



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104394879 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201380022281. 4

(22) 申请日 2013. 03. 27

(30) 优先权数据

61/616, 073 2012. 03. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/002550 2013. 03. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/147509 KO 2013. 10. 03

(71) 申请人 株式会社绿十字

地址 韩国京畿道

申请人 财团法人牧岩生命工学研究所

(72) 发明人 金世镐 洪广元 张基奂 金敏洙

李美祯 元钟和 许旻奎 曹炫寿

俞知镐

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 38/16(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

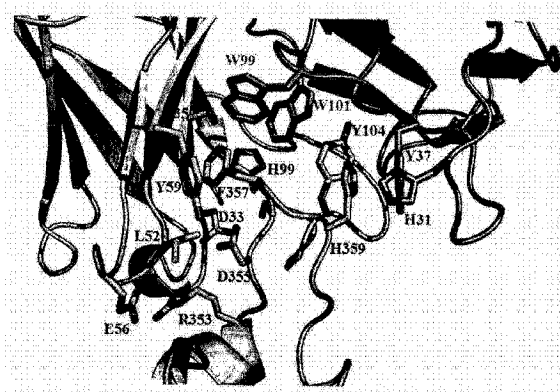
权利要求书2页 说明书16页
序列表6页 附图7页

(54) 发明名称

表皮生长因子受体表面抗原的表位及其用途

(57) 摘要

本发明涉及表皮生长因子受体 (EGFR) 的表位及其用途。本发明提供的表位是高度保守的, 并且位于与结合表皮生长因子 (EGF) 紧密相关的结构域中。因此, 包含所述表位的疫苗组合物或包含所述表位之抗体的组合物可有效地阻断由 EGF 与 EGFR 结合所引起的信号转导, 并因此可以高度有价值地用于治疗多种疾病例如癌症。与本发明的表位结合的抗体可有效地抑制多种 EGFR 配体与 EGFR 的结合, 所述 EGFR 配体例如不仅包括 EGF, 还包括 TGF- α 、AR、BTC、EPR 和 HB-EGF, 并因此不仅可用于治疗通过与 EGF 结合引起的 EGFR 活化导致的多种疾病, 还可用于治疗通过与其他 EGFR 配体结合引起的 EGFR 活化导致的多种疾病。



1. 表皮生长因子受体 (EGFR) 的表位, 其具有氨基酸序列 RGDSFTH (SEQ ID NO :2)。
2. 根据权利要求 1 所述的表位, 其具有氨基酸序列 RGDSFTHTP (SEQ ID NO :3)。
3. 复合物, 其中权利要求 1 或 2 所述的表位与载体结合。
4. 根据权利要求 3 所述的复合物, 其中所述载体是选自以下的至少一种: 肽、血清白蛋白、免疫球蛋白、血蓝蛋白和多糖。
5. 多核苷酸, 其编码权利要求 1 或 2 所述的表位。
6. 重组载体, 其包含权利要求 5 所述的多核苷酸。
7. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其包含诱导所述表位在微生物细胞或病毒表面上表达的启动子或编码信号蛋白的核苷酸序列。
8. 重组微生物或病毒, 其被权利要求 6 或 7 所述的重组载体转化。
9. 根据权利要求 8 所述的重组微生物或病毒, 其选自重组大肠杆菌、重组酵母和重组噬菌体。
10. 制备具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的表位的方法, 其包括培养权利要求 6 至 9 中任一项所述的重组载体、重组微生物或病毒。
11. 用于治疗癌症的疫苗组合物, 其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的表位、包含所述表位的复合物或编码所述表位的多核苷酸。
12. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物, 其还包含在注射进身体后提高抗体形成的可药用佐剂。
13. 根据权利要求 12 所述的疫苗组合物, 其中所述佐剂是选自以下的至少一种: 铝盐 ($Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$)、角鲨烯、山梨聚糖、聚山梨酯 80、CpG、脂质体、胆固醇、MPL (单磷酸脂质 A) 和 GLA (吡喃葡萄糖基脂质 A)。
14. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物, 其中所述多核苷酸包含于可药用载体中。
15. 根据权利要求 14 所述的疫苗组合物, 其中所述可药用载体是病毒或非病毒载体。
16. 产生与具有 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :3 之氨基酸序列的表位特异性结合的抗体或其片段的方法, 所述方法使用具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的表位; 包含所述表位的复合物; 或编码所述表位的多核苷酸。
17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
18. 根据权利要求 16 所述的方法, 其包括以下步骤:
向动物施用具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的表位; 包含所述表位的复合物; 或编码所述表位的多核苷酸; 以及
从所述动物中筛选与具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的表位特异性结合的抗体。
19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其还包括进行人源化或去免疫化的步骤。
20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述人源化包括将由动物产生之抗体的 CDR 序列移植到人抗体框架区 (FR) 中。
21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其还包括进行替换、插入或缺失至少一个氨基酸以

提高亲和力或降低免疫原性的步骤。

22. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述动物是转基因动物,其能够产生具有与人抗体之氨基酸序列相同的氨基酸序列的抗体。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述转基因动物是转基因小鼠。

24. 根据权利要求 16 所述的方法,其采用展示技术。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述展示技术是选自以下的至少一种:噬菌体展示、细菌展示和核糖体展示。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的方法,其中所述展示采用设计成包含来自人之抗体的序列的文库。

27. 根据权利要求 24 至 26 中任一项所述的方法,其包括:

通过使用具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的表位或包含所述表位的复合物来筛选与具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的表位特异性结合的抗体。

28. 用于诊断癌症的组合物,其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的表位、包含所述表位的复合物或编码所述表位的多核苷酸。

29. 用于诊断癌症的试剂盒,其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的表位、包含所述表位的复合物或编码所述表位的多核苷酸。

表皮生长因子受体表面抗原的表位及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及表皮生长因子受体（下文中称为“EGFR”）上的表位及其用途。根据本发明一个示例性实施方案提供的表位是高度保守的，并且位于与结合表皮生长因子（下文中称为“EGF”）紧密相关的结构域中。因此，包含所述表位的疫苗组合物、针对所述表位的抗体或者包含所述抗体的组合物可有效阻断由 EGFR 与 EGF 结合所引起的信号转导，并因此在治疗多种疾病例如癌症中可以是高度有价值的并且可用于治疗这些疾病。此外，与所述表位结合的抗体可有效抑制多种 EGFR 配体与 EGFR 的结合，所述 EGFR 配体例如不仅包括 EGF，还包括转化生长因子- α (TGF- α)、双调蛋白 (AR)、 β 动物纤维素 (betacellulin, BTC)、表皮调节素 (epiregulin, EPR) 和肝素结合的 EGF 样生长因子 (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)，因此可用于治疗由 EGFR 活化引起的多种疾病。

[0002] 此外，本发明涉及产生所述表位的特异性抗体的方法。

背景技术

[0003] 治疗癌症的免疫治疗方法具有这样的优点，即，与手术、放疗或化疗相比，提高了对患者中的目标疾病的特异性，从而增强了抗癌效果并降低了副作用。肿瘤特异性单克隆抗体已经用作治疗剂，其通过靶向根据多种类型的癌特异性过表达的某些蛋白质来获得抗癌效果，在肿瘤治疗过程中是非常有用的。

[0004] 表皮生长因子受体 (EGFR) 是分子量为 170kDa 的 I 型膜蛋白，并已知在多种类型的肿瘤中过表达。对 EGFR 的研究已经持续了很长一段时间，并且当前已经成功进行了细胞结构域 (Garrett TP 等, Cell, 2002, 110 :763-773) 和细胞内激酶结构域 (Stamos J 等, J. Biol. Chem., 2002, 277 :46265-46272) 的晶体学 (crystallographic) 研究。这些研究显示了受体及其配体行为的重要信息。EGFR 是细胞表面相关分子，其通过在此结合 EGF 配体和转化生长因子- α (TGF- α) 来被活化。与配体结合后，受体二聚化以使细胞内的酪氨酸激酶结构域磷酸化。结果，后续的信号级联反应被激活从而诱导正常细胞的生长和增殖以及肿瘤细胞的生长。特别地，因为肿瘤细胞的功能主要依赖于 EGFR，所以所述受体由于抑制 EGFR 调控功能的可能性程度而被视为治疗的常用靶。

[0005] 例如在某些类型的癌症中观察到 EGFR 的过表达，例如肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、脑癌、膀胱癌、头颈癌、卵巢癌和前列腺癌。当使用针对 EGFR 的抗体抑制 EGFR 与 EGF 的结合时，癌细胞的生长可以受到抑制从而治疗癌症，这已经通过使用针对 EGFR 的单克隆抗体在实验上证明。

[0006] 同时，虽然已经进行了尝试来阐述 EGFR 结合 EGF 的各个结构域的位置 (S. Yokoyama 等, Cell, 2002, 110 :775-787)，但是必须进一步研究，在使用这样的 EGFR 结构域作为表位的情况下，抗体是否抑制由 EGF 引起的 EGFR 信号转导通路的激活。

[0007] 近年来，在临床领域用于治疗转移性结直肠癌的西妥昔单抗 (Cetuximab) (C225 抗体, 产品名: Erbitux; ImClone, US) 是通过使小鼠抗体的可变区与人抗体 IgG1 恒定区结合而得到的嵌合抗体（具有约 30% 的小鼠氨基酸序列），并因此在体外抑制由 EGF 引起的

肿瘤细胞生长以及 EGFR 磷酸化,并且在裸鼠中抑制人肿瘤形成。此外,发现所述抗体与某些化疗药剂对根除异种移植小鼠模型中的人肿瘤有协同作用。然而,西妥昔单抗存在这样的问题,即,其在患者(约 10%)中导致免疫应答,并且仅能用作与化疗药剂的联合治疗,因为其在用于独立治疗时不具有令人满意的治疗效果。

