를 판독하였으며, 이때 판독 시간은 블랭크 상태의 배지 단독에 대해 0.5초/웰이었다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 PBS-처리된 세포 성장의 백분율로서 데이터를 도표로 나타내었다. 그래프패드 프리즘 4(그래프패드 소프트웨어)를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량 반응에 대한 식에 데이터를 피팅함으로써 IC_{50} 값을 결정하였다. 표 5에는, NCI-H292 및 NCI-H322 세포를 사용했을 때, IC_{50} 값이 각각 5.9 nM 내지 1.15 μM의 범위 및 9.2 nM 내지 3.1 μM 초과의 범위인 것으로 나타나 있다. 표 5에는 각각의 검정에 대한 EGFR-결합 FN3 도메인의 생물학적 특성에 대한 요약이 나타나 있다.

[0643] [표 5]

FN3 도메인 클론 ID	서열 번호	EGFR-Fc 친화도 (nM)	A431 세포 결합	A431 세포 EGF 경쟁	포스포-EGFR	NCI-H292 성장	NCI-H322 성장
			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	미검출	미검출
P54AR4-47	20	2.51	8.6	7.1	295	44	39
P54AR4-48	21	7.78	12	9.8	170	미검출	미검출
P54AR4-73	22	0.197	9.4	4.6	141	83	73
P54AR4-74	23	미검출	77	미검출	미검출	미검출	미검출
P54AR4-81	24	미검출	84	121	미검출	미검출	미검출
P54AR4-83	25	0.255	2.2	1.8	18	5.9	9.2
P54CR4-31	26	0.383	>20000	55	179	1150	>3073

[0644]

[0645] **실시예 4: EGFR-결합 FN3 도메인의 조작**

[0646] 각각의 분자의 입체구조 안정성을 증가시키기 위해 EGFR 결합 FN3 도메인들의 서브세트를 조작하였다. FN3 도메인 안정성을 개선하는 것으로, 밝혀진 돌연변이 L17A, N46V 및 E86I(미국 특허 출원 공개 US2011/0274623호에 기재됨)를 DNA 합성에 의해 클론 P54AR4-83, P54CR4-31, 및 P54AR4-37 내로 도입시켰다. 전술된 바와 같이 새로운 돌연변이체 P54AR5-83v2, P54CR431-v2, 및 P54AR4-37v2를 발현시키고 정제하였다. PBS 중에서의 시차 주사 열량측정법을 사용하여 각각의 돌연변이체의 안정성을 평가하였는데, 이는 각각의 돌연변이체의 안정성을 상응하는 부모 분자의 안정성과 비교하기 위함이다. 표 6은 각각의 변이체 분자가 유의하게 안정화되었음을 보여주는데, 이때 T_m의 평균 증가는 18.5℃였다.

[0647] [표 6]

FN3 도메인 클론	서열 번호	T_m(℃)
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

[0648]

[0649] **실시예 5: c-Met에 결합하여 HGF 결합을 억제하는 피브로넥틴 III형(FN3) 도메인의 선택**

[0650] **인간 c-Met 상에서의 패닝**

[0651] TCL14 라이브러리를 비오티닐화-인간 c-Met 세포외 도메인(bt-c-Met)에 대해 스크리닝하여 c-Met에 특이적으로 결합할 수 있는 FN3 도메인을 확인하였다. 선택을 위하여, *E. 콜리* S30 리니어 익스트랙트(Linear Extract)(미국 위스콘신주 메디슨 소재의 프로메가) 중에서 3 μg의 TCL14 라이브러리를 시험관내 전사 및 번역(IVTT)하였으며, 발현된 라이브러리를 시스 블록(Cis Block)(2% BSA(미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마-알드리치), 100 μg/ml의 청어 정자 DNA(프로메가), 1 mg/mL의 헤파린(시그마-알드리치))으로 블로킹하였다. 선택을 위하여, bt-c-Met를 400 nM(라운드 1), 200 nM(라운드 2 및 3), 및 100 nM(라운드 4 및 5)의 농도로 첨가하였다. 뉴트라비딘 자성 비드(미국 일리노이주 록포드 소재의 써모 피셔(Thermo Fisher))(라운드 1, 3, 및 5) 또는 스트렙타비딘 자성 비드(프로메가)(라운드 2 및 4)를 사용하여 결합된 라이브러리 구성원을 회수하였으며,

비드를 500 uL의 PBS-T로 5 내지 14회 세척한 후 500 μL PBS로 2회 세척함으로써 결합되지 않은 라이브러리 구성원을 제거하였다.

[0652] 개선된 친화도를 갖는 FN3 도메인 분자를 확인하기 위해 추가의 선택 라운드를 수행하였다. 간단히 말하면, 라운드 5로부터의 산출물을 전술된 바와 같이 제조하고, 하기의 변화를 동반하여 추가의 반복 선택 라운드를 거치게 하였다: bt-c-Met와의 인큐베이션을 1시간에서 15분으로 감소시켰고 비드 포획을 20분에서 15분으로 감소시켰으며, bt-c-Met를 25 nM(라운드 6 및 7) 또는 2.5 nM(라운드 8 및 9)로 감소시켰고, 과량의 비오티닐화되지 않은 c-Met의 존재 하에서 추가 1 시간의 세척을 수행하였다. 이들 변화의 목적은, 잠재적으로 더 빠른 결합 속도(on-rate) 및 더 느린 해리 속도를 가져서 실질적으로 더 낮은 K_D를 산출하는 결합물질을 동시에 선택하기 위한 것이었다.

[0653] TCON6 (서열 번호 30) 및 TCON5 E86I short (서열 번호 31) 프라이머를 이용하여 리가제 비의존성 클로닝 부위(pET15-LIC)를 함유하는 변형된 pET15 벡터(미국 뉴저지주 깁스타운 소재의 이엠디 바이오사이언시스) 내로 라운드 5, 7 및 9의 산출물을 PCR 클로닝하였으며, 이들 단백질은 표준 프로토콜을 사용하여 형질전환 및 IPTG 유도(최종 1 mM, 16시간 30℃)한 후에 C-말단 His6-태깅된 단백질로서 발현시켰다. 원심분리에 의해 세포를 수거하고, 이어서 0.2 mg/mL의 계난백 라이소자임(Chicken Egg White Lysozyme)(시그마-알드리치)으로 보충된 버그버스터 HT(이엠디 바이오사이언시스)로 용해시켰다. 세균 용해물을 원심분리에 의해 청징화하였으며, 상청액을 새로운 96 딥웰 플레이트에 옮겼다.

[0654] **c-Met에 대한 HGF의 결합을 억제하는 FN3 도메인에 대한 스크리닝**

[0655] *E. 콜리* 용해물에 존재하는 FN3 도메인을 생화학적 포맷으로 정제된 c-Met 세포외 도메인에 대한 HGF 결합을 억제하는 그의 능력에 대해 스크리닝하였다. 재조합 인간 c-Met Fc 키메라(PBS 중 0.5 μg/mL, 100 μL/웰)를 96 웰 백색 맥시소프 플레이트(White Maxisorp Plate)(눈크) 상에 코팅하고, 4℃에서 하룻밤 인큐베이팅하였다. 바이오텍(Biotek) 플레이트 워셔 상에서 300 μl/웰의 0.05% 트윈 20을 함유하는 트리스 완충 식염수(TBS-T, 시그마-알드리치)로 플레이트를 2회 세척하였다. 진탕하면서 실온(RT)에서 1시간 동안 스타팅블록(StartingBlock) T20(200 μL/웰, 미국 일리노이주 록랜드 소재의 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))을 사용하여 검정 플레이트를 블로킹하였으며, 300 μl의 TBS-T로 다시 2회 세척하였다. 해밀턴 스타 플러스(Hamilton STAR plus) 로보틱스 시스템을 사용하여, FN3 도메인 용해물을 스타팅블록 T20 중에 (1:10으로부터 1:100,000까지) 희석시켰다. 용해물(50 μL/웰)을 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 검정 플레이트 상에서 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척하지 않고서, bt-HGF(스타팅블록 T20 중 1 μg/mL, 50 μL/웰, 비오티닐화)를 진탕하면서 실온에서 30분 동안 플레이트에 첨가하였다. 텐콘27 용해물을 함유하는 대조군 웰은 스타팅 블록 T20 또는 희석된 bt-HGF를 수용하였다. 이어서, 플레이트를 300 μl/웰의 TBS-T로 4회 세척하고, 진탕하면서 실온에서 30 내지 40분 동안 100 μl/웰의 스트렙타비딘-HRP(TBS-T 중 1:2000, 미국 웬실베이니아주 웨스트 그로브 소재의 잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch))와 함께 인큐베이팅하였다. 플레이트를 TBS-T로 다시 4회 세척하였다. 신호를 발생시키기 위하여, 제조자의 사용설명서에 따라 제조된 POD 화학발광 기질(POD Chemiluminescence Substrate)(50 μL/웰, 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재의 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics))을 플레이트에 첨가하였으며, 대략 3분 이내에 소프트맥스 프로(SoftMax Pro)를 사용하여 몰레큘러 디바이시스 M5 상에서 발광을 판독하였다. 하기 계산을 사용하여 %억제율을 결정하였다: 100-((RLU$_{샘플}$ -평균 RLU$_{무\ bt\text{-}HGF\ 대조군}$)/(평균 RLU$_{bt\text{-}HGF\ 대조군}$ -평균 RLU$_{무\ bt\text{-}HGF\ 대조군}$)*100). 50% 이상의 %억제율 값을 히트(hit)로 간주하였다.

[0656] **FN3 도메인의 대용량(high-throughput) 발현 및 정제**

[0657] 히스 멀티트랩™ HP 플레이트(지이 헬쓰케어)를 사용하여, 청징화된 E. 콜리 용해물로부터 His-태깅된 FN3 도메인을 정제하였으며, pH 7.4에서 20 mM 인산나트륨, 500 mM 염화나트륨, 및 250 mM 이미다졸을 함유하는 완충액 중에서 용출시켰다. 정제된 샘플을 PD 멀티트랩™ G-25 플레이트(지이 헬쓰케어)를 사용하여 분석을 위하여 PBS pH 7.4 중으로 교환하였다.

[0658] **c-Met에 대한 HGF 결합의 억제에 대한 IC_{50} 결정**

[0659] 선택된 FN3 도메인을 HGF 경쟁 검정에서 추가로 특성화하였다. 정제된 FN3 도메인에 대한 용량 반응 곡선을 전술된 검정을 이용하여 생성하였다(5 μM의 출발 농도). %억제율 값을 계산하였다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 %억제율로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 4를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자

형 용량 반응에 데이터를 피팅함으로써 IC_{50} 값을 결정하였다.

[0660] 35개의 특유의 서열이 라운드 5로부터 1:10의 희석에서 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 이때 IC_{50} 값은 0.5 내지 1500 nM의 범위였다. 라운드 7은 39개의 특유의 서열을 산출하였는데, 이때 1:100의 희석에서 활성을 가졌으며, IC_{50} 값은 0.16 내지 2.9 nM의 범위였다. 라운드 9로부터 66개의 특유의 서열을 확인하였는데, 여기서는 1:1000의 희석에서 활성인 것으로 히트를 규정하였다. 0.2 nM만큼이나 낮은 IC_{50} 값이 라운드 9에서 관찰되었다(표 8).

[0661] **c-Met-Fc에 대한 선택된 c-Met-결합 FN3 도메인의 친화도 결정(EGFR-Fc 친화도)**

[0662] c-Met-Fc를 검정에서 사용한 것을 제외하고는, 선택된 EGFR-결합 FN3 도메인의 친화도 결정에 대해 실시예 3에 기재된 바와 같이, 선택된 c-Met 결합 FN3 도메인에 대해 친화도를 결정하였다.

[0663] **실시예 6: c-Met에 결합하여 HGF 결합을 억제하는 FN3 도메인의 특성화**

[0664] 실시예 2에 전술된 바와 같이 FN3 도메인을 발현시키고 정제하였다. 실시예 1 및 실시예 2에 각각 전술된 바와 같이, 크기 배제 크로마토그래피 및 속도론적 분석을 행하였다. 표 7에는 각각의 도메인에 대한 C-가닥, CD 루프, F-가닥, 및 FG 루프의 서열, 및 전체 아미노산 서열에 대한 서열 번호가 나타나 있다.

[0665] [표 7]

클론		C 루프	CD 가닥	F 루프	FG 가닥
명칭	서열 번호:				
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

C 루프 잔기는 표시된 서열 번호의 잔기 28-37에 상응한다.
CD 가닥 잔기는 표시된 서열 번호의 잔기 38-43에 상응한다.
F 루프 잔기는 표시된 서열 번호의 잔기 65-74에 상응한다.
FG 가닥 잔기는 표시된 서열 번호의 잔기 75-81에 상응한다.

[0666]

[0667] **세포 상에서의 c-Met에 대한 선택된 c-Met-결합 FN3 도메인의 결합("H441 세포 결합 검정")**

[0668] 폴리-D-라이신 코팅된 흑색 투명 바닥 96웰 플레이트들(미국 캘리포니아주 새너제이 소재의 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 내에서 NCI-H441 세포(카탈로그 번호 HTB-174, 미국 버지니아주 매나사스 소재의 ATCC)를 20,000 세포/웰로 평판배양하고, 37℃, 5% CO_2에서 하룻밤 부착되게 하였다. 정제된 FN3 도메인(50 μL/웰; 0 내지 1000 nM)을 2개의 반복된 플레이트 내에서 4℃에서 1시간 동안 세포에 첨가하였다. 상청액을 제거하였으며, 세포를 FACS 염색 완충액(150 μL/웰, 비디 바이오사이언시스, 카탈로그 번호 554657)으로 3회 세척하였다. 4℃에서 30분 동안 비오티닐화-항 HIS 항체(FACS 염색 완충액 중에 1:160으로 희석됨, 50 μL/웰, 알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 BAM050)와 함께 세포를 배양하였다. 세포를 FACS 염색 완충액(150 μL/웰)으로 3회 세척하였으며, 이후에 4℃에서 30분 동안 항 마우스 IgG1-알렉사 488 접합된 항체(FACS 염색 완충액 중에 1:80으로 희석됨, 50 μL/웰, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 카탈로그 번호 A21121)와 함께 웰을 인큐베이팅하였다. 세포를 FACS 염색 완충액(150 μL/웰)으로 3회 세척하고, FACS 염색 완충액(50 μL/웰) 중에 그대로 두었다. 아큐멘 eX3 판독기를 사용하여 총 형광을 결정하였다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 원시 형광 신호로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 4(그래프패드 소프트웨어)를 사용하여

가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선에 피팅하여 EC_{50} 값을 계산하였다. FN3 도메인은 일정 범위의 결합 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 이때 EC_{50} 값은 1.4 nM 내지 22.0 nM로서, 이는 표 8에 나타낸 바와 같다.

[0669] **HGF-자극된 c-Met 인산화의 억제**

[0670] 메조 스케일 디스커버리(미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재)로부터의 c-Met 포스포(Tyr1349) 키트를 사용하여, 정제된 FN3 도메인을 NCI-H441에서의 c-Met의 HGF-자극된 인산화를 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 투명한 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들 내에서, 10% 소태아 혈청(FBS; 라이프 테크놀로지스)과 함께 (글루타맥스 및 HEPES(라이프 테크놀로지스)를 함유하는) 100 μL/웰의 RPMI 배지 중에서 세포를 20,000개/웰로 평판배양하고, 37℃, 5% CO_2에서 하룻밤 부착되게 하였다. 배양 배지를 완전히 제거하였으며, 37℃, 5% CO_2에서 무혈청 RPMI 배지(100 μL/웰) 중에 세포를 하룻밤 기아상태에 두었다. 이어서, 37℃, 5% CO_2에서 1시간 미만 동안 그리고 20 μM 농도로 FN3 도메인을 함유하는 새로운 무혈청 RPMI 배지(100 μL/웰)를 세포에 보급하였다. 대조군은 배지 단독으로 처리하였다. 100 ng/mL의 재조합 인간 HGF(100 μL/웰, 알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 294-HGN)로 세포를 자극하고, 15분 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이팅하였다. 일 세트의 대조군 웰을 음성 대조군으로서 자극되지 않은 채로 그대로 두었다. 이어서, 배지를 완전히 제거하였으며, 제조자의 사용설명서에 따라, 진탕하면서 실온에서 10분 동안 완전 용해 완충액(50 μL/웰, 메조 스케일 디스커버리)으로 세포를 용해시켰다. 인산화된 c-Met를 측정하도록 구성된 검정 플레이트를, 1시간 동안 실온에서 제조자의 사용설명서에 따라, 제공된 블로킹 용액으로 블로킹하였다. 이어서, 플레이트를 트리스 세척 완충액(200 μL/웰, 메조 스케일 디스커버리)으로 3회 세척하였다. 세포 용해물(30 μL/웰)을 검정 플레이트에 옮기고, 1시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 검정 플레이트를 트리스 세척 완충액으로 4회 세척하였으며, 이후에 빙랭 검출 항체 용액(25 μL/웰, 메조 스케일 디스커버리)을 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 트리스 세척 완충액으로 다시 4회 헹구었다. 150 판독 완충액(150 μL/웰, 메조 스케일 디스커버리)을 첨가하고, 제조자-설정 검정-전용 디폴트 세팅을 사용하여 섹터® 이미저 6000 기기(메조 스케일 디스커버리) 상에서 판독함으로써 신호를 검출하였다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 전기화학발광 신호로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 4를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량 반응에 데이터를 피팅함으로써 IC_{50} 값을 결정하였다. FN3 도메인은 인산화된 c-Met를 억제하는 것으로 확인되었는데, 이때 IC_{50} 값은 4.6 nM 내지 1415 nM의 범위로서, 이는 표 8에 나타낸 바와 같다.

[0671] **인간 종양 세포 성장 또는 생존력의 억제**

[0672] c-Met-결합 FN3 도메인에 노출 후, U87-MG 세포(ATCC, 카탈로그 번호 HTB-14)의 생존력을 측정함으로써 c-Met-의존성 세포 성장의 억제를 평가하였다. 불투명한 백색 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들(눈크) 내에서, 10% FBS로 보충된 100 μL/웰의 RPMI 배지 중에서 세포를 8000 세포/웰로 평판배양하고, 37℃, 5% CO_2에서 하룻밤 부착되게 하였다. 평판배양 후 24시간째에, 배지를 흡인하였으며 세포에 무혈청 RPMI 배지를 보급하였다. 혈청 기아 후 24시간째에, c-Met-결합 FN3 도메인을 함유하는 무혈청 배지(30 μL/웰)를 첨가함으로써 세포를 처리하였다. 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 세포를 인큐베이팅하였다. 100 μL/웰의 셀타이터-글로® 시약(프로메가)을 첨가한 후, 10분 동안 플레이트 진탕기 상에서 혼합함으로써 생존 세포를 검출하였다. 발광 모드로 설정된 스펙트라맥스 M5 플레이트 판독기(몰레큘러 디바이시스) 상에서 플레이트를 판독하였으며, 이때 판독 시간은 0.5초/웰이었다. FN3 도메인 몰 농도의 로그에 대한 미처리 발광 단위(raw luminescence unit, RLU)로서 데이터를 도표로 나타내었다. 그래프패드 프리즘 4를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량 반응에 대한 식에 데이터를 피팅함으로써 IC_{50} 값을 결정하였다. 표 8에는 IC_{50} 값이 1 nM 내지 1000 nM 초과의 범위인 것으로 기록되어 있다. c-Met 결합 FN3 도메인의 특성이 표 8에 요약되어 있다.

[0673] [표 8]

클론		친화도 (Kd, nM)	HGF 경쟁 IC_{50} (nM)	H441 세포 결합 (EC_{50}, nM)	H441 세포에서의 pMet 억제(IC_{50}, nM)	U87-MG 세포의 증식의 억제(IC_{50}, nM)
명칭	서열 번호					
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	미검출	22.0	766.4	672.3
P114AR7P93-D11	38	미검출	미검출	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	미검출	9.8	17.4
P114AR7P95-D3	44	0.3	0.2	1.5	4.6	1.7
P114AR7P95-D4	45	0.4	미검출	1.4	19.5	19.4
P114AR7P95-E3	46	1.5	미검출	3.2	204.6	209.2
P114AR7P95-F10	47	4.2	1.4	4.4	187.6	129.7
P114AR7P95-G7	48	20.0	미검출	11.3	659.3	692
P114AR7P95-H8	49	3.7	미검출	4.1	209.8	280.7

[0674]

[0675] **c-Met-결합 FN3 도메인의 열 안정성**

[0676] **PBS 중에서의 시차 주사 열량측정법을 사용하여 각각의 FN3 도메인의 안정성을 평가하였다. 실험 결과가 표 9에 나타나 있다.**

[0677] [표 9]

클론		열 안정성(Tm, C)
명칭	서열 번호	
P114AR5P74-A5	32	74.1
P114AR5P75-E9	33	미검출
P114AR7P92-F3	34	81.5
P114AR7P92-F6	35	76.8
P114AR7P92-G8	36	90.9
P114AR7P92-H5	37	87
P114AR7P93-D11	38	미검출
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

[0678]

[0679] **실시예 7. 이중특이성 항-EGFR/c-Met 분자의 생성 및 특성화**

[0680] **이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 생성**

[0681] 실시예 1 내지 실시예 6에 기재된 EGFR-결합 FN3 도메인과 c-Met-결합 FN3 도메인의 다수의 조합들을 연결시켜 EGFR 및 c-Met 둘 모두에 결합할 수 있는 이중특이성 분자로 하였다. 추가적으로, 서열 번호 107-110에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 EGFR-결합 FN3 도메인 및 서열 번호 111-114에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 c-Met 결합 FN3 도메인을 제조하고, 이들을 연결시켜 이중특이성 분자로 하였다. 하기 포맷, 즉 EGFR-결합 FN3 도메인, 그에 이어지는 펩티드 링커, 그에 이어지는 c-Met-결합 FN3 도메인을 유지하도록 서열 번호 50-72 및 106(표 10)에 기재된 아미노산 서열을 암호화하기 위해 합성 유전자를 생성하였다. 정제를 돕기 위해 폴리-히스티딘 태그

를 C-말단에 도입시켰다. 표 10에 기재된 분자들에 더하여, 이들 2개의 FN3 도메인들 사이의 링커는 표 11에 열거된 것들에 따라 길이, 서열 조성 및 구조에 따라 다양하였다. 다수의 다른 링커들이 그러한 FN3 도메인들을 연결하는 데 사용될 수 있었을 것으로 고려된다. IMAC 및 겔 여과 크로마토그래피 단계들을 사용하여 단일특이성 EGFR 또는 c-Met FN3 도메인에 대하여 기재된 바와 같이 E. 콜리로부터 이중특이성 EGFR/c-Met 분자를 발현시키고 정제하였다.

[0682] [표 10]

이중특이성 EGFR/c-Met 분자		EGFR-결합 FN3 도메인		c-MET-결합 FN3 도메인		링커	
클론 ID	서열 번호:	클론 ID	서열 번호:	클론 ID	서열 번호:	서열	서열 번호:
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	$(GGGGS)_4$	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	$(GGGGS)_4$	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	$(GGGGS)_4$	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	$(GGGGS)_4$	79
ECB5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	$(GGGGS)_4$	79
ECB6	55	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P93-H9	40	$(GGGGS)_4$	79
ECB7	56	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P75-E9	33	$(GGGGS)_4$	79
ECB15	57	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB27	58	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB60	59	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB37	60	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB94	61	P54AR4-83v22	108	P114AR7P94-A3v22	111	$(AP)_5$	81
ECB95	62	P54AR4-83v22	108	P114AR9P121-A6v2	112	$(AP)_5$	81
ECB96	63	P54AR4-83v22	108	P114AR9P122-A7v2	113	$(AP)_5$	81
ECB97	64	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB106	65	P54AR4-83v23	109	P114AR7P94-A3v22	111	$(AP)_5$	81
ECB107	66	P54AR4-83v23	109	P114AR9P121-A6v2	112	$(AP)_5$	81
ECB108	67	P54AR4-83v23	109	P114AR9P122-A7v2	113	$(AP)_5$	81
ECB109	68	P54AR4-83v23	109	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB118	69	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P94-A3v22	111	$(AP)_5$	81
ECB119	70	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P121-A6v2	112	$(AP)_5$	81
ECB120	71	P53A1R5-17v22	110	P114AR9P122-A7v2	113	$(AP)_5$	81
ECB121	72	P53A1R5-17v22	110	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB91	106	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB18	118	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB28	119	P53A1R5-17v2	107	P114AR5P74-A5	32	$(AP)_5$	81
ECB38	120	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB39	121	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94-A3	41	$(AP)_5$	81
ECB168	190	P54AR4-83v22	108	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81
ECB176	192	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P95-C5v2	114	$(AP)_5$	81

[0683]

[0684] [표 11]

링커	서열 번호	링커 길이(아미노산 개수)	구조
GS	78	2	무질서
GGGGS	105	5	무질서
(GGGGS)2	224	10	무질서
$(GGGGS)_4$	79	20	무질서
$(AP)_2$	80	4	강성
$(AP)_5$	81	5	강성
$(AP)_{10}$	82	20	강성
$(AP)_{20}$	83	40	강성
$A(EAAAK)_5AAA$	84	29	α-나선

[0685]

[0686] **이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 단일특이성 분자 단독과 비교하여 효력을 향상시킨다 - 결합력을 시사함**

[0687] 96웰 플레이트 내에서, 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지 중에서 NCI-H292 세포를 평판배양하였다. 24시간 후에, 배지를 무혈청 RPMI로 대체하였다. 혈청 기아 후 24시간째에, 하기 FN3 도메인들의 다양한 농도들로 세포를 처리하였다: 고 친화도 단일특이성 EGFR FN3 도메인(P54AR4-83v2), 약 친화도 단일특이성 c-Met FN3 도메인

(P114AR5P74-A5), 2개의 단일특이성 EGFR과 c-Met FN3 도메인의 혼합물, 또는 고 친화도 EGFR FN3 도메인(ECB1)에 연결된 저 친화도 c-Met FN3 도메인으로 구성된 이중특이성 EGFR/c-Met 분자. 세포를 단일특이성 또는 이중특이성 분자로 1시간 동안 처리하고, 이어서 37℃, 5% CO_2에서 15분 동안 EGF, HGF, 또는 EGF와 HGF의 조합으로 자극하였다. 세포를 MSD 용해 완충액으로 용해시켰으며, 전술된 바와 같이 제조자의 사용설명서에 따라 적절한 MSD 검정 플레이트를 사용하여 세포 신호전달을 평가하였다.

[0688] 저 친화도 c-Met FN3 도메인은 610 nM의 IC_{50}으로 c-Met의 인산화를 억제하였다(도 4). 예측된 바와 같이, EGFR FN3 도메인은 c-Met 인산화를 억제할 수 없었으며, 단일특이성 분자들의 혼합물은 c-Met FN3 도메인 단독과 동일한 것으로 보였다. 그러나, 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 1 nM의 IC_{50}으로 c-Met의 인산화를 억제하여(도 4), c-Met 단일특이성 단독에 비하여 효력을 개선함에 있어서 2-로그 시프트를 초과하여 제공하였다.

[0689] 이중특이성 EGFR/c-Met 분자가 결합력 효과를 통해 c-Met 및/또는 EGFR 인산화의 억제를 향상시킬 수 있는 잠재성을 c-Met 및 EGFR의 가변적인 밀도 및 비로 다수의 세포 유형에서 평가하였다(도 5). 96웰 플레이트 내에서, 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지 중에서 NCI-H292, NCI-H441, 또는 NCI-H596 세포를 평판배양하였다. 24시간 후에, 배지를 무혈청 RPMI로 대체하였다. 혈청 기아 후 24시간째에, 단일특이성 EGFR-결합 FN3 도메인, 단일특이성 c-Met FN3 도메인, 또는 이중특이성 EGFR/c-Met 분자(ECB5, 이는 P53A1R5-17v2 및 P114AR7P94-A3으로 구성됨)의 다양한 농도들로 세포를 처리하였다. 세포를 단일특이성 또는 이중특이성 분자로 1시간 동안 처리하고, 이어서 37℃, 5% CO_2에서 15분 동안 EGF, HGF, 또는 EGF와 HGF의 조합으로 자극하였다. 세포를 MSD 용해 완충액으로 용해시켰으며, 전술된 바와 같이 제조자의 사용설명서에 따라 적절한 MSD 검정 플레이트를 사용하여 세포 신호전달을 평가하였다.

[0690] 도 5a 내지 도 5c는 3개의 상이한 세포주에서 이중특이성 EGFR/cMet 분자와 비교하여 단일특이성 EGFR-결합 FN3 도메인을 사용하여 EGFR을 억제하는 것을 나타낸다. EGFR 인산화 검정에서 결합력을 평가하기 위하여, 중간 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인(1.9 nM)(P53A1R5-17v2)을, 고 친화도 c-Met-결합 FN3 도메인(0.4 nM)(P114AR7P94-A3)에 연결된 동일한 EGFR-결합 FN3 도메인을 함유하는 이중특이성 EGFR/c-Met 분자와 비교하였다. NCI-H292 및 H596 세포에서, EGFR의 인산화의 억제는 단일특이성 분자 및 이중특이성 분자(도 5a 및 도 5b)에 있어서 비견되었는데, 이는 이들 세포주는 높은 EGFR 수용체 대 c-Met 수용체 비를 갖기 때문일 가능성이 높다. 이 이론을 시험하기 위하여, EGFR보다 더 많은 c-Met 수용체를 나타내는 NCI-H441 세포에서 EGFR 인산화의 억제를 평가하였다. 이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의한 NCI-H441 세포의 처리는, EGFR 인산화의 억제에 있어서 IC_{50}을 단일특이성 EGFR-결합 FN3 도메인과 비교하여 30배 감소시켰다(도 5c).

[0691] EGFR(0.26 nM)에 대해 고 친화도를 갖고 c-Met(10.1 nM)에 대해 중간 친화도를 갖는 분자를 사용하여 c-Met 인산화 검정에서, 이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의한 향상된 효력에 대한 잠재성을 평가하였다. NCI-H292 세포 및 NCI-H596 세포 둘 모두에서는, 단일특이성 c-Met-결합 FN3 도메인과 비교하여 이중특이성 분자에 의해 각각 134배 및 1012배로 c-Met의 인산화의 억제를 향상시켰다(도 3d 및 도 3e).

[0692] 이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의한 EGFR 및 c-Met 인산화의 억제에 있어서의 향상된 효력이 신호전달 및 증식의 향상된 억제로 이어졌음이 검증되었다. 이들 실험을 위하여, EGFR-결합 FN3 도메인과 c-Met-결합 FN3 도메인의 혼합물을 이중특이성 EGFR/c-Met 분자와 비교하였다. 표 12 및 표 13에 기재된 바와 같이, 단일특이성 결합물질들의 혼합물과 비교하여 이중특이성 EGFR/c-Met 분자로 세포를 처리했을 때, ERK 인산화에 대한 IC_{50} 값(표 12) 및 NCI-H292 세포의 증식(표 13)이 감소되었다. 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 경우의 ERK 인산화의 억제에 대한 IC_{50}은 2개의 단일특이성 EGFR과 c-Met FN3 도메인의 혼합물에 비하여 143배 더 낮았는데, 이는 이 검정에서 이러한 분자의 효력에 대한 결합력의 효과를 나타낸다. 표 12에서, 단일특이성 EGFR 및 c-Met 결합 FN3 도메인은 활성을 완전히 억제하지 못하며, 이에 따라, 나타낸 IC_{50} 값은 하한치인 것으로 여겨져야 한다. EGFR 결합 FN3 도메인과 c-Met 결합 FN3 도메인의 상이한 조합들을, 혼합물로서 또는 이중특이성 포맷에 연결된 것으로서 사용하여, 증식 검정을 완성하였다. 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 경우의 증식의 억제에 대한 IC_{50}은 단일특이성 부모 EGFR 또는 c-Met 결합 FN3 도메인들의 혼합물에 비하여 34 내지 236배 더 낮았다. 이는 이들 수용체의 수준에서 관찰된 결합력 효과(도 4 및 도 5)가 세포 신호전달(표 12) 및 세포 증식(표 13) 억제의 개선으로 이어졌음을 확인시켜 주었다.

[0693] [표 12]

FN3-도메인 분자의 특이성	클론명	유형	IC_{50}(nM) (ERK 인산화)
EGFR	P54AR4-83v2	단일특이성	>10,000
c-Met	P114AR5P74-A5	단일특이성	2366
EGFR 또는 c-Met	P54AR4-83v2 + P114AR5P74-A5	단일특이성 분자들의 혼합물	798.4
EGFR 및 c-Met	ECB1	이중특이성	5.6

[0694]

[0695] [표 13]

EGFR-결합 FN3 도메인(친화도)	c-Met 결합 FN3 도메인(친화도)	단일특이성 분자들의 혼합물에 대한 IC_{50}(nM)	이중특이성 분자에 대한 IC_{50}(nM)	단일특이성 분자들의 혼합물/이중특이성 분자에 대한 IC_{50}의 배수 증가
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

[0696]

[0697] **생체내 종양 이종이식편: PK/PD**

[0698] 생체내에서의 단일특이성 및 이중특이성 FN3 도메인 분자의 효능을 결정하기 위하여, 인간 HGF를 분비하도록 종양 세포를 조작하였다(뮤린 HGF는 인간 c-Met에 결합하지 않는다). 렌티바이러스성 감염(진코포에이아(Genecopoeia)로부터의 인간 HGF(기탁 번호 X16322)를 발현하는 렌티바이러스 DNA 벡터 및 렌티바이러스 패키징 키트)을 이용하여, 인간 HGF를 NCI-H292 세포에서 안정하게 발현시켰다. 감염 후에, HGF-발현 세포를 4 μg/mL의 퓨로마이신(puromycin)(인비트로젠)을 사용하여 선택하였다. 메조 스케일 디스커버리로부터의 검정 플레이트를 사용하여 풀링된 세포의 컨디셔닝된 배지 중에서 인간 HGF 단백질을 검출하였다.

[0699] SCID 베이지 마우스에 인간 HGF를 발현하는 NCI-H292 세포(200 μL 부피의 컬트렉스(Cultrex)(트레비젠(Trevigen)) 중 2.0×10^6 세포)를 각각의 동물의 등 옆부분에 피하 접종하였다. 종양 부피가 150 내지 250 ㎣의 범위가 될 때까지 매주 2회 종양 측정을 실시하였다. 이어서, (반감기를 증가시키기 위해 알부민 결합 도메인에 연결된) 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 또는 PBS 비히클의 단회 i.p. 용량을 마우스에 제공하였다. 투여 후 6시간째 또는 72시간째에, 종양을 적출하고 액체 질소 중에서 즉시 냉동시켰다. 혈액 샘플을 심장 천자를 통해 프로테아제 억제제를 함유하는 3.8% 시트레이트 내로 수집하였다. 수집 직후에, 혈액 샘플을 원심분리하였으며, 생성된 혈장을 샘플관에 옮기고 -80℃에서 저장하였다. 종양의 중량을 측정하고, 작은 조각으로 절단하고, HALT 프로테아제/포스파타제 억제제(피어스(Pierce)), 50 mM 불화나트륨(시그마), 2 mM 활성화 오르토바나듐산나트륨(시그마), 및 1 mM PMSF(메조 스케일 디스커버리)와 함께 RIPA 완충액을 함유하는 용해 매트릭스 A(Lysing Matrix A) 관(LMA) 내에서 용해시켰다. 용해물을 LMA 매트릭스로부터 회수하고 원심분리하여 불용성 단백질을 제거하였다. BCA 단백질 검정을 사용하여 가용성 종양 단백질을 정량화하고, 종양 용해 완충액 중에 등가의 단백질 수준으로 희석시켰다. 메조 스케일 디스커버리로부터의 검정 플레이트를 (제조자의 프로토콜에 따라 그리고 전술된 바와 같이) 사용하여, 인산화된 c-Met, EGFR 및 ERK를 측정하였다.

[0700] 도 6은 시험의 결과를 나타낸다. 각각의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 6시간 및 72시간 둘 모두에서 인산화된 c-Met, EGFR, 및 ERK의 수준을 유의하게 감소시켰다. 도 6에 제시된 데이터는 c-Met 및 EGFR 둘 모두의 동시 억제의 중요성, 및 각각의 수용체에 대한 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 친화도가 어떻게 하류 ERK의 억제에서

역할을 하는지를 나타낸다. 고 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인(P54AR4-83v2; 도면에서 "8"로 나타나 있음, K_D=0.26 nM)을 함유하는 분자는, 6시간 및 72시간 둘 모두에서, 중간 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인(P53A1R5-17v2; 도면에서 "17"로 나타나 있음, K_D = 1.9 nM)을 함유하는 분자와 비교하여 더 큰 정도로 EGFR의 인산화를 억제하였다. 시험된 4개의 이중특이성 분자 모두는 친화도에 관계 없이 6시간 시점에서 ERK의 인산화를 완전히 억제하였다. 72시간 시점에서, 고 친화도 c-Met-결합 도메인(P114AR7P94-A3; 도면에서 "A3"으로 나타나 있음, K_D = 0.4 nM)을 함유하는 분자는 중간 친화도 c-Met-결합 FN3 도메인(P114AR5P74-A5; 도면에서 "A5"로 나타나 있음; K_D =10.1 nM; 도 6)과 비교하여 ERK의 인산화를 유의하게 억제하였다.

[0701] 각각의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 농도를, 투여 후 6시간째 및 72시간째에, 혈액에서 그리고 종양에서 측정하였다(도 7). 흥미롭게도, 중간 친화도 EGFR-결합 도메인(P53A1R5-17v2; K_D =1.9 nM)을 갖지만 고 친화도 c-Met-결합 FN3 도메인(P114AR7P94-A3; K_D =0.4 nM)을 갖는 이중특이성 분자는 다른 분자들에 비하여 6시간째에 유의하게 더 많은 종양 축적률을 가졌지만, 이 차이는 72시간쯤에는 감소되었다. 종양 밖의 세포가 EGFR 및 c-Met 둘 모두에서 더 낮은 표면 발현 수준을 가지며, 이에 따라 중간 친화도 EGFR 분자는, 더 높은 친화도의 EGFR-결합 FN3 도메인과 엄격하게 비교할 때, 정상 조직에 결합하지 않는 것으로 가설화될 수 있다. 그러므로, 종양에서 결합에 이용가능한 중간 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인에는 더 많은 자유가 있다. 따라서, 각각의 수용체에 적절한 친화도를 확인하는 것은 감소된 전신 독성 및 증가된 종양 축적률을 갖는 치료제의 확인을 가능하게 할 수 있다.

[0702] **이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의한 종양 효능 연구**

[0703] SCID 베이지 마우스에 인간 HGF를 발현하는 NCI-H292 세포(200 μL의 컬트렉스(트레비젠) 중 2.0×10^6 세포)를 각각의 동물의 등 옆부분에 피하 접종하였다. 이식 후 1주째에, 마우스를 등가의 종양 부피(평균 종양 부피 =77.9+/-1.7 ㎣)를 갖는 집단으로 층별화하였다. 마우스에 이중특이성 분자를 주당 3회 투여하였으며, 종양 부피를 매주 2회 기록하였다. c-Met 및 EGFR에 대해 가변 친화도를 갖는 4개의 상이한 이중특이성 분자에 의한 종양 성장 억제(TGI)를 관찰하였다. 도 8은 종양 성장에서의 지연으로서 c-Met 및 EGFR 둘 모두의 억제 효과가, c-Met-결합 FN3 도메인이 중간 친화도였을 때, 중간 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인과 비교하여 고 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인을 함유하는 분자로 처리된 마우스에서 관찰되었음을 보여준다(채워진 삼각형 대비 빈 삼각형, P53A1R5-17 - P114AR5P74-A5 대비 P54AR4-83v2 - P114AR5P74-A5). 게다가, 이 데이터는 고 친화도 c-Met-결합 FN3 도메인을 갖는 것의 중요성을 보여주는데, 그 이유는 고 또는 중간 친화도 EGFR-결합 FN3 도메인을 함유하지만 고 친화도 c-Met-결합 FN3 도메인을 함유하는 이중특이성 분자가 최대 효능을 나타내었기 때문이다(회색 점선 및 흑색 점선, P54AR4-83v2 - P114AR7P94-A3 및 P53A1R5-17v2 - P114AR7P94-A3).

[0704] **이중특이성 분자 및 EGFR 및 c-Met의 다른 억제제의 효능**

[0705] 이중특이성 EGFR/c-Met 분자(ECB38) 및 소분자 억제제인 크리조티닙(c-Met 억제제) 및 에를로티닙(EGFR 억제제), 세툭시맙(항-EGFR 항체) - 이들 각각은 단제(single agent)로서임 -, 및 크리조티닙과 에를로티닙의 병용의 생체내 치료적 효능을 SCID/베이지 마우스에서의 피하 H292-HGF 인간 폐암 이종이식편 모델의 처리에서 평가하였다.

[0706] H292-HGF 세포를 공기 중 5% CO_2의 분위기 내에서 37℃에서 소태아 혈청(10% v/v) 및 L-글루타민(2 mM)으로 보충된 RPMI1640 배지 중에 시험관내에서 유지하였다. 트립신-EDTA 처리에 의해 세포를 매주 2회 일상적으로 계대배양하였다. 지수 성장기에서 성장하는 세포를 수거하고 종양 접종을 위해 카운팅하였다.

[0707] 종양 발생을 위하여, 컬트렉스를 함유하는 PBS(1:1) 0.1 ml 중 H292-HGF 종양 세포(2×10^6)를 각각의 마우스의 우측 옆구리 부분에 피하 접종하였다. 평균 종양 크기가 139 ㎣에 도달했을 때 이 처리를 시작하였다. 각각의 연구 집단에서의 시험 대상품(test article) 투여 및 동물 마리수는 하기 실험 설계 표에 나타나 있다. 종양 세포 접종 일자는 일수 0으로서 표기하였다. 표 14는 처리군을 나타낸다.

[0708] [표 14]

집단	N	처리	용량 (mg/kg)	투여 경로	계획 일정	실제 일정
1	10	비히클 대조군	0	*i.p.*	QDx3주	QDx3주
2	10	이중특이성 EGFR/c-Met 분자	25	*i.p.*	3회/주 x3주	3회/주 x3주
3	10	크리조티닙	50	*p.o.*	QDx3주	QDx17일
4	10	에를로티닙	50	*p.o.*	QDx2주	QDx3주
5	10	크리조티닙	50	*p.o.*	QDx3주	QDx3주
6	10	세툭시맙	1 mg/마우스	*i.p.*	Q4d*6	Q4d*6

N: 동물 마리수; *p.o.*: 경구 투여; *i.p.*: 복막내 주사; 3회/주: 해당 주의 1, 3 및 5일에 용량을 제공하였음. QD: 일일 1회; Q4d: 매 4일마다 1회; 크리조티닙과 에를로티닙의 병용의 간격은 0.5시간이었음; 투여 부피는 체중에 기초하여 조정됨(10 l/g); a: 집단화 후 14일째에는 투여를 제공하지 않았음.

[0709]

[0710] 치료 개시 전에, 모든 동물의 체중을 측정하고 종양 부피를 측정하였다. 종양 부피는 임의의 주어진 치료의 유효성에 영향을 줄 수 있기 때문에, 그들의 종양 부피에 기초한 무작위화 블록 설계(randomized block design)를 사용하여 마우스를 집단에 배정하였다. 이는 모든 집단이 기준선에서 비견되도록 보장한다. 무작위화 블록 설계를 사용하여 실험 동물들을 집단에 배정하였다. 첫 번째로, 실험 동물들을 그들의 초기 종양 부피에 따라 균질한 블록들로 나누었다. 두 번째로, 각각의 블록 내에서, 치료에 대한 실험 동물들의 무작위화를 수행하였다. 무작위화 블록 설계를 사용하여 실험 동물들을 배정하는 것은, 각각의 동물이 주어진 치료에 배정되는 데 동일한 확률을 가지며, 이에 따라 계통 오류(systematic error)를 감소시키도록 보장하였다.

[0711] 일상적인 모니터링시에, 움직임, 먹이 및 물 소비의 시각적 평가, 체중 증가/손실(체중은 매주 2회 측정하였음), 눈/모발의 윤기 상실(matting) 및 임의의 다른 비정상 효과와 같은, 정상 거동에 대한 종양 성장 및 치료의 어떠한 효과에 대해서도 동물들을 검사하였다.

[0712] 종점은 종양 성장이 지연될 수 있는지 또는 종양 보유 마우스가 치유될 수 있는지 중 어느 것이었다. 캘리퍼를 사용하여 종양 크기를 2개의 치수에서 매주 2회 측정하였으며, 부피는 하기 식을 사용하여 ㎣로 표현하였다: $V = 0.5\ a \times b^2$(여기서, a 및 b는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경임). 이어서, 종양 크기를 T-C 및 T/C 값 둘 모두의 계산에 사용하였다. 처리군의 평균 종양 크기가 1000 ㎣에 도달하는 데 필요한 시간(단위: 일수)으로서 T를 사용하여 T-C를 계산하였으며, C는 대조군의 평균 종양 크기가 동일한 크기에 도달하는 데 걸린 시간(단위: 일수)이었다. T/C 값(단위: %)은 항종양 효능의 지표였으며; T 및 C는 주어진 날에 대한 각각 처리군 및 대조군의 평균 종양 부피였다. 완전 종양 퇴행(complete tumor regression, CR)은 촉진(palpation)의 한계(62.5 ㎣) 미만으로 감소된 종양으로서 규정된다. 부분 종양 퇴행(partial tumor regression, PR)은 초기 종양 부피로부터 감소된 종양으로서 규정된다. 3회 이상의 연속 종양 측정에서의 CR 또는 PR의 최소한의 지속시간이, CP 또는 PR을 지속적이라고 간주하는 데 필요하다.

[0713] 체중 손실이 20%를 초과하거나 또는 집단의 평균 종양 크기가 2000 ㎣를 초과하는 동물들을 안락사시켰다. 이 연구는 최종 투여 후 2주의 관찰 후에 종료하였다.

[0714] 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)를 포함하는 요약 통계치가 각각의 시점에서 각각의 집단의 종양 부피에 대해 제공되며, 이는 표 15에 나타나 있다. 집단들 사이의 종양 부피 차이의 통계학적 분석을 일원분산분석(one-way ANOVA)을 사용하여 평가한 후, 게임즈-호웰(Games-Howell)(등분산성이 가정되지 않음)을 사용하여 개별 비교들을 행하였다. 모든 데이터는 SPSS 18.0을 사용하여 분석하였다. $p < 0.05$를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0715] [표 15]

일수	종양 부피(mm³)a					
	비히클	25 mg/kg의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자	50 mg/kg의 크리조티닙	50 mg/kg의 에를로티닙	50 mg/kg의 크리조티닙; 50 mg/kg의 에를로티닙	1 mg/마우스의 세툭시맙
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

[0716]

[0717] 비히클 처리군(집단 1)의 평균 종양 크기는 종양 접종 후 일수 23에서 1,758 ㎟에 도달하였다. 25 mg/kg 용량 수준의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자(집단 2)에 의한 처리는 모든 마우스에서 완전 종양 퇴행(CR)으로 이어졌는데, 이때 이는 3회 초과의 연속 종양 측정에서 지속적이었다(일수 23의 비히클군과 비교하여 평균 TV=23 ㎟, T/C 값=1%, p=0.004).

[0718] 50 mg/kg 용량 수준의 단제로서의 크리조티닙(집단 3)에 의한 치료는 항종양 활성을 나타내지 않았으며; 평균 종양 크기는 일수 23에서 2,102 ㎟였다(비히클군과 비교하여 T/C 값=120%, p=0.944).

[0719] 50 mg/kg 용량 수준의 단제로서의 에를로티닙(집단 4)에 의한 치료는 미소한 항종양 활성을 나타내었지만, 비히클군과 비교하여 유의한 차이는 발견되지 않았으며; 평균 종양 크기는 일수 23에서 1,122 ㎟였는데(비히클군과 비교하여 T/C 값=64%, p=0.429), 이때 비히클군과 비교하여 1,000 ㎟의 종양 크기에서 4일의 종양 성장 지연이 있었다.

[0720] 크리조티닙(50 mg/kg, 집단 5)과 에를로티닙(50 mg/kg, 집단 5)의 병용은 유의한 항종양 활성을 나타내었으며; 평균 종양 크기는 일수 23에서 265 ㎟였는데(T/C=15%; p=0.008), 이때 비히클군과 비교하여 1,000 ㎟의 종양 크기에서 17일의 종양 성장 지연이 있었다.

[0721] 단제로서의 1 mg/마우스 용량 수준의 세툭시맙(집단 6)은 유의한 항종양 활성을 나타내었으며; 평균 종양 크기는 일수 23에서 485 ㎟였는데(T/C=28%; p=0.018), 이때 비히클군과 비교하여 1,000 ㎟의 종양 크기에서 17일의 종양 성장 지연이 있었다. 도 15 및 표 16은 다양한 요법들의 항종양 활성을 나타낸다.

[0722] [표 16]

처리	일수 23에서의 종양 크기(mm³)	T/C(%)	1000 mm³에서의 T-C(일수)	p값
비히클	1758±259	--	--	--
이중특이성 EGFR/c-Met 분자 (25 mg/kg)	23±7	1	--	0.004
크리조티닙 (50 mg/kg)	2102±298	120	-1	0.944
에를로티닙 (50 mg/kg)	1122±202	64	4	0.429
크리조티닙+ 에를로티닙 (50 mg/kg+50 mg/kg)	265±40	15	17	0.008
세툭시맙 (1 mg/마우스)	485±61	28	17	0.018

[0723]

[0724] 중간 내지 심각한 체중 손실이 비히클군에서 관찰되었는데, 이는 증가하는 종양 부하(tumor burden)에 기인할 수 있었을 것이며; 3 마리는 죽었으며, 1 마리의 마우스는 일수 23일까지 BWL>20%이었을 때 안락사시켰다. 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 약간의 독성이 집단 2에서 관찰되었는데; 3 마리의 마우스를 처리 기간 동안 BWL>20%일 때 안락사시켰으며; 2주의 관찰 기간 동안 처리를 중단했을 때 체중을 점차로 회복하였다. 비히클군과 비교하여 크리조티닙 또는 에를로티닙의 단제요법군에서 더 심각한 체중 손실이 관찰되었는데, 이는 치료 관련 독성을 시사한다. 크리조티닙과 에를로티닙의 병용은 일반적으로 투여 단계 동안 내약성을 나타내었지만, 연구의 종료시에 심각한 체중 손실이 관찰되었는데, 이는 비처리 기간 동안의 빠른 종양 성장의 재개에 기인할

수 있었을 것이다. 세툭시맙의 단제요법은 이 연구에서 우수한 내약성을 나타내었으며; 체중 손실은 종양 성장의 재개로 인해 단지 연구의 종료시에 관찰되었다.

[0725] 요약하면, 25 mg/kg(3회/주 x3주)의 이중특이성 EGFR/c-Met 분자는 SCID/베이지 마우스에서 H292-HGF 인간 폐암 이종이식편 모델에서 완전한 반응을 생성하였다. 이 처리는 10 마리의 마우스 중 7 마리에서 내약성을 나타내었는데, 결과적으로는 10 마리의 마우스 중 3 마리에서 심각한 체중 손실이 있었다. 도 9는 처리 후 시점들 동안의 종양 크기에 대한 다양한 요법들의 영향을 나타낸다.

[0726] **실시예 8: 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 반감기 연장**

[0727] 신장 여과를 감소시키고 이에 따라 단백질의 혈청 반감기를 연장하기 위해 다수의 방법이 기술되어 왔는데, 이러한 방법은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 다른 중합체에 의한 변형, 알부민에 대한 결합, 알부민 또는 다른 혈청 단백질에 결합하는 단백질 도메인에 대한 융합, 알부민에 대한 유전자 융합, IgG Fc 도메인에 대한 융합, 및 긴 비구조화 아미노산 서열에 대한 융합을 포함한다.

[0728] 분자의 C-말단에 유리 시스테인을 도입시킴으로써 수력학적 반경을 증가시키기 위하여 이중특이성 EGFR/c-Met 분자를 PEG로 변형시켰다. 가장 일반적으로는, 시스테인 잔기의 유리 티올 기를 사용하여, 표준 방법을 사용하여 말레이미드 또는 요오도아세트아미드 기로 작용화된 PEG 분자를 부착한다. 1000, 2000, 5000, 10,000, 20,000, 또는 40,000 kDa의 선형 PEG를 포함하는 다양한 형태의 PEG를 사용하여 단백질을 변형시킬 수 있다. 이들 분자량의 분지형 PEG 분자가 또한 변형에 사용될 수 있다. 일부 경우에, PEG 기는 또한 이중특이성 EGFR/c-Met 분자 내의 1차 아민을 통해 부착될 수 있다.

[0729] 페길화(PEGylation)에 더하여, 천연 발생 3-나선 번들 혈청 알부민 결합 도메인(ABD) 또는 공통 알부민 결합 도메인(ABDCon)과의 융합 분자로서 이들 단백질을 생성함으로써 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 반감기를 연장시켰다. 이들 단백질 도메인을 표 12에 기재된 링커들 중 임의의 것을 통해 c-Met-결합 FN3 도메인의 C-말단에 연결시켰다. ABD 또는 ABDCon 도메인은 또한 1차 서열 내의 EGFR-결합 FN3 도메인과 c-Met 결합 FN3 도메인 사이에 배치될 수 있다.

[0730] **실시예 9: 선택된 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 특성화**

[0731] 선택된 이중특이성 EGFR/c-Met 분자들을, EGFR 및 c-Met 둘 모두에 대한 그들의 친화도, EGFR 및 c-Met 자가인산화를 억제하는 그들의 능력, 및 HGF 세포의 증식에 대한 그들의 영향에 대해 특성화하였다. 재조합 EGFR 및/또는 c-Met 세포외 도메인에 대한 이중특이성 EGFR/c-Met 분자의 결합 친화도를 실시예 3에 기재된 프로토콜에 따라 프로테온 기기(바이오라드)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 방법에 의해 추가로 평가하였다. 특성화의 결과가 표 17에 나타나 있다.

[0732] [표 17]

	K_D (EGFR, nM)	K_D (c-Met, nM)	H441 세포에서의 pMet 억제 (IC_{50}, nM)	H292 세포에서의 H292 pEGFR 억제 (IC_{50}, nM)	HGF-유도 H292 세포에서의 H292-HGF 증식 억제(IC_{50}, nM)
ECB15	0.2	2.6	**해당없음**	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

[0733]

[0734] **실시예 10. 이중특이성 EGFR/cMet 항체의 생성**

[0735] 수 개의 단일특이성 EGFR 및 c-Met 항체들을 IgG1 카파로 표현하였는데, 이는 그들의 Fc 영역 내에서 Fc 치환 K409R 또는 F405L(넘버링은 EU 인덱스에 따름)을 갖는다. 이들 단일특이성 항체를 2개의 CHO 세포주에서 발현시켰는데, 이때 하나의 세포주는 감소된 푸코실화 능력을 가졌으며, 그 결과 항체 다당쇄 내의 푸코스 함량이 1

내지 15%인 항체가 생성되었다.

[0736] 이들 단일특이성 항체를 단백질 A 컬럼(하이트랩 마브셀렉트 수레(HiTrap MabSelect SuRe) 컬럼)을 사용하여 표준 방법을 이용하여 정제하였다. 용출 후, 풀(pool)들을 D-PBS(pH 7.2) 내로 투석하였다.

[0737] (WO2011/131746호에 기재된 바와 같이) 시험관내 Fab 아암 교환으로 단일특이성 EGFR mAb와 단일특이성 c-Met mAb를 배합함으로써 이중특이성 EGFR/c-Met 항체를 생성하였다. 간략하게 말하면, PBS(pH 7 내지 7.4) 및 75 mM 2-메르캅토에탄올아민(2-MEA) 중에서 각각의 항체를 약 1 내지 20 mg/ml로 1:1 몰비로 함께 혼합하고 2 내지 6시간 동안 25 내지 37℃에서 인큐베이팅한 후, 표준 방법을 사용하여 투석, 투석여과, 접선 유동 여과 및/또는 스핀 세포 여과를 통해 2-MEA를 제거하였다.

[0738] 수 개의 단일특이성 항-EGFR 항체들과 항-c-Met 항체들을 시험관내 Fab 아암 교환에서 매트릭스 중에서 배합하여 이중특이성 항체들을 생성하였으며, 이어서 이를 추가로 특성화하였다. 생성된 이중특이성 항체들을 다음과 같이 검정을 사용한 4단계 전략을 이용하여 순위를 매겼다: 단계 1: FACS 검정에서 NCI-H441, NCI-H1975 및 A549 세포에 대한 결합. 단계 2: A549 세포에서의 pMet 인산화의 억제. 단계 3: NCI-H1975, KP4 및 NCI-H441 세포에서의 증식의 억제. 단계 4: A549 및 SNU-5 세포에서의 EGFR 인산화의 억제. 주목할 만한 것은, 부모 항체들의 특성이 이중특이성 항체에 보존되지 않았다는 것이다. 예를 들어, 이중특이성 항체 내의 소정의 EGFR 결합 아암의 존재는 상실 또는 감소된 억제, 또는 향상된 c-Met 인산화를 가져왔다. 특성화 연구에 기초하여, 엄선된 쌍들을 선택하였다.

[0739] 서열 번호 189의 VH 및 서열 번호 190의 VL을 갖는 항-EGFR 항체 2F8의 VH 및 VL 영역(항체 2F8은 국제 특허 공개 WO2002/100348호에 기재됨) 및 K409R 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 2가 항-EGFR 항체 E1-K409R을 생성하였다.

[0740] 서열 번호 189의 VH 및 서열 번호 190의 VL을 갖는 항-EGFR 항체 2F8의 VH 및 VL 영역(항체 2F8은 국제 특허 공개 WO2002/100348호에 기재됨) 및 F405L 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 2가 항-EGFR 항체 E1-K405L을 생성하였다.

[0741] 서열 번호 191의 VH 및 서열 번호 192의 VL을 갖는 항-EGFR 항체 018의 VH 및 VL 영역(항체 018은 국제 특허 공개 WO2009/030239호에 기재됨) 및 K409R 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 2가 항-EGFR 항체 E2-K409R을 생성하였다.

[0742] 서열 번호 191의 VH 및 서열 번호 192의 VL을 갖는 항-EGFR 항체 018의 VH 및 VL 영역(항체 018은 국제 특허 공개 WO2009/030239호에 기재됨) 및 F405L 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 2가 항-EGFR 항체 E2-F405L을 생성하였다.

[0743] 서열 번호 193의 VH 및 서열 번호 194의 VL을 갖는 항-c-Met 항체 069의 VH 및 VL 영역(항체 069는 WO2011/110642호에 기재됨) 및 K409R 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 2가 항-c-Met 항체 M1-K409R을 생성하였다.

[0744] 서열 번호 193의 VH 및 서열 번호 194의 VL을 갖는 항-c-Met 항체 069의 VH 및 VL 영역(항체 069는 WO2011/110642호에 기재됨) 및 F405L 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 2가 항-c-Met 항체 M1-F405L을 생성하였다.

[0745] 서열 번호 195의 VH 및 서열 번호 196의 VL을 갖는 항-c-Met 항체 058의 VH 및 VL 영역(항체 058은 WO2011/110642호에 기재됨) 및 K409R 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 항-c-Met 항체 M2-K409R을 생성하였다.

[0746] 서열 번호 195의 VH 및 서열 번호 196의 VL을 갖는 항-c-Met 항체 058의 VH 및 VL 영역(항체 058은 WO2011/110642호에 기재됨) 및 F405L 치환을 갖는 IgG1 불변 영역을 포함하는 단일특이성 항-c-Met 항체 M2-F405L을 생성하였다.

[0747] 이들 항체의 VH, VL, HC 및 LC 서열은 하기에 나타나 있다:

[0748] >서열 번호 189 EGFR mAb E1 VH

[0749] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD
DGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGV
MKDYFDYWGQGTLVTVSS

[0750] >서열 번호 190 EGFR mAb E1 VL

[0751] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG
VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

[0752] >서열 번호 191 EGFR mAb E2 VH

[0753] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN
IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL
GWGWGWYFDL WGRGTLVTVSS

[0754] >서열 번호 192 EGFR mAb E2 VL

[0755] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ
GTKVEIK

[0756] >서열 번호 193 cMet mAb M1 VH

[0757] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAY
NGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFD
YWGQGTLVTVSS

[0758] >서열 번호 194 cMet mAb M1VL

[0759] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP-ITFGQGTRLEIK

[0760] >서열 번호 195 cMet mAb M2 VH

[0761] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDD
GSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYYGSGS
YYNQDYWGQGTLVTVSS

[0762] >서열 번호 196 cMet mAb M2 VL

[0763] QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK

[0764] >서열 번호 199 EM1-mAb H1(항-EGFR, 405L)

[0765] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD
DGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGV
MKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS

[0766] DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0767] >서열 번호 200 EM-1 mAb L1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG
VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0768]

[0769] >서열 번호 201 EM-1 mAb H2(K409R, 항-cMet)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAY
NGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[0770]

[0771] >서열 번호 202 EM-1 mAb L2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0772]

[0773] >서열 번호 234 E2 mAb HC1(EGFR-F405L)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN
IKKDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL
GWGWGWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYF
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKP
SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCV
VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLN
GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFLLYSKL TVDKSRWQQG NVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

[0774]

[0775] >서열 번호 235 E2 mAb LC1(EGFR)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQ
SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNR
GEC

[0776]

[0777] >서열 번호 236 E2 mAb HC2(c-Met- K409R)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDD
GSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYYGSGS
YYNQDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

[0778]

[0779] >서열 번호 237 E2 mAb LC2(cMet)

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0780]

[0781] 생성된 단일특이성 항-EGFR 및 c-Met 항체들을 매트릭스 중에서 시험관내 Fab 아암 교환을 위해 혼합하였으며, 다양한 검정에서 특성화하였다. 이중특이성 항체 EM1-mAb는 mAb E1-F405L의 EGFR 결합 아암 및 mAb M1-K409R의 c-Met 결합 아암을 포함한다. 이중특이성 항체 EM2-mAb는 mAb E2-F405L의 EGFR 결합 아암 및 mAb M2-K409R의 c-Met 결합 아암을 포함한다. 이중특이성 항체 EM3-mAb는 mAb E1-K409R의 EGFR 결합 아암 및 mAb M1-F405L의 c-Met 결합 아암을 포함한다. 이중특이성 항체 EM4-mAb는 mAb E2-K409R의 EGFR 결합 아암 및 mAb M2-F405L의 c-Met 결합 아암을 포함한다. EM1-mAb와 EM3-mAb는 비견되는 특성을 가졌다.

[0782] 이중특이성 EM1-mAb를 당단백질의 감소된 푸코실화 능력을 갖는 CHO 세포주에서 배양하였으며, 이에 따라 약 1 내지 15%의 푸코실 함량을 갖는다. Fc 영역에 부착된 바이안테나리 복합형 올리고당으로부터의 코어 푸코스의 제거는, 항원 결합 또는 CDC 활성을 변경시키지 않고서, 개선된 FcγRIIIa 결합을 통해 항체의 ADCC를 유의하게 향상시킨다. 그러한 mAb는 바이안테나리 복합형의 Fc 올리고당을 담지하는 비교적 고도로 탈푸코실화된 치료용 항체의 성공적인 발현으로 이어지는 것으로 보고된 상이한 방법들을 사용하여 달성될 수 있으며, 전술되어 있다.

[0783] **실시예 11. 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 정제**

[0784] 표준 방법을 사용하여 잔류 부모 c-Met 및 EGFR 항체를 최소화하기 위하여 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여, 시험관내 Fab-아암 교환 후에 이중특이성 EM1-mAb를 추가로 정제하였다.

[0785] **실시예 12. 이중특이성 EGFR/c-Met 항체의 특성화**

[0786] EGF-자극된 EGFR 인산화, HGF-자극된 c-Met 인산화, ERK1/2 인산화, AKT 인산화의 억제, 리간드 결합 및 세포 생존력의 억제를 포함하는 다양한 특성 검정에서 EGFR/c-Met 이중특이성 항체 EM1-mAb를 시험하였다. EM1-mAb의 특성을 대조군 1가 EGFR- 또는 c-Met-결합 항체와, 그리고 알려진 EGFR 억제제, 예컨대 에를로티닙(CAS 183321-74-6; 티로신 키나제 억제제) 및 세툭시맙(CAS 205923-56-4)과 비교하였다.

[0787] EM-1 mAb 항체의 부모 항체들은 2가이기 때문에, 상응하는 대조군 1가 분자들의 혼합물 대비 이중특이성 EM-1 mAb의 상승작용 및 결합력을 정확히 비교하기 위하여, 대조군 1가 EGFR 및 c-Met 항체를 무관계/무관련 항원에 결합하는 Fab 아암과 배합하여 이중특이성 포맷으로 생성하였다.

[0788] 대조군 1가 EGFR 및 c-Met 항체를 생성하기 위하여, 서열 번호 198의 중쇄 및 서열 번호 209의 경쇄를 포함하는 단일특이성 항-HIV gp120 항체 gp120-K409R을 생성하였다. 서열 번호 197의 중쇄 및 서열 번호 209의 경쇄를 포함하는 단일특이성 항-HIV gp120 항체 gp120-F405L을 생성하였다.

[0789] E1-F405L과 gp120-K409R 사이의 시험관내 Fab 아암 교환에 의해 대조군 1가 항-EGFR mAb E1-F405L-gp120-K409R을 생성하였으며, M1-K409R과 gp120-F405L 사이의 시험관내 Fab-아암 교환에 의해 대조군 1가 항-cMet mAb M1-K409R-gp120-F405L을 생성하였으며, 앞서 기재된 바와 같이 정제하였다.

[0790] 이중특이성 항체의 특성화에서는 하기의 세포주를 사용하였다: NCI-H292(ATCC, 카탈로그 번호 CRL-1848), NCI-H1975(ATCC 카탈로그 번호 CRL-5908), SKMES-1(ATCC 카탈로그 번호 HTB-58), A431(ATCC 카탈로그 번호 CRL-1555), NCI-H441(ATCC 카탈로그 번호 HTB-174), NCI-H3255(DCTD 종양/세포주 리포지토리(repository), 엔씨아이, 프레데릭(NCI, Frederick), 문헌[NCI-Navy Medical oncology Cell Line supplement. J Cell Biochem suppl 24, 1996]; 문헌[Tracy S. cancer Res 64:7241-4, 2004]; 문헌[Shimamura T. cancer Res 65:6401-8, 2005]) 및 HCC-827(ATCC 카탈로그 번호 CRL-2868). NCI-H292 및 SKMES-1 세포는 야생형 EGFR 및 야생형 c-Met 둘 모두를 발현한다. NCI-3255는 돌연변이체 L858R EGFR을 발현하고, EGFR 및 c-Met 증폭을 나타낸다. H1975는 돌연변이체 L858R/T790M EGFR 및 야생형 c-Met를 발현한다. HCC-827은 Δ (E746, A750) EGFR을 발현하고, EGFR 증폭을 나타낸다. 세포주 NCI-H292, NCI-H975, NCI-H441 및 NCI-H3255는 본 명세서에서 상호교환적으로 각각 H292, H975, H441 및 H3255로 지칭된다.

[0791] **세포 상에서의 EGFR 및 c-Met에 대한 이중특이성 EGFR/cMet 항체의 결합(A431 세포 결합 검정)**

[0792] 실시예 3("A431 세포 결합 검정") 및 실시예 6("H441 세포 결합 검정")에 기술된 프로토콜을 사용하여 세포 상에서의 EGFR 및 c-Met에 대한 결합에 대해 이중특이성 EGFR/c-Met 항체 EM1-mAb를 시험하였다. 세툭시맙, 및 EGFR E1-F405L-gp120-K409R에 대해 1가인 대조군 항체를 A431 세포에 대한 대조군들로서 사용하였다. 세툭시맙은 EC_{50} 값이 5.0 nM이었다. 표 18은 결합에 대한 EC_{50} 값을 나타낸다. EM1-mAb는 2가 단일특이성 부모 대조군 항체들과 비교할 때 결합에 있어서 1.9배(A431 세포) 및 2.3배(H441 세포) 감소를 보여주었다. 세툭시맙은 2가 부모 대조군 항체에 비견되었다. EM1-mAb는 EGFR 및 c-Met의 1가 결합으로 인해 부모 mAb들에 대한 값보다 더 높은 EC_{50} 결합 값을 나타낸다. EM1-mAb는 단일 아암 E1/불활성 아암 및 E2/불활성 아암 이중특이성 1가 mAb와 유사한 결합 EC_{50} 값을 갖는다.

[0793] [표 18]

	세포에 대한 결합의 EC_{50}(nM)		
	EM1-mAb	부모 mAb 들	E1-F405L-gp120-K409R(A431 세포) 또는 M1-K409R-gp120-F405L(H441 세포)
A431(EGFR 결합에 대한 검정)	9.6 ± 3	5.1 ± 0.3	10.1 ± 0.6
H441(c-Met 결합에 대한 검정)	1.5 ± 0.7	0.65 ± 0.1	1.0 ± 0.3

[0794]

[0795] **수용체에 대한 리간드 결합의 억제**

[0796] ELISA 검정에서 EGFR 세포외 도메인에 대한 EGF의 결합 및 c-Met 세포외 도메인에 대한 HGF의 결합을 차단하는 능력에 대해 이중특이성 항체를 시험하였다. 재조합 인간 EGF R-Fc(알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 344-ER-050) 또는 인간 HGF(알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 294-HGN-025/CF)를 실온에서 2시간 동안 MSD 하이바인드(HighBind) 플레이트(미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재의 메조 스케일 디스커버리) 상에 코팅하였다. MSD 블로커 A 완충액(미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재의 메조 스케일 디스커버리)를 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 0.1 M HEPES 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척한 후, 형광 염료 표지된(MSD) EGF 또는 비오티닐화 HGF 단백질과 상이한 농도의 항체의 혼합물을 첨가하였다. 상이한 항체들의 농도를 1 nM로부터 4 μM까지 증가시키면서, 루테늄-표지된 EGF 단백질을 실온에서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 실온에서 온화하게 진탕하면서 2시간 인큐베이션 후에, 플레이트를 0.1 M HEPES 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척하였다. MSD 판독 완충액 T를 희석시키고 분배하였으며, 섹터 이미저 6000으로 신호를 분석하였다. 상이한 항체들의 농도를 1 nM로부터 2 μM까지 증가시키면서, 10 nM의 비오티닐화 HGF를 실온에서 30분 동안 인큐베이팅한 것을 제외하고는, EGF/EGFR 억제 검정과 같이 HGF 억제 검정을 수행하였다.

[0797] EM1-mAb는, 50 nM EGF의 존재 하에서 10.7 nM ± 1.2의 IC_{50} 값으로, 그리고 80 nM EGF의 존재 하에서 10.6 ± 1.5 nM의 IC_{50} 값으로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 억제하였다. 부모 2가 항체는, 50 nM EGF의 존재 하에서 0.14 ± 1.5 nM의 IC_{50} 값으로, 그리고 80 nM EGF의 존재 하에서 1.7 ± 1.4 nM의 IC_{50} 값으로 EGFR에 대한 EGF의 결합을 억제하였다. EM1 mAb는 부모 2가 mAb와 비교할 때 EM1 mAb의 1가 결합으로 인해 EGFR 세포외 도메인에 대한 EGF 결합에 대해 더 약한 억제를 가졌다.

[0798] EM1-mAb는 29.9 ± 1.5 nM의 IC_{50} 값으로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 억제하였다. 부모 2가 항체는 14.8 ± 1.6 nM의 IC_{50}으로 c-Met에 대한 HGF의 결합을 억제하였다. EM1 mAb는 부모 2가 mAb와 비교할 때 EM1-mAb의 1가 결합으로 인해 cMet 세포외 도메인에 대한 HGF 결합에 대해 더 약한 억제를 가졌다.

[0799] **EGF-자극된 EGFR 인산화 및 HGF-자극된 c-Met 인산화의 억제**

[0800] EGFR 및 c-Met 인산화의 억제에 대한 IC_{50} 값을 결정하기 위해 항체를 시험하였다. 실시예 2("EGF-자극된 EGFR 인산화의 억제") 및 실시예 6("HGF-자극된 c-Met 인산화의 억제")에 기재된 바와 같이 다양한 항체 농도들(최종 0.035 내지 700 nM)에서 EGF-자극된 EGFR 인산화 및 HGF-자극된 c-Met 인산화의 억제를 평가하였다. 일부 실험에서는, EGF 및 HGF 둘 모두를 세포에 첨가하였으며, 따라서 동일한 세포 용해물을 사용하여 EGFR 인산화 및 c-Met 인산화 둘 모두를 검출할 수 있었다.

[0801] EGFR에 대해 1가인 대조군 항-EGFR mAb E1-F405L-gp120-K409R 및 저 푸코스 함량을 갖는 부모 2가 항-EGFR 항체를 대조군 항체들로 사용하였다. 표 19는 이들 검정의 IC_{50} 값을 나타낸다.

[0802] [표 19]

	pEGFR(IC_{50}, nM)		pMet(IC_{50}, nM)	
세포주	H292	H1975	H292	H1975
항체				
EM1-mAb	8.6 내지 29	1.5	0.55 내지 0.83	0.64
E1-F405L-gp120-K409R	10.9 내지 13.1	미검출	0.7 내지 4	미검출
부모 EGFR (F405L)mAb*	1.5	미검출	효과 없음	미검출

[0803] *항체는 저 푸코스 함량을 가졌음.

[0804] **1가 항체들의 혼합물과 비교하여 EM1-mAb에 의한 pERK 및 pAKT의 향상된 억제(mAb pERK 검정)(mAb pAKT 검정)**

[0805] pERK 및 pAKT 하류 신호전달에 대한 mAb 효과를 평가함으로써 이중특이성 EGFR/c-Met 항체에 의한 향상된 효력에 대한 잠재성을 평가하였다. 이들 실험을 위하여, 1가 대조군 EGFR 항체와 1가 대조군 c-Met 항체의 혼합물을 이중특이성 EM1-mAb와 비교하였다. 투명한 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들(눈크) 내에서, 1 mM 소듐 피루베이트(깁코), 0.1 mM NEAA(깁코), 10% 열 불활성화 소태아 혈청(깁코) 및 7.5 ng/mL HGF(알앤디 시스템즈 카탈로그 번호 294-HGN)으로 보충된, 글루타맥스 및 25 mM HEPES(인비트로젠)를 함유하는 100 μL/웰의 RPMI 배지 중에서 세포를 평판배양하고, 가습된 5% CO_2 분위기 내에서 37℃에서 하룻밤 부착되게 하였다. 세포는 혈청-기아상태에 두지 않았다. 다양한 농도들(최종 0.11 내지 700 nM)의 1가 대조군 항체들 또는 EM1-mAb에 의해 세포를 30분(pERK 검정) 또는 1시간(pAkt 검정) 동안 처리하였다.

[0806] 메조 스케일 디스커버리로부터의 하기의 키트를 사용하여 그리고 제조자의 사용설명서에 따라 세포를 pERK 또는 pAKT 수준에 대해 평가하였다: 포스포-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; Thr185/Tyr187) 검정 전 세포 용해물 키트(Assay Whole Cell Lysate Kit)(카탈로그 번호 K151DWD, 포스포-Akt(Ser473) 검정 전 세포 용해물 키트(카탈로그 번호 K151CAD), 포스포-Akt(Thr308) 검정 전 세포 용해물 키트(카탈로그 번호 K151DYD). pERK 검정을 위해서, 세포를 용해시켰으며, 전 세포 용해물을 항-포스포-ERK1/2 항체(잔기 Thr202 및 Tyr204에서 인산화되는 ERK1 및 잔기 Thr185 및 Tyr187에서 인산화되는 ERK2를 인식함)로 코팅된 플레이트에 첨가하였으며, MSD 설포-태그™ 시약과 접합된 항-토탈 ERK1/2 항체(anti-total ERK1/2 antibody)를 사용하여 인산화된 ERK1/2를 검출하였다. pAKT Ser473 검정을 위해서, 포획 항체는 항-토탈 AKT 항체이고 검출 항체는 MSD 설포-태그™ 시약과 접합된 항-pAKT Ser473 항체였다. pAKT Thr308 검정을 위해서, 포획 항체는 항-토탈 AKT 항체이고, 검출 항체는 MSD 설포-태그™ 시약과 접합된 항-pAKT Thr308 항체였다.

[0807] 제조자-설정 검정-전용 디폴트 세팅을 사용하여 섹터® 이미저 6000 기기(메조 스케일 디스커버리) 상에서 플레이트를 판독하였다. 항체 농도의 로그에 대한 전기화학발광 신호로서 데이터를 도표로 나타내었으며, 그래프패드 프리즘 5 소프트웨어를 사용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량 반응에 데이터를 피팅함으로써 IC_{50} 값을 결정하였다. NCI-H292, H1975 및 SKMES-1 세포주를 이들 검정에서 사용하였다.

[0808] 이중특이성 EM1-mAb에 의한 ERK 인산화의 억제에 대한 IC_{50}은, 시험된 세포주에 따라, 2개의 1가 대조군 항체들의 혼합물에 비하여 약 14 내지 63배 더 낮았다(표 20). 2개의 1가 대조군 항체들의 혼합물과 비교하여 EM1-mAb의 개선된 효력은 이들 세포주에 대한 EM1-mAb의 향상된 결합으로 인한 협동적 효과 또는 결합력 효과를 시사한다. NCI-H1975 세포주에서의 Ser475(pAKTS475) 및 Thr308(pAKTT308) AKT 인산화의 억제에 대한 IC_{50}은, 2개의 1가 대조군 항체들의 혼합물과 비교할 때, 각각 약 75배 및 122배 더 낮았다(표 21). 2개의 1가 대조군 항체들의 혼합물과 비교하여 EM1-mAb의 개선된 효력은 이들 세포주에 대한 EM1-mAb의 향상된 결합으로 인한 협동적 효과 또는 결합력 효과를 시사한다. 따라서, EM1-mAb의 이중특이성 본질은 하류 신호전달 효과기에 대한 향상된 효과를 가져왔다.

[0809] [표 20]

	IC_{50}(nM) pERK		
	항체		
세포주	이중특이성 EM1-mAb	E1-F405L-gp120-K409R 과 M1-K409R-gp120-F405L 의 혼합물	이중특이성 항체 대 2 개의 1 가 대조군 항체들의 혼합물의 배수 변화
H292	0.64	34.94	55
H1975	1.67	106	63
SKMES-1	0.54	7.63	14

[0810]

[0811] [표 21]

항체	IC_{50}(nM) pAKTS473	IC_{50}(nM) pAKTT308
이중특이성 EM1-mAb	0.87	0.96
E1-F405L-gp120-K409R 과 M1-K409R-gp120-F405L 의 혼합물	65	117
2 개의 1 가 항체들의 혼합물 대 이중특이성 항체의 배수 변화	75	122

[0812]

[0813] **항체에 의한 인간 종양 세포 성장 또는 생존력의 억제**

[0814] 이중특이성 EM1-mAb에 노출 후, 다양한 종양 세포의 생존력을 측정함으로써 c-Met-의존성 세포 성장의 억제를 평가하였다. NCI-H292, SKMES-1, NCI-H1975 및 NCI-H3255 세포를 연구에서 사용하였다.

[0815] 표준 2D 포맷 및 낮은 부착 포맷에서 세포를 배양하였다. 에를로티닙 및 세툭시맙을 대조군들로서 사용하였다. 표 22에는 이 검정에 대한 IC_{50} 값이 요약되어 있다.

[0816] **항체에 의한 인간 종양 세포 성장 또는 생존력의 억제 – 표준 2D 포맷**

[0817] 2개의 포맷에서 항체에 대한 노출 후, NCI-H292 및 NCI-H1975의 생존력을 특정함으로써 세포 성장의 억제를 평가하였다. 표준 2D 포맷을 위하여, 불투명한 백색 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들(퍼킨엘머(PerkinElmer)) 내에서, 1 mM 소듐 피루베이트(깁코), 0.1 mM NEAA(깁코), 및 10% 열 불활성화 소태아 혈청(깁코)으로 보충된, 글루타맥스 및 25 mM HEPES(인비트로젠)를 함유하는 RPMI 배지 중에서 세포를 평판배양하고, 37℃, 5% CO_2 에서 하룻밤 부착되게 하였다. HGF(7.5 ng/mL, 알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 294-HGF)와 함께, 다양한 농도들의 항체(최종 0.035 내지 700 nM)에 의해 세포를 처리하고, 이어서 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이팅하였다. 일부 세포는 대조군으로서 HGF 또는 항체에 의해 처리되지 않은 상태로 남겨 두었다. 실시예 3에서의 "인간 종양 세포 성장의 억제(NCI-H292 성장 및 NCI-H322 성장 검정)"에서 기술된 바와 같이, 셀타이터-글로® 시

약(프로메가)을 사용하여 생존 세포를 검출하였으며, 데이터를 분석하였다.

[0818] **항체에 의한 인간 종양 세포 성장 또는 생존력의 억제 – 낮은 부착 포맷**

[0819] 낮은 부착 조건에서의 생존을 평가하기 위하여, 초저 부착 96웰 플레이트(코닝 코스타(Corning Costar)) 내에서, 1 mM 소듐 피루베이트(깁코), 0.1 mM NEAA(깁코), 및 10% 열 불활성화 소태아 혈청(깁코)으로 보충된, 글루타맥스 및 25 mM HEPES를 함유하는 50 μL/웰의 RPMI 배지(인비트로젠) 중에서 세포를 평판배양하고, 37℃, 5% CO_2에서 하룻밤 부착되게 하였다. HGF(7.5 ng/mL, 알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 294-HGN)와 함께, 다양한 농도들의 항체(최종 0.035 내지 700 nM)에 의해 세포를 처리하고, 이어서 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이팅하였다. 일부 세포는 대조군으로서 HGF 또는 항체에 의해 처리되지 않은 상태로 남겨 두었다. 발광 판독 전에 용해물을 불투명한 백색 96웰 조직 배양-처리된 플레이트들(퍼킨엘머)에 옮긴 것을 제외하고는, 실시예 3에서의 "인간 종양 세포 성장의 억제(NCI-H292 성장 및 NCI-H322 성장 검정)"에서 전술된 바와 같이, 셀타이터-글로® 시약(프로메가)을 사용하여 생존 세포를 검출하였으며, 데이터를 분석하였다.

[0820] 표준 2D 배양에서, EM1-mAb는 31 nM의 IC_{50}으로 NCI-H292 성장을 억제하였으며, 낮은 부착 조건에서는 0.64 nM의 IC_{50}으로 NCI-H292 성장을 억제하였다. EM-1 mAb는 표준 2D 배양 및 낮은 부착 배양에서 각각 700 nM 초과 및 0.8 내지 1.35 nM의 IC_{50}으로 NCI-H1975 세포 성장을 억제하였다. 야생형 EGFR 및 cMet 둘 모두를 발현하는 NCI-H292 세포에서, EM1-mAb는 세툭시맙과 비교할 때, 표준 2D에서는 22배 초과의 개선된 효력을, 그리고 낮은 부착 배양 조건에서는 약 330배 개선된 효력을 가졌다. L858R, T790M EGFR 돌연변이체 및 야생형 cMet를 발현하는 NCI-H1975 세포에서, EM-1 mAb는 낮은 부착 배양 조건에서 세툭시맙과 비교할 때 적어도 518배 개선된 효력을 가졌다. 표 22는 이들 검정의 요약을 나타낸다.

[0821] [표 22]

세포주	EGFR 상태	cMet 상태	EM1-mAb 표준 2D 배양 IC_{50}(nM)	EM1-mAb 낮은 부착 배양 IC_{50}(nM)	세툭시맙 표준 2D 배양 IC_{50}(nM)	세툭시맙 낮은 부착 배양 IC_{50}(nM)
NCI-H292	야생형	야생형	31	0.64	>700	212
NCI-H1975	L858R, T790M	야생형	>700	0.8 내지 1.35	>700	>700

[0822]

[0823] **에를로티닙과 EM1-mAb의 병용이 EGFR 돌연변이체 세포주의 성장 억제에 효율적이다.**

[0824] 에를로티닙 + EM1-mAb의 병용에 의한 세포 성장의 억제를 표준 2D 배양 조건 및 낮은 부착 포맷 둘 모두에서 평가하였다. NCI-H3255 및 HCC-827 세포를 "항체에 의한 인간 종양 세포 성장 또는 생존력의 억제"에서 전술된 바와 같이 평판배양하였다. HGF(7.5 ng/mL, 알앤디 시스템즈 카탈로그 번호 294-HGN)를 세포에 첨가하였으며, 이와 함께 항체에 의해 처리하였다. 다양한 농도들의 항체(최종 0.11 내지 700 nM), 또는 에를로티닙(최종 0.46 내지 3000 nM), 또는 에를로티닙 + 항체의 병용 - 고정비(예를 들어, 병용의 최저 농도 = 항체의 최저 농도(0.11 nM) + 에를로티닙의 최저 농도(0.46 nM))로 각각에 대해 증가하는 양을 사용함 - 에 의해 세포를 처리하였다. 일부 세포는 대조군으로서 HGF 또는 항체에 의해 처리되지 않은 상태로 남겨 두었다. "인간 종양 세포 성장의 억제(NCI-H292 성장 및 NCI-H322 성장 검정)"에서 전술된 바와 같이, 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 세포를 인큐베이팅하였으며, 이어서 셀타이터-글로® 시약(프로메가)을 사용하여 생존 세포를 검출하였으며, 데이터를 분석하였다. 표 23에 실험 결과가 요약되어 있다. 이 표에서, 이들 병용에 대한 IC_{50} 값은, 괄호 안에 표시된 것에 따라, 항체 또는 에를로티닙에 대한 상대적인 값이다.

[0825] NCI-H3255 및 HCC-827 세포(EGFR 돌연변이체 세포주) 둘 모두에서, 에를로티닙에 대한 EM1-mAb의 첨가는 둘 모두 세포 생존력의 억제 효력을 증가시키고 더 효과적이었으며, 그 결과 전체적으로 생존 세포가 더 적었다. 표준 2D 조건을 사용한 NCI-H3255 세포에서, 에를로티닙 단독에 대한 IC_{50}은 122 nM이었으며, 반면 병용은 49 nM이었다. 유사하게, HCC-827 세포에서, 에를로티닙 단독에 대한 IC_{50}은 27 nM이었으며, 반면 병용은 15 nM이었다. 또한, 에를로티닙 + EM1-mAb의 병용은 에를로티닙 + 세툭시맙의 병용보다 더 효과적이었다. 따라서, HGF의 존재 하에서, EM1-mAb의 첨가는 이 검정에서 에를로티닙의 효과를 증가시켰다.

[0826] NCI-H3255 세포는 L858R 돌연변이체 EGFR 및 증폭된 cMet를 발현한다. HCC-827 세포는 아미노산 위치 746 및 750에서 결실을 갖는 EGFR 돌연변이체 및 야생형 c-Met를 발현한다. EM1-mAb는, 표준 배양 또는 낮은 부착 배양 어느 것에서도, 에를로티닙의 존재 하에서 HCC-827 및 NCI-3255의 생존력에 있어서, 에를로티닙 단독보다 더

강한 효과를 갖는다.

[0827] [표 23]

샘플	EM1 mAb + 에를로티닙 IC_{50}(nM)	에를로티닙 IC_{50}(nM)
NCI-H3255, 표준 2D 배양	49.0	122
NCI-H3255, 낮은 부착 배양	10.6	47.1
HCC-827, 표준 2D 배양	14.6	27.4
HCC-827, 낮은 부착 배양	3.5	9.5

[0828]

[0829] **실시예 13. 시험관내 세포주에서의 EM1-mAb의 항체 매개 세포성 세포독성(ADCC).**

[0830] ADCC 검정을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다(문헌[Scallon *et al.*, Mol Immunol 44:1524-1534 2007]). 간략하게 말하면, PBMC를 피콜 구배(Ficoll gradient)에 의해 인간 혈액으로부터 정제하고, ADCC 검정을 위한 효과기 세포로 사용하였다. NCI-H292, NCI-H1975 또는 NCI-H441 세포를 표적 세포로 사용하였는데, 이때 1개의 표적 세포 대 50개의 효과기 세포의 비로 사용하였다. 표적 세포를 37℃에서 20분 동안 BATDA(퍼킨엘머)로 사전-표지하고, 2회 세척하고, DMEM, 10% 열-불활성화 FBS, 2 mM L-글루타민(모두 인비트로젠으로부터의 것) 중에 재현탁시켰다. 표적 세포(1×10^4개 세포) 및 효과기 세포(0.5×10^6개 세포)를 합하고, 100 μl의 세포를 96웰 U-바닥 플레이트의 웰에 첨가하였다. 추가 100 μl를 야생형 및 프로테아제-내성 mAb 작제물과 함께 또는 이것 없이 첨가하였다. 모든 샘플을 2회 반복하여 수행하였다. 플레이트를 200 g에서 3분 동안 원심분리하고, 37℃에서 2시간 동안 인큐베이팅하고, 이어서 200 g에서 3분 동안 다시 원심분리하였다. 웰당 총 20 μl의 상청액을 회수하였으며, 200 μl의 델피아(DELPHIA) 유로퓸계 시약(퍼킨엘머)의 첨가에 의해 세포 용해를 측정하였다. 엔비전 2101 다중표지 판독기(Envision 2101 Multilabel Reader)(퍼킨엘머)를 사용하여 형광을 측정하였다. 0.67% 트리톤(Triton) X-100(시그마 알드리치(Sigma Aldrich))을 사용한 최대 세포독성 및 임의의 항체의 부재하에 표적 세포로부터의 BATDA의 자발적인 방출에 의해 결정된 최소 대조군에 대해, 하기 식을 사용하여 데이터를 정규화하였다: (실험 방출 − 자발적인 방출)/(최대 방출 − 자발적인 방출) × 100%. 그래프패드 프리즘 v5를 사용하여 S자형 용량-반응 모델에 데이터를 피팅하였다.

[0831] EM1 mAb 및 비교군들에 대한 ADCC 결과가 표 24(NCI-H292 세포), 표 25(NCI-H1975 세포) 및 표 26(NCI-H441 세포) 및 표 27(NCI-H1993 세포)에 요약되어 있는데, 이들 표에는 EC_{50} 값 및 달성된 최대 용해율이 열거되어 있다. NCI-H292 세포는 야생형(WT) EGFR, WT c-Met, 및 WT KRAS를 발현하고; NCI-H1975 세포는 돌연변이체 EGFR(L858R T790M), WT cMet 및 WT KRAS를 발현하고; NCI-H441은 WT EGFR, WT cMet, 및 돌연변이체 KRAS(G12V)를 발현하고, NCI-H1993 세포는 WT EGFR, 증폭된 cMet, WT KRAS를 발현한다. KRAS는 또한 GTPase KRas로 그리고 V-Ki-ras2 키르스텐(Kirsten) 래트 육종 바이러스성 발암유전자 상동체로 알려져 있다.

[0832] EM1-mAb는 더 낮은 EC_{50} 값을 갖는 것에 의해 나타난 바와 같이, 세툭시맙 및 EM1-mAb의 정상 푸코스 버전보다 ADCC 반응에 대해 더 높은 효력을 갖는다. EM1 mAb는 달성된 최대 용해율의 관점에서 세툭시맙 및 정상 푸코스 이중특이성 mAb보다 더 높은 효능을 갖는다. 표 24 내지 표 27에서의 프로파일로부터, EM-1 mAb는 돌연변이체 및 WT EGFR, 정상 및 증폭된 수준을 갖는 WT cMet, 및 WT 및 돌연변이체 KRAS를 갖는 세포에 대해 ADCC 활성을 갖는다.

[0833] [표 24]

mAb	효력(EC_{50} μg/ml)	R^2	효능(달성된 최대 용해율)
EM1 mAb	0.0058	0.93	19%
항-EGFR x cMet 정상 푸코스 이중특이성 mAb	0.22	0.85	13%
세툭시맙	0.0064	0.94	12%

[0834]

[0835] [표 25]

mAb	효력(EC_{50} μg/ml)	R^2	효능(달성된 최대 용해율)
EM1 mAb	0.022	0.91	19%
항-EGFR x cMet 정상 푸코스 이중특이성 mAb	1.8	0.79	13%
세툭시맙	0.029	0.70	11%

[0836]

[0837] [표 26]

mAb	효력(EC_{50} μg/ml)	R^2	효능(달성된 최대 용해율)
EM1 mAb	0.022	0.97	24%
항-EGFR x cMet 정상 푸코스 이중특이성 mAb	0.52	0.87	7.9%
세툭시맙	0.013	0.85	15%

[0838]

[0839] [표 27]

mAb	효력(EC_{50} μg/mL)	R^2	효능(달성된 최대 용해율)
EM1 mAb	0.0013	0.95	27%
항-EGFR × cMet 정상 푸코스 이중특이성 mAb	0.054	0.87	17%
세툭시맙	0.0042	0.76	21%

[0840]

[0841] **실시예 14. EM1-mAb에 의한 종양 효능 연구**

[0842] 실시예 7의 "이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의한 종양 효능 연구"에 기술된 바와 같이, 종양 성장에 대한 EM1 mAb의 효능을 수행하였다. 간략하게 말하면, NCI-H292-HGF 세포를 2×10^6개로 컬트렉스와 함께 암컷 SCID 베이지 마우스 내로 피하(s.c.) 이식하였다. 이식 후 7일째에, 마우스를 종양 부피에 의해 집단당 10마리의 마우스로 된 5개의 집단으로 층별화하였다. 집단당 출발 평균 종양 부피가 62 내지 66 ㎣ 범위(소종양)가 된 후에 투여가 시작되었다. PBS 또는 치료제를 주당 2회 복막내(i.p.) 투여하였다.

[0843] 효능의 평가에는 또한 SKMES-HGF가 사용되었는데, SKMES-HGF는 인간 HGF(간세포 성장 인자)로 형질감염된 인간 편평 세포 암종이다. 이들 세포를 10×10^6개로 암컷 SCID 베이지 마우스 내로 s.c. 이식하였다. 이식 후 12일째에, 이들 마우스를 종양 부피에 의해 집단당 8마리의 마우스로 된 5개의 집단으로 층별화하였다. 집단당 출발 평균 종양 부피가 98 내지 101 ㎣ 범위(대종양)일 때 첫 번째 연구가 시작되었다. PBS 또는 치료제 mAb를 4주 동안 2회/주 i.p. 투여하였다. 이러한 더 큰 크기의 종양 연구에서는, 종양 부피가 약 200 내지 300 ㎣가 된 후에 2개의 집단으로 분할함으로써 마우스를 층별화하였다. 이어서, 이들 마우스를 2회/주(3주) i.p.로 세툭시맙(20 mg/kg) 또는 EM1-mAb(20 mg/kg)로 처리하였다.

[0844] 데이터의 요약이 표 28에 나타나 있다. 도 10은 시간 경과에 따른 분자의 효능을 나타낸다. EM1-mAb는 H292-HGF 소종양 모델에서, 그리고 SKMES-HGF 소종양 및 대종양 모델에서, 세툭시맙과 비교할 때 개선된 종양 억제 프로파일을 갖는다.

[0845] [표 28]

샘플 및 시간	세포주	kg 당 mg 의 투여량	부분 퇴행	완전 퇴행
일수 35 에서의 EM1	H292-HGF 소종양	20	10/10	10/10
		5	10/10	10/10
		1	0/10	0/10
일수 35 에서의 세툭시맙	H292-HGF 소종양	20	0/10	0/10
일수 67 에서의 EM1	SKMES-HGF 소종양	20	0/8	8/8
		5	1/8	6/8
		1	2/8	4/8
일수 67 에서의 세툭시맙		20	0/8	6/8
일수 70 에서의 EM1	SKMES-HGF 대종양	20	4/7	3/7
일수 35 에서의 세툭시맙		20	0/7	0/7

[0846]

[0847] 표 29는 SKMES-HGF 종양으로부터의 처리군들에서의 종양 크기를 나타내고, 표 30은 항종양 활성을 나타낸다.

[0848] EM1-mAb는 SKMES-HGF 모델에서 적게는 1 mg/kg까지의 다회 용량들에서 97% 이상으로 종양 성장을 억제하였다. 초기에 세툭시맙은 매우 효과적이었지만(20 mg/kg으로 88% TGI), 투여가 종료된 후에, 세툭시맙-처리된 종양은 다시 성장하였다. 대조적으로, 5 또는 20 mg/kg의 EM1-mAb로 처리된 종양은 연구 과정(2개월 초과)에 걸쳐 다시 성장하지 않았다.

[0849] [표 29]

일수	종양 부피(mm^3)				
	비히클	20 mg/kg 의 이중특이성 EM1	5 mg/kg 의 이중특이성 EM1	1 mg/kg 의 이중특이성 EM1	20 mg/kg 의 세툭시맙
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

[0850]

[0851] [표 30]

처리	일수 36 에서의 종양 크기(mm^3)	T/C(%)	1000 mm^3 에서의 T-C(일수)	*p* 값
비히클	994±114	--	--	--
20 mg/kg 의 이중특이성 EM1	0.19±0.12	0.02	--	
5 mg/kg 의 이중특이성 EM1	13±9	1.3	--	
1 mg/kg 의 이중특이성 EM1	26±14	2.6	--	
세툭시맙(20 mg/kg)	125±62	13	31	

[0852]

[0853] **실시예 15. 시험관내에서의 EM1-mAb에 의한 세포 이동의 억제**

[0854] **방법**

[0855] 종양 세포 이동의 억제에 대한 EM-mAb 및 대조군 1가 항체의 효과를 NIH-1650 세포에서 평가하였다. EGFR 돌연변이체 세포주 H1650(엑손 19 돌연변이[결실 E746, A750]를 갖는 폐 세기관지 폐포성 암종 세포)를 정상 배양 조건(37℃, 5% CO_2, 95% 습도) 하에서 조직 배양 플라스크 내에서 배양하였다. 모든 배지 및 보충은 세포 공급자(미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC)에 의해 제시된 바와 같았다.

[0856] H1650 폐 종양 세포를 200 μl/웰로 "U" 바닥 초저 부착(ULA) 96웰 플레이트(미국 튜크스베리 소재의 코닝) 내에서 10,000 세포/웰로 평판배양함으로써 구상체(spheroid)를 생성하였다. 이들 플레이트는 (37℃, 5% CO_2에서의 인큐베이션시에) 24시간 이내에 세포의 단일 구상체의 자발적인 형성을 자극하고, 정상 배양 조건 하에서 4일 동안 구상체를 성장시켰다.

[0857] 둥근바닥 96웰 플레이트(비디 바이오사이언스)를 37℃에서 1시간 동안 멸균수 중 0.1% 젤라틴(미국 빌레리카 소재의 이엠디 밀리포어(EMD Millipore))으로 코팅하였다. 화합물 평가 연구를 위하여, 일수 4의 10,000개의 세포 종양 구상체(H1650 및 NCI-H1975)를 코팅된 둥근바닥 플레이트에 옮기고, 20 ng/ml의 HGF(알앤디 시스템즈)와 함께 희석 시리즈로의 EM1-mAb, 저 푸코스 함량을 갖는 대조군 1가 항-EGFR mAb E1-F405L-gp120-K409R, 저 푸코스 함량을 갖는 대조군 1가 항-cMet mAb M1-K409R-gp120-F405L, 및 2개의 (저 푸코스로 생성된) 1가 항체 E1-F405L-gp120-K409R과 M1-K409R-gp120-F405L의 병용으로 처리하였다. 대조군들은 IgG_1 카파 동종형 대조군인 비히클(농도는 최고로 약물-처리된 세포와 동일함)로 처리하였다. 화합물의 효과를 48시간째에 분석하였는데, 이는 2x 대물렌즈와 함께, 완전 자동화 오페레타 하이 콘텐트 이미징 시스템(fully automated Operetta high content imaging system)(퍼킨엘머)에서 명시야 이미지를 사용하여, 이동 중인 세포에 의해 덮인 면적을 측정함으로써 행하였다. 배지 단독 대조군으로 나누어서 대조군에 대한 세포 이동률(%)을 생성함으로써 데이터를 정규화하여, 처리 효과로 인한 세포 이동(총 면적)의 억제를 평가하였다. 따라서, 1 미만의 값이 세포 이동에 대한 억제를 나타낼 것이다.

[0858] **결과**

[0859] EM1-mAb는, 대조군 1가 항-EGRF 및 항-c-Met 항체인 E1-F405L-gp120-K409R과 M1-K409R-gp120-F405L의 병용과 비교할 때, H1650(L858R EGFR 돌연변이체) 및 H1975(L858R/T790M EGFR 돌연변이체) 세포에서 세포 이동의 강력한 상승적 억제를 입증하였다. H1650 세포에서는, EM1-mAb의 6개의 최고 농도가 동종형 대조군에 비하여 세포 이동을 유의하게 억제하였다($p<0.001$). EM1-mAb에 대한 EC_{50} 값은 0.23 nM인 반면, 단일특이성 대조군 항체들의 병용에 대한 EC_{50} 값은 4.39 nM이었다. 따라서, EM1-mAb는 1가 대조군 항체들의 병용과 비교할 때 H1650 세포 이동을 억제함에 있어서 약 19배 더 효율적이었다. EM1-mAb의 세포 이동 억제의 수준은 H1650 및 H1975 세포에 대하여 단일특이성 대조군 mAb들의 병용보다 더 우수하였다. 표 31은 이 검정에 대한 EC_{50} 값을 나타낸다.

[0860] [표 31]

샘플	H1650		H1975
	EC_{50}(nM)	30 nM 에서의 억제율	30 nM 에서의 억제율
EM1-mAb	0.23	64%	38%
E1-F405L-gp120-K409R*과 M1-K409R-gp120-F405L*의 혼합물	4.39	59%	20%
E1-F405L - gp120-K409R*	5.44	15%	7%
M1-K409R-gp120-F405L*	7.36	43	10%

[0861] *항체는 저 푸코스 함량을 가짐.

[0862] **실시예 16. 항-c-Met 항체 069 및 5D5의 에피토프 맵핑**

[0863] 선형 및 구속성 CLIPS 펩티드(linear and constrained CLIPS peptide) 기술을 사용하여, 항-c-Met mAb 069 결합 에피토프를 맵핑하였다. 이들 펩티드는 인간 cMet의 SEMA, PSI, 및 Ig 도메인을 스캐닝하였다. 표준 Fmoc

화학을 이용하여 상기 언급된 cMet의 아미노산 서열을 사용하여 선형 및 CLIPS 펩티드를 합성하였으며, 포착제(scavenger)와 함께 삼불산(trifluoric acid)을 사용하여 탈보호하였다. 스캐폴드 상에 화학적으로 연결된 펩티드(Chemically linked Peptides on Scaffolds, CLIPS) 기술을 사용하여 입체구조 에피토프(conformational epitope)들을 재구성하기 위하여 구속성 펩티드를 화학적 스캐폴드 상에 합성하였다(문헌[Timmerman *et al.*, J Mol Recognition 20:283, 2007]). 이들 선형 및 구속성 펩티드를 펩스캔(PEPSCAN) 카드에 결합하고, 펩스캔 기반 ELISA를 사용하여 스크리닝하였다(문헌[Slootstra *et al.*, Molecular Diversity 1, 87-96, 1996]). 항-c-Met mab 069 결합 에피토프는 c-Met 아미노산 239-253 PEFRDSYPIKYVHAF(서열 번호 238) 및 346-361 FAQSKPDSAEPMDRSA(서열 번호 239)로 이루어진 불연속 에피토프이다. c-Met 아미노산 서열은 서열 번호 201에 나타나 있다.

[0864] 유사한 방법을 사용하여 mAb 5D5(메트맙, 오나르투주맙) 에피토프를 맵핑하였다. mAb 5D5는 c-Met 잔기 325-340 PGAQLARQIGASLNDD(서열 번호 240)에 결합한다.

[0865] **실시예 17. EM1-mAb에 의한 생체내 종양 효능 연구**

[0866] 실시예 7의 "이중특이성 EGFR/c-Met 분자에 의한 종양 효능 연구"에 기술되고 EGFR 돌연변이 또는 EGFR 및/또는 c-Met 증폭을 갖는 추가 종양 세포주를 사용하는 실시예 14에 기술된 바와 같이, 종양 성장에 대한 EM1 mAb의 효능을 수행하였다. 간략하게 말하면, SNU-5, H1975, HCC827 세포, 인간 HGF를 발현하는 H1975 세포, 또는 에를로티닙에 대한 증가된 내성을 위해 선택된 HCC827 세포들(HCC827-ER1 세포들)의 클론을 암컷 누드 마우스 내로 피하(s.c) 이식하였는데, 예외적으로 SNU-5 세포는 CR17/SCID 마우스 내에 이식하였다. 표 32에 나와 있는 지시된 투여량 및 일정으로 PBS 또는 EM1-mAb, 세툭시맙(CAS 205923-56-4), 에를로티닙(CAS 183321-74-6), 아파티닙(CAS 439081-18-2), 또는 EM-1 mAb와 아파티닙, 그리고 EM-1 mAb와 에를로티닙의 병용을 마우스에 복막내 투여하였다. %TGI(종양 성장 억제)로서 항종양 효능을 측정하였는데, 이때 %TGI는 100 - %T/C(실시예 7에 기술된 바와 같이 주어진 일수에서의 T=처리군의 평균 종양 크기; C=대조군의 평균 종양 크기)로 계산하였다.

[0867] 1차 EGFR 활성화 돌연변이를 갖는 종양(EGFR TKI에 대한 내성이 없음): (HCC827 종양, EGFR del(E746, A750))에서, 10 mg/kg이 투여된 EM1-mAb는 종양 성장을 82%로 억제하였다. 에를로티닙은 이 모델에서 유사하게 효과적이었으며, 에를로티닙과 EM1-mAb의 병용도 마찬가지였다. 도 11은 HCC827 종양 모델에서의 시간 경과에 따른 치료제의 효능을 나타낸다.

[0868] 야생형 EGFR 및 c-Met 유전자 증폭을 갖는 종양(위암 모델 SNU-5)에서, EM1-mAb는 완전 종양 퇴행으로 항종양 활성을 나타내었다(일수 34에서 98% TGI, $p<0.01$, 일원분산분석을 사용하여 비히클과 비교한 후, 게임즈-호웰을 사용하여 개별 비교를 행함). 항-EGFR mAb 세툭시맙의 항종양 활성은 이 모델에서 더 적었으며, 일수 34에 49%였다. 도 12는 SNU-5 모델에서의 시간 경과에 따른 치료제의 효능을 나타낸다.

[0869] 1차 EGFR 활성화 돌연변이 및 종양이 제1 세대 EGFR TKI에 대해 내성을 나타내게 하는 T790M EGFR 돌연변이를 함유하는 NSCLC 모델(H1975 모델)에서 EM1-mAb를 시험하였다. EM1-mAb는 누드 마우스 내에 이식된 H1975 세포주 모델에서 57% TGI로 종양 성장을 억제하였다($p<0.0001$, 프리즘(Prism) 3.03으로 로그랭크(Logrank) 분석을 사용하여 PBS 비히클과 비교함). 예측된 바와 같이, 에를로티닙은 T790M 돌연변이를 갖는 이 모델에서 효과적이지 않았다. 아파티닙은 EM1-mAb와 동일하게 효과적이었다(57% TGI). 세툭시맙, 및 EM1-mAb와 아파티닙의 병용이 가장 효과적이었는데, 각각 91% 및 96% 종양 성장 억제를 갖고서 종양을 퇴행시켰다(프리즘 3.03으로 로그랭크 분석을 사용하여, PBS와 비교된 세툭시맙, 그리고 PBS + 아파티닙 비히클군과 비교된 EM1-mAb + 아파티닙 둘 모두에 대해 $p<0.0001$). c-Met 신호전달 경로는 이 모델에서 활성화되지 않는데, 그 이유는 마우스 HGF는 인간 c-Met에 결합되지 않기 때문이다.

[0870] 렌티바이러스 형질도입 시스템(lentiviral transduction system)을 사용하여 인간 HGF를 발현하도록 조작된 수개의 모델에서 EM1-mAb를 시험하였다. 이는 생체내에서의 c-Met 경로의 리간드 활성화의 모델링을 가능하게 하는데, 그 이유는 마우스 HGF는 이식된 인간 종양 세포 상에 인간 c-Met를 활성화시키지 않기 때문이다. SKMES-HGF 모델에 의한 결과가 실시예 14 및 도 10에 나타나 있으며, %TGI는 표 32에 요약되어 있다. EM1-mAb는 H1975-HGF 모델에서 71%로 종양 성장을 억제하였다($p<0.0001$, 프리즘 3.03으로 로그랭크 분석을 사용하여 PBS 비히클과 비교함). 아파티닙, 에를로티닙 및 세툭시맙은 이 모델에서 더 적은 효능을 나타내었다. EM1-mAb와 아파티닙의 병용은 매우 효과적이었다(96% TGI, $p<0.0001$, 프리즘 3.03으로 로그랭크 분석을 사용하여 PBS + 아파티닙 비히클군과 비교함). 도 13은 H1975-HGF 모델에서의 시간 경과에 따른 분자의 효능을 나타낸다. 이와 같이, 에를로티닙, 아파티닙 및 세툭시맙은 c-Met 경로가 활성화된 종양 모델에서 그들의 항종양 효능을 상실한다.

[0871] 1차 EGFR 활성화 돌연변이 및 c-Met 유전자 증폭으로 인해 제1 세대 EGFR TKI(에를로티닙)에 대한 증가된 내성을 특징으로 하는 종양 모델(HCC827-ER1 모델)에서 EM1-mAb를 시험하였다. 10 mg/kg으로 투여된 EM1-mAb는 일수 25에서 86% TGI로, 이식된 HCC827-ER1 종양을 부분 퇴행시켰으며, 에를로티닙 단독(일수 25에서 65% TGI)보다 더 효능이 있었다. EM1-mAb와 에를로티닙의 병용은 효능을 추가로 개선하지 않았다. 도 14는 시간 경과에 따른 분자의 효능을 나타낸다.

[0872] 이와 같이, EM1-mAb는 야생형 EGFR을 갖는 종양 모델, 1차 EGFR 활성화 돌연변이를 갖는 종양 모델, EGFR 치료제에 대한 내성과 관련된 EGFR 돌연변이 T790M을 갖는 종양 모델에서뿐만 아니라 c-Met가 리간드-의존성(자가분비 HGF 발현) 또는 리간드-비의존성(c-Met 유전자 증폭) 방식으로 활성화되는 모델에서도 효능을 입증한다. EM1-mAb와 에를로티닙 또는 아파티닙의 병용은 일부 종양 모델에서 효능을 개선할 수 있다.

[0873] [표 32]

종양 유형	EGFR	cMet	처리 (용량, mg/kg), 일정	%TGI(연구 일수); PBS 비히클과 비교됨
SKMES-HGF 폐 편평 세포 암종	WT	WT	EM1-mAb(20), BIW×4 주	100(36)
			세툭시맙(20), BIW×4 주	88(36)
SNU-5 위암	WT	AMP	EM1-mAb(10), BIW×4 주	98(34)
			세툭시맙(10), BIW×4 주	49(34)
H1975 NSCLC	L858R; T790M	WT	EM1-mAb(10), BIW×3 주	57(18)
			세툭시맙(10), BIW×3 주	91(18)
			에를로티닙(50), QD×21 일	9(18)
			아파티닙(15), QD×21 일	57(18)
			EM1-mAb(10), BIW×3 주 + 아파티닙(15), QD×21 일	96(18)
H1975-HGF NSCLC	L858R; T790M	WT	EM1-mAb (10), BIW×3 주	71(16)
			세툭시맙(10), BIW×3 주	42(16)
			에를로티닙(50), QD×21 일	20(16)
			아파티닙(15), QD×21 일	29(16)
			EM1-mAb(10), BIW×3 주 + 아파티닙 (15), QD×21 일	96(16)
HCC827 NSCLC	del(E746, A750); AMP	WT	EM1-mAb(10), BIW×4 주	82(35)
			에를로티닙(25), QD×28 일	79(35)
			EM1-mAb(10), BIW×3 주 + 에를로티닙(25), QD×28 일	78(35)
HCC827-ER1 NSCLC	del(E746, A750); AMP	AMP	EM1-mAb(10), BIW×4 주	86(25)
			에를로티닙(25), QD×28 일	65(25)
			EM1-mAb(10), BIW×3 주 + 에를로티닙(25), QD×28 일	87(25)

BIW= 주 2 회

QD= 일일 1 회

WT= 야생형

[0874] AMP= 증폭된

[0875] **실시예 18. 생체내에서의 EGFR 및 c-Met의 EM1 mAb 유도 분해**

[0876] 종양에서의 EM1-mAb에 의한 EGFR 및 c-Met 둘 모두의 결합을 입증하기 위하여, 20 mg/kg EM1-mAb의 단회 용량을 투여한 후 다양한 시점에서 H1975-HGF 종양으로부터 샘플을 채취하였다. 종양 용해물을 준비하고, 총 단백질에 대해 정규화하고, 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 이동시켰다. 겔을 니트로셀룰로스에 옮기고, EGFR(마우스 (mAb)

항-인간 EGFR(EGF-R2); 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 카탈로그 번호 sc-73511) 또는 c-Met(마우스 (mAb) 항-인간 Met(L41G3); 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology), 카탈로그 번호 3148)에 대해 웨스턴 블롯팅을 행하였다. EGFR 수준을 GAPDH에 대해 정규화하였으며; c-Met 수준을 액틴에 대해 정규화하였다. EM1-mAb-처리된 종양으로부터의 수용체의 수준을 PBS-처리된 종양의 수준과 비교하여 총 수용체(%)를 얻었다. EM1-mAb 처리는 분석 시점에 따라 H1975-HGF 종양에서 총 EGFR 및 cMet 수준을 대조군의 20% 내지 60%까지 감소시켰다. 도 15는 시간 경과에 따른 PBS 대비 평균 수용체 수준을 나타낸다. pEGFR, pc-Met 및 pAKT는 또한 EM1의 단회 용량 투여 후 72시간째에 감소되었다.

[0877] **실시예 19. EGFR/c-Met 이중특이성 mAb의 IgG_1과 $IgG_{2\sigma}$ 변이체 동형체들의 항종양 활성의 비교**

[0878] H1975-HGF 모델에서 관찰된 효능에 대한 효과기 기능의 기여를 더 잘 이해하기 위하여, EM1-mAb와, IgG2 상에 효과기 사일런싱 치환 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S를 갖는 IgG2 Fc를 가진 EM1-mAb의 변이체 사이에서 비교를 수행하였다(치환은 국제 특허 출원 WO2011/066501호에 기재됨)(넘버링은 EU 인덱스에 따름). V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S 치환을 갖는 IgG2 항체는 Fc 수용체 또는 효과기 세포(예컨대, NK 세포 및 대식세포)와 상호작용하지 않는다. 따라서, EM1-mAb의 IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S 변이체에 대해 관찰된 활성의 임의의 상실은 ADCC 및/또는 ADCP와 같은 효과기-매개 기전에 의해 기여된 항종양 활성을 나타낼 수 있다. 전술된 H1975-HGF 모델에서 종양 세포를 이식한 지 32일 후, 부모 EM1-mAb와 비교할 때 EM1-mAb의 IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S 변이체에 의한 항종양 활성의 상실에 대한 징후가 있었는데, 이는 효과기-매개 기전이 EM-1 mAb의 기능에 기여함을 시사한다. 도 16은 분자의 항종양 활성을 나타낸다.

[0879] **서열 목록**

[0880]

서열 번호:	유형	종	설명	서열
1	PRT	인공	펩콘	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	DNA	인공	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	DNA	인공	TC5'toFG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	DNA	인공	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	DNA	인공	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	DNA	인공	TCF7	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	DNA	인공	TCF8	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	DNA	인공	TCF9	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	DNA	인공	TCF10	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	DNA	인공	TCF11	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	DNA	인공	TCF12	GGTGGTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
12	DNA	인공	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG

13	DNA	인공	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	DNA	인공	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	DNA	인공	Tcon5new2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGGTGACCACCGGTGGTGAATTCCGCAGACAG
16	DNA	인공	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	DNA	인공	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACCATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCCAACTGATCTTCACCAAAC
18	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P53A1R5-17	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

[0881]

19	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-17	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-47	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-48	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-37	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
23	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 54AR4-74	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-81	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-83	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54CR4-31	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-83v2	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54CR4-31v2	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
29	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-73v2	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
30	DNA	인공	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC GAA AAA C
31	DNA	인공	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	인공	P114AR5P74-A5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSISVPLSAIFTT
33	PRT	인공	P114AR5P75-E9	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLRSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGLVSTPLSAIFTT
34	PRT	인공	P114AR7P92-F3	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVNIMGVKGGSISHPLSAIFTT

[0882]

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

[0883]

49	PRT	인공	P114AR7P95-H8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGSI SPPLSAIFTT
50	PRT	인공	ECB1	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVV VGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVNILGVKGGSIS VPLSAIFTT
51	PRT	인공	ECB2	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSL PAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKIS PPLSAIFTT
52	PRT	인공	ECB3	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
53	PRT	인공	ECB4	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLR SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVTILGVKGGLVS TPLSAIFTT
54	PRT	인공	ECB5	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
55	PRT	인공	ECB6	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
56	PRT	인공	ECB7	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSM LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT

[0884]

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

[0885]

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

[0886]

[0887] 서열 번호 73, PRT, 호모 사피엔스, EGFR(24 aa의 신호 서열을 포함함. 성숙 단백질은 잔기 25에서 시작함)

[0888]
```
  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

[0889]

74	PRT	호모 사피엔스	EGF	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIG ERCQYRDLKWWELR

[0890]

[0891] 서열 번호 75, PRT, 호모 사피엔스, 테나신-C

1 mgamtqllag vflaflalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvynikipv
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 sellcpndcf drgrcingtc yceegftged cgkptcphac htqgrceegq
361 cvcdegfagv dcsekrcpad chnrgrcvdg rcecddgftg adcgelkcpn gcsghgrcvn
421 gqcvcdegyt gedcsqlrcp ndchsrgrcv egkcvceqgf kgydcsdmsc pndchqhgrc
481 vngmcvcddg ytgedcrdrq cprdcsnrgl cvdgqcvced gftgpdcael scpndchggg
541 rcvngqcvch egfmgkdcke qrcpsdchgq grcvdgqcic hegftgldcg qhscpsdcnn
601 lgqcvsgrci cnegysgedc sevsppkdlv vtevteetvn lawdnemrvt eylvvytpth
661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapegikf
721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifnmnn kedegeitks lrrpetsyrq tglapgqeye
781 islhivknnt rgpglkrvtt tnldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgieltygik
841 dvpgdrttid ltedenqysi gnlkpdteye vslisrgdm ssnpaketft tgldaprnlr

[0892]

901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pksqqattkt tltglrpgte
961 ygigvsavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltllwktpla kfdryrlnys
1021 iptgqwvgvq lpnttsyvl rglepgqeyn vlltaekgrh kskparvkas teqapeleni
1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfliqvqe ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy
1141 tvsiygviqg yrtpvlsaea stgetpnlge vvvaevgwda ikinwtapeg ayeyfflqvq
1201 eadtveaaqn ltvpggirst dlpglkaath ytitirgvtq dfsttplsve vlteevpdmg
1261 nltvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nltvpgslrs meipglragt
1321 pytvtlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dglrlnwtaa dnayehfviq
1381 vqevnkveaa qnltlpgslr avdlpgleaa tpyrvsiygv irgyrtpvls aeastakepe
1441 igninvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrlle tveynisgae rtahisglpp
1501 stdfivylsg lapsirtkti satattealp llenltisdi npygftvswm asenafdsfl
1561 vtvvdsgkll dpqeftlsgt qrklelrgli tgigyevmvs gftqghqtkp lraeivtsae
1621 pevdnllvsd atpdgftlsw 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 etallturpp rasvtgyllv
1921 yesvdgtvke vivgpdttsy sladlspsth ytakiqalng plrsnmiqti fttigllypf
1981 pkdesqamln gdttsglyti ylngdkaeal evfedmtsdg ggwivfirrk ngrenfyqnw
2041 kayaagfgdr reefwlgldn inkitaqgqy elrvdlrdhg etafavydkf svgdaktryk
2101 lkvegysgta gdsmayhngr sfstfdkdtd saitncalsy kgafwyrnch rvnlmgrygd
2161 nnhsqgvnwf hwkghehsiq faemklrpsn fnlegrrkr a

[0893]

76	PRT	인공	피브론	Ldaptdlqvtnvtdtsitvswtppsatitgyritytpsngpgepkeltvppsstsv titgltpgveyvvsiyalkdnqespplvgtqtt
77	PRT	인공	피브로넥틴의 제10 FN3 도메인(FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	인공	링커	GSGS
79	PRT	인공	링커	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
80	PRT	인공	링커	APAP
81	PRT	인공	링커	APAPAPAPAP
82	PRT	인공	링커	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	인공	링커	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPA PAP

[0894]

84	PRT	인공	링커	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	인공	텐콘 BC 루프	TAPDAAFD
86	PRT	인공	텐콘 GF 루프	KGGHRSN
87	PRT	인공	P53A1R5-17 BC 루프	ADPHGFYD
88	PRT	인공	P54AR4-17 BC 루프	TYDRDGYD
89	PRT	인공	P54AR4-47 BC 루프	WDPFSFYD
90	PRT	인공	P54AR4-48 BC 루프	DDPRGFYE
91	PRT	인공	P54AR4-73 BC 루프	TWPYADLD
92	PRT	인공	P54AR4-74 BC 루프	GYNGDHFD

[0895]

93	PRT	인공	P54AR4-81 **BC 루프**	DYDLGVYD
94	PRT	인공	P54AR4-83 **BC 루프**	DDPWDFYE
95	PRT	인공	**EGFR의 FG 루프**	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	인공	**EGFR의 FG 루프**	LGSYVFEHDVM
97	DNA	인공	**>EGFR 부분ECB97; P54AR4-83v22**	Atgttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttct gatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgac cgtcccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggt accgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggaca ctaatatccgcggtctgcctctgagcgccattttcaccacc
98	DNA	인공	**>EGFR 부분ECB15; P54AR4-83v2**	Atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgagga cagcgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcc tgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctga ccgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgg gtacggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagac accaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
99	PRT	인공	**텐콘 27**	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	인공	**TCL14 라이브러리**	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

[0896]

[0897] >서열 번호 101

[0898] PRT

[0899] 호모 사피엔스

[0900] cMet

1 mkapavlapg ilvliftlvq rsngeckeal aksemnvnmk yqlpnftaet piqnvilheh

61 hifigatnyi yvlneedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd csskanisgg vwkdnimmal

121 vvdtyyddql iscgsvnrgt 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 tlirnssgce arrdeyrtef

421 ttalqrvdlf mgqfsevllt sistfikgdl tianlgtseg rfmqvvvsrs gpstphvnfl

481 ldshpvspev ivehtlnqng ytlvitgkki tkiplngigc rhfqscsqcl sappfvqcgw

541 chdkcvrsee clsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtr lticgwdfgf rrnnkfdlkk

[0901]

601 trvlignesc tltlsestmn tlkctvgpam nkhfnmsiii snghgttqys tfsyvdpvit

661 sispkygpma ggtiltltgn yinsgnsrhi siggktctik svsnsilecy tpaqtistef

721 avklkidlan retsifsyre dpivyeihpt ksfistwwke plnivsflfc fasggstitg

781 vgknlnsvsv prmvinvhea grnftvacqh rsnseiicct tpslqqlnlq lpiktkaffm

841 ldgilskyfd liyvhnpvfk pfekpvmism gneuvieikg ndidpeavkg evikvgnksc

901 enihlhseav letvpndllk lnseiniewk qaisstvlgk vivqpdqnft gliagvvsis

961 tallliigff lwlkkrkqik digselvryd arvhtphldr ivsarsvspt temvsnesvd

1021 yratfpedqf pnssqngscr qvqypltdms piltsgdsdi sspliqntvh 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 tvyllqgrri

1321 lqpeycpdpl yevmlkcwhp kaemrpsfse lvsrisaifs tfigehyvhv natyvnvkcv

1381 apypsllsse dnaddevdtr pasfwets

[0902]

102	PRT	호모 사피엔스	HGF	QRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKK TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMS SGVKKEFGHEFDLYE NKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRG KDLQENYCRNP RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDH TESGKICQRWDHQTP HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIK TCADNTMNDTDVPL ETTECIQGQGEGYRGTVNTIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKC KDLRENYCRNPDGS ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQT RSGLTCSMWDKNME DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPIS RCEGDTTPTIVNL DHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESW VLTARQCFPSRD LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLAR PAVLDDFVSTIDLP NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRG KVTLNESEICAG AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFV RVAYYAKWIHKII LTYKVPQS
103	DNA	인공	>c-Met 부분ECB97 P114AR7P95-C5v2	Ctgccggctccgaagaacttggtggtgagccgtgttaccgaagatagc gcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttcgatagcttctgg attcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggcaattgttctgacggtgcc gggctctgaacgctcctacgatttgaccggtctgaaaccgggcaccga gtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagcccaccg ctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
104	DNA	인공	>c-Met 부분ECB15 P114AR7P94-A3	Ctgccggcaccgaagaacctggttgtcagccgtgtgaccgaggatag cgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagcctttgacagcttctgga ttcgttacttttgaatttctgggtagcggtgaggcgatcgttctgacggtgccg ggctctgaacgcagctatgatttgacgggcctgaagccgggtactgagt acgtggttaacatcatgggcgttaagggtggtaaaatcagcccgccatt gtccgcgatctttaccacg
105	PRT	인공	링커	GGGGS
106	PRT	인공	ECB91	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
107	PRT	인공	P53A1R5-17v2	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersy dltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaiftt

[0903]

108	PRT	인공	P54AR4-83v22	ipapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaiftt
109	PRT	인공	P54AR4-83v23	ipapknlvvsevtedsarlswddphafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaiftt
110	PRT	인공	P53A1R5-17v22	ipapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirgiplsaiftt
111	PRT	인공	P114AR7P94-A3v22	ipapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydltglkpgteyvvnilgvkggkisppIsaiftt
112	PRT	인공	P114AR9P121-A6v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
113	PRT	인공	P114AR9P122-A7v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSISPPLSAIFTT
114	PRT	인공	P114AR7P95-C5v2	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
115	DNA	인공	ECB97	atgttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagcgcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgatccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgtcccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtaccgagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaatatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccaccgcaccggcaccggctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtgagccgtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggcaattgttctgacggtgccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtctgaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggtagcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
116	DNA	인공	ECB15	atgctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacagcgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctgattcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccgtcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggtacggagtacacggtgtccattacggtgttcacaatgtgtataaagacaccaacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgcctgccgccagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgtcagccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatgcagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtgaggcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggggcctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaaggtggtaaaatcagcccgccattgtccgcgatctttaccacg
117	PRT	인공	알부민 결합 도메인	tidewllkeakekaieelkkagitsdyyfdlinkaktvegvnalkdeilka

[0904]

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

[0905]

[0906]

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

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

[0907]

149	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB94	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB95	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
151	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB96	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
152	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB97	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT
153	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB106	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
154	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB107	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB108	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
156	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB109	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT

[0908]

157	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB118	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB119	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB120	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSIS PPLSAIFTT
160	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB121	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISP PLSAIFTT
161	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB91	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapaplPAPK NLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTT
162	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB18	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltv pgsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknliinnaktvegvkalldeilaalp
163	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB28	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwirydevvvggeaivltvp gsersydltglkpgteyyvnilgvkggsisvplsaifttapapapapapiae akvlanreldkygvsdyyknliinnaktvegvkalldeilaalp
164	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB38	lpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvp gsersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapap aplpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfefigsgeaivltvp gsersydltglkpgteyvvnimgvkggkisppIsaifttapapapapapla eakvlanreldkygvsdyyknliinnaktvegvkalldeilaalp

[0909]

165	PRT	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB39	lpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnmrglplsaifttapapapapa plpapknlvvsrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpg sersydltglkpgteyvvnimgvkggkispplsaifttapapapapaplae akvlanreldkygvsdyyknlinnaktvegvkallde!laalp
166	DNA	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB97	ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccaccgcaccggcaccg gctccggctcctgccccgctgccggctccgaagaacttggtggtgagcc gtgttaccgaagatagcgcacgcctgagctggacggcaccggatgcg gcgttcgatagcttctggattcgctattttgagtttctgggtagcggtgaggc aattgttctgacggtgcccgggctctgaacgctcctacgatttgaccggtct gaaaccgggcaccgagtatgtggtgaacattctgagcgttaagggcggt agcatcagcccaccgctgagcgcgatcttcacgactggtggttgc
167	DNA	인공	메티오닌을 갖지 않는 ECB15	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccaccgcgcctgcgc cagcgcctgcaccggctccgctgccggcaccgaagaacctggttgtca gccgtgtgaccgaggatagcgcacgtttgagctggaccgctccggatg cagcctttgacagcttctggattcgttactttgaatttctgggtagcggtgag gcgatcgttctgacggtgccgggctctgaacgcagctatgatttgacggg cctgaagccgggtactgagtacgtggttaacatcatgggcgttaagggtg gtaaaatcagcccgccattgtccgcgatctttaccacg
168	DNA	인공	>EGFR 부분 ECB97; 메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-83v22	ttgccagcgccgaagaacctggtagttagcgaggttactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgtgggcgttctacgagagctttctgat ccagtatcaagagagcgagaaagtcggtgaagcgattgtgctgaccgt cccgggctccgagcgttcctacgacctgaccggtttgaagccgggtacc gagtatacggtgagcatctacggtgttcacaatgtctataaggacactaa tatccgcggtctgcctctgagcgccatttcaccacc
169	DNA	인공	>EGFR 부분 ECB15; 메티오닌을 갖지 않는 P54AR4-83v2	ctgccagcccctaagaatctggtcgtgagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccgtgggcgttctatgagtctttcctga ttcagtatcaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgatcgtcctgaccg tcccgggtagcgagcgctcctacgatctgaccggcctgaaaccgggta cggagtacacggtgtccatttacggtgttcacaatgtgtataaagacacc aacatgcgtggcctgccgctgtcggcgattttcaccacc
170	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB94	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
171	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB95	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC

[0910]

172	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB96	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
173	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB97	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSIS PPLSAIFTTC
174	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB106	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGKI SPPLSAIFTTC
175	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB107	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
176	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB108	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILGVKGGSI SPPLSAIFTTC
177	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB109	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSIS PPLSAIFTTC
178	PRT	인공	C-말단 시스테인을 갖는 ECB91	mlpapknlvvsevtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgse rsydltglkpgteytvsiygvhnvykdtnirglplsaifttapapapapapLPAP KNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSISPPLSAIFTTC

[0911]

[0912] >서열 번호 179

[0913] PRT

[0914] 인공

[0915] EGFR 결합 FN3 도메인의 FG 루프

[0916] $HNVYKDTNX_9RGL$

[0917] (여기서, X_9는 M 또는 I임)

[0918] >서열 번호 180

[0919] PRT

[0920] 인공

[0921] EGFR 결합 FN3 도메인의 FG 루프

[0922] LGSYVFEHDVML(서열 번호 180)

[0923] >서열 번호 181

[0924] PRT

[0925] 인공

[0926] EGFR 결합 FN3 도메인의 BC 루프

[0927] $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ (서열 번호 181)(여기서,

[0928] X_1은 A, T, G 또는 D이고;

[0929] X_2는 A, D, Y 또는 W이고;

[0930] X_3은 P, D 또는 N이고;

[0931] X_4는 L 또는 부재하고;

[0932] X_5는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0933] X_6은 G, D 또는 A이고;

[0934] X_7은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0935] X_8은 Y, F 또는 L임)

[0936] >서열 번호 182

[0937] PRT

[0938] 인공

[0939] EGFR 결합 FN3 도메인

[0940] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLTVP

[0941] GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX_9RGLPLSAEFTT (서열 번호 182)

[0942] (X_1은 A, T, G 또는 D이고;

[0943] X_2는 A, D, Y 또는 W이고;

[0944] X_3은 P, D 또는 N이고;

[0945] X_4는 L 또는 부재하고;

[0946] X_5는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0947] X_6은 G, D 또는 A이고;

[0948] X_7은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0949] X_8은 Y, F 또는 L이고;

[0950] X_9는 M 또는 I임)

[0951] >서열 번호 183

[0952] PRT

[0953] 인공

[0954] EGFR 결합 FN3 도메인

[0955] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$DSFLIQYQESEKVGEAINLTVP

[0956] GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (서열 번호 183)

[0957] (여기서,

[0958] X_1은 A, T, G 또는 D이고;

[0959] X_2는 A, D, Y 또는 W이고;

[0960] X_3은 P, D 또는 N이고;

[0961] X_4는 L 또는 부재하고;

[0962] X_5는 D, H, R, G, Y 또는 W이고;

[0963] X_6은 G, D 또는 A이고;

[0964] X_7은 A, F, G, H 또는 D이고;

[0965] X_8은 Y, F 또는 L임)

[0966] >서열 번호 184

[0967] PRT

[0968] 인공

[0969] c-Met 결합 FN3 도메인의 C 가닥 및 CD 루프 서열

[0970] DSFX_{10}IRYX_{11}E $X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$GX_{16} (서열 번호 184)(여기서,

[0971] X_{10}은 W, F 또는 V이고;

[0972] X_{11}은 D, F 또는 L이고;

[0973] X_{12}는 V, F 또는 L이고;

[0974] X_{13}은 V, L 또는 T이고;

[0975] X_{14}는 V, R, G, L, T 또는 S이고;

[0976] X_{15}는 G, S, A, T 또는 K이고;

[0977] X_{16}은 E 또는 D임)

[0978] >서열 번호 185

[0979] PRT

[0980] 인공

[0981] c-Met 결합 FN3 도메인의 F 가닥 및 FG 루프

[0982] TEYX_{17}VX_{18}I$X_{19}X_{20}$V KGG$X_{21}X_{22}$SX_{23} (서열 번호 185)(여기서,

[0983] X_{17}은 Y, W, I, V, G 또는 A이고;

[0984] X_{18}은 N, T, Q 또는 G이고;

[0985] X_{19}는 L, M, N 또는 I이고;

[0986] X_{20}은 G 또는 S이고;

[0987] X_{21}은 S, L, G, Y, T, R, H 또는 K이고;

[0988] X_{22}는 I, V 또는 L이고;

[0989] X_{23}은 V, T, H, I, P, Y 또는 L임)

[0990] >서열 번호 186

[0991] PRT

[0992] 인공

[0993] c-Met 결합 FN3 도메인

[0994] LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX$_{16}$IRYX$_{18}$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 (서열 번호 186)

[0995] (여기서,

[0996] X_{10}은 W, F 또는 V이고;

[0997] X_{11}은 D, F 또는 L이고;

[0998] X_{12}는 V, F 또는 L이고;

[0999] X_{13}은 V, L 또는 T이고;

[1000] X_{14}는 V, R, G, L, T 또는 S이고;

[1001] X_{15}는 G, S, A, T 또는 K이고;

[1002] X_{16}은 E 또는 D이고;

[1003] X_{17}은 Y, W, I, V, G 또는 A이고;

[1004] X_{18}은 N, T, Q 또는 G이고;

[1005] X_{19}는 L, M, N 또는 I이고;

[1006] X_{20}은 G 또는 S이고;

[1007] X_{21}은 S, L, G, Y, T, R, H 또는 K이고;

[1008] X_{22}는 I, V 또는 L이고;

[1009] X_{23}은 V, T, H, I, P, Y 또는 L임)

[1010] >서열 번호 187

[1011] PRT

[1012] 인공

[1013] 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 EGFR FN3 도메인

[1014] LPAPKNLVVSX$_{24}$VTX$_{25}$DSX$_{26}$RLSWDDPX$_{27}$AFYX$_{28}$SFLIQYQX$_{29}$SEKVGEAIX$_{30}$LT

[1015] VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX$_{31}$VHNVYKDTNX$_{32}$RGLPLSAX$_{33}$FTT (서열 번호 187)(여기서,

[1016] X_{24}는 E, N 또는 R이고;

[1017] X_{25}는 E 또는 P이고;

[1018] X_{26}은 L 또는 A이고;

[1019] X_{27}은 H 또는 W이고;

[1020] X_{28}은 E 또는 D이고;

[1021] X_{29}는 E 또는 P이고;

[1022] X_{30}은 N 또는 V이고;

[1023] X_{31}은 G 또는 Y이고;

[1024] X_{32}는 M 또는 I이고;

[1025] X_{33}은 E 또는 I임)

[1026] >서열 번호 188

[1027] 이중특이성 EGFR/c-Met FN3 도메인 함유 분자의 c-Met FN3 도메인

[1028] LPAPKNLVVSX$_{34}$VTX$_{35}$DSX$_{36}$RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX$_{37}$FX$_{38}$X$_{39}$X$_{40}$GX$_{41}$AIX$_{42}$

LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX$_{43}$X$_{44}$VKGGX$_{45}$ISPPLSAX$_{46}$FTT (서열 번호 188)(여기서,

[1029] X_{34}는 E, N 또는 R이고;

[1030] X_{35}는 E 또는 P이고;

[1031] X_{36}은 L 또는 A이고;

[1032] X_{37}은 E 또는 P이고;

[1033] X_{38}은 V 또는 L이고;

[1034] X_{39}는 G 또는 S이고;

[1035] X_{40}은 S 또는 K이고;

[1036] X_{41}은 E 또는 D이고;

[1037] X_{42}는 N 또는 V이고;

[1038] X_{43}은 L 또는 M이고;

[1039] X_{44}는 G 또는 S이고;

[1040] X_{45}는 S 또는 K이고;

[1041] X_{46}은 E 또는 I임)

[1042] >서열 번호 189

[1043] EGFR mAb E1 VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD
DGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSS

[1044]

[1045] >서열 번호 190

[1046] EGFR mAb E1 VL

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG
VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

[1047]

[1048] >서열 번호 191

[1049] EGFR mAb E2 VH

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA
PGKGLEWVAN IKKDGSEKYY
61 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL
GWGWGWYFDL WGRGTLVTVS
121 S

[1050]

[1051] >서열 번호 192

[1052] EGFR mAb E2 VL

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA
61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK

[1053]

[1054] >서열 번호 193

[1055] cMet mAb M1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAY
NGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFD
YWGQGTLVTVSS

[1056]

[1057] >서열 번호 194

[1058] cMet mAb M1VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP-ITFGQGTRLEIK

[1059]

[1060] >서열 번호 195

[1061] cMet mAb M2 VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDD
GSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYYGSGS
YYNQDYWGQGTLVTVSS

[1062]

[1063] >서열 번호 196

[1064] cMet mAb M2 VL

QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK

[1065]

[1066] >서열 번호 197

[1067] F405L을 갖는 Gp120 중쇄

qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapgqrfewmgwinpyngnkefsakfqdrvtftadtsantay
melrslrsadtavyycarvgpyswddspqdnyymdvwgkgttvivssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfp
epvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapell
ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwln
gkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpp
vldsdgsfllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

[1068]

[1069] >서열 번호 198

[1070] K409R을 갖는 Gp120 중쇄

qvqlvqsgaevkkpgasvkvscqasgyrfsnfvihwvrqapgqrfewmgwinpyngnkefsakfqdrvtftadtsantay
melrslrsadtavyycarvgpyswddspqdnyymdvwgkgttvivssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfp
epvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapell

[1071]

ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwln
gkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpp
vldsdgsfflysrltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

[1072]

[1073] >서열 번호 199

[1074] EM1-mAb H1(항-EGFR,405L)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD
DGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGV
MKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

[1075]

[1076] >서열 번호 200

[1077] EM-1 mAb L1

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG
VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1078]

[1079] >서열 번호 201

[1080] EM-1 mAb H2(K409R, 항-cMet)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFTSYGISWVRQAPGHGLEWMGWISAY
NGYTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLRGTNYFD
YWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1081]

[1082] >서열 번호 202

[1083] EM-1 mAb L2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWFQHKPGKAPKLLIYAASSLLS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1084]

[1085] >서열 번호 203

[1086] H1 불변 영역

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1087]

[1088] >서열 번호 204

[1089] H2 불변 영역

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1090]

[1091] >서열 번호 205

[1092] EM1-mAb H1 cDNA pdr000015499

caggtgcagctggtcgagagcggcggagggggtggtgcagcccggcagaagcctgaggctgtcctgcgccgccagcggcttc
accttcagcacctacggcatgcactgggtgcggcaggccccaggcaagggcctggagtgggtggccgtgatctgggacgacg
gcagctacaagtactacggcgacagcgtgaagggcaggttcaccatcagcagggacaacagcaagaacaccctgtacctgca
gatgaacagcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagggacggcatcaccatggtgcgggggcgtgatgaag
gactacttcgactactggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgccagcaccaagggccccaagcgtgttccccctggc
ccccagcagcaagagcaccagcggcggcacagccgccctgggctgcctggtgaaggactacttccccgagccagtgaccgtg

[1093]

tcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacaccttcccgccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagc
gtggtgaccgtgcccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccacacctgccccccctgcccagccccagagctgctgggcggaccca
gcgtgttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtga
gccacgaggacccagaggtgaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg
agcagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaatacaagtgc
aaggtctccaacaaggccctgccagcccccatcgaaaagaccatcagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtg
tacaccctgccccccagccgggaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctaccccagcgac
atcgccgtggagtgggagagcaacggccagccgagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagc
ttcctcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggcc
ctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccccggcaaatga

[1094]

[1095] >서열 번호 206

[1096] EM1-mAb L1 cDNA pDR000015499

atccagctgacccagagccccagcagcctgagcgccagcgtgggcgaccgggtgaccatcacctgccgggccagccaggac
atcagcagcgccctggtctggtatcagcagaagcccggcaaggccccaagctgctgatctacgacgccagctccctggaaag
cggcgtgcccagccggttcagcggcagcgagagcggcaccgacttcaccctgaccatcagcagcctgcagccgaggactic
gccacctactactgccagcagttcaacagctaccccctgaccttggcggcggaacaaaggtggagatcaagcgtacggtggcc
gctcccagcgtgttcatcttccccccagcgacgagcagctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttct
accccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcag
gacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctg
cgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgctga

[1097]

[1098] >서열 번호 207

[1099] EM-1 mAb H2 cDNA pDR000016584

caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcgagacttctggttacacctt
taccagctatggtatcagctgggtgcgacaggcccctggacacgggcttgagtggatgggatggatcagcgcttacaatggttac
acaaactatgcacagaagctccagggcagggtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgagga
gcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagatctgagaggaactaactactttgactactggggccagggaac
cctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccaagcgtgttccctctggccccccagcagcaagagcacatctggcggaac
agccgccctgggctgcctggtgaaagactacttccccgagccccgtgacccgtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggcgt
gcacaccttccagccgtgctgcagagcagcggcctgtacagccctgtccagcgtggtgaccgtgcccagcagctccctgggcac
ccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagagctgcgacaag

[1100]

acccacacctgtcccccctgccctgccccctgaactgctgggcggaccctccgtgttcctgttcccccccaaagcccaaggacaccc
tgatgatcagccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgt
ggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaacagcacctaccgggtggtgtccgtgctg
acagtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtctccaacaaggccctgcctgctcccatcgagaa
aaccatcagcaaggccaagggccagccccgcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa
ccaggtgtccctgacctgtctggtgaaaggcttctaccccagcgatatcgccgtggaatgggagagcaacggacagccgagaa
caactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggctccttcttcctgtactctcggctgaccgtggacaagagccggtgg
cagcagggaaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgagcctgagccc
cgggaagtga

[1101]

[1102] >서열 번호 208

[1103] EM-1 mAb L2 cDNA pDR000016584

gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtccgcctctgtgggcgacagagtgaccatcacctgtcgggcctcccagggc
atctccaactggctggcctggttccagcacaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccgcctcctccctgctgtccg
gcgtgccctccagattctccggctctggctccggcaccgacttcaccctgaccatctccagcctgcagccccgaggacttcgccac
ctactactgccagcaggccaacticcttcccccatcaccticggccagggcacccggctggaaatcaagcgtacggtggccgctcc
cagcgtgttcatcttcccccccagcgacgagcagctgaagagcggcaccgccagcgtggtgtgcctgctgaacaacttctaccc
ccgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggaca
gcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgag
gtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgctga

[1104]

[1105] >서열 번호 209

[1106] Gp120 경쇄

Eivltqspgtlslspgeratfscrsshsirsrrvawyqhkpgqaprlvihgvsnrasgisdrfsgsgsgtdftltitrvepedfalyy
cqvygassytfgqgtklerkrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskd
styslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

[1107]

[1108] >서열 번호 210

[1109] E1 HC1 HCDR1

[1110] TYGMH

[1111] >서열 번호 211

[1112] E1 HC1 HCDR2

[1113] VIWDDGSYKYYGDSVKG

[1114] >서열 번호 212

[1115] E1 HC1 HCDR3

[1116] DGITMVRGVMKDYFDY

[1117] >서열 번호 213

[1118] E1 LC1 LCDR1

[1119] RASQDISSALV

[1120] >서열 번호 214

[1121] E1 LC1 LCDR2

[1122] DASSLES

[1123] >서열 번호 215

[1124] E1 LC1 LCDR3

[1125] QQFNSYPLT

[1126] >서열 번호 216

[1127] E1 HC2 HCDR1

[1128] SYGIS

[1129] >서열 번호 217

[1130] E1 HC2 HCDR2

[1131] WISAYNGYTNYAQKLQG

[1132] >서열 번호 218

[1133] E1 HC2 HCDR3

[1134] DLRGTNYFDY

[1135] >서열 번호 219

[1136] E1 LC2 LCDR1

[1137] RASQGISNWLA

[1138] >서열 번호 220

[1139] E1 LC2 LCDR2

[1140] AASSLLS

[1141] >서열 번호 221

[1142] E1 LC2 LCDR3

[1143] QQANSFPIT

[1144] >서열 번호 222

[1145] E2 mAB HC1 HCDR1

[1146] SYWMN

[1147] >서열 번호 223

[1148] E2 mAb HC1 HCDR2

[1149] NIKKDGSEKYYVDSVKG

[1150] >서열 번호 224

[1151] E2 mAb HC1 HCDR3

[1152] DLGWGWGWYFDL

[1153] >서열 번호 225

[1154] E2 mAB LC1 LCDR1

[1155] RASQSVSSYLA

[1156] >서열 번호 226

[1157] E2 mAb LC1 LCDR2

[1158] DASNRAT

[1159] >서열 번호 227

[1160] E2 mAb LC1 LCDR3

[1161] QQRSNWPPT

[1162] >서열 번호 228

[1163] E2 mAB HC2 HCDR1

[1164] DYYMY

[1165] >서열 번호 229

[1166] E2 mAb HC2 HCDR2

[1167] TISDDGSYTYYPDSVKG

[1168] >서열 번호 230

[1169] E2 mAb HC2 HCDR3

[1170] EGLYYYGSGSYYNQDY

[1171] >서열 번호 231

[1172] E2 mAB LC2 LCDR1

[1173] RASQGLSSALA

[1174] >서열 번호 232

[1175] E2 mAb LC2 LCDR2

[1176] DASSLES

[1177] >서열 번호 233

[1178] E2 mAb LC2 LCDR3

[1179] QQFTSYPQIT

[1180] >서열 번호 234

[1181] E2 mAb HC1 (EGFR-F405L)

[1182] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMNWVRQA PGKGLEWVAN
IKKDGSEKYY
VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDL GWGWGWYFDL
WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[1183] >서열 번호 235

[1184] E2 mAb LC1 (EGFR)

[1185] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQ GTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1186] >서열 번호 236

[1187] E2 mAb HC2 (c-Met- K409R)

[1188] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDD
GSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYYCAREGLYYYGSGS
YYNQDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

[1189] >서열 번호 237

[1190] E2 mAb LC2 (cMet)

[1191] QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLSSALAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSYPQITFGQGTRLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1192] >서열 번호 238

[1193] mAb 069의 c-Met 불연속 에피토프

[1194] PEFRDSYPIKYVHAF

[1195] >서열 번호 239

[1196] mAb 069의 c-Met 불연속 에피토프

[1197] FAQSKPDSAEPMDRSA

[1198] >서열 번호 240

[1199] 5D5 mAb 에피토프

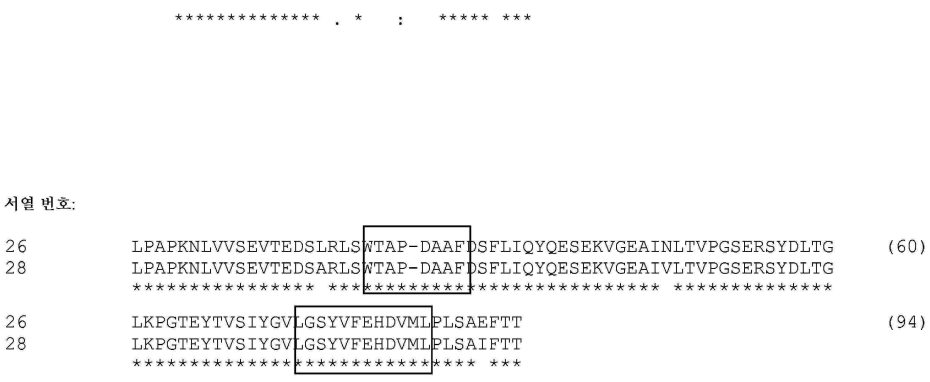
[1200] PGAQLARQIGASLNDD

도면

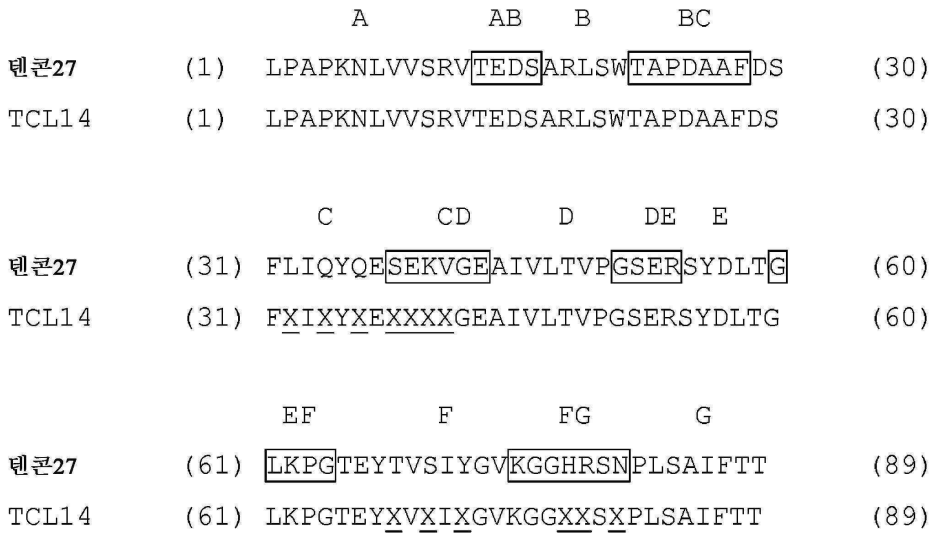
도면1a



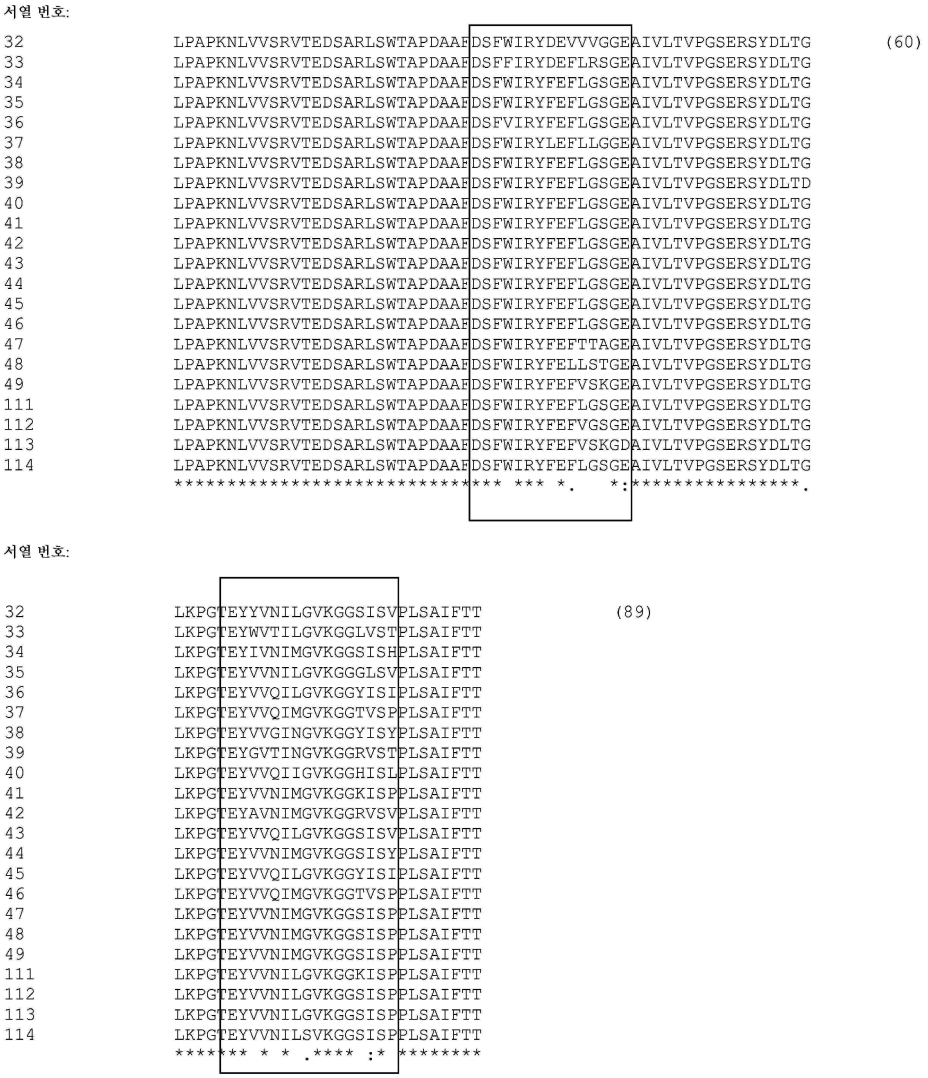
도면1b



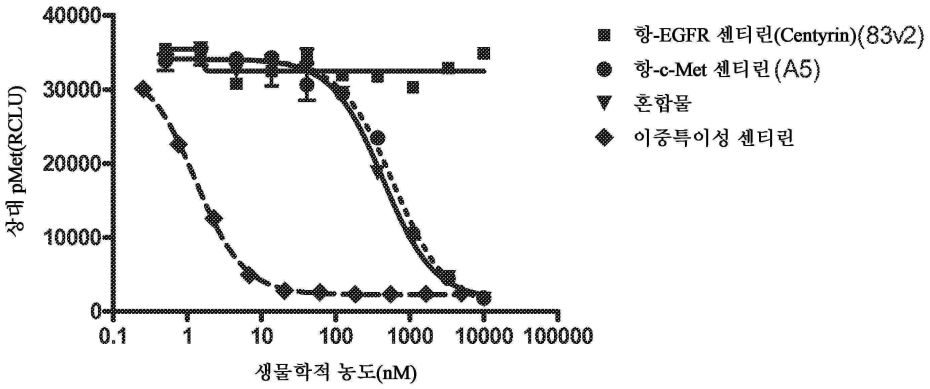
도면2


A AB B BC
텐콘27 (1) LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS (30)
TCL14 (1) LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDS (30)
C CD D DE E
텐콘27 (31) FLIQYQESEKVGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
TCL14 (31) FXIXYXEXXXXGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
EF F FG G
텐콘27 (61) LKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT (89)
TCL14 (61) LKPGTEYXVXIXGVKGGXXSXPLSAIFTT (89)

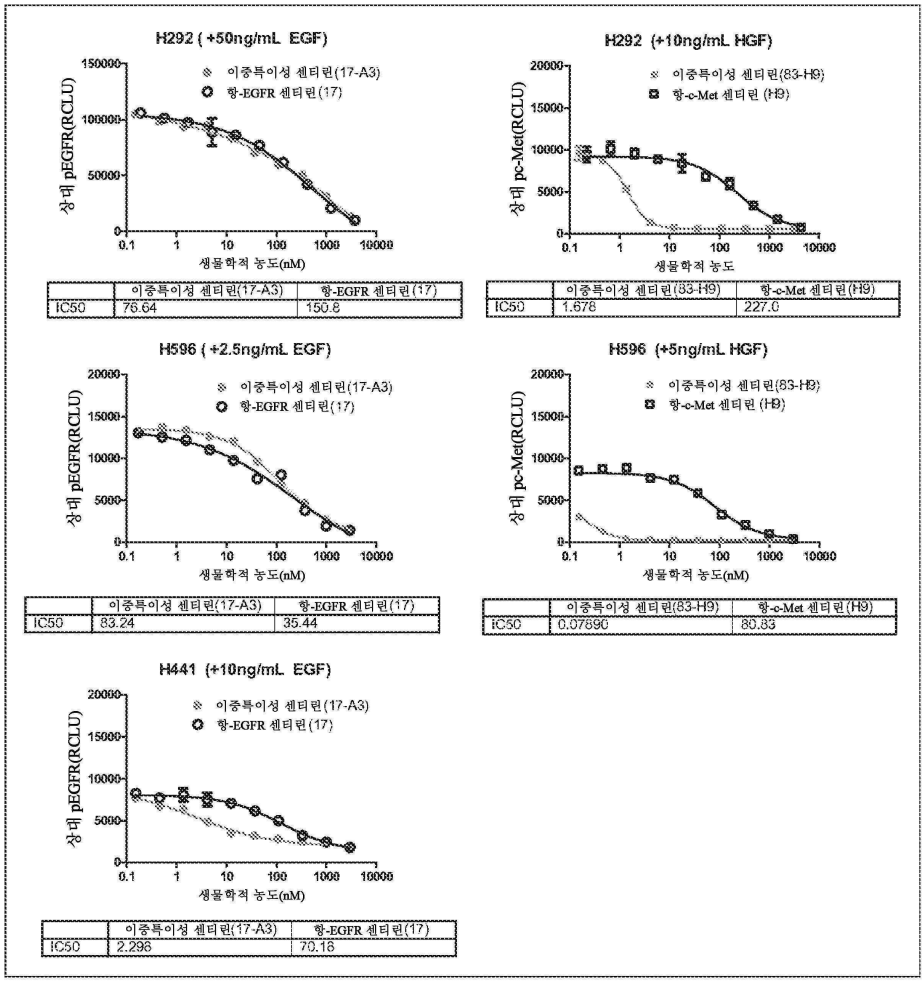
도면3


서열 번호:
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
서열 번호:
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

도면4



도면5



	이중특이성 센티린(17-A3)	항-EGFR 센티린(17)
IC50	76.64	150.8

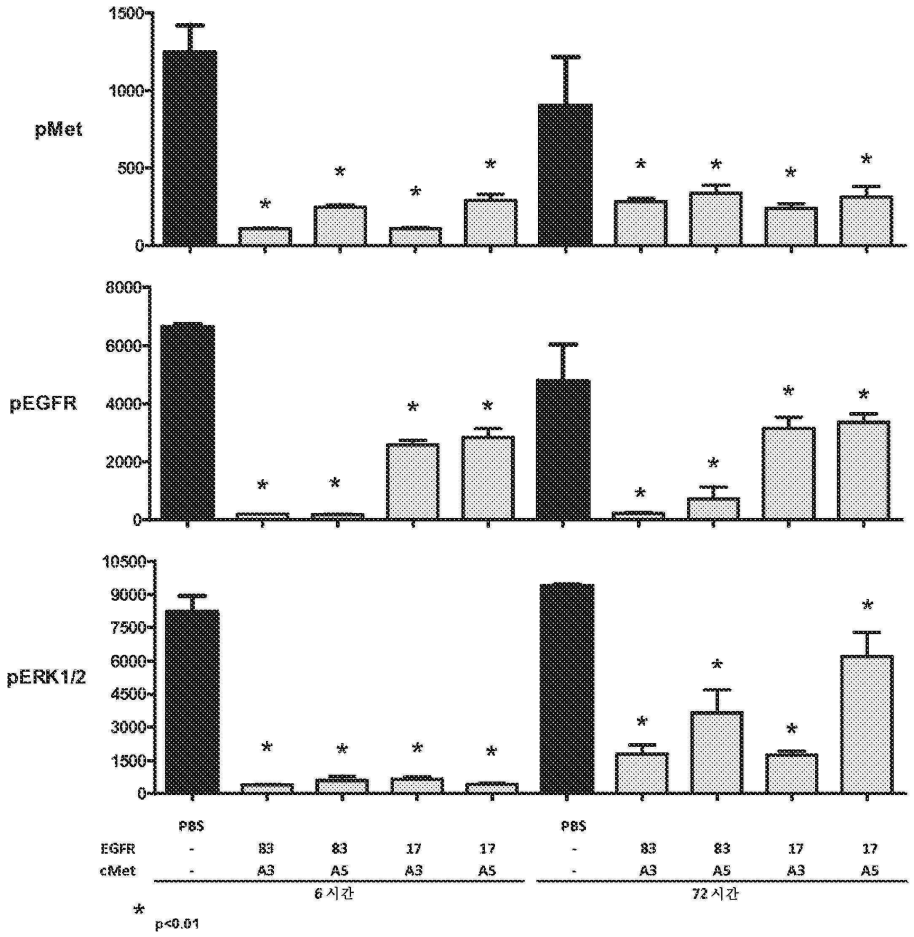
	이중특이성 센티린(83-H9)	항-c-Met 센티린(H9)
IC50	1.678	227.0

	이중특이성 센티린(17-A3)	항-EGFR 센티린(17)
IC50	83.24	35.44

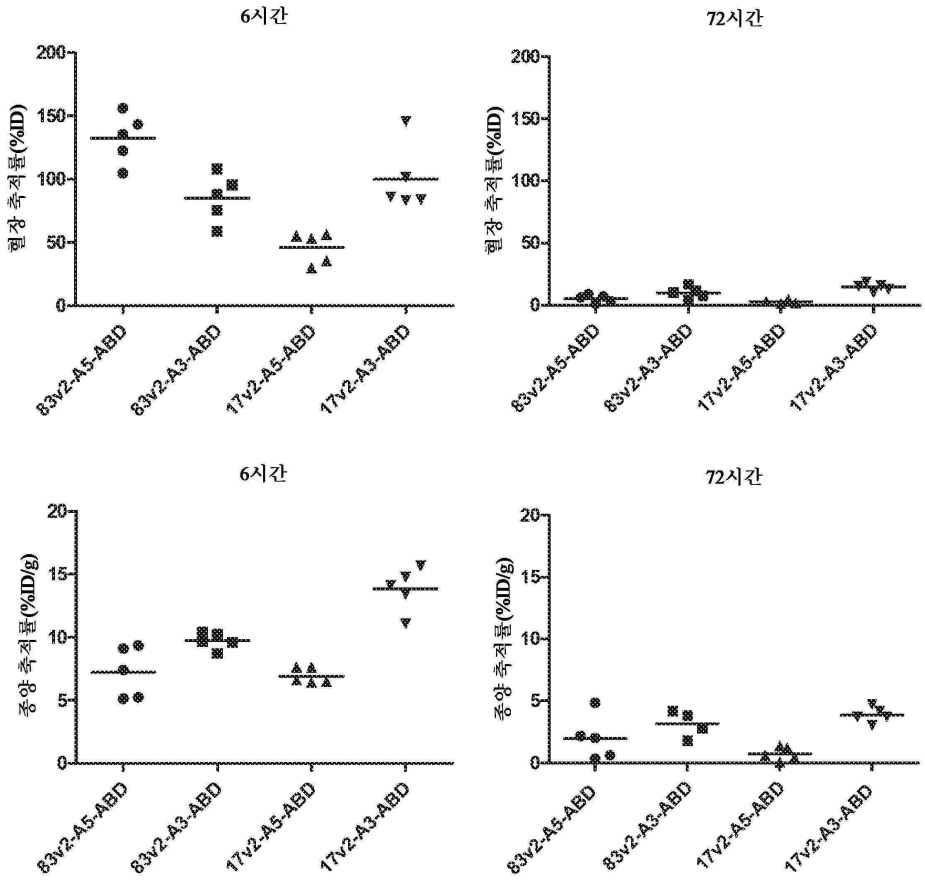
	이중특이성 센티린(83-H9)	항-c-Met 센티린(H9)
IC50	0.07890	80.83

	이중특이성 센티린(17-A3)	항-EGFR 센티린(17)
IC50	2.296	70.18

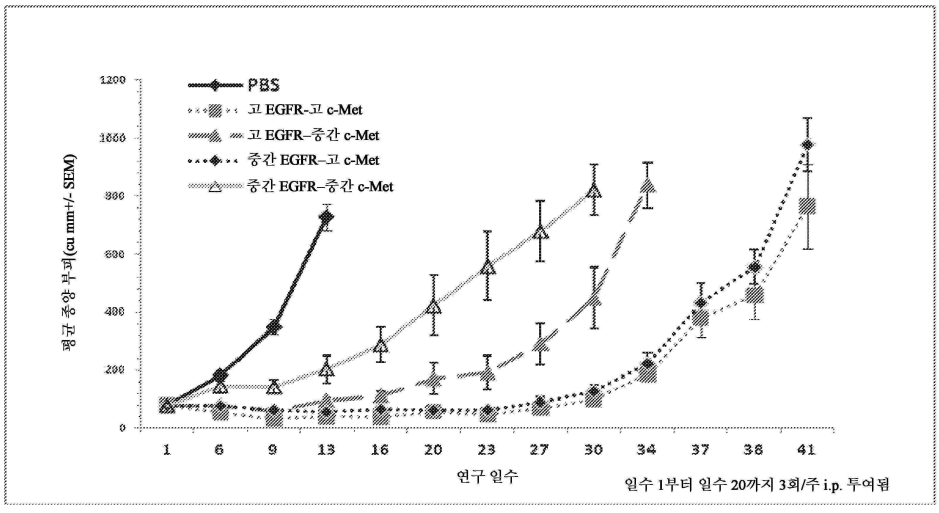
도면6


pMet
pEGFR
pERK1/2
PBS
EGFR - 83 83 17 17 - 83 83 17 17
cMet - A3 A5 A3 A5 - A3 A5 A3 A5
6 시간
72 시간
* p<0.01

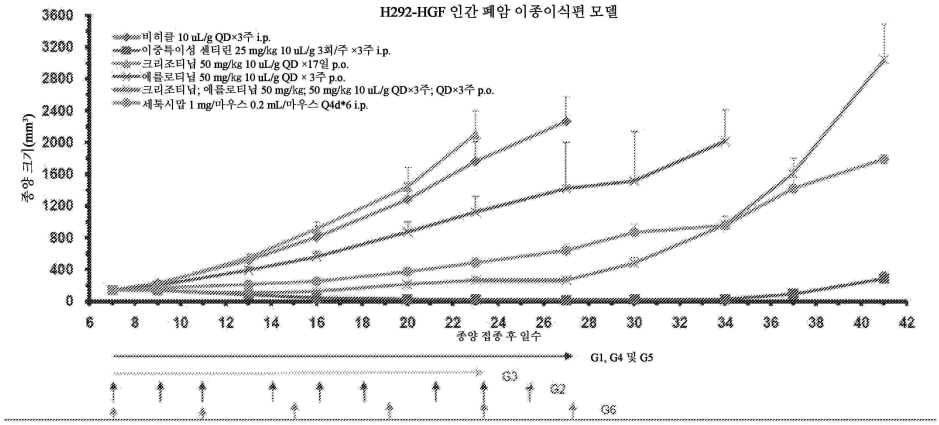
도면7


6시간
72시간
혈장 축적률(%ID)
종양 축적률(%ID/g)
200
150
100
50
0
20
15
10
5
0
83v2-A5-ABD
83v2-A3-ABD
17v2-A5-ABD
17v2-A3-ABD

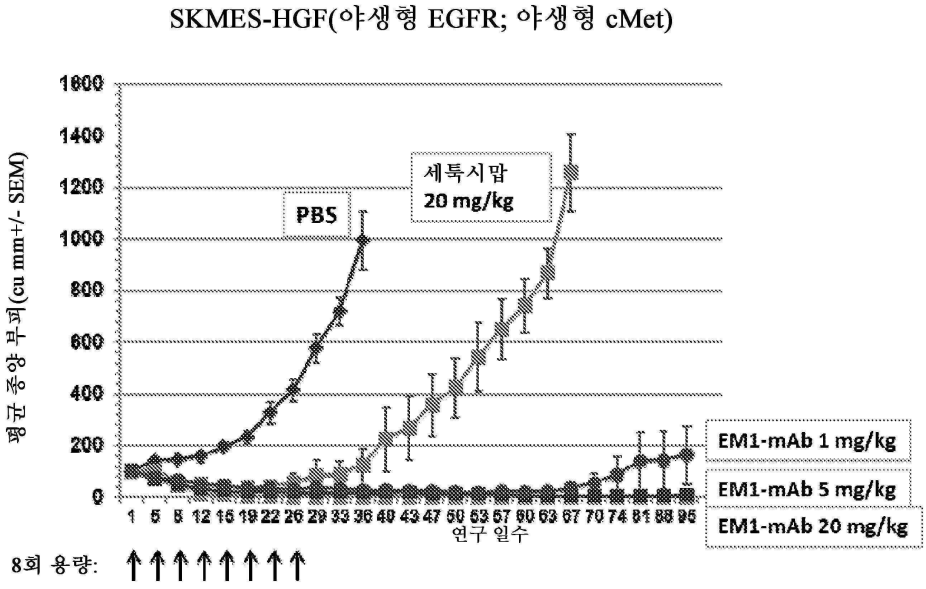
도면8


PBS
고 EGFR-고 c-Met
고 EGFR-중간 c-Met
중간 EGFR-고 c-Met
중간 EGFR-중간 c-Met
평균 종양 부피(cu mm+/- SEM)
1200
1000
800
600
400
200
0
1
6
9
13
16
20
23
27
30
34
37
38
41
연구 일수
일수 1부터 일수 20까지 3회/주 i.p. 투여됨

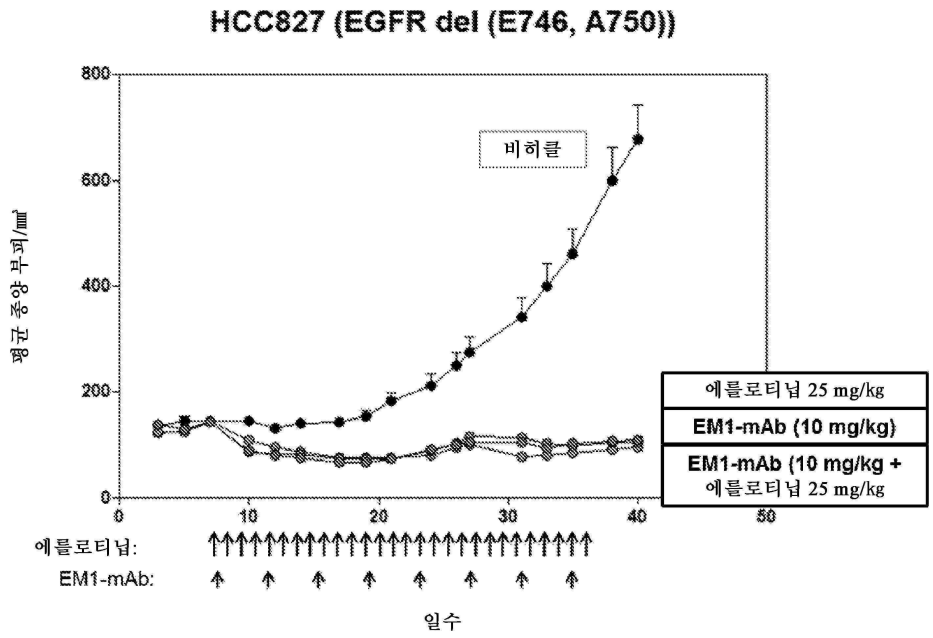
도면9


H292-HGF 인간 폐암 이종이식편 모델
비히클 10 uL/g QD×3주 i.p.
이중특이성 셀티린 25 mg/kg 10 uL/g 3회/주 ×3주 i.p.
크리조티닙 50 mg/kg 10 uL/g QD ×17일 p.o.
에를로티닙 50 mg/kg 10 uL/g QD × 3주 p.o.
크리조티닙; 에를로티닙 50 mg/kg; 50 mg/kg 10 uL/g QD×3주; QD×3주 p.o.
세툭시맙 1 mg/마우스 0.2 mL/마우스 Q4d*6 i.p.
종양 크기(mm³)
종양 접종 후 일수
G1, G4 및 G5
G3
G2
G6

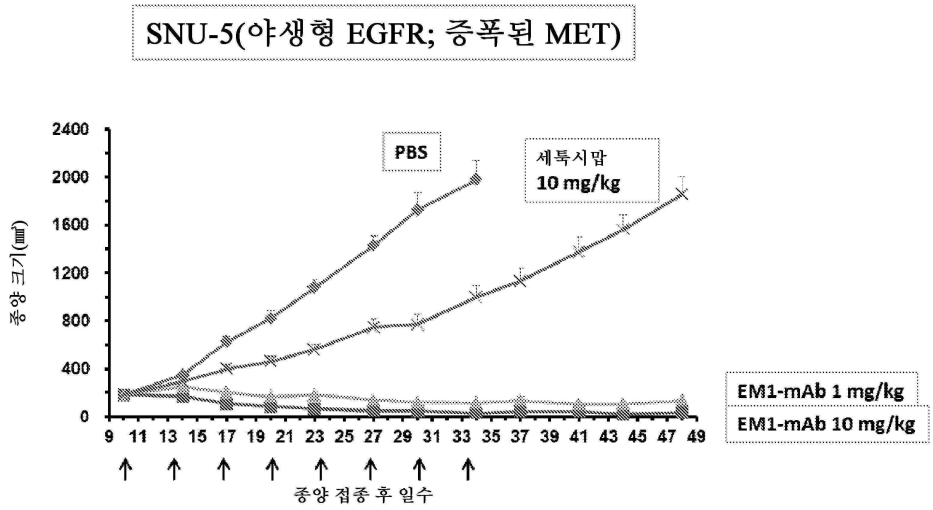
도면10


SKMES-HGF(야생형 EGFR; 야생형 cMet)
평균 종양 부피(cu mm+/- SEM)
세툭시맙
20 mg/kg
PBS
EM1-mAb 1 mg/kg
EM1-mAb 5 mg/kg
EM1-mAb 20 mg/kg
연구 일수
8회 용량:

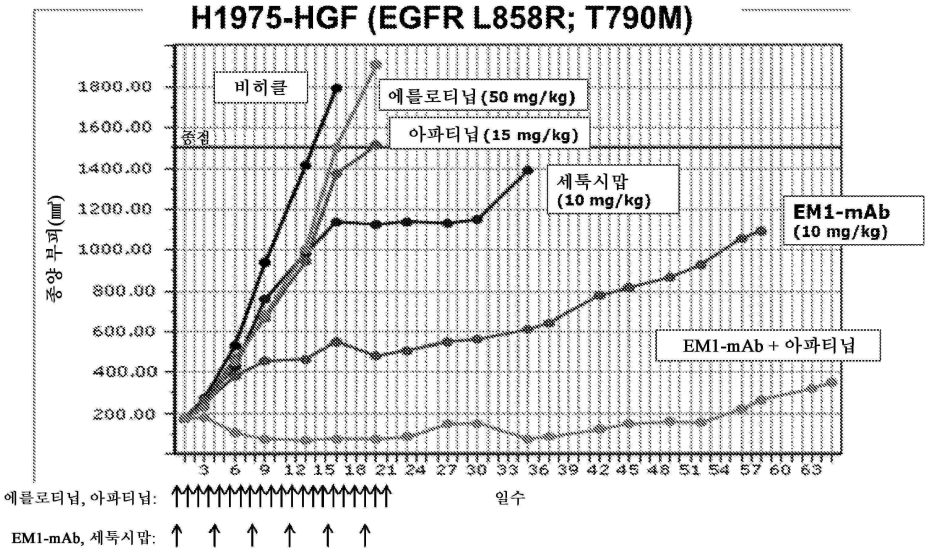
도면11


HCC827 (EGFR del (E746, A750))
800
600
400
200
0
평균 종양 부피/㎣
비히클
에를로티닙 25 mg/kg
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg +
에를로티닙 25 mg/kg
0
10
20
30
40
50
에를로티닙:
EM1-mAb:
일수

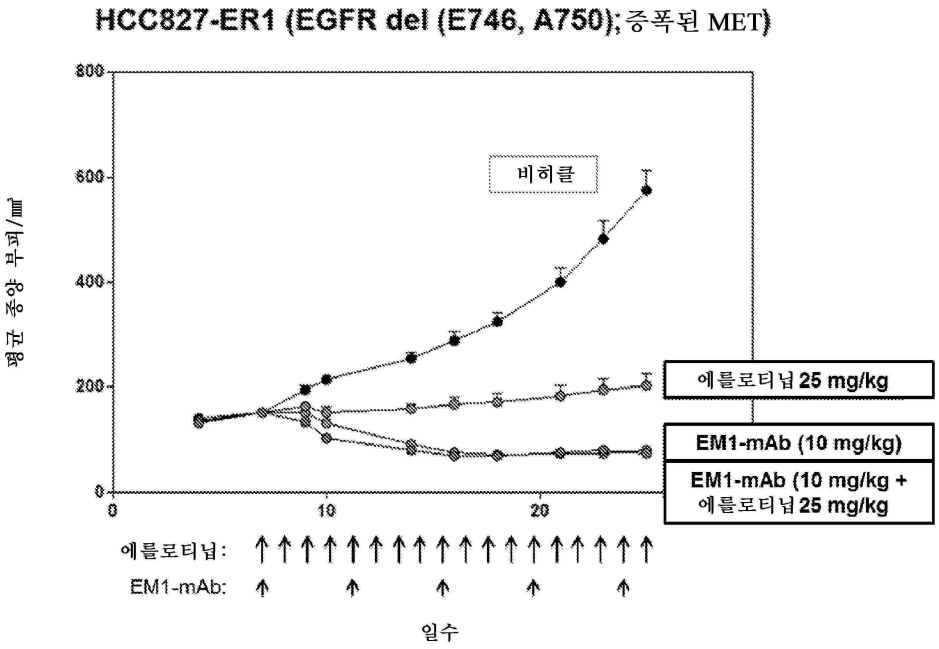
도면12


SNU-5(야생형 EGFR; 증폭된 MET)
2400
2000
1600
1200
800
400
0
종양 크기(㎣)
PBS
세툭시맙
10 mg/kg
EM1-mAb 1 mg/kg
EM1-mAb 10 mg/kg
9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
종양 접종 후 일수

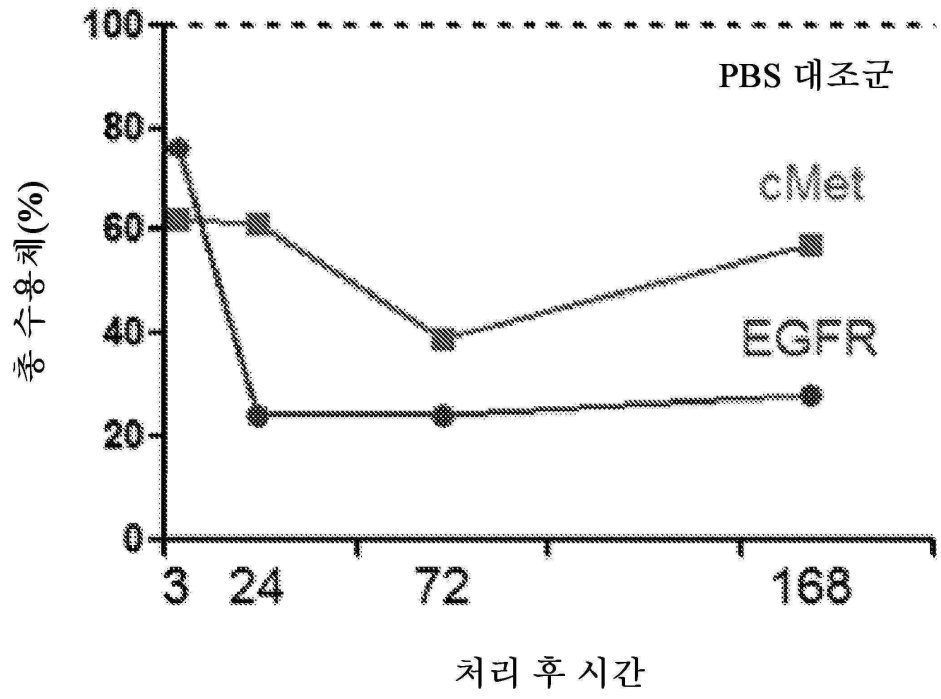
도면13


H1975-HGF (EGFR L858R; T790M)
비히클
에를로티닙 (50 mg/kg)
아파티닙 (15 mg/kg)
세툭시맙 (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb + 아파티닙
종양 부피(㎣)
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
일수
에를로티닙, 아파티닙:
EM1-mAb, 세툭시맙:

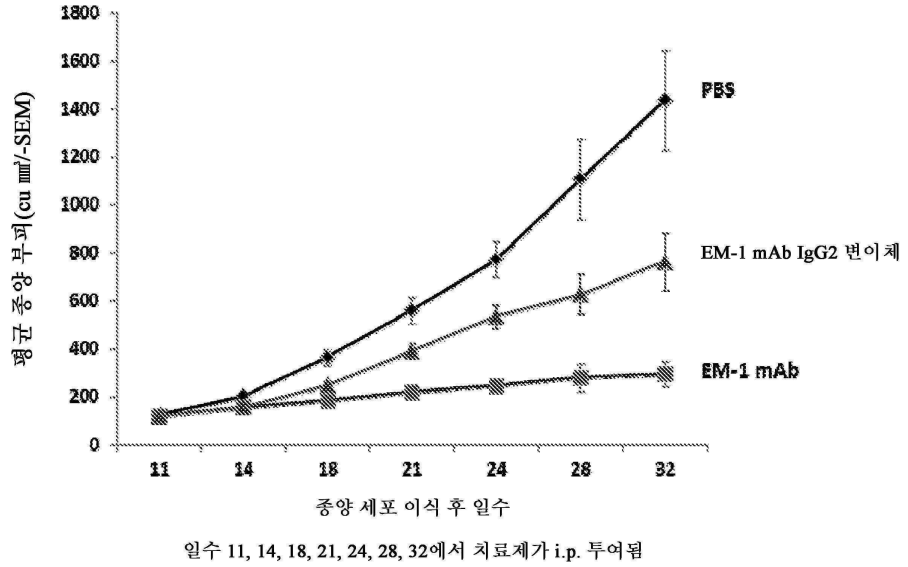
도면14


HCC827-ER1 (EGFR del (E746, A750); 증폭된 MET)
비히클
에를로티닙 25 mg/kg
EM1-mAb (10 mg/kg)
EM1-mAb (10 mg/kg + 에를로티닙 25 mg/kg
평균 종양 부피/㎣
800
600
400
200
0
0
10
20
에를로티닙:
EM1-mAb:
일수

도면15



도면16



일수 11, 14, 18, 21, 24, 28, 32에서 치료제가 i.p. 투여됨

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Mark, Chiu

Sheri, Moores

Joost, Neijssen

Paul, Parren

Janine, Schuuman

<120> Bispecific EGFR/c-Met Antibodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> Tencon FN3 scaffold

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggaaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgtttctg aagttacc 58

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

aacaccgtag atagaaacgg t 21

<210> 4

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

cggcggttag aacgcggcta caattaatac ataaccccat ccccctgttg acaattaatc 60

atcggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacaggat 120

ctaccatgct g 131

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

cggcggttag aacgcggcta c 21

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(42)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 6

ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnaacac cgtagataga 60

aacggt 66

<210> 7

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(42)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(48)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 7

ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnaa caccgtagat 60

agaaacggt 69

<210> 8

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(42)

<223>

n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(48)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 8

ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta 60

gatagaaacg gt 72

<210> 9

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(42)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(48)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(54)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 9

ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnaacacc 60

gtagatagaa acggt 75

<210> 10

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(29)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(47)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(53)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (55)..(56)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(59)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 10

rmggtggtga attccgcaga cagcggsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsnna 60

acaccgtaga tagaaacggt 80

<210> 11

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(42)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(48)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(54)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (56)..(57)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (59)..(60)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 11

ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn 60

aacaccgtag atagaaacgg t 81

<210> 12

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

aagatcagtt gcggccgcta gactagaacc gctgccatgg tgatggtgat ggtgaccgcc 60

ggtggtgaat tccgcagaca g 81

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

cggcggttag aacgcggcta caattaatac 30

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

catgattacg ccaagctcag aa 22

<210> 15

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gagccgccgc caccggttta atggtgatgg tgatggtgac caccggtggt gaattccgca 60

gacag 65

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

aagaaggaga accggtatgc tgccggcgcc gaaaaac 37

<210> 17

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

tttgggaagc ttctaggtct cggcggtcac catcaccatc accatggcag cggttctagt 60

ctagcggccc caactgatct tcaccaaac 89

<210> 18

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> primer

<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> Artificial Sequence

<220><223> primer

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><
223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence

<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence

<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule

<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<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> Artificial Sequence
<220><223> bispecific EGFR/cMet binding molecule
<400> 72

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 73
<211> 1210
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS
<400> 73
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu

145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met

165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro

180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln

195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys

225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp

245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly

275 280 285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn

340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405 410 415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465 470 475 480
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> HOMO SAPIENS

<400> 74

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn

20 25 30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys

35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 75

<211> 2201

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu

1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys

20 25 30

Arg Gln Ser Gly Val Asn Ala Thr Leu Pro Glu Glu Asn Gln Pro Val

35 40 45

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys

50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro

65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn

85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly

100 105 110

Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu

115 120 125

```
Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala

    130                 135                 140
Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe
145                 150                 155                 160
Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
                165                 170                 175
Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
            180                 185                 190
Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp

        195                 200                 205
Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
    210                 215                 220
Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
225                 230                 235                 240
Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
                245                 250                 255
Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp

            260                 265                 270
Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
        275                 280                 285
Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
    290                 295                 300
Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
305                 310                 315                 320
Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe

                325                 330                 335
Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
            340                 345                 350
Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
        355                 360                 365
Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
```

370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly

385 390 395 400

Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly

405 410 415

Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu

420 425 430

Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg

435 440 445

Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp

450 455 460

Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys

465 470 475 480

Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys

485 490 495

Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val

500 505 510

Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala

515 520 525

Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn

530 535 540

Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu

545 550 555 560

Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly

565 570 575

Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His

580 585 590

Ser Cys Pro Ser Asp Cys Asn Asn Leu Gly Gln Cys Val Ser Gly Arg

595 600 605

Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser

610 615 620

Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn
625 630 635 640
Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr

645 650 655
Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly
660 665 670
Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr
675 680 685
Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val
690 695 700
Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe

705 710 715 720
Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp
725 730 735
Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu
740 745 750
Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr
755 760 765
Arg Gln Thr Gly Leu Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His

770 775 780
Ile Val Lys Asn Asn Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr
785 790 795 800
Thr Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp
805 810 815
Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly
820 825 830
Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr

835 840 845
Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys
850 855 860
Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met

865 870 875 880

Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro

885 890 895

Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu

900 905 910

Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala

915 920 925

Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln

930 935 940

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu

945 950 955 960

Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro

965 970 975

Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln

980 985 990

Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro

995 1000 1005

Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr

1010 1015 1020

Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr

1025 1030 1035

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu

1040 1045 1050

Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys

1055 1060 1065

Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr

1070 1075 1080

Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp

1085 1090 1095

Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys

1100 1105 1110

Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala

1115 1120 1125

Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser

1130 1135 1140

Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala

1145 1150 1155

Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val

1160 1165 1170

Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro

1175 1180 1185

Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp

1190 1195 1200

Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg

1205 1210 1215

Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile

1220 1225 1230

Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser

1235 1240 1245

Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr

1250 1255 1260

Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr

1265 1270 1275

Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala

1280 1285 1290

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu

1295 1300 1305

Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr

1310 1315 1320

Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu

1325 1330 1335

Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu

1340 1345 1350

Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr

1355 1360 1365

Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu

1370 1375 1380

Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser

1385 1390 1395

Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr

1400 1405 1410

Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val

1415 1420 1425

Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn

1430 1435 1440

Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp

1445 1450 1455

Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile

1460 1465 1470

Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly

1475 1480 1485

Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp

1490 1495 1500

Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys

1505 1510 1515

Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu

1520 1525 1530

Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser

1535 1540 1545

Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val

1550 1555 1560

Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser

1565 1570 1575

Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile

1580 1585 1590

Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr

1595 1600 1605

Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val

1610 1615 1620

Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu

1625 1630 1635

Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys

1640 1645 1650

Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu

1655 1660 1665

Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Ile Thr Gly Leu Arg Glu Ala

1670 1675 1680

Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg

1685 1690 1695

Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro

1700 1705 1710

Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val

1715 1720 1725

Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr

1730 1735 1740

Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp

1745 1750 1755

Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val

1760 1765 1770

Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser

1775 1780 1785

Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser

1790 1795 1800

Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg

1805 1810 1815

Trp Gln Pro Ala Ile Ala Thr Val Asp Ser Tyr Val Ile Ser Tyr

1820 1825 1830

Thr Gly Glu Lys Val Pro Glu Ile Thr Arg Thr Val Ser Gly Asn

1835 1840 1845

Thr Val Glu Tyr Ala Leu Thr Asp Leu Glu Pro Ala Thr Glu Tyr

1850 1855 1860

Thr Leu Arg Ile Phe Ala Glu Lys Gly Pro Gln Lys Ser Ser Thr

1865 1870 1875

Ile Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu Asp Ser Pro Arg Asp Leu

1880 1885 1890

Thr Ala Thr Glu Val Gln Ser Glu Thr Ala Leu Leu Thr Trp Arg

1895 1900 1905

Pro Pro Arg Ala Ser Val Thr Gly Tyr Leu Leu Val Tyr Glu Ser

1910 1915 1920

Val Asp Gly Thr Val Lys Glu Val Ile Val Gly Pro Asp Thr Thr

1925 1930 1935

Ser Tyr Ser Leu Ala Asp Leu Ser Pro Ser Thr His Tyr Thr Ala

1940 1945 1950

Lys Ile Gln Ala Leu Asn Gly Pro Leu Arg Ser Asn Met Ile Gln

1955 1960 1965

Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp

1970 1975 1980

Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr

1985 1990 1995

Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Ala Glu Ala Leu Glu Val Phe

2000 2005 2010

Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly Trp Ile Val Phe Leu Arg

2015 2020 2025

Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln Asn Trp Lys Ala Tyr

2030 2035 2040

Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe Trp Leu Gly Leu

2045 2050 2055

Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly Gln Tyr Glu Leu Arg

2060 2065 2070

Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp

2075 2080 2085

Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val

2090 2095 2100

Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn

2105 2110 2115

Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile

2120 2125 2130

Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn

2135 2140 2145

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His

2150 2155 2160

Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser

2165 2170 2175

Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn

2180 2185 2190

Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala

2195 2200

<210> 76

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fibcon FN3 domain

<400> 76

Leu Asp Ala Pro Thr Asp Leu Gln Val Thr Asn Val Thr Asp Thr Ser

1 5 10 15

Ile Thr Val Ser Trp Thr Pro Pro Ser Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

20 25 30

Ile Thr Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Pro Gly Glu Pro Lys Glu Leu Thr

35 40 45

Val Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Thr Ile Thr Gly Leu Thr Pro Gly

50 55 60

Val Glu Tyr Val Val Ser Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Asn Gln Glu Ser

65 70 75 80

Pro Pro Leu Val Gly Thr Gln Thr Thr

85

<210> 77

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr

20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp

65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 78

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 78

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 79

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 80

Ala Pro Ala Pro

1

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> linker

<400> 81

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro

1 5 10

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> tencon BC loop

<400> 85

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> tencon FG loop

<400> 86

Lys Gly Gly His Arg Ser Asn

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400>

87

Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 88

Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 89

Trp Asp Pro Phe Ser Phe Tyr Asp

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 90

Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu

1 5

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 91

Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp

1 5

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 92

Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp

1 5

<210

> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 93

Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Asp

1 5

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain BC loop

<400> 94

Asp Asp Pro Trp Asp Phe Tyr Glu

1 5

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain FG loop

<400> 95

His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu

1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain FG loop

<400> 96

Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met

1 5 10

<210> 97

<211> 285

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain from 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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain from 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> Artificial Sequence

<220><223> tencon27 FN3 domain

<400> 99

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

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

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

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

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

Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 100

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCL14 library

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (40)..(40)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(78)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(79)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (81)..(81)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 100

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Xaa Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Gly Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser

65 70 75 80

Xaa Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr

85

<210> 101

<211> 1408

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 101

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys

20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala

35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu

50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys

65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe

85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp

100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp

115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His

130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys

145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val

165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe

180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp

195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp

210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu

225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn

245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln

260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu

275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg

290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp

340 345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380
Cys 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> HOMO SAPIENS

<400> 102

Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys

1 5 10 15

Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys

20 25 30

Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly

35 40 45

Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln

50 55 60

Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu
65 70 75 80
Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn
85 90 95
Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr
100 105 110
Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu

115 120 125
His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn
130 135 140
Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr
145 150 155 160
Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser
165 170 175
Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met

180 185 190
Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr
195 200 205
Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe
210 215 220
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys
225 230 235 240
Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr

245 250 255
Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr
260 265 270
Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr
275 280 285
Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His
290 295 300
Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu

305 310 315 320

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr

325 330 335

Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys

340 345 350

Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr

355 360 365

Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp

370 375 380

Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp

385 390 395 400

Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp 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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 105

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 106

<211> 194

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 106

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe

20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys

65 70 75 80

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr

<210> 107
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<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> Artificial Sequence

<220><223> albumin binding domain

<400> 117

Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Glu Ala Lys Glu Lys Ala Ile Glu
1 5 10 15

Glu Leu Lys Lys Ala Gly Ile Thr Ser Asp Tyr Tyr Phe Asp Leu Ile
20 25 30

Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Asn Ala Leu Lys Asp Glu Ile
35 40 45

Leu Lys Ala
50

<210> 118

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 118

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

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

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

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

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

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala

85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu

100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala

115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val

130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile

165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe

180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala

195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr

210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala

225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

245 250

<210> 119

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 119

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe

20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu

35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala

85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu

100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala

115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val

130 135 140

Val Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile

165 170 175

Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe

180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala

195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr

210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala

225 230 235 240

Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

245 250

<210> 120

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 120

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
210 215 220

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 121
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule
<400> 121

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe

20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala

85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala
195 200 205
Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr

210 215 220
Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
225 230 235 240
Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 122
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain

<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> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence
<220><223> EGFR binding FN3 domain
<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> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 138

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr

115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val Gly Gly Glu Ala Ile

145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 139
<211> 203
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 139
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu

115 120 125

Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser
130 135 140
Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val
145 150 155 160
Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys
165 170 175
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly Lys
180 185 190

Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 140
<211> 204
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain
<400> 140
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu

165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 141
<211> 204
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain
<400> 141
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140

Ser Phe Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Phe Leu Arg Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Trp Val Thr Ile Leu Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
Leu Val Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 142

<

211> 204

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 142

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175

Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 143
<211> 204
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain
<400> 143
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly

85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125
Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile

145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190
His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 144
<211> 204
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 144
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr
115 120 125

Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
130 135 140
Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly Ser Gly Glu Ala Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu
165 170 175
Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Gln Ile Ile Gly Val Lys Gly Gly
180 185 190

His Ile Ser Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
195 200

<210> 145
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain
<400> 145
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15
Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu
20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60
Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 146

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 146

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val

130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 147

<211> 194

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 147

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu

100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala

115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu

130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile

165 170 175

Met Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe

180 185 190

Thr Thr

<210> 148

<211> 193

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 148

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val

130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 149

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 149

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 150

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 150

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 151

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 151

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser

130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 152

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 152

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 153

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 153

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 154

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 154

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 155

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 155

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser

130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 156

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 156

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 157

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 157

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 158

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 158

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 159

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 159

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val Ser

130 135 140

Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 160

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 160

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 161

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 161

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu

165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr

<210> 162

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 162

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val

130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys

195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr

210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu

225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

245

<210> 163

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 163

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Asp Glu Val Val Val
130 135 140

Gly Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Ile Leu
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

245

<210> 164

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 164

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr

145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met

165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr

180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys

195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr

210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu

225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

245

<210> 165

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<400> 165

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Ala Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu

20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val

100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro

115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly

130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Met
165 170 175

Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Ala Glu Ala Lys
195 200 205

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
225 230 235 240

Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245

<210> 166

<211> 588

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding domain

<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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain from 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> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain from 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> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 170

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 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> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 171

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 172
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 172
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140
Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190

Thr Thr Cys
195
<210> 173
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule
<400> 173
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140
Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190

Thr Thr Cys
195

<210> 174

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 174

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Lys Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 175
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule
<400> 175
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 176
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule

<400> 176
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110
Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Val
130 135 140

Ser Lys Gly Asp Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175
Leu Gly Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190

Thr Thr Cys
195

<210> 177
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule
<400> 177
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro His Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95
Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
115 120 125
Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
145 150 155 160
Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
180 185 190
Thr Thr Cys
195

<210> 178
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Bispecific EGFR/c-Met binding molecule
<400> 178
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe
20 25 30

Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu
35 40 45
Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro
50 55 60
Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys
65 70 75 80
Asp Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala
85 90 95

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro 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> Artificial Sequence

<220><223> Consensus FG loop of EGFR bindiing FN3 domain

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Xaa may be Met or 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> Artificial Sequence

<220><223> GF loop of EGFR binding FN3 domain

<400> 180

Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met Leu

1 5 10

<210> 181

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus BC loop of EGFR binding FN3 domain

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa may be Ala, Thr, Gly or Asp

<220><221> VARIANT

<222

> (2)..(2)

<223> Xaa may be Ala, Asp, Tyr or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> Xaa may be Pro, Asp or Asn

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa may be Leu or absent

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Xaa may be Asp, His, Arg, Gly, Tyr or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Xaa may be Glu, Asp or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> Xaa may be Ala, Phe, Gly, His or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Xaa may be Tyr, Phe or Leu

<400> 181

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 182

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> (22)..(22)

<223> Xaa may be Ala, Thr, Gly or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (23)..(23)

<223> Xaa may be Ala, Asp, Tyr or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (24)..(24)

<223> Xaa may be Pro, Asp or Asn

<220><221> VARIANT

<222> (25)..(25)

<223> Xaa may be Leu or absent

<220><221> VARIANT

<222> (26)..(26)

<223> Xaa may be Asp, His, Arg, Gly, Tyr or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> Xaa may be Gly, Asp or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (28)..(28)

<223> Xaa may be Ala, Phe, Gly, His or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (29)..(29)

<223> Xaa may be Tyr, Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (84)..(84)

<223> Xaa may be Met or 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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR binding FN3 domain consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> (22)..(22)

<223> Xaa may be Ala, Thr, Gly or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (23)..(23)

<223> Xaa may be Ala, Asp, Tyr or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (24)..(24)

<223> Xaa may be Pro, Asp or Asn

<220><221> VARIANT

<222> (25)..(25)

<223> Xaa may be Leu or absent

<220><221> VARIANT

<222> (26)..(26)

<223> Xaa may be Asp, His, Arg, Gly, Tyr or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> Xaa may be Gly, Asp or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (28)..(28)

<223> Xaa may be Ala, Phe, Gly, His or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (29)..(29)

<223> Xaa may be Tyr, Phe or 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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain C strand and CD loop consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Trp, Phe or Val

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Asp, Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Val, Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222

> (11)..(11)

<223> Xaa is Val, Leu or Thr

<220><221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is Val, Arg, Gly, Leu, Thr or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is Gly, Ser, Ala, Thr or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Glu or 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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain F strand and FG loop consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Tyr, Trp, Ile, Val, Gly or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Asn, Thr, Qln or Gly

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Leu, Met, Asn or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Gly or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Ile, Val or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr or 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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met binding FN3 domain consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> (32)..(32)

<223> Xaa is Trp, Phe or Val

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> Xaa is Asp, Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (38)..(38)

<223> Xaa is Val, Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (39)..(39)

<223> Xaa is Val, Leu or Thr

<220><221> VARIANT

<222> (40)..(40)

<223> Xaa is Val, Arg, Gly, Leu, Thr or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (41)..(41)

<223> Xaa is Gly, Ser, Ala, Thr or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (43)..(43)

<223> Xaa is Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (68)..(68)

<223> Xaa is Tyr, Trp, Ile, Val, Gly or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (70)..(70)

<223> Xaa is Asn, Thr, Qln or Gly

<220><221> VARIANT

<222> (72)..(72)

<223> Xaa is Leu, Met, Asn or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (73)..(73)

<223> Xaa is Gly or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (78)..(78)

<223> Xaa is Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (79)..(79)

<223> Xaa is Ile, Val or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (81)..(81)

<223> Xaa is Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr or 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> Artificial Sequence

<220><223> EGFR consensus FN3 domain of bispecific EGFR/c-Met molecule

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Glu, Asn or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Glu or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Leu or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (25)..(25)

<223> Xaa is His or Trp

<220><221> VARIANT

<222> (29)..(29)

<223> Xaa is Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (37)..(37)

<223> Xaa is Glu or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (46)..(46)

<223> Xaa is Asn or Val

<220><221> VARIANT

<222> (73)..(73)

<223> Xaa is Gly or Tyr

<220><221> VARIANT

<222> (83)..(83)

<223> Xaa is Met or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (91)..(91)

<223> Xaa is Glu or 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> Artificial Sequence

<220><223> c-Met consensus FN3 domain of bispecific EGFR/c-Met molecule

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Glu, Asn or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Glu or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Leu or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (37)..(37)

<223> Xaa is Glu or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (39)..(39)

<223> Xaa is Val or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (40)..(40)

<223> Xaa is Gly or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (41)..(41)

<223> Xaa is Ser or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (43)..(43)

<223> Xaa is Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (46)..(46)

<223> Xaa is Asn or Val

<220><221> VARIANT

<222> (72)..(72)

<223> Xaa is Leu or Met

<220><221> VARIANT

<222> (73)..(73)

<223> Xaa is Gly or Ser

<220

><221> VARIANT

<222> (78)..(78)

<223> Xaa is Ser or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (86)..(86)

<223> Xaa is Glu or 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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> DNA

<213> Homo Sapiens

<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 tcccccctggc 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> DNA

<213> Homo Sapiens

<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> DNA

<213> Homo Sapiens

<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> DNA

<213> Homo Sapiens

<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 cttccccccc 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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<400> 210

Thr Tyr Gly Met His

1 5

<210> 211

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<400> 213

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Val

1 5 10

<210> 214

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 214

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 215

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 216

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 216

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 217

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<400> 218

Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 219

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 219

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 220

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 220

Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser

1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 221

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr

1 5

<210> 222

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 222

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 223

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<400> 224

Asp Leu Gly Trp Gly Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 225

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 225

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 226

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 226

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 227

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 227

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 228

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 228

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 5

<210> 229

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<400> 231

Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 232

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 232

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 233

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 233

Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Pro Gln Ile Thr

1 5 10

<210> 234

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens
<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<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> Homo Sapiens

<400> 240

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp

1 5 10 15