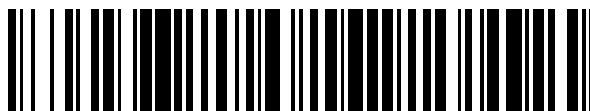


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 148**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2013 PCT/US2013/071267**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14081944**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2013 E 13856353 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2922566**

54 Título: **Moléculas de unión al dominio de tipo III de c-Met-fibronectina y EGFR**

30 Prioridad:

21.11.2012 US 201261728906 P
21.11.2012 US 201261728914 P
21.11.2012 US 201261728912 P
14.03.2013 US 201361782550 P
08.04.2013 US 201361809541 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2019

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

ANDERSON, MARK;
ATTAR, RICARDO;
DIEM, MICHAEL;
HYUN, LINUS;
JACOBS, STEVEN;
KING, ALASTAIR;
KLEIN, DONNA;
MOORES, SHERI;
O'NEIL, KARYN y
PICHA, KRISTEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 696 148 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión al dominio de tipo III de c-Met-fibronectina y EGFR

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moléculas de unión a EGFR y/o c-Met mono-específicas o bio-específicas y a métodos de preparación y uso de las moléculas.

10 **Antecedentes de la invención**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1) es una glicoproteína transmembrana de 170 kDa que está codificada por el proto-oncogén c-erbB1. El EGFR es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) de las tirosina quinasa receptoras (RTK) que incluye HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). La señalización del EGFR se inicia mediante la unión del ligando seguida de la inducción de cambio conformacional, homodimerización o la heterodimerización del receptor con otros miembros de la familia ErbB y autofosforilación trans del receptor (Ferguson et al., *Annu Rev Biophys*, 37: 353–73, 2008), que inicia una cascada de transducción de señales que afecta en última instancia a una amplia variedad de funciones celulares, incluida la proliferación celular y la supervivencia. Los aumentos en la expresión o la actividad de la quinasa del EGFR se han relacionado con una serie de cánceres humanos, lo que hace que el EGFR sea un objetivo atractivo para la intervención terapéutica (Mendelsohn et al., *Oncogene* 19: 6550–6565, 2000; Grünwald et al., *J Natl Cancer Inst* 95: 851–67, 2003; Mendelsohn et al., *Semin Oncol* 33: 369–85, 2006). Los aumentos tanto en el número de copias del gen EGFR como en la expresión de proteínas se han asociados con respuestas favorables al inhibidor de la tirosina quinasa EGFR, IRESSA™ (gefitinib), en el cáncer de pulmón no microcítico (Hirsch et al., *Ann Oncol* 18:752–60, 2007).

Las terapias con EGFR incluyen tanto moléculas pequeñas como anticuerpos anti-EGFR, aprobados para el tratamiento del cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer pulmonar no microcítico (CPNM) (Baselga y Arteaga, *J Clin Oncol* 23:2445–2459 (2005); Gill et al., *J Biol Chem*, 259:7755–7760, 1984; Goldstein et al., *Clin Cancer Res*, 1:131 1–1318; 1995; Prewett et al., *Clin Cancer Res*, 4:2957–2966.1998).

La eficacia de las terapias anti-EGFR puede depender del tipo de tumor y el estado de mutación/amplificación del EGFR en el tumor. Los efectos secundarios de las terapias actuales pueden incluir toxicidad para la piel (De Roock et al., *Lancet Oncol* 11 :753–762, 2010; Linardou et al., *Nat Rev Clin Oncol*, 6: 352–366, 2009; Li y Perez–Soler, *Targ Oncol* 4: 107-119, 2009). Los inhibidores de la tirosina quinasa EGFR (TKI) se usan habitualmente como terapias de segunda línea para el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), pero a menudo dejan de funcionar en doce meses debido a las vías de resistencia (Riely et al., *Clin Cancer Res* 12: 839-44, 2006).

c-Met codifica un receptor de tirosina quinasa. Se identificó por primera vez como un protooncogén en 1984, después de descubrir que el tratamiento con un carcinógeno daba como resultado una proteína de fusión constitutivamente activa TPR–MET (Cooper et al., *Nature* 311:29–33, 1984). La activación de c-Met por su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), estimula una gran cantidad de procesos celulares, incluidos el crecimiento, la motilidad, la invasión, la metástasis, la transición epitelio-mesenquimatosa, la angiogénesis/cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (Christensen et al., *Cancer Lett* 225:1–26.2005; Peters y Adjei, *Nat Rev Clin Oncol* 9:314–26, 2012). c-Met se sintetiza como proteína monocatenaria que se puede romper en una subunidad alfa de 50 kDa y una beta de 140 kDa unidas por un puente disulfuro ((Ma et al., *Cancer and Metastasis Reviews*, 22: 309–325, 2003). c-Met es estructuralmente similar a otros receptores de membrana como Ron y. La estequiometría exacta de la unión de HGF:c-Met no está clara, pero en general se cree que dos moléculas de HGF se unen a dos moléculas de c-Met que conducen a la dimerización del receptor y la autofosforilación en las tirosinas 1230, 1234 y 1235 (Stamos et al., *The EMBO Journal* 23: 2325-2335, 2004). La autofosforilación de C-Met independiente del ligando también puede producirse debido a la amplificación génica, la mutación o la sobreexpresión del receptor.

c-Met es frecuentemente amplificado, mutado o sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, incluyendo cánceres gástricos, de pulmón, de colon, de mama, de vejiga, de cabeza y cuello, de ovario, de próstata, de tiroides, de páncreas y del SNC. Las mutaciones con sentido erróneo típicamente localizadas en el dominio de la quinasa se encuentran habitualmente en los carcinomas renales papilares hereditarios (PRCC) y en el 13 % de los PRCC esporádicos (Schmidt et al., *Oncogene* 18: 2343–2350, 1999). Las mutaciones de c-Met localizadas en los dominios de semaforina o yuxtamembrana de c-Met se encuentran con frecuencia en los cánceres gástricos, de cabeza y cuello, de hígado, de ovarios, CPNM y de tiroides (Ma et al., *Cancer and Metastasis Reviews*, 22: 309–325, 2003; Sakakura et al., *Chromosomes and Cancer*, 1999. 24:299–305). Se ha detectado amplificación de c-Met en cánceres de cerebro, colorrectal, gástrico y de pulmón, que a menudo se correlacionan con progresión de la enfermedad (Ma et al., *Cancer and Metastasis Reviews*, 22: 309-325, 2003). Hasta el 4 % y el 20 % del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y de los cánceres gástricos, respectivamente, exhiben amplificación de c-Met (Sakakura et al., *Chromosomes and Cancer*, 1999. 24:299–305; Sierra and Tsao, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3:S21–35, 2011). Incluso en ausencia de amplificación génica, con frecuencia se observa sobreexpresión

de c-Met en el cáncer de pulmón (Ichimura et al., *Jpn J Cancer Res*, 87:1063–9, 1996). Además, en muestras clínicas, casi la mitad de los adenocarcinomas de pulmón mostraron niveles altos de c-Met y HGF, ambos correlacionados con una mayor velocidad de crecimiento tumoral, metástasis y mal pronóstico (Sierra and Tsao, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3:S21–35, 2011; Siegfried et al., *Ann Thorac Surg* 66: 1915-8, 1998).

En casi el 60 % de todos los tumores que se hacen resistentes a los inhibidores de tirosina quinasa EGFR hay un incremento de la expresión de c-Met o se incrementa su único ligando conocido, HGF (Turke et al., *Cancer Cell*, 17:77–88, 2010), lo que sugiere que la existencia de una vía compensatoria para EGFR a través de la amplificación de c-Met se identificó por primera vez en células cultivadas que se hicieron resistentes al gefitinib, un inhibidor de la quinasa EGFR, y mostraron una supervivencia mejorada a través de la vía de Her3 (Engelmann et al., *Science*, 316:1039–43, 2007). Esto se validó aún más en muestras clínicas en las que nueve de los 43 pacientes con resistencia adquirida a erlotinib o gefitinib presentaron amplificación de c-Met, en comparación con solo dos de 62 pacientes no tratados. Cuatro de los nueve pacientes tratados también adquirieron la mutación activadora de EGFR, T790M, demostrando vías de resistencia simultáneas (Beat et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:20932–7, 2007).

Los papeles individuales de EGFR y c-Met en el cáncer están bien establecidos, lo que hace que estos objetivos sean atractivos para la terapia de combinación. Ambos receptores señalizan a través de las mismas vías de supervivencia y antiapoptóticas (ERK y AKT); por lo tanto, inhibir el par en combinación puede limitar el potencial de activación de la vía compensatoria, mejorando así la eficacia general. Las terapias combinadas dirigidas a EGFR y c-Met se analizan en ensayos clínicos con Tarceva® (erlotinib) en combinación con anticuerpo monovalente anti-c-Met para el CPNM (Spigel et al., 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011, *Journal of Clinical Oncology*: Chicago, IL, pág. 7505) y Tarceva (erlotinib) en combinación con ARQ-197, un inhibidor de molécula pequeña de c-Met (Adjei et al., *Oncologist*, 16:788–99, 2011). Las terapias de combinación o las moléculas biespecíficas anti-EGFR/c-Met se han desvelado, por ejemplo, en: la publicación de patente internacional n.º WO2008/127710, la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2009/0042906, la publicación de patente internacional n.º WO2009/111691, la publicación de patente internacional n.º WO2009/126834, la publicación de patente internacional n.º WO2010/039248, la publicación de patente internacional n.º WO2010/115551.

Los enfoques terapéuticos actuales de molécula pequeña y molécula grande para antagonizar las vías de señalización de EGFR y/o c-Met para la terapia pueden ser subóptimos debido a la posible falta de especificidad, actividad potencial fuera del objetivo y toxicidad limitante de la dosis que pueden observarse en los inhibidores de molécula pequeña. Los anticuerpos bivalentes típicos pueden dar como resultado la agrupación de receptores unidos a la membrana y la activación no deseada de las vías de señalización descendentes. Los anticuerpos monovalentes (medios brazos) presentan una complejidad y un coste significativos para el proceso de fabricación.

En consecuencia, existe la necesidad de más inhibidores de EGFR y/o c-Met mono-específicos y biespecíficos con fines tanto terapéuticos como de diagnóstico.

El documento WO2011131746 se refiere a proteínas que contienen Fc de anticuerpos heterodiméricos, tales como anticuerpos biespecíficos y métodos para producirlos. El documento WO2011110642 se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a c-Met humano. Jacobs et al. (2012) estudian el diseño de nuevos dominios FN3 con alta estabilidad mediante un enfoque de secuencia de consenso. El documento US2011053842 se refiere a proteínas de un solo dominio que se unen a EGFR. El documento US2012244164 menciona nanocuerpos biespecíficos de unión a c-Met/EGFR. El documento US2012225870 comenta métodos para tratar el cáncer que es resistente al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB y que está asociado con una mutación del gen MET de activación o una amplificación del gen MET. Los métodos implican administrar a un sujeto una combinación de un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. El documento US2011274623 muestra un armazón proteico basado en una secuencia consenso de proteínas de fibronectina de tipo III (FN3), por ejemplo, tenascina. El documento US2010179094 se refiere a moléculas biespecíficas que comprenden un dominio de unión a EGFR y un dominio de unión a IGFIR distinto para su uso en aplicaciones de diagnóstico, investigación y terapéuticas. El documento US2011287009 comenta métodos para la producción eficiente de anticuerpos y otros complejos de proteínas multiméricas capaces de unirse específicamente a más de un objetivo. Zucali et al (2008) estudian el papel de la expresión de cMET en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con inhibidores de la tirosina quinasa EGFR.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. La invención proporciona una molécula que contiene un dominio FN3 biespecífico aislado que comprende un primer dominio de fibronectina de tipo III (FN3) y un segundo dominio FN3, en el que el primer dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a EGFR, y el segundo dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met), y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, y en el que el primer dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y el segundo dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

En el presente documento se desvelan las moléculas que contienen dominio FN3 de unión biespecífica a EGFR/c-Met y unión mono-específica a EGFR o c-Met que tienen ciertas secuencias.

5 La invención también proporciona un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) al EGFR, en el que el dominio FN3 se aísla de una biblioteca diseñada basada en la secuencia de aminoácidos de Tencon de la SEQ ID NO: 1, en la que el dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

10 La invención también proporciona un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, en el que el dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

15 La invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica la molécula de la invención. Otro aspecto de la invención es un vector que comprende el polinucleótido de la invención.

20 La invención también proporciona una célula huésped que comprende el vector de la invención.

La invención también proporciona un método para producir: (a) una molécula biespecífica, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la invención en condiciones tales que se expresa la molécula biespecífica y purificar la molécula biespecífica; (b) un dominio FN3 que se une específicamente a EGFR, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la invención en condiciones tales que se expresa el dominio FN3 que se une específicamente a EGFR, y purificar el dominio FN3; o (c) un dominio FN3 que se une específicamente a c-Met, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la invención en condiciones tales que se expresa el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met, y purificar el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met.

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La invención también proporciona una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de acuerdo con la invención, un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de acuerdo con la invención, un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

35 En el presente documento también se desvela un método para tratar un sujeto que tiene cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met biespecífico o el dominio FN3 que se une a EGFR o c-Met a un paciente que lo necesite durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

45 **Figura 1A y 1B.** Alineación de aminoácidos de los dominios FN3 de unión a EGFR. Los bucles BC y FG están en recuadros en los residuos 22–28 y 75–86 de la SEQ ID NO: 18. Algunas variantes incluyen la estabilidad térmica que mejora las sustituciones L17A, N46K y E86I (numeración de residuos según Tencon SEQ ID NO: 1). Los residuos de paratopo P54AR4–83v2 (SEQ ID NO: 27) están subrayados (D23, F27, Y28, V77, G85 en la SEQ ID NO: 27).

50 **Figura 2.** Alineación de secuencia del armazón Tencon27 (SEQ ID NO: 99) y una biblioteca TCL14 (SEQ ID NO: 100) que tiene una superficie alternativa de C–CD–F–FG aleatorizada. Los residuos del bucle están encuadrados. Los bucles y las cadenas se indican encima de las secuencias.

Figura 3. Alineación de secuencias de los dominios FN3 de unión a c-Met. El bucle C y la cadena CD y el bucle F y la cadena FG están encuadrados y abarcan los residuos 29–43 y 65–81. Los residuos de paratopo P114AR7P95–A3 (SEQ ID NO: 41) están subrayados (R34S, F38S, M72S, e I79S).

55 **Figura 4.** Se muestra la inhibición de la fosforilación de c-Met en células H292 tratadas con moléculas que contienen dominios FN3 mono-específicas o biespecíficas y se estimulan con HGF. Se observó un aumento sustancial en la potencia de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met (ECB1) cuando se comparó con un dominio FN3 mono-específico de unión a c-Met (P114AR5P74–A5, que se muestra como A5 en la Figura) solo o en combinación con un dominio FN3 de unión a EGFR (P54AR4–83v2, que se muestra como 83v2 en la Figura).

60 **Figura 5.** Inhibición de la fosforilación de EGFR y c-Met en células pro-tratadas con moléculas que contienen el dominio FN3 mono-específicas o biespecíficas. En líneas celulares que expresan altos niveles de EGFR, NCI-H292 (Figura 5A) y H596 (Figura 5 (B)), las moléculas que contienen el dominio FN3 mono-específicas y biespecíficas anti-EGFR son igualmente potentes para disminuir la fosforilación de EGFR. En las líneas celulares que expresan niveles bajos de EGFR en relación con c-Met, H441 (Figura 5C), las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met mejoran la potencia para la inhibición de la fosforilación de EGFR en comparación con el dominio

FN3 mono-específico de unión a EGFR. En líneas celulares con bajos niveles de c-Met, en relación con EGFR, H292 (Figura 5D) y H596 (Figura 5E), la inhibición de la fosforilación de c-Met se potencia significativamente con la molécula de EGFR/c-Met biespecífica, en comparación con el dominio FN3 de unión a c-Met mono-específica. Las moléculas utilizadas en el estudio fueron: ECB5 biespecífico (mostrado como 17-A3 en la Figura), dominio FN3 de unión a EGFR mono-específica P53A1R5 (mostrado como "17" en la Figura), molécula ECB3 EGFR/c-Met biespecífica (mostrada 83-H9 en la Figura) y dominio FN3 de unión a c-Met mono-específica P114AR7P93-H9 (mostrado como H9 en la Figura).

Figura 6. Señalización farmacodinámica en tumores aislados de ratones a los que se les administraron moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met durante 6 horas o 72 horas. Todas las moléculas redujeron significativamente la fosforilación de c-Met, EGFR y ERK tanto a las 6 horas como a las 72 horas, el grado de inhibición dependía de la afinidad de los dominios FN3 a EGFR y/o c-Met. Las moléculas biespecíficas se generaron uniendo el dominio FN3 de unión a EGFR con una afinidad alta ("83" en la Figura es p54AR4-83v2) o media ("17v2" en la Figura es P53A1R5-17v2) al dominio FN3 de unión a c-Met con afinidad alta ("A3" en la Figura es P114AR7P94-A3) o media ("A5" en la Figura es P114AR5P74-A5).

Figura 7. La acumulación en plasma (parte superior) y tumor (parte inferior) de moléculas biespecíficas de EGFR/cMet de afinidades variables unidas a un dominio de unión a la albúmina (ABD) se muestra 6 horas (izquierda) y 72 horas (derecha) después de la dosificación IP. Seis horas después de la dosificación, la acumulación de tumores es máxima en ratones a los que se les administró una molécula biespecífica que alberga un dominio de unión a EGFR de afinidad media (17v2) o un dominio de unión a EGFR de afinidad alta (83v2). Las moléculas biespecíficas incorporaron los dominios FN3 de unión a EGFR o c-Met de afinidad alta o media de la siguiente manera: 83v2-A5-ABD (ECB18; alta/media para EGFR/cMet) 83v2-A3-ABD (ECB38; alta/ala) 17v2-A5 (ECB28; media/media) 17v2-A3-ABD (ECB39; media/alta) . En la figura, 83v2 se refiere a p54AR4-83v2; 17v2 se refiere a p53A1R5-17v2; A3 se refiere a p114AR7P94-A3 y A5 se refiere a p114AR5P74-A5.

Figura 8. Se implantaron xenoinjertos de tumor H292-HGF en ratones SCID beige. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de aproximadamente 80 mm³, los ratones recibieron dosis de moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met (25 mg/kg) o vehículo PBS tres veces a la semana. Todas las moléculas biespecíficas redujeron el crecimiento del tumor, siendo la inhibición del crecimiento del tumor (TGI) dependiente de las afinidades de las moléculas para c-Met y EGFR. (EGFR alta-cMet alta se refiere a p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3 (ECB38); EGFR alta-cMet media se refiere a p54AR4-83v2-p114AR5P74-A5 (ECB18); EGFR media-cMet alta se refiere a p53A1R5-17v7-p11-118 A3 (ECB39); EGFR media -cMet media se refiere a p53A1R5-17-p114AR5P74-A 5 (ECB28)).

Figura 9. Se implantaron xenoinjertos de tumor H292-HGF en ratones SCID beige y se trataron con diferentes terapias. Se muestra la actividad antitumoral de las terapias. (La molécula biespecífica de EGFR/c-Met se refiere a p54AR4-83v2-p114AR7P94-A3-ABD (ECB38); las otras terapias son crizotinib, erlotinib, cetuximab y la combinación de crizotinib y erlotinib).

Descripción detallada de la invención

El término "dominio de fibronectina de tipo III (FN3)" (dominio FN3) como se usa en el presente documento se refiere a un dominio que se produce con frecuencia en proteínas que incluyen fibronectinas, tenascina, proteínas del citoesqueleto intracelulares, receptores de citocinas y enzimas procarióticas (Bork y Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8994, 1992; Meinke et al., J Bacteriol 175:1910-1918, 1993; Watanabe et al., J Biol Chem 265:15659-15665, 1990). Los dominios FN3 de ejemplo son los 15 dominios FN3 diferentes presentes en la tenascina C humana, los 15 dominios FN3 diferentes presentes en la fibronectina humana (FN) y los dominios FN3 sintéticos no naturales como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Pub1 N.º 2010/0216708. Se hace referencia a los dominios FN3 individuales por el número de dominio y el nombre de la proteína, por ejemplo, el tercer dominio FN3 de tenascina (TN3), o el décimo dominio FN3 de fibronectina (FN10).

El término "sustituir" o "sustituido" o "mutar" o "mutar" como se usa en el presente documento se refiere a alterar, eliminar la inserción de uno o más aminoácidos o nucleótidos en un polipéptido o secuencia de polinucleótido para generar una variante de esa secuencia.

El término "aleatorizar" o "aleatorizado" o "diversificado" o "diversificar" como se usa en el presente documento se refiere a hacer al menos una sustitución, inserción o eliminación en una secuencia de polinucleótido o polipéptido.

"Variante" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido o un polinucleótido que difiere de un polipéptido de referencia o un polinucleótido de referencia por una o más modificaciones, por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones.

La expresión "se une específicamente" o "unión específica" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad del dominio FN3 de la invención para unirse a un antígeno predeterminado con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1×10^{-6} M o menos, por ejemplo aproximadamente 1×10^{-7} M o menos, aproximadamente 1×10^{-8} M o menos, aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, aproximadamente 1×10^{-11} M o menos, aproximadamente 1×10^{-12} M o menos, o aproximadamente 1×10^{-13} M o menos. Típicamente, el dominio FN3 de la invención se une a un antígeno predeterminado (es decir, EGFR o

c-Met) con una K_D que es al menos diez veces menor que su K_D para un antígeno no específico (por ejemplo, BSA o caseína) medido por resonancia de plasmón superficial utilizando, por ejemplo, un instrumento Proteon (BioRad). Por lo tanto, una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met FN3 de la invención se une específicamente a cada EGFR y c-Met con una afinidad de unión (K_D) de al menos 1×10^{-6} M o menos tanto para EGFR como para c-Met. Sin embargo, el dominio FN3 aislado de la invención que se une específicamente a un antígeno predeterminado puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno predeterminado de otras especies (homólogos).

El término "biblioteca" se refiere a una colección de variantes. La biblioteca puede estar compuesta por variantes de polipéptidos o polinucleótidos.

El término "estabilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una molécula para mantener un estado plegado en condiciones fisiológicas de modo que retenga al menos una de sus actividades funcionales normales, por ejemplo, la unión a un antígeno predeterminado, tal como EGFR o c-Met.

"Receptor del factor de crecimiento epidérmico" o "EGFR" como se usa en el presente documento se refiere al EGFR humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1 (Ullrich et al., Nature 309:418-425, 1984) que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 73 y en el número de acceso en GenBank NP_005219, así como las variantes de origen natural de las mismas. Dichas variantes incluyen el EGFRvIII bien conocido y otras variantes de corte y empalme alternativas (por ejemplo, identificadas por los números de acceso de SwissProt P00533-1 (tipo salvaje; idénticas a SEQ ID NO: 73 y NP_005219), P00533-2 (F404L/L405S), P00533-3 (628-705: CTGPGLEGCP...GEAPNQALLR → PGNESLKAML...SVIITASSCH y 706-1210 eliminados), P00533-4 (C628S y 629-1210 eliminados), variantes Q98, R266, K521, 1674, G962 y P988 (Livingston et al., NIEHS) -SNPs, proyecto genoma ambiental, NIEHS ES15478), T790M, L858R/T790M y de1 (E746, A750).

El "ligando EGFR" como se usa en el presente documento abarca todos los ligandos (por ejemplo, fisiológicos) para EGFR, incluidos EGF, TGF- α , EGF de unión a heparina (HB-EGF), anfiregulina (AR) y epiregulina (EPI).

"Factor de crecimiento epidérmico" (EGF), como se usa en el presente documento, se refiere al EGF humano de 53 aminoácidos bien conocidos que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 74.

"Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos" o "c-Met", como se usa en el presente documento, se refiere al c-Met humano que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 101 o en el número de acceso en GenBank: NP_001120972 y variantes naturales de los mismos.

El "factor de crecimiento de hepatocitos" (HGF), como se usa en el presente documento, se refiere al HGF humano bien conocido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 102 que se escinde para formar un dímero de una cadena alfa y beta unidas por un enlace disulfuro.

"Bloquea la unión" o "inhibe la unión", como se usa en el presente documento de manera intercambiable, se refiere a la capacidad de los dominios FN3 de la invención de la molécula que contiene el dominio EGFR/c-Met biespecífica para bloquear o inhibir la unión del ligando EGFR, tal como EGF a EGFR y/o HGF to c-Met, e incluyen el bloqueo/inhibición tanto parcial como completo. El bloqueo/inhibición del ligando de EGFR, tal como EGF a EGFR y/o HGF a c-Met, mediante el dominio FN3 o la molécula que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met FN3 biespecífica, reduce parcial o completamente el nivel normal de señalización de EGFR y/o señalización de c-Met en comparación con la unión del ligando de EGFR de unión de EGFR y/o unión de HGF a c-Met sin bloqueo ni inhibición. El dominio FN3 o la molécula que contiene el dominio FN3 DE EGFR/c-Met biespecífico de la invención "bloquea la unión" del ligando del EGFR, tal como EGF a EGFR y/o HGF a c-Met cuando la inhibición es de al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. La inhibición de la unión puede medirse utilizando métodos bien conocidos, por ejemplo, midiendo la inhibición de la unión de EGF biotinilado en células A431 que expresan EGFR expuestas al dominio FN3 o la molécula que contiene el dominio FN3 de EFGR/c-Met biespecífica de la invención que utiliza FACS, y utilizando métodos descritos en el presente documento, o midiendo la inhibición de la unión del HGF biotinilado en el dominio extracelular de c-Met utilizando métodos bien conocidos y métodos descritos en el presente documento.

La expresión "señalización de EGFR" se refiere a la transducción de señales inducida por la unión del ligando de EGFR a EGFR que da como resultado la autofosforilación de al menos un residuo de tirosina en el EGFR. Un ligando de EGFR de ejemplo es EGF.

"Neutraliza la señalización de EGFR" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad del dominio FN3 de la invención para inhibir la señalización de EGFR inducida por el ligando de EGFR, tal como EGF en al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

La expresión "señalización de c-Met" se refiere a la transducción de señales inducida por la unión de HGF a c-Met que da como resultado la autofosforilación de al menos un residuo de tirosina en el c-Met. Típicamente, al menos un residuo de tirosina en las posiciones 1230, 1234, 1235 o 1349 se autofosforila en la unión a HGF.

5 "Neutraliza la señalización de c-Met" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad del dominio FN3 de la invención para inhibir la señalización de c-Met inducida por HGF en al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

10 "Sobreexpresión", "sobreespresado" y "sobreespresión" como se usa en el presente documento se refieren indistintamente a una célula cancerosa o maligna que tiene niveles considerablemente mayores de EGFR y/o c-Met en la superficie en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede ser causada por la amplificación de genes o por un aumento de la transcripción o traducción. La expresión y sobreexpresión de EGFR y/o c-Met se pueden medir usando ensayos bien conocidos que utilizan, por ejemplo, ELISA, inmunofluorescencia, citometría de flujo o radioinmunoensayo en células vivas o lisadas. Como alternativa, o
15 adicionalmente, los niveles de EGFR y/o las moléculas de ácido nucleico codificantes de c-Met se pueden medir en la célula, por ejemplo, utilizando técnicas de hibridación fluorescente *in situ*, transferencia de tipo Southern o PCR. EGFR y/o c-Met se sobreespresan cuando el nivel de EGFR y/o c-Met en la superficie de la célula es al menos 1,5 veces mayor en comparación con la célula normal.

20 "Tencon", como se usa en el presente documento, se refiere al dominio de fibronectina sintética de tipo III (FN3) que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y se describe en la patente de Estados Unidos Publ. No. US2010/0216708.

25 Una "célula cancerosa" o una "célula tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula cancerosa, precancerosa o transformada, ya sea *in vivo*, *ex vivo* y en cultivo de tejidos, que presenta cambios fenotípicos espontáneos o inducidos que no necesariamente implican la captación de nuevo material genético. Aunque la transformación puede surgir de la infección con un virus transformante y la incorporación de un nuevo ácido nucleico genómico, o la captación de ácido nucleico exógeno, también puede surgir espontáneamente o
30 después de la exposición a un carcinógeno, mutando así un gen endógeno. La transformación/cáncer se ilustra mediante, por ejemplo, cambios morfológicos, inmortalización de células, control de crecimiento aberrante, formación de focos, proliferación, malignidad, niveles de marcadores específicos de tumores, invasividad, crecimiento o supresión de tumores en huéspedes animales adecuados, tales como ratones atímicos y similares, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3^a ed. 1994)).

35 El término "vector" significa un polinucleótido capaz de ser duplicado dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre tales sistemas. Los polinucleótidos vectoriales típicamente contienen elementos, tales como orígenes de replicación, señales de poliadenilación o marcadores de selección que funcionan para facilitar la duplicación o el mantenimiento de estos polinucleótidos en un sistema biológico. Los ejemplos de tales sistemas biológicos pueden
40 incluir una célula, virus, animal, planta y sistemas biológicos reconstituidos que utilizan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido que comprende un vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estos.

45 La expresión "vector de expresión" significa un vector que puede utilizarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos presente en el vector de expresión.

50 El término "polinucleótido" significa una molécula que comprende una cadena de nucleótidos unida covalentemente por un esqueleto de azúcar-fosfato u otra química covalente equivalente. Los ADN y ARN bicatenarios y monocatenarios son ejemplos típicos de polinucleótidos.

55 El término "polipéptido" o "proteína" significa una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Los polipéptidos pequeños de menos de aproximadamente 50 aminoácidos pueden denominarse "péptidos".

60 La expresión "molécula biespecífica de EGFR/c-Met" o "molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met FN3", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende un dominio FN3 de unión a EGFR y un dominio FN3 de unión a c-Met distinto que están unidos covalentemente ya sea directamente o a través de un enlazador. Una molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met de ejemplo comprende un primer dominio FN3 que se une específicamente a EGFR y un segundo dominio FN3 que se une específicamente a c-Met.

65 "Valente", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de un número específico de sitios de unión específicos para un antígeno en una molécula. Como tales, los términos "monovalente", "bivalente", "tetraivalente" y "hexaivalente" se refieren a la presencia de uno, dos, cuatro y seis sitios de unión, respectivamente, específicos para un antígeno en una molécula.

"Mezcla", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra o preparación de dos o más dominios FN3 que no están unidos covalentemente entre sí. Una mezcla puede consistir en dos o más dominios FN3 idénticos o dominios FN3 distintos.

5

Composiciones de la materia

En el presente documento se desvelan moléculas monoespecíficas y biespecíficas que contienen el dominio FN3 de unión a EGFR y/o c-Met. La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los dominios FN3 de la invención o ácidos nucleicos complementarios de los mismos, vectores, células huésped y métodos para hacerlos y usarlos.

10

Moléculas monoespecíficas de unión a EGFR

En el presente documento se desvelan los dominios de fibronectina de tipo III (FN3) que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquean la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) al EGFR, y por lo tanto, pueden usarse ampliamente en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los dominios FN3 de la invención o ácidos nucleicos complementarios de los mismos, vectores, células huésped y métodos para hacerlos y usarlos.

15

20

Los dominios FN3 de la invención se unen a EGFR con alta afinidad e inhiben la señalización de EGFR, y pueden proporcionar un beneficio en términos de especificidad y reducción de la toxicidad fuera del objetivo cuando se comparan con los inhibidores de EGFR de molécula pequeña, y mejoran la penetración en los tejidos cuando se comparan con las terapias convencionales con anticuerpos.

25

La invención también proporciona un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) al EGFR en el que el dominio FN3 se aísla de una biblioteca diseñada en base a la secuencia de aminoácidos Tencon de SEQ ID NO: 1 y en el que el dominio FN3 se aísla de una biblioteca diseñada en base a la secuencia de aminoácidos de Tencon de la SEQ ID NO: 1.

30

Los dominios FN3 de la invención en el presente documento descritos pueden bloquear la unión de EGF al EGFR con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente 1×10^{-7} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-8} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-9} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-10} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-11} M, o inferior a aproximadamente 1×10^{-12} M en un ensayo de competición que emplea células A431 y detecta la cantidad de fluorescencia del EGF biotinilado unido utilizando estreptavidina-ficoeritrina conjugada a 600 nM en las células A431 incubadas con o sin los dominios FN3 de la invención. Los dominios FN3 de ejemplo pueden bloquear la unión de EGF al EGFR con un valor CI_{50} entre aproximadamente 1×10^{-9} M y aproximadamente 1×10^{-7} M, tales como los dominios FN3 de unión a EGFR que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18-29, 107-110 o 122-137. Los dominios FN3 de la invención pueden bloquear la unión de EGF al EGFR en al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la unión de EGF al EGFR en ausencia de los dominios FN3 de la invención usando las mismas condiciones de ensayo.

35

40

El dominio FN3 de la invención descrito en el presente documento puede inhibir la señalización de EGFR en al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de señalización en ausencia de los dominios FN3 de la invención utilizando las mismas condiciones de ensayo.

45

50

La unión de un ligando, tal como EGF a EGFR, estimula la dimerización del receptor, la autofosforilación, la activación del dominio tirosina quinasa citoplasmático interno y el inicio de múltiples vías de transducción de señales y vías de transactivación involucradas en la regulación de la síntesis de ADN (activación del gen) y la progresión del ciclo celular o división. La inhibición de la señalización de EGFR puede dar como resultado inhibición en una o más vías de señalización de EGFR aguas abajo y, por lo tanto, neutralizar el EGFR puede tener varios efectos, incluida la inhibición de la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la motilidad celular y la metástasis.

55

La señalización de EGFR puede medirse utilizando varios métodos bien conocidos, por ejemplo midiendo la autofosforilación del receptor en cualquiera de las tirosinas Y1068, Y1148 y Y1173 (Downward et al., Nature 311:483-5, 1984) y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. La fosforilación se puede detectar utilizando métodos bien conocidos, como un ensayo ELISA o un gráfico Western utilizando un anticuerpo específico de fosfotirosina. Se pueden encontrar ensayos de ejemplo en Panek et al., J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997 y Batley et al., Life Sci 62:143-50, 1998, y los ensayos descritos en el presente documento.

60

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en la posición del residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M, por ejemplo, inferior a aproximadamente 1×10^{-6} M, inferior a aproximadamente $1 \times$

65

10-7 M, inferior a aproximadamente 1×10^{-8} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-9} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-10} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-11} M, o inferior a aproximadamente 1×10^{-12} M cuando se mide en células A431 usando 50 ng/ml de EGF humano.

5 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en la posición del residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} entre aproximadamente $1,8 \times 10^{-8}$ M y aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células A431 utilizando 50 ng/ml de EGF humano. Dichos dominios FN3 de ejemplo son aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18-29, 107-110 o 122-137.

10 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención se une al EGFR humano con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M, por ejemplo, menos de aproximadamente 1×10^{-9} M, menos de aproximadamente 1×10^{-10} M, menos de aproximadamente 1×10^{-11} M, menos de aproximadamente 1×10^{-12} M, o menos de aproximadamente 1×10^{-13} M según se determina mediante resonancia de plasmón superficial o el método Kinexa, tal como lo practican los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el dominio FN3 de la invención se une al EGFR humano con una K_D de aproximadamente 2×10^{-10} a aproximadamente 1×10^{-8} M. La afinidad de un dominio FN3 por EGFR puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992)); y procedimientos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción de antígeno-dominio FN3 particular puede variar si se mide en diferentes condiciones (por ejemplo, osmolaridad, pH). Por lo tanto, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_D , K_{on} , K_{off}) se preparan, preferentemente, con soluciones estandarizadas del armazón proteico y el antígeno, y un tampón estandarizado, tal como el tampón descrito en el presente documento.

25 Los dominios FN3 de ejemplo de la invención que se unen a EGFR incluyen los dominios FN3 de las SEQ ID NO: 18-29, 107-110 o 122-137.

30 El dominio FN3 que se une específicamente a EGFR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 que se une específicamente a EGFR comprende

35 un bucle FG que comprende la secuencia HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) o la secuencia LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), en la que X₉ es M o I; y un bucle BC que comprende la secuencia X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181):

en la que
 40 X₁ es A, T, G o D;
 X₂ es A, D, Y o W;
 X₃ es P, D o N;
 X₄ es L o está ausente;
 X₅ es D, H, R, G, Y o W;
 X₆ es G, D o A;
 45 X₇ es A, F, G, H o D; y
 X₈ es Y, F o L.

50 Los dominios FN3 de la invención que se unen específicamente a EGFR e inhiben la autofosforilación de EGFR como se describe en el presente documento pueden comprender como característica estructural un bucle FG que comprende la secuencia HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) o la secuencia LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180), en la que X₉ es M o I. Dichos dominios FN3 pueden comprender además un bucle BC de 8 o 9 aminoácidos de longitud y definido por la secuencia X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181), e inhibe la autofosforilación de EGFR con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M, o con un valor de CI_{50} de entre aproximadamente $1,8 \times 10^{-8}$ M a aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células A431 usando 50 ng/ml de EGF humano.

55 Los dominios FN3 de la invención que se unen específicamente a EGFR e inhiben la autofosforilación de EGFR como se describe en el presente documento, comprenden además la secuencia de

60 LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182), o la secuencia
 LPAPKNLWSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),
 en la que
 65 X₁ es A, T, G o D;
 X₂ es A, D, Y o W;
 X₃ es P, D o N;

X₄ es L o está ausente;
 X₅ es D, H, R, G, Y o W;
 X₆ es G, D o A;
 X₇ es A, F, G, H o D;
 X₈ es Y, F o L; y
 X₉ es M o I

5

10

Los dominios FN3 de unión a EGFR como se describen en el presente documento pueden generarse y analizarse para determinar su capacidad para inhibir la autofosforilación de EGFR usando métodos bien conocidos y métodos descritos en el presente documento.

La invención también proporciona un dominio FN3 aislado que se une específicamente a EGFR, en donde el dominio FN3 comprende la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137 o 194–211.

15

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, los dominios FN3 de unión a EGFR comprenden una metionina iniciadora (Met) unida al término N o una cisteína (Cys) unida a un extremo C de un dominio FN3 en particular, por ejemplo para facilitar la expresión y/o conjugación de moléculas que prolongan la semivida.

20

El dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado de la invención que se une específicamente a EGFR y bloquea la unión de EGF al EGFR, se aísla de una biblioteca diseñada en base a la secuencia Tencon de la SEQ ID NO: 1.

25

La invención también proporciona un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente a EGFR y bloquea la unión de EGF al EGFR, en el que el dominio FN3 se une a EGFR con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos D23, F27, Y28, V77 y G85 de P54AR4–83v2 (SEQ ID NO: 27).

30

Los residuos de aminoácidos que contribuyen a la unión del dominio FN3 a EGFR pueden identificarse utilizando métodos, tales como mutagénesis y evaluando los residuos de unión/superficie por estructura cristalina. Las sustituciones en los residuos D23, F27, Y28, V77, G85 en el dominio F54 de unión a EGFR P54AR4–83v2 (SEQ ID NO: 27) redujeron la unión de EGFR al dominio FN3 en más de 100 veces. Los dominios FN3 de unión a EGFR P54AR4–48, P54AR4–81, P53A1R5–17v2, P54AR4–83v22 y P54AR4–83v23 comparten estos residuos y se puede esperar que se unan a EGFR con los mismos residuos de paratopo que P54AR4–83v2. Se pueden crear otros dominios FN3 de unión a EGFR manteniendo constantes las posiciones D23, F27, Y28, V77, G85 mientras se cambian los aminoácidos ubicados en las otras posiciones de los bucles BC y FG (posiciones 24, 25, 75, 76, 78, 79), 80, 81, 82, 83, 84 y 86). Estos cambios se pueden realizar mediante el diseño de aminoácidos específicos en posiciones específicas o mediante la incorporación de estas posiciones en una biblioteca que reemplaza estos sitios con aminoácidos aleatorios. Los nuevos dominios FN3 diseñados de tal manera se pueden usar para detectar o seleccionar propiedades optimizadas, tales como la unión a EGFR, la solubilidad, la estabilidad, la inmunogenicidad o la semivida en suero.

40

Moléculas mono-específicas de unión a c-met

45

En el presente documento se desvelan los dominios de fibronectina de tipo III (FN3) que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y bloquean la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, y, por lo tanto, se pueden usar ampliamente en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los dominios FN3 de la invención o ácidos nucleicos complementarios de los mismos, vectores, células huésped y métodos para hacerlos y usarlos.

50

Los dominios FN3 de la invención en el presente documento descritos en el presente documento se unen a c-Met con alta afinidad e inhiben la señalización de c-Met, y pueden proporcionar un beneficio en términos de especificidad y toxicidad reducida fuera del objetivo cuando se comparan con los inhibidores de molécula pequeña de c-Met y mejor penetración tisular en comparación con la terapéutica convencional de anticuerpos. Los dominios FN3 de la invención son monovalentes, por lo tanto evitan la agrupación y activación de receptores no deseados que pueden producirse con otras moléculas bivalentes.

55

La invención también proporciona un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met.

60

Los dominios FN3 de la invención descritos en el presente documento pueden bloquear la unión de HGF a c-Met con un valor de CI₅₀ inferior a aproximadamente 1×10^{-7} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-8} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-9} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-10} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-11} M o inferior a aproximadamente 1×10^{-12} M en un ensayo que detecta la inhibición de la unión del HGF biotinilado a la proteína de fusión c-Met–Fc en la presencia de los dominios FN3 de la invención. Los dominios FN3 de ejemplo pueden bloquear la unión de HGF a c-Met con un valor de CI₅₀ entre aproximadamente 2×10^{-10} M a aproximadamente 6×10^{-8} M. Los dominios FN3 de la invención pueden bloquear la unión de HGF a c-Met al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %.

65

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la unión de HGF a c-Met en ausencia de los dominios FN3 de la invención usando las mismas condiciones de ensayo.

5 El dominio FN3 de la invención descrito en el presente documento puede inhibir la señalización de c-Met en al menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de señalización en ausencia de dominios FN3 de la invención utilizando las mismas condiciones de ensayo.

10 La unión de HGF a c-Met estimula la dimerización del receptor, la autofosforilación, la activación del dominio tirosina quinasa citoplasmático interno y el inicio de múltiples vías de transducción y transactivación de señales implicadas en la regulación de la síntesis de ADN (activación génica) y la progresión o división del ciclo celular. La inhibición de la señalización de c-Met puede dar como resultado la inhibición de una o más vías de señalización de c-Met aguas abajo y, por lo tanto, la neutralización de c-Met puede tener varios efectos, incluida la inhibición de la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la motilidad celular y la metástasis.

15 La señalización de c-Met se puede medir utilizando varios métodos bien conocidos, por ejemplo midiendo la autofosforilación del receptor en al menos un residuo de tirosina Y1230, Y1234, Y1235 o Y1349, y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. La fosforilación se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo específico para la fosfotirosina en un ensayo ELISA o ensayos de transferencia de tipo Western para determinar la actividad tirosina quinasa (Panek et al., J Pharmacol Exp Thera 283:1433-44, 1997; Batley et al., Life Sci 62:143-50, 1998), y los ensayos descritos en el presente documento.

25 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en la posición 1349 del residuo c-Met con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente 1×10^{-6} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-7} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-8} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-9} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-10} M, inferior a aproximadamente 1×10^{-11} M, o inferior a aproximadamente 1×10^{-12} M cuando se mide en células NCI-H441 utilizando 100 ng/ml de HGF humano recombinante.

30 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en la tirosina Y1349 de c-Met con un valor de CI_{50} entre aproximadamente 4×10^{-9} M y aproximadamente 1×10^{-6} M cuando se mide en células NCI-H441 usando 100 ng/ml de HGF humano recombinante.

35 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención se une al c-Met humano con una constante de disociación (K_D) igual o inferior a aproximadamente 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, o 1×10^{-15} M según se determina mediante resonancia de plasmón superficial o el método Kinexa, tal como lo practican los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el dominio FN3 de la invención se une a c-Met humano con una K_D de aproximadamente 3×10^{-10} a
40 aproximadamente 5×10^{-8} M. La afinidad de un dominio FN3 por c-Met puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992)); y procedimientos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción de antígeno-dominio FN3 particular puede variar si se mide en diferentes condiciones
45 (por ejemplo, osmolaridad, pH). Por lo tanto, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_D , K_{on} , K_{off}) se preparan, preferentemente, con soluciones estandarizadas del armazón proteico y el antígeno, y un tampón estandarizado, tal como el tampón descrito en el presente documento.

50 Los dominios FN3 de ejemplo de la invención que se unen a c-Met incluyen dominios FN3 que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 32-49, 111-114 o 212-223.

55 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met comprende

60 una cadena C y un bucle CD que comprende la secuencia DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), en la que
X₁₀ es W, F o V;
X₁₁ es D, F o L;
X₁₂ es V, F o L;
X₁₃ es V, L o T;
65 X₁₄ es V, R, G, L, T o S;
X₁₅ es G, S, A, T o K; y

X₁₆ es E o D; y

una cadena F y un bucle FG que comprende la secuencia TEYX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), en la que

- 5 X₁₇ es Y, W, I, V, G o A;
 X₁₈ es N, T, Q o G;
 X₁₉ es L, M, N o I;
 X₂₀ es G o S;
 X₂₁ es S, L, G, Y, T, R, H o K;
 10 X₂₂ es I, V o L; y
 X₂₃ es V, T, H, I, P, Y o L.

Los dominios FN3 de la invención que se unen específicamente a c-Met e inhiben la autofosforilación de c-Met descrita en el presente documento comprenden además la secuencia: LPAPKLNLSRVTEDSARLSWTAPDAAF
 15 DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ AIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYX₁₁VX₁₈X₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186), en la que:

- 20 X₁₀ es W, F o V; y
 X₁₁ es D, F o L;
 X₁₂ es V, F o L;
 X₁₃ es V, L o T;
 X₁₄ es V, R, G, L, T o S;
 X₁₅ es G, S, A, T o K;
 25 X₁₆ es E o D;
 X₁₇ es Y, W, I, V, G o A;
 X₁₈ es N, T, Q o G;
 X₁₉ es L, M, N o I;
 X₂₀ es G o S;
 30 X₂₁ es S, L, G, Y, T, R, H o K;
 X₂₂ es I, V o L; y
 X₂₃ es V, T, H, I, P, Y o L.

35 La invención también proporciona un dominio FN3 aislado que se une específicamente a c-Met, en el que el dominio FN3 comprende la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 32-49 o 111-114.

En el presente documento se desvela un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente a c-Met y bloquea la unión de HGF al c-Met, en el que el dominio FN3 se aísla de una biblioteca diseñada en base a la secuencia Tencon de la SEQ ID NO: 1.

La invención también proporciona un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente a c-Met y bloquea la unión de HGF a c-Met, en el que el dominio FN3 se une a c-Met con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos R34, F38, M72 y 179 en P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

45 Los residuos de aminoácidos que contribuyen a la unión del dominio FN3 a c-Met pueden identificarse utilizando métodos, tales como mutagénesis y evaluando los residuos de unión/superficie por estructura cristalina. Las sustituciones en los residuos R34S, F38S, M72S e I79S en el dominio FN3 de unión a c-Met P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 27) redujeron la unión de c-Met al dominio FN3 en más de 100 veces. Las moléculas de los dominios FN3 de unión a c-Met P114AR7P92-F3, P114AR7P95-D3, P114AR7P95-F10 and P114AR7P95-H8 comparten estos residuos y se puede esperar que se unen a c-Met con los mismos residuos de paratopo que P114AR7P95-A3. Se pueden crear otros dominios FN3 de unión a c-Met manteniendo las posiciones R34S, F38S, M72S e I79S constantes mientras se cambian los aminoácidos ubicados en las otras posiciones de la cadena C, la cadena F, el bucle CD y/o los bucles FG (posiciones 32, 36, 39, 40, 68, 70, 78 y 81). Estos cambios se pueden realizar mediante el diseño de aminoácidos específicos en posiciones específicas o mediante la incorporación de estas posiciones en una biblioteca que reemplaza estos sitios con aminoácidos aleatorios. Los nuevos dominios FN3 diseñados de tal manera se pueden usar para detectar o seleccionar propiedades optimizadas, tales como la unión de c-Met, la solubilidad, la estabilidad, la inmunogenicidad o la semivida en suero.

60 **Aislamiento de los dominios FN3 de unión a EGFR o c-Met de una biblioteca basada en la secuencia de Tencon**

Tencon (SEQ ID NO: 1) es un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) no natural diseñado a partir de una secuencia de consenso de quince dominios FN3 de tenascina-C humana (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; patente de Estados Unidos Publ. N.º 2010/0216708). La estructura cristalina de Tencon muestra seis bucles expuestos en la superficie que conectan siete cadenas beta características de los

dominios FN3, denominadas las cadenas beta A, B, C, D, E, F y G, y los bucles denominados AB, BC, CD, DE, EF y FG (Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990–8992, 1992; patentes de Estados Unidos N.º 6.673.901). Estos bucles, o residuos seleccionados dentro de cada bucle, se pueden aleatorizar para construir bibliotecas de dominios de fibronectina de tipo III (FN3) que pueden usarse para seleccionar nuevas moléculas que se unen a EGFR o c-Met. La Tabla 1 muestra las posiciones y secuencias de cada bucle y cadena beta en Tencon (SEQ ID NO: 1).

La biblioteca diseñada en función de la secuencia de Tencon puede, por tanto, tener un bucle FG aleatorio o bucles BC y FG aleatorios, tales como las bibliotecas TCL1 o TCL2, como se describe a continuación. El bucle Tencon BC tiene una longitud de 7 aminoácidos, por lo tanto, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos pueden ser aleatorizados en la biblioteca diversificada en el bucle BC y diseñados en base a la secuencia de Tencon. El bucle Tencon FG tiene una longitud de 7 aminoácidos, por lo tanto, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos pueden ser aleatorizados en la biblioteca diversificada en el bucle FG y diseñados en base a la secuencia de Tencon. La diversidad adicional en los bucles en las bibliotecas de Tencon se puede lograr mediante la inserción y/o deleción de residuos en los bucles. Por ejemplo, los bucles FG y/o BC pueden extenderse en 1-22 aminoácidos, o disminuirse en 1-3 aminoácidos. El bucle FG en Tencon tiene una longitud de 7 aminoácidos, mientras que el bucle correspondiente en las cadenas pesadas de anticuerpos varía de 4 a 28 residuos. Para proporcionar la máxima diversidad, el bucle de FG se puede diversificar en secuencia y en longitud para corresponder al rango de longitud del anticuerpo CDR3 de 4-28 residuos. Por ejemplo, el bucle FG se puede diversificar aún más en longitud extendiendo el bucle en 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos adicionales.

La biblioteca diseñada en base a la secuencia de Tencon también puede tener superficies alternativas aleatorias que se forman en un lado del dominio FN3 y comprenden dos o más cadenas beta, y al menos un bucle. Una de estas superficies alternativas está formada por aminoácidos en las cadenas beta y C, y en los bucles CD y FG (una superficie C–CD–F–FG). Un diseño de biblioteca basado en la superficie C–CD–F–FG de Tencon alternativa que se muestra en la Figura 1 y la generación detallada de dichas bibliotecas se describe en la patente de Estados Unidos Publ. N.º US2013/0226834. La biblioteca diseñada con base en la secuencia de Tencon también incluye bibliotecas diseñadas con base en las variantes de Tencon, tales como las variantes de Tencon que tienen sustituciones en las posiciones de residuos 11, 14, 17, 37, 46, 73 o 86 (numeración de residuos correspondiente a la SEQ ID NO: 1), y cuyas variantes muestran mejor estabilidad térmica. Variantes de ejemplo de Tencon se describen en la patente de Estados Unidos Publ. N.º 2011/0274623, e incluyen Tencon27 (SEQ ID NO: 99) que tienen las sustituciones E11R, L17A, N46V y E86I en comparación con Tencon de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 1.

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

Tencon y otras bibliotecas basadas en la secuencia de FN3 se pueden aleatorizar en las posiciones de residuos seleccionadas utilizando un conjunto aleatorio o definido de aminoácidos. Por ejemplo, las variantes en la biblioteca que tienen sustituciones aleatorias pueden generarse usando los codones NNK, que codifican los 20 aminoácidos naturales. En otros esquemas de diversificación, los codones DVK se pueden usar para codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys. Como alternativa, los codones NNS pueden usarse para dar lugar a los 20 residuos de aminoácidos y al mismo tiempo reducir la frecuencia de los codones de terminación. Las bibliotecas de dominios FN3 con distribución de aminoácidos sesgada en las posiciones a diversificar se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando la tecnología Slonomics® (<http://www.sloning.com>). Esta tecnología utiliza una biblioteca de tripletes bicatenarios prefabricados que actúan como bloques componente universales suficientes para miles de procesos de síntesis de genes. La biblioteca de tripletes representa todas las

posibles combinaciones de secuencias necesarias para construir cualquier molécula de ADN deseada. Las designaciones de codones son de acuerdo con el código IUB bien conocido.

5 Los dominios FN3 que se unen específicamente a EGFR o c-Met de la invención como se describe en el presente documento se pueden aislar produciendo la biblioteca FN3 tal como la biblioteca Tencon usando la expresión en *cis* para ligar fragmentos de ADN que codifican las proteínas de armazón a un fragmento de ADN que codifica RepA para generar un conjunto de complejos de proteína-ADN formados después de la traducción *in vitro*, en el que cada proteína está asociada de manera estable con el ADN que la codifica (patentes de Estados Unidos No. 7.842.476; Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2806–2810, 2004), y analizando la biblioteca para detectar unión específica a EGFR y/o c-Met mediante cualquier método conocido en la técnica y descrito en el Ejemplo. Ejemplos de métodos bien conocidos que pueden usarse son ELISA, inmunoensayos en sándwich y ensayos competitivos y no competitivos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Los dominios FN3 identificados que se unen específicamente a EGFR o c-Met se caracterizan además por su capacidad para bloquear el ligando de EGFR, tal como la unión de EGF a EGFR, o la unión de HGF a c-Met, y por su capacidad para inhibir la señalización de EGFR y/o c-Met utilizando los métodos descritos en el presente documento.

20 Los dominios FN3 que se unen específicamente a EGFR o c-Met de la invención como se describe en el presente documento pueden generarse usando cualquier dominio FN3 como molde para generar una biblioteca y cribar la biblioteca en busca de moléculas que se unan específicamente a EGFR o c-Met usando los métodos proporcionados en el mismo. Los dominios FN3 de ejemplo que se pueden usar son el tercer dominio FN3 de tenascina C (TN3) (SEQ ID NO: 75), Fibcon (SEQ ID NO: 76) y el décimo dominio FN3 de la fibronectina (FN10) (SEQ ID NO: 77). Se utilizan técnicas estándar de clonación y expresión para clonar las bibliotecas en un vector o sintetizar casetes de ADN bicatenario de la biblioteca, para expresar o traducir las bibliotecas *in vitro*. Por ejemplo, se pueden usar expresión en ribosomas (Hanes y Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937–4942, 1997), expresión de ARNm (Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297–12302, 1997), u otros sistemas acelulares (patente de Estados Unidos n.º 5.643.768). Las bibliotecas de las variantes del dominio FN3 pueden expresarse como proteínas de fusión mostradas en la superficie, por ejemplo, de cualquier bacteriófago adecuado. Los métodos para presentar polipéptidos de fusión en la superficie de un bacteriófago son bien conocidos (publ. de patente de Estados Unidos N.º 2011/0118144; publ. de patente de Estados Unidos N.º WO2009/085462; patente de Estados Unidos N.º 6.969.108; patente de Estados Unidos N.º 6.172.197; patente de Estados Unidos N.º 5.223.409; patente de Estados Unidos N.º 6.582.915; patente de Estados Unidos N.º 6.472.147).

35 Los dominios FN3 que se unen específicamente a EGFR o c-Met de la invención como se describe en el presente documento pueden modificarse para mejorar sus propiedades, tales como mejorar la estabilidad térmica y la reversibilidad del plegamiento y desplegamiento térmico. Se han aplicado varios métodos para aumentar la estabilidad térmica aparente de las proteínas y las enzimas, incluido el diseño racional basado en la comparación con secuencias termoestables muy similares, el diseño de puentes disulfuro estabilizantes, las mutaciones para aumentar la propensión a la hélice alfa, la ingeniería de puentes salinos, la alteración del carga superficial de la proteína, la evolución dirigida y la composición de las secuencias de consenso (Lehmann y Wyss, Curr Opin Biotechnol, 12, 371–375, 2001) La alta estabilidad térmica puede aumentar el rendimiento de la proteína expresada, mejorar la solubilidad o la actividad, disminuir la inmunogenicidad y minimizar la necesidad de una cadena de frío en la fabricación. Los residuos que pueden ser sustituidos para mejorar la estabilidad térmica de Tencon (SEQ ID NO: 1) son las posiciones de residuos 11, 14, 17, 37, 46, 73 u 86, y se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2011/0274623. Las sustituciones correspondientes a estos residuos pueden incorporarse en los dominios FN3 o a las moléculas biespecíficas que contienen dominios FN3 de la invención.

50 La invención también proporciona un dominio FN3 aislado que se une específicamente a EGFR y bloquea la unión de EGF a EGFR, que comprende la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137, que comprende además sustituciones en una o más posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 en Tencon (SEQ ID NO: 1).

55 La invención también proporciona un dominio FN3 aislado que se une específicamente a c-Met y bloquea la unión de HGF a c-Met, que comprende la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 32–49 o 111–114, que comprende además sustituciones en una o más posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 en Tencon (SEQ ID NO: 1).

60 Las sustituciones de ejemplo son las sustituciones E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y y E86I (numeración de acuerdo con la SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, los dominios FN3 de la invención comprenden sustituciones correspondientes a las sustituciones L17A, N46V y E86I en Tencon (SEQ ID NO: 1).

65 Los dominios FN3 que se unen específicamente a EGFR como se describe en el presente documento (Figura 1) tienen un bucle FG extendido cuando se comparan con Tencon (SEQ ID NO: 1). Por lo tanto, los residuos correspondientes a los residuos 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 en Tencon (SEQ ID NO: 1) son los residuos 11, 14, 17,

37, 46, 73 y 91 en los dominios FN3 del EGFR que se muestran en la Figura 1A y 1B, excepto el dominio FN3 de la SEQ ID NO: 24, en el que los residuos correspondientes son residuos 11, 14, 17, 38, 74 y 92 debido a una inserción de un aminoácido en el bucle BC.

5 La invención también proporciona un dominio FN3 aislado que se une específicamente a EGFR y bloquea la unión de EGF a EGFR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137 o 194–211, teniendo opcionalmente una, dos o tres sustituciones correspondientes a las sustituciones L17A, N46V y E86I en Tencon (SEQ ID NO: 1).

10 La invención también proporciona un dominio FN3 aislado que se une específicamente a c-Met y bloquea la unión de HGF a c-Met que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 32–49, 111–114 o 212–223, que tienen opcionalmente una, dos o tres sustituciones correspondientes a las sustituciones L17A, N46V y E86I en Tencon (SEQ ID NO: 1).

15 La medición de la estabilidad proteica y la labilidad proteica se pueden ver como aspectos iguales o diferentes de la integridad de las proteínas. Las proteínas son sensibles o "lábil" a la desnaturalización causada por calor, por radiación ultravioleta o ionizante, cambios en la osmolaridad ambiental y el pH si están en solución líquida, fuerza de corte mecánica impuesta por filtración en tamaño de poro pequeño, radiación ultravioleta, radiación ionizante, tal como por irradiación gamma, deshidratación química o por calor, o cualquier otra acción o fuerza que pueda causar la alteración de la estructura de la proteína. La estabilidad de la molécula se puede determinar utilizando métodos estándar. Por ejemplo, la estabilidad de una molécula puede determinarse midiendo la temperatura de fusión térmica ("TF"), la temperatura en grados Celsius (°C) a la que se despliega la mitad de las moléculas, utilizando métodos estándar. Normalmente, cuanto más alta es la TF, más estable es la molécula. Además del calor, el entorno químico también cambia la capacidad de la proteína para mantener una estructura tridimensional particular.

25 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, los dominios FN3 que se unen a EGFR o c-Met de la invención exhiben estabilidad aumentada en al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % o más en comparación con el mismo dominio antes de la ingeniería medida por el aumento en la TF.

30 La desnaturalización química también se puede medir mediante diversos métodos. Los desnaturalizantes químicos incluyen clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, urea, acetona, disolventes orgánicos (DMF, benceno, acetonitrilo), sales (sulfato de amonio, bromuro de litio, cloruro de litio, bromuro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de sodio); agentes reductores (por ejemplo, ditiotreitól, beta-mercaptoetanol, dinitrotiobenceno e hidruros, tales como borohidruro de sodio), detergentes no iónicos e iónicos, ácidos (por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl), ácido acético (CH₃COOH), ácidos acéticos halogenados), moléculas hidrofóbicas (por ejemplo, fosfolípidos), y desnaturalizantes dirigidos. La cuantificación de la extensión de la desnaturalización puede depender de la pérdida de una propiedad funcional, tal como la capacidad para unirse a una molécula diana, o mediante propiedades fisicoquímicas, tal como la tendencia a la agregación, exposición de los residuos de disolvente antes inaccesibles o la rotura o formación de puentes disulfuro.

45 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio FN3 de la invención que se une a EGFR o c-Met exhibe estabilidad aumentada en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% o más en comparación con el mismo armazón antes de la ingeniería, medido utilizando clorhidrato de guanidinio como producto químico desnaturalizante. El aumento de la estabilidad se puede medir en función de la disminución de la fluorescencia del triptófano en el tratamiento con concentraciones crecientes de clorhidrato de guanidina utilizando métodos bien conocidos.

50 Los dominios FN3 de la invención en el presente documento descritos pueden generarse como monómeros, dímeros o multímeros, por ejemplo, como un medio para aumentar la valencia y, por lo tanto, la avidéz de la unión de la molécula diana, o para generar armazones biespecíficos o multiespecíficos que unen simultáneamente dos o más moléculas diana diferentes. Los dímeros y multímeros pueden generarse mediante la unión de armazones proteicos mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos, por ejemplo, mediante la inclusión de un enlazador de aminoácidos, por ejemplo, un enlazador que contiene poliglicina, glicina y serina, o alanina y prolina. El enlazador de ejemplo incluye (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 224), (GGGGS)₅ (SEQ ID NO: 79), (AP)₂ (SEQ ID NO: 80), (AP)₅ (SEQ ID NO: 81), (AP)₁₀ (SEQ ID NO: 82), (AP)₂₀ (SEQ ID NO: 83) y A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84). Los dímeros y multímeros se pueden unir unos a otros en una dirección N a C. El uso de enlazadores peptídicos artificiales y de origen natural para conectar polipéptidos a nuevos polipéptidos de fusión unidos es bien conocido en la literatura (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260–5268, 1989; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725–731, 1995; Robinson y Sauer, Biochemistry 35, 109–116, 1996; patente de Estados Unidos n.º 5.856.456).

Moléculas biespecíficas de unión a EGFR/c-Met

65 Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención descritas en el presente documento pueden proporcionar un beneficio en términos de especificidad y toxicidad reducida fuera del objetivo cuando se comparan con los inhibidores de EGFR de molécula pequeña, y mejoran la penetración en los tejidos

- cuando se comparan con los tratamientos terapéuticos convencionales con anticuerpos. La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención proporcionan un efecto inhibitorio sinérgico significativamente mejorado cuando se comparan con una mezcla de dominios de unión a EGFR y de unión a c-Met. Las moléculas pueden adaptarse a una afinidad específica hacia EGFR y c-Met para maximizar la penetración y retención del tumor. Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de unión a EGFR/c-Met proporcionan una inhibición más eficiente de las vías de señalización de EGFR y/o c-Met e inhiben el crecimiento tumoral más eficazmente que el cetuximab (Eribtux®)
- La invención también proporciona una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 aislada que comprende un primer dominio de fibronectina de tipo III (FN3) y un segundo dominio FN3, en el que el primer dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a EGFR, y el segundo dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, y en el que el primer dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 87 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y el segundo dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.
- Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención descritas en el presente documento pueden generarse uniéndose covalentemente cualquier dominio FN3 de unión a EGFR y cualquier dominio FN3 de unión a c-Met de la invención directamente o mediante un enlazador. Por lo tanto, el primer dominio FN3 de la molécula biespecífica puede tener las características descritas anteriormente para los dominios FN3 de unión a EGFR, y el segundo dominio FN3 de la molécula biespecífica puede tener las características descritas anteriormente para los dominios FN3 de unión a c-Met.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el primer dominio FN3 de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en el residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células A431 usando 50 ng/ml de EGF humano, y el segundo dominio FN3 de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en el residuo de c-Met Tirosina 1349 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $1,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células NCI-H441 utilizando 100 ng/ml de HGF humano.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el primer dominio FN3 de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en el residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} de entre aproximadamente $1,8 \times 10^{-8}$ M y aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células NCI-H292 usando 50 ng/ml de EGF humano, y el segundo dominio FN3 de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en el residuo de c-Met Tirosina 1349 con un valor de CI_{50} entre aproximadamente 4×10^{-9} M y aproximadamente $1,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células NCI-H441 utilizando 100 ng/ml de HGF humano.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el primer dominio FN3 de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met se une al EGFR humano con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M, y el segundo dominio FN3 de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met se une a c-Met humano con una K_D de menos de aproximadamente 5×10^{-8} M.
- En la molécula biespecífica de unión a EGFR y c-Met como se describe en el presente documento, el primer dominio FN3 se une a EGFR humano con una K_D de entre aproximadamente 2×10^{-10} a aproximadamente 1×10^{-8} M, y el segundo dominio FN3 se une a c-Met con una K_D de entre aproximadamente 3×10^{-10} a aproximadamente 5×10^{-8} M.
- La afinidad de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met por EGFR y c-Met se puede determinar como se describe en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 5 para las moléculas mono-específicas.
- El primer dominio FN3 en la molécula biespecífica de EGFR/c-Met de la invención puede bloquear la unión de EGF a EGFR con un valor de CI_{50} de entre aproximadamente 1×10^{-9} M y aproximadamente $1,5 \times 10^{-7}$ M en un ensayo que emplea células A431 y la detección de la cantidad de fluorescencia del EGF biotinilado unido utilizando el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina a 600 nM en células A431 incubadas con o sin el primer dominio FN3. El primer dominio FN3 en la molécula biespecífica de EGFR/c-Met de la invención puede bloquear la unión de EGF al EGFR en al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la unión de EGF a EGFR en ausencia de los primeros dominios FN3 usando las mismas condiciones de ensayo.
- El segundo dominio FN3 en la molécula biespecífica de EGFR/c-Met de la invención puede bloquear la unión de HGF a c-Met con un valor de CI_{50} de entre aproximadamente 2×10^{-10} M y aproximadamente 6×10^{-8} M en un ensayo que detecta inhibición de la unión del HGF biotinilado a la proteína de fusión c-Met-Fc en presencia del

segundo dominio FN3. El segundo dominio FN3 en la molécula biespecífica de EGFR/c-Met puede bloquear la unión de HGF a c-Met en al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la unión de HGF a c-Met en ausencia del segundo dominio FN3 usando las mismas condiciones de ensayo.

5 La molécula biespecífica de EGFR/c-Met de la invención descrita en el presente documento puede inhibir la señalización de EGFR y/o c-Met en al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con el nivel de señalización en ausencia de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met de la invención usando las mismas condiciones de ensayo.

La señalización de EGFR y c-Met se puede medir utilizando varios métodos bien conocidos como se ha descrito anteriormente para las moléculas mono-específicas.

15 Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met de la invención como se describen en el presente documento que comprenden el primer dominio FN3 que se une específicamente a EGFR y el segundo dominio FN3 que se une específicamente a c-Met proporcionan una inhibición sinérgica significativamente aumentada de la señalización de EGFR y c-Met y la proliferación de células tumorales en comparación con la inhibición sinérgica observada por una mezcla del primer y segundo dominio FN3. La inhibición sinérgica puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la inhibición de la fosforilación de ERK por las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met y por una mezcla de dos moléculas mono-específicas, una que se une a EGFR y la otra a c-Met. Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met de la invención pueden inhibir la fosforilación de ERK con un valor de CI_{50} al menos aproximadamente 100 veces más pequeño, por ejemplo, al menos 500, 1000, 5000 o 10,000 veces menor en comparación con el valor de CI_{50} para una mezcla de dos dominios FN3 mono-específicos, lo que indica al menos 100 veces más potencia para las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met cuando se comparan con la mezcla de dos dominios FN3 mono-específicos. Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR-c-Met pueden inhibir la fosforilación de ERK con un valor de CI_{50} de aproximadamente 5×10^{-9} M o menos. La fosforilación de ERK se puede medir usando métodos estándar y métodos descritos en el presente documento.

30 La molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención como se describe en el presente documento puede inhibir la proliferación de células H292 con un valor de CI_{50} que es al menos 30 veces menor cuando se compara con el valor de CI_{50} de inhibición del crecimiento de células H292 con una mezcla del primer dominio FN3 y el segundo FN3, en el que la proliferación celular se induce con medio que contiene FBS al 10 % suplementado con 7,5 ng/ml de HGF. La molécula biespecífica de la invención como se describe en el presente documento puede inhibir la proliferación de células tumorales con un valor de CI_{50} que es aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o aproximadamente 1000 veces menor que el valor de la CI_{50} de inhibición de la proliferación de células tumorales con una mezcla del primer dominio FN3 y el segundo dominio FN3. La inhibición de la proliferación de células tumorales puede medirse utilizando métodos estándar y métodos descritos en el presente documento.

45 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met se une a EGFR con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos D23, F27, Y28, V77 y G85 de P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27).

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met se une a c-Met con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos R34, F38, M72 y 179 en P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41).

50 Los residuos de paratopo en las moléculas biespecíficas se pueden identificar mediante estudios de mutagénesis o a partir de estructuras de cocristales del dominio FN3 y se pueden emplear estudios de mutagénesis de EGFR o c-Met, por ejemplo, mediante el uso de barrido de alanina, y las variantes resultantes se pueden analizar para determinar su unión a EGFR o c-Met utilizando métodos estándar. Típicamente, los residuos de paratopo son aquellos residuos que, cuando se mutagenizan, dan como resultado variantes con una unión reducida o abolida a EGFR o c-Met. Los dominios FN3 de unión a EGFR con sustituciones en las posiciones de residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos D23, F27, Y28, V77 y G85 de P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), cuando están sustituidos, reducen la unión al EGFR al menos 100 veces en comparación con el P54AR4-83v2 de tipo salvaje. Las moléculas biespecíficas ECB1, ECB2, ECB3, ECB4, ECB5, ECB6, ECB7, ECB15, ECB17, ECB60, ECB37, ECB94, ECB95, ECB96, ECB97, ECB91, ECB18, ECB28, ECB38, ECB39, ECB168 y ECB176 tienen D, F, Y, V y G en las posiciones de los residuos correspondientes a los residuos D23, F27, Y28, V77 y G85 de P54AR4-83v2 y se espera que se unan a EGFR con estos residuos. Los dominios FN3 de unión a c-Met con sustituciones en las posiciones de residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos R34, F38, M72 e I79 de P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41), cuando están sustituidos, eliminan o reducen la unión a c-Met al menos 100 veces en comparación con el P114AR7P95-A3 de tipo salvaje. Las moléculas biespecíficas ECB2, ECB5, ECB15, ECB60, ECB38 y ECB39 tienen R, F, M e I en las posiciones de residuos correspondientes a los residuos R34, F38, M72 y I79 de P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41) y se espera que se unan a c-Met con estos residuos.

La invención también proporciona una molécula biespecífica que contiene el dominio FN300000000000000000 que comprende un primer dominio de fibronectina de tipo III (FN3) y un segundo dominio FN3, en el que el primer dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a EGFR, y el segundo dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met), y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, en el que

el primer dominio FN3 comprende

un bucle FG que comprende la secuencia HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) o la secuencia LGSYVFEHDVML (SEQ ID NO: 180), en la que X₉ es M o I; y

un bucle BC que comprende la secuencia X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181), en la que

X₁ es A, T, G o D;

X₂ es A, D, Y o W;

X₃ es P, D o N;

X₄ es L o está ausente;

X₅ es D, H, P, G, Y o W;

X₆ es G, D o A;

X₇ es A, F, G, H o D; y

X₈ es Y, F o L; y

el segundo dominio FN3 comprende

una cadena C y un bucle CD que comprende la secuencia DSFX₁₀TRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), en la que

X₁₀ es W, F o V;

X₁₁ es D, F o L;

X₁₂ es V, F o L;

X₁₃ es V, L o T;

X₁₄ es V, R, G, L, T o S;

X₁₅ es G, S, A, T o K; y

X₁₆ es E o D; y

una cadena F y un bucle FG que comprende la secuencia TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀V KGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), en la que

X₁₇ es Y, W, I, V, G o A;

X₁₈ es N, T, Q o G;

X₁₉ es L, M, N o I;

X₂₀ es G o S;

X₂₁ es S, L, G, Y, T, R, H o K;

X₂₂ es I, V o L; y

X₂₃ es V, T, H, I, P, Y o L.

En algunas otras realizaciones descritas en el presente documento, la molécula biespecífica comprende el primer dominio FN3 que se une a EGFR que comprende la secuencia:

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182), o la secuencia

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈

DSFLIQYQESEKVGAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV LGSYVFEHDVMLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

en la que en las SEQ ID NO: 182 y 183;

X₁ es A, T, G o D;

X₂ es A, D, Y o W;

X₃ es P, D o N;

X₄ es L o está ausente;

X₅ es D, H, R, G, Y o W;

X₆ es G, D o A;

X₇ es A, F, G, H o D;

X₈ es Y, F o L; y

X₉ es M o I.

En algunas otras realizaciones descritas en el presente documento, la molécula biespecífica comprende el segundo dominio FN3 que comprende c-Met LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFX₁₀IRYX₁₁E X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),

en la que:

- 5 X₁₀ es W, F o V; y
 X₁₁ es D, F o L;
 X₁₂ es V, F o L;
 X₁₃ es V, L o T;
 X₁₄ es V, R, G, L, T o S;
 X₁₅ es G, S, A, T o K;
 X₁₆ es E o D;
 10 X₁₇ es Y, W, I, V, G o A;
 X₁₈ es N, T, Q o G;
 X₁₉ es L, M, N o I;
 X₂₀ es G o S;
 X₂₁ es S, L, G, Y, T, R, H o K;
 15 X₂₂ es I, V o L; y
 X₂₃ es V, T, H, I, P, Y o L.

Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met FN3 a modo de ejemplo comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 50–72, 106, 118–121, 138–165, 170–178 o 190–193.

20 Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met de la invención como se describen en el presente documento comprenden ciertas características estructurales asociadas con sus características funcionales, tales como la inhibición de la autofosforilación de EGFR, tal como el bucle FG del primer dominio FN3 que se une a EGFR que comprende la secuencia HNVYKDTNX₉RGL (SEQ ID NO: 179) o la secuencia LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180),
 25 en la que X₉ es M o I.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención

30 inhiben la fosforilación de EGFR inducida por EGF en los residuos de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI₅₀ inferior a aproximadamente 8×10^{-7} M cuando se mide en células H292 utilizando 50 ng/ml de EGF humano; inhiben la fosforilación de c-Met inducida por HGF en el residuo de c-Met Tirosina 1349 con un valor de CI₅₀ inferior a aproximadamente $8,4 \times 10^{-7}$ M cuando se mide en células NCI – H441 usando 100 ng/ml de HGF humano;
 35 inhiben la proliferación de células NCI-H292 inducida por HGF con un valor de CI₅₀ inferior a aproximadamente $9,5 \times 10^{-6}$ M, en el que la proliferación celular se induce con un 10 % de FBS que contiene 7,5 ng de HGF; se unen a EGFR con una K_D de menos de aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M; o se unen a c-Met con una K_D de menos de aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M; en el que la K_D se mide utilizando resonancia de plasmón superficial como se describe en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 5.

40 En otra realización, las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención inhiben la fosforilación de EGFR inducida por EGF en los residuos de EGFR Tirosina 1173 con una CI₅₀ entre aproximadamente $4,2 \times 10^{-9}$ M y 8×10^{-7} M cuando se mide en células H292 utilizando 50 ng/ml de EGF humano;
 45 inhiben la fosforilación de c-Met inducida por HGF en los residuos de c-Met Tirosina 1349 con un valor de CI₅₀ entre aproximadamente $2,4 \times 10^{-8}$ M y aproximadamente $8,4 \times 10^{-7}$ M cuando se mide en células NCI – H441 usando 100 ng/ml de HGF humano; inhiben la proliferación de células NCI-H292 inducida por HGF con un valor de CI₅₀ entre aproximadamente $2,3 \times 10^{-8}$ M y aproximadamente $9,5 \times 10^{-6}$ M, en el que la proliferación celular se induce con un 10 % de FBS que contiene 7,5 ng de HGF;
 50 se unen a EGFR con una K_D de entre aproximadamente 2×10^{-10} M y aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M; o se unen a c-Met con una K_D entre aproximadamente 1×10^{-9} M y aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M; en el que la K_D se mide utilizando resonancia de plasmón superficial como se describe en el Ejemplo 3 o el Ejemplo 5.

55 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met comprenden el dominio FN3 de unión a EGFR que comprende la secuencia LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV HNVYKDTNX₉RGL PLSAEFTT (SEQ ID NO: 182), en la que

- 60 X₁ es D;
 X₂ es D;
 X₃ es P;
 X₄ está ausente;
 65 X₅ es H o W;
 X₆ es A;

X₇ es F
 X₈ es Y; y
 X₉ es M o I; y

5 el dominio FN3 de unión a c-Met que comprende la secuencia LPAPK₁₀NLVVSRVTE₁₁DSARLSWTAPDAAF₁₂DSFX₁₃IRYX₁₄E X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉GX₂₀ AIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYX₂₁VX₂₂IX₂₃VKGGX₂₄X₂₅SX₂₆ PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186), en la que

10 X₁₀ es W;
 X₁₁ es F;
 X₁₂ es F;
 X₁₃ es V o L;
 X₁₄ es G o S;
 15 X₁₅ es S o K;
 X₁₆ es E o D;
 X₁₇ es V;
 X₁₈ es N;
 X₁₉ es L o M;
 20 X₂₀ es G o S;
 X₂₁ es S o K;
 X₂₂ es I; y
 X₂₃ es P.

25 Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met de ejemplo son aquellas que tienen la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 5761, 62, 6364, 6566, 6768 o 190–193.

Las moléculas biespecíficas de la invención como se describe en el presente documento pueden comprender además sustituciones en una o más posiciones de residuos en el primer dominio FN3 y/o el segundo dominio FN3 correspondientes a las posiciones 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 en Tencon (SEQ ID NO: 1) como se ha descrito anteriormente, y una sustitución en la posición 29. Las sustituciones de ejemplo son las sustituciones E11N, E14P, L17A, E37P, N46V, G73Y, E86I y D29E (numeración de acuerdo con la SEQ ID NO: 1). Los expertos en la materia apreciarán que pueden usarse otros aminoácidos para sustituciones, tales como aminoácidos dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales como se describe a continuación. Las variantes generadas pueden analizarse para determinar su estabilidad y unión a EGFR y/o c-Met utilizando los métodos del presente documento.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met comprende el primer dominio FN3 que se une específicamente a EGFR y el segundo dominio FN3 que se une específicamente a c-Met, en el que el primer dominio FN3 comprende la secuencia:
 40 LPAPK₁₀NLVVVSX₂₄ VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVG₃₀EAI₃₁X₃₂LT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (SEQ ID NO: 187), en la que

45 X₂₄ es E, N o R;
 X₂₅ es E o P;
 X₂₆ es L o A;
 X₂₇ es H o W;
 X₂₈ es E o D;
 X₂₉ es E o P;
 50 X₃₀ es N o V;
 X₃₁ es G o Y;
 X₃₂ es M o I; y
 X₃₃ es E o I;

55 y el segundo dominio FN3 comprende la secuencia:
 LPAPK₁₀NLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂
 LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPPLSAX₄₆FTT (SEQ ID NO: 188); en la que

60 X₃₄ es E, N o R;
 X₃₅ es E o P;
 X₃₆ es L o A;
 X₃₇ es E o P;
 X₃₈ es V o L;
 X₃₉ es G o S;
 65 X₄₀ es S o K;
 X₄₁ es E o D;

X₄₂ es N o V;
 X₄₃ es L o M;
 X₄₄ es G o S;
 X₄₅ es S o K; y
 X₄₆ es E o I.

5

10

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met comprende el primer dominio FN3 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y el segundo dominio FN3 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

15

Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención como se describe en el presente documento pueden adaptarse a una afinidad específica hacia EGFR y c-Met para maximizar la acumulación de tumores.

20

En el presente documento se desvela una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 aislado que comprende un primer dominio de fibronectina de tipo III (FN3) y un segundo dominio FN3, en el que el primer dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a EGFR, y el segundo dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met), y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, en el que el primer dominio FN3 y el segundo dominio FN3 se aíslan de una biblioteca diseñada en base a la secuencia de Tencon de SEQ ID NO: 1.

25

30

La molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención como se describe en el presente documento puede generarse mediante el acoplamiento covalente del dominio FN3 de unión a EGFR y el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención utilizando métodos bien conocidos. Los dominios FN3 pueden estar unidos a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador que contiene poli-glicina, glicina y serina, o alanina y prolina. El enlazador de ejemplo incluye (GS)₂, (SEQ ID NO: 78), (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 224), (GGGGS)₅ (SEQ ID NO: 79), (AP)₂ (SEQ ID NO: 80), (AP)₅ (SEQ ID NO: 81), (AP)₁₀ (SEQ ID NO: 82), (AP)₂ (SEQ ID NO: 83), A(EAAAK)₅AAA (SEQ ID NO: 84). El uso de enlazadores peptídicos artificiales y de origen natural para conectar polipéptidos a nuevos polipéptidos de fusión unidos es bien conocido en la literatura (Hallewell et al., J Biol Chem 264, 5260–5268, 1989; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725–731, 1995; Robinson y Sauer, Biochemistry 35, 109–116, 1996; patente de Estados Unidos n.º 5.856.456). Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met de la invención, tal como se describe en el presente documento, pueden estar unidas entre un extremo C del primer dominio FN3 al extremo N del segundo dominio FN3, o desde el extremo C del segundo dominio FN3 al extremo N del primer dominio FN3. Cualquier dominio FN3 de unión a EGFR puede estar unido covalentemente a un dominio FN3 de unión a c-Met. Los dominios FN3 de unión a EGFR de ejemplo son dominios que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137 o 194–211, y los dominios FN3 de unión a c-Met de ejemplo son dominios que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 32–49, 111–114 o 212–223. Los dominios FN3 de unión a EGFR para acoplar a una molécula biespecífica pueden comprender, adicionalmente, una metionina iniciadora (Met) en su extremo N.

40

45

Las variantes de las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 DE EGFR/c-Met como se describe en el presente documento están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones en la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met siempre que la variante resultante retenga una selectividad y una potencia similares hacia EGFR y c-Met en comparación con la molécula original. Las modificaciones de ejemplo son, por ejemplo, sustituciones conservadoras que darán como resultado variantes con características similares a las de las moléculas originales. Las sustituciones conservadoras son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéricamente se pueden dividir en cuatro familias: (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina); (3) no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y (4) polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). En ocasiones, los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican en conjunto como aminoácidos aromáticos. Como alternativa, el repertorio de aminoácidos se puede agrupar como (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina histidina), (3) alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), con la serina y la treonina opcionalmente agrupadas por separado como hidroxilo-alifáticas; (4) aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); (5) amidas (asparagina, glutamina); y (6) que contienen azufre (cisteína y metionina) (Stryer (ed.), Biochemistry, 2ª ed, WH Freeman and Co., 1981). Se pueden realizar sustituciones no conservadoras en la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met que implica sustituciones de residuos de aminoácidos entre diferentes clases de aminoácidos para mejorar las propiedades de las moléculas biespecíficas. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o un fragmento del mismo en un homólogo funcional evaluando la capacidad del polipéptido o fragmento modificado para producir una respuesta de manera similar al polipéptido o fragmento no modificado utilizando los ensayos descritos en el presente

50

55

60

65

documento. Los péptidos, polipéptidos o proteínas en los que se ha producido más de una sustitución se pueden someter a ensayo fácilmente del mismo modo.

Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención como se describe en el presente documento pueden generarse como dímeros o multímeros, por ejemplo, como un medio para aumentar la valencia y, por lo tanto, la avidéz de la unión de la molécula diana. Los multímeros pueden generarse uniendo uno o más dominios FN3 de unión a EGFR y uno o más dominios FN3 de unión a c-Met para formar moléculas que comprenden al menos tres dominios FN3 individuales que son al menos biespecíficos para EGFR o c-Met, por ejemplo mediante la inclusión de un enlazador de aminoácidos utilizando métodos bien conocidos.

La invención también proporciona una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 que comprende un primer dominio de fibronectina de tipo III (FN3) y un segundo dominio FN3, en el que el primer dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a EGFR, y el segundo dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met), y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 50–72, 106, 118–121, 138–165, 170-179 o 190–193.

Restos de extensión de la semivida

Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met o los dominios mono-específicos FN3 de unión a EGFR o c-Met de la invención como se describe en el presente documento pueden incorporar otras subunidades, por ejemplo, mediante interacción covalente. En un aspecto de la invención, las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención comprenden además un resto que se extiende en la semivida. Los restos que extienden la semivida de ejemplo son albúmina, variantes de albúmina, proteínas y/o dominios de unión a albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de los mismos, y regiones Fc. Un dominio de unión a la albúmina de ejemplo se muestra en la SEQ ID NO: 117 y una variante de albúmina de ejemplo se muestra en la SEQ ID NO: 189.

La totalidad o una porción de una región constante de anticuerpo puede unirse a las moléculas de la invención para impartir propiedades similares a los anticuerpos, especialmente las propiedades asociadas con la región Fc, tales como funciones efectoras de Fc, tal como la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), y puede modificarse aún más modificando los residuos en el Fc responsable de estas actividades (para su revisión, véase Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20, 685–691, 2009).

Pueden incorporarse restos adicionales en las moléculas biespecíficas de la invención, tales como moléculas de polietilenglicol (PEG), tal como PEG5000 o PEG20.000, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena, por ejemplo, laurato, miristato, estearato, araquidato, behenato, oleato, araquidonato, ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico y similares, polilisina, octano, carbohidratos (dextrano, celulosa, oligosacáridos o polisacáridos) para las propiedades deseadas. Estos restos pueden ser fusiones directas con las secuencias codificantes de armazón de proteínas y pueden generarse mediante técnicas estándar de clonación y expresión. Como alternativa, pueden usarse métodos de acoplamiento químico bien conocidos para unir los restos a moléculas producidas de forma recombinante de la invención.

Se puede añadir un resto pegilo a las moléculas biespecíficas o mono-específicas de la invención incorporando un residuo de cisteína al extremo C de la molécula y uniendo un grupo pegilo a la cisteína utilizando métodos bien conocidos. Las moléculas biespecíficas de ejemplo con la cisteína C-terminal son aquellas que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 170–178.

Las moléculas mono-específicas y biespecíficas de la invención como se describen en el presente documento que incorporan restos adicionales pueden compararse por su funcionalidad mediante varios ensayos bien conocidos. Por ejemplo, las propiedades alteradas de las moléculas mono-específicas y/o biespecíficas debidas a la incorporación de los dominios Fc y/o las variantes del dominio Fc pueden analizarse en ensayos de unión al receptor DE Fc utilizando formas solubles de los receptores, tales como los receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIII o FcRn, o utilizando ensayos basados en células bien conocidos que miden, por ejemplo, la ADCC o la CDC, o que evalúan las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de la invención en modelos *in vivo*.

Polinucleótidos, vectores, células huésped

La invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los dominios FN3 de unión a EGFR o que se unen a c-Met o las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención como polinucleótidos aislados o como porciones de vectores de expresión o como porciones de secuencias de ADN lineales. Incluidas las secuencias de ADN lineales utilizadas para la transcripción/traducción *in vitro*, vectores compatibles con la expresión eucariota, procariota o en fagos filamentosos, la secreción y/o presentación de las composiciones o mutágenos dirigidos de los mismos. En el presente documento se desvelan ciertos polinucleótidos de ejemplo, sin embargo,

otros polinucleótidos que, dada la degeneración del código genético o las preferencias de codones en un sistema de expresión dado, codifican los dominios FN3 de unión a EGFR o de unión a c-Met o las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención también están dentro del alcance de la invención.

- 5 La invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica el dominio FN3 que se une específicamente a EGFR que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137 o 194–211.

La invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met que tiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia mostrada en las SEQ ID NO: 32-49, 111-114 o 212-223.

La invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica la molécula biespecífica que contiene el dominio EGFR/c-Met FN3 que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 50–72, 106, 118–121, 138–165, 170-179 o 190–193.

15 La invención también proporciona un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de polinucleótidos de las SEQ ID NO: 97, 98, 103, 104, 115, 76116 o 166-169.

Los polinucleótidos de la invención como se describen en el presente documento pueden producirse por síntesis química tal como la síntesis de polinucleótidos en fase sólida en un sintetizador de polinucleótidos automático y ensamblarse en moléculas monocatenarias o bicatenarias completas. Como alternativa, los polinucleótidos de la invención pueden producirse mediante otras técnicas, tales como una PCR seguida de clonación de rutina. Las técnicas para producir u obtener polinucleótidos de una secuencia conocida dada son bien conocidas en la materia.

25 Los polinucleótidos de la invención como se describen en el presente documento pueden comprender al menos una secuencia no codificadora, tal como una secuencia promotora o potenciadora, intrón, señal de poliadenilación, una secuencia *cis* que facilita la unión de RepA, y similares. Las secuencias de polinucleótidos también pueden comprender secuencias adicionales que codifican aminoácidos adicionales que codifican, por ejemplo, un marcador o una secuencia marcadora, tal como un marcador de histidina o un marcador de HA para facilitar la purificación o detección de la proteína, una secuencia señal, una proteína de fusión asociada, tal como RepA, Fc o proteína de la cubierta de bacteriófago, tal como pIX o pIII.

La invención también proporciona un vector que comprende al menos un polinucleótido de la invención. Dichos vectores pueden ser vectores plasmídicos, vectores virales, vectores para la expresión de baculovirus, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para la introducción de los polinucleótidos de la invención en un organismo determinado o fondo genético por cualquier medio. Dichos vectores pueden ser vectores de expresión que comprenden elementos de secuencia de ácido nucleico que pueden controlar, regular, causar o permitir la expresión de un polipéptido codificado por dicho vector. Dichos elementos pueden comprender sitios de unión al potenciador de la transcripción, sitios de iniciación de la ARN polimerasa, sitios de unión al ribosoma y otros sitios que facilitan la expresión de polipéptidos codificados en un sistema de expresión dado. Dichos sistemas de expresión pueden ser sistemas basados en células o sistemas libres de células bien conocidos en la técnica.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende el vector de la invención. Un dominio mono-específico FN3 de unión a EGFR o de unión a c-Met o la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met de la invención pueden producirse opcionalmente por una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o una población clonal de células inmortalizadas, también conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987–2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994–2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997–2001).

La célula huésped elegida para la expresión puede ser de origen mamífero o puede seleccionarse entre COS–1, COS–7, HEK293, BHK21, CHO, BSC–1, He G2, SP2/0, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, células de insecto o vegetales, o cualquier derivado, célula inmortalizada o transformada de las mismas. Como alternativa, la célula huésped puede seleccionarse de una especie u organismo incapaz de glicosilar polipéptidos, por ejemplo, una célula u organismo procariótico, tal como BL21, BL21 (DE3), BL21–GOLD (DE3), XL1–Blue, JM109, HMS174, HMS174 (DE3), y cualquiera de las cepas de *E. coli spp*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp* naturales o diseñadas por ingeniería.

Otra realización de la invención es un método para producir el dominio FN3 aislado que se une específicamente a EGFR o c-Met de la invención o la molécula que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met biespecífico aislado de la invención, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la invención en condiciones tales que el dominio FN3 aislado que se une específicamente a EGFR o c-Met o la molécula que contiene el dominio biespecífico EGFR/c-Met aislado se exprese, y purificar el dominio o la molécula.

El dominio FN3 que se une específicamente a EGFR o c-Met o la molécula biespecífica que contiene el dominio de FN3 EGFR/c-Met aislado de la invención se puede purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos, por ejemplo mediante purificación de la proteína A, precipitación en sulfato amónico o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, 5 cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina, o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Usos de las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met F y los dominios FN3 de unión a EGFR o de unión a c-Met de la invención

10 Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 que se unen a EGFR o los dominios FN3 que se unen a c-Met de la invención, tal como se describe en el presente documento, pueden usarse para diagnosticar, monitorizar, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de o reducir los síntomas de enfermedades humanas o patologías específicas en células, tejidos, órganos, fluidos o, en general, un huésped. Los métodos desvelados en el presente documento se pueden usar para tratar a un paciente animal que pertenece a cualquier clasificación. Ejemplos de tales animales incluyen mamíferos, tales como seres humanos, roedores, perros, gatos y animales de granja.

20 En el presente documento se desvela un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de células que expresan EGFR y/o c-Met, que comprende poner en contacto las células con la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met aislado, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención.

25 En el presente documento también se desvela un método para inhibir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas o tumorales que expresan EGFR y/o c-Met en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met aislada, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención, de modo que se inhibe el crecimiento o la metástasis de las células cancerosas o tumorales que expresan EGFR y/o c-Met.

30 En el presente documento también se desvela un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met aislada, el dominio FN3 de unión a EGFR, o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención a un paciente que lo necesite durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

35 La molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por una activación o producción anormal de EGFR, c-Met, EGF u otro ligando de EGFR o HGF, o trastorno relacionado con la expresión de EGFR o c-Met, que puede o no implicar malignidad o cáncer, en el que la activación y/o producción anormales de EGFR, c-Met, EGF u otro ligando de EGFR, o HGF se produce en 40 células o tejidos de un sujeto que tienen la enfermedad o trastorno o que están predispuestos a sufrirla. La molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención se pueden usar para el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres y tumores benignos. Los cánceres susceptibles de ser tratados mediante las moléculas biespecíficas de la invención incluyen aquellas que sobreexpresan EGFR y/o c-Met, los cánceres asociados con una actividad elevada de EGFR y/o los niveles de expresión (tal como, por ejemplo, una mutación activadora de EGFR, una amplificación del gen del EGFR o activación de EGFR mediada por ligando) y actividad y/o niveles de expresión elevados de c-Met (tales como, por ejemplo, mutación activadora de c-Met, una amplificación de genes de c-Met o activación de c-Met mediada por HGF.

50 Las mutaciones activadoras de EGFR de ejemplo que pueden estar asociadas con el cáncer incluyen mutaciones puntuales, mutaciones de delección, mutaciones de inserción, inversiones o amplificaciones de genes que conducen a un aumento de al menos una actividad biológica de EGFR, tal como la actividad elevada de tirosina quinasa, la formación de homodímeros y heterodímeros de receptores, mayor unión al ligando, etc. Las mutaciones pueden localizarse en cualquier parte de un gen de EGFR o región reguladora asociada con un gen de EGFR e incluyen mutaciones en el exón 18, 19, 20 o 21 o mutaciones en el dominio de la quinasa. Las mutaciones de EGFR de activación a modo de ejemplo son las sustituciones G719A, L861X (siendo X cualquier aminoácido), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P o T790M, delección de E746-A750, delección de R748 -P753, inserción de Ala entre M766 y A767, inserción de SVA (Ser, Val, Ala) entre S768 y V769 e inserción de NS (Asn, Ser) entre P772 y H773. Otros ejemplos de mutaciones de activación de EGFR son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2005/0272083). La información sobre EGFR y otros receptores de ErbB, incluidos los homodímeros y heterodímeros receptores, ligandos de receptores, sitios de autofosforilación y moléculas de señalización involucradas en la señalización mediada por ErbB se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Hynes y Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341-354, 2005).

65 Las mutaciones de activación de c-Met de ejemplo incluyen mutaciones puntuales, mutaciones de delección, mutaciones de inserción, inversiones o amplificaciones génicas que conducen a un incremento en al menos una

actividad biológica de una proteína c-Met, tal como actividad tirosina quinasa elevada, formación de homodímeros y heterotrímeros receptores, mayor unión al ligando etc. Las mutaciones pueden localizarse en cualquier parte del gen de c-Met o en las regiones reguladoras asociadas con el gen, tales como las mutaciones en el dominio quinasa de c-Met. Las mutaciones de activación de c-Met a modo de ejemplo son mutaciones en las posiciones de los residuos N375, V13, V923, R175, V136, L229, S323, R988, S1058/T1010 y E168. Los métodos para detectar mutaciones de EGFR y c-Met o amplificaciones de genes son bien conocidos.

Los cánceres de ejemplo que son susceptibles de tratamiento por la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención incluyen cánceres de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de boca, cáncer de esófago, cáncer de vagina, cáncer cervical, cáncer de bazo, cáncer de testículo, cáncer gástrico, cáncer de timo, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de hígado o carcinoma renal papilar esporádico o hereditario (CCPR).

Los dominios FN3 que se unen específicamente a c-Met y bloquean la unión de HGF a c-Met de la invención pueden ser para el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres y tumores benignos. Los cánceres susceptibles de tratamiento por los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención incluyen aquellos que sobreexpresan los cánceres de ejemplo que son susceptibles de tratamiento por los dominios FN3 de la invención incluyen cánceres de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de boca, cáncer de esófago, cáncer de vagina, cáncer de cuello uterino, cáncer de bazo, cáncer de testículo y cáncer del timo.

Los dominios FN3 que se unen específicamente a EGFR y bloquean la unión de EGF al EGFR de la invención se pueden usar para el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres y tumores benignos. Los cánceres susceptibles de ser tratados con los dominios FN3 de la invención incluyen aquellos que sobreexpresan EGFR o variantes. Los cánceres de ejemplo que son susceptibles de tratamiento con los dominios FN3 de la invención incluyen cánceres de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de boca, cáncer de esófago, cáncer de vagina, cáncer de cuello uterino, cáncer de bazo, cáncer de testículo y cáncer de timo.

En algunos métodos descritos en el presente documento, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención se pueden usar para tratar a un sujeto con un cáncer que es resistente o ha adquirido resistencia al tratamiento con uno o más inhibidores de EGFR. Los inhibidores de EGFR de ejemplo para los cuales el cáncer puede adquirir resistencia son los anticuerpos anti-EGFR cetuximab (Erbix®), pantinimumab (Vectibix®), matuzumab, nimotuzumab, inhibidores de EGFR de molécula pequeña Tarceva® (erlotinib), IRESSA (gefitinib), EKB-569 (pelitina, TKI de EGFR irreversible), pan-ErbB y otros inhibidores de la tirosina quinasa receptora lapatinib (inhibidor de EGFR y HER2), pelitinib (inhibidor de EGFR y HER2), vandetanib (ZD6474, ZACTIMA™, EGFR, VEGFR2 y RET TKI), PF00299804 (dacomitinib, pan-ErbB TKI irreversible), CI-1033 (pan-erbB TKI irreversible), afatinib (BIBW2992, pan-ErbB TKI irreversible), AV-412 (inhibidor doble de EGFR y ErbB2) EXEL-7647 (inhibidor de EGFR, ErbB2, GEVGR y EphB4), CO-1686 (EGFR TKI selectivo de mutante irreversible), AZD9291 (EGFR TKI selectivo de mutante irreversible) y HKI-272 (neratinib, inhibidor irreversible de EGFR/ErbB2). Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar el cáncer que es resistente o que ha adquirido resistencia al tratamiento con gefitinib, erlotinib, afatinib, CO-1686, AZD9291 y/o cetuximab. Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a C-Met que pueden usarse son los descritos en el presente documento que tienen secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 18-29, 107-110, 122-137, 194-211, 32-49, 111-114, 212-223, 50-72, 106, 118-121, 138-165, 170-178 o 190-193.

En el presente documento también se describe un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met o el dominio FN3 que se une específicamente al EGFR a un paciente que lo necesite durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer, en el que el sujeto es resistente o ha adquirido resistencia al tratamiento con erlotinib, gefitinib, afatinib, CO-1686 (número CAS: 1374640-70-6), AZD9291 o cetuximab.

Se pueden usar varios métodos cualitativos y/o cuantitativos para determinar si un sujeto es resistente, ha desarrollado o es susceptible de desarrollar una resistencia al tratamiento con un inhibidor de EGFR. Los síntomas que pueden asociarse con la resistencia a un inhibidor de EGFR incluyen, por ejemplo, una disminución o la meseta del bienestar del paciente, un aumento en el tamaño de un tumor, disminución detenida o ralentizada del del crecimiento de un tumor y/o la diseminación de células cancerosas en el cuerpo de un lugar a otros órganos, tejidos o células. El restablecimiento o el empeoramiento de varios síntomas asociados con el cáncer también puede ser una indicación de que un sujeto ha desarrollado o es susceptible de desarrollar resistencia a los inhibidores de

EGFR, tal como anorexia, disfunción cognitiva, depresión, disnea, fatiga, trastornos hormonales, neutropenia, dolor , neuropatía periférica, y disfunción sexual. Los síntomas asociados con cáncer puede variar de acuerdo con el tipo de cáncer. Por ejemplo, los síntomas asociados con el cáncer cervical pueden incluir sangrado anormal, flujo vaginal pesado inusual, dolor pélvico que no está relacionado con el ciclo menstrual normal, dolor vesical o dolor durante la micción, y sangrado entre los períodos menstruales regulares, después de las relaciones sexuales, duchas vaginales, o examen pélvico. Los síntomas asociados con el cáncer de pulmón pueden incluir tos persistente, tos con sangre, dificultad para respirar, sibilancias, dolor en el pecho, pérdida de apetito, pérdida de peso sin intentarlo y fatiga. Los síntomas del cáncer de hígado pueden incluir pérdida de peso, dolor abdominal, especialmente en la parte superior derecha del abdomen que puede extenderse hacia la espalda y el hombro, náuseas y vómitos, debilidad general y fatiga, hepatomegalia, hinchazón abdominal (ascitis) y una decoloración amarilla de la piel y el blanco de los ojos (ictericia). Un experto en oncología puede identificar fácilmente los síntomas asociados con un tipo particular de cáncer.

Otros medios para determinar si un sujeto ha desarrollado una resistencia a un inhibidor de EGFR incluyen examinar la fosforilación de EGFR, la fosforilación de ERK1/2 y/o la fosforilación de AKT en células cancerosas, en las que el aumento de la fosforilación puede ser indicativo de que el sujeto ha desarrollado o es susceptible de desarrollar resistencia a un inhibidor de EGFR. Los métodos para determinar la fosforilación de EGFR, ERK1/2 y/o AKT son bien conocidos y se describen en el presente documento. La identificación de un sujeto que ha desarrollado una resistencia a un inhibidor de EGFR puede implicar la detección de niveles elevados de expresión de c-Met o actividad elevada de c-Met, por ejemplo, que surgen de niveles elevados de HGF circulante, una mutación activadora del gen de c-Met o amplificación del gen de c-met.

En el presente documento también se desvela un método para tratar CPNM en un paciente que tiene un tumor de CPNM o una metástasis tumoral que tiene una mutación activadora de EGFR o una amplificación del gen EGFR, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met , el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención.

La molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención se pueden usar para tratar el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que incluye carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma macrocítico. En algunas realizaciones, las células del CPNM tienen un fenotipo epitelial. En algunas realizaciones, el CPNM tiene resistencia adquirida al tratamiento con uno o más inhibidores del EGFR.

En el CPNM, mutaciones específicas en el gen de EGFR se asocian con tasas elevadas de respuesta (70–80 %) a los inhibidores de tirosina quinasa de EGFR (EGFR-TKI). Una delección de 5 aminoácidos en el exón 19 o la mutación puntual L858R en EGFR se asocian con la sensibilidad a EGFR-TKI (Nakata y Gotoh, Expert Opin Ther Targets 16:771–781, 2012). Estas mutaciones dan como resultado una activación independiente de los ligando de la actividad de la quinasa del EGFR. Las mutaciones de activación de EGFR se producen en el 10-30 % de los pacientes con CPNM y son significativamente más frecuentes en asiáticos orientales, mujeres, no fumadores y pacientes con histología de adenocarcinoma (Janne y Johnson Clin Cancer Res 12(14 Suppl): 4416s–4420s, 2006). La amplificación del gen de EGFR también está fuertemente correlacionada con la respuesta después del tratamiento con EGFR-TKI (Cappuzzo et al., J Natl Cancer Inst 97:643–55, 2005).

Aunque la mayoría de los pacientes con CPNM con mutaciones del EGFR responden inicialmente a la terapia con EGFR TKI, prácticamente todos adquieren una resistencia que impide una respuesta duradera. El 50-60 % de los pacientes adquieren resistencia debido a una mutación puntual en el segundo sitio en el dominio de quinasa de EGFR (T790M). Casi el 60 % de todos los tumores que se vuelven resistentes a los inhibidores de la tirosina quinasa EGFR aumentan la expresión de c-Met, amplifican el gen de c-Met o aumentan su único ligando conocido, HGF (Turke et al., Cancer Cell, 17:77–88, 2010).

En el presente documento también se desvela un método para tratar un cáncer que tiene un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención a un paciente que lo necesite durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer, en el que el cáncer está asociado con una mutación activadora de EGFR, una amplificación del gen del EGFR, una mutación de activación dec-Met o una amplificación del gen de c-Met.

En algunas realizaciones, la mutación activadora de EGFR es G719A, G719X (siendo X cualquier aminoácido), L861X (siendo X cualquier aminoácido), L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P o sustitución T790M, delección de E746 –A750, delección de R748–P753, inserción de Ala (A) entre M766 y A767, inserción de Ser, Val y Ala (SVA) entre S768 y V769, e inserción de Asn y Ser (NS) entre P772 y H773.

En el presente documento también se desvela un método para tratar un cáncer que tiene un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de un paciente que lo

necesite durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer, en el que el cáncer está asociado con una mutación de EGFR L858R, T790M o delección de los residuos E746-A750 (del (E746, A750)), amplificación de EGFR o amplificación c-Met.

5 En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con EGFR de tipo salvaje y c-Met de tipo salvaje.

En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con EGFR de tipo salvaje y amplificación de c-Met.

10 En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con las mutaciones del EGFR L858R y T790M y c-Met de tipo salvaje.

En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con la delección del EGFR del(E764, A750) y c-Met de tipo salvaje.

15 En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con la delección del EGFR del(E764, A750) y la amplificación de c-Met.

En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con la delección de EGFR (E764, A750), la amplificación de EGFR y la amplificación de c-Met.

20 En algunas realizaciones, el paciente tiene un CPNM asociado con las mutaciones del EGFR L858R y T790M y c-Met de tipo salvaje.

En algunas realizaciones, el paciente tiene un CPNM asociado con amplificación del EGFR y c-Met de tipo salvaje.

25 En algunas realizaciones, el paciente tiene un CPNM asociado con la amplificación de EGFR y la amplificación de c-Met.

En algunas realizaciones, el paciente tiene un CPNM asociado con delección del EGFR del (E764, A750) y c-Met de tipo salvaje.

30 En algunas realizaciones, el paciente tiene un CPNM asociado con delección de EGFR del (E764, A750) y amplificación de c-Met. La amplificación de EGFR o c-Met se puede evaluar mediante métodos estándar, por ejemplo, determinando el número de copias del gen de EGFR o c-Met mediante transferencia Southern, FISH o hibridación genómica comparativa (CGH)

35 Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como el desarrollo o la diseminación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estable (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad y remisión (parcial o total), sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o trastorno, así como aquellos que son propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno se va a prevenir.

50 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los indicadores de ejemplo de un terapéutico de EGFR/c-Met efectivo que puede disminuir o abatir en asociación con la resistencia incluyen, por ejemplo, el bienestar mejorado del paciente, la disminución o la reducción del tamaño de un tumor, el crecimiento detenido o lento de un tumor y/o la ausencia de metástasis de células cancerosas a otras ubicaciones en el cuerpo.

Administración/Composiciones Farmacéuticas

60 La invención proporciona composiciones farmacéuticas la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para uso terapéutico, las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención se pueden preparar como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del dominio o molécula como ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto activo. Dichos vehículos pueden ser

líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Por ejemplo, se puede usar 0,4 % de solución salina y 0,3 % de glicina. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de material particulada. Estas soluciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas (por ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración de las moléculas de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,5 %, generalmente de al menos aproximadamente 1 % hasta 15 o 20 % en peso y se seleccionará principalmente en función de la dosis requerida, los volúmenes de fluidos, las viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionada. Los vehículos y formulaciones adecuados, incluidas otras proteínas humanas, por ejemplo, seroalbúmina humana, se describen, por ejemplo, en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691–1092, véase especialmente pp. 958–989.

El modo de administración para el uso terapéutico de las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención puede ser cualquier ruta adecuada que libere el agente en el huésped, tal como como administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, pulmonar; transmucosa (oral, intranasal, intravaginal, rectal), utilizando una formulación en un comprimido, cápsula, solución, polvo, gel, partícula; y contenido en una jeringa, un dispositivo implantado, una bomba osmótica, un cartucho, una microbomba u otro medio apreciado por el experto en la técnica, como es bien conocido en la materia. La administración específica del sitio se puede lograr, por ejemplo, mediante administración intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intracardíaca, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravascular, intravesical, intralesional, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

Por lo tanto, una composición farmacéutica de la invención para inyección intramuscular podría prepararse para contener 1 ml de agua tamponada estéril, y entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 mg, por ejemplo, de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg o, más preferiblemente, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, del dominio FN3 de la invención.

Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención pueden administrarse a un paciente por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía parenteral mediante infusión intravenosa (IV) o inyección en bolo, intramuscular o subcutánea o intraperitoneal. La infusión intravenosa puede administrarse en tan solo 15 minutos, pero con más frecuencia durante 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos o incluso 2 o 3 horas. Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención también pueden inyectarse directamente en el sitio de la enfermedad (por ejemplo, el propio tumor). La dosis administrada a un paciente con cáncer es suficiente para aliviar o al menos detener parcialmente la enfermedad que se está tratando ("cantidad terapéuticamente eficaz") y puede ser algunas veces de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg, pero puede ser incluso mayor, por ejemplo 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg. También se puede administrar una dosis unitaria fija, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 o 1000 mg, o la dosis puede basarse en el área de la superficie del paciente, por ejemplo, 400, 300, 250, 200 o 100 mg/m². Por lo general, se pueden administrar entre 1 y 8 dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) para tratar el cáncer, pero se pueden administrar 10, 12, 20 o más dosis. La administración de las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención se puede repetir después de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más. También son posibles cursos repetidos de tratamiento, al igual que la administración crónica. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente.

Por ejemplo, una composición farmacéutica de las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención para infusión intravenosa se puede preparar para que contenga aproximadamente 200 ml de solución de Ringer estéril y de aproximadamente 8 mg a aproximadamente 2400 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1600 mg, o de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 800 mg del anticuerpo biespecífico de EGFR/c-Met para la administración a un paciente de 80 kg. Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral son bien conocidas y se describen con más detalle en, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención se pueden liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un

vehículo adecuado antes de su uso. Se ha mostrado que esta técnica es eficaz con las preparaciones proteicas convencionales y se pueden emplear las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la materia.

5 Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención pueden administrarse a un sujeto en una dosis única o la administración puede repetirse, por ejemplo, después de un día, dos días, tres días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, dos meses o tres meses. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. La administración se puede repetir una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, 10 diez veces o más.

15 Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met FN3, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención pueden administrarse en combinación con un segundo agente terapéutico de forma simultánea, secuencial o por separado. El segundo agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico o un fármaco citotóxico. Cuando se usa para tratar el cáncer, las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met se pueden usar en combinación con terapias convencionales para el cáncer, tal como cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de los mismos. Los agentes de ejemplo que pueden usarse en combinación con los dominios FN3 de la invención son antagonistas de HER2, HER3, HER4, VEGF e 20 inhibidores de la proteína tirosina quinasa, tales como Iressa® (gefitinib) y Tarceva (erlotinib).

25 Las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met pueden administrarse junto con uno cualquiera o más de los fármacos quimioterapéuticos u otros agentes terapéuticos anticancerosos conocidos por los expertos en la materia. Los agentes quimioterapéuticos son compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer e incluyen agentes inhibidores del crecimiento u otros agentes citotóxicos e incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores antimicrotúbulos, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la tirosina quinasa del receptor, inhibidores de la angiogénesis y similares. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; 30 aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminasas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosfoamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; 35 antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azramerina, belomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenocex, zinostatina, zorubicina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 40 5-FU; análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de la purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frofínico; 45 aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; 50 pipobromano; gacitosina; arabinósido (" Ara-C "); ciclofosfamida; tiotepa; miembros de la familia de taxoides o taxanos, tales como paclitaxel (TAXOL®/docetaxel (TAXOTERE®) y análogos de los mismos; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tal como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido de platino (VP-16); ifosfamida; mitomicina c; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 55 2000; difluorometilornitina; (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; inhibidores de tirosina quimasas receptores y/o de la angiogénesis, incluyendo sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®), pazopanib (VOTRIENT™), toceranib (PALLADIA™), vandetanib (ZACTIMA™), cediranib (RECENTIN®), regorafenib (BAY 73-4506), axitinib (AG013736), lestaurtinib (CEP-701), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA™), BIBW 2992 (TOVOK™), lapatinib (TYKERB®), neratinib (HKI-272) y similares, y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como los antiestrogénicos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. 65 Otros compuestos químicos citotóxicos convencionales como los desvelados en Wiemann et al., 1985, in Medical

Oncology (Calabresi et al, eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, también son aplicables a los métodos de la presente invención.

5 Los agentes de ejemplo que se pueden usar en combinación con las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met incluyen inhibidores de la tirosina quinasa y terapias dirigidas contra el cáncer, tal como Iressa® (gefitinib) y

10 Tarceva (erlotinib) y otros antagonistas de HER2, HER3, HER4 o VEGF. Los antagonistas de HER2 de ejemplo incluyen CP-724-714, HERCEPTIN™ (trastuzumab), OMNITARG™ (pertuzumab), TAK-165, lapatinib (inhibidor de EGFR y HER2) y GW-282974. Los antagonistas de HER3 de ejemplo incluyen anticuerpos anti-Her3 (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2004/0197332). Los ejemplos de antagonistas de HER4 incluyen ARNsi anti-HER4 (véase, por ejemplo, Maatta et al., Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006,. Un antagonista de VEGF de ejemplo es Bevacizumab (Avastin™).

15 Cuando se usa una molécula pequeña en combinación con las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención, típicamente se administra más a menudo, preferiblemente una vez al día, pero también es posible 2, 3, 4 o más veces al día, como cada dos días, semanalmente o en algún otro intervalo. Los medicamentos de moléculas pequeñas a menudo se toman por vía oral, pero también es posible la administración parenteral, por ejemplo, mediante infusión IV o inyección de bolos o por vía subcutánea o intramuscular. Las dosis de medicamentos de molécula pequeña pueden ser típicamente de 10 a 1000 mg, o de aproximadamente 100, 150, 200 o 250 mg.

25 Cuando las moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de EGFR/c-Met, los dominios FN3 de unión a EGFR o los dominios FN3 de unión a c-Met de la invención se administran en combinación con un segundo agente terapéutico, la combinación puede tener lugar en cualquier período de tiempo conveniente . Por ejemplo, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención y el segundo agente terapéutico se pueden administrar a un paciente el mismo día, e Incluso en la misma infusión intravenosa. Sin embargo, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención y el segundo agente terapéutico también se pueden administrar en días alternos o semanas, quincenas o meses alternos y así sucesivamente. En algunos métodos, la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención y el segundo agente terapéutico se administran suficientemente cercanos en el tiempo de modo que estén presentes de forma simultánea (por ejemplo en el suero) a niveles detectables en el paciente que se está tratando. En algunos métodos, un curso entero de tratamiento de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención que consiste en una serie de dosis en un período de tiempo es seguido o precedido por un curso de tratamiento del segundo agente terapéutico que también consiste en una serie de dosis. En algunos métodos, el tratamiento con la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención administrados en segundo lugar se inicia si el paciente tiene resistencia o desarrolla resistencia al segundo agente terapéutico administrado inicialmente. El paciente puede recibir un solo curso o múltiples cursos de tratamiento con uno o ambos de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención y el segundo agente terapéutico. Se puede usar un período de recuperación de 1, 2 o varios días o semanas entre la administración de la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención y el segundo agente terapéutico. Cuando ya se ha establecido un régimen de tratamiento adecuado para el segundo agente terapéutico, ese régimen se puede usar en combinación con la molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met Dominio de la invención. Por ejemplo, Tarceva® (erlotinib) se toma como una píldora de 100 mg o 150 mg una vez al día, e Iressa® (gefitinib) se toma como un comprimido de 250 mg al día.

55 La molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met, el dominio FN3 de unión a EGFR o el dominio FN3 de unión a c-Met de la invención, opcionalmente en combinación con el segundo agente terapéutico, se pueden administrar junto con cualquier forma de radioterapia, incluyendo radiación de haz externo, radioterapia de intensidad modulada (IMRT) y cualquier tipo de radiocirugía, incluyendo Gamma Knife, Cyberknife, Linac, y radiación intersticial (por ejemplo, semillas radiactivas implantadas, globo GliaSite) y/o con cirugía. La combinación con radioterapia puede ser especialmente adecuada para el cáncer de cabeza y cuello y los tumores cerebrales.

60 Aunque se ha descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se desvelarán adicionalmente en los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLO 1. Construcción de bibliotecas de Tencon

65 Tencon (SEQ ID NO: 1) es un armazón similar a inmunoglobulina, dominio de fibronectina de tipo III (FN3), diseñado a partir de una secuencia de consenso de quince dominios FN3 de tenascina-C humana (Jacobs et al., Protein

Engineering, Design, and Selection, 25:107–117, 2012; publicación de patente de Estados Unidos N.º 2010/0216708). La estructura cristalina de Tencon muestra seis bucles expuestos en la superficie que conectan siete cadenas beta. Estos bucles, o residuos seleccionados dentro de cada bucle, se pueden aleatorizar para construir bibliotecas de dominios de fibronectina de tipo III (FN3) que se pueden usar para seleccionar nuevas moléculas que se unen a objetivos específicos.

Tencon:

L.PAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSEFLIQYQSEKVGAEAINLTVPGSERSYDLTGLK
PGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO 1);

Construcción de la biblioteca TCL1

Una biblioteca diseñada para aleatorizar solo el bucle FG de Tencon (SEQ ID NO: 1), TCL1, fue construido para su uso con el sistema de presentación en *cis* (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107–117, 2012). En este sistema, se produce una secuencia de ADN de una sola cadena que incorpora secuencias para un promotor Tac, una secuencia de codificación de la biblioteca Tencon, una secuencia de codificación RepA, un elemento en *cis* y un elemento ori. Tras la expresión en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, se produce un complejo de la proteína de fusión Tencon-RepA unida en *cis* al ADN a partir del cual se codifica. Los complejos que se unen a una molécula diana se aíslan y amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se describe a continuación.

La construcción de la biblioteca de TCL1 para su uso con expresión en *cis* se logró mediante rondas sucesivas de PCR para producir moléculas de ADN lineales finales, bicatenarias en dos mitades; el fragmento 5' contiene el promotor y las secuencias de Tencon, mientras que el fragmento 3' contiene el gen *repA* y los elementos *cis* y ori. Estas dos mitades se combinan mediante una fracción digerida para producir toda la construcción. La biblioteca TCL1 se diseñó para incorporar aminoácidos aleatorios solo en el bucle FG de Tencon, KGGHRSN (SEQ ID NO: 86). Los codones NNS se usaron en la construcción de esta biblioteca, lo que dio como resultado la posible incorporación de los 20 aminoácidos y un codón de terminación en el bucle FG. La biblioteca TCL1 contiene seis sub-bibliotecas separadas, cada una con una longitud de bucle FG aleatoria diferente, de 7 a 12 residuos, para aumentar aún más la diversidad. El diseño de las bibliotecas basadas en tencon se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.

Biblioteca	Diseño del bucle BC	Diseño del bucle FG
WT Tencon	TAPDAAF [*] D	KGGHRSN ^{**}
TCL1	TAPDAAF [*] D	XXXXXXXX XXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX
TCL2	#####	#####S##
[*] TAPDAAF [*] D: residuos 22–28 de SEQ ID NO: 1; ^{**} KGGHRSN: SEQ ID NO: 86 X se refiere a los aminoácidos degenerados codificados por codones NNS. # se refiere a la "distribución diseñada de aminoácidos" descrita en el texto.		

Para construir la biblioteca TCL1, se realizaron rondas sucesivas de PCR para añadir el promotor Tac, construir la degeneración en el bucle FG y añadir los sitios de restricción necesarios para el ensamblaje final. Primero, se generó una secuencia de ADN que contenía la secuencia promotora y la secuencia 5' de Tencon del bucle FG por PCR en dos etapas. El ADN correspondiente a la secuencia completa del gen Tencon se utilizó como molde de PCR con los cebadores POP2220 (SEQ ID NO: 2) y TC5' a FG (SEQ ID NO: 3). El producto de PCR resultante de esta reacción se usó como molde para la siguiente ronda de amplificación por PCR con los cebadores de 130 unidades (SEQID NO: 4) y Tc5' a FG para completar la adición de las secuencias promotoras a Tencon. A continuación, se introdujo la diversidad en el bucle de FG amplificando el producto de ADN producido en la primera etapa con el cebador directo POP2222 (SEQID NO: 5) y cebadores inversos TCF7 (SEQ ID NO: 6), TCF8 (SEQ ID NO: 7), TCF9 (SEQ ID NO: 8), TCF10 (SEQ ID NO: 9), TCF11 (SEQ ID NO: 10) o TCF12 (SEQ ID NO: 11), que contienen nucleótidos degenerados. Se realizaron al menos ocho reacciones de PCR de 100 µl para cada sub-biblioteca para minimizar los ciclos de PCR y maximizar la diversidad de la biblioteca. Al menos 5 µg de este producto de PCR se purificaron en gel y se usaron en una etapa posterior de PCR, con los cebadores POP2222 (SEQ ID NO: 5) y POP2234 (SEQ ID NO: 12), que da como resultado la unión de una cola de 6xHis y un sitio de restricción NotI al

extremo 3' de la secuencia de Tencon. Esta reacción de PCR se llevó a cabo utilizando solo quince ciclos de PCR y al menos 500 ng de ADN de molde. El producto de la PCR resultante se purificó en gel, se digirió con la enzima de restricción NotI y se purificó con una columna Qiagen.

5 El fragmento 3' de la biblioteca es una secuencia de ADN constante que contiene elementos para su presentación, incluido un sitio de restricción PspOMI, la región codificante del gen *repA* y los elementos *cis* y *ori*. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un plásmido (pCR4Blunt) (Invitrogen) que contiene este fragmento de ADN con los cebadores directo M13 e inverso M13. Los productos de PCR resultantes se digirieron con PspOMI durante la noche y se purificaron en gel. Para ligar la porción 5' del ADN de la biblioteca al ADN 3' que contiene el gen *repA*, se
10 ligaron 2 pmol de ADN 5' a una cantidad molar igual de ADN 3' *repA* en presencia de las enzimas NotI y PspOMI y la ligasa T4. Después de ligar durante la noche a 37 °C, una pequeña porción del ADN ligado se pasó en un gel para comprobar la eficacia del ligado. El producto de la biblioteca ligada se dividió en doce amplificaciones de PCR y se realizó una reacción de PCR de 12 ciclos con el par de cebadores POP2250 (SEQ ID NO: 13) y DidLigRev (SEQ ID NO: 14). El rendimiento de ADN para cada sub-biblioteca de la biblioteca TCL1 osciló entre 32 y 34 µg.

15 Para evaluar la calidad de la biblioteca, una pequeña parte de la biblioteca de trabajo se amplificó con los cebadores Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) y Tcon6 (SEQ ID NO: 16) y se clonó en un vector pET modificado mediante clonación independiente de ligasa. El ADN plasmídico se transformó en células competentes BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) y se secuenciaron 96 colonias seleccionadas aleatoriamente usando un cebador del promotor de T7. No se
20 encontraron secuencias duplicadas. En general, aproximadamente el 70–85 % de los clones tenía un promotor completo y una secuencia de codificación de Tencon sin mutación de cambio de marco. La tasa de secuencia funcional, que excluye los clones con codones de TERMINACIÓN, estaba entre 59 % y 80 %.

Construcción de la biblioteca TCL2

25 Se construyó la biblioteca TCL2 en la que se aleatorizaron los bucles BC y FG de Tencon y se controló estrictamente la distribución de aminoácidos en cada posición. La Tabla 3 muestra la distribución de aminoácidos en las posiciones de bucle deseadas en la biblioteca TCL2. La distribución de aminoácidos diseñada tenía dos objetivos. Primero, la biblioteca estaba sesgada hacia los residuos que se predijo que serían estructuralmente
30 importantes para el plegamiento y la estabilidad de Tencon basándose en el análisis de la estructura cristalina de Tencon y/o en el modelo de homología. Por ejemplo, la posición 29 se fijó para ser solo un subconjunto de aminoácidos hidrófobos, ya que este residuo se enterró en el núcleo hidrófobo del plegamiento de Tencon. Una segunda capa de diseño incluyó sesgar la distribución de aminoácidos hacia la de los residuos encontrados preferentemente en la cadena pesada HCDR3 de los anticuerpos, para producir eficientemente aglutinantes de alta
35 afinidad (Birtalan et al., J Mol Biol 377:1518–28, 2008; Olson et al., Protein Sci 16:476–84, 2007). Con este objetivo, la "distribución diseñada" de la Tabla 3 se refiere a la distribución de la siguiente manera: alanina al 6 %, arginina al 6 %, asparagina al 3,9 %, ácido aspártico al 7,5 %, ácido glutámico al 2,5 %, glutamina al 1,5 %, glicina al 15 %, histidina al 2,3 %, isoleucina al 2,5 %, leucina al 5 %, lisina al 1,5 %, fenilalanina al 2,5 %, prolina al 4 %, serina al 10 %, treonina al 4,5 %, triptófano al 4 %, tirosina al 17,3 % y valina al 4 %. Esta distribución está exenta de codones de
40 metionina, cisteína y de TERMINACIÓN.

Tabla 3.

Posición del residuo*	Residuos de WT	Distribución en la librería TCL2
22	T	distribución diseñada
23	A	distribución diseñada
24	P	50 % de P + diseñada diseñada
25	D	distribución diseñada
26	A	20 % de A + 20 % de G + distribución diseñada
27	A	distribución diseñada
28	F	20 % de F, 20 % de I, 20 % de L, 20 % de V, 20 % de Y
29	D	33 % de D, 33 % de E, 33 % de T
75	K	distribución diseñada
76	G	distribución diseñada
77	G	distribución diseñada
78	H	distribución diseñada
79	R	distribución diseñada

80	S	100 % de S
81	N	distribución diseñada
82	P	50 % de P + diseñada diseñada
*la numeración de residuos se basa en la secuencia Tencon de la SEQ ID NO: 1		

El fragmento 5' de la biblioteca TCL2 contenía el promotor y la región de codificación de Tencon (SEQ ID NO: 1), que se sintetizó químicamente como un grupo de bibliotecas (Sloning Biotechnology). Este grupo de ADN contenía al menos 1×10^{11} miembros diferentes. Al final del fragmento, se incluyó un sitio de restricción Bsal en el diseño para el ligado a *RepA*.

El fragmento 3' de la biblioteca era una secuencia de ADN constante que contenía elementos para mostrar, incluida una cola 6xHis, la región codificante del gen *repA* y el elemento *cis*. El ADN se preparó mediante reacción de PCR utilizando una molde de ADN existente (anterior) y los cebadores LS1008 (SEQ ID NO: 17) y DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Para ensamblar la biblioteca TCL2 completa, se ligó un total de 1 µg de ADN de la biblioteca Tencon 5' digerido con Bsal a 3,5 µg del fragmento 3' que se preparó mediante digestión de restricción con la misma enzima. Después del ligado durante la noche, el ADN se purificó mediante una columna Qiagen y el ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm. El producto de la biblioteca ligada se amplificó mediante una reacción de PCR de 12 ciclos con un par de cebadores POP2250 (SEQ ID NO: 13) y DidLigRev (SEQ ID NO: 14). Se realizaron un total de 72 reacciones, cada una de las cuales contenía 50 ng de productos de ADN ligado como un molde. El rendimiento total de ADN de la biblioteca de trabajo de TCL2 fue de aproximadamente 100 µg. Una pequeña parte de la biblioteca de trabajo se subclonó y se secuenció, como se ha descrito anteriormente para la biblioteca TCL1. No se encontraron secuencias duplicadas. Aproximadamente el 80 % de las secuencias contenían el promotor completo y las secuencias de codificación de Tencon sin mutaciones de cambio de marco.

Construcción de la biblioteca TCL14

Los bucles superior (BC, DE y FG) e inferior (AB, CD y EF), por ejemplo, las superficies de unión indicadas en los dominios FN3 están separadas por las cadenas beta que forman el centro de la estructura de FN3. Las superficies alternativas que residen en los dos "lados" de los dominios FN3 que tienen formas diferentes a las superficies formadas por bucles solo se forman en un lado del dominio FN3 por dos cadenas beta-paralelas, las cadenas beta C y F, y los bucles CD y FG, y en el presente documento se denomina superficie C-CD-F-FG.

Se generó una biblioteca que aleatorizaba una superficie alternativa de Tencon mediante la aleatorización de residuos expuestos en la superficie seleccionados de las cadenas C y F, así como porciones de los bucles CD y FG como se muestra en la Figura 1. Una variante de Tencon, Tencon27 (SEQ ID NO: 99) que tiene las siguientes sustituciones en comparación con Tencon (SEQ ID NO: 1) se utilizó para generar la biblioteca; E11R L17A, N46V, E86I. Una descripción completa de los métodos utilizados para construir esta biblioteca se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N.º US2013/0226834.

Ejemplo 2 Selección de dominios de fibronectina de tipo III (FN3) que se unen a EGFR e inhiben la unión de EGF

Detección selectiva de la biblioteca

Se usó presentación en *cis* para seleccionar dominios de unión del EGFR de las bibliotecas TCL1 y TCL2. Se biotiniló un dominio extracelular humano recombinante del EGFR fusionado a un Fc de IgG1 (R&D Systems) usando métodos estándar y se usó para la exploración (residuos 25-645 de EGFR de longitud completa de la SEQ ID NO: 73). Para la transcripción y traducción *in vitro* (TTI), se incubaron 2-6 µg de ADN de la biblioteca con aminoácidos completos 0,1 mM, 1X componentes de premezcla S30 y 30 µl de extracto S30 (Promega) en un volumen total de 100 µl y se incubaron a 30 °C. Después de 1 hora, se añadieron 450 µl de solución de bloqueo (PBS pH 7,4, suplementado con 2 % de seroalbúmina bovina, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque y 1 mg/ml de heparina) y la reacción se incubó en hielo durante 15 minutos. Los complejos EGFR-Fc:EGF se ensamblaron en proporciones molares de 1:1 y 10:1 de EGFR:EGF mezclando EGF humano recombinante (R&D Systems) con EGFR-Fc recombinante biotinilado en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la unión, se mezclaron 500 µl de reacciones de TTI bloqueadas con 100 µl de complejos EGFR-Fc:EGF y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual los complejos unidos se extrajeron con esferas magnéticas de neutravidina o estreptavidina (Seradyne). Los miembros de la biblioteca no unidos se eliminaron mediante lavados sucesivos con PBST y PBS. Después del lavado, el ADN se eluyó de los complejos unidos calentando a 65 °C durante 10 minutos, se amplificó mediante PCR y se unió a un fragmento de ADN que codifica *RepA* mediante digestión de restricción y ligado para rondas adicionales de exploración de tipo *panning*. Los aglutinantes de alta afinidad se aislaron reduciendo sucesivamente la concentración de EGFR-Fc objetivo durante cada ronda de 200 nM a 50 nM y aumentando la rigurosidad del lavado. En las rondas 4 y 5, los dominios FN3 no unidos y unidos débilmente se eliminaron mediante lavado en presencia de un exceso molar de 10 veces de EGFR-Fc no biotinilado durante la noche en PBS.

Después de la exploración de tipo *panning*, los dominios FN3 seleccionados se amplificaron por PCR utilizando oligos Tcon5new2 (SEQ ID NO: 15) y Tcon6 (SEQ ID NO: 16), se subclonaron en un vector pET modificado para incluir un sitio de clonación independiente de la ligasa, y se transformaron en células BL21-GOLD (DE3) (Stratagene) para la expresión soluble en *E. coli* utilizando técnicas estándar de biología molecular. Se añadió una secuencia génica que codifica un marcador de poli-histidina C-terminal a cada dominio FN3 para permitir la purificación y detección. Los cultivos se cultivaron hasta una densidad óptica de 0,6-0,8 en medio 2YT suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina en bloques de 96 pocillos de 1 ml a 37 °C antes de la adición de IPTG a 1 mM, momento en el cual la temperatura se redujo a 30 °C. Las células se recogieron aproximadamente 16 horas después mediante centrifugación y se congelaron a -20 °C. La lisis celular se logró incubando cada sedimento en 0,6 ml de tampón de lisis BugBuster® HT (Novagen EMD Biosciences) con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Selección de dominios FN3 que se unen a EGFR en las células

Para evaluar la capacidad de diferentes dominios FN3 para unirse a EGFR en un contexto más fisiológico, se midió su capacidad para unirse a células A431. Las células A431 (Colección Americana de Cultivos Tipo, n.º de cat. CRL-1555) sobreexpresan EGFR con ~ 2 x 10⁶ receptores por célula. Las células se sembraron en placas a 5.000/pocillo en placas de 96 pocillos negras opacas y se dejaron unir durante la noche a 37 °C, en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Los lisados bacterianos que expresan el dominio FN3 se diluyeron 1.000 veces en tampón de tinción FACS (Becton Dickinson) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en placas por triplicado. Los lisados se eliminaron y las células se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS. Las células se incubaron con 50 µl/pocillo de conjugado de anticuerpo anti-penta His-Alexa488 (Qiagen) diluido a 1:100 en tampón de tinción FACS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS, después de lo cual se llenaron los pocillos con 100 µl de tampón de tinción FACS y se leyó la fluorescencia a 488 nm usando un lector Acumen eX3. Se analizaron los lisados bacterianos que contenían dominios FN3 para determinar su capacidad para unirse a células A431 (1320 lisados bacterianos crudos para las bibliotecas de TCL1 y TCL2) y se identificaron 516 clones positivos, donde la unión fue ≥10 veces mayor que la señal de fondo. Se analizaron 300 lisados de la biblioteca de TCL14 para determinar su unión, lo que dio como resultado 58 secuencias únicas de dominio FN3 que se unen a EGFR.

Selección de dominios FN3 que inhiben la unión de EGF a EGFR en las células

Para caracterizar mejor el mecanismo de unión a EGFR, se midió la capacidad de varios clones del dominio FN3 identificados para unirse a EGFR de una manera competitiva para EGF utilizando células A431 y se ejecutó en paralelo con la selección del ensayo de unión a A431. Las células A431 se sembraron en placas a 5.000/pocillo en placas de 96 pocillos negras opacas y se dejaron unir durante la noche a 37 °C, en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Las células se incubaron con 50 µl/pocillo de lisado bacteriano diluido a 1:1.000 durante 1 hora a temperatura ambiente en placas por triplicado. Se añadió EGF biotinilado (Invitrogen, n.º de cat. E-3477) a cada pocillo para una concentración final de 30 ng/ml y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS. Las células se incubaron con 50 µl/pocillo de conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (Invitrogen) diluido a 1:100 en tampón de tinción FACS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de tampón de tinción FACS, después de lo cual se llenaron los pocillos con 100 µl de tampón de tinción FACS y se leyó la fluorescencia a 600 nm usando un lector Acumen eX3.

Los lisados bacterianos que contenían los dominios FN3 se seleccionaron en el ensayo de competición de EGF descrito anteriormente. Se seleccionaron 1320 lisados bacterianos en bruto de las bibliotecas TCL1 y TCL2, lo que dio como resultado 451 clones positivos que inhibían la unión de EGF en > 50 %.

Expresión y purificación de dominios FN3 identificados que se unen a EGFR

Los dominios FN3 marcados con His se purificaron a partir de lisados de *E. coli* clarificados con placas His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) y se eluyeron en tampón que contenía fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM e imidazol 250 mM a pH 7,4. Las muestras purificadas se intercambiaron a PBS a pH 7,4 para su análisis utilizando placas PD MultiTrap™ G-25 (GE Healthcare). **Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño**

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño para determinar el estado de agregación de los dominios FN3 que se unen a EGFR. Se inyectaron alícuotas (10 µl) de cada dominio FN3 purificado en una columna Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) a un caudal de 0,3 ml/min en una fase móvil de PBS a pH 7,4. La elución de la columna se controló mediante absorbancia a 280 nm. Los dominios FN3 que exhibieron altos niveles de agregación por SEC se excluyeron de análisis posteriores.

Velocidad de disociación de dominios FN3 de unión a EGFR seleccionados de EGFR-Fc

Dominios FN3 de unión a EGFR seleccionados se sometieron a detección selectiva para identificar aquellos con velocidades de disociación (k_{off}) lentas en la unión a EGFR-Fc en un instrumento ProteOn XPR-36 (Bio-Rad) para facilitar la selección de aquellos que se unían con afinidad alta. Se inmovilizó IgG Fc anti-humana de cabra (R&D systems), a una concentración de 5 µg/ml, directamente mediante acoplamiento de amina (a pH 5,0) en los 6 canales de ligando en orientación horizontal en el chip con un caudal de 30 µl/min en PBS que contenía 0,005 % de Tween-20. Las densidades de inmovilización promediaron aproximadamente 1.500 unidades de respuesta (UR) con menos de 5 % de variación entre los diferentes canales. EGFR-Fc se capturó en la superficie de IgG Fc anti-humana a una densidad de aproximadamente 600 UR en orientación vertical de ligando. Todos los dominios FN3 analizados se normalizaron a una concentración de 1 µM y se analizó su unión en orientación horizontal. Los 6 canales de analito se utilizaron para los dominios FN3 para maximizar el rendimiento de la detección selectiva. La fase de disociación se controló durante 10 minutos a un caudal de 100 µl/min. Las señales de unión entre puntos se utilizaron como referencias para monitorizar la unión no específica entre los analitos y la superficie de IgG inmovilizada y se restaron de todas las respuestas de unión. Los datos de unión procesados se ajustaron localmente a un modelo de unión de Langmuir simple a 1:1 para extraer la k_{off} para cada dominio FN3 de unión a EGFR-Fc capturado.

Inhibición de la fosforilación de EGFR estimulada por EGF

Se analizaron los dominios FN3 de unión a EGFR purificados para determinar su capacidad para inhibir la fosforilación de EGFR estimulada por EGF en células A431 a una única concentración. La fosforilación de EGFR se monitorizó utilizando el kit EGFR fosfo (Tyr1173) (Meso Scale Discovery). Las células se sembraron en placas a 20.000/pocillo en placas transparentes tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos (Nunc) en 100 µl/pocillo de medio RPMI (Gibco) que contenía GlutaMAX™ con 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) y se dejó unir durante la noche a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se eliminó completamente y las células se dejaron sin alimento durante la noche en 100 µl/pocillo de medio que no contenía FBS a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. A continuación, las células se trataron con 100 µl/pocillo de medio de inanición precalentado (37 °C) que contenía los dominios FN3 de unión a EGFR a una concentración de 2 µM durante 1 hora a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Los controles se trataron con medio de inanición solamente. Las células se estimularon mediante la adición y mezcla suave de 100 µl/pocillo de medio de inanición precalentado (37 °C) que contenía EGF recombinante humano de 100 ng/ml (R&D Systems, n.º de cat. 236-EG), para concentraciones finales de 50 ng/ml de EGF y dominio FN3 de unión a EGFR 1 µM e incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 15 minutos. Un conjunto de pocillos de control se dejó sin estimular como controles negativos. El medio se eliminó completamente y las células se lisaron con 100 µl/pocillo de tampón de lisis completo (Meso Scale Discovery) durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, según las instrucciones del fabricante. Las placas de ensayo configuradas para medir el EGFR fosforilado en la tirosina 1173 (Meso Scale Discovery) se bloquearon con la solución de bloqueo provista según las instrucciones del fabricante a temperatura ambiente durante 1,5-2 horas. A continuación, las placas se lavaron 4 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado Tris 1X (Meso Scale Discovery). Se transfirieron partes alícuotas de lisado celular (30 µl/pocillo) a placas de ensayo, que se cubrieron con película de sellado de placa (VWR) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Las placas de ensayo se lavaron 4 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado Tris, después de lo cual se añadieron 25 µl de solución de anticuerpo de detección helada (Meso Scale Discovery) a cada pocillo, teniendo cuidado de no introducir burbujas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora, seguido de 4 lavados con 200 µl/pocillo de tampón de lavado Tris. Las señales se detectaron mediante la adición de 150 µl/pocillo de tampón de lectura (Meso Scale Discovery) y se leyeron en un instrumento SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) usando las configuraciones predeterminadas específicas del ensayo instaladas por el fabricante. El porcentaje de inhibición de la señal de control positivo estimulada por EGF se calculó para cada dominio FN3 de unión a EGFR.

La inhibición de la fosforilación de EGFR estimulada por EGF se midió para 232 clones identificados de las bibliotecas TCL1 y TCL2. 22 de estos clones inhibieron la fosforilación de EGFR en ≥ 50 % a una concentración de 1 µM. Después de la eliminación de los clones que se expresaron poco o se juzgó que eran multiméricos por cromatografía de exclusión por tamaño, se usaron nueve clones para una caracterización biológica adicional. Las secuencias de bucle BC y FG de estos clones se muestran en la Tabla 4. Ocho de los nueve clones seleccionados tenían una secuencia de bucle FG común (HNVYKDTNMRGL; SEQ ID NO: 95) y se observaron áreas de similitud significativa entre varios clones en sus secuencias de bucle BC.

Tabla 4.

Dominio FN3		Bucle BC		Bucle FG	
ID del clon	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
P53A1R5-17	18	ADPHGFYD	87	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-17	19	TYDRDGYD	88	HNVYKDTNMRGL	95
P54AR4-47	20	WDPFSFYD	89	HNVYKDTNMRGL	95

Dominio FN3		Bucle BC		Bucle FG	
JP54AR4-48	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

Ejemplo 3 Caracterización de los dominios FN3 de unión a EGFR que inhiben la unión a EGF

Expresión a gran escala, purificación y eliminación de endotoxinas

5 Los dominios FN3 mostrados en la Tabla 4 se ampliaron para proporcionar más material para una caracterización detallada. Se usó un cultivo durante la noche que contenía cada variante del dominio FN3 de unión a EGFR para
 10 inocular 0,8 l de medio de caldo Terrific suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a una dilución de 1/80 del cultivo durante la noche en medio fresco, y se incubó con agitación a 37 °C. El cultivo se indujo cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó ~1,2-1,5 mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y la temperatura se redujo a 30 °C. Después de 4 horas, las células se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se almacenó a -80 °C hasta que fue necesario.

15 Para la lisis celular, el sedimento descongelado se resuspendió en 1X BugBuster® suplementado con 25 U/ml de Benzonase® (Sigma-Aldrich) y 1 kU/ml de rLysozyme™ (Novagen EMD Biosciences) en una proporción de 5 ml de BugBuster® por gramo de gránulo. La lisis procedió durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, seguido de centrifugación a 56.000 x g durante 50 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm, luego se cargó en una columna HisTrap FF de 5 ml previamente equilibrada con Tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) utilizando un sistema de cromatografía GE Healthcare
 20 ÄKTAexplorer 100s. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de tampón A y se lavó adicionalmente con 16 % de tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM) durante 6 volúmenes de columna. Los dominios FN3 se eluyeron con 50 % de B para 10 volúmenes de columna, seguido de un gradiente de 50 a 100 % de B sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían la proteína del dominio FN3 se agruparon, se concentraron usando un concentrador Millipore 10K MWCO y se filtraron antes de cargarlas en una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 (GE Healthcare) preequilibrada con PBS. El pico de monómero de proteína que se eluye de la columna de exclusión por tamaño se retuvo.

30 Las endotoxinas se eliminaron utilizando un método discontinuo con resina ActiClean Etox (Sterogene Bioseparations). Antes de la eliminación de la endotoxina, la resina se trató previamente con NaOH 1 N durante 2 horas a 37 °C (o durante la noche a 4 °C) y se lavó extensamente con PBS hasta que el pH se estabilizó a ~7 según lo medido con papel indicador de pH. La proteína purificada se filtró a través de un filtro de 0,2 µm antes de añadir 1 ml de resina Etox en una proporción de 10 ml de proteína a 1 ml de resina. La unión de la endotoxina a la resina se dejó proceder a temperatura ambiente durante al menos 2 horas con rotación suave. La resina se eliminó mediante centrifugación a 500 x g durante 2 minutos y se retuvo el sobrenadante de proteínas. Los niveles de endotoxinas se
 35 midieron utilizando cartuchos EndoSafe®-PTSTM y se analizaron en un lector EndoSafe®-MCS (Charles River). Si los niveles de endotoxinas estaban por encima de 5 UE/mg después del primer tratamiento con Etox, se repitió el procedimiento anterior hasta que los niveles de endotoxinas disminuyeron a ≤ 5 UE/mg. En los casos en que el nivel de endotoxinas fue superior a 5 UE/mg y se estabilizó después de dos tratamientos consecutivos con Etox, se establecieron condiciones de cromatografía de intercambio aniónico o de interacción hidrofóbica para que la proteína eliminara las endotoxinas restantes.

Determinación de la afinidad de los dominios FN3 de unión a EGFR seleccionados a EGFR-Fc (afinidad de EGFR-Fc)

45 La afinidad de unión de determinados dominios FN3 de unión a EGFR al dominio extracelular de EGFR recombinante se caracterizó adicionalmente por métodos de resonancia de plasmón superficial usando un Proteon Instrument (BioRad). La configuración del ensayo (preparación de chip, captura de EGFR-Fc) fue similar a la descrita anteriormente para el análisis de la velocidad de disociación. Los dominios FN3 de unión a EGFR seleccionados se analizaron a una concentración de 1 µM en dilución en serie 3 veces en la orientación horizontal.
 50 También se inyectó una muestra de tampón para controlar la estabilidad basal. La fase de disociación para todas las concentraciones de cada dominio FN3 de unión a EGFR se monitorizó a un caudal de 100 µl/min durante 30 minutos (para aquellos con una $k_{off} \sim 10^{-2} s^{-1}$ a partir del cribado de la velocidad de disociación), o 1 hora (para aquellos con $k_{off} \sim 10^{-3} s^{-1}$ o más lento). Se restaron dos conjuntos de datos de referencia de los datos de respuesta: 1) las señales entre puntos para corregir las interacciones inespecíficas entre el dominio FN3 de unión a EGFR y la superficie de IgG inmovilizada; 2) las señales del canal de tampón para corregir la desviación basal debido a la

disociación de la superficie de EGFR-Fc capturada en el tiempo. Los datos de unión procesados en todas las concentraciones para cada dominio FN3 se ajustaron globalmente a un modelo de unión de Langmuir simple 1:1 para extraer estimaciones de las constantes cinéticas (k_{on} , k_{off}) y de afinidad (K_D). La Tabla 5 muestra las constantes cinéticas para cada una de las construcciones, con una afinidad que varía de 200 pM a 9,6 nM.

5 **Unión de dominios FN3 de unión a EGFR seleccionados al EFGR en las células ("Ensayo de unión en células A431")**

10 Las células A431 se sembraron en placas a 5.000/pocillo en placas negras opacas de 96 pocillos y se dejaron unir durante la noche a 37 °C, en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Se añadieron dominios FN3 de unión a EGFR purificados (1,5 nM a 30 μM) a las células (en 50 ul) durante 1 hora a temperatura ambiente en placas por triplicado. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron 3 veces con 150 μl/pocillo de tampón de tinción FACS. Las células se incubaron con 50 μl/pocillo de conjugado de anticuerpo anti-penta His-Alexa488 (Qiagen) diluido a 1:100 en tampón de tinción FACS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 150 μl/pocillo de tampón de tinción FACS, después de lo cual se llenaron los pocillos con 100 μl de tampón de tinción FACS y se leyó la fluorescencia a 488 nm usando un lector Acumen eX3. Los datos se representaron como señal de fluorescencia sin procesar frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3 y se ajustaron a una curva de dosis-respuesta sigmoideal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (software GraphPad) para calcular los valores de CE₅₀. La Tabla 5 muestra los valores de CE₅₀ para cada una de las construcciones que van desde 2,2 nM hasta > 20 μM.

Inhibición de la unión de EGF a EGFR en células utilizando dominios FN3 de unión a EGFR seleccionados (ensayo de competición DE EGF EN células A431)

25 Las células A431 se sembraron en placas a 5.000/pocillo en placas negras opacas de 96 pocillos y se dejaron unir durante la noche a 37 °C, en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Los dominios FN3 de unión a EGFR purificados (1,5 nM a 30 μM) se añadieron a las células (50 μl/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente en placas por triplicado. Se añadió EGF biotinilado (Invitrogen, n.º de cat: E-3477) a cada pocillo para dar una concentración final de 30 ng/ml y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 150 μl/pocillo de tampón de tinción FACS. Las células se incubaron con 50 μl/pocillo de conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (Invitrogen) diluido a 1:100 en tampón de tinción FACS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 150 μl/pocillo de tampón de tinción FACS, después de lo cual se llenaron los pocillos con 100 μl de tampón de tinción FACS y se leyó la fluorescencia a 600 nm usando un lector Acumen eX3. Los datos se representaron como la señal de fluorescencia en bruto frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3 y se ajustaron a una curva de dosis-respuesta sigmoideal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (software GraphPad) para calcular los valores de CI₅₀. La Tabla 5 indica los valores de CI₅₀ que van desde 1,8 nM a 121 nM.

40 **Inhibición de la fosforilación de EGFR estimulada por EGF (ensayo de Fosfo-EGFR)**

Los dominios FN3 seleccionados que inhibieron significativamente la fosforilación de EGFR estimulada por EGF se evaluaron más completamente midiendo los valores de CI₅₀ para la inhibición. La inhibición de la fosforilación de EGFR estimulada por EGF se evaluó a concentraciones variables del dominio FN3 (0,5 nM a 10 μM) como se ha descrito anteriormente en la "inhibición de la fosforilación de EGFR estimulada por EGF". Los datos se representaron como una señal de electroquimioluminiscencia frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3 y los valores de la CI₅₀ se determinaron ajustando los datos a una respuesta de dosis sigmoideal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). La Tabla 5 muestra los valores de CI₅₀ que variaron de 18 nM a > 2,5 μM.

50 **Inhibición del crecimiento de células tumorales humanas (ensayo de crecimiento NCI-H292 y de crecimiento NCI-H322)**

La inhibición del crecimiento de células dependientes de EGFR se evaluó mediante la medición de la viabilidad de las líneas celulares de tumores humanos con sobreexpresión de EGFR, NCI-H292 y NCI-H322 (Colección Americana de Cultivos Tipo, n.º cat. CRL-1848 & # CRL-5806, respectivamente), siguiendo

Tabla 5.

Dominio FN3 ID del clon	SEQ ID NO:	EGFR-Fc Afinidad (nM)	A431	Célula A431	Fosfo- EGFR	NCI-H292 Crecimiento	NCI-H322 Crecimiento
			Unión celular	EGF Competencia			
			CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)
P53A1R5-17	18	1,89	4,0	9,8	> 2500	86	65
P54AR4-17	19	9,62	16	21	184	ND:	ND:

P54AR4-47	20	2,51	8,6	7,1	295	44	39
P54AR4-48	21	7,78	12	9,8	170	ND:	ND:
P54AR4-73	22	0.197	9,4	4,6	141	83	73
P54AR4-74	23	ND:	77	ND:	ND:	ND:	ND:
P54AR4-81	24	ND:	84	121	ND	ND	ND
P54AR4-83	25	0.255	2,2	1,8	18	5,9	9,2
P54CR4-31	26	0.383	> 20000	55	179	1150	> 3073

5 exposición a los dominios FN3 de unión a EGFR. Las células se sembraron en placas a 500 células/pocillo (NCI-H292) o 1.000 células/pocillo (NCI-H322) en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido (Nunc) en 100 μ l/pocillo de medio RPMI (Gibco) que contenía GlutaMAX™ con HEPES 10 mM suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado con calor (FBS) (Gibco) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco) y se dejó unir durante la noche a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Las células se trataron mediante la adición de 5 μ l/pocillo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía un intervalo de concentración de dominios FN3 de unión a EGFR. Los controles se trataron con 5 μ l/pocillo de PBS solo o ácido etilendiaminotetraacético 25 mM en PBS. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 120 horas. Las células viables se detectaron mediante la adición de 75 μ l/pocillo de reactivo CellTiter-Glo® (Promega), seguido de la mezcla en un agitador de placas durante 2 minutos e incubación en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos adicionales. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) configurado en modo de luminiscencia, con un tiempo de lectura de 0,5 segundos/pocillo contra un blanco de medio solamente.

10 Los datos se representaron como un porcentaje del crecimiento celular tratado con PBS frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3. Los valores de la CI₅₀ se determinaron ajustando los datos a la ecuación para una respuesta de dosis sigmoideal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). La Tabla 5 muestra los valores de la CI₅₀ que van desde 5,9 nM a 1,15 μ M y de 9,2 nM a > 3,1 μ M, utilizando las células NCI-H292 y NCI-H322 respectivamente. La Tabla 5 muestra el resumen de las propiedades biológicas de los dominios FN3 de unión a EGFR para cada ensayo.

20 Ejemplo 4 Ingeniería de los dominios FN3 de unión a EGFR

Un subconjunto de los dominios FN3 de unión a EGFR se diseñó para aumentar la estabilidad conformacional de cada molécula. Las mutaciones L17A, N46V y E86I que han demostrado mejorar la estabilidad del dominio FN3 (descritas en la publicación de patente de e86I que han demostrado mejorar la estabilidad del dominio FN3 (descritas en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2011/0274623) se incorporaron en los clones P54AR4-83, P54CR4-31 y P54AR4-37 por síntesis de ADN. Los nuevos mutantes, P54AR5-83v2, P54CR431-v2 y P54AR4-37v2 se expresaron y purificaron como se ha descrito anteriormente. Se usó calorimetría diferencial de barrido en PBS para evaluar la estabilidad de cada mutante para compararla con la de la molécula original correspondiente. La tabla 6 muestra que cada molécula variante se estabilizó significativamente, con un aumento promedio en la T_m de 18,5 °C.

Tabla 6.

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

35 **Ejemplo 5 Selección de dominios de fibronectina de tipo III (FN3) que se unen a c-Met e inhiben la unión a HGF**

Exploración de tipo *panning* en c-Met humano

40 La biblioteca TCL14 se analizó frente al dominio extracelular c-Met humano biotinilado (bt-c-Met) para identificar dominios FN3 capaces de unirse específicamente a c-Met. Para las selecciones, 3 μ g de la biblioteca TCL14 se transcribieron y tradujeron *in vitro* (TTIV) en el extracto lineal S30 de *E. coli* (Promega, Madison, WI) y la biblioteca expresada se bloqueó con Cis Block (BSA al 2 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 μ g/ml de ADN de esperma de

arenque (Promega), 1 mg/ml de heparina (Sigma-Aldrich)). Para las selecciones, se añadió bt-c-Met a concentraciones de 400 nM (Ronda 1), 200 nM (Rondas 2 y 3) y 100 nM (Rondas 4 y 5). Los miembros de la biblioteca unidos se recuperaron usando esferas magnéticas de neutravidina (Thermo Fisher, Rockford, IL) (Rondas 1, 3 y 5) o esferas magnéticas de estreptavidina (Promega) (Rondas 2 y 4) y los miembros de la biblioteca no unidos se eliminaron lavando las esferas 5 –14 veces con 500 μ l de PBS–T, seguido de 2 lavados con 500 μ l de PBS.

Se realizaron rondas de selección adicionales para identificar las moléculas de los dominios FN3 con afinidades mejoradas. En resumen, los resultados de la ronda 5 se prepararon como se ha descrito anteriormente y se sometieron a rondas de selección iterativas adicionales con los siguientes cambios: la incubación con bt-c-Met se redujo de 1 hora a 15 minutos y la captura de las esferas se redujo de 20 minutos a 15 minutos, bt-c-Met disminuyó a 25 nM (Rondas 6 y 7) o 2,5 nM (Rondas 8 y 9), y se realizó un lavado adicional de 1 hora en presencia de un exceso de c-Met no biotinilado. El objetivo de estos cambios fue seleccionar simultáneamente los ligadores con una velocidad de asociación potencialmente más rápida y una velocidad de disociación más lenta, que produzca una K_D sustancialmente menor.

Los resultados de las rondas 5, 7 y 9 se clonaron por PCR en un vector pET 15 modificado (EMD Biosciences, Gibbstown, NJ) que contiene un sitio de clonación independiente de la ligasa (pET15–LIC) utilizando los cebadores TCON6 (SEQID NO 30) y TCON5 E86l corto (SEQ ID NO 31) y las proteínas se expresaron como proteínas marcadas con His6 en el extremo C después de las transformaciones y la inducción de IPTG (1 mM final, 30 °C durante 16 horas) utilizando protocolos estándar. Las células se recogieron por centrifugación y posteriormente se lisaron con Bugbuster HT (EMD Biosciences) suplementado con 0,2 mg/ml de lisozima blanca de huevo de pollo (Sigma-Aldrich). Los lisados bacterianos se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se transfirieron a nuevas placas de 96 pocillos profundos.

25 **Detección de dominios FN3 que inhiben la unión de HGF a c-Met**

Se realizó un cribado de los dominios FN3 en lisados de *E. coli* para determinar su capacidad para inhibir la unión de HGF al dominio extracelular de c-Met purificado en un formato bioquímico de quimera de cMet Fc humana recombinante (0,5 μ g/ml en PBS, 100 μ l/pocillo) se recubrió en placas de 96 pocillos White Maxisorp (Nunc) y se incubó durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron dos veces con 300 μ l/pocillo de solución salina tamponada con Tris con Tween 20 al 0,05 % (TBS–T, Sigma-Aldrich) en una lavadora de placas Biotek. Las placas de ensayo se bloquearon con StartingBlock T20 (200 μ l/pocillo, Thermo Fisher Scientific, Rockland, IL) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con agitación y nuevamente se lavaron dos veces con 300 μ l de TBS–T. Los lisados del dominio FN3 se diluyeron en StartingBlock T20 (de 1:10 a 1:100.000) usando el sistema de robótica Hamilton STARplus. Los lisados (50 μ l/pocillo) se incubaron en placas de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Sin lavar las placas, se añadió bt-HGF (1 μ g/ml en StartingBlock T20, 50 μ l/pocillo, biotinilado) a la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Los pocillos de control que contenían lisados Tencon27 recibieron el bloque de inicio T20 o bt-HGF diluido. Las placas se lavaron a continuación cuatro veces con 300 μ l/pocillo de TBS–T y se incubaron con 100 μ l/pocillo de estreptavidina-HRP (1:2000 en TBS–T, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 30–40 minutos a temperatura ambiente con agitación. Nuevamente, las placas se lavaron cuatro veces con TBS–T. Para desarrollar la señal, se añadió sustrato de quimioluminiscencia POD (50 μ l/pocillo, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a la placa y en aproximadamente 3 minutos se leyó la luminiscencia en Molecular Devices M5 utilizando SoftMax Pro. El porcentaje de inhibición se determinó usando el siguiente cálculo: $100 - ((ULR_{muestra} - ULR_{media_{sin\ bt-HGF}}) / (ULR_{media_{bt-HGF\ control}} - ULR_{media_{sin\ bt-HGF\ control}})) * 100$. Los valores del porcentaje de inhibición del 50 % o más se consideraron aciertos.

Expresión y purificación de alto rendimiento de dominios FN3

Los dominios FN3 marcados con His se purificaron a partir de lisados de *E. coli* clarificados con placas His MultiTrap™ HP (GE Healthcare) y se eluyeron en tampón que contenía fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM e imidazol 250 mM a pH 7,4. Las muestras purificadas se intercambiaron en PBS a pH 7,4 para su análisis utilizando placas PD MultiTrap™ G–25 (GE Healthcare).

55 **Determinación de la CI_{50} de la inhibición de la unión de HGF a c-Met**

Los dominios FN3 seleccionados se caracterizaron aún más en el ensayo de competición HGF. Las curvas de respuesta a la dosis para dominios FN3 purificados se generaron utilizando el ensayo descrito anteriormente (concentraciones iniciales de 5 μ M). Se calcularon los valores de porcentaje de inhibición. Los datos se representaron como el % de inhibición frente al logaritmo de las concentraciones molares del dominio FN3 y los valores de la CI_{50} se determinaron ajustando los datos a una respuesta de dosis sigmoidea con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4.

Se identificaron 35 secuencias únicas de la Ronda 5 para mostrar actividad a diluciones de 1:10, con valores de CI_{50} que van desde 0,5 a 1500 nM. La ronda 7 produjo 39 secuencias únicas con actividad a diluciones de valores de 1:100 y CI_{50} que oscilan entre 0,16 y 2,9 nM. Se identificaron 66 secuencias únicas de la Ronda 9, en la que los

aciertos se definieron como activos a diluciones de 1:1000. Se observaron valores de Cl_{50} de tan solo 0,2 nM en la Ronda 9 (Tabla 8).

Determinación de afinidad de los dominios FN3 de unión a c-Met seleccionados a c-Met-Fc (afinidad de c-Met-Fc)

Las afinidades se determinaron para los dominios FN3 de unión a c-Met seleccionados de acuerdo con el protocolo descrito para la determinación de las afinidades al dominio de FN3 de unión a EGFR en el Ejemplo 3, excepto que en los experimentos se usó la proteína de fusión c-Met-Fc.

Ejemplo 6 Caracterización de los dominios FN3 que se unen a c-Met e inhiben la unión de HGF

Los dominios FN3 se expresaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La cromatografía de exclusión por tamaño y el análisis cinético se realizaron como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente. La Tabla 7 muestra las secuencias de la cadena C, el bucle CD, la cadena F y el bucle FG, y una SEQ ID NO: para la secuencia completa de aminoácidos para cada dominio.

Tabla 7.

Clon		Bucle C	Cadena CD	Bucle F	Cadena FG
Nombre	SEQ ID NO:				
P114AR5P74-A5	32	FDSFWIRYDE	VVVGGE	TEYYVNILGV	KGGSISV
P114AR5P75-E9	33	FDSFFIRYDE	FLRSGE	TEYWVTILGV	KGGLVST
P114AR7P92-F3	34	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYIVNIMGV	KGGSISH
P114AR7P92-F6	35	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNILGV	KGGGLSV
P114AR7P92-G8	36	FDSFVIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P92-H5	37	FDSFWIRYLE	FLLGGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P93-D11	38	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVGINGV	KGGYISY
P114AR7P93-G8	39	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYGVTINGV	KGGRVST
P114AR7P93-H9	40	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIIGV	KGGHISL
P114AR7P94-A3	41	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGKISP
P114AR7P94-E5	42	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYAVNIMGV	KGGRVSV
P114AR7P95-B9	43	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGSISV
P114AR7P95-D3	44	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVNIMGV	KGGSISY
P114AR7P95-D4	45	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQILGV	KGGYISI
P114AR7P95-E3	46	FDSFWIRYFE	FLGSGE	TEYVVQIMGV	KGGTVSP
P114AR7P95-F10	47	FDSFWIRYFE	FTTAGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-G7	48	FDSFWIRYFE	LLSTGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
P114AR7P95-H8	49	FDSFWIRYFE	FVSKGE	TEYVVNIMGV	KGGSISP
Los residuos del bucle C corresponden a los residuos 28-37 de la SEQ ID NO. Los residuos de la cadena CD corresponden a los residuos 38-43 de la SEQ ID NO. Los residuos del bucle F corresponden a los residuos 65-74 de la SEQ ID NO: indicada Los residuos de la cadena FG corresponden a los residuos 75-81 de la SEQ ID NO.					

Unión de los dominios FN3 de c-Met seleccionados a c-Met en células ("Ensayo de unión en células H441")

Se sembraron células NCI-H441 (n.º de cat. HTB-174, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) a 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo negro transparente recubiertas con poli-D-lisina (BD Biosciences, San Jose, CA) y se dejó unir durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadieron los dominios FN3 purificados (50 µl/pocillo; 0 a 1000 nM) a las células durante 1 hora a 4 °C en placas duplicadas. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con tampón de tinción FACS (150 µl/pocillo, BD Biosciences, n.º de cat. 554657). Las células se incubaron con anticuerpo anti-HIS biotinilado (diluido a 1:160 en tampón de tinción FACS, 50 µl/pocillo, R&D Systems, n.º de cat. BAM050) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón de tinción FACS (150 µl/pocillo), tras lo cual los pocillos se incubaron con anticuerpo conjugado IgG1-Alexa 488 anti-ratón (diluidos a 1:80 en tampón de tinción FACS, 50 µl/pocillo, Life Technologies, n.º de cat. A21121) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón de tinción FACS (150 µl/pocillo) y se dejaron en el tampón de tinción FACS (50 µl/pocillo). La fluorescencia total se determinó utilizando un lector

Acumen eX3. Los datos se representaron como señal de fluorescencia sin procesar frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3 y se ajustaron a una curva de dosis-respuesta sigmoideal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (software GraphPad) para calcular los valores de CE_{50} . Se encontró que los dominios FN3 exhibían un rango de actividades de unión, con valores de CE_{50} entre 1,4 nM y 22,0 nM, como se muestra en la Tabla 8.

Inhibición de la fosforilación de C-Met estimulada por HGF

Los dominios FN3 purificados se analizaron para determinar su capacidad para inhibir la fosforilación de c-Met estimulada por HGF en NCI-H441, utilizando el kit c-Met fosfo (Tyr1349) de Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD). Las células se sembraron en placas a 20.000/pocillo en placas transparentes tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos (Nunc) en 100 μ l/pocillo de medio RPMI (que contenía GlutaMAX y HEPES, Life Technologies) con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Life Technologies) y se dejó unir durante la noche a 37 °C con CO_2 al 5 %. El medio de cultivo se eliminó completamente y las células se dejaron sin alimento durante la noche en medio RPMI sin suero (100 μ l/pocillo) a 37 °C, CO_2 al 5 %. Las células se rellenaron con medio RPMI libre de suero fresco (100 μ l/pocillo) que contenía dominios FN3 a una concentración de 20 μ M e inferior durante 1 hora a 37 °C, CO_2 al 5 %. Los controles se trataron con medio solamente. Las células se estimularon con 100 ng/ml de HGF humano recombinante (100 μ l/pocillo, R&D Systems n. ° de cat. 294-HGN) y se incubaron a 37 °C, CO_2 al 5 % durante 15 minutos. Un conjunto de pocillos de control se dejó sin estimular como controles negativos. El medio se eliminó completamente y las células se lisaron con tampón de lisis completa (50 μ l/pocillo, Meso Scale Discovery) durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, según las instrucciones del fabricante. Las placas de ensayo configuradas para medir c-Met fosforilado se bloquearon con la solución de bloqueo provista según las instrucciones del fabricante a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron después tres veces con tampón de lavado Tris (200 μ l/pocillo, Meso Scale Discovery). Los lisados celulares (30 μ l/pocillo) se transfirieron a placas de ensayo y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Las placas de ensayo se lavaron después cuatro veces con tampón de lavado Tris, después de lo cual se añadió solución de anticuerpo de detección helada (25 μ l/pocillo, Meso Scale Discovery) a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se enjuagaron de nuevo cuatro veces con tampón de lavado Tris. Las señales se detectaron mediante la adición de 150 μ l de lectura (150 μ l/pocillo, Meso Scale Discovery) y la lectura en un instrumento SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery) usando las configuraciones predeterminadas específicas del ensayo instaladas por el fabricante. Los datos se representaron como una señal de electroquimioluminiscencia frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3 y los valores de CI_{50} se determinaron ajustando los datos a una respuesta de dosis sigmoideal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4. Se encontró que los dominios FN3 inhibían c-Met fosforilado con valores de CI_{50} que varían de 4,6 nM a 1415 nM, como se muestra en la Tabla 8.

Inhibición del crecimiento de células tumorales humanas

La inhibición del crecimiento de células dependientes de c-Met se evaluó midiendo la viabilidad de las células U87-MG (Colección Americana de Cultivos Tipo, n. ° de cat. HTB-14), después de la exposición a los dominios FN3 que se unen a c-Met. Las células se sembraron en placas a 8000 células/pocillo en placas opacas tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos (Nunc) en 100 μ l/pocillo de medio RPMI suplementado con FBS al 10 % y se dejó unir durante la noche a 37 °C con CO_2 al 5 %. Veinticuatro horas después de la siembra, se aspiró el medio y las células se rellenaron con medio RPMI sin suero.

Tabla 8.

Clon		Afinidad (Kd, nM)	HGF competencia CI_{50} (nM)	H441 Unión celular (CE_{50} , nM)	inhibición de pMet en células H441 (CI_{50} , nM)	Inhibición de proliferación de células U87-MG (CI_{50} , nM)
Nombre	SEQ ID NO:					
P114AR5P74-A5	32	10,1	5,2	18,7	1078	464,4
P114AR5P75-E9	33	45,8	51,9	ND	1415	1193,9
P114AR7P92-F3	34	0,4	0,2	1,5	8,3	2,7
P114AR7P92-F6	35	3,1	2,2	4,9	165,3	350,5
P114AR7P92-G8	36	1,0	1,6	5,9	155,3	123,9
P114AR7P92-H5	37	11,6	ND	22,0	766,4	672,3
P114AR7P93-D11	38	ND	ND	2,3	16	14,4
P114AR7P93-G8	39	6,9	1	3,8	459,5	103,5
P114AR7P93-H9	40	3,3	2,9	12,9	288,2	269,9

P114AR7P94–A3	41	0,4	0,2	1,4	5	9,3
P114AR7P94–E5	42	4,2	0,7	3,4	124,3	195,6
P114AR7P95–B9	43	0,5	0,3	ND	9,8	17,4
P114AR7P95–D3	44	0,3	0,2	1,5	4,6	1,7
P114AR7P95–D4	45	0,4	ND	1,4	19,5	19,4
P114AR7P95–E3	46	1,5	ND	3,2	204,6	209,2
P114AR7P95–F10	47	4,2	1,4	4,4	187,6	129,7
P114AR7P95–G7	48	20,0	ND	11,3	659,3	692
P114AR7P95–H8	49	3,7	ND	4,1	209,8	280,7

5 Veinticuatro horas después de la inanición del suero, las células se trataron mediante la adición de un medio sin suero que contenía los dominios FN3 de unión a c-Met (30 μ l/pocillo). Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 72 horas. Las células viables se detectaron mediante la adición de 100 μ l/pocillo de reactivo CellTiter-Glo® (Promega), seguido de la mezcla en un agitador de placas durante 10 minutos. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices) configurado en modo de luminiscencia, con un tiempo de lectura de 0,5 segundos/pocillo. Los datos se representaron como unidades de luminiscencia sin procesar (ULR) frente al logaritmo de la concentración molar del dominio FN3. Los valores de CI₅₀ se determinaron ajustando los datos a una ecuación para una respuesta de dosis sigmoïdal con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4. La Tabla 8 indica valores de CI₅₀ que van desde 1 nM hasta > 1000 nM.

Las características de los dominios FN3 de unión a c-Met se resumen en la Tabla 8.

Estabilidad térmica de los dominios FN3 de unión a c-Met

15 Se usó calorimetría diferencial de barrido en PBS para evaluar la estabilidad de cada dominio FN3. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9.

Clon		Estabilidad térmica (T _m , C)
Nombre	SEQ ID NO:	
P114AR5P74–A5	32	74,1
P114AR5P75–E9	33	ND
P114AR7P92–F3	34	81,5
P114AR7P92–F6	35	76,8
P114AR7P92–G8	36	90,9
P114AR7P92–H5	37	87
P114AR7P93–D11	38	ND
P114AR7P93–G8	39	76,8
P114AR7P93–H9	40	88,2
P114AR7P94–A3	41	86,2
P114AR7P94–E5	42	80
P114AR7P95–B9	43	86,3
P114AR7P95–D3	44	82
P114AR7P95–D4	45	85,3
P114AR7P95–E3	46	94,2
P114AR7P95–F10	47	85,2
P114AR7P95–G7	48	87,2
P114AR7P95–H8	49	83

20

EJEMPLO 7. Generación y caracterización de moléculas biespecíficas anti-EGFR/c-Met

Generación de moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met

5 Numerosas combinaciones de los dominios FN3 de unión a EGFR y c-Met descritos en los Ejemplos 1-6 se unieron en moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a EGFR como a c-Met. Además, los dominios FN3 de unión a EGFR que tienen secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 107-110 y los dominios FN3 de unión a c-Met que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 111-114 se hicieron y se unieron en moléculas biespecíficas. Se crearon genes sintéticos para codificar las secuencias de aminoácidos descritas en las SEQ ID NO: 50-72, 106, 118-121 o 190-193 (Tabla 10) de manera que se mantuvo el siguiente formato: dominio FN3 de unión a EGFR seguido de un enlazador peptídico seguido de un dominio FN3 de unión a c-Met. Se incorporó una cola de poli-histidina en el extremo C-terminal para ayudar a la purificación. Además de las moléculas descritas en la Tabla 10, el enlazador entre los dos dominios FN3 se varió según la longitud, la composición de la secuencia y la estructura de acuerdo con las enumeradas en la Tabla 11. Está previsto que se puedan usar otros numerosos enlazadores para unir dichos dominios FN3. Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met se expresaron y se purificaron a partir de *E. coli* como se describe para los dominios FN3 mono-específicos de EGFR o de c-Met usando etapas de IMAC y de cromatografía de filtración en gel. Es evidente para los expertos en la materia que las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met pueden contener o no una metionina iniciadora. Las moléculas de ejemplo con la metionina iniciadora son moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 106, 118-121, 138-165, 190 y 192, y las moléculas de ejemplo sin metionina iniciadora se muestran en las SEQ ID NO: 50-72, 191 y 193. La presencia de la metionina iniciadora para los dominios FN3 de unión a EGFR asegura una actividad adecuada; la metionina iniciadora tiene menos impacto en los dominios FN3 de c-Met.

Tabla 10.

Molécula biespecífica de EGFR/c-Met		Dominio FN3 de unión a EGFR		Dominio FN3 de unión a cMET		Enlazador	
Clon D	SEQ ID NO:	ID del clon	SEQ ID NO:	Clon D	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
ECB1	50	P54AR4-83v2	27	P114AR5P74-A5	32	(GGGGS) ₄	79
ECB2	51	P54AR4-83v2	27	P114AR7P94-A3	41	(GGGGS) ₄	79
ECB3	52	P54AR4-83v2	27	P114AR7P93-H9	40	(GGGGS) ₄	79
ECB4	53	P54AR4-83v2	27	P114AR5P75-E9	33	(GGGGS) ₄	79
ECB5	54	P53A1R5-17v2	107	P114AR7P94A3	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

Molécula biespecífica de EGFR/c-Met		Dominio FN3 de unión a EGFR		Dominio FN3 de unión a cMET		Enlazador	
Clon D	SEQ ID NO:	ID del clon	SEQ ID NO:	Clon D	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
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

Tabla 11.

Enlazador	SEQ ID NO:	Longitud del enlazador en aminoácidos	Estructura
GS	78	2	Desordenado
GGGGS	105	5	Desordenado
(GGGGS) ₂	224	10	Desordenado
(GGGGS) ₄	79	20	Desordenado
(AP) ₂	80	4	Rígido
(AP) ₅	81	5	Rígido
(AP) ₁₀	82	20	Rígido
(AP) ₂₀	83	40	Rígido
A(EAAAK) ₅ AAA	84	29	α-helicoidal

Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met mejoran la potencia en comparación con las moléculas mono-específicas solas, lo que sugiere avidéz

5

Las células NCI-H292 se sembraron en placas de 96 pocillos en medio RPMI que contenía FBS al 10 %. 24 horas después, el medio se reemplazó con RPMI sin suero. 24 horas después de la inanición del suero, las células se trataron con concentraciones variables de dominios FN3: un dominio EGFR FN3 mono-específico de alta afinidad (P54AR4-83v2), un dominio FN3 mono-específico de c-Met de afinidad débil (P114AR5P74-A5), la mezcla de los dos dominios FN3 mono-específicos de EGFR y c-Met o moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met que comprenden el dominio FN3 de c-Met de baja afinidad unido al dominio FN3 de EGFR de alta afinidad (ECB1). Las células se trataron durante 1 hora con las moléculas mono-específicas o biespecíficas y luego se estimularon con EGF, HGF o una combinación de EGF y HGF durante 15 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se lisaron con tampón de lisis de MSD y la señalización celular se evaluó utilizando las placas de ensayo de MSD adecuadas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se ha descrito anteriormente.

10

15

El dominio FN3 de c-Met de baja afinidad inhibió la fosforilación de c-Met con una CI₅₀ de 610 nM (Figura 4). Como era de esperar, el dominio FN3 de EGFR no pudo inhibir la fosforilación de c-Met y la mezcla de las moléculas mono-específicas parecía idéntica al dominio FN3 de c-Met solo. Sin embargo, la molécula biespecífica de EGFR/c-Met inhibió la fosforilación de c-Met con una CI₅₀ de 1 nM (Figura 4), proporcionando un cambio de más de 2 log en la mejora de la potencia en relación con el mono-específico de c-Met solo.

20

El potencial de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met para mejorar la inhibición de la fosforilación de c-Met y/o EGFR a través de un efecto de avidéz se evaluó en múltiples tipos de células con densidades y proporciones variables de c-Met y EGFR (Figura 5). Las células NCI-H292, NCI-H441 o NCI-H596 se sembraron en placas de 96 pocillos en medio RPMI que contenía FBS al 10 %. 24 horas después, el medio se reemplazó con RPMI sin suero. 24 horas después de la inanición del suero, las células se trataron con concentraciones variables de cualquiera de los dominios FN3 mono-específicos de unión a EGFR, del dominio FN3 mono-específico de c-Met o de una molécula biespecífica de EGFR/c-Met (ECB5, compuesta por P53A1R5-17v2 y P114AR7P94-A3). Las células se trataron durante 1 hora con las moléculas mono-específicas o biespecíficas y luego se estimularon con EGF, HGF o una combinación de EGF y HGF durante 15 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se lisaron con tampón de lisis de MSD y la señalización celular se evaluó utilizando las placas de ensayo de MSD adecuadas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se ha descrito anteriormente.

30

35

La Figura 5 (A–C) muestra la inhibición de EGFR utilizando un dominio mono-específico FN3 de unión a EGFR en comparación con una molécula bis-específica de EGFR/cMet en tres líneas celulares diferentes. Para evaluar la avidéz en un ensayo de fosforilación de EGFR, se comparó un dominio FN3 de unión a EGFR de afinidad media (1,9 nM) (P53A1R5–17v2) con una molécula bis-específica de EGFR/c–Met que contiene el mismo dominio FN3 de unión a EGFR unida a un dominio FN3 de unión a c–Met de alta afinidad (0,4 nM) (P114AR7P94–A3). En las células H292 y H596, la inhibición de la fosforilación de EGFR fue comparable para las moléculas mono-específicas y bis-específicas (Figuras 5A y 5B), probablemente debido a que estas líneas celulares tienen una alta proporción de EGFR a receptores de c-Met. Para probar esta teoría, se evaluó la inhibición de la fosforilación de EGFR en células NCI-H441 que exhiben más receptores de C-Met que EGFR. El tratamiento de las células NCI-H441 con la molécula bis-específica de EGFR/c-Met redujo la CI_{50} para la inhibición de la fosforilación de EGFR en comparación con el dominio FN3 mono-específico de unión a EGFR en 30 veces (Figura 5C).

El potencial de la potencia mejorada con una molécula bis-específica de EGFR/c-Met se evaluó en un ensayo de fosforilación de c-Met utilizando una molécula con una alta afinidad por EGFR (0,26 nM) y afinidad media por c-Met (10,1 nM). Tanto en las células NCI–H292 como en las células NCI–H596, la inhibición de la fosforilación de c–Met se mejoró con la molécula bis-específica en comparación con el dominio FN3 mono-específico de unión a c–Met, en 134 y 1012 veces, respectivamente (Figura 3D y 3E).

Se verificó que la potencia mejorada para la inhibición de la fosforilación de EGFR y c-Met con las moléculas bis-específicas de EGFR/c-Met se tradujo en una inhibición mejorada de la señalización y la proliferación. Para estos experimentos, la mezcla de dominios FN3 de unión a EGFR y de unión a c-Met se comparó con una molécula bis-específica de EGFR/c-Met. Como se describe en las Tablas 12 y 13, los valores de CI_{50} para la fosforilación de ERK (Tabla 12) y la proliferación de células H292 (Tabla 13) disminuyeron cuando las células se trataron con la molécula bis-específica de EGFR/c-Met en comparación con la mezcla de los enlazadores mono-específicos. La CI_{50} para la inhibición de la fosforilación de ERK para la molécula bifásica de EGFR/c-Met fue 143 veces más baja en comparación con la mezcla de los dos dominios FN3 mono-específicos de EGFR y c-Met, mostrando el efecto de la avidéz en la potencia de las moléculas en este ensayo. En la Tabla 12, los dominios mono-específicos FN3 de unión a EGFR y c-Met no inhiben completamente la actividad y, por lo tanto, los valores de CI_{50} mostrados deben considerarse límites inferiores. El ensayo de proliferación se completó utilizando diferentes combinaciones de dominios FN3 de unión a EGFR y c-Met, ya sea como una mezcla o enlazados en un formato bis-específico. La CI_{50} para la inhibición de la proliferación de la molécula bis-específica de EGFR/c-Met fue 34-236 veces más baja con respecto a la mezcla de los dominios FN3 mono-específicos de unión a EGFR o c-Met parental. Esto confirmó que el efecto de avidéz observado a nivel de los receptores (Figura 4 y Figura 5) se traduce en una mejora en la inhibición de la señalización celular (Tabla 12) y la proliferación celular (Tabla 13).

Tabla 12.

Especificidad de la molécula de dominio FN3	N.º de clon	Tipo	CI_{50} (nM) (fosforilación de ERK)
EGFR	P54AR4–83v2	mono-específico	> 10.000
c-Met	P114AR5P74–A5	mono-específico	2366
EGFR o c–Met	P54AR4–83v2 + P114AR5P74–A5	mezcla de moléculas mono-específicas	798,4
EGFR y c–Met	ECB1	bis-específico	5,6

Tabla 13.

Dominio FN3 de unión a EGFR (afinidad)	Dominio FN3 de unión a c–Met (afinidad)	CI_{50} para mezcla de mono-específicos (nM)	CI_{50} para bis-específicos (nM)	Incremento en la CI_{50} para bis-específicos/mezcla de mono-específicos
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

Xenoinjertos tumorales *in vivo*: PK/PD

5 Con el fin de determinar la eficacia de las moléculas mono-específicas y bio-específicas de dominios FN3 *in vivo*, las células tumorales se diseñaron para secretar HGF humano (el HGF murino no se une a Met humano). El HGF humano se expresó de manera estable en las células NCI-H292 utilizando una infección lentiviral (vector de ADN lentiviral que expresa HGF humano (número de registro X16322) y un kit de empaquetamiento lentiviral de Genecopoeia). Después de la infección, se seleccionaron células que expresaban HGF con 4 µg/ml de puromicina (Invitrogen). La proteína HGF humana se detectó en el medio acondicionado de las células reunidas utilizando
10 placas de ensayo de MesoScale Discovery.

Se inoculó a los ratones SCID Beige por vía subcutánea células NCI-H292 que expresaban HGF humano ($2,0 \times 10^6$ células en Cultrex (Trevigen) en un volumen de 200 µl) en el flanco dorsal de cada animal. Las mediciones del tumor se realizaron dos veces a la semana hasta que los volúmenes del tumor oscilaron entre 150 y 250 mm³. A
15 continuación, se administró a los ratones una única dosis i.p. de moléculas bio-específicas de EGFR/c-Met (unidas a un dominio de unión a la albúmina para aumentar la semivida) o vehículo PBS. A las 6 h o 72 h después de la dosificación, los tumores se extrajeron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras de sangre se recogieron mediante punción cardíaca en inhibidores de proteasa que contienen citrato al 3,8 %. Inmediatamente después de la recolección, las muestras de sangre se centrifugaron y el plasma resultante se transfirió a los tubos de muestra y se almacenó a - 80 °C. Los tumores se pesaron, se cortaron en trozos pequeños y se lisaron en tubos Lysing Matrix A (LMA) que contenían también RIPa con inhibidores de proteasa/fosfatasa HALT (Pierce), fluoruro de sodio 50 mM (Sigma), ortovanadato de sodio activado 2 mM (Sigma) y PMSF 1 mM (MesoScale
20 Discovery). Los lisados se eliminaron de la matriz de LMA y se centrifugaron para eliminar la proteína insoluble. La proteína tumoral soluble se cuantificó con un ensayo de proteína BCA y se diluyó hasta niveles de proteína equivalentes en un tampón de lisis tumoral. C-Met fosforilada, EGFR y ERK se midieron utilizando placas de ensayo de MesoScale Discovery (según el protocolo del fabricante y como se ha descrito anteriormente).
25

La figura 6 muestra los resultados de los experimentos. Cada molécula bio-específica de EGFR/c-Met redujo significativamente los niveles de c-Met, EGFR y ERK fosforilados tanto a las 6 como a las 72 horas. Los datos
30 presentados en la Figura 6 muestran la importancia de inhibir tanto c-Met como EGFR simultáneamente y cómo la afinidad de la molécula bio-específica de EGFR/c-Met para cada receptor desempeña un papel en la inhibición de ERK aguas abajo. Las moléculas que contenían los dominios FN3 de unión a EGFR de alta afinidad (P54AR4-83v2; mostradas como "8" en la Figura, $K_D = 0,26$ nM) inhibieron la fosforilación de EGFR en mayor medida en comparación con las que contienen los dominios FN3 de unión a EGFR con afinidad media (P53A1R5-17v2; mostrados como "17" en la figura $K_D = 1,9$ nM) tanto a las 6 h como a las 72 horas. Las cuatro moléculas bio-específicas analizadas inhibieron completamente la fosforilación de ERK en el punto de tiempo de 6 horas, independientemente de la afinidad. En el punto de tiempo de 72 horas, las moléculas que contienen el dominio de unión a c-Met de afinidad estrecha (P114AR7P94-A3; mostradas como "A3" en la figura $K_D = 0,4$ nM) inhibieron significativamente la fosforilación de ERK en comparación con el dominio FN3 de unión a c-Met de afinidad media (P114AR5P74-A5; mostrado como "A5" en la Figura; $K_D = 10,1$ nM; Figura 6).
40

La concentración de cada molécula bio-específica de EGFR/c-Met se midió a las 6 y 72 horas después de la dosificación en la sangre y en el tumor (Figura 7). Curiosamente, la molécula bio-específica con el dominio de unión a EGFR de afinidad media (P53A1R5-17v2; $K_D = 1,9$ nM) pero el dominio FN3 de unión a c-Met de alta afinidad (P114AR7P94-A3; $K_D = 0,4$ nM) tuvo significativamente más acumulación tumoral a las 6 horas en relación con las otras moléculas, mientras que la diferencia disminuye en 72 horas. Se puede suponer que las células fuera del tumor tienen niveles más bajos de expresión en superficie tanto de EGFR como de c-Met y, por lo tanto, la molécula de EGFR de afinidad media no se une al tejido normal en comparación con el dominio FN3 de unión a EGFR de mayor afinidad. Por lo tanto, hay más dominio FN3 de unión a EGFR de afinidad media libre disponible para unirse al tumor. Por lo tanto, la identificación de las afinidades apropiadas para cada receptor puede permitir la identificación de un agente terapéutico con toxicidades sistémicas disminuidas y una mayor acumulación de tumores.
50

Estudios de eficacia tumoral con moléculas bio-específicas de EGFR/c-Met

55 Se inoculó a los ratones SCID Beige por vía subcutánea células NCI-H292 que expresaban HGF humano ($2,0 \times 10^6$ células en Cultrex (Trevigen) en un volumen de 200 µl) en el flanco dorsal de cada animal. Una semana después de la implantación, los ratones se estratificaron en grupos con volúmenes tumorales equivalentes (volumen tumoral medio = $77,9 \pm 1,7$ mm³). Los ratones recibieron dosis tres veces a la semana de las moléculas bio-específicas y los volúmenes tumorales se registraron dos veces a la semana. Se observó inhibición del crecimiento tumoral (ICT) con cuatro moléculas bio-específicas diferentes, con afinidades variables para c-Met y EGFR. La Figura 8 muestra el beneficio de inhibir tanto c-Met como EGFR, ya que se observó un retraso en el crecimiento del tumor en los ratones tratados con moléculas que contenían el dominio FN3 de unión a EGFR de alta afinidad en comparación con el dominio FN3 de unión a EGFR de afinidad media cuando el dominio FN3 de unión a c-Met era de afinidad media (triángulos abiertos frente a cerrados, P54AR4-83v2- P114AR5P74-A5 en comparación con P53A1R5-17- P114AR5P74-A5). Además, los datos muestran la importancia de tener un dominio FN3 de unión a c-Met de alta
65

afinidad como moléculas biespecíficas que contienen el dominio FN3 de unión a EGFR de afinidad alta o media, pero el dominio FN3 de unión a c-Met de alta afinidad mostró la mayor eficacia (líneas de puntos grises y negras, P54AR4–83v2– P114AR7P94–A3 y P53A1R5–17v2– P114AR7P94–A3).

5 Eficacia de la molécula biespecífica y otros inhibidores de EGFR y c-Met

Las eficacias terapéuticas *in vivo* de una molécula biespecífica de EGFR/c-Met (ECB38) y los inhibidores de molécula pequeña crizotinib (inhibidor de c-Met) y erlotinib (inhibidor de EGFR), cetuximab (anticuerpo anti-EGFR), cada uno como agente único. y la combinación de crizotinib y erlotinib, se evaluaron en el tratamiento del modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano H292-HGF subcutáneo en ratones SCID/Beige.

Las células H292-HGF se mantuvieron *in vitro* en medio RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal (10 % v/v) y L-glutamina (2 mM) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Las células se subcultivaron de forma rutinaria dos veces a la semana mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Las células que crecían en una fase de crecimiento exponencial se recogieron y se contaron para la inoculación del tumor.

Tabla 14.

Grupo	N	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Posología Vía	Horario planeado	Horario real
1	10	Vehículo control	0	<i>ip</i>	CDx3 semanas	CDx3 semanas
2	10	Molécula biespecífica de EGFR/c–Met	25	<i>ip</i>	3 veces/semana × 3 semanas	3 veces/semana × 3 semanas
3	10	Crizotinib	50	<i>p.o.</i>	CDx3 semanas	CD × 17 días
4	10	Erlotinib	50	<i>p.o.</i>	CDx2 semanas	CD × 3 semanas
5	10	Crizotinib	50	<i>p.o.</i>	CDx3 semanas	CD × 3 semanas
6	10	Cetuximab	1 mg/ratón	<i>ip</i>	C4d * 6	C4d * 6

N: número de animal; *p.o.*: administración oral; *i.p.*: inyección intraperitoneal 3 veces/semana: las dosis se administraron los días 1, 3 y 5 de la semana.
 CD: una vez al día C4d: una vez cada cuatro días; el intervalo de la combinación de crizotinib y erlotinib fue de 0,5 horas; el volumen de dosificación se ajustó según el peso corporal (10 1/g); a: la dosis no se administró el día 14 después de la agrupación.

A cada ratón se inocularon por vía subcutánea en la región del flanco derecho células tumorales H292-HGF (2 x 6) en 0,1 ml de PBS con Cultrex (1:1) para el desarrollo del tumor. Los tratamientos se iniciaron cuando el tamaño medio del tumor alcanzó 139 mm³. La administración del artículo de prueba y el número de animales en cada grupo de estudio se mostraron en la siguiente tabla de diseño experimental. La fecha de la inoculación de las células tumorales se denota como día 0. La tabla 14 muestra los grupos de tratamiento.

Antes del comienzo del tratamiento, se pesaron todos los animales y se midieron los volúmenes del tumor. Dado que el volumen del tumor puede afectar a la efectividad de cualquier tratamiento dado, se asignó a los ratones a grupos utilizando un diseño de bloques al azar en función de sus volúmenes tumorales. Esto asegura que todos los grupos sean comparables a nivel basal. El diseño de bloques al azar se usó para asignar animales experimentales a grupos. Primero, los animales experimentales se dividieron en bloques homogéneos de acuerdo con su volumen tumoral inicial. En segundo lugar, dentro de cada bloque, se realizó la aleatorización de animales experimentales a los tratamientos. El uso de un diseño de bloques al azar para asignar animales experimentales aseguró que cada animal tuviera la misma probabilidad de ser asignado a un tratamiento dado y, por lo tanto, se redujo el error sistemático.

En el momento de la monitorización de rutina, se comprobaron los efectos del crecimiento del tumor y los tratamientos sobre el comportamiento normal, tal como la movilidad, la estimación visual del consumo de alimentos y agua, la ganancia/pérdida de peso corporal (los pesos corporales se midieron dos veces a la semana), la matización de los ojos/pelos y cualquier otro efecto anormal.

El criterios de valoración fue si el crecimiento del tumor puede retrasarse o los ratones portadores de tumores pueden curarse. El tamaño del tumor se midió dos veces a la semana en dos dimensiones con un calibrador y el volumen se expresó en mm³ con la fórmula: $V = 0,5 a \times b^2$ donde *a* y *b* son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. A continuación, el tamaño del tumor se usó para los cálculos de los valores tanto de T–C como de T/C. T–C se calculó con T como el tiempo (en días) requerido para que el tamaño medio del tumor del grupo de tratamiento alcance 1000 mm³, y C fue el tiempo (en días) para que el tamaño medio del tumor del grupo control alcanzara el mismo tamaño. El valor T/C (en porcentaje) fue una indicación de la eficacia antitumoral; T y C fueron el

volumen tumoral medio de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día determinado. La regresión tumoral completa (RC) se define como los tumores que se reducen por debajo del límite de palpación (62,5 mm³). La regresión tumoral parcial (RP) se define como los tumores que se reducen desde el volumen inicial del tumor. Se requiere una duración mínima de RC o RP en 3 o más mediciones de tumores sucesivas para que se considere que una RC o RP es duradera.

Se sacrificó a los animales para los cuales la pérdida de peso corporal superó el 20 %, o para los cuales el tamaño medio del tumor del grupo excede los 2000 mm³. El estudio finalizó después de dos semanas de observación después de la dosis final.

Las estadísticas de resumen, que incluyen la media y el error estándar de la media (SEM), se proporcionan para el volumen del tumor de cada grupo en cada punto de tiempo que se muestra en la Tabla 15. Los análisis estadísticos de la diferencia en el volumen del tumor entre los grupos se evaluaron utilizando un ANOVA de una vía seguido de comparaciones individuales utilizando Games-Howell (no se supone la misma varianza). Todos los datos se analizaron utilizando SPSS 18.0. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Tabla 15.

Días	Volumen tumoral (mm ³)a					
	Vehículo	Molécula biespecífica de EGFR/c-Met a 25mg/kg	Crizotinib a 50 mg/kg	Erlotinib a 50 mg/kg	Crizotinib; Erlotinib a 50 mg/kg 50 mg/kg,	Cetuximab a 1 mg/ratón
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

El tamaño medio del tumor del grupo tratado con vehículo (Grupo 1) alcanzó 1.758 mm³ el día 23 después de la inoculación del tumor. El tratamiento con la molécula biespecífica de EGFR/c-Met biespecífica a un nivel de dosis de 25 mg/kg (Grupo 2) llevó a la regresión completa del tumor (RC) en todos los ratones, que fue duradera en > 3 mediciones sucesivas del tumor (VT promedio = 23 mm³, valor T/C = 1 %, $p = 0,004$ comparado con el grupo de vehículo el día 23).

El tratamiento con crizotinib como agente único a un nivel de dosis de 50 mg/kg (Grupo 3) no mostró actividad antitumoral; el tamaño medio del tumor fue de 2.102 mm³ el día 23 (valor T/C = 120 %, $p = 0,944$ en comparación con el grupo del vehículo).

El tratamiento con erlotinib como agente único a un nivel de dosis de 50 mg/kg (Grupo 4) mostró una actividad antitumoral menor, pero no se encontraron diferencias significativas en comparación con el grupo del vehículo; el tamaño medio del tumor fue de 1.122 mm³ el día 23 (valor T/C = 64 %, $p = 0,429$ en comparación con el grupo del vehículo), con 4 días de retraso del crecimiento del tumor en el tamaño del tumor de 1.000 mm³ en comparación con el grupo del vehículo.

La combinación de crizotinib (50 mg/kg, Grupo 5) y erlotinib (50 mg/kg, Grupo 5) mostró una actividad antitumoral significativa; el tamaño medio del tumor fue de 265 mm³ el día 23 (T/C = 15 %; $l = 0,008$), con 17 días de retraso en el crecimiento del tumor al tamaño del tumor de 1.000 mm³ en comparación con el grupo del vehículo.

El cetuximab a nivel de dosis de 1 mg/ratón como agente único (Grupo 6) mostró actividades antitumorales significativas; el tamaño medio del tumor fue de 485 mm³ el día 23 (T/C = 28 %; $p = 0,018$), con 17 días de retraso del crecimiento del tumor en el tamaño del tumor de 1.000 mm³ en comparación con el grupo del vehículo. La Figura 9 y la Tabla 16 muestran las actividades antitumorales de las diversas terapias.

Tabla 16.

Tratamiento	Tamaño del tumor (mm ³) el día 23	T/C (%)	T-C (días) a 1000 mm ³	Valor de <i>p</i>
Vehículo	1758±259	—	—	—
molécula biespecífica de EGFR/c-Met (25 mg/kg)	23±7	1	—	0.004
Crizotinib (50 mg/kg)	2102±298	120	-1	0.944
Erlotinib (50 mg/kg)	1122±202	64	4	0.429
Crizotinib + Erlotinib (50 mg/kg + 50 mg/kg)	265±40	15	17	0.008
Cetuximab (1 mg/ratón)	485±61	28	17	0.018

Se observó una pérdida de peso corporal media a grave en el grupo del vehículo, lo que podría deberse al aumento de la carga tumoral; murieron 3 ratones y se sacrificó a 1 ratón cuando BWL > 20 % al día 23. Se observó una ligera toxicidad de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met en el Grupo 2; se sacrificó a 3 ratones cuando BWL > 20 % durante el período de tratamiento; el peso corporal se recuperó gradualmente cuando se retiró el tratamiento durante las 2 semanas del período de observación. Se observó una pérdida de peso corporal más grave en el grupo de monoterapia con crizotinib o erlotinib en comparación con el grupo del vehículo, lo que sugiere la toxicidad relacionada con el tratamiento. La combinación de crizotinib y erlotinib fue generalmente tolerada durante la fase de dosificación, pero al final del estudio se observó una pérdida de peso corporal grave, que podría deberse a la reanudación del rápido crecimiento del tumor durante el período sin tratamiento. La monoterapia de cetuximab fue bien tolerada en el estudio; la pérdida de peso corporal solo se observó al final del estudio debido a la reanudación del crecimiento del tumor.

En resumen, la molécula biespecífica de EGFR/c-Met a 25 mg/kg (3 veces/semana x 3 semanas) produjo una respuesta completa en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón humano H292-HGF en ratones SCID/Beige. El tratamiento fue tolerado en 7 de cada 10 ratones y resultó en una pérdida de peso corporal intensa en 3 de cada 10 ratones. La Figura 9 muestra el impacto de las diversas terapias en el tamaño del tumor durante los puntos de tiempo posteriores al tratamiento.

20 Ejemplo 8: Extensión de la semivida de las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met

Se han descrito numerosos métodos para reducir la filtración renal y, por lo tanto, extender la semivida sérica de las proteínas, incluida la modificación con polietilenglicol (PEG) u otros polímeros, la unión a la albúmina, la fusión a los dominios de proteínas que se unen a la albúmina u otras proteínas del suero, la fusión genética a la albúmina, la fusión a los dominios Fc de IgG y la fusión a secuencias de aminoácidos largas y no estructuradas.

Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met se modificaron con PEG para aumentar el radio hidrodinámico incorporando una cisteína libre en el extremo C de la molécula. Más habitualmente, el grupo tiol libre del residuo de cisteína se usa para unir moléculas de PEG que están funcionalizadas con grupos de maleimida o yodoacetemida usando métodos estándar. Se pueden usar varias formas de PEG para modificar la proteína, incluido PEG lineal de 1000, 2000, 5000, 10.000, 20.000 o 40.000 kDa. Las moléculas de PEG ramificadas de estos pesos moleculares también se pueden usar para la modificación. Los grupos PEG también pueden unirse a través de aminas primarias en las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met en algunos casos.

Además de la PEGilación, la semivida de las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met se extendió al producir estas proteínas como moléculas de fusión con un dominio de unión a la seroalbúmina (ABD) del haz de 3 hélices de origen natural o un dominio de unión a la albúmina de consenso (ABDCon). Estos dominios de proteínas se unieron al extremo C-C del dominio FN3 de unión a c-Met a través de cualquiera de los enlazadores descritos en la Tabla 12. El dominio ABD o ABDCon también se puede colocar entre el dominio FN3 de unión a EGFR y el dominio FN3 de unión a c-Met en la secuencia primaria. En algunos casos, la albúmina o variante de albúmina (SEQ ID NO: 189) se unió a las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met al extremo C del dominio FN3 de unión a c-Met.

45 Ejemplo 9: Caracterización de ciertas moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met

Las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met selectas se caracterizaron por su afinidad con EGFR y c-Met, su capacidad para inhibir la autofosforilación de EGFR y c-Met, y su efecto sobre la proliferación de células HGF. La afinidad de unión de las moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met al EGFR recombinante y/o al dominio extracelular de c-Met se analizó adicionalmente mediante métodos de resonancia de plasmón superficial utilizando un Proteon

Instrument (BioRad) de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 3. Los resultados de la caracterización se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17.

Molécula	K _D (EGFR, nM)	K _D (c-Met, nM)	inhibición de pMet en células H441 (CI ₅₀ , nM)	inhibición de pEGFR en células H292 (CI ₅₀ , nM)	Inhibición de la proliferación de H292-HGF en células H292 inducidas por HGF (CI ₅₀ , nM)
ECB15	0,2	2,6	n/a	4,2	23
ECB94	1	4,3	53,8	5,1	29,6
ECB95	1,1	6,2	178,8	13,6	383,4
ECB96	1,6	22,1	835,4	24,7	9480
ECB97	1,3	1,7	24,2	16,6	31,0
ECB106	16,7	5,1	53,3	367,4	484,5
ECB107	16,9	9	29,9	812,3	2637
ECB108	15,3	25,5	126,2	814,4	11372
ECB109	17,3	2,1	26	432	573,6
ECB168	0,4	0,32			3,1
ECB158*	0,9	0,58			10,8

* ECB158 es ECB168 conjugado con la variante de seroalbúmina humana C34S a través de un enlazador (GGGS)₂ de la SEQ ID NO: 224

5

Ejemplo 10. Paratopos de los dominios FN3 de unión a EGFR y c-Met

Se realizaron una serie de mutaciones en la molécula P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27) con el fin de definir residuos críticos para la unión al dominio extracelular de EGFR. Para este análisis, cada posición de aminoácido en los bucles BC y FG se mutó a alanina de una en una para producir 18 nuevas moléculas. La afinidad con la que estos mutantes se unen a EGFR se determinó mediante análisis SPR utilizando un instrumento Proteon. Los resultados se muestran en la Tabla 18. 10 posiciones resultaron en una pérdida de afinidad de unión mayor a 10 veces, lo que indica que estas posiciones contribuyen a la unión a EGFR. La cantidad de cambio indica la cantidad de cambio del valor K_D de una variante cuando se compara con el P54AR4-83v2 parental. Una combinación de residuos de los bucles BC y FG conforma la superficie de unión. Se demostró que 10 posiciones debilitaban la unión a EGFR en más de 10 veces, y se demostró que 5 posiciones debilitaban la unión a EGFR en más de 100 veces (D23, F27, Y28, V77, G85). Además de P54AR4-83v2, las moléculas de unión a EGFR P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 y P54AR4-83v23 (SEQ ID NO: 21, 25, 107, 108 y 109, respectivamente) tienen residuos idénticos en las posiciones de los paratopos que debilitan la unión de EGFR en más de 100 veces cuando se mutan. Varias moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met generadas comprenden P54AR4-83v2, P54AR4-48, P54AR4-81, P53A1R5-17v2, P54AR4-83v22 o P54AR4-83v23 como su dominio FN3 de unión a EGFR como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 18.

Molécula	SEQ ID NO:	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (nM)	N.º de cambios
P54AR4-83v2	27	3,54 E- 05	4,98 E-05	0,14	1
83v2 D22A	194	2,15 E- 05	3,01 E-05	0,14	1
83v2 D23A	195	1,32 E- 05	4,20 E-03	31,8	227
83v2 P24A	196	7,81 E- 04	2,19 E-04	2,8	20
83v2 W25A	197	1,10 E- 05	1,69 E-04	1,5	11
83v2 F27A	198	2,32 E- 04	5,56 E-04	24	171
83v2 Y28A	199	4,36 E- 04	3,86 E-03	88,5	632
83v2 H75A	200	1,67 E- 05	6,55 E-04	3,9	28

83v2 N76A	201	2,08 E- 05	7,43 E-05	0,36	3
83v2 V77A	202	7,88 E- 04	8,55 E-03	108	771
83v2 Y78A	203	1,82 E- 05	5,14 E-04	2,8	20
83v2 K79A	204	6,81 E- 05	2,83 E-05	0,04	0
83v2 D80A	205	1,23 E- 05	5,46 E-05	0,45	3
83v2 M83A	206	1,77 E- 05	2,74 E-04	1,5	11
83v2 R84A	207	2,34 E- 05	1,37 E-04	0,59	4
83v2 G85A	208	7,30 E- 04	2,20 E-03	30,1	215
83v2 L86A	209	3,09 E- 05	1,17 E-04	0,38	3
83v2 T81A	210	2,28 E- 05	8,38 E-05	0,37	3
83v2 N82A	211	1,94 E- 05	9,67 E-05	0,5	4

Del mismo modo, se realizaron una serie de mutaciones en la superficie de interacción presunta de c-Met de la molécula P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41) con el fin de definir posiciones críticas para el enlace de destino. Este análisis se realizó en el contexto de la molécula biespecífica ECB15 (SEQ ID NO: 145) y se usó serina como reemplazo en lugar de alanina como se ha descrito anteriormente. Se eligió la serina para disminuir la hidrofobicidad de los mutantes resultantes. La Tabla 19 describe los resultados de SPR con la numeración de cada posición de mutación en relación con la de la molécula A3 (SEQ ID NO: 41). Se demostró que 7 posiciones debilitaban la unión a c-Met en más de 10 veces. No se pudo medir la unión de los mutantes M72S, R34S e I79S. La mutación F38S redujo la unión a c-Met en más de 100 veces. Estos datos demuestran que las posiciones que contribuyen a la unión de c-Met se distribuyen entre la cadena C, la cadena F, el bucle CD y el bucle FG. La cantidad de cambios indica el cambio del valor K_D de una variante en comparación con el P114AR7P95-A3 parental. Además de P114AR7P94-A3, las moléculas de unión a c-Met P114AR7P92-F3, P114AR7P95-D3, P114AR7P95-F10 y P114AR7P95-H8 (SEQ ID NO: 34, 44, 47 y 49, respectivamente) tienen residuos idénticos en las posiciones de los paratopos que debilitan la unión de c-Met en más de 100 veces cuando se mutan.

Tabla 19.

Muestra	SEQ ID NO:	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	N.º de cambios
ECB15	145	3,51 E- 05	1,33 E-04	0,4	1
A3 K78S	212	4,40 E- 05	1,50 E-04	0,3	0,75
A3 G40S	213	1,85 E- 05	3,20 E-04	1,7	4,25
A3 L39S	214	4,75 E- 05	1,27 E-03	2,7	6,75
A3 V68S	215	3,29 E- 05	1,20 E-03	3,6	9
A3 N70S	216	4,25 E- 05	2,49 E-03	5,9	14,75
A3 P81 S	217	3,21 E- 05	5,36 E-04	1,7	4,25
A3 F36S	218	1,88 E- 05	5,12 E-03	27,2	68
A3 W32S	219	2,89 E- 05	8,60 E-03	29,8	74,5
A3 M72S	220	-	-	-	
A3 R34S	221	-	-	-	
A3 F38S	222	4,51 E- 04	3,23 E-02	717	1792,5
A3 I79S	223	-	-	-	

20 Ejemplo 11. Inhibición del crecimiento de células tumorales humanas por moléculas biespecíficas de EGFR/c-Met

La inhibición del crecimiento de células tumorales humanas se evaluó en un cultivo de unión estándar como se describe en los Ejemplos 3 o 6, o en condiciones de unión baja. Para evaluar la supervivencia en condiciones de unión baja, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fijación ultra baja (Corning Costar) en 50 μ l/pocillo de medio RPMI (Invitrogen) que contenía GlutaMAX y Hepes 25 mM, suplementado con piruvato de sodio 1 mM (Gibco), NEAA 0,1 mM (Gibco) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Gibco), y se dejó unir durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las células se trataron con concentraciones variables de anticuerpos (0,035 - 700 nM

final), junto con HGF (7,5 ng/ml, R&D Systems nº de cat. 294-HGN), luego se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 72 horas. Algunos pocillos se dejaron sin tratar con HGF o anticuerpos como controles. Las células viables se detectaron utilizando el reactivo CellTiter-Glo® (Promega), y los datos se analizaron como se ha descrito anteriormente en "Inhibición del crecimiento de células tumorales humanas (crecimiento de NCI-H292 y ensayo de crecimiento de NCI-H322)" en el Ejemplo 3, excepto que los lisados fueron transferido a placas blancas opacas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejidos (PerkinElmer) antes de leer la luminiscencia.

La línea celular se clasificó como un fuerte respondedor a la molécula biespecífica EGFR/c-Met en aquellos casos en que la inhibición máxima del crecimiento celular fue > 40 % y la CI₅₀ relativa < 5 mM.

La actividad inhibitoria de ECB15 se evaluó en múltiples líneas celulares que tenían EGFR de tipo salvaje, amplificado o mutante y c-Met amplificada o de tipo salvaje. ECB15 inhibió el crecimiento de células tumorales de líneas celulares que se muestra en la Tabla 20. ECB15 también inhibió el crecimiento de la línea celular NCI-H1975 que tiene la mutación T790M, que se ha demostrado que produce resistencia a los TKI, como erlotinib.

Tabla 20.

Línea celular	Histología	EGFR	c-Met
NCI-H1650	Adenocarcinoma broncoalveolar	Del (E746, A750)	WT
SKMES-1	Escamoso	WT	WT
NCI-H1563	Adenocarcinoma		
GLC-82	Adenocarcinoma		
Calu-3	Adenocarcinoma		
NCI-H1573	Adenocarcinoma	AMP	AMP
NCI-H1435	CPNMC		
NCI-H1975	CPNMC	L858R; T790M	WT
NCI-H1666	Adenocarcinoma broncoalveolar		
HCC2935	CPNM	del (E746 - T751), S752I	
HCC4006	Adenocarcinoma	del (L747 - E749), A750P	
H292	Mucoepidermoide	WT	WT
H322	Adenocarcinoma	WT	WT
HCC827	Adenocarcinoma	del (E746, A750); AMP	WT
H596	Mixto adeno-escamoso	WT	Delección del exón 14
H1869	Escamoso	WT	WT

WT: de tipo salvaje
AMP: amplificado
Del: Delección

Listado de secuencias

SEQ ID NO:	Tipo	Especie	Descripción	Secuencia
1	PRT	Artificial	Tencon	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESKVGAINLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
2	ADN	Artificial	POP2220	GGAAACAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT TTCTGAAGTTACC
3	ADN	Artificial	TC5' a FG	AACACCGTAGATAGAAACGGT
4	ADN	Artificial	130mer	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCATCCCC TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTCACACAGGAAACAGGATCTACCATGCTG
5	ADN	Artificial	POP2222	CGGCGGTTAGAACGCGGCTAC
6	ADN	Artificial	TCF7	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN AACACCGTAGATAGAAACGGT
7	ADN	Artificial	TCF8	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
8	ADN	Artificial	TCF9	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
9	ADN	Artificial	TCF10	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
10	ADN	Artificial	TCF11	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
11	ADN	Artificial	TCF12	GGTGGTGAATTCGCGAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGT
12	ADN	Artificial	POP2234	AAGATCAGTTGCGGCCGCTAGACTAGAACCCGCTGCCATGGTGATG GTGATGGTGACCGCCGGTGGTGAATTCGCGAGACAG
13	ADN	Artificial	POP2250	CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC
14	ADN	Artificial	DidLigRev	CATGATTACGCCAAGCTCAGAA
15	ADN	Artificial	Tcon5new 2	GAGCCGCCGCCACCGGTTTAAATGGTGATGGTGATGGT GACCACCGGTGGTGAATTCGCGAGACAG
16	ADN	Artificial	Tcon6	AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC
17	ADN	Artificial	LS1008	TTTGGGAAGCTTCTAGGTCTCGGCGGTCACCATCACC ATCACCATGGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCCAAC TGATCTTCAACAAAC
18	PRT	Artificial	P53A1R5-17 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
19	PRT	Artificial	P54AR4-17 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTYDRDGYDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
20	PRT	Artificial	P54AR4-47 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNHDFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
21	PRT	Artificial	P54AR4-48 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPRGFYESFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
22	PRT	Artificial	P54AR4-37 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT

ES 2 696 148 T3

SEQ ID NO:	Tipo	Especie	Descripción	Secuencia
23	PRT	Artificial	54AR4-74 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
24	PRT	Artificial	P54AR4-81 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQYQE SEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV VYKDTNMRGLPLSAEFTT
25	PRT	Artificial	P54AR4-83 sin met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
26	PRT	Artificial	P54CR4-31 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSGY VFEHDVMLPLSAEFTT
27	PRT	Artificial	P54AR4-83v2 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAIFTT
28	PRT	Artificial	P54CR4-31v2 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESE KVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSGY VFEHDVMLPLSAIFTT
29	PRT	Artificial	P54AR4-73v2 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTWPYADLDSFLIQYQES EKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNV YKDTNMRGLPLSAEFTT
30	ADN	Artificial	TCON6	AAG AAG GAG AAC CGG TAT GCT GCC GGC GCC GAA AAA C
31	ADN	Artificial	TCON5 E86lshort	GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TGA TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG
32	PRT	Artificial	P114AR5P74-A5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEV VVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGG SISVPLSAIFTT
33	PRT	Artificial	P114AR5P75-E9	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFL RSGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGG VSTPLSAIFTT
34	PRT	Artificial	P114AR7P92-F3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGG SHPLSAIFTT
35	PRT	Artificial	P114AR7P9 2-F6	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGG SVPLSAIFTT
36	PRT	Artificial	P114AR7P9 2-G8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLG SGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGYIS PLSAIFTT
37	PRT	Artificial	P114AR7P9 2-H5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYLEFL GGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGTVS PPLSAIFTT
38	PRT	Artificial	P114AR7P9 3-D11	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGYI SYPLSAIFTT
39	PRT	Artificial	P114AR7P9 3-G8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAINLTVPGSERSYDLTDLKPGTEYVWNLGVKGG STPLSAIFTT
40	PRT	Artificial	P114AR7P9 3-H9	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGHIS LPLSAIFTT

ES 2 696 148 T3

SEQ ID NO:	Tipo	Especie	Descripción	Secuencia
41	PRT	Artificial	P114AR7P9 4-A3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
42	PRT	Artificial	P114AR7P9 4-E5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVNIMGVKGGRV SVPLSAIFTT
43	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-B9	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQILGVKGGSI SVPLSAIFTT
44	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-D3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGSI SYPLSAIFTT
45	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-D4	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQILGVKGGYI SIPLSAIFTT
46	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-E3	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQIMGVKGGTV SPPLSAIFTT
47	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-F10	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFTT AGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGGIS PPLSAIFTT
48	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-G7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFELLS TGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGIS PPLSAIFTT
49	PRT	Artificial	P114AR7P9 5-H8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFV SKGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGSI SPPLSAIFTT
50	PRT	Artificial	ECB1	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVV VGGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNLGVKGGGIS VPLSAIFTT
51	PRT	Artificial	ECB2	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSL PAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLG SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKIS PPLSAIFTT
52	PRT	Artificial	ECB3	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWQILGVKGGHIS LPLSAIFTT
53	PRT	Artificial	ECB4	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIRYDEFLLR SGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVILGVKGGGLVS TPLSAIFTT

ES 2 696 148 T3

SEQ ID NO:	Tipo	Especie	Descripción	Secuencia
54	PRT	Artificial	ECB5	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGKGI SPPLSAIFTT
55	PRT	Artificial	ECB6	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYVWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
56	PRT	Artificial	ECB7	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSM LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFL GSGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYVWQIIGVKGGHIS LPLSAIFTT
57	PRT	Artificial	ECB15	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSEERS YDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGKISPPLSAIFTT
58	PRT	Artificial	ECB27	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTPGSEERS SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGISVPLSAIFTT
59	PRT	Artificial	ECB60	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSEERS SYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGKISPPLSAIFTT
60	PRT	Artificial	ECB37	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVVGGEAIVLTPGSEERS SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGISVPLSAIFTT
61	PRT	Artificial	ECB94	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSEERS YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT
62	PRT	Artificial	ECB95	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSEERS SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGISVPLSAIFTT
63	PRT	Artificial	ECB96	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYES EKVGEAIVLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNLVSRVTED SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTPGSEERS YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPPLSAIFTT

ES 2 696 148 T3

SEQ ID NO:	Tipo	Especie	Descripción	Secuencia
64	PRT	Artificial	ECB97	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGGSIPLSAIFTT
65	PRT	Artificial	ECB106	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPLSAIFTT
66	PRT	Artificial	ECB107	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGGSIPLSAIFTT
67	PRT	Artificial	ECB108	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGGSIPLSAIFTT
68	PRT	Artificial	ECB109	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGGSIPLSAIFTT
69	PRT	Artificial	ECB118	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKISPLSAIFTT
70	PRT	Artificial	ECB119	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVGSGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGGSIPLSAIFTT
71	PRT	Artificial	ECB120	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGDAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGGSIPLSAIFTT
72	PRT	Artificial	ECB121	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQES EKVGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVY KDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLAPKPNLVSRVTE SARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGGSIPLSAIFTT

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

1 mrpsgtaga llallaalcp asraleekkv cqgtsnkltq lgtfedhfis lqrmfncoe
61 vlgaleityv grnydlsflk tiqevagyvl ialntverip lenlqlizgn wyyensyala
121 visnydankt glkelpmrnl qeilhgavrf snnpalcnve sigwrdives dflsnmsmdf
181 qnhlgscqkc dpscpngscw qageencqkl tkliicaqqcs grcrgkpsd cchnqeaage
241 tgpresdelv czkfrzdeatc kdtecpplmly npttyqmdvn pegkysfgat cvkkekprnyv

ES 2 696 148 T3

301 vtdhgscvrs egdsdyemee dgvrkckkce gporkvengi gigefkdsle inatnikhfk
 361 nctsisgdih ilpvafrgds fthtppldpq eldiktkvke itgfilligaw penrtldhaf
 421 enleirgrt kqhgqfslav vslnitslgl rslkeisdgd viisgnknlc yantinwkl
 481 egtsgqtkki isnrgensck atgqvchalc spegkwgpep zdcvsscrns rgrecvdkcn
 541 llegeprefv enseciqchp eclpqqamnit ctgrgpdnci qcahyidgph cvktcpagvm
 601 genntlwky adaghvhlc hpnetygotg pglegcpntg pkipsiatgm vgalllllv
 661 aliglgfmr zhivkrtrr rllqerelve pltpsgaepn gallrilket efkkikvlgs
 721 gafgtvykgl wipegekvti pvaikelrea tspkankeil deaymasvd nphvorligi
 781 cltstvtqlit qlmpfglld yvrehkdnig sqyllawcvq iakgmnyled rrlvhrdiaa
 841 nrvlvktpqh vkitdfglak llgaekeyh aeggkvpikw malesilhri ythqsdvswy
 901 gvtvwelmtf gskpydgipa seissilekg erlpqppict idvymimvc wmidadsrpk
 961 freliiefsk mardpqrylv igqdermhlp sptdsnfyra lmeedmdv vdadeylipq
 1021 qgffespsts rtpllslsa tsnnstvaci drnglqscpi kedsflqrys sdptgalted
 1081 siadtflpvp eyinqsvpkr pagsvqnpvy hmqplnaps rdphvqdphe tavgnpeyln
 1141 tvqptcvnst fdpahwqk gshqisldnp dyqqdffpk akpngifkgs taenaeylrv
 1201 aqqsefiga

74	PRT	Homo sapiens	EGF	NSDSECLSHDGYCLHDGVCMIYIEALDKYACNCVGYIG ERCQYRDLKWWELR
----	-----	--------------	-----	--

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

5

1 mgamtqlilag vflafalalat eggvlkkvir hkrqsgvnat lpeenqpvvf nhvyniklpv
 61 gsqcsvdles asgekdlapp sepsesfgeh tvdgenqivf thriniprra cgaaspdvk
 121 eilszleele nlvsslreqc tagagcolap atgrldtrpf csgrgnfste gqgcvcpegw
 181 kqpnosepec pgnchlrgc idgqcicddg ftgedcsqia cpsdcndgk cvngvcicfe
 241 gyagadcsre icpvpcseeh qtcvdglcvc hdgfagddcn kplcinncyn rgrovenecv
 301 cdegftgedc selicpndof drgrcingtc yceegftged egkptcphac htqgrceegq
 361 cvcdesfagv dceekrcpad chxrgrcvdg roecddgftg adcgelkcpn gszghgrovn
 421 gqcvcdegyt gedcsqircp ndchsrgrcv egkcvceqgf kqydcscmsc pndchghrc
 481 vngmcevdgy ytgederdrq cprdcnrgl cvdggcvccead gftgpdcael scpndchggq
 541 rcvngqvcch egfngkdcke qrcpsdchgg grcvdggcic hegftgldeg qhscpsdcun
 601 lggcvsgrci cnegysgedc sevspkdlv vtavteetvn lawdnemrvt eylvvytpth
 661 egglemqfrv pgdqtstiiq elepgveyfi rvfailenkk sipvsarvat ylpapegikf
 721 ksiketsvev ewdpldiafe tweiifzmmn kedegaitks lrrpetsyrq tglapqeye
 781 islhivknnt rgpglkrvtv trldapsqie vkdvtdttal itwfkplaei dgileitygik
 841 dvpgdrttid ltedengysi qnlkpdteye vslisrrgdm ssnpaketft tgidaprnlr
 901 rvsqtdnsit lewrngkaai dsyrikyapi sggdhaevdv pkeqqattkt tltglrpgte
 961 ygigvavke dkesnpatin aateldtpkd lqvsetaets ltlwktpla kfdryrlnys

ES 2 696 148 T3

1021 lptgqvwvgvq lprnttasyvl rglepqqeyn vlltaekgrh kekparvkaas teqapaleni
 1081 tvtevgwdgl rlnwtaadqa yehfiiqvqe ankveaarnl tvpgslravd ipglkaatpy
 1141 tvsiygvigq yrtppvlsaea stgetpnlge vvvaevgwa lklntapeg ayeyffiqvq
 1201 eadtveaaqn ltvpgglrst dlpglkaath ytitirgvvtq dfsttplsve vlteevpdmg
 1261 nitvtevswd alrlnwttpd gtydqftiqv qeadqveeah nitvpgslrs meipglragt
 1321 pyvtvlhgev rghstrplav evvtedlpql gdlavsevgw dgrlrlnwtaa dnayehfviq
 1381 vgevknveas qniltlpgslr avdipgleaa tpyrvsiygv irgyrtppvls seastakepe
 1441 ignlnvsdit pesfnlswma tdgifetfti eiidsnrlie tveyniegae rtahisgipp
 1501 stdfivylsq lapsirtkti satattealp lienltisdi npygftvswm asenafdsfl
 1561 vuvdsgkll dpgqftlsgt qrklelrgli tgigyevmva gftqghqtkp lraeivteae
 1621 pevdnllvsd atpdgfrlsw tadegvfdnf vkirdtkkq sepleitlla pertrditqi
 1681 reateyeiel ygiskgrzsq tvaaiattam gspkevifs itensatvsw raptaqvesf
 1741 ritvypitgg tpsmvtvdtg ktqtrlvkli pgveylvsi amkqfeesep vsgsftald
 1801 gpsglvtani tdsealarwq paiatvdsyv isytgekype itrvtvqntv eyaltdlepa
 1861 teytlrifae kggpkestat akfttdldsp rdlratevqs etaliltwrpp raavtgyllv
 1921 yeavdgtvke vivgpdtttsy sladlspath ytakiqalng pirsniqti fttigillypf
 1981 pkdcsqamin gdttsglyti ylngkkaeal evfcdmts dqgwivflrrk ngrenfyqnv
 2041 kayaaqfgr reefwlglbn lckitaqqgy elrvdlrdhg etafavvdkf svgdaktryk
 2101 lkvegysgta gdsamayhnr sfstfdktdt sraitncalsy kgafwyrnch rvnlmgyryd
 2161 nnhsqgvnwf hwkghesiq faemkirpsn frnleqrrkr a

76	PRT	Artificial	Fibcon	ldaptldqvntvdtitvsvtppsaitgyritytspnggpeketivppsstsv titgitpgveyvslyalkdnqespplygtqt
77	PRT	Artificial	10° dominio FN3 de fibronectina (FN10)	VSDVPRDLEVVAATPTSLSLISWDAPAVTVRYRYRTYGETGGNSPV QEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTHVVAVTGRGDSPASSKPISINY RT
78	PRT	Artificial	Enlazador	GSGS
79	PRT	Artificial	Enlazador	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
80	PRT	Artificial	Enlazador	APAP
81	PRT	Artificial	Enlazador	APAPAPAPAP
82	PRT	Artificial	Enlazador	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
83	PRT	Artificial	Enlazador	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP PAP
84	PRT	Artificial	Enlazador	AEEAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA
85	PRT	Artificial	Tencon Bucle BC	TAPDAAFD
86	PRT	Artificial	Tencon Bucle GF	KGGHRSN
87	PRT	Artificial	P53A1R5–17 Bucle BC	ADPHGFYD
88	PRT	Artificial	P54AR4–17 Bucle BC	TYDRDGYD
89	PRT	Artificial	P54AR4–47 Bucle BC	WDPFSFYD
90	PRT	Artificial	P54AR4–48 Bucle BC	DDPRGFYE
91	PRT	Artificial	P54AR4–73 Bucle BC	TWPYADLD
92	PRT	Artificial	P54AR4–74 Bucle BC	GYNGDHFD
93	PRT	Artificial	P54AR4–81 Bucle BC	DYDLGVYD
94	PRT	Artificial	P54AR4–83 Bucle BC	DDPWDFYE
95	PRT	Artificial	Bucles FG de EGFR	HNVYKDTNMRGL
96	PRT	Artificial	Bucles FG de EGFR	LGSYVFEHDVM

97	ADN	Artificial	>EGFR parte ECB97; P54AR4-83v22	Atgttgccagcgcgaaagaacctggtagttagcgggttactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgacccgctggcgtctacgagagc.tttc gatccagtaicaagagagcagaaagcggggaagcgaattgctgac cgtccgggctccgagcgttctacgacctgacccggttgaagccgggt accgaglatacgggagcaatctacgggtgtcacaatgtctataaggaca ctaataaccggctgctctgagcgcacatttaccacc
98	ADN	Artificial	>EGFR parte ECB15; P54AR4-83v2	Atgctgcccagcccctaagaatctggctgtagcgaagtaaccgaggga cagcgcgccgctgagctgggacgacccgctggcgttctatgagctttcc tgattcaglatcaagaaagcgaataaaagtggcgaagcgaatgctcga cgtccgggtagcagcgcctctacgactgaccggcctgaaaccgg gtaccgagtaaccgggtgtccattacgggtgtcacaatgtgataaagac accaacatgctggcctgcccgtgicggcgafttaccacc
99	PRT	Artificial	tencon 27	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VKGGHRSNPLSAIFTT
100	PRT	Artificial	Biblioteca TCL14	LPAPKNLWSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFXIXYX EXXXGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYXVXIXG VKGGXXSXPLSAIFTT

>SEQ ID NO: 101
PRT
5 Homo sapiens
cMet

1 mkapavlapg ilvllfltlvg rsngeckeal aksemnvmnk yqlpnftaet piqnvilheh
61 hiflilatnyi yvineedlqk vaeyktgpvl ehpdcfpcqd esskanlsgg vwkdnlnmal
121 vvdtyyddql iscgavarrgt cqrhvfphnh tadiqsevhc lfspqieeps qcpdcvveal
181 gakvlsvkd rfinffvqnt inssyfpdhp lhsisvrrlk etkdqfmflt dqsyidvlpe
241 frdsypikyv hafesnnfiy fltvqretld aqtfhtriiy fosinsqlhs ymemplecil
301 tekrkrstsk kevfnilqaa yvskpqaqla xqigaslndd ilfgvfaqsk pdsaeppmrs
361 amcafpikyv ndffnkivnk nnvroiqhfy gpnhehcfar tilrnssgce arrdeyrtef
421 ttalqrvdlf mgqfsevllt sistfikqdl tianlqtseq rfmqvvsars gpstphvnfl
481 ldshpvspev ivehulnqng ytlvitgkki tkiplnglqc zhfqscsqcl sappfvqgw
541 chakcvreee elsgtwtqqi clpaiykvfp nsapleggtz lticqwdfgf rznnkfdlkk
601 trvllgnesc tltlsestmn tlkctvgpam nxhfnmsiii snhggttqys tfsyvdpvit
661 sispkypma ggtllltlgn ylnsgnszhi siggktctlk avensilecy tpaqtistef
721 avkkidlan retsifsyre dpiveyhnt ksfristwke pinivsfifc fasggatitg
781 vgnlnsvsv prmvinvhea gznftvacqh rsnseicct tpslqqlnlq lplktkaffm
841 ldgilskyfd liyvhnvfk pfekpvmism gnenvleikg ndidpeavkg evikvgnksc
901 enihlhseav lctvpndllk lnsefniewk qaisstvlqk vivqpdqnt gliagvvsis
961 talllllgff lwkkrrkqik dlgselvryd arvhtphldr lvsarsvspt temvnesvd
1021 yratfpedqf pnsqngscr qvqypltdms piltsgdedi sspllqntvh idlsalpel
1081 vqavqhvviq psslivhfne viqrghfgcv yhgtilldng kkihcavksl nritdigevs
1141 qlftegiimk dshpvnsls lgiclrsegs plvvlpymkh gdlrnfirne thapvkdli
1201 gfgiqvokcm kyliaskkfvh rdlaarncml dektfvkved fglardmydk eyysvhnktg
1261 aklpvkmal eslqtqkftt kedvwsfgvl lwelmtregap pypdvntfdi tvyllqgrrl
1321 lqpeycpdl yevmlkwhp kaemrpsfse lvsrisaifs tfigehyvvh natyvvnkcv
1381 apypslisse dnaddevdtr pasfwets

10

ES 2 696 148 T3

102	PRT	Homo sapiens	HGF	<p>QKRFRNTHFFKKSATTLKIDPALKK TKKVNTADQCANRC TRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNMSMS SGVKKFEGHEFDLYE NKDYRNGIGKGRSYKGTVSTFKSGKQCPWSSMPHEHSFLPSSYRG KDLOENYCRNP RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDH TESGKICQRWDHQTP HRHKFLPERYPDKCFDDNYCRNPDGQPRPWOCYTLDPHTRWEYCAK TCADNTMNDTDVPL ETTTECQQGGEGYRGTVNTWNGPCQRWD SOYPHEHDMTPENFKC KDLRENYCRNPDGS ESPWCFITDPNRYVGYCSQPNCDSHGGDCYRGNKKNYMGNL SGT RSGLTCSMWDKNME DLHRHFWE PDASKLNENYCRNPD DAHGWPWCYTGNPLIPWGYCPIS RCEGDTTPTVNL DHPVISCATKQLRVVNGPTRITNGWVMSLRVYRNKHDCGSLIKE SW VLTARQCFPSRD LKDYEAWLGHDFVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDVLMLKLAR PAVLDDFVSTDL P NYGCTPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHL YMGNEKCSQHHRG KVTLNESEKAG AEKKGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVMPGRGCAPNRPGFV RVAYYAKWHKII LTYKVPQS</p>
103	ADN	Artificial	>cMET parte ECB97 P114AR7P95–C5v2	<p>Ctgcggcctcgaagaacttggtgga gccgtgtaccgaagatagc gcaacgcctgagctggacggcaccggatgcggcgttgatagctctgg attcgcattttgagttctgggtgacggggaaggcaattgtctgacgggtgcc gggctctgaacgcctcctacgattgaccggctgaaaccgggcaaccga gtagtggtagaacattcgaagcgttaagggcgttagcaacagccaccg ctgagcgcgacttcaacgactgggtgctc</p>
104	ADN	Artificial	>cMET parte ECB15 P114AR7P94–A3	<p>Ctgcggcaccgaagaacctggtgtcaccgctgtgaccaggatag cgcacgtttgagctggaccgctcggatgcagccttgacagctctgga ttcttactttgaattctgggtagcggtagggcagctgtctgacgggtgcc ggctctgaacgcagctatgattgacgggctgaagccgggtactgagt acgtggtaacacatcggcgttaaggggtgtaaaatcagccgccatt gtccggatcttaccacg</p>
105	PRT	Artificial	Enlazador	GGGGS
106	PRT	Artificial	ECB91	<p>mlpapknlvsvtedsarlswddpwafyesfiiqyqesekvgeaivltpgse rsydltgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifftapapapapapapap KNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNLSVKGGSSIPPLSAIFTT</p>
107	PRT	Artificial	P53A1R5–17v2	<p>lpapknlvsvtedsarlswadphgfydsfiiqyqesekvgeaivltpgsersy dltgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft</p>
108	PRT	Artificial	P54AR4–83v22	<p>lpapknlvsvtedsarlswddpwafyesfiiqyqesekvgeaivltpgsers ydltgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft</p>
109	PRT	Artificial	P54AR4–83v23	<p>lpapknlvsvtedsarlswddphafyesfiiqyqesekvgeaivltpgsersy dltgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft</p>
110	PRT	Artificial	P53A1R5–17v22	<p>lpapknlvsvtedsarlswadphgfydsfiiqyqesekvgeaivltpgsersy dltgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft</p>
111	PRT	Artificial	P114AR7P94–A3v22	<p>lpapknlvsvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltpgsersy dltgkpgteyvnlgvkgkispplsaifft</p>
112	PRT	Artificial	P114AR9P121–A6v2	<p>LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGGEAI VLVTPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNLSVKGGSSIPPLSAIFTT</p>
113	PRT	Artificial	P114AR9P122–A7v2	<p>LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGGDA IVLTPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNLSVKGGSSIPPLSAIFTT</p>
114	PRT	Artificial	P114AR7P95–C5v2	<p>LPAPKNLVSVRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAI VLVTPGSERSYDLTGLKPGTEYVVNLSVKGGSSIPPLSAIFTT</p>

115	ADN	Artificial	ECB97	aigtgcacagccgaagaaactggtagtagcagggtaactgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgacccgtggcggcttacgagaacttct gatccagtaacaagagagcagaaagtcggtyaagcagattgctgac cgtccgggctcagagcgttcctacgacctgaccggttgagcagggt accgagtaacgggtgagcaactacgggttcaacaatgctataaggaca ctaataaccgggtctgcctctgagcgcacatttaccaccgcaaccggc accggctccggctcctgccccgtgcggcctccgaagaaactgggtggg agccgtgtaccgaagatagcgcaaccctgagctggaaggcaaccgga tgcggcgttcgatagctctggattcgcattttgaggttcgggtagcgggga ggcaattgtctgacgggtcgggctctgaaacgctcctacgattgaccg gtctgaaccgggcaaccgagtagtgggtgaacattctgagcgttaagg cggtagcaacagcccaccgctgagcgcgacttaccgactgggtgtc
116	ADN	Artificial	ECB15	atgtgccagcccctaagaatcggctgtagcgaagtaaccgaggac agcgcgcgtctgagctgggacgacccgtggcggcttacgagaacttct gattcagtaacaagagcgaagaaagttggcgaagcagatcgtctgac cgtccgggtgagcagcgtctctacgactgaccggctgaaaccggg tacggagtaacacgggtgctcattacgggtgtcacaatggtataaagaca ccaacatgctggcctgcccgtctgctggcgaatttcaaccaccggcctgc gccagcgcctgacaccggctccgctgcccggcaccgaagaaactggtgt cagccgtgtgacccgaggaatagcgaacgtttgagctggaccgctccgga tgcagcctttgacagcttctggattcgttaattgaaattctgggtagcgggtg aggcagatcgtctgacgggtcgggctctgaaacgcaagctatgattgacg ggcctgaaaccgggtaactgagtaactgggtlaacatcaatggcgtlaagg gtggtaaaatcagcccaccgctgagcgcgacttaccgactgggtgtc
117	PRT	Artificial	dominio de unión a albúmina	tidewllkeakekaieelkagitsdyfydlinkaktvegvalkdeil ka
118	PRT	Artificial	ECB18	mipapknlvsvtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydlitgkpgteyvtvsiygvhnvykdnmrgipisaiftapapapa paplpapknlvsvrvedsarlswtpdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydlitgkpgteyvvniilgvkgsisvplsaiiftapapapapapl aeakvianreldkygvsdyynlinnaktvegvalkdeilaalp
119	PRT	Artificial	ECB28	mipapknlvsvtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydlitgkpgteyvtvsiygvhnvykdnmrgipisaiftapapapa paplpapknlvsvrvedsarlswtpdaafdsfwirydevvvggeaivlt vpgsersydlitgkpgteyvvniilgvkgsisvplsaiiftapapapapapl aeakvianreldkygvsdyynlinnaktvegvalkdeilaalp
120	PRT	Artificial	ECB38	mipapknlvsvtedsarlswddpwafyesfliqyqesekvgeaivltv pgsersydlitgkpgteyvtvsiygvhnvykdnmrgipisaiftapapapa paplpapknlvsvrvedsarlswtpdaafdsfwiryfeligsgaivltv pgsersydlitgkpgteyvvniilgvkgsisvplsaiiftapapapapapl aeakvianreldkygvsdyynlinnaktvegvalkdeilaalp
121	PRT	Artificial	ECB39	mipapknlvsvtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltv pgsersydlitgkpgteyvtvsiygvhnvykdnmrgipisaiftapapapa paplpapknlvsvrvedsarlswtpdaafdsfwiryfeligsgaivltv pgsersydlitgkpgteyvvniilgvkgsisvplsaiiftapapapapapl aeakvianreldkygvsdyynlinnaktvegvalkdeilaalp
122	PRT	Artificial	P53A1R5–17 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRSLWADPHGfydsfliqyqesekvgeaivltv QSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
123	PRT	Artificial	P54AR4–17 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRSLWYDRDGYDSFLIqy QSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
124	PRT	Artificial	P54AR4–47 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRSLWGYNGDHFDSFLIqy QSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
125	PRT	Artificial	P54AR4–48 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRSLWDDPRGFYESFLIqy QSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT

ES 2 696 148 T3

126	PRT	Artificial	P54AR4–73 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPWYADLDSFLIQY QESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
127	PRT	Artificial	54AR4–74 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWGYNGDHFDSFLIQY QESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
128	PRT	Artificial	P54AR4–81 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDYDLGVYFDSFLIQY YQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSI YGVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
129	PRT	Artificial	P54AR4–83 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWDDPWAFYEFSLIQY QESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
130	PRT	Artificial	P54CR4–31 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAEFTT
131	PRT	Artificial	P54AR4–83v2 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQY QESEKVGGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTT
132	PRT	Artificial	P54CR4–31v2 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQY QESEKVGGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVLGSYVFEHDVMLPLSAIFTT
133	PRT	Artificial	P54AR4–73v2 con Met	MLPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTPWYADLDSFLIQY QESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNMRGLPLSAEFTT
134	PRT	Artificial	P53A1R5–17v2 con Met	mlpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltpgser sydltlgkpgteytsiygvhnykdtnmrglplsaifft
135	PRT	Artificial	P54AR4–83v22 con Met	mlpapknlvsevtedsarlswddpwafyesfliqqesekvgeaivltpgse rsydltlgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft
136	PRT	Artificial	P54AR4–83v23 con Met	mlpapknlvsevtedsarlswddphafyesfliqqesekvgeaivltpgser sydltlgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft
137	PRT	Artificial	P53A1R5–17v22 con Met	mlpapknlvsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltpgser sydltlgkpgteytsiygvhnykdtnirgplsaifft
138	PRT	Artificial	ECB1 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQ ESEKVGGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYDEVVGGGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVNVILGVKGGISVPLSAIFTT
139	PRT	Artificial	ECB2 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQ ESEKVGGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFWIRYFEFLGSGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYVNVIMGVKGGKISPLSAIFTT
140	PRT	Artificial	ECB3 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYEFSLIQYQ ESEKVGGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEAVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT

ES 2 696 148 T3

141	PRT	Artificial	ECB4 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFFIRYDEFLRSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYVVVILGVKGGVSTPLSAIFTT
142	PRT	Artificial	ECB5 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVWNIMGVKGGKISPLSAIFTT
143	PRT	Artificial	ECB6 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
144	PRT	Artificial	ECB7 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSMLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAF DSFWIRYFEFLGSGEIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
145	PRT	Artificial	ECB15 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGGKI SPPLSAIFTT
146	PRT	Artificial	ECB27 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVGG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SVPLSAIFTT
147	PRT	Artificial	ECB60 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPK NLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGS GAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNIMGVKGG KISPLSAIFTT
148	PRT	Artificial	ECB37 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYDEVVGG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SVPLSAIFTT
149	PRT	Artificial	ECB94 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
150	PRT	Artificial	ECB95 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEVGGSG EIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT

ES 2 696 148 T3

151	PRT	Artificial	ECB96 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSSIS PPLSAIFTT
152	PRT	Artificial	ECB97 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGSSISP PLSAIFTT
153	PRT	Artificial	ECB106 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
154	PRT	Artificial	ECB107 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGS EAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
155	PRT	Artificial	ECB108 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSSIS PPLSAIFTT
156	PRT	Artificial	ECB109 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGSSISP PLSAIFTT
157	PRT	Artificial	ECB118 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKIS PPLSAIFTT
158	PRT	Artificial	ECB119 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSGS EAIIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTT
159	PRT	Artificial	ECB120 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKGD AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSSIS PPLSAIFTT
160	PRT	Artificial	ECB121 sin Met	LPAPKNLVSEVTEDSARLSWADPHGFYDSFLIQYQ ESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYG VHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKNL VSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGSSISP PLSAIFTT

161	PRT	Artificial	ECB91 sin Met	lpapknlvsevtedsarlswddpwa fyefliqyqesekvgeaivltvpgsers ydltgkpgteyvtvsiygvhnykdnmrgplsaiftapapapapaplpap NLVVSrvTedsARLSWTAPDAAFDFWIRYFELGSGEAVLTVP GSESYDlTGLKPGTEYVvNlSVKGGsISPLSAIFTT
162	PRT	Artificial	ECB18 sin Met	lpapknlvsevtedsarlswddpwa fyefliqyqesekvgeaivltv gsersydltgkpgteyvtvsiygvhnykdnmrgplsaiftapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirye vvggeaivltv pgsersydltgkpgteyvvniilgvkgsisvpsaiftapapapapapla eakvianreldkygvsdyykniinnaktvegkaildeilaalp
163	PRT	Artificial	ECB28 sin Met	lpapknlvsevtedsarlswdphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltgkpgteyvtvsiygvhnykdnmrgplsaiftapapapap plpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirye vvggeaivltv gsersydltgkpgteyvvniilgvkgsisvpsaiftapapapapaplae akvianreldkygvsdyykniinnaktvegkaildeilaalp
164	PRT	Artificial	ECB38 sin Met	lpapknlvsevtedsarlswddpwa fyefliqyqesekvgeaivltv gsersydltgkpgteyvtvsiygvhnykdnmrgplsaiftapapapap aplpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirye figsgeaivltv gsersydltgkpgteyvvniilgvkgsisvpsaiftapapapapapla eakvianreldkygvsdyykniinnaktvegkaildeilaalp
165	PRT	Artificial	ECB39 sin Met	lpapknlvsevtedsarlswdphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpg sersydltgkpgteyvtvsiygvhnykdnmrgplsaiftapapapap pipapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirye figsgeaivltvpg sersydltgkpgteyvvniilgvkgsisvpsaiftapapapapaplae akvianreldkygvsdyykniinnaktvegkaildeilaalp
166	ADN	Artificial	ECB97 sin Met	ttgccagccgcaagaacctggtagttagcagggtactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgiggcgtctacgagagcttctgat ccagtaicaagagagcgagaagcggggaagcgatgtgctgaccgt cccgggctcogagcgtctacgacctgaccggttgaaagccgggtaacc gagtaacggfagcactacoggtgtcaaatgctataaggacactaa tatccgggctgacctgagcgcacatccaaccgaccggcaccg gctccggctcctgcccctgcccctgcccctccgaagacctgggtgtagcc gtgtaccgaagatagcgcacgctgagctggacggcaccggaagc gcgctcgtatgcttctggatcgtatcttggatctgggtagcggtaggc aatgctcagcgggctcgggctgaaagcctctacgatctgaccggtct gaaaccgggaccgagtagtggtagacaactgagcgttaaggcggg agcatcagccaccgctgagcgcgactccaagactggggttgc
167	ADN	Artificial	ECB15 sin Met	ctgccagcccctaagaactggctgtagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccggggcgtctctagagcttctctga ttcagtaicaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgaatgctgaccg tcccgggtagcagcgcctctacgactgaccggcctgaaaccgggta cggagtaacgggtgctcaattacgggtgtcacaatgtgataaagacacc aacatgctgggctgcccgtctgctggcgaatttaccaccggcctgccc cagcgcctgaccggcctcctgcccggcaccgaagacacctgggtgca gcccgtgtagccgagtagcgcacgtttgagctggacgcctcoggatg cagcccttgacagctctggatcgttacttgaaattctggtagcggtag gctgactctgacggfcccgggctcgaaccgacgctatgattgacggg cctgaagccgggactgagtaactgtgtaacatctgggcttaagggtg gtaaaatcagcccgccatgtccgctgactttaccacg
168	ADN	Artificial	>EGFR parte ECB97; P54AR4–83v22 sin met	ttgccagccgcaagaacctggtagttagcagggtactgaggacagc gcgcgtctgagctgggacgatccgiggcgtctacgagagcttctgat ccagtaicaagagagcgagaagcggggaagcgatgtgctgaccgt cccgggctcogagcgtctacgacctgaccgggttgaaagccgggtaacc gagtaacggfagcactacoggtgtcacaatgctataaggacactaa tatccgggctgacctgagcgcacatccaacc
169	ADN	Artificial	>EGFR parte ECB15; P54AR4–83v2 sin Met	ctgccagcccctaagaactggctgtagcgaagtaaccgaggacag cgcccgcctgagctgggacgacccggggcgtctctagagcttctctga ttcagtaicaagaaagcgaaaaagttggcgaagcgaatgctgaccg tcccgggtagcagcgcctctacgactgaccggcctgaaaccgggta cggagtaacgggtgctcaattacgggtgtcacaatgtgataaagacacc aacatgctgggctgcccgtctgctggcgaatttaccacc

170	PRT	Artificial	ECB94 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKI SPPLSAIFTTTC
171	PRT	Artificial	ECB95 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTTC
172	PRT	Artificial	ECB96 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTTC
173	PRT	Artificial	ECB97 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGSSIS PPLSAIFTTTC
174	PRT	Artificial	ECB106 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGKI SPPLSAIFTTTC
175	PRT	Artificial	ECB107 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTTC
176	PRT	Artificial	ECB108 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFVSKG DAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILGVKGGSI SPPLSAIFTTTC
177	PRT	Artificial	ECB109 con Cisteína C-ter	MLPAPKNIWSEVTEDSARLSWDDPHAFYESFLIQY QESEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIY GVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSG EAI.VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGSSIS PPLSAIFTTTC
178	PRT	Artificial	ECB91 con Cisteína C-ter	mipapknIwsevtedsarlswwddpwafyesfliqyqesekvgeaivltpgse rsydlgtgkpgteytsiygvhnykdtnirgIplsaiFFTAPAPAPAPAPLPAP KNLWVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAI.VLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYVWNILSVKGGSSIPPLSAIFTTTC

>SEQ ID NO: 179

PRT

5 Artificial

Un Bucle FG del dominio FN3 de unión a EGFR

HNHYKDTNX₉RGL;

en el que X₉ es M o I

>SEQ ID NO: 180

PRT

Artificial

- 5 Un bucle FG del dominio FN3 de unión a EGFR
LGSYVFEHDMVL (SEQ ID NO: 180),

>SEQ ID NO: 181

PRT

- 10 Artificial

Un bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 181); en el que

X₁ es A, T, G o D;

X₂ es A, D, Y o W;

- 15 X₃ es P, D o N;

X₄ es L o está ausente;

X₅ es D, H, R, G, Y o W;

X₆ es G, D o A;

X₇ es A, F, G, H o D; and

- 20 X₈ es Y, F o L.

>SEQ ID NO: 182

PRT

- 25 Artificial

Dominio FN3 de unión a EGFR

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP

GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNX₉RGLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 182),

X₁ es A, T, G o D;

- 30 X₂ es A, D, Y o W;

X₃ es P, D o N;

X₄ es L o está ausente;

X₅ es D, H, R, G, Y o W;

X₆ es G, D o A;

- 35 X₇ es A, F, G, H o D;

X₈ es Y, F o L; and

X₉ es M o I

- 40 >SEQ ID NO: 183

PRT

Artificial

Dominio FN3 de unión a EGFR

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈DSFLIQYQESEKVGGEAINLTVP

- 45 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVLSYVFEHDMVLPLSAEFTT (SEQ ID NO: 183),

en el que

X₁ es A, T, G o D;

X₂ es A, D, Y o W;

X₃ es P, D o N;

- 50 X₄ es L o está ausente;

X₅ es D, H, R, G, Y o W;

X₆ es G, D o A;

X₇ es A, F, G, H o D; and

- 55 X₈ es Y, F o L.

>SEQ ID NO: 184

PRT

Artificial

- 60 Una secuencia de cadena C y del bucle CD del dominio FN3 de unión a C-met

DSFX₁₀IRYX₁₁EX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆ (SEQ ID NO: 184), en el que

X₁₀ es W, F o V;

X₁₁ es D, F o L;

X₁₂ es V, F o L;

- 65 X₁₃ es V, L o T;

X₁₄ es V, R, G, L, T o S;

X₁₅ es G, S, A, T o K; y
X₁₆ es E o D; y

5 >SEQ ID NO: 185
PRT
Artificial
Cadena F y un bucle FG del dominio FN3 de unión a C-met
TEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃ (SEQ ID NO: 185), en el que
10 X₁₇ es Y, W, I, V, G o A;
X₁₈ es N, T, Q o G;
X₁₉ es L, M, N o 1;
X₂₀ es G o S;
X₂₁ es S, L, G, Y, T, R, H o K;
15 X₂₂ es I, V o L; and
X₂₃ es V, T, H, I, P, Y o L.

>SEQ ID NO: 186
20 PRT
Artificial
un dominio FN3 de unión a c-Met
LPAPKNLVSVRTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁₀IRYX₁₁EX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅GX₁₆
AIVLTPGSESYDLTGLKPGTEYX₁₇VX₁₈IX₁₉X₂₀VKGGX₂₁X₂₂SX₂₃PLSAEFTT (SEQ ID NO: 186),
25 en el que
X₁₀ es W, F o V; and
X₁₁ es D, F o L;
X₁₂ es V, F o L;
X₁₃ es V, L o T;
30 X₁₄ es V, R, G, L, T o S;
X₁₅ es G, S, A, T o K;
X₁₆ es E o D;
X₁₇ es Y, W, I, V, G o A;
X₁₈ es N, T, Q o G;
35 X₁₉ es L, M, N o 1;
X₂₀ es G o S;
X₂₁ es S, L, G, Y, T, R, H o K;
X₂₂ es I, V o L; and
X₂₃ es V, T, H, I, P, Y o L.
40

>SEQ ID NO: 187
PRT
Artificial
45 Dominio FN3 de EGFR de una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-Met
LPAPKNLVVSX₂₄VTX₂₅DSX₂₆RLSWDDPX₂₇AFYX₂₈SFLIQYQX₂₉SEKVGAEIX₃₀LT
VPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYX₃₁VHNVYKDTNX₃₂RGLPLSAX₃₃FTT (SEQ ID NO: 187), en el que
X₂₄ es E, N o R;
X₂₅ es E o P;
50 X₂₆ es L o A;
X₂₇ es H o W;
X₂₈ es E o D;
X₂₉ es E o P;
X₃₀ es N o V;
55 X₃₁ es G o Y;
X₃₂ es M o I; and
X₃₃ es E o I;

>SEQ ID NO: 188
60 Dominio FN3 de c-Met de una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de EGFR/c-
MetLPAPKNLVVSX₃₄VTX₃₅DSX₃₆RLSWTAPDAAFDSFWIRYFX₃₇FX₃₈X₃₉X₄₀GX₄₁AIX₄₂
LTVPGSESYDLTGLKPGTEYVVNIX₄₃X₄₄VKGGX₄₅ISPLSAX₄₆FTT (SEQ ID NO: 188); en el que
X₃₄ es E, N o R;
X₃₅ es E o P;
65 X₃₆ es L o A;
X₃₇ es E o P;

- X₃₈ es V o L;
- X₃₉ es G o S;
- X₄₀ es S o K;
- X₄₁ es E o D;
- X₄₂ es N o V;
- X₄₃ es L o M;
- X₄₄ es G o S;
- X₄₅ es S o K; y
- X₄₆ es E o I.

5

10

>SEQ ID NO: 189
 VARIANTEe C34S de HSA

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFA
 KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERN
 ECFLQHKDDNPNLPRLV RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYF
 YAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG
 DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP
 ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLR
 LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLG
 EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP TLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC
 AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYV
 PKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVM
 DDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL

15

>SEQ ID NO: 190
 ECB168

MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAP
 APLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP
 PGSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGG SISPPLSAIFTT

20

>SEQ ID NO: 191
 ECB 168 sin Met

25

LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESFLIQYQSEKVG EAIVLTVP
 SERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVHNVYKDTNIRGLPLSAIFTTAPAPAPAPA
 PLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP
 GSERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGG SISPPLSAIFTT

>192
 ECB sin nombre último en la lista 17v2–C5v2

30

mLpapknlvvsevtedsarlswadphgfydsfliqqesekvgeaivltvpgsersydl tglkpgteytsiygvh
 nvykdtmrglplsaifftapapapapap
 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVP
 SERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGG SISPPLSAIFTT

>193
 ECB sin nombre sin met último en la lista17v2–C5v2

35

Lpapknlvsvtedsarlswadphgfydsfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaiftapapapapap
LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIRYFEFLGSGEAIVLTVPG
SERSYDLTGLKPGTEYVVNILSVKGGSSPPLSAIFTT

5 >SEQ ID NO: 194
>83v2 D22A

Lpapknlvsvtedsarlswadpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

10 >SEQ ID NO: 195
>83v2 D23A

Lpapknlvsvtedsarlswadpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

15 >SEQ ID NO: 196
>83v2 P24A

Lpapknlvsvtedsarlswwdawafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

20 >SEQ ID NO: 197
>83v2 W25A

Lpapknlvsvtedsarlswwdpafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

30 >SEQ ID NO: 198
>83v2 F27A

Lpapknlvsvtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

35 >SEQ ID NO: 199
>83v2 Y28A

Lpapknlvsvtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

40 >SEQ ID NO:200
>83v2 H75A

Lpapknlvsvtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

45 >SEQ ID NO: 201
>83v2 N76A

Lpapknlvsvtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsygvhn
vykdtmrglplsaift

50 >SEQ ID NO: 202

ES 2 696 148 T3

>83v2 V77a

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
aykdtmrglplsaifft

5

>SEQ ID NO: 203
>83v2 Y78A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vakdtmrglplsaifft

10

>SEQ ID NO: 204
>83v2 K79A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vyadtnmrglplsaifft

15

>SEQ ID NO: 205
>83v2 D80A

20

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vykatmrglplsaifft

>SEQ ID NO: 206
>83v2 M83A

25

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vykdtmarglplsaifft

30

>SEQ ID NO: 207
>83v2 R84A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vykdtmraglplsaifft

35

>SEQ ID NO: 208
>83v2 G85A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vykdtmralplsaifft

40

>SEQ ID NO: 209
>83v2 L86A

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vykdtmrgaplsaifft

45

>SEQ ID NO: 210
>83v2 T81A

50

Lpapknlvvsevtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgteyvtvsiygvhn
vykdanmrglplsaifft

>SEQ ID NO: 211
>83v2 N82A

55

lpapknlvsvrvtedsarlswwdpwafyesfliqyqesekvgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvtvsiygvhn
vykdtamrglplsaifft

5 SEQ ID NO: 212
>K78S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
Sispplsaifft

10 SEQ ID NO: 213
>G40S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflSsggeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
kispplsaifft

15 SEQ ID NO: 214
>L39S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflSsggeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
gkispplsaifft

20 SEQ ID NO: 215
>V68S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
kispplsaifft

25 SEQ ID NO: 216
>N70S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvSimgvkkg
kispplsaifft

30 SEQ ID NO: 217
>P81S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
kisSpplsaifft

35 SEQ ID NO: 218
>F36S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwirySeflgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
kispplsaifft

40 SEQ ID NO: 219
>W32S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfSiryfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
kispplsaifft

45 SEQ ID NO: 220
>M72S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfelfgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvniSgvkkg
kispplsaifft

50 SEQ ID NO: 221
>R34S

lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiSyfeflgsgeaivltvpgsersydlgtlkgpgetyvvnimgvkkg
kispplsaifft

SEQ ID NO: 222
>F38S

5 lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeSlgsgeaivltvpgsersydltgkpgteyvvnimgvkgg
kispplsaiftt

SEQ ID NO: 223
>179S

10 lpapknlvsvrvtedsarlswtapdaafdsfwiryfeflgsgeaivltvpgsersydltgkpgteyvvnimgvkgg
kSspplsaiftt

SEQ ID NO: 224
PRT

15 Artificial
Enlazador
GGGSGGGGS

Listado de secuencias

- <110> Anderson, Mark Attar, Ricardo Diem, Michael Hyun, Linus Jacobs, Steven King, Alastair Klein, Donna Moores, Sheri O'Neil, Karyn Picha, Kristen
- 5 <120> Moléculas de unión al dominio de fibronectina de tipo III de EGFR y c-Met
- <130> JBI5014WOPCT
- 10 <140> Pendiente de asignación
- <141> 2013-11-20
- <150> 61/728,906
- 15 <151> 2012-11-21
- <150> 61/728,914
- <151> 2012-11-21
- 20 <150> 61/728,912
- <151> 2012-11-21
- <150> 61/782,550
- <151> 2013-03-14
- 25 <150> 61/809,541
- <151> 2013-04-08
- <160> 224
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 89
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Armazón de FN3 de Tencon
- <400> 1
- 45
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | | | | | | | | | | | |
- 50 <210> 2

ES 2 696 148 T3

<211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 2
 10 ggaacagga tctaccatgc tgccggcgcc gaaaaacctg gttgttctg aagttacc 58

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 3
 20 aacaccgtag atagaaacgg t 21

<210> 4
 <211> 131
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 4
 cggcggtag aacgcggcta caattaatac ataaccocat cccctgttg acaattaatc 60
 atcggctcgt ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacaggat 120
 ctaccatgct g 131

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <400> 5
 cggcggtag aacgcggcta c 21

<210> 6
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 55 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 60 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(42)
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(45)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 6
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnaacac cgtagataga 60
 aacggt 66

<210> 7
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> n es a, c, g, o t

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(42)
 <223> n es a, c, g, o t

	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (44)..(45)		
5	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (47)..(48)		
10	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 7		
	ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnaa caccgtagat		60
	agaaacggt		69
15	<210> 8		
	<211> 72		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> cebador		
	<220>		
	<221> misc_feature		
25	<222> (26)..(27)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
30	<222> (29)..(30)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
35	<222> (32)..(33)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
40	<222> (35)..(36)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
45	<222> (38)..(39)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
50	<222> (41)..(42)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
55	<222> (44)..(45)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
60	<222> (47)..(48)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		

ES 2 696 148 T3

<222> (50)..(51)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 8
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta 60

5 gatagaaacg gt 72

<210> 9
 <211> 75
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(39)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (41)..(42)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(45)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (47)..(48)
 <223> n es a, c, g, o t

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(51)
 <223> n es a, c, g, o t

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (53)..(54)
 <223> n es a, c, g, o t

ES 2 696 148 T3

	<code><400> 9</code>	<code>ggtggtgaat tccgcagaca ggggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnaacacc</code>	60
		<code>gtagatagaa acggt</code>	75
5	<code><210> 10 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial</code>		
10	<code><220> <223> cebador</code>		
15	<code><220> <221> misc_feature <222> (28)..(29) <223> n es a, c, g, o t</code>		
20	<code><220> <221> misc_feature <222> (31)..(32) <223> n es a, c, g, o t</code>		
25	<code><220> <221> misc_feature <222> (34)..(35) <223> n es a, c, g, o t</code>		
30	<code><220> <221> misc_feature <222> (37)..(38) <223> n es a, c, g, o t</code>		
35	<code><220> <221> misc_feature <222> (40)..(41) <223> n es a, c, g, o t</code>		
40	<code><220> <221> misc_feature <222> (43)..(44) <223> n es a, c, g, o t</code>		
45	<code><220> <221> misc_feature <222> (46)..(47) <223> n es a, c, g, o t</code>		
50	<code><220> <221> misc_feature <222> (49)..(50) <223> n es a, c, g, o t</code>		
55	<code><220> <221> misc_feature <222> (52)..(53) <223> n es a, c, g, o t</code>		
60	<code><220> <221> misc_feature <222> (55)..(56) <223> n es a, c, g, o t</code>		
	<code><220> <221> misc_feature <222> (58)..(59)</code>		

ES 2 696 148 T3

<223> n es a, c, g, o t

<400> 10
rmggtggtga attccgcaga cagcgggsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsnna 60

5 acaccgtaga tagaaacggt 80

<210> 11
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<220>

15 <221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

20 <221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

25 <221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

30 <221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

35 <221> misc_feature
<222> (38)..(39)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

40 <221> misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

45 <221> misc_feature
<222> (44)..(45)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

50 <221> misc_feature
<222> (47)..(48)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

55 <221> misc_feature
<222> (50)..(51)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

60 <221> misc_feature
<222> (53)..(54)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

ES 2 696 148 T3

<221> misc_feature
 <222> (56)..(57)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(60)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 11
 ggtggtgaat tccgcagaca gcggsnnsnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn 60
 aacaccgtag atagaaacgg t 81

<210> 12
 <211> 81

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

20 <400> 12
 aagatcagtt gcggccgcta gactagaacc gctgccatgg tgatggtgat ggtgaccgcc 60
 ggtggtgaat tccgcagaca g 81

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

30 <400> 13
 cggcggtag aacgcggcta caattaatac 30

35 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 14
 catgattacg ccaagctcag aa 22

45 <210> 15
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

<400> 15
 gagccgccgc caccggttta atggtgatgg tgatggtgac caccggtggt gaattccgca 60

55 gacag 65

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 696 148 T3

<220>
 <223> cebador

5 <400> 16
 aagaaggaga accggtatgc tgccggcgcc gaaaaac 37

<210> 17
 <211> 89
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

15 <400> 17
 ttgggaagc ttctaggtct cggcggtcac catcaccatc accatggcag cggttctagt 60
 ctagcggccc caactgatct tcaccaaac 89

<210> 18
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 18
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Trp Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp Ser Phe Leu
 20 25 30
 Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val His Asn Val Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Asn Met Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85 90

30 <210> 19
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 19
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Trp Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Ser Phe Leu
 20 25 30

40

ES 2 696 148 T3

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
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

10 <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

15 <210> 21
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 21
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

10

<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

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

20

<400> 23

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 24

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

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

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

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

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

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

<210> 25

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 25

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 26

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

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

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

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

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

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

<210> 27

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 27

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 28

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

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

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

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

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

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

15 <210> 29

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 29

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

10

<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

15 <211> 65

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador

<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 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

ES 2 696 148 T3

<210> 32
 <211> 89
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

 10 <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
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

 20 <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
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 696 148 T3

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 34

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

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

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

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

5 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

10 <211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 35

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

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

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

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

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

Val Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

20 <210> 36

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 36

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 37
- <211> 89
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 37
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

- 15 <210> 38
- <211> 89
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 38

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 39
- <211> 89
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 39
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

Thr Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

- 15 <210> 40
- <211> 89
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 40
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

25

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10

<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

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 42

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10

<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

15 <211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 44

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10

<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

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 46

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10

<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

15

<210> 48

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 48

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 49

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

15 <210> 50

<211> 205

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 50

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 51
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 51

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 52
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 52

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 53
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 53

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 54
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 54

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 55
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 55

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 56
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 56

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 57
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 57

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 58
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 58

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 59

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 60

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 61

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 62

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 63

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 64

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 65

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 66

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 67

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 68

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 69

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 70

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 71

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 72

ES 2 696 148 T3

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

5 <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

10

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

5 <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

10

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

ES 2 696 148 T3

<210> 75
 <211> 2201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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												

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 Fibcon

<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

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador

10

<400> 78

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 79

15 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Enlazador

<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

25 <210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Enlazador

<400> 80

Ala Pro Ala Pro

1

35

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Enlazador

 <400> 81
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 5 1 5 10

 <210> 82
 <211> 20
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 15 <400> 82
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

 Ala Pro Ala Pro
 20

 <210> 83
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador
 25

 <400> 83
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 20 25 30

 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 35 40

 30 <210> 84
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Enlazador

 <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

 40 <210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> tencon Bucle BC

 <400> 85

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp
 1 5
 <210> 86
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> tencon Bucle FG
 10
 <400> 86
Lys Gly Gly His Arg Ser Asn
 1 5
 <210> 87
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR
 <400> 87
Ala Asp Pro His Gly Phe Tyr Asp
 1 5
 25 <210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR
 <400> 88
Thr Tyr Asp Arg Asp Gly Tyr Asp
 1 5
 35 <210> 89
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR
 <400> 89
Trp Asp Pro Phe Ser Phe Tyr Asp
 45 1 5
 <210> 90
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR
 55 <400> 90
Asp Asp Pro Arg Gly Phe Tyr Glu
 1 5
 <210> 91
 <211> 8
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR

5 <400> 91
 Thr Trp Pro Tyr Ala Asp Leu Asp
 1 5

<210> 92
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR

15 <400> 92
 Gly Tyr Asn Gly Asp His Phe Asp
 1 5

<210> 93
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 93
 Asp Tyr Asp Leu Gly Val Tyr Asp
 1 5

30 <210> 94
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Bucle BC del dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 94
 Asp Asp Pro Trp Asp Phe Tyr Glu
 1 5

40 <210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Bucle FG del dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 95
 His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Met Arg Gly Leu
 50 1 5 10

<210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Bucle FG del dominio FN3 de unión a EGFR

60 <400> 96
 Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met
 1 5 10

ES 2 696 148 T3

<210> 97
 <211> 285
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR deECB97; P54AR4-83V22

10 <400> 97
 atgttgccag cgccgaagaa cctggtagtt agcgagggta ctgaggacag cgcgcgctctg 60
 agctgggacg atccgtgggc gttctacgag agctttctga tccagtatca agagagcgag 120
 aaagtcggtg aagcgattgt gctgaccgtc ccgggtccg agcgttccta cgacctgacc 180
 ggtttgaagc cgggtaccga gtatacggtg agcatctacg gtgttcacaa tgtctataag 240
 gacactaata tccgcggtct gcctctgagc gccattttca ccacc 285

<210> 98
 <211> 285
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR deECB15; P54AR4-83V2

20 <400> 98
 atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgcctg 60
 agctgggacg acccgtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120
 aaagttggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgttccta cgatctgacc 180
 ggctgaaac cgggtaccga gtacacggtg tccatttacg gtgttcacaa tgtgtataaa 240
 gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattttca ccacc 285

<210> 99
 <211> 89
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> dominio FN3 tencon27

<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

35 Asn Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

- <210> 100
- <211> 89
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Biblioteca TCL14

- 10 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (32)..(32)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (34)..(34)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (36)..(36)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 25 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (38)..(38)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (39)..(39)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (40)..(40)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 40 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (41)..(41)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 45 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (68)..(68)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 50 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (70)..(70)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 55 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (72)..(72)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 60 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (78)..(78)
- <223> Xaa es cualquier aminoácido

- 65 <220>
- <221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(79)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<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

10 Xaa Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 101
 <211> 1408
 <212> PRT
 15 <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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

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
5 <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

10

ES 2 696 148 T3

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

ES 2 696 148 T3

```

340                               345                               350

Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr
   355                                360                                365

Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp
   370                                375                                380

Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp
385                                390                                395                                400

Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala
   405                                410                                415

His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr
   420                                425                                430

Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn
   435                                440                                445

Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val
   450                                455                                460

Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu
465                                470                                475                                480

Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser
   485                                490                                495

Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp
   500                                505                                510

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu
   515                                520                                525

Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu
   530                                535                                540

Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp
545                                550                                555                                560

Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro
   565                                570                                575

Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile
   580                                585                                590

```

ES 2 696 148 T3

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
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10 <400> 103
ctgccggctc cgaagaactt ggtggtgagc cgtgttaccg aagatagcgc acgcctgagc 60
tggacggcac cggatgcggc gttc gatagc ttctggattc gctat tttga gtttctgggt 120
agcggtgagg caattgttct gacggtgccg ggctctgaac gctcctacga tttgaccggt 180
ctgaaaccgg gcaccgagta tgtggtgaac attctgagcg ttaagggcgg tagcatcagc 240
ccaccgctga gcgcgatctt cacgactggt ggttgc 276

15 <210> 104
<211> 267
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 104
ctgccggcac cgaagaacct ggttgtcagc cgtgtgaccg aggatagcgc acg tttgagc 60
tggaccgctc cggatgcagc ctttgacagc ttctggattc gttactttga atttctgggt 120
agcggtgagg cgatcgttct gacggtgccg ggctctgaac gcagctatga tttgacgggc 180
ctgaaaccgg gtactgagta cgtggttaac atcatgggcg ttaaggggtg taaaatcagc 240
25 ccgccattgt ccgcgatctt taccacg 267

<210> 105
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

ES 2 696 148 T3

<220>
<223> Enlazador

5 <400> 105
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 106
<211> 194
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
15

<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

20 Thr Thr
<210> 107
<211> 94
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 696 148 T3

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

5 <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

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

15

<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

20

<210> 109

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 109

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 110

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

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

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

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

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

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

<210> 111

15 <211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 111

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 112

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 113

15 <211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 113

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 114
- <211> 89
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 114
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

- 15 <210> 115
- <211> 591
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 115

ES 2 696 148 T3

atggtgccag 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 gccatthtca ccaccgcacc ggcaccggct 300
 ccggctcctg ccccgctgcc ggctccgaag aacttggtgg tgagccgtgt taccgaagat 360
 agcgcacgcc tgagctggac ggcaccgat gcggcgttcg atagcttctg gattcgtat 420
 tttgagtttc tgggtagcgg tgaggcaatt gttctgacgg tgccgggctc tgaacgctcc 480
 tacgatttga ccggtctgaa accgggcacc gagtatgtgg tgaacattct gagcgttaag 540
 ggcggtagca tcagcccacc gctgagcgcg atcttcacga ctggtggttg c 591

- 5 <210> 116
- <211> 582
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 116
 atgctgccag cccctaagaa tctggtcgtg agcgaagtaa ccgaggacag cgcccgcctg 60
 agctgggacg acccggtgggc gttctatgag tctttcctga ttcagtatca agaaagcgaa 120
 aaagtggcg aagcgatcgt cctgaccgtc ccgggtagcg agcgcctccta cgatctgacc 180
 ggcctgaaac cgggtacgga gtacacggtg tccatthtacc gtgttcacaa tgtgtataaa 240
 gacaccaaca tgcgtggcct gccgctgtcg gcgattthtca ccaccgcgcc tgcgccagcg 300
 cctgcaccgg ctccgctgcc ggcaccgaag aacttggttg tcagccgtgt gaccgaggat 360
 agcgcacggt tgagctggac cgctccgat gcagcctttg acagcttctg gattcgttac 420
 tttgaatttc tgggtagcgg tgaggcgatc gttctgacgg tgccgggctc tgaacgcagc 480
 tatgatttga cgggcctgaa gccgggtact gagtacgtgg ttaacatcat gggcgttaag 540
 ggtggtaaaa tcagcccgcc attgtccgcg atctttacca cg 582

- 15 <210> 117
- <211> 51
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> dominio de unión a albúmina
- <400> 117

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 118

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 119
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 119

ES 2 696 148 T3

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 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

5 <210> 120
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 120

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 121
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

ES 2 696 148 T3

<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

5 Leu Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
245 250

<210> 122

<211> 95

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

ES 2 696 148 T3

<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

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

<210> 123

<211> 95

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

15 <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

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

25 <400> 124

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 125
- <211> 95
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 125
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

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

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

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

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

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

- 15 <210> 126
- <211> 95
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 126
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp

- 25

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 129

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

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

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

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

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

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

<210> 130

15 <211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 130

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 131

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

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

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

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

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

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

15 <210> 132

<211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 132

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 133

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

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

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

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

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

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

15 <210> 134

<211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 134

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 135

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

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

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

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

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

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

15 <210> 136

<211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 136

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

10

<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

15

<210> 138

<211> 204

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 138

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 139
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 139

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 140
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 140

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 141
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 141

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 142
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 142

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 143
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
 <400> 143

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 144
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 144

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 145
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
 <400> 145

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 146
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 146

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 147
- <211> 194
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
- <400> 147

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 148
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
- <400> 148

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 149
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
- <400> 149

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 150
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 150

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 151
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
- <400> 151

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 152
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 152

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 153
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
- <400> 153

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 154

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 155

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 156

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 157

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 158

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 159

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 160

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 161

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

10

<400> 162

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 163
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 163

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 164
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 164

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 165
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 165

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 166
 <211> 588
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

ES 2 696 148 T3

	<400> 166		
	ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgctctgagc	60	
	tgggacgatc cgtgggcggt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa	120	
	gtcggggaag 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 tcgctatddd	420	
	gagtttctgg gtacgggtga ggcaattggt ctgacgggtc cgggctctga acgctcctac	480	
	gatttgaccg gtctgaaacc gggcaccgag tatgtggtga acattctgag cgttaagggc	540	
5	ggtagcatca gccaccgct gagcgcgatc ttcacgactg gtggttgc	588	
	<210> 167		
	<211> 579		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met		
15	<400> 167		
	ctgccagccc ctaagaatct ggtcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc ccgcctgagc	60	
	tgggacgacc cgtgggcggt ctatgagtct ttctgattc agtatcaaga aagcgaaaaa	120	
	gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg gtagcgagc gctcctacga tctgaccggc	180	
	ctgaaaccgg gtaccgagta cacgggtgcc 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 gtacgggtga ggcgatcgtt ctgacgggtc cgggctctga acgcagctat	480	
	gatttgacgg gcctgaagcc gggactgag tacgtggtta acatcatggg cgttaagggc	540	
	ggtaaaaatca gcccgccatt gtccgcgatc tttaccacg	579	
	<210> 168		
	<211> 282		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Dominio FN3 de unión a EGFR deECB97		
	<400> 168		
	ttgccagcgc cgaagaacct ggtagttagc gaggttactg aggacagcgc gcgctctgagc	60	
	tgggacgatc cgtgggcggt ctacgagagc tttctgatcc agtatcaaga gagcgagaaa	120	
	gtcggggaag cgattgtgct gaccgtcccg ggctccgagc gttcctacga cctgaccggt	180	
	ttgaagccgg gtaccgagta tacggtgagc atctacggtg ttcacaatgt ctataaggac	240	
	actaatatcc gcggtctgcc tctgagcgcc attttcacca cc	282	

ES 2 696 148 T3

<210> 169
 <211> 282
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR deECB15

10 <400> 169
 ctgccagccc ctaagaatct ggctcgtgagc gaagtaaccg aggacagcgc cgcctgagc 60
 tgggacgacc cgtgggcgct ctatgagtct ttctgattc agtatcaaga aagcgaaaa 120
 gttggcgaag cgatcgtcct gaccgtcccg ggtagcagc gctcctacga tctgaccggc 180
 ctgaaaccgg gtacggagta cacggtgtcc atttacggtg ttcacaatgt gtataaagac 240
 accaacatgc gtggcctgcc gctgtcggcg atttcacca cc 282

<210> 170
 <211> 195
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

20 <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

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<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

ES 2 696 148 T3

- <210> 172
 <211> 195
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
- 10 <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
- 15 <210> 173
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met
 <400> 173

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 174
- <211> 195
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 174

ES 2 696 148 T3

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

- 5 <210> 175
- <211> 195
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 175

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 176
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 176

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 177
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 177

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 178
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Molécula biespecífica de unión a EGFR/c-Met

<400> 178

ES 2 696 148 T3

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

5 <210> 179
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Bucle FG de consenso del dominio FN3 de unión a EGFR

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser Met o Ile

<400> 179
 His Asn Val Tyr Lys Asp Thr Asn Xaa Arg Gly Leu
 1 5 10

20 <210> 180
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Bucle GF del dominio FN3 de unión a EGFR

 <400> 180
Leu Gly Ser Tyr Val Phe Glu His Asp Val Met Leu
1 5 10

10 <210> 181
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Bucle BC de consenso del dominio FN3 de unión a EGFR

 <220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Ala, Thr, Gly o Asp

 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Ala, Asp, Tyr o Trp

 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser Pro, Asp o Asn

 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser Leu o está ausente

 <220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Asp, His, Arg, Gly, Tyr o Trp

 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser Glu, Asp o Ala

 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Ala, Phe, Gly, His o Asp

 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser Tyr, Phe o Leu

 <400> 181
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

60 <210> 182
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Secuencia de consenso del dominio FN3 de unión a EGFR
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa puede ser Ala, Thr, Gly o Asp
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa puede ser Ala, Asp, Tyr o Trp
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa puede ser Pro, Asp o Asn
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (25)..(25)
<223> Xaa puede ser Leu o está ausente
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa puede ser Asp, His, Arg, Gly, Tyr o Trp
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (27)..(27)
<223> Xaa puede ser Gly, Asp o Ala
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (28)..(28)
<223> Xaa puede ser Ala, Phe, Gly, His o Asp
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa puede ser Tyr, Phe o Leu
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (84)..(84)
<223> Xaa puede ser Met o Ile
- 50 <400> 182

ES 2 696 148 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de consenso del dominio FN3 de unión a EGFR

<220>

<221> VARIANTE

<222> (22)..(22)

15 <223> Xaa puede ser Ala, Thr, Gly o Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23)..(23)

20 <223> Xaa puede ser Ala, Asp, Tyr o Trp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

25 <223> Xaa puede ser Pro, Asp o Asn

<220>

<221> VARIANTE

<222> (25)..(25)

30 <223> Xaa puede ser Leu o está ausente

<220>

<221> VARIANTE

<222> (26)..(26)

35 <223> Xaa puede ser Asp, His, Arg, Gly, Tyr o Trp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (27)..(27)

40 <223> Xaa puede ser Gly, Asp o Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (28)..(28)

45 <223> Xaa puede ser Ala, Phe, Gly, His o Asp

<220>

<221> VARIANTE

ES 2 696 148 T3

<222> (29)..(29)

<223> Xaa puede ser Tyr, Phe o 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

5 Phe Glu His Asp Val Met Leu Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90 95

<210> 184

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de la cadena C y el bucle CD del dominio FN3 de unión a c-Met

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Trp, Phe o Val

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Asp, Phe o Leu

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es Val, Phe o Leu

30 <220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es Val, Leu o Thr

35 <220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Val, Arg, Gly, Leu, Thr o Ser

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es Gly, Ser, Ala, Thr o Lys

45 <220>

<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)

ES 2 696 148 T3

<223> Xaa es Glu o Asp

<400> 184
 Asp Ser Phe Xaa Ile Arg Tyr Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
 1 5 10 15

5 <210> 185
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de consenso de la cadena F y el bucle FG del dominio FN3 de unión a c-Met

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Tyr, Trp, Ile, Val, Gly o Ala

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Asn, Thr, Qln o Gly

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es Leu, Met, Asn o Ile

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Gly o Ser

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His o Lys

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Ile, Val o Leu

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr o Leu

<400> 185
 Thr Glu Tyr Xaa Val Xaa Ile Xaa Xaa Val Lys Gly Gly Xaa Xaa Ser
 1 5 10 15

50 Xaa

<210> 186
 <211> 89
 <212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de consenso del dominio FN3 de unión a c-Met

60 <220>
 <221> VARIANTE

- <222> (32)..(32)
<223> Xaa es Trp, Phe o Val
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (36)..(36)
<223> Xaa es Asp, Phe o Leu
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (38)..(38)
<223> Xaa es Val, Phe o Leu
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (39)..(39)
<223> Xaa es Val, Leu o Thr
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (40)..(40)
<223> Xaa es Val, Arg, Gly, Leu, Thr o Ser
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (41)..(41)
<223> Xaa es Gly, Ser, Ala, Thr o Lys
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (43)..(43)
<223> Xaa es Glu o Asp
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (68)..(68)
<223> Xaa es Tyr, Trp, Ile, Val, Gly o Ala
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (70)..(70)
<223> Xaa es Asn, Thr, Qin o Gly
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (72)..(72)
<223> Xaa es Leu, Met, Asn o Ile
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (73)..(73)
<223> Xaa es Gly o Ser
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (78)..(78)
<223> Xaa es Ser, Leu, Gly, Tyr, Thr, Arg, His o Lys
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (79)..(79)
<223> Xaa es Ile, Val o Leu
- 65 <220>
<221> VARIANTE
<222> (81)..(81)

ES 2 696 148 T3

<223> Xaa es Val, Thr, His, Ile, Pro, Tyr o 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

5

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

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Dominio FN3 consenso de EGFR de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

20

<223> Xaa es Glu, Asn o Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(14)

25

<223> Xaa es Glu o Pro

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

30

<223> Xaa es Leu o Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (25)..(25)

35

<223> Xaa es His o Trp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

40

<223> Xaa es Glu o Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (37)..(37)

45

<223> Xaa es Glu o Pro

<220>

<221> VARIANTE

<222> (46)..(46)

50

<223> Xaa es Asn o Val

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa es Gly o Tyr
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa es Met o Ile
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa es Glu o Ile
 15
 <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> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Dominio FN3 consenso de c-Met de la molécula biespecífica de EGFR/c-Met
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Glu, Asn o Arg
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es Glu o Pro
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Leu o Ala
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa es Glu o Pro
 45
 <220>

ES 2 696 148 T3

<221> VARIANTE
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa es Val o Leu

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa es Gly o Ser

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa es Ser o Lys

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa es Glu o Asp

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa es Asn o Val

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa es Leu o Met

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa es Gly o Ser

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa es Ser o Lys

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (86)..(86)
 <223> Xaa es Glu o Ile

45 <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

ES 2 696 148 T3

<210> 189
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)..(34)
 <223> C34S

10

<400> 189
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

ES 2 696 148 T3

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

ES 2 696 148 T3

	405	410	415	
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys	420	425	430	
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys	435	440	445	
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His	450	455	460	
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser	465	470	475	480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr	485	490	495	
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp	500	505	510	
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala	515	520	525	
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu	530	535	540	
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys	545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val	565	570	575	
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu	580	585		
<210> 190				
<211> 194				
5 <212> PRT				
<213> Secuencia artificial				
<220>				
<223> Molécula biespecífica de EFGR/c-Met				
10 <400> 190				
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp	1	5	10	15
Ser Ala Arg Leu Ser Trp Asp Asp Pro Trp Ala Phe Tyr Glu Ser Phe	20	25	30	

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
 180 185 190

Thr Thr

<210> 191

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Molécula biespecífica de EFGR/c-Met

<400> 191

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

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

ES 2 696 148 T3

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

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

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

Thr Asn Ile Arg Gly Leu Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr Ala Pro
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
 100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
 115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
 130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
 145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
 165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
 180 185 190

Thr

<210> 192

<211> 194

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Molécula biespecífica de EFGR/c-Met

<400> 192

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

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

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu
 100 105 110

Val Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala
 115 120 125

Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu
 130 135 140

Gly Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile
 165 170 175

Leu Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe
 180 185 190

Thr Thr

<210> 193

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Molécula biespecífica de EFGR/c-Met

<400> 193

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

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

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr

ES 2 696 148 T3

35

40

45

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

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

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

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val
100 105 110

Val Ser Arg Val Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro
115 120 125

Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Trp Ile Arg Tyr Phe Glu Phe Leu Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Asn Ile Leu
165 170 175

Ser Val Lys Gly Gly Ser Ile Ser Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr
180 185 190

Thr

<210> 194

<211> 94

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 194

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

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

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

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

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

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

ES 2 696 148 T3

<210> 195
 <211> 94
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

 10 <400> 195
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

 <210> 196
 <211> 94
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

 20 <400> 196
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

 25 <210> 197
 <211> 94
 <212> PRT

ES 2 696 148 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

5

<400> 197

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

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

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

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

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

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

<210> 198

10

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 198

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

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

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

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

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

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

20

<210> 199

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 199

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 200

<211> 94

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 200

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

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

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

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

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

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

<210> 201

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 201

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 202

<211> 94

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 202

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

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

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

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

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

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

<210> 203

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 203

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 204
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 204
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

- 15 <210> 205
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 205

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 206
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 206
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

- 15 <210> 207
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 207

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 208
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 208
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

- 15 <210> 209
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 209
Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

25

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

<210> 210

<211> 94

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 210

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

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

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

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

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

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

<210> 211

15 <211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dominio FN3 de unión a EGFR

<400> 211

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 212

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 212

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 213

15 <211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 213

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 214

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10

<400> 214

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 215

<211> 89

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 215

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 216

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 216

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

15

<210> 217

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 217

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

Ser Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 218

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 218

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

15 <210> 219

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 219

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

<210> 220

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

10

<400> 220

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
 85

15

<210> 221

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 221

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 222

<211> 89

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 222

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

15 <210> 223

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> dominio FN3 de unión a c-Met

<400> 223

ES 2 696 148 T3

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

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

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

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

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

Pro Pro Leu Ser Ala Ile Phe Thr Thr
85

<210> 224

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador

10

<400> 224

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

15

20

25

30

35

40

45

REIVINDICACIONES

1. Una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 aislado que comprende un primer dominio de fibronectina de tipo III (FN3) y un segundo dominio FN3, en la que el primer dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) al EGFR, y el segundo dominio FN3 se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, y en la que el primer dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y el segundo dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

2. La molécula biespecífica de la reivindicación 1, en la que:

a) el primer dominio FN3 inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en el residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células A431 utilizando 50 ng/ml de EGF humano, y el segundo dominio FN3 inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en el residuo de c-Met Tirosina 1349 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $1,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células NCI-H441 utilizando 100 ng/ml de HGF humano;

b) el primer dominio FN3 inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en el residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} de entre aproximadamente $1,8 \times 10^{-8}$ M y aproximadamente $2,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células A431 usando 50 ng/ml de EGF humano, y el segundo dominio FN3 inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en el residuo dec-Met Tirosina 1349 con un valor de CI_{50} entre aproximadamente 4×10^{-9} M y aproximadamente $1,5 \times 10^{-6}$ M cuando se mide en células NCI-H441 usando 100 ng/ml de HGF humano;

c) el primer dominio FN3 se une al EGFR humano con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M, y el segundo dominio FN3 se une al c-Met humano con una K_D de menos de aproximadamente 5×10^{-8} M, en el que la K_D se mide utilizando resonancia de plasmón superficial; o

d) el primer dominio FN3 se une al EGFR humano con una constante de disociación (K_D) de entre aproximadamente 2×10^{-10} M y aproximadamente 1×10^{-8} M, y el segundo dominio FN3 se une a c-Met humano con una K_D de entre aproximadamente 3×10^{-10} M y aproximadamente 5×10^{-8} M, en el que la K_D se mide utilizando resonancia de plasmón superficial; y/o

e) la molécula biespecífica inhibe la proliferación de células NCI-H292 con un valor de CI_{50} que es al menos 30 veces menor cuando se compara con el valor de CI_{50} de inhibición del crecimiento de células NCI-H292 con una mezcla del primer dominio FN3 y el segundo dominio FN3, en el que la proliferación celular se induce con FBS al 10 % que contiene 7,5 ng/ml de HGF; y/o

f) la molécula biespecífica:

i) inhibe la fosforilación de EGFR inducida por EGF en el residuo de EGFR Tirosina 1173 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente 8×10^{-7} M cuando se mide en células NCI-H292 utilizando 50 ng/ml de EGF humano;

ii) inhibe la fosforilación de c-Met inducida por HGF en el residuo de c-Met Tirosina 1349 con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $8,4 \times 10^{-7}$ M cuando se mide en células NCI-H441 usando 100 ng/ml de HGF humano;

iii) inhibe la proliferación de células NCI-H292 inducida por HGF con un valor de CI_{50} inferior a aproximadamente $9,5 \times 10^{-6}$ M, en el que la proliferación celular se induce con FBS al 10 % que contiene 7,5 ng de HGF;

iv) se une a EGFR con una K_D inferior a aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M; o

v) se une a c-Met con una K_D inferior a aproximadamente $2,0 \times 10^{-8}$ M, en el que la K_D se mide utilizando resonancia de plasmón superficial como se describe en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 5.

3. La molécula biespecífica de la reivindicación 1 o 2, en la que:

a) el primer dominio FN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 107 o 108, y el segundo dominio FN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114;

b) el primer dominio FN3 se une a EGFR con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos D23, F27, Y28, V77 y G85 de P54AR4-83v2 (SEQ ID NO: 27), opcionalmente en el que el segundo dominio FN3 se une a c-Met con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos R34, F38, M72 y 179 en P114AR7P95-A3 (SEQ ID NO: 41);

c) el primer dominio FN3 comprende

i) un bucle FG que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 179 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 180; y

ii) un bucle BC que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 181; y

el segundo dominio FN3 comprende

i) una cadena C y un bucle CD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 184; y

ii) una cadena F y un bucle FG que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185;

d) el primer dominio FN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 183; y el segundo dominio FN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186;

e) el primer dominio FN3 y/o el segundo dominio FN3 comprenden sustituciones en una o más posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 en Tencon (SEQ ID NO: 1), opcionalmente, en el que el primer dominio FN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 187; y el segundo dominio FN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 188;

f) el primer dominio FN3 comprende la secuencia mostrada en una de las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137 o 194–211, y el segundo dominio FN3 comprende la secuencia mostrada en una de las SEQ ID NO: 32–49, 111–114 o 212–223, en el que opcionalmente el primer dominio FN3 y el segundo dominio FN3 comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 y 32, respectivamente; 27 y 41, respectivamente; 27 y 40, respectivamente; 27 y 33, respectivamente; 107 y 41, respectivamente; 107 y 40, respectivamente; 107 y 33, respectivamente; 107 y 32, respectivamente; 107 y 114, respectivamente; 108 y 111, respectivamente; 108 y 112, respectivamente; 108 y 113, respectivamente; 108 y 114, respectivamente; 109 y 111, respectivamente; 109 y 112, respectivamente; 109 y 113, respectivamente; 109 y 114, respectivamente; 110 y 111, respectivamente; 110 y 112, respectivamente; 110 y 113, respectivamente; o 110 y 114, respectivamente,

por ejemplo, en el que el primer dominio FN3 y/o el segundo dominio FN3 comprenden una o más sustituciones correspondientes a las sustituciones L17A, N46V y E86I en Tencon (SEQ ID NO: 1); y/o

g) el primer dominio FN3 y/o el segundo dominio FN3 se aíslan de una biblioteca diseñada en base a la secuencia Tencon de la SEQ ID NO: 1.

4. La molécula biespecífica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3:

a) en la que el primer dominio FN3 y el segundo dominio FN3 están acoplados por un enlazador, opcionalmente en la que el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en una de las SEQ ID NO: 78–84 o 224;

b) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 50–72, 106, 118–121, 138–165 o 190–193, y que comprende opcionalmente una metionina (Met) unida al extremo N de la molécula, que además comprende opcionalmente una cisteína unida al extremo C de la molécula ; y/o

c) acoplado a un resto de extensión de la semivida, en el que opcionalmente el resto de extensión de la semivida es una molécula de unión a albúmina, un polietilenglicol (PEG), una albúmina, una variante de albúmina, o al menos una parte de una región Fc de una inmunoglobulina y, opcionalmente, en la que el resto de extensión de la semivida es la variante de albúmina de la SEQ ID NO: 189.

5. Un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y bloquea la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) al EGFR, en el que el dominio FN3 se aísla de una biblioteca diseñada en base a la secuencia de aminoácidos de Tencon SEQ ID NO: 1, en el que:

a) el dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27; y opcionalmente

b) el dominio FN3 se une a EGFR con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos D23, F27, Y28, V77 y G85 de P54AR4–83v2 (SEQ ID NO: 27);

c) el dominio FN3 comprende

i) un bucle FG que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 179 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 180; y

ii) un bucle BC que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 181, y comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 183;

d) el dominio FN3 comprende la secuencia mostrada en una de las SEQ ID NO: 18–29, 107–110, 122–137 o 194–211; y/o

e) el dominio FN3 comprende sustituciones en una o más posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 en Tencon (SEQ ID NO: 1), opcionalmente, en el que el dominio FN3 comprende una o más sustituciones correspondientes a las sustituciones L17A, N46V y E86I en la secuencia de aminoácidos Tencon de la SEQ ID NO: 1.

6. Un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) y bloquea la unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a c-Met, en el que:

a) el dominio FN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 83 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41; y opcionalmente

b) el dominio FN3 se une a c-Met con uno o más residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos R34, F38, M72 y 179 en P114AR7P95–A3 (SEQ ID NO: 41):

c) el dominio FN3 comprende:

- i) una cadena C y un bucle CD que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 184; y
- ii) una cadena F y un bucle FG que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185, y comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 186;

d) el dominio FN3 comprende la secuencia mostrada en una de las SEQ ID NO: 32–49, 111–114 o 212–223; opcionalmente, en el que el dominio FN3 comprende sustituciones en una o más posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 11, 14, 17, 37, 46, 73 y 86 de la secuencia de aminoácidos Tencon de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en el que el dominio FN3 comprende una o más sustituciones correspondientes a las sustituciones L17A, N46V y E86I de la secuencia de aminoácidos de Tencon de la SEQ ID NO: 1; y/o

e) el dominio FN3 se aísla de una biblioteca diseñada en base a la secuencia de aminoácidos de Tencon de la SEQ ID NO: 1.

7. Un polinucleótido aislado que codifica:

- a) la molécula biespecífica de la reivindicación 1;
- b) el dominio FN3 de la reivindicación 5; o
- c) el dominio FN3 de la reivindicación 6.

8. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.

9. Una célula huésped aislada que comprende el vector de la reivindicación 9.

10. Un método para producir:

- a) una molécula biespecífica, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la reivindicación 9, como dependiente de la reivindicación 7a), en condiciones tales que se expresa la molécula biespecífica, y purificar la molécula biespecífica;
- b) un dominio FN3 que se une específicamente a EGFR, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la reivindicación 9, como dependiente de la reivindicación 7b), en condiciones tales que el dominio FN3 que se une específicamente a EGFR se expresa, y purifica el dominio FN3; o
- c) un dominio FN3 que se une específicamente a c-Met, que comprende cultivar la célula huésped aislada de la reivindicación 9, como dependiente de la reivindicación 7c), en condiciones tales que se expresa el dominio FN3 que se une específicamente a EGFR, y purifica el dominio FN3 que se une específicamente a c-Met.

11. Una composición farmacéutica que comprende:

- a)
 - i) la molécula biespecífica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o
 - ii) el dominio FN3 de la reivindicación 5 o 6; y

c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de la reivindicación 5, un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) de la reivindicación 6, o una composición de la reivindicación 11 para su uso en terapia.

13. Una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) aislado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de acuerdo con la reivindicación 5, un dominio de fibronectina de tipo III (FN3) que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) de acuerdo con la reivindicación 6, o una composición de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que, opcionalmente:

- a) el cáncer es un cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de faringe, cáncer de nariz, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de esófago, cáncer de vagina, cáncer de cuello uterino, cáncer de bazo, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer del timo, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (CHC) o carcinoma de células renales papilar esporádico o hereditario (CCP); y/o
- b) el sujeto es resistente o ha adquirido resistencia al tratamiento con erlotinib, gefitinib, afatinib, CO-1686, AZD9192 o cetuximab.

14. Una molécula biespecífica que contiene el dominio FN3 según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una composición de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que, opcionalmente:

5 a) el cáncer está asociado con una mutación activadora de EGFR, una amplificación del gen del EGFR, una mutación de activación de c-Met o una amplificación del gen dec-Met, en el que la mutación activadora de EGFR es G719A, G719X (siendo X cualquier aminoácido), L861X (siendo X cualquier aminoácido), sustitución L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, L858P o T790M, delección de E746–A750, delección de R748–P753, inserción de Ala (A) entre M766 y A767, inserción de Ser, Val y Ala (SVA) entre S768 y V769, e inserción de Asn y Ser (NS) entre P772 y H773; y/o

10 b) el tratamiento comprende administrar un segundo agente terapéutico, opcionalmente en donde el segundo agente terapéutico es:

15 i) un agente quimioterapéutico o una terapia dirigida contra el cáncer, opcionalmente cisplatino, vinblastina, un inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR, c-Met, HER2, HER3, HER4 o VEGFR, erlotinib, gefitinib o afatinib; y/o

ii) administrado simultáneamente, secuencialmente o por separado de la molécula biespecífica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1A.

SEQ ID			
NO:			
18	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWADP-HCFY	DSFLIQQESEKVG
19	EAINTVPC		SERSYDLTG
20	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWTYD-RDGY	DSFLIQQESEKVG
21	EAINTVPC		SERSYDLTG
22	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWGYN-GDHF	DSFLIQQESEKVG
23	EAINTVPC		SERSYDLTG
24	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWDDP-RGFY	DSFLIQQESEKVG
25	EAINTVPC		SERSYDLTG
26	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWTP-YADI	DSFLIQQESEKVG
27	EAINTVPC		SERSYDLTG
28	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWYDLDG	DFDSFLIQQESEKVG
29	EAINTVPC		SERSYDLTG
30	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWDDP-WAFY	ESFLIQQESEKVG
31	EAINTVPC		SERSYDLTG
32	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWTP-YADLD	DSFLIQQESEKVG
33	EAINTVPC		SERSYDLTG
34	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWADP-HGFY	DSFLIQQESEKVG
35	EAINTVPC		SERSYDLTG
36	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWDDP-WAFY	ESFLIQQESEKVG
37	EAINTVPC		SERSYDLTG
38	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWTP-YADLD	DSFLIQQESEKVG
39	EAINTVPC		SERSYDLTG
40	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWDDP-WAFY	ESFLIQQESEKVG
41	EAINTVPC		SERSYDLTG
42	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWDDP-HAFY	ESFLIQQESEKVG
43	EAINTVPC		SERSYDLTG
44	LPAPKNLVVSEVTE	DSRLSWADP-HCFY	DSFLIQQESEKVG
45	EAINTVPC		SERSYDLTG
46	*****	*****	*****
47	*****	*****	*****
48	*****	*****	*****
49	*****	*****	*****
50	*****	*****	*****
51	*****	*****	*****
52	*****	*****	*****
53	*****	*****	*****
54	*****	*****	*****
55	*****	*****	*****
56	*****	*****	*****
57	*****	*****	*****
58	*****	*****	*****
59	*****	*****	*****
60	*****	*****	*****
61	*****	*****	*****
62	*****	*****	*****
63	*****	*****	*****
64	*****	*****	*****
65	*****	*****	*****
66	*****	*****	*****
67	*****	*****	*****
68	*****	*****	*****
69	*****	*****	*****
70	*****	*****	*****
71	*****	*****	*****
72	*****	*****	*****
73	*****	*****	*****
74	*****	*****	*****
75	*****	*****	*****
76	*****	*****	*****
77	*****	*****	*****
78	*****	*****	*****
79	*****	*****	*****
80	*****	*****	*****
81	*****	*****	*****
82	*****	*****	*****
83	*****	*****	*****
84	*****	*****	*****
85	*****	*****	*****
86	*****	*****	*****
87	*****	*****	*****
88	*****	*****	*****
89	*****	*****	*****
90	*****	*****	*****
91	*****	*****	*****
92	*****	*****	*****
93	*****	*****	*****
94	*****	*****	*****

Figura 1B

```

SEQ ID
NO:
26 LPAPKNLVSEVTEDSLRLSNTAP-DAAFDSFLIQQESEKVGHAINLTVPGSERSYDLTG (60)
28 LPAPKNLVSEVTEDSLRLSNTAP-DAAFDSFLIQQESEKVGHAINLTVPGSERSYDLTG
***
26 LKPGTEYTVSIYGVLSGYVFEHDMVLPPLSAEFTT (94)
28 LKPGTEYTVSIYGVLSGYVFEHDMVLPPLSAIFTT
***

```

Figura 2.

	A	AB	B	BC																							
TENCON27	(1)	LPAPKNLVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAE	DS	(30)																				
TCL14	(1)	LPAPKNLVSRV	TEDS	ARLSW	TAPDAAE	DS	(30)																				
		C	CD	D	DE	E																					
TENCON27	(31)	FLIQYQ	SEKVG	EAI	VL	TV	PGSER	SYDL	TG	(60)																	
TCL14	(31)	FXIXY	XXXXXXXX	G	EAI	VL	TV	PGSER	SYDL	TG	(60)																
		EF	F	FG	G																						
TENCON27	(61)	LKPG	TEY	TV	SI	Y	GV	K	G	H	R	S	N	P	L	S	A	I	F	T	(89)						
TCL14	(61)	LKPG	TE	Y	X	V	X	I	X	G	V	K	G	X	X	X	X	X	X	P	L	S	A	I	F	T	(89)

Figura 3.

```
SEQ ID NO: 32 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYDEVVGGGEAIVLTVPGSERSYDLTG (60)
33 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYDEFILRSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
34 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
35 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
36 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
37 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYLEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
38 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
39 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
40 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
41 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
42 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
43 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
44 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
45 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
46 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
47 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFTTAGEAIVLTVPGSERSYDLTG
48 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFELLSTGEAIVLTVPGSERSYDLTG
49 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG
111 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
112 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG
113 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFVSKGEAIVLTVPGSERSYDLTG
114 LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEWIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTG
*****
*:*:*****
* * * * *
```


Figura 3 (continuación)

```

SEQ ID
NO:
32 LKPGTEYVVNIIILGVKGGSSISVPLSAIFTT
33 LKPGTEYVWVTIILGVKGGIVSTPLSAIFTT
34 LKPGTEYIVNIMGVKGGSSISHPLSAIFTT
35 LKPGTEYVVNIIILGVKGGGLSVPLSAIFTT
36 LKPGTEYVVQIILGVKGGYISIPLSAIFTT
37 LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
38 LKPGTEYVVGINGVKGGGYISYPLSAIFTT
39 LKPGTEYGVTINGVKGGRVSTPLSAIFTT
40 LKPGTEYVVQIIGVKGGHISLPLSAIFTT
41 LKPGTEYVVNIMGVKGGKISPPLSAIFTT
42 LKPGTEYAVNIMGVKGGVSVPLSAIFTT
43 LKPGTEYVVQIILGVKGGSSISVPLSAIFTT
44 LKPGTEYVVNIMGVKGGSSISYPLSAIFTT
45 LKPGTEYVVQIILGVKGGYISIPLSAIFTT
46 LKPGTEYVVQIMGVKGGTVSPPLSAIFTT
47 LKPGTEYVVNIMGVKGGSSISPPLSAIFTT
48 LKPGTEYVVNIMGVKGGSSISPPLSAIFTT
49 LKPGTEYVVNIMGVKGGSSISPPLSAIFTT
111 LKPGTEYVVNIIILGVKGGKISPPLSAIFTT
112 LKPGTEYVVNIIILGVKGGSSISPPLSAIFTT
113 LKPGTEYVVNIIILGVKGGSSISPPLSAIFTT
114 LKPGTEYVVNIIILSVKGGSSISPPLSAIFTT
***** * * * . ***** : * *****

```

Figura 4.

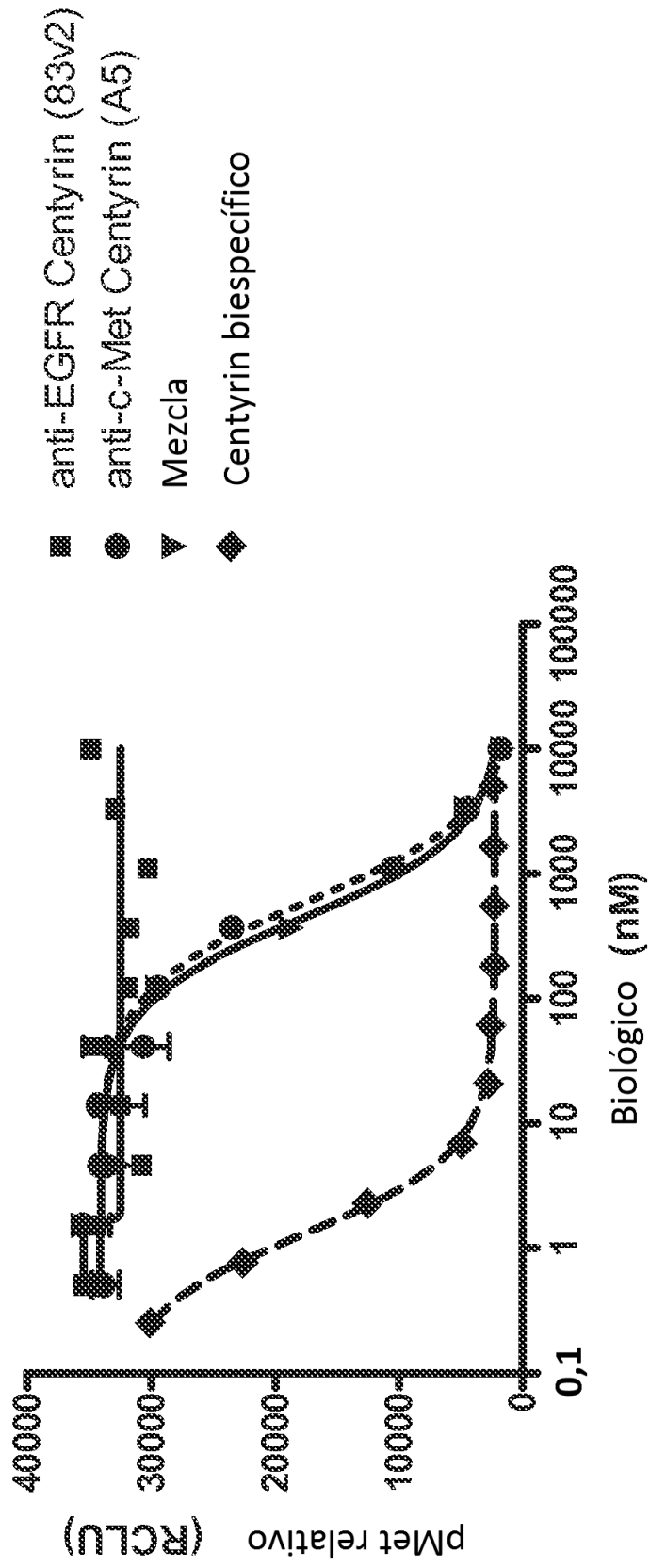


Figura 5.

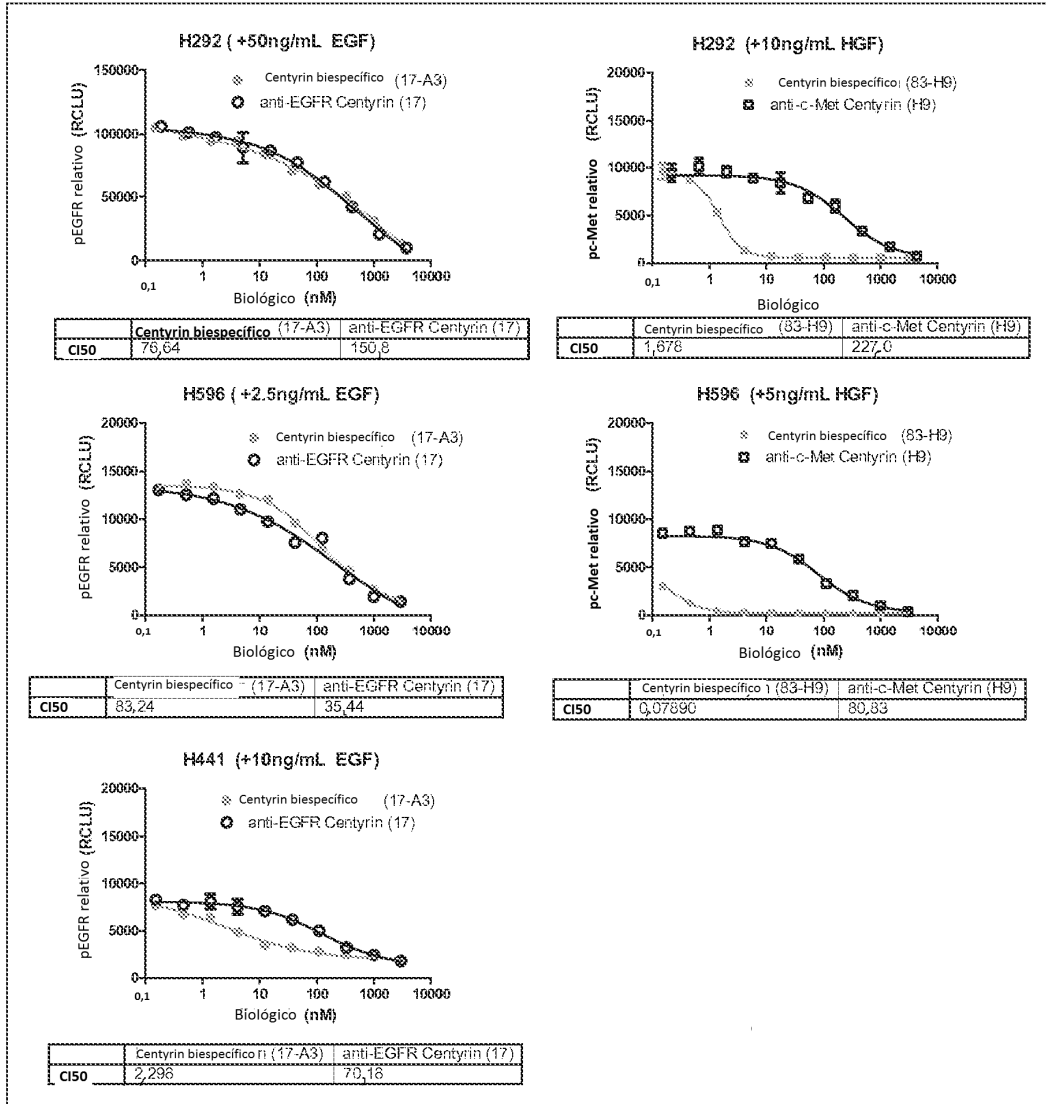


Figura 6.

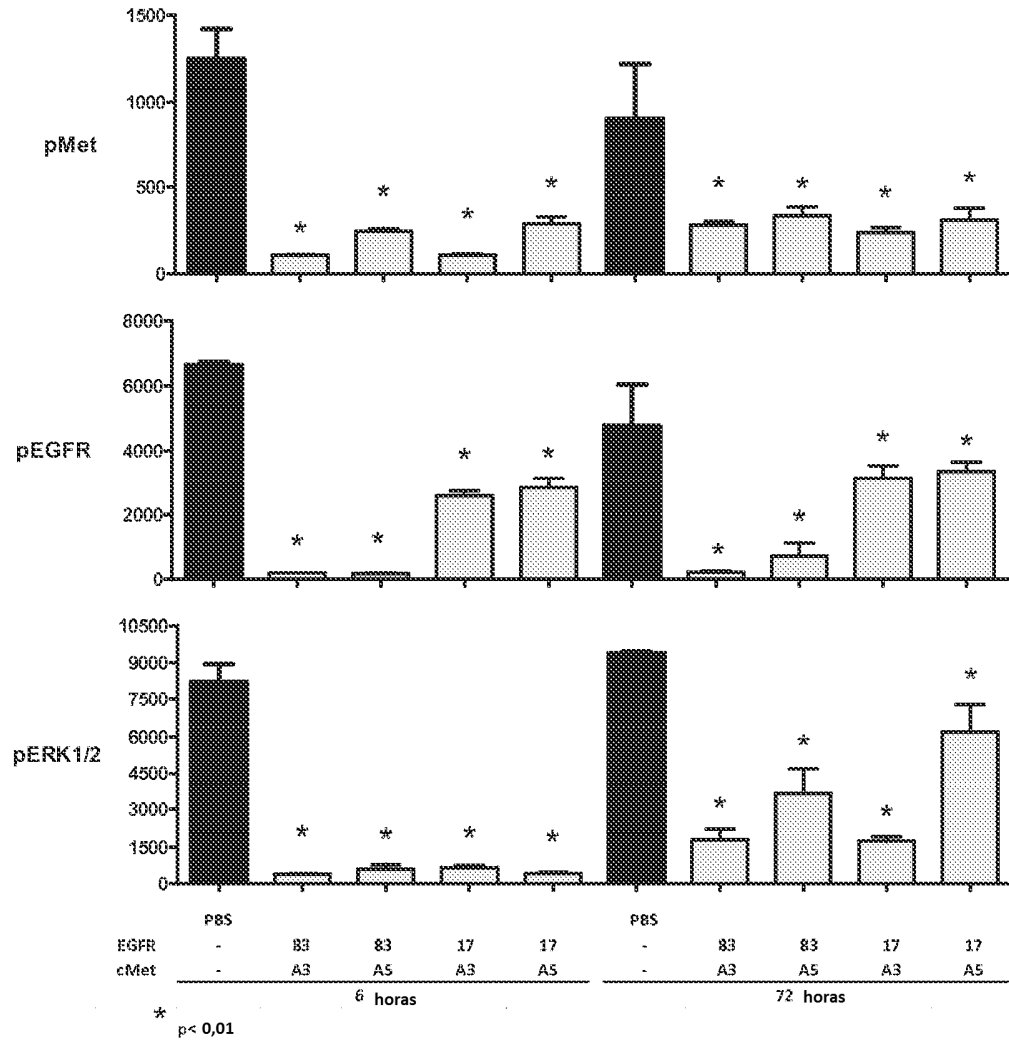


Figura 7.

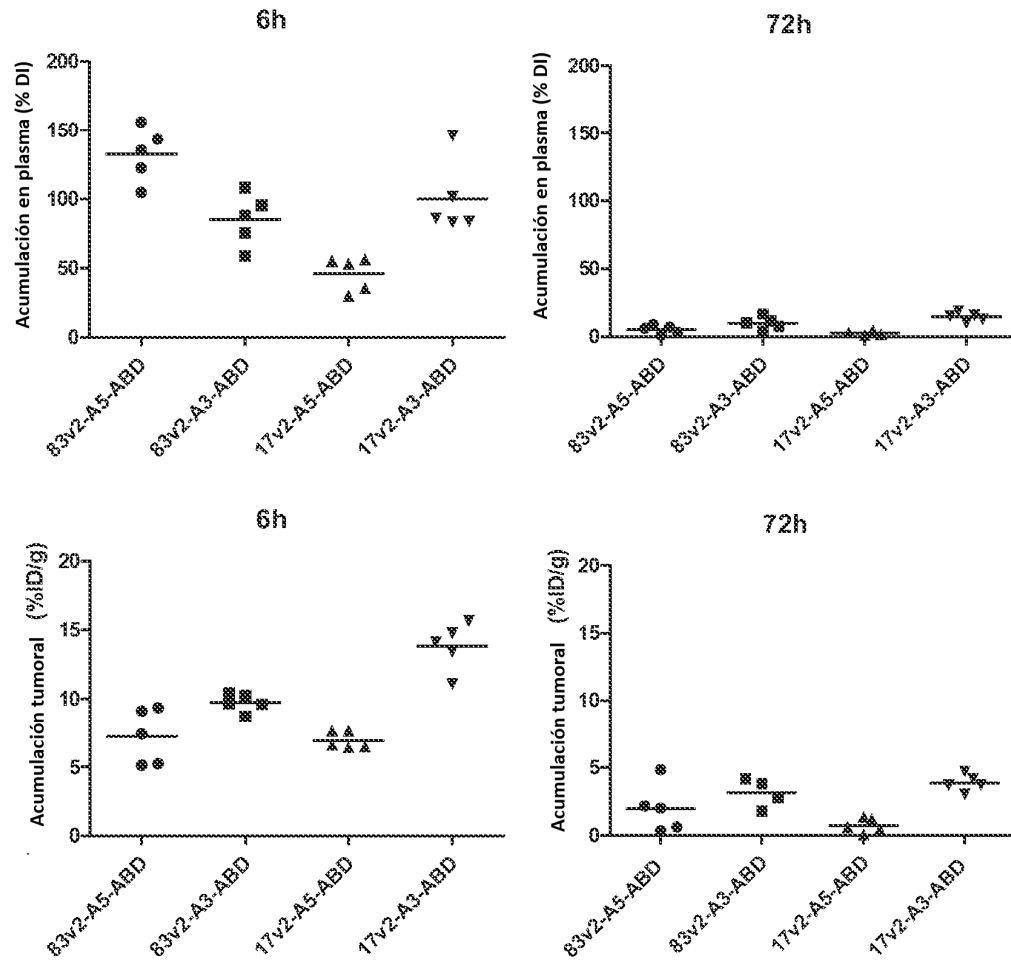


Figura 8.

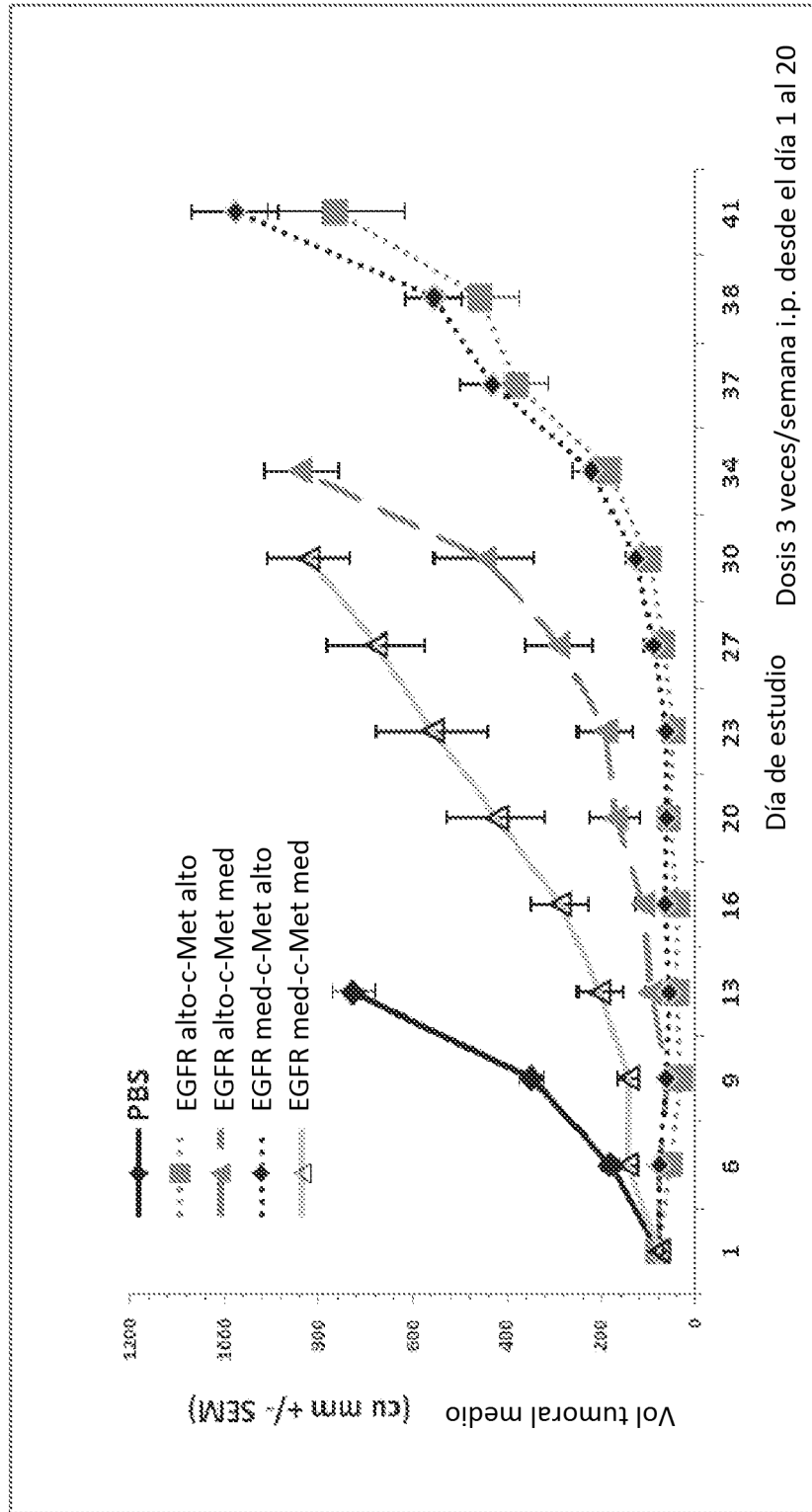


Figura 9.