[0008] 帕木单抗 (panitumumab) (产品名:Vectibix;Amgen Inc.US) 是另一种用于治疗性转移结直肠癌的抗体,其是体外抑制由 EGF 引起的肿瘤细胞生长和 EGFR 磷酸化并且抑制裸鼠中人肿瘤之形成的完全人抗体。此外,发现所述抗体与某些化疗药剂对根除异种移植小鼠模型中的人肿瘤有协同作用。帕木单抗与西妥昔单抗不同在于其是完全人抗体,具有 10 倍于西妥昔单抗的抗原结合能力,降低了如西妥昔单抗作为 IgG2 型抗体诱导免疫应答的概率,并且由于 IgG2 的限制而仅表现出对由 EGFR 与 EGF 结合引起的信号转导的抑制效果,尽管增强了结合能力以降低副作用和提高效力。因此,据报道,帕木单抗具有与西妥昔单抗相似的总体临床效果,因为其没有相关领域已知的西妥昔单抗的信号转导抑制效果与抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC, Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity) 活性之中的 ADCC 活性。

[0009] 此外,由 Merck Serono 和 Takeda Pharmaceuticals 联合开发的马妥珠单抗 (matuzumab, mAb425) 迄今为止在独立治疗中不具有令人满意的疗效。

[0010] 总之,所有常规的靶向 EGFR 的抗体治疗剂都未被准许作为处方用于治疗 K-ras 突变体结直肠癌。2009 年报道的数据证实,其中两个抗体显示出治疗效果的患者的百分比总计约 21%,并且所述抗体在其余 79% 的患者中未示出治疗效果。抗体未示出治疗效果的患者组的 43% (即,约患者总数的约 30%) 具有 K-ras 突变体,将该组归为 K-ras 突变体结直肠癌。常规的抗体治疗剂西妥昔单抗和帕尼单抗仅在约 1.5% 的 K-ras 突变体中示出治疗效果。

[0011] 因此,对具有能够通过更有效地抑制 EGFR 与 EGF 结合来克服常规 EGFR 抗体之间题和限制的区别和优越性的新抗 EGFR 抗体的需求正在持续增加。

发明内容

[0012] 因此,本发明的一个目的是提供氨基酸序列 RGDSFTH (SEQ ID NO:2),或包含该序列的 EGFR 上的表位,以及特别是具有氨基酸序列 RGDSFTHTP (SEQ ID NO:3) 的表位。

[0013] 本发明的另一个目的是提供产生所述表位、包含所述表位的用于一种或更多种癌症疫苗之组合物的方法、使用所述表位产生具有与所述表位特异性结合之能力的抗体的方法,以及包含通过该方法产生之抗体的用于预防和 / 或治疗癌症的组合物或治疗剂。

[0014] 本发明的另一个目的是提供所述表位或编码所述表位的多核苷酸序列,以及用于诊断癌症的包含所述多核苷酸序列的组合物和试剂盒。

附图说明

[0015] 图 1 是以 3D 方式示出 EGFR 与 GC1118 抗体之结合特征的图。

[0016] 图 2 是以 3D 方式示出 EGFR 与 EGF 之结合特征的图。

[0017] 图 3 是以 3D 方式示出当 GC1118 抗体与 EGFR 重叠时,GC1118 抗体与和 EGF 结合的 EGFR 的结合特征的图。

[0018] 图 4 是以 3D 方式示出 EGFR 与西妥昔单抗和马妥珠单抗的结合特征的图。

[0019] 图 5 是示出合成 EGFR 变体基因之流程以及转化酵母细胞之流程的图。

[0020] 图 6 是示出通过由 DNA 碱基序列确定的氨基酸序列来鉴定各个 EGFR 突变体被正确合成的图。

[0021] 图 7 是示出各个 EGFR 变体的表达比率的图

[0022] 图 8 是示出抗体针对各个 EGFR 突变体的结合能力的图 : (A) GC1118, 以及 (B) 西妥昔单抗 (对照)。

[0023] 图 9 是示出 EGFR 配体与 GC1118 的竞争结合能力的图 : (A) GC1118, 以及 (B) 西妥昔单抗 (对照)。

[0024] 图 10 是示出 GC1118 对诱导细胞增殖的抑制活性的图。

具体实施方式

[0025] 下文将详细描述本发明。

[0026] 本发明人已经发现, 在 EGFR 的氨基酸序列中, 氨基酸序列 RGDSFTH (SEQ ID NO : 2) 或包括该序列的氨基酸序列, 特别是由 RGDSFTHTP (SEQ ID NO : 3) 所示的氨基酸序列, 主要作用于与 EGF 结合, 并且发现具有该氨基酸序列作为表位的抗体非常有效地抑制 EGFR 与 EGF 的结合, 并因此在通过阻断结合导致的信号转导来治疗癌症中示出优异的效果。因此, 本发明基于这些事实得以完成。

[0027] SEQ ID NO : 2 所示的氨基酸序列 RGDSFTH 与 SEQ ID NO : 1 所示的 EGFR 胞外结构域之氨基酸序列的第 353 位氨基酸残基至第 359 位氨基酸残基相对应, 并且 SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列 RGDSFTHTP 与 SEQ ID NO : 1 所示的 EGFR 胞外结构域的第 353 位氨基酸残基至第 361 位氨基酸残基相对应。

[0028] 本发明提供的氨基酸序列中存在的氨基酸残基由相关领域已知的三字母缩写或一字母缩写来表示。此外, 在本发明中, 术语“xA”是指 SEQ ID NO : 1 所示的 EGFR 序列的第 A 位氨基酸 x, 术语“xAz”意指用 z 替换第 A 位氨基酸 x。例如, 术语“R353”是指 SEQ ID NO : 1 所示的氨基酸序列的第 353 位氨基酸残基是精氨酸 (Arg), 术语“R353G”是指 SEQ ID NO : 1 所示的氨基酸序列的第 353 位氨基酸残基精氨酸 (Arg) 被甘氨酸 (Gly) 替换。

[0029] 具有 SEQ ID NO : 2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO : 2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列的表位可与载体组合使用, 以维持其本身的 3D 结构或提供用作组合物例如癌症疫苗的效力。根据本发明一个示例性实施方案的载体是生物相容的, 并且本文可使用所有类型的载体, 只要其能达到期望的效果即可。在这种情况下, 所述载体可选自肽、血清白蛋白、免疫球蛋白、血蓝蛋白和多糖, 但本发明不限于此。

[0030] 可使用具有 SEQ ID NO : 2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO : 2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO : 3 所示的氨基酸序列的表位本身, 或作为与载体组合的复合物使用。在这种情况下, 所述表位或所述复合物可用于癌症疫苗组合物。本文中, 所述疫苗组合物还可包含可药用佐剂或赋形剂。可使用任何类型的佐剂, 只要其在注射进身体后可发挥增强抗体形成的作用从而实现本发明的目的即可。特别地, 所述佐剂可为选自铝盐 ($\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 AlPO_4)、角鲨烯、山梨聚糖、聚山梨酯 80、CpG、脂质体、单磷酸脂质 A (MPL) 以及吡喃葡萄糖基脂质 A (GLA) 中的至少一种, 但是本发明不限于此。

[0031] 本发明提供的编码具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位的多核苷酸可以基因癌症疫苗本身的形式使用。在这种情况下,所述多核苷酸本身可在没有使用递送系统的情况下使用,或者可容纳在病毒或非病毒递送系统中递送进身体。可使用任意类型的病毒或非病毒递送系统,只要它们在本领域中已知为常规可用的即可。特别地,所述病毒递送系统优选包括腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒等,并且本文可使用的非病毒载体包括选自以下的至少一种:阳离子聚合物、非离子聚合物、脂质体、脂质、磷脂、亲水性聚合物、疏水性聚合物及其复合物,但本发明不限于此。

[0032] 本发明提供了包含编码具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或者 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位之多核苷酸的重组载体;包含所述重组载体的宿主细胞;以及使用根据本发明的重组载体或宿主细胞制备具有 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 之氨基酸序列的表位的方法。

[0033] 在本发明中,术语“重组载体”是指能够在合适的宿主细胞中表达靶蛋白的表达载体,即,包含有效连接的必要调控元件以表达插入基因的基因构建体。在本发明中,术语“有效连接的”意指编码目的蛋白质的核酸序列与核酸表达控制序列功能性地连接,从而执行一般功能。与重组载体的有效连接可使用本领域公知的基因重组技术进行,并且可通过使用本领域公知的酶来容易地进行位点特异性 DNA 切割和连接。

[0034] 除了表达控制元件例如启动子、起始密码子、终止密码子、多腺苷酸化信号和增强子外,适用于本发明的表达载体还可包含用于靶向膜或分泌的信号序列。起始密码子和终止密码子一般被视为编码免疫原性靶蛋白的核苷酸序列的一部分,因此当基因构建体施用到个体中并且以框内插入了编码序列时,在个体中应当是基本发挥功能的。常见的启动子可为组成型的或诱导型的。可使用存在于原核细胞中的 Lac 启动子、Tac 启动子、T3 启动子和 T7 启动子,但不限于此。可使用 β -肌动蛋白启动子与来源于人血红蛋白、人肌肉肌酸和人金属硫蛋白的启动子,以及来源于存在于真核细胞中的猿猴病毒 40(simian virus 40, SV40)、小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)(例如,来自 HIV 的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)启动子)、莫洛尼病毒(Moloney virus)、巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒(Epstein bar virus, EBV)以及劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV),但不限于此。

[0035] 所述表达载体可包括选择标记用于选择包含所述载体的宿主细胞。所述选择标记用于选择被所述载体转化了的细胞。本文中,标记赋予的可选择表型(例如药物耐受、营养缺陷型、对细胞毒性试剂的耐受或表面蛋白质的表达)可用作选择标记。因为只有表达选择标记的细胞在经选择试剂处理的环境中存活,所以可选择经转化的细胞。此外,当所述载体是可复制的表达载体时,所述载体可包含复制起点,即复制自其起始的特定核酸序列。各种类型的载体例如质粒、病毒和黏粒可用作重组表达载体。可使用任何类型的重组载体,没有特定的限制,只要他们可在各种宿主细胞例如原核细胞和真核细胞中发挥表达目的基因的功能并产生目的蛋白质即可。但是,可优选包含具有强活性的启动子并且可大量产生具有与野生型相似形状的异源蛋白同时保持强表达强度的载体用作重组载体。

[0036] 特别地,可采用表达宿主/载体的各种组合以表达根据本发明一个示例性实施

方案的表位,所述表位具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。适于真核宿主的表达载体可包含表达调控序列,包括但不限于来源于 SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、腺相关病毒、巨细胞病毒、慢病毒和逆转录病毒的表达调控序列。可用于细菌宿主的表达载体包括得自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的细菌质粒,例如 pET、pRSET、pBluescript、pGEX2T、pUC 载体、col E1、pCR1、pBR322、pMB9 及其衍生物;具有广宿主范围的质粒,例如 RP4、噬菌体 DNA——包括多种 λ 噬菌体衍生物,例如 λ gt10、 λ gt11 和 NM989;以及另一些 DNA 噬菌体,例如 M13 和丝状单链 DNA 噬菌体。可用的昆虫细胞的载体是 pVL941。

[0037] 将所述重组载体引入宿主细胞中以形成转化体。合适的宿主细胞可包括原核生物,例如大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、链霉菌属 (*Streptomyces* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 或葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.);真菌,例如曲霉属 (*Aspergillus* sp.);酵母细胞,例如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces* sp.) 和粗脉胞菌 (*Neurospora crassa*);以及其他低等真核生物和高等真核细胞例如昆虫细胞。此外,所述宿主细胞可优选但不限于来源于植物和哺乳动物,例如猴肾细胞 7 (COS7:monkey kidney cell)、NS0 细胞、SP2/0、中国仓鼠卵巢 (CHO:Chinese hamster ovary) 细胞、W138、幼仓鼠肾 (BHK:baby hamster kidney) 细胞、MDCK、骨髓瘤细胞系、HuT 78 细胞和 HEK293 细胞。CHO 细胞是特别优选的。

[0038] 在本发明中,术语“转化”至宿主细胞中,涵盖任何将核酸序列引入生物体、细胞、组织或器官的方法,并且如本领域已知,可以使用适于所述宿主细胞的标准技术来进行。这样的方法包括但不限于例如电穿孔、原生质体融合、磷酸钙 (CaPO_4) 沉淀、氯化钙 (CaCl_2) 沉淀、使用碳化硅纤维搅拌 (교반)、农杆菌介导的转化、PEG 法、硫酸葡聚糖法、脂质体 (리포솜타민) 法以及干燥/抑制介导的转化。通过在营养培养基中培养表达重组载体的转化体,根据本发明一个示例性实施方案的具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的表位得以大规模产生。可根据宿主细胞来选择合适的培养基和培养条件。可适当调节例如温度、培养基 pH 以及培养时间等条件以使得细胞能充分生长,并且使得能够大量产生蛋白质。如上文所述,可从培养基或细胞裂解物中以重组方式回收具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的表位,并且可使用常规生化分离技术来进行分离和纯化 (Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deuschel, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, 卷 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990))。可用于本文的生化分离技术可包括但不限于:电泳、离心、凝胶过滤、沉淀、透析、色谱 (离子交换色谱、亲和色谱法、免疫吸附色谱或尺寸排阻色谱)、等电点聚焦,及这些方法的多种改变和组合。

[0039] 本发明提供了在微生物或病毒表面上表达具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列的表位的方法。在该方法中,重组载体的特征在于,其包含编码诱导型启动子或信号蛋白的序列,并

且可使用包含所述重组载体的多种微生物或病毒。特别合适的微生物或病毒包括但不限于重组大肠杆菌、重组酵母和重组噬菌体。可使用本领域公知的展示技术在微生物或病毒表面上表达具有 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :3 所示之氨基酸序列的表位。特别地,本文可使用以下方法,但不限于此:使编码具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位之多核苷酸序列与编码启动子或信号蛋白质的序列结合以诱导所述表位在微生物或病毒细胞表面上表达的方法,或者缺失编码本来在微生物或病毒细胞表面上表达之蛋白质的基因的一部分并将编码具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位之多核苷酸序列插入部分缺失的基因中的方法。可对在微生物或病毒表面上表达的具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位本身进行分离和纯化,并且所述表位可用于根据本发明的一个示例性实施方案的特定用途的目的,并且当所述表位在微生物或病毒表面上表达时,可用于筛选与具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位特异性结合的抗体,以得到所述抗体。

[0040] 此外,本发明提供了具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位,与具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位特异性结合的抗体,使用包含所述表位或编码所述表位之多核苷酸的复合物,或者产生此种抗体之片段的方法。这样的抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体,并且只要所述抗体的片段保留了与具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位结合的性质,则所述片段落在本发明的范围内。特别地,根据本发明一个示例性实施方案的抗体或其片段包括但不限于:单链抗体、双链抗体 (디아바디)、三链抗体 (트리아바디)、四链抗体 (테트라바디)、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fd、scFv、结构域抗体、双特异性抗体、微抗体 (미니바디)、scAb、IgD 抗体、IgE 抗体、IgM 抗体、IgG1 抗体、IgG2 抗体、IgG3 抗体、IgG4 抗体、抗体的恒定区衍生物以及基于蛋白质支架的合成抗体,只要其具有与具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位的结合活性即可。此外,在其可变区具有突变的抗体也涵盖在本发明的范围内,只要它们保留了根据本发明一个示例性实施方案的性质。例如,所述突变可包括可变区中氨基酸的保守替换。所述保守替换是指用具有相似性质的另一个氨基酸残基对原氨基酸序列进行的替换。例如,赖氨酸残基、精氨酸残基和组氨酸残基在具有碱性侧链方面是相似的。此外,天冬氨酸残基和谷氨酸残基在具有酸性侧链方面是相似的。此外,甘氨酸残基、天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基和色氨酸残基在具有不带电的极性侧链方面是相似的,并且丙氨酸残基、缬氨酸残基、亮氨酸残基、苏氨酸残基、异亮氨酸残基、脯氨酸残基、苯丙氨酸残基和甲硫氨酸残基在具有非极性侧链方面是相似的。此外,酪氨酸残基、苯丙氨酸残基、色氨酸残基和组氨酸残基在具有芳族侧链方面是相似的。因此,对本领域技术人员显而易见的是,在具有上述相似性

质的氨基酸组中的氨基酸替换不会引起性质的任何变化。因此,产生在其可变区中具有由保守替换导致的突变之抗体的方法落在本发明的范围内,只要具有突变的抗体保留了原抗体的性质。

[0041] 可通过使用本发明所属领域公知的方法来得到与根据本发明的具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位结合的抗体。特别地,所述抗体可通过以下方法来制备:用具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位、包含所述表位的复合物或者编码所述表位的多核苷酸接种动物,从所接种的动物产生并筛选与具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位特异性结合的抗体。

[0042] 在这种情况下,所述动物优选是经转化的动物以生产具有与来自人的序列相同序列的抗体,特别是经转化的大鼠。本文中,可使用根据美国专利 No. 5, 569, 825、5, 633, 425 和 7, 501, 552 中公开的方法转化的大鼠来制备具有降低的免疫原性的完全人抗体。在所述动物未被转化以允许产生具有与来自人的序列相同之序列的抗体的情况下,如美国专利 No. 5, 225, 539、5, 859, 205、6, 632, 927、5, 693, 762、6, 054, 297 和 6, 407, 213 以及 WO 1998/52976 中所公开的方法中所述,可对从所述动物得到的抗体进一步地进行人源化(humanization)或去免疫化(deimmunization)步骤,以使所述抗体变得适于在身体中的治疗用途。具体地,所述人源化或去免疫化步骤可包括:CDR 移植(grafting)步骤,将由所述动物产生的抗体 CDR 序列移植到人抗体的框架区(FR);以及 CDR 步移步骤,替换、插入或缺失至少一个氨基酸序列以进一步增强亲和力(affinity)或降低免疫原性(immunogenicity)。

[0043] 当使用全长 EGFR 而不是具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位、包含所述表位的复合物或者编码所述表位的多核苷酸作为免疫原时,还可使用这样的筛选抗体的方法,其包括初次筛选具有 EGFR 结合能力的抗体,以及在经初次筛选的抗体中筛选特异性识别具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位的抗体。在这种情况下,本文中还可使用这样的筛选抗体的方法,其包括在具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位的重要结合位点引起突变,以及在经初次筛选为与 EGFR 结合的抗体中筛选由于具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位的重要结合位点之突变导致的与 EGFR 的结合能力缺失或降低的抗体。

[0044] 此外,可使用本发明所属领域公知的展示技术来产生并筛选与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :3 所示之表位结合的人抗体。所述展示技术优选为选自以下的至少一种:噬菌体展示技术、酵母菌展示技术、细菌展示技术和核糖体展示技术,但本发明不限于此。文库的制备和展示可如美国专利 No. 5, 733, 743、7063943、6172197、6, 348, 315 和 6, 589, 741 中所公开的来容易地进行。特别地,用于展示的文库优选设计成具有来自人之抗体的序列。具体地,所述方法的特征在于其包括使用具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位或者包含所述表位

的复合物来筛选仅与具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位特异性结合的抗体。

[0045] 最后,本发明提供了具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列、包含 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的氨基酸序列或 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列的表位、包含所述表位的复合物或者用于包含编码所述表位的多核苷酸之癌症疫苗的组合物。

[0046] 本发明将通过以下的示例性实施方案来更详细的阐述。然而,应理解,详细描述和具体实施例虽然表示本发明一些优选实施方案,但仅以举例说明的方式给出,因为对本领域技术人员来说,本发明范围内的多种改变和修改都将从该详细描述中变得显而易见。

[0047] 实施例 1 :GC1118 的 Fab 与 EGFR 至结合结构的鉴定

[0048] 为了鉴定由本发明一组研究人员研发的 GC1118 的抗原结合片段 (Fab) (参见 KR 10-2011-0034914A) 与 EGFR 的结合结构,使用 BL26B2 光束 (Spring-8 Institution, 日本) 得到 EGFR/GC1118Fab 复合物晶体结构的 X-射线衍射数据,并使用 HKL2000 软件 (HKL Research Inc., 美国) 进行指数化和刻度化,然后使用分子置换 (MR) 法得到 EGFR/GC1118 复合物的早期电子密度图。为了使用 MR 法,需要具有与 EGFR/靶抗体复合物的结构相似之结构的蛋白质的 3D 结构方面的数据。在这种情况下,使用 EGFR/西妥昔单抗复合物 (PDB ID :1YY9) 的结构作为 EGFR/GC1118 复合物的结构。使用 Molrep 程序 (<http://www.ysbl.york.ac.uk/~alexei/molrep.html>) 得到 EGFR/GC1118 复合物的早期阶段信息,并基于在早期阶段获得的信息使用 Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit, <http://www.biop.ox.ac.uk/coot/>) 来进行模型建立任务。然后,使用 Refmac5 (<http://www.ccp4.ac.uk/html/refmac5.html>) 软件以及 PHENIX (Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography :<http://www.phenix-online.org/>) 软件来完成细化 (refinement) 任务。

[0049] 因此,可发现,GC1118 的 EGFR 上的表位位于 EGFR 的第三结构域中,并且特别地,所述表位是所述第三结构域的短环区,其由跨越氨基酸序列的第 353 位氨基酸残基至第 361 位氨基酸残基的 9 个氨基酸残基组成 (参见 SEQ ID NO :1 和图 1)。该环区向外突出,并且被抗体的 CDR 包围。特别地,在 GC1118 与 EGFR 的结合中发挥重要作用的氨基酸残基是 EGFR 的 F357 和 H359。这两个氨基酸残基被 GC1118 抗体 CDR 区的氨基酸残基包围,并且功能是与 CDR 区的氨基酸残基形成疏水键和氢键,以稳固地维持 EGFR 和 GC1118 之间的结合。此外,R353 还有助于经与 GC1118 抗体重链之可变区 (VH) 的离子键来与抗体结合 (参见图 1)。

[0050] 同时,EGF 结合的区域位于 EGFR 的第一结构域和第三结构域之间。在这种情况下,EGF 首先与 EGFR 第一结构域结合 (参见图 2) 从而引起所述 EGFR 结构域的结构变化,然后与第三结构域结合 (参见图 3)。在这种情况下,参与结合 EGF 的重要的 EGFR 氨基酸残基是第三结构域的 D355 (Ferguson 等, Molecular Cell, 2003, 11 :507-517)。此处,所述存在于包含 R353、F357 和 H359 的环中的氨基酸残基作为 GC1118 的表位。换言之,因为 EGFR 上与 GC1118 结合的表位存在于与 EGF 结合的区域相同的区域中,所以与 GC1118 的表位结合的抗体可直接抑制 EGF 与 EGFR 的第三结构域结合。通过对比结合了 EGF 的 EGFR 的结构进一步证实了这一点。因此,当通过结合 EGF 活化的 EGFR 的结构与通过结合 GC1118 活化的 EGFR 结构重叠时,可见到 GC1118 与 EGF 彼此重叠的 VH 区 (参见图 3)。

[0051] 与当前使用的西妥昔单抗与 EGFR 结合进行对比,西妥昔单抗具有位于 EGFR 第三结构域的表位,但是西妥昔单抗的结合位点广泛地分布于第三结构域的表面上。因此,这些表位中的一些对 EGF 的结合具有间接影响(参见图 4A)。马妥珠单抗是另一种也具有位于 EGFR 第三结构域之表位的抗体,但是马妥珠单抗的表位位于与根据本发明的一个示例性实施方案的表位不同的位置,并且位于与 EGF 结合的区域不同的区域,所以马妥珠单抗的表位不能直接阻碍 EGF 的结合(参见图 4B)。

[0052] 实施例 2:使用酵母细胞表面表达法验证 GC1118 的 EGFR 上的表位

[0053] 为了验证通过结构模型发现的针对 GC1118 的 EGFR 表位(R353、F357 和 H359 氨基酸残基),用没有结合反应性的甘氨酸替换相应的氨基酸残基以产生变体,接着在酵母细胞的表面上进行表达。然后,使用流式细胞术(BD FACSCalibur™,美国)确认 GC1118 与 EGFR 变体的结合,其中表位在酵母细胞表面上表达。结果,在所有 EGFR 变体中证实了与 GC1118 的结合亲和力降低。

[0054] 2.1EGFR 变体的构建

[0055] 通过使用重叠 PCR 法以甘氨酸替换 EGFR 氨基酸序列(参见 SEQ ID NO:1)的 R353、F357 和 H359 中的一个或多个来构建 EGFR 变体,在所述重叠 PCR 法中使用编码人 EGFR 胞外结构域的基因序列作为模板。结果列于下表 1 中。

[0056] 表 1

[0057] 用甘氨酸(Gly)替换的 EGFR 变体

[0058]

EGFR 变体	氨基酸替换	详情		
		位置	替换前	替换后
变体 1	R353G	353	Arg	Gly
变体 2	F357G	357	Phe	Gly
变体 3	H359G	358	His	Gly
变体 4	R353G+F357G	353	Arg	Gly
		357	Phe	Gly
变体 5	F357G+H359G	357	Phe	Gly
		359	His	Gly
变体 6	R353G+H359G	353	Arg	Gly
		359	His	Gly
变体 7	R353G+F357G+H359G	353	Arg	Gly
		357	Phe	Gly
		359	His	Gly

[0059] 2.1.1 用于合成 EGFR 变体的 PCR 反应

[0060] 通过使用包含人 EGFR 基因序列作为模板以及设计成引起 EGFR 基因突变的一组引

物（参见表 2）的 AccuPower™ TLA PCR PreMix (Bioneer, 韩国) 进行 PCR 反应来合成通常包含各 EGFR 突变体的两个基因片段（约 1,150bp 和 720bp）。使这两个合成的基因片段在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 并且使用 Qiagen 试剂盒 (Qiagen 28706, 德国) 纯化各个基因片段的 DNA。然后, 使用这两种经纯化的基因片段组的 DNA 作为一个模板以及具有 SEQ ID NO: 4 至 19 所示之氨基酸序列（参见表 2）的引物来进行重叠 PCR 反应, 从而合成最终 EGFR 变体基因（参见图 5）。使用限制性内切酶 *NheI*/*MluI* (New England BioLabs, 美国) 切割合成的基因。如表 2 所列出的引物名称后的术语“*For*”表示正向引物, 而术语“*Rev*”表示反向引物。

[0061] 表 2

[0062] 构建 EGFR 变体的 PCR 反应中使用的引物

[0063]

引物名称	目标变体	序列	SEQ ID NO
pCTCON-For	对照	5'- CGGCTAGCCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGC - 3'	4
pCTCON-Rev		5'- CGACGCGTTGGACGGGATCTTAGGCC - 3'	5
R353G-For	变体 1	5'- CTGCCGGTGGCATTGCGGTGACTCCTTCA ACA - 3'	6
R353G-Rev		5'- TGTGAAGGAGTCACCGCCAAATGCCACCG GCAG - 3'	7
F357G-For	变体 2	5'- TTTAGGGGTGACTCCGGCACACATACTCC TCCT - 3'	8
F357G-Rev		5'- AGGAGGAGTATGTGTGCCGGAGTCACCCC TAAA - 3'	9
H359G-For	变体 3	5'- GGTGACTCCTTCACAGGCACTCCTCCTCTG GAC - 3'	10
H359G-Rev		5'- GTCCAGAGGAGGAGTGCCTGTGAAGGAGT CACC - 3'	11
R353G,F357 G-For	变体 4	5'- CTGCCGGTGGCATTGCGGTGACTCCGG GACACATACTCCTCCT - 3'	12
R353G,F357 G-Rev		5'- AGGAGGAGTATGTGTCCCGGAGTCACCGC CAAATGCCACCGGCAG - 3'	13

[0064]

F357G,H359 G-For	变体 5 *****	5'- TTTAGGGGTGACTCCGGCACAGGGACTCC TCCTCTGGAC - 3'	14
F357G,H359 G-Rev		5'- GTCCAGAGGAGGAGTCCCTGTGCCGGAGT CACCCCTAAA - 3'	15
R353G,H359 G-For	变体 6	5'- CTGCCGGTGGCATTGCGGTGACTCCTTC ACAGGTACTCCTCCTCTGGAC - 3'	16
R353G,H359 G-Rev		5'- GTCCAGAGGAGGAGTACCTGTGAAGGAGT CACCGCCAAATGCCACCGGCAG - 3'	17
R353G,F357 G,H359G-For	变体 7	5'- CTGCCGGTGGCATTGCGGTGACTCCGG AACAGGTACTCCTCCTCTGGAC - 3'	18
R353G,F357 G,H359G-Rev		5'- GTCCAGAGGAGGAGTACCTGTTCCGGAGT CACCGCCAAATGCCACCGGCAG - 3'	19

[0065] 2. 1. 2EGFR 变体的连接和转化

[0066] 使用限制性内切酶 *Nhe*I/*Mlu*I 切割酵母表面表达载体 pCTCON (Boder, E. T 等, *Nat Biotechnol.* 1997, 15 (6) :553-7), 在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 并使用 Qiagen 试剂盒进行纯化。将实施例 2. 1. 1 中制备的 EGFR 变体 DNA 与 pCTCON 混合, 向其中添加 T4 DNA 连接酶 (New England BioLabs, 美国), 并在 25°C 下反应 2 小时。使用 Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., 美国) 通过电穿孔使所述连接混合物与大肠杆菌 XL1-blue 细胞 (Stratagene, 美国) 转化, 并在总共 2mL 的培养基中孵育一小时。然后, 将经转化的细胞涂布于补充了羧苄青霉素 (Sigma, 美国) 的 LB 琼脂平板上。接着, 所述细胞在 37°C 孵育过夜。

[0067] 2. 1. 3EGFR 变体的碱基测序

[0068] 将实施例 2. 1. 2 中在平板上培养的菌落 (콜로니) 在 2mL 补充了 50 μ g/mL 羧苄青霉素的 LB 培养基中孵育过夜, 然后使用 Qiagen 质粒微型试剂盒 (Qiagen 27106, 德国) 分离重组质粒, 以确定 EGFR 变体的 DNA 碱基序列插入所述质粒中。将用作测序引物的具有 SEQ ID NO:20 至 22 所示之序列的引物用于碱基测序 (参见表 3), 并且由 Genotech Corporation (Daejeon, 韩国) 根据已知的方法进行碱基测序并分析。将人 EGFR 的碱基序列用作对照。在确定 EGFR 变体的 DNA 碱基序列之后, 使用将碱基序列翻译成氨基酸序列的基于网络的程序 (www.expasy.org:DNA 到蛋白质的翻译工具) 将确定的 DNA 碱基序列翻译成氨基酸序列。翻译结果在图 6 中示出。然后, 确认表 1 中列出的所有 EGFR 变体基因正确插入到 pCTCON 载体中。

[0069] 表 3

[0070] 用于测序反应的引物

[0071]

引物的类型	序列	SEQ ID NO
seq-F1	5'-ATGAAGGTTTGTGATTGTCTTGTGG	20
seq-F1	5'- CCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTG	21
seq-F1	5'- CGTCGGCCTGAACATAACATCCTTG	22

[0072] 2.2 分析酵母细胞表面上 EGFR 变体的表达及与抗体结合

[0073] 2.2.1 在酵母细胞表面上表达 EGFR 变体的流程

[0074] 使用来自 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的 Gene Pulser, 用实施例 2.1 中炎症的 pCTCON-EGFR 转化 EBY100 (酿酒酵母) 酵母菌株 (图 1)。将经转化的菌落在选择培养基, SD-CAA 液体培养基 (20g/L 葡萄糖、6.7g/L 无氨基酸的酵母氮源基础、5.4g/L Na_2HPO_4 、8.6g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 以及 5g/L 酪蛋白氨基酸 (casaminoacid)) 中于 30°C 孵育 20 小时。然后, 通过将经转化的菌落在选择培养基, SD-CAA 液体培养基 (20g/L 葡萄糖、6.7g/L 无氨基酸的酵母氮源基础、5.4g/L Na_2HPO_4 、8.6g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 以及 5g/L 酪蛋白氨基酸) 中于 30°C 孵育 20 小时来诱导酵母细胞表面上 EGFR 变体的表达。

[0075] 2.2.2 酵母细胞表面上的 EGFR 变体之表达的测定

[0076] 使用 BD FACS Calibur™ (Becton Dickinson) 来确认酵母细胞表面上 EGFR 变体的表达。以密度为约 1×10^7 细胞/ml 的表达酵母细胞与 0.1ml 磷酸盐缓冲盐水 (包含 1mg/ml BSA 的 PBSB; pH 7.4) 中的抗 c-myc 9E10 抗 c-myc 9E10mAb (1 : 100 稀释) 反应 (在 25°C 持续 30 分钟), 并用 PBSB 洗涤。酵母细胞与经 R-藻红蛋白缀合的山羊抗小鼠 IgG (1 : 25 稀释) 在冰上进行第二次反应 15 分钟, 用 PBSB 洗涤, 然后使用 BD FACS Calibur™ 分析。从分析结果发现, 所述 EGFR 变体在酵母细胞表面上表达良好 (参见图 7)。

[0077] 2.2.3 使用流式细胞术分析 EGFR 变体与 GC1118 之间的结合

[0078] 使用 BD FACS Calibur™ (Becton Dickinson) 来确认 GC1118 与在酵母细胞表面上表达的 EGFR 变体之间的结合。将西妥昔单抗用作对照抗体。以密度为约 1×10^7 细胞/ml 的表达酵母细胞与 0.1ml PBSB (包含 1mg/ml BSA 的磷酸盐缓冲盐水; pH 7.4) 中的 $1 \mu\text{g}$ 各抗体反应 (在 25°C 持续 30 分钟), 并用 PBSB 洗涤。酵母细胞与经 FITC 缀合的抗人 IgG (1 : 50 稀释) 在冰上进行第二次反应 15 分钟, 用 PBSB 洗涤, 然后使用 BD FACS Calibur™ 测量平均荧光强度。测量结果列于表 4 中, 并在图 8 中示出。如在表 4 中所见, 证明了在表位 (根据本发明一个实施方案通过结构分析得出的 R353、F357 和 H359) 被甘氨酸替换的 EGFR 变体中, GC1118 的结合受到抑制, 因此经替换的氨基酸残基是 GC1118 的表位。

[0079] 表 4

[0080] 拮抗剂与 EGFR 变体的结合

[0081]

EGFR 变体	表达水平 (%)	拮抗物结合活性 (%)	
		GC1118	西妥昔单抗
EGFR (野生型)	100	100	100
变体 1(R353G)	66.5	30.4	23.8
变体 2(F357G)	91.3	26.1	88.3
变体 3(H359G)	89.3	34.1	82.9
变体 4(R353G+F357G)	71.4	14.1	34.8
变体 5(F357G+H359G)	74.4	15	77.3
变体 6(R353G+H359G)	68	13.7	35.2
变体 7(R353G+F357G+H359G)	69.2	13.61	42.6

[0082] 实施例 3 :GC1118 和配体与 EGFR 的竞争性结合的分析

[0083] 为了确定 GC1118 和表 5 中列出的六种配体是否具有对 EGFR 相同或相似的结合位点,进行竞争结合测试。将西妥昔单抗用作对照抗体。首先,使预定浓度的抗体 (1.5nM) 和多种浓度的配体在包被有 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ EGFR 的平板上一起反应。在这种情况下,所述配体以使抗体与配体的摩尔比定量为 $1:1$ 、 $1:10$ 、 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 和 $1:10^5$ 的浓度存在。使所得的混合物在室温反应 30 分钟,然后用 PBST (包含 0.05% 吐温 20 ;pH 7.4) 洗涤五次。然后,使混合物与缀合过氧化物酶的抗人 IgG (Fc 特异性) (Sigma A0170, 美国) 在室温下进行第二次反应 30 分钟,并用 PBST 洗涤五次。随后,向各孔中添加 $100\mu\text{L}$ 的 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 微孔过氧化物酶底物 (KPL 50-76-03, 美国) 溶液,然后在 405nm 处测量 O.D 值。注意到,两种反应物 (抗体和配体) 彼此竞争,当 GC1118 对 EGFR 的结合亲和力和力随着配体浓度的升高而降低时说明这两种反应物对 EGFR 具有相同表位,或者非常接近的匹配。抗体和配体之间的竞争在图 9 中示出,并列于表 6 中。结果,可以见到,与西妥昔单抗相比,GC1118 具有抑制 EGF、TGF- α 、BTC、EPR 和 HB-EGF 之结合的优异能力。

[0084] 表 5

[0085] 使用的 EGFR 配体

[0086]

人 EGFR 配体	详情
EGF	表皮生长因子
TGF- α	转化生长因子 - α
AR	双调蛋白
BTC	β - 动物纤维素

EPR	表皮调节素
HB-EGF	肝素结合的 EGF 样生长因子

[0087] 表 6

[0088] EGFR 配体对 GC1118 的竞争性结合能力

[0089]

	抗体结合 (%)			
	GC1118		西妥昔单抗	
抗体: 配体 (摩尔比)	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁴	1:10 ⁵
EGF	30.2	15.2	61.8	22.5
TGF- α	94.1	61.1	96.5	92.4
AR	99.6	99.9	96.6	99.9
BTC	40.4	18.9	80.2	51.1
EPR	90.0	54.4	99.9	91.5
HB-EGF	65.1	31.2	96.2	76.1

[0090] 实施例 4 :对 EGFR 配体诱导的细胞增殖的抑制效果

[0091] 为了比较本发明的 GC1118 与西妥昔单抗对由 EGFR 配体诱导的癌细胞增殖的抑制效果,将结直肠癌细胞系 LS174T(ATCC, CL-188) 涂布于 96 孔微板 (Nunc) 上使得细胞数定量为 3,000 细胞 /ml。一天后,去除培养基,并用 GC1118 和对照抗体西妥昔单抗以 0.1 μ g/ml、1 μ g/ml 和 10 μ g/ml 的浓度处理不含牛血清白蛋白的培养基。在抗体处理的同时,使用 EGFR 配体根据其类型以相应的浓度处理培养基 (EGF ;50ng/ml, TGF- α ;100ng/ml, 双调蛋白 ;100ng/ml, 表皮调节素 ;300ng/ml, HB-EGF ;50ng/ml, 以及 b- 动物纤维素 ;100ng/ml), 然后在 CO₂ 培养箱中于 37°C 孵育 3 天。为了在 3 天后测量癌细胞的增殖水平,向在 96 孔板中孵育的癌细胞添加 40 μ l MTS 溶液 (CellTiter 96Aqueous One solution Reagent, Promega), 使其在 CO₂ 培养箱中于 37°C 反应 3 小时,然后在 490nm 处测量 O.D 值。

[0092] 结果可以见到,与西妥昔单抗相比,GC1118 对 EGF、TGF- α 、HB-EGF 和 BTC 配体诱导的癌细胞增殖的抑制高效得多,表明这些结果与实施例 3 中的那些结果相对应。

[0093] 上述结果揭示了,具有根据本发明一个示例性实施方案之表位的抗体示出了对细胞增殖的优异抑制效果,因为这些抗体具有与西妥昔单抗不同的表位,并因此具有抑制配体结合的能力 (参见图 10)。特别地,与根据本发明一个示例性实施方案的表位结合的抗体能够用于治疗多种疾病,例如由 EGF 以及其他 EGFR 配体结合导致的 EGFR 活化所发展的癌症,因为所述抗体高效抑制多种 EGFR 配体与 EGFR 的结合,所述 EGFR 配体例如不仅包括 EGF 还包括 TGF- α 、AR、BTC、EPR 和 HB-EGF。

[0094] 工业实用性

[0095] 根据本发明一个示例性实施方案提供的 EGFR 上的表位是高度保守的,并且位于与结合 EGF 紧密相关的结构域中。因此,包含针对所述表位之抗体的组合物或包含所述表

位的疫苗组合物可有效阻断由 EGR 与 EGFR 结合所引起的信号转导,并因此可在治疗多种疾病例如癌症中具有高度价值并且可用于治疗这些疾病。

[0001]

IP1459617P, 序列表.txt

<110> Green Cross Corporation
 Mogam Biotechnology Research Institute
 <120> 表皮生长因子受体表面抗原的表位及其用途
 <130> PP-1202
 <150> 61/616, 073
 <151> 2012-03-27
 <160> 22
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 1
 Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
 20 25 30
 Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
 35 40 45
 Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
 85 90 95
 Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro
 100 105 110
 Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn
 115 120 125
 Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val
 130 135 140
 Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu
 145 150 155 160
 Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp
 165 170 175
 Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala
 180 185 190
 Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
 195 200 205
 His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys
 210 215 220
 Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn
 245 250 255
 Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
 260 265 270

[0002]

Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
 275 280 285
 Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys
 290 295 300
 Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
 325 330 335
 Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
 340 345 350
 Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
 355 360 365
 Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
 370 375 380
 Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
 385 390 395 400
 Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
 405 410 415
 Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
 420 425 430
 Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
 435 440 445
 Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
 450 455 460
 Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
 465 470 475 480
 Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
 485 490 495
 Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
 500 505 510
 Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
 515 520 525
 Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
 530 535 540
 Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
 545 550 555 560
 Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
 565 570 575
 Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
 580 585 590
 Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
 595 600 605
 Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser
 610 615 620

<210> 2
 <211> 7

[0003]

<212> PRT
<213> 人

<400> 2
Arg Gly Asp Ser Phe Thr His
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 3
Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro
1 5

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pCTCON-For

<400> 4
cggcctagcct ggaggaaaag aaagtttgc 29

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pCTCON-Rev

<400> 5
cgacgcgttg gacgggatct taggccc 27

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> R353G-For

<400> 6
ctgccggttg catittggcgg tgactccttc aca 33

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> R353G-Rev

<400> 7
tgtgaaggag tcaccgcca atgccaccgg cag 33

<210> 8

[0004]

<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	F357G-For	
<400>	8	
tttaggggtg actccggcac acatactcct cct		33
<210>	9	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	F357G-Rev	
<400>	9	
aggaggagta tgtgtgcgg agtcaccct aaa		33
<210>	10	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	H359G For	
<400>	10	
ggtgactcct tcacaggcac tcctcctctg gac		33
<210>	11	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	H359G-Rev	
<400>	11	
gtccagagga ggagtgcctg tgaaggagtc acc		33
<210>	12	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R353G, F357G-For	
<400>	12	
ctgccggtgg catttggegg tgactccggg acacatactc ctctc		45
<210>	13	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R353G, F357G-Rev	

[0005]

<400>	13	
aggaggagta	tgtgtcccg agtcaccgcc aatgccacc ggcag	45
<210>	14	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	F357G, H359G-For	
<400>	14	
tttaggggtg	actccggcac agggactcct cctctggac	39
<210>	15	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	F357G, H359G-Rev	
<400>	15	
gtccagagga	ggagtccttg tgccggagtc acccctaaa	39
<210>	16	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R353G, H359G-For	
<400>	16	
ctgccggtgg	catttgccgg tgaaccttc acaggtactc ctctcttgga c	51
<210>	17	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R353G, H359G-Rev	
<400>	17	
gtccagagga	ggagtacctg tgaaggagtc accgccaaat gccaccggca g	51
<210>	18	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R353G, F357G, H359G-For	
<400>	18	
ctgccggtgg	catttgccgg tgactccgga acaggtactc ctctcttgga c	51

[0006]

<210>	19	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R353G, F357G, H359G-Rev	
<400>	19	
	gtccagagga ggagtacctg ttccggagtc accgccaaat gccaccggca g	51
<210>	20	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	seq-F1	
<400>	20	
	atgaagggtt tgattgtctt gttgg	25
<210>	21	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	seq-F1	
<400>	21	
	ccagtgaactg ctgccacaac cagtg	25
<210>	22	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	seq-F1	
<400>	22	
	cgtcggcctg aacataacat ccttg	25

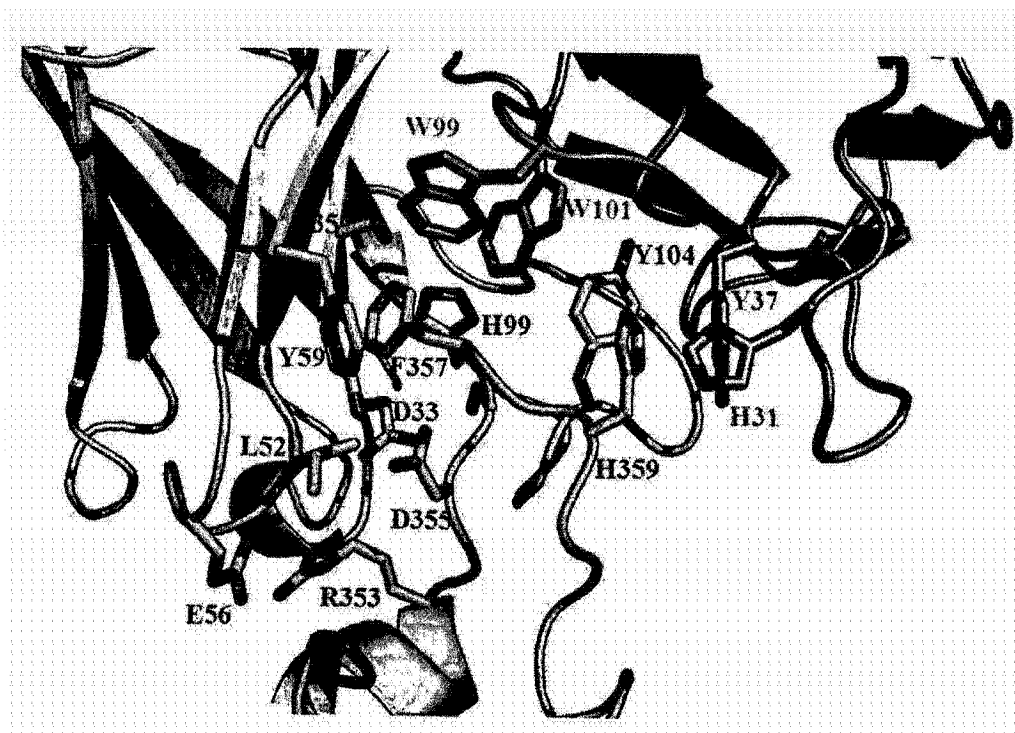


图 1

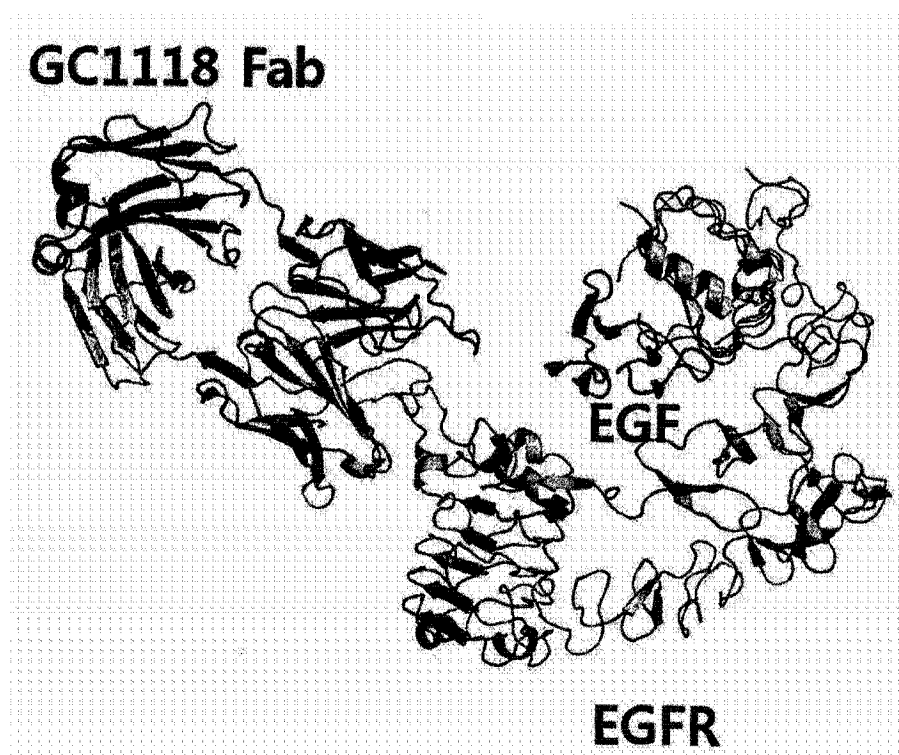


图 2

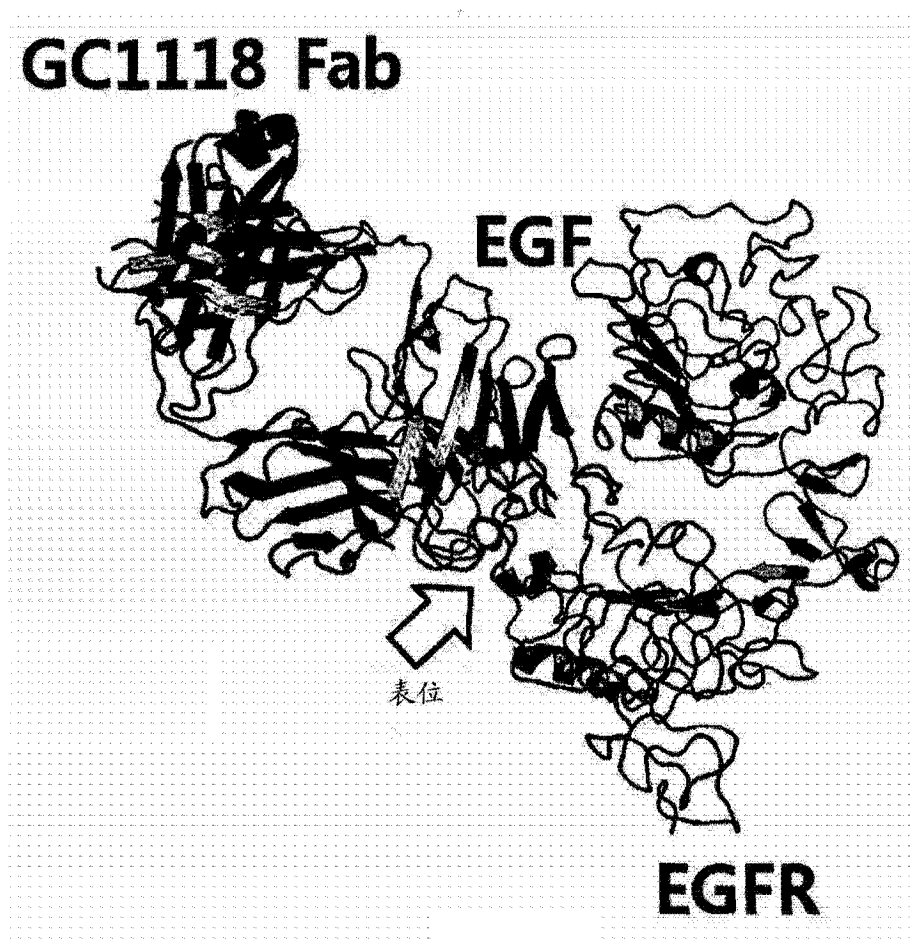


图 3

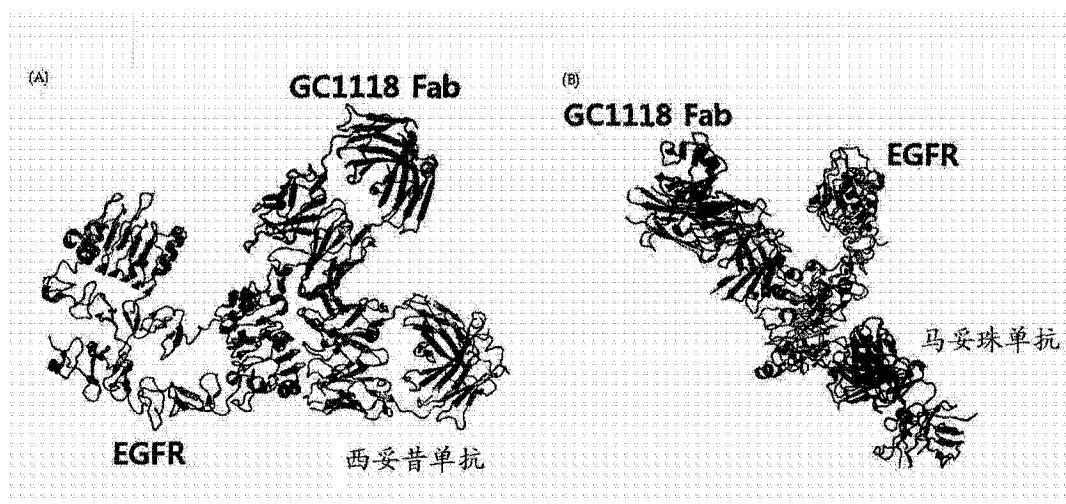


图 4

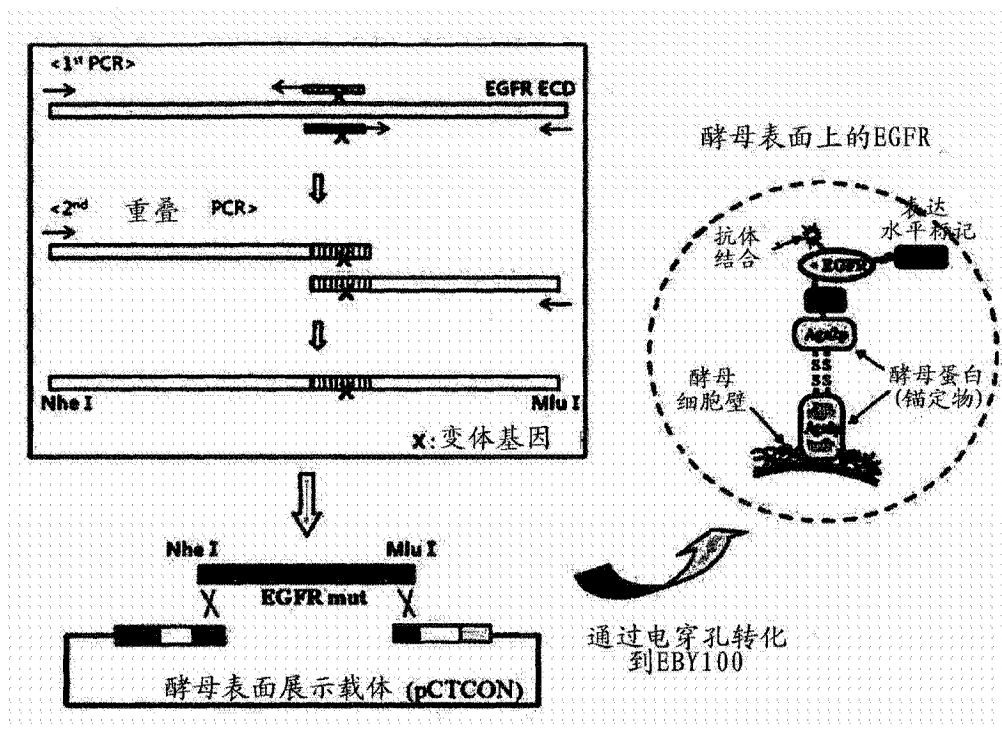


图 5

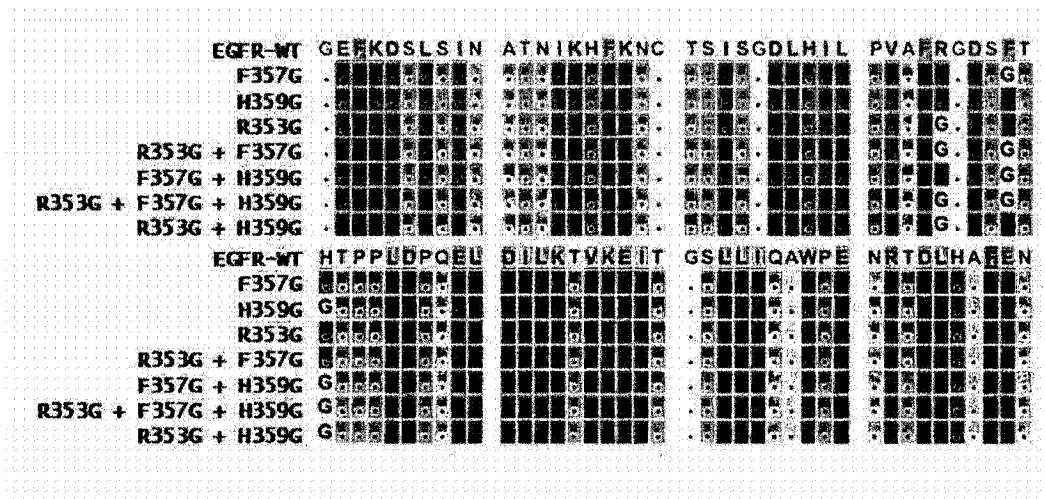


图 6

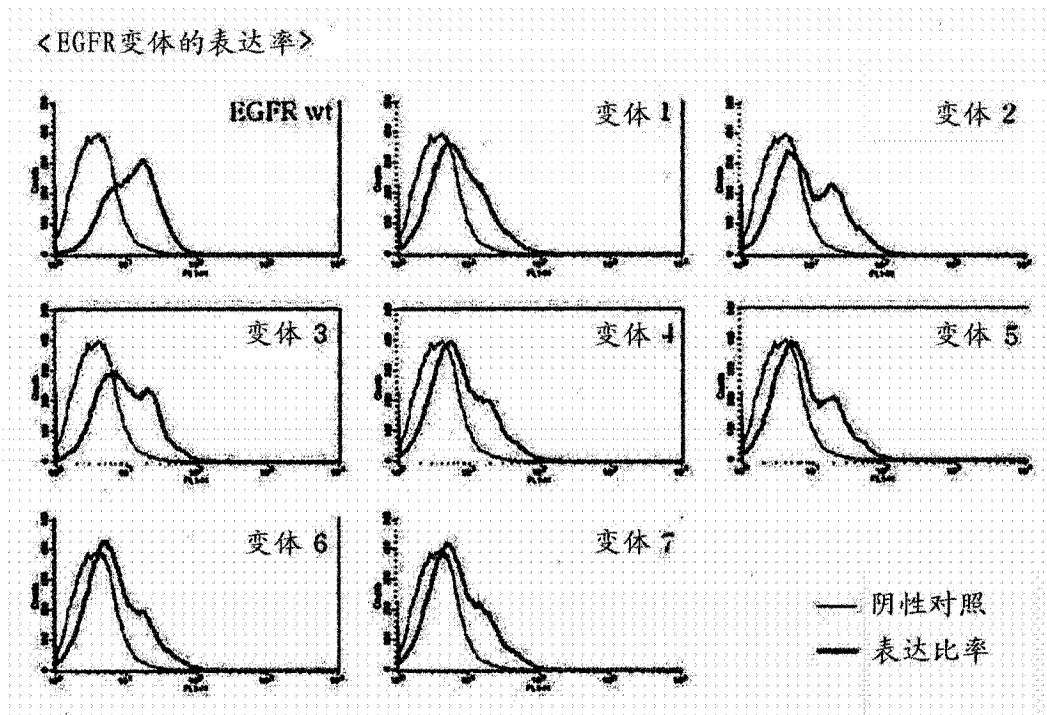


图 7

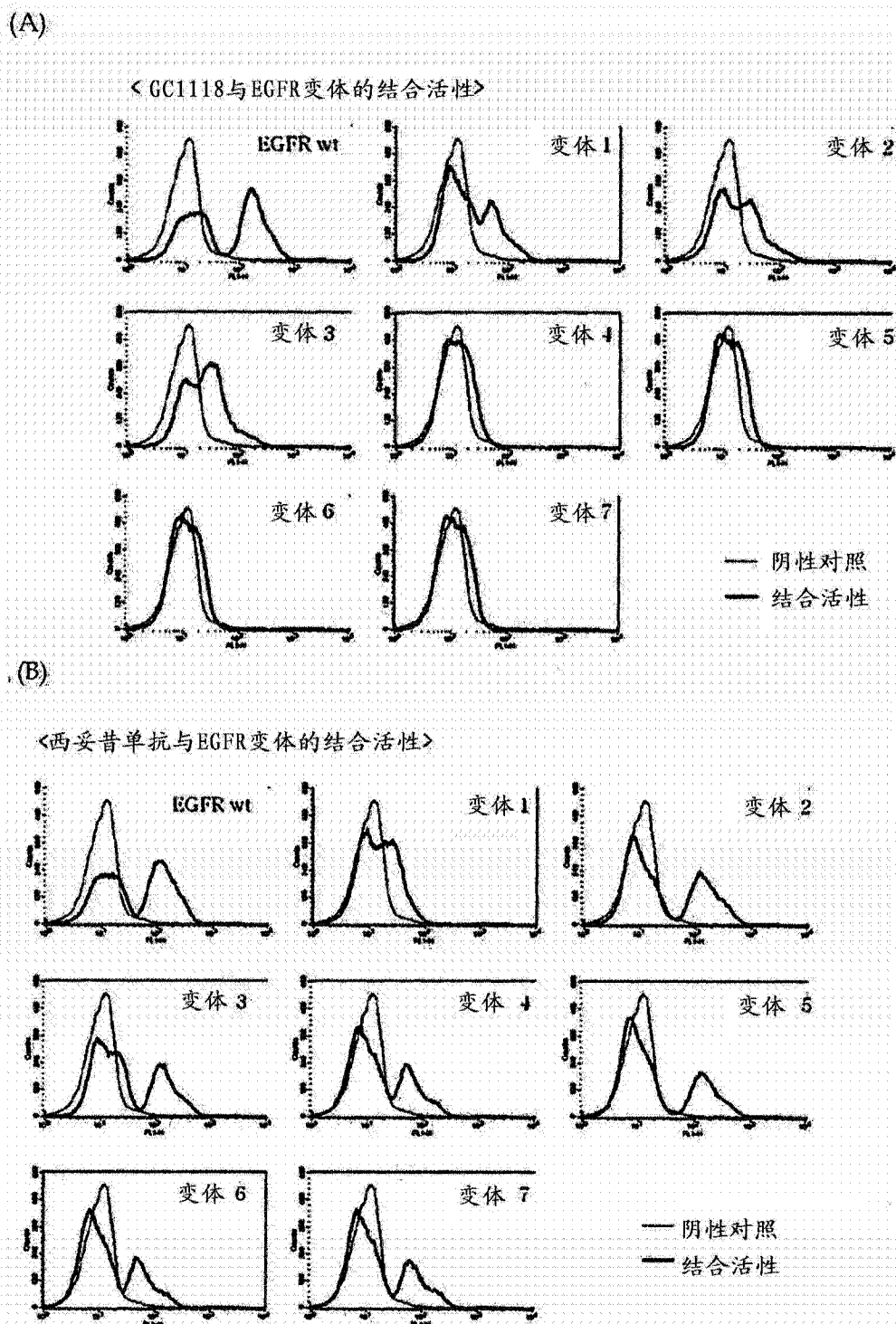


图 8

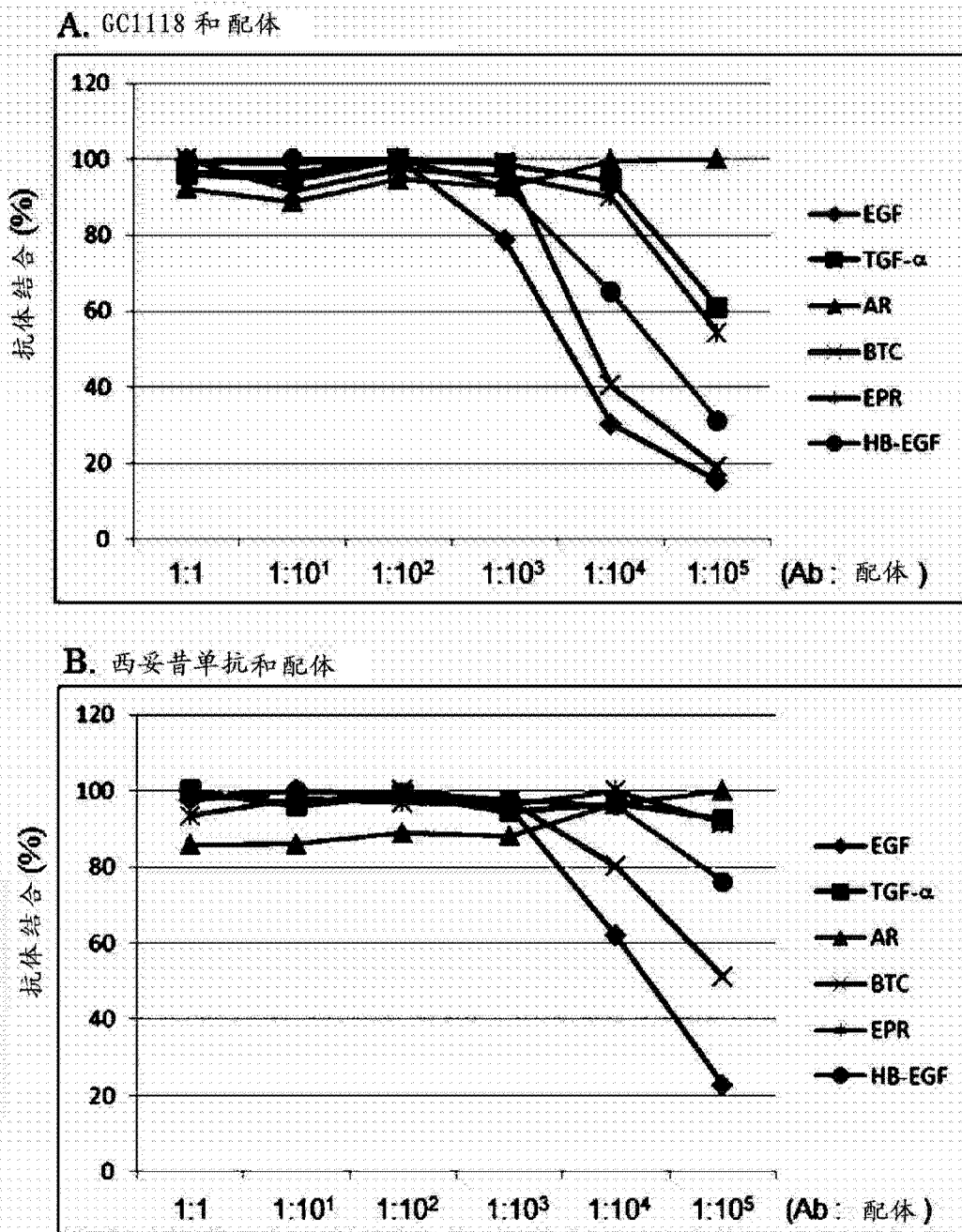


图 9

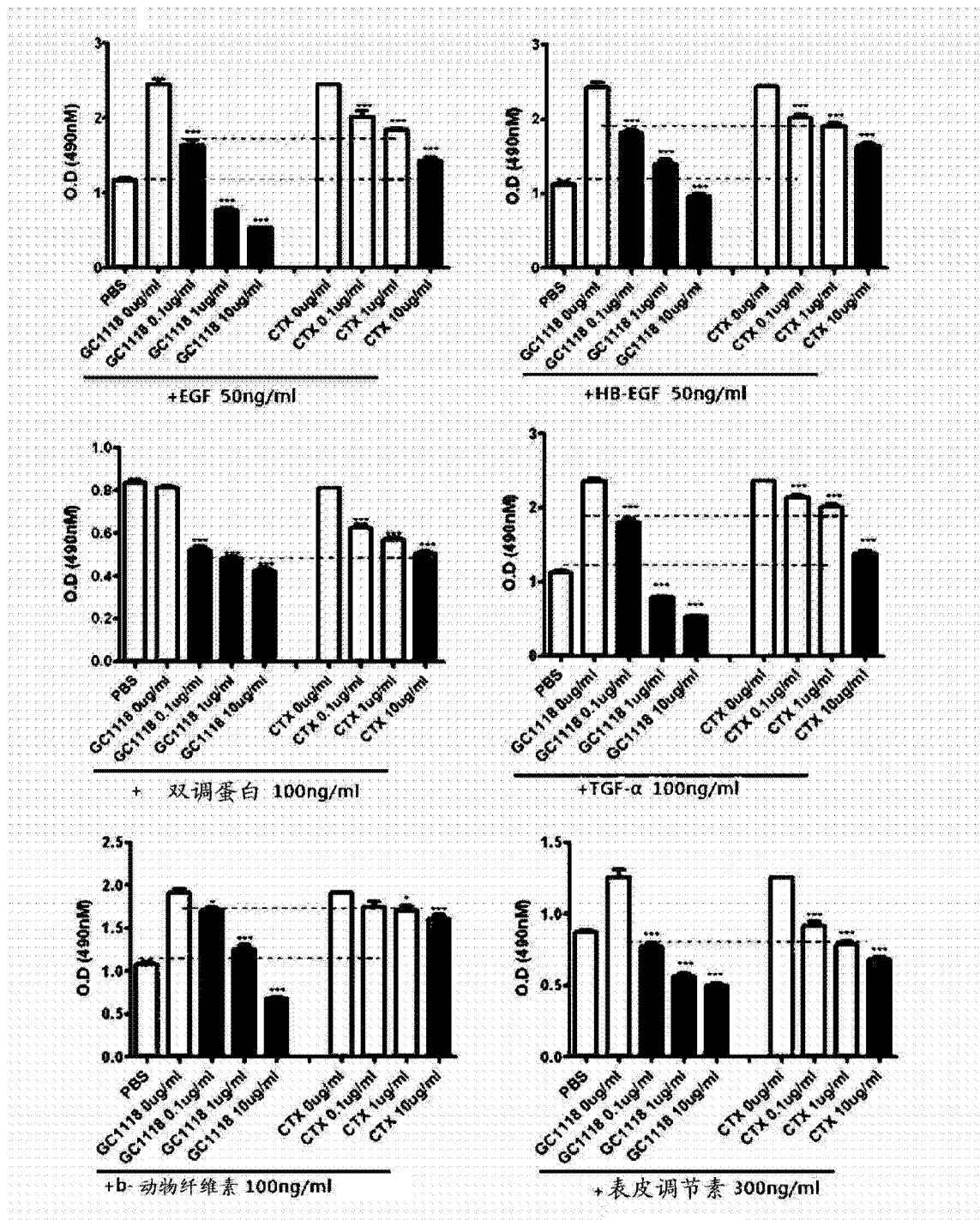


图 10