



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/71 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/0005 (2017.08); A61K 39/0011 (2017.08)

(21)(22) Заявка: 2014143032, 27.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.03.2013Дата регистрации:  
17.04.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
27.03.2012 US 61/616,073

(43) Дата публикации заявки: 20.05.2016 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 17.04.2018 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 27.10.2014(86) Заявка РСТ:  
KR 2013/002550 (27.03.2013)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2013/147509 (03.10.2013)Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КИМ Се-Хо (KR),  
ХОНГ Кванг-Вон (KR),  
ЧАНГ Ки Хван (KR),  
КИМ Мин-Сoo (KR),  
ЛИ Ми-Дзунг (KR),  
ВОН Дзонг-Хва (KR),  
ХУР Мин-Киу (KR),  
ЧО Хиун-соо (KR),  
ЙОО Дзи-Хо (KR)

(73) Патентообладатель(и):

ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН (KR),  
МОГАМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ РИСЕРЧ  
ИНСТИТЮТ (KR)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 5459061 A, 17.10.1995. US  
7732157 B1, 08.06.2010. WO 2011140391 A2,  
10.11.2011. HARTMANN C. et al., Peptide  
mimotopes recognized by antibodies cetuximab  
and matuzumab induce a functionally  
equivalent anti-EGFR immune response,  
Oncogene, 2010, v.29, n.32, p.4517-4527. RU  
2335507 C2, 10.10.2008.

## (54) ЭПИТОПЫ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к эпитопам рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), и может быть использовано в медицине для лечения злокачественного новообразования, связанного с активацией EGFR. Получены эпитопы EGFR с аминокислотной последовательностью RGDSFTH

(SEQ ID NO:2) или RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3). Полученные эпитопы являются высококонсервативными и расположены в домене, тесно связанном с EGF. Изобретение позволяет эффективно блокировать передачу сигналов, вызванную связыванием EGF и EGFR. 7 н. и 16 з.п. ф-лы, 11 ил., 6 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C07K 14/71* (2006.01)*C07K 7/04* (2006.01)*C12P 21/02* (2006.01)*A61K 39/00* (2006.01)*G01N 33/574* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/0005* (2017.08); *A61K 39/0011* (2017.08)(21)(22) Application: **2014143032, 27.03.2013**(24) Effective date for property rights:  
**27.03.2013**Registration date:  
**17.04.2018**

Priority:

(30) Convention priority:  
**27.03.2012 US 61/616,073**(43) Application published: **20.05.2016** Bull. № 14(45) Date of publication: **17.04.2018** Bull. № 11(85) Commencement of national phase: **27.10.2014**(86) PCT application:  
**KR 2013/002550 (27.03.2013)**(87) PCT publication:  
**WO 2013/147509 (03.10.2013)**Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KIM Se-Kho (KR),  
KHONG Kvang-Von (KR),  
CHANG Ki Khvan (KR),  
KIM Min-Soo (KR),  
LI Mi-Dzung (KR),  
VON Dzung-Khva (KR),  
KHUR Min-Kiu (KR),  
CHO Khiun-soo (KR),  
JOO Dzi-Kho (KR)**

(73) Proprietor(s):

**GRIN KROSS KORPOREJSHN (KR),  
MOGAM BAJOTEKNOLODZHI RISERCH  
INSTITYUT (KR)**(54) **EPITOPES OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR SURFACE ANTIGEN AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to epitopes of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and can be used in medicine to treat a malignant tumor related to the activation of the EGFR. Provided are EGFR epitopes with the amino acid sequence

RGDSFTH (SEQ ID NO: 2) or RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3). Resulting epitopes are highly conserved and are located in the domain closely related to the EGF.

EFFECT: invention effectively blocks signaling caused by the binding of EGF and EGFR.

23 cl, 11 dwg, 6 tbl, 4 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к эпитопам рецептора эпидермального фактора роста (в настоящем описании обозначен как “EGFR”) и их применению. Эпитопы, предоставленные в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенным в качестве примера, являются высококонсервативными и расположены в домене, тесно связанном с присоединением эпидермального фактора роста (в настоящем описании обозначен как “EGF”). Следовательно, композиции вакцины, содержащие эпитопы, антитела против данных эпитопов, или композиции, содержащие антитела, могут эффективно блокировать передачу сигналов, вызванную связыванием EGFR и EGF, и, таким образом, могут иметь важное значение и могут использоваться для лечения различных заболеваний, таких как злокачественные новообразования. Дополнительно, антитела, связывающиеся с эпитопами, могут эффективно ингибировать связывание различных лигандов EGFR, таких как, но не ограничиваясь ими, EGF, а также трансформирующий фактор роста- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), амфирегулин (AR), бетацеллюлин (BTC), эпирегулин (EPR) и гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF) с EGFR, и, таким образом, могут быть использованы для лечения различных заболеваний, вызываемых активацией EGFR.

Также настоящее изобретение относится к способу получения антитела, специфичного в отношении эпитопов.

Предшествующий уровень техники

Преимущества иммунотерапевтических способов лечения злокачественных новообразований состоят в увеличении специфичности в отношении мишеневых заболеваний у пациентов по сравнению с хирургическим вмешательством, лучевой терапией и химиотерапией, в результате чего усиливаются противоопухолевые эффекты и снижаются побочные эффекты. Опухолеспецифические моноклональные антитела используются в качестве терапевтического средства, которое является эффективным для лечения опухолей благодаря нацеливанию на определенные белки, которые специфически сверхэкспрессируются в различных типах злокачественных новообразований, вызывая противоопухолевые эффекты.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой мембранный белок типа I, имеющий молекулярную массу, равную 170 кДа, и известно, что он сверхэкспрессируется в различных типах опухолей. EGFR исследовались в течение длительного периода времени, и в настоящее время были успешно проведены кристаллографические исследования клеточного домена (Garrett TP et al., Cell, 2002, 110: 763-773) и внутриклеточного домена киназы (Stamos J et al., J Biol. Chem., 2002, 277: 46265-46272). Эти исследования дали ключевую информацию о поведении рецепторов и их лигандов. EGFR представляет собой молекулу, связанную с поверхностью клетки, которая активируется посредством связывания с ней EGF-лигандов и трансформирующего фактора роста- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). После связывания лигандов, рецепторы димеризуются и фосфорилируют внутриклеточный домен тирозинкиназы. В результате активируются последующие реакции сигнального каскада, индуцируя рост и пролиферацию нормальных клеток и усиливая рост опухолевых клеток. В частности, поскольку функции опухолевых клеток зависят в основном от EGFR, то понятно, что рецептор является общей мишенью для лечения из-за высокой вероятности ингибирования регуляторных функций EGFR.

Сверхэкспрессию EGFR, например, отмечают при некоторых типах злокачественных новообразований, таких как рак легких, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак желудка, рак мозга, рак шеи и головы, рак яичника и рак простаты. Если связывание

EGF и EGFR ингибируется с помощью антител против EGFR, то можно ингибировать рост злокачественных клеток и злокачественное новообразование излечиваться, что уже было экспериментально доказано на моноклональном антителе против EGFR.

В то же время, хотя были сделаны попытки выяснить положения соответствующих доменов EGFR, связывающихся с EGF (S. Yokoyama et al., Cell, 2002, 110: 775-787), следует провести дополнительное исследование, ингибирует ли антитело, если такой домен используется в качестве эпитопа, активацию пути передачи сигналов EGFR за счет EGF.

В последние годы, для лечения метастатического колоректального рака в клинической области используется цетуксимаб (антитело C225, название продукта: эрбитукс; ImClone, США), который представляет собой химерное антитело, получаемое посредством связывания вариабельной области антитела мыши и константной области антитела IgG1 человека (имеющей приблизительно 30% мышьиной аминокислотной последовательности), и который, таким образом, ингибирует рост опухолевых клеток и фосфорилирование EGFR посредством EGF *in vitro*, и подавляет образование опухолей человека у “голых” мышей. Также было обнаружено, что антитело обладает синергизмом с некоторым химиотерапевтическим средством для уничтожения опухолей человека на ксенотрансплантатной мышьиной модели. Однако проблема использования цетуксимаба состоит в том, что он вызывает иммунный ответ у пациентов (приблизительно 10%), и может использоваться только в виде сочетанной терапии с химиотерапевтическим средством, так как он не проявляет удовлетворительного терапевтического эффекта при его самостоятельном использовании в терапии.

Панитумумаб (название продукта: вектибикс; Amgen Inc. США), который является еще одним антителом, используемым для лечения метастатического колоректального рака, представляет собой полностью антитело человека, которое ингибирует рост опухолевых клеток и фосфорилирование EGFR посредством EGF *in vitro*, и подавляет образование опухолей человека у “голых” мышей. Также было обнаружено, что антитело обладает синергизмом с некоторым химиотерапевтическим средством для уничтожения опухолей человека на ксенотрансплантатной мышьиной модели.

Панитумумаб отличается от цетуксимаба тем, что является полностью антителом человека, обладает антигенсвязывающей способностью, в 10 раз превышающей аналогичную способность цетуксимаба, снижает вероятность индукции иммунного ответа, вызываемого цетуксимабом как антитело IgG2-типа, и проявляет только ингибирующий эффект на передачу сигналов при связывании EGFR и EGF вследствие ограничений IgG2, несмотря на то, что активность связывания увеличена для снижения побочных эффектов и улучшения эффективности. Следовательно, сообщалось, что панитумумаб обладает общими клиническими эффектами, аналогично цетуксимабу, поскольку он не обладает активностью антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) наряду с ингибирующим эффектом на передачу сигналов, и активность ADCC у цетуксимаба известна из уровня техники.

Матузумаб (mAb425), который был разработан совместно Merck Serono и Takeda Pharmaceuticals, до настоящего времени также не обладает удовлетворительным терапевтическим эффектом при одиночной терапии.

Прежде всего, все общепринятые терапевтические средства на основе антител, нацеленных на EGFR, не имеют разрешения на назначение для лечения K-ras мутантного колоректального рака. Данные, приведенные в 2009 г., подтвердили, что процентная доля пациентов, у которых два антитела демонстрируют терапевтический эффект, количественно составляет приблизительно 21%, и антитела не проявляют терапевтического эффекта у остальных 79% пациентов. Группа из 43% пациентов, у



которых антитела не проявляют терапевтического эффекта, т.е. приблизительно 30% от общего числа пациентов, имеет K-ras мутант, который принадлежит к этой группе K-ras мутантного колоректального рака. Общепринятые терапевтические средства на основе антител, цетуксимаба и панитумумаба, показывают терапевтический эффект только приблизительно у 1,5% с K-ras мутантом.

Следовательно, все сильнее становится необходимость в новых анти-EGFR антителах, имеющих дифференциацию и эффективное действие, которые могут решить проблемы и ограничения общепринятых антител против EGFR благодаря более эффективному ингибированию связывания EGFR и EGF.

#### 10 Сущность изобретения

Следовательно, объектом настоящего изобретения является аминокислотная последовательность RGDSFTH (SEQ ID NO: 2) или эпитоп EGFR, включающий указанную последовательность, и, в частности, эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3).

15 Еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения эпитопа, композиция для противоопухолевых вакцин или противоопухолевой вакцины, содержащая данный эпитоп, способ получения антитела, которое способно специфически связываться с эпитопом, применение эпитопа и композиция или терапевтическое средство для профилактики и/или лечения злокачественных новообразований, содержащие

20 антитело, полученное с помощью указанного способа.  
Еще одним дополнительным объектом настоящего изобретения является эпитоп или полинуклеотидная последовательность, кодирующая данный эпитоп, и композиция и набор для диагностики злокачественных новообразований, содержащие указанную полинуклеотидную последовательность.

#### 25 Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена диаграмма, показывающая характеристики связывания EGFR и антитела GC118 в виде 3D-изображения.

На фиг. 2 представлена диаграмма, показывающая характеристики связывания EGFR и EGF в виде 3D-изображения.

30 На фиг. 3 представлена диаграмма, показывающая характеристики связывания антитела GC118 и EGFR, с которым связан EGF, если антитело GC118 перекрывает EGFR.

На фиг. 4 представлена диаграмма, показывающая характеристики связывания EGFR и цетуксимаба и матузумаба в виде 3D-изображения.

35 На фиг. 5 представлена диаграмма, показывающая методику синтеза вариантного гена EGFR и методику трансформации дрожжевых клеток.

На фиг. 6 представлена диаграмма, показывающая, что соответствующие варианты EGFR синтезируются надлежащим образом посредством идентификации аминокислотной последовательности, определенной по последовательности оснований ДНК.

40 На фиг. 7 представлена диаграмма, показывающая скорость экспрессии соответствующих вариантов EGFR.

На фиг. 8 представлена диаграмма, показывающая способность к связыванию антител против соответствующих мутантов EGFR: (А) GC118 и (В) цетуксимаб (контроль).

45 На фиг. 9 представлена диаграмма, показывающая способность к конкурентному связыванию лигандов EGFR с GC118: (А) GC118 и (В) цетуксимаб (контроль).

На фиг. 10 представлена диаграмма, показывающая влияние ингибирующих активностей GC118 на индукцию клеточной пролиферации.

#### Подробное описание изобретения

Далее в описании настоящее изобретение будет описано подробно.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2 или содержащая ее аминокислотная последовательность, в частности, аминокислотная последовательность RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3), по существу проявляет активность в отношении связывания с EGF среди аминокислотных последовательностей EGFR, и было обнаружено, что антитела с аминокислотной последовательностью в качестве эпитопа, очень эффективно ингибируют связывание EGFR и EGF и, таким образом, проявляют превосходные эффекты в отношении лечения злокачественных новообразований посредством блокирования передачи сигналов в результате связывания. Следовательно, настоящее изобретение было выполнено на основании этих фактов.

Аминокислотная последовательность RGDSFTH, показанная как SEQ ID NO: 2, соответствует аминокислотным остаткам 353-359 аминокислотной последовательности внеклеточного домена EGFR, показанной как SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность RGDSFTHTP, показанная как SEQ ID NO: 3, соответствует аминокислотным остаткам 353-361 внеклеточного домена EGFR, показанного как SEQ ID NO: 1.

Аминокислотные остатки, присутствующие в аминокислотной последовательности по настоящему изобретению, представлены посредством либо трех-, либо однобуквенных сокращений, известных из уровня техники. Кроме того, в настоящем изобретении термин "xA" относится к A аминокислотам последовательности EGFR, показанной как SEQ ID NO: 1, и термин "xAz" означает, что A аминокислота x заменена на z. Например, термин "R353" относится к аргинину (Arg), который является 353 аминокислотным остатком аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 1, и термин "R353G" означает, что аргинин (Arg), который является 353 аминокислотным остатком аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 1, заменен на глицин (Gly).

Эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может использоваться в комбинации с носителем для поддержания его собственной 3D-структуры или обеспечения эффективности при использовании в качестве композиции, такой как противоопухолевая вакцина. Носитель, в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, является биосовместимым, и все типы носителей могут быть использованы в данном случае, поскольку с ними может быть достигнут желаемый эффект. В данном случае, носитель может быть выбран из группы, состоящей из пептида, сывороточного альбумина, иммуноглобулина, гемоцианина и полисахарида, но не ограничиваясь ими.

Эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может использоваться как таковой или использоваться в виде комплекса в комбинации с носителем. В этом случае, эпитоп или комплекс могут быть использованы в композиции противоопухолевой вакцины. В настоящем описании композиция вакцины может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант или эксципиент. Может использоваться любой тип адъюванта, поскольку они предназначены для увеличения образования антитела при инъекционном введении в организм, благодаря чему достигаются цели настоящего изобретения. В частности, адъювант может

представлять собой по меньшей мере один адъювант, выбранный из группы, состоящей из соли алюминия ( $\text{Al}(\text{OH})_3$  или  $\text{AlPO}_4$ ), сквалена, сорбитана, полисорбата 80, CpG, липосомы, холестерина, монофосфориллипида А (MPL) и глюкопиранозиллипида А (GLA), но, не ограничиваясь ими.

Полинуклеотид, кодирующий эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 по настоящему изобретению, может использоваться в форме генетической противоопухолевой вакцины как таковой. В этом случае, полинуклеотид может использоваться сам по себе, без использования системы доставки, или он может быть доставлен в организм в составе вирусной или невирусной системы доставки. Может использоваться любой тип вирусной или невирусной системы доставки, поскольку известно, что они доступны в данной области. Конкретно, вирусная система доставки включает аденовирус, адено-ассоциированный вирус, лентивирус, ретровирус и т.п., и невирусный вектор, который может использоваться в настоящем изобретении, включает по меньшей мере один вектор, выбранный из группы, состоящей из катионного полимера, неионного полимера, липосомы, липида, фосфолипиды, гидрофильного полимера, гидрофобного полимера и их комплекса, но, не ограничиваясь ими.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, к клетке-хозяину, содержащей рекомбинантный вектор, и к способу получения эпитопа, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, используя рекомбинантный вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении термин “рекомбинантный вектор” относится к вектору экспрессии, способному к экспрессии мишеневого белка в соответствующей клетке-хозяине, которая представляет собой генную конструкцию, содержащую незаменимый регуляторный элемент, функционально связанный для экспрессии генной вставки. В настоящем изобретении термин “функционально связанный” означает, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая желаемый белок, функционально связана с экспрессионной контрольной последовательностью нуклеиновой кислоты для выполнения общих функций. Функциональное связывание с рекомбинантным вектором может осуществляться с использованием технологий генетической рекомбинации, широко известных в данной области, и сайт-специфическое расщепление ДНК и лигирование могут легко проводиться с использованием ферментов, широко известных в данной области.

Подходящий вектор экспрессии, который может использоваться в настоящем изобретении, может содержать сигнальные последовательности для мембранного нацеливания или секреции в дополнение к элементам контроля экспрессии, такие как промотор, кодон инициации, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования и энхансер. Кодон инициации и стоп-кодон, как правило, считаются частью нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуногенный мишеневый белок, и, таким образом, должны по существу использоваться у индивида, если генную конструкцию вводят индивиду, и встраивают в рамку вместе с кодирующей последовательностью. Промотор

в общем случае может быть конститутивным или индуцируемым. В прокариотических клетках присутствуют промоторы Lac, Tac, T3 и T7, но не ограничиваясь ими.

Существуют промотор  $\beta$ -актина и промоторы, выделенные из гемоглобина человека, мышечного креатина человека и металлотионеина человека, а также промоторы, выделенные из обезьяньего вируса 40 (SV40), мышиноного вируса опухоли молочных желез (MMTV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (например, промотор длинного терминального повтора (LTR) из ВИЧ), вируса Молони, цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барра (EBV) и вируса саркомы Рауса (RSV), присутствующих в эукариотических клетках, но, не ограничиваясь ими.

Вектор экспрессии может содержать маркер селекции для отбора клетки-хозяина, содержащей вектор. Маркер селекции используют для селекции клеток, трансформированных вектором. В данном случае, маркеры, придающие селективируемый фенотип, например толерантность к лекарственным средствам, ауксотрофность, толерантность к цитотоксическим средствам или экспрессию поверхностных белков, могут использоваться в качестве маркера селекции. Поскольку только клетки, экспрессирующие маркер селекции, выживают в окружении, обработанном средством для селекции, можно проводить селекцию трансформированных клеток. Также, если вектор представляет собой реплицируемый вектор экспрессии, то вектор может включать точку начала репликации, которая является определенной последовательностью нуклеиновой кислоты, от которой иницируется репликация. Различные типы векторов, таких как плаزمиды, вирус и космиды, могут быть использованы в качестве рекомбинантных векторов экспрессии. Может использоваться любой тип рекомбинантного вектора, без конкретного ограничения, поскольку они могут функционировать для экспрессии желательного гена в различных клетках-хозяевах, таких как прокариотические клетки и эукариотические клетки, и продуцировать желаемый белок. Однако вектор, который содержит промотор сильной активности и может продуцировать в больших количествах чужеродный белок, имеющий форму, сходную белком дикого типа, в то же время сохраняя сильную интенсивность экспрессии, может предпочтительно использоваться в качестве рекомбинантного вектора.

В частности, различные комбинации хозяев/векторов экспрессии могут использоваться для экспрессии эпитопа в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. Вектор экспрессии, подходящий для хозяев-эукариотов, может содержать регуляторную последовательность для экспрессии, включающую, но без ограничения, последовательность, выделенную из SV40, вируса бычьей папилломы, аденовируса, адено-ассоциированного вируса, цитомегаловируса, лентивируса и ретровируса. Вектор экспрессии, который может использоваться в бактериальном хозяине, включает бактериальные плазмиды, полученные из *Escherichia coli*, такие как pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, вектор pUC, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные; плазмиды, имеющие широкий диапазон хозяев, такие как RP4; фаговые ДНК, включающие различные производные фага лямбда, такие как  $\lambda$ gt10,  $\lambda$ gt11 и NM989; и другие ДНК фагов, такие как M13 и нитевидные одноцепочечные фаговые ДНК. Вектором, используемым для клеток насекомых, является pVL941.

Рекомбинантный вектор вводят в клетки-хозяева для образования трансформантов. Подходящие клетки-хозяева могут включать прокариоты, такие как *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis* или *Staphylococcus* sp., грибки, такие как *Aspergillus*

sp., дрожжевые клетки, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Shizosaccharomyces* sp. и *Neurospora crassa*; и другие низшие эукариоты, и клетки высших эукариотов, такие как клетки насекомых. Дополнительно, клетки-хозяева могут предпочтительно быть выделены из растений и млекопитающих, такие как клетки почки обезьяны (COS7), клетки NSO, SP2/0, клетки яичника китайского хомяка (CHO), W138, клетки почки молодого хомяка (BHK), MDCK, линия клеток миеломы, клетки HuT 78, клетки HEK293, но без ограничения. Особенно предпочтительными являются клетки CHO.

В настоящем изобретении термин “трансформация” в клетки-хозяева охватывает любой метод введения последовательности нуклеиновой кислоты в организм, клетку, ткань или орган, и трансформация может осуществляться стандартными методиками, подходящими для клетки-хозяина, как известно в данной области. Такие методы включают, но без ограничения, электропорацию, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция ( $\text{CaPO}_4$ ), осаждение хлоридом кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), встряхивание с использованием волокон карбида кремния, *Agrobacteria*-опосредованную трансформацию, метод ПЭГ, метод с декстрансульфатом, липофектаминный метод и трансформацию, опосредованную сушкой/подавлением. Эпитоп, в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может быть подвергнут крупномасштабному получению путем культивирования трансформантов, экспрессирующих рекомбинантный вектор в питательной среде. Среда и условия культивирования могут быть надлежащим образом выбраны в зависимости от клетки-хозяина. Условия, такие как температура, pH среды и время культивирования могут соответственно регулироваться для обеспечения эффективного роста клеток и получения белка в больших количествах. Как описано выше, эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может быть выделен рекомбинантно из среды или клеточного лизата, и может быть выделен и очищен с использованием общепринятых методов биохимического разделения (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Col Spring Harbr Laboratory Press (1989); Deucher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990)). Методики биохимического разделения, которые могут быть использованы в данном случае, могут включать, но без ограничения, электрофорез, центрифугирование, гель-фильтрацию, осаждение, диализ, хроматографию (ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, иммуноабсорбентную хроматографию или эксклюзионную по размерам хроматографию), изоэлектрическое фокусирование и различные их модифицированные и комбинированные методы.

Настоящее изобретение относится к способу экспрессии эпитопа, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, на поверхности микроорганизмов или вирусов. В способе по настоящему изобретению может использоваться рекомбинантный вектор, отличающийся тем, что содержит последовательность, кодирующую индуцируемый промотор или сигнальный белок, и различные микроорганизмы или вирусы. Особенно подходящие микроорганизмы или

вирусы включают, но без ограничения, рекомбинантную E. coli, рекомбинантные дрожжи и рекомбинантные бактериофаги. Технологии дисплея, широко известные в данной области, могут быть использованы для экспрессии эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 на поверхности микроорганизма или вируса. В частности, может быть использован, но, не ограничиваясь только им, способ связывания полинуклеотидной последовательности, кодирующей эпитоп, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, с последовательностью, кодирующей промотор или сигнальный белок для индукции экспрессии эпитопа на поверхности микробиальных или вирусных клеток, или способ делеции части гена, кодирующего белок, изначально экспрессируемый на поверхности микробиальных или вирусных клеток, и вставки полинуклеотидной последовательности, кодирующей эпитоп, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, в ген, подвергнутый частичной делеции. Эпитоп, экспрессированный на поверхностях микроорганизмов или вирусов, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может быть выделен и очищен как таковой, и может быть использован с целью конкретного применения в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, и может быть использован для пэннинга антитела, специфически связывающегося с эпитопом, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, если он экспрессирован на поверхности микроорганизмов или вирусов для получения антитела.

Настоящее изобретение также относится к эпитопу, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, антителу, специфически связывающегося с эпитопом, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, к применению комплекса, включающего эпитоп или полинуклеотид, кодирующий данный эпитоп, или к способу получения фрагмента такого антитела. Такое антитело может представлять собой поликлональное антитело или моноклональное антитело, и фрагмент антитела входит в объем настоящего изобретения, поскольку он сохраняет характеристики для связывания с эпитопом, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В частности, антитело или его фрагмент в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, включает, но без ограничения, антитела с одиночной цепью, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, Fd, scFv, доменные антитела, биспецифические антитела, минитела, scAb, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела,

IgG3-антитела, IgG4-антитела, производные константных областей антител и искусственные антитела на основе белковых матриц, поскольку они обладают активностью связывания с эпитопом, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. Также антитела, имеющие мутации в их вариабельных областях, входят в объем настоящего изобретения, поскольку они сохраняют их характеристики в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенном в качестве примера. В качестве примера, мутации могут

включать консервативные замены аминокислот в вариабельных областях. Консервативная замена относится к замене исходной аминокислотной последовательности на другой аминокислотный остаток, имеющий аналогичную характеристику. Например, остатки лизина, аргинина и гистидина являются сходными с точки зрения наличия у них основной боковой цепи. Также, остатки аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты являются сходными с точки зрения наличия у них кислотной боковой цепи. Также, остатки глицина, аспарагина, глутамина, серина, треонина, тирозина, цистеина и триптофана являются сходными с точки зрения наличия у них незаряженной, полярной боковой цепи, а остатки аланина, валина, лейцина, треонина, изолейцина, пролина, фенилаланина и метионина являются сходными с точки зрения наличия у них неполярной боковой цепи. Дополнительно, остатки тирозина, фенилаланина, триптофана и гистидина являются сходными с точки зрения наличия у них ароматической боковой цепи. Следовательно, для специалистов в области будет очевидным, что аминокислотные замены среди группы аминокислот, имеющих сходные характеристики, как описано выше, не будут вызывать какого-либо изменения в характеристиках. В результате, способ получения антитела, имеющего мутации посредством консервативных замен в его вариабельной области входят в объем настоящего изобретения, поскольку антитело сохраняет свои характеристики.

Антитело, связывающееся с эпитопом по настоящему изобретению, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, может быть получено способами, широко известными в области, к которой относится настоящее изобретение. Конкретно, антитело может быть получено путем инокуляции животному эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, комплекса, включающего данный эпитоп, или полинуклеотида, кодирующего данный эпитоп, и продуцирования и пэннинга антитела, специфически связывающегося с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, из инокулированного животного.

В этом случае, животное, предпочтительно, представляет собой животное, трансформированное с целью продукции антитела, имеющего такую же последовательность, как последовательность человека, в частности, трансформированную крысу. В данном случае, может быть получено полностью антитело человека, имеющее пониженную иммуногенность, с использованием трансформированной крысы в соответствии со способами, как описано в патентах

США 5569825; 5633425 и 7501552. Если животное не трансформировано для продукции антитела, имеющего такую же последовательность, как последовательность человека, может быть дополнительно осуществлена стадия гуманизации или деиммунизации антитела, полученного из животного, таким образом, что антитело становится

5 подходящим для лечебного использования в организме, как описано в способах патентов США 5225539; 5859205; 6632927; 5693762; 6054297 и 6407213; и WO 1998/52976.

Конкретно, стадия гуманизации или деиммунизации может включать стадию CDR-прививки для прививания последовательности CDR антитела, продуцируемого от животного в каркас (FR) антитела человека, и стадию блуждающей-CDR замены, вставки

10 или делеции по меньшей мере, одной аминокислотной последовательности, для дополнительного повышения аффинности или уменьшения иммуногенности.

Если непротессированный EGFR, отличный от эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную

15 последовательность SEQ ID NO: 3, комплекса, включающего данный эпитоп, или полинуклеотида, кодирующего данный эпитоп, используют в качестве иммуногена, можно также применять способ пэннинга антитела, включающий первоначальный пэннинг антител, способных к связыванию с EGFR, и пэннинг антитела, специфически распознающего эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

20 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, среди антител, первоначально подвергнутых пэннингу. В данном случае, можно также применять способ пэннинга антитела, включающий индуцирование мутаций в ключевом участке связывания эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность

25 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и пэннинг антител, которые потеряли или уменьшили активность связывания с EGFR вследствие мутаций в ключевом сайте связывания эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную

30 последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, среди антител, первоначально подвергнутых пэннингу, связывающихся с EGFR.

Также, антитело человека, связывающееся с эпитопом SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, может быть получено и подвергнуто пэннингу, с использованием технологии дисплея, широко известной в области, к которой относится настоящее изобретение. Эта

35 технология дисплея предпочтительно представляет собой по меньшей мере одну технологию, выбранную из группы, состоящей из технологий фагового дисплея, дисплея дрожжей, дисплея бактерий и дисплея рибосом, но, не ограничиваясь ими. Получение и дисплей библиотеки может быть легко осуществлен, как описано в патентах США

40 5733743; 7063943; 6172197; 6348315 и 6589741. В частности, библиотеку, используемую в дисплее, предпочтительно создают, чтобы иметь последовательность антитела, полученную от человека. В частности, способ отличается тем, что включает пэннинг только антител, специфически связывающихся с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, с использованием эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

45



2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, или комплекса, включающего данный эпитоп.

Наконец, настоящее изобретение относится к эпитопу, имеющему аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, к комплексу, включающему данный эпитоп, или к композиции для противоопухолевых вакцин, содержащей полинуклеотид, кодирующий данный эпитоп.

Настоящее изобретение будет описано более подробно посредством примеров вариантов осуществления, приведенных ниже. Однако следует отметить, что подробное описание и конкретные примеры, указывающие на предпочтительные варианты осуществления изобретения, являются только иллюстративными, так как различные изменения и модификации в пределах объема изобретения будут понятны специалистам в данной области из этого подробного описания.

#### Пример 1: Идентификация структуры связывания EGFR и Fab GC1118

Для идентификации структуры связывания EGFR с антиген-связывающим фрагментом (Fab) GC1118 (см. KR 10-2011-0034914 A), разработанной группой исследователей настоящего изобретения, получали данные рентгеновской дифракции кристаллической структуры композита EGFR/GC1118 Fab с использованием лучевой линии BL26B2 (Spring-8 Institution, Япония), которые индексировали и масштабировали, используя программное обеспечение HKL2000 (HKL Research Inc., США), и затем получали раннюю карту электронной плотности композита EGFR/GC1118, применяя метод молекулярной замены (MR). Для использования метода MR, были необходимы данные по 3D-структуре белка, имеющего структуру, аналогичную структуре композита EGFR/мишеневое антитело. В этом случае, структуру композита EGFR/цетуксимаб (PDB ID: IYY9) использовали в качестве структуры для композита EGFR/GC1118. Информацию по ранней фазе композита EGFR/GC1118 получали, используя программу Morlep (<http://www.ysbl.york.ac.uk/~alexei/morlep.html>), и задание построения модели осуществляли, используя кристаллографический объект-ориентированный набор инструментов (COOT: <http://www.biop.ox.ac.uk/coot/>), на основании полученной информации о ранней фазе. Затем задание по уточнению выполняли с использованием программного обеспечения Refmac5 (<http://www.ccp4.ac.uk/html/refmac5.html>) и программного обеспечения на базе Питон для иерархического окружения для интегрированной рентгеновской кристаллографии (PHENIX: <http://www.phenix-online.org/>).

В результате, было показано, что эпитоп EGFR GC1118 был расположен в 3 домене EGFR, и, в частности, эпитоп представлял собой область короткой петли в 3 домене, которая состоит из 9 аминокислотных остатков от 353 до 361 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности (см. SEQ ID NO: 1 и фиг. 1). Эта область петли выступает наружу, и она окружена CDR антитела. В частности, аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в связывании между GC1118 и EGFR, представляют собой F357 и H359 EGFR. Два аминокислотных остатка окружены аминокислотными остатками области CDR антитела GC1118 и функционируют с образованием гидрофобных связей и водородных связей с аминокислотными остатками области CDR, для плотного поддержания связывания между EGFR и GC1118. R353 также способствует дополнительному связыванию с антителом через ионные связи с вариабельной областью (VH) тяжелой цепи антитела GC1118 (см. фиг. 1).

В то же время, область, с которой связывается EGF, расположена между 1 и 3 доменами EGFR. В этом случае, EGF сначала связывается с 1 доменом EGFR (см. фиг.

2) для индукции структурного изменения домена EGFR, и затем связывается с 3 доменом EGFR (см. фиг. 3). В этом случае, важным аминокислотным остатком EGFR, участвующим в связывании с EGF, является D3555 3 домена (Ferguson et al., Molecular Cell, 2003, 11:507-517). В этом случае, аминокислотный остаток присутствует в петле, содержащей R353, F357 и H359, которые являются эпитопами GC1118. То есть, поскольку эпитопы EGFR, с которыми связывается GC1118, присутствуют в той же самой области, что и область, с которой связывается EGF, причем связывание антитела с эпитопами GC1118 может напрямую ингибировать связывание EGF с 3 доменом EGFR. Это дополнительно подтверждается при сравнении со структурой EGFR, связанной с EGF. Соответственно, если структура EGFR, активированная через связывание с EGF, перекрывает структуру GC1118, можно видеть, что область VH GC1118 и EGF перекрываются друг с другом (см. фиг. 3).

При сравнении со связыванием используемого в настоящее время цетуксимаба с EGFR, цетуксимаб имеет эпитопы, расположенные в 3 домене EGFR, но участки связывания цетуксимаба были широко разбросаны на поверхности 3 домена. Следовательно, некоторые из эпитопов имели опосредованное влияние на связывание EGF (см. фиг. 4A). Матузумаб, который является еще одним антителом, также имело эпитопы, расположенные в 3 домене EGFR, но эпитопы матузумаба присутствовали в положениях, отличающихся от положений эпитопов в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенным в качестве примера, и расположены в области, отличной от области, с которой был связан EGF, так что эпитопы матузумаба не обладали способностью напрямую затруднять связывание EGF (см. фиг. 4B).

Пример 2: Верификация эпитопов EGFR GC1118 с использованием способа экспрессии поверхности дрожжевых клеток

Для верификации эпитопов (аминокислотных остатков R353, F357 и H359) EGFR против GC1118, обнаруженных посредством структурной модели, соответствующие аминокислотные остатки замещали глицином, не обладающим реакционной способностью связывания, чтобы продуцировать варианты, и затем экспрессировали их на поверхностях дрожжевых клеток. Затем связывание GC1118 с вариантами EGFR, в которых эпитопы были экспрессированы на поверхностях дрожжевых клеток, подтверждали при использовании проточной цитометрии (BD FACS Calibur™, США). В результате, было подтверждено, что активность связывания с GC1118 снижалась у всех вариантов EGFR.

## 2.1 Конструирование вариантов EGFR

Варианты EGFR конструировали посредством замены одного или более из R353, F357 и H359 аминокислотной последовательности EGFR (см. SEQ ID NO: 1) на глицин, с использованием метода перекрывающей ПЦР, в котором генную последовательность, кодирующую внеклеточный домен EGFR человека, использовали в качестве матрицы. Результаты приведены в следующей таблице 1.

Таблица 1				
Варианты EGFR, замещенные глицином (Gly)				
Варианты EGFR	Аминокислотное замещение	Подробности		
		Положение	Перед замещением	После замещения
Вариант 1	R353G	353	Arg	Gly
Вариант 2	F357G	357	Phe	Gly
Вариант 3	H359G	359	His	Gly
Вариант 4	R353G+F357G	353	Arg	Gly
		357	Phe	Gly

5	Вариант 5	F357G+H359G	357	Phe	Gly
			359	His	Gly
	Вариант 6	R353G+H359G	353	Arg	Gly
			359	His	Gly
	Вариант 7	R353G+F357G+H359G	353	Arg	Gly
			357	Phe	Gly
			359	His	Gly

### 2.1.1 Реакция ПЦР для синтеза вариантов EGFR

Два генных фрагмента (приблизительно 1150 п.о. и 720 п.о.), обычно включающие каждый из вариантов EGFR, синтезировали путем осуществления реакции ПЦР с использованием набора AccuPower™ TLA PCR PreMix (Bioneer, Корея), включающего генную последовательность EGFR человека в качестве матрицы, и набора праймеров (см. таблицу 2), сконструированных для индуцирования мутации гена EGFR. Два синтезированных генных фрагмента подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, и ДНК каждого из генных фрагментов очищали, используя набор Qiagen (Qiagen 28706, Германия). Последовательно, осуществляли перекрывающую реакцию ПЦР, используя ДНК набора из двух очищенных генных фрагментов в качестве одной матрицы и праймеры, имеющие аминокислотные последовательности, как показано в SEQ ID NO: 4-19 (см. таблицу 2), синтезируя, таким образом, конечные варианты генов EGFR (см. фиг. 5). Синтезированные гены расщепляли, используя ферменты рестрикции NheI/MluI (New England Biolabs, США). Термин “прямой” после названий праймеров, как приведено в таблице 2, представляет прямой праймер, и термин “обратный” представляет обратный праймер.

Таблица 2				
Праймеры, использованные в реакции ПЦР для конструирования вариантов EGFR				
Название праймера	Мишеневые варианты	Последовательность		SEQ ID NO
pCTCON-прямой	Контроль	5'-CGGCTAGCCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGC-3'		4
pCTCON-обратный		5'-CGACGCGTTGGACGGGATCTTAGGCCCC-3'		5
R353G-прямой	Вариант 1	5'-CTGCCCGGTGGCATTTGGCGGTGACTCCTTCACA-3'		6
R353G-обратный		5'-TGTGAAGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'		7
F357G-прямой	Вариант 2	5'-TTTAGGGGTGACTCCGGCACACATACTCCTCCT-3'		8
F357G-обратный		5'-AGGAGGAGTATGTGTGCCGGAGTCACCCCTAAA-3'		9
H359G-прямой	Вариант 3	5'-GGTGACTCCTTCACAGGCACTCCTCCTCTGGAC-3'		10
H359G-обратный		5'-GTCCAGAGGAGGAGTGCCTGTGAAGGAGTCACC-3'		11
R353G, F357G-прямой	Вариант 4	5'-CTGCCCGGTGGCATTTGGCGGTGACTCCGGGACACATACTCCTCCT-3'		12
R353G, F357G-обратный		5'-AGGAGGAGTATGTGTCCCGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'		13
F357G, H359G-прямой	Вариант 5	5'-TTTAGGGGTGACTCCGGCACAGGGACTCCTCCTCTGGAC-3'		14
F357G, H359G-обратный		5'-GTCCAGAGGAGGAGTCCCTGTGCCGGAGTCACCCCTAAA-3'		15
R353G, H359G-прямой	Вариант 6	5'-CTGCCCGGTGGCATTTGGCGGTGACTCCTTCACAGGACTCCTCCTCTGGAC-3'		16
R353G, H359G-обратный		5'-GTCCAGAGGAGGAGTACCTGTGAAGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'		17
R353G, F357G, H359G-прямой	Вариант 7	5'-CTGCCCGGTGGCATTTGGCGGTGACTCCGGAACAGGACTCCTCCTCTGGAC-3'		18
R353G, F357G, H359G-обратный		5'-GTCCAGAGGAGGAGTACCTGTTCGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'		19

### 2.1.2 Лигирование и трансформация вариантов EGFR

Вектор экспрессии дрожжевой поверхности рСТCON (Boder, E.T. et al., Nat Biotechnol. 1997, 15(6): 553-7) расщепляли с использованием ферментов рестрикции *NheI/MluI*, подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле и очищали, используя набор Qiagen. ДНК вариантов EGFR, полученных в примере 2.1.1, смешивали с рСТCON, и к ним добавляли ДНК-лигазу T4 (New England Biolabs, США), и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. Лигирующую смесь трансформировали с помощью XL1-голубых клеток *E. coli* (Stratagene, США) посредством электропорации с использованием Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и инкубировали в течение часа в целом в 2 мл среды. Затем трансформированные клетки распределяли в планшет с LB-агаром, дополненным карбенициллином (Sigma, США). Далее клетки инкубировали в течение ночи при 37°C.

### 2.1.3 Секвенирование оснований вариантов EGFR

Колонии на планшете, культивированные в примере 2.1.2, инкубировали в течение ночи в 2 мл LB-среды, дополненной 50 мкг/мл карбенициллина, и рекомбинантную плазмиду затем отделяли, используя плазмидный мини-набор Qiagen (Qiagen 27106, Германия) для определения последовательностей оснований ДНК вариантов EGFR, введенных в плазмиду. Праймеры, имеющие последовательности, как показано в SEQ ID NO: 20-22, использовали в качестве секвенирующих праймеров, используемых для секвенирования оснований (см. таблицу 3), и секвенирование оснований осуществляли и анализировали в Genotech Corporation (Тэджон, Республика Корея) в соответствии с известным методом. Последовательность оснований EGFR человека использовали в качестве контроля. После того, как были определены последовательности оснований ДНК вариантов EGFR, определенные последовательности оснований ДНК транслировали в аминокислотные последовательности с использованием веб-программы (www.exPASy.org: DNA to Protein translate tool), которая транслирует последовательность оснований в аминокислотную последовательность. Результаты трансляции показаны на фиг. 6. Затем подтверждали, что все из вариантных генов EGFR, приведенных в таблице 1, были корректно введены в векторы рСТCON.

Таблица 3		
Праймеры, использованные в реакции секвенирования		
Типы праймеров	Последовательность	SEQ ID NO
seq-F1	5'-ATGAAGGTTTGTATTGTCTGTGG	20
seq-F1	5'-CCAGTGACTGCTGCCACAACCACTG	21
seq-F1	5'-CGTCGGCCTGAACATAACATCCTTG	22

## 2.2. Анализ экспрессии вариантов EGFR на поверхностях дрожжевых клеток и связывания с антителом

### 2.2.1 Методика экспрессирования вариантов EGFR на поверхностях дрожжевых клеток

Штамм дрожжей EBY100 (*S. cerevisiae*) трансформировали с помощью рСТCON-EGFR, верифицированного в примере 2.1, с использованием Gene Pulser от Bio-Rad Laboratories, Inc. (фиг. 1). Трансформированные колонии инкубировали при 30°C в течение 20 часов в среде для селекции, жидкой среде SD-CAA (20 г/л глюкозы, 6,7 г/л дрожжевого азотного основания без аминокислот, 5,4 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,6 г/л NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O и 5 г/л казаминокислот). Затем экспрессию варианта EGFR на поверхностях дрожжевых клеток индуцировали инкубацией трансформированных колоний при 30°C в течение 20 часов в среде для селекции, жидкой среде SD-CAA (20 г/л галактозы, 6,7 г/л дрожжевого азотного основания без аминокислот, 5,4 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,6 г/л NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

и 5 г/л казаминокислот).

## 2.2.2 Определение экспрессии вариантов EGFR на поверхностях дрожжевых клеток

Экспрессию вариантов EGFR на поверхностях дрожжевых клеток подтверждали с использованием BD FACS Calibur™ (Becto Dickinson). Дрожжевые клетки,

экспрессированные при плотности, равной приблизительно  $1 \times 10^7$  клеток/мл, подвергали взаимодействию с анти-с-мус 9E10 mAb (разведение 1:1000) в 0,1 мл забуференного фосфатом физраствора (PBSB, включающем 1 мг/мл BSA; pH 7,4) (при 25°C в течение 30 минут), и промывали PBSB. Дрожжевые клетки вторично подвергали взаимодействию с козьими антителами против мышиных IgG, конъюгированными с R-фикоэритрином (разведение 1:25) на льду в течение 15 минут, промывали PBSB и затем анализировали с использованием BD FACS Calibur™. Из результатов анализа видно, что варианты EGFR хорошо экспрессировались на поверхностях дрожжевых клеток (см. фиг. 7).

## 2.2.3 Анализ связывания между вариантами EGFR и GC1118 с использованием проточной цитометрии

Связывание между GC1118 и вариантами EGFR, экспрессированными на поверхностях дрожжевых клеток, подтверждали с использованием BD FACS Calibur™ (Becto Dickinson). В качестве контрольного антитела использовали цетуксимаб. Дрожжевые клетки,

экспрессированные при плотности, равной приблизительно  $1 \times 10^7$  клеток/мл, подвергали взаимодействию с 1 мкг каждого из антител в 0,1 мл PBSB (включающем 1 мг/мл BSA; pH 7,4) (при 25°C в течение 30 минут) и промывали PBSB. Дрожжевые клетки вторично подвергали взаимодействию с антителами против IgG человека, конъюгированными с FITC (разведение 1:50) на льду в течение 15 минут, промывали PBSB, и затем измеряли среднюю интенсивность флуоресценции с использованием BD FACS Calibur™. Результаты измерений приведены в таблице 4 и показаны на фиг. 8. Как видно из таблицы 4, было доказано, что связывание GC1118 ингибировалось у вариантов EGFR, в которых эпитопы (R353, F357 и H359, в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенным в качестве примера, посредством структурного анализа) были замещены глицином, и, таким образом, замененные аминокислотные остатки представляли собой эпитопы GC1118.

Таблица 4			
Связывание антагониста с вариантами EGFR			
Варианты EGFR	Уровень экспрессии (%)	Активность связывания антагониста (%)	
		GC1118	Цетуксимаб
EGFR (дикий тип)	100	100	100
Вариант 1 (R353G)	66,5	30,4	23,8
Вариант 2 (F357G)	91,3	26,1	88,3
Вариант 3 (H359G)	89,3	34,1	82,9
Вариант 4 (R353G+F357G)	71,4	14,1	34,8
Вариант 5 (F357G+H359G)	74,4	15	77,3
Вариант 6 (R353G+H359G)	68	13,7	35,2
Вариант 7 (R353G+F357G+H359G)	69,2	13,61	42,6

## Пример 3: Анализ конкурентного связывания GC1118 и лигандов с EGFR

Для определения, имеют ли GC1118 и шесть лигандов, приведенных в таблице 5, идентичные или сходные участки связывания для EGFR, осуществляли тест на конкурентное связывание. В качестве контрольного антитела использовали цетуксимаб. Сначала, предварительную концентрацию антитела (1,5 нМ) и различные концентрации лиганда подвергали взаимодействию на планшете, покрытом 2 мкг/мл EGFR. В этом случае, лиганд присутствовал в концентрации таким образом, что молярное отношение

антитела и лиганда количественно составляло 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> и 1:10<sup>5</sup>.

Полученной в результате смеси давали взаимодействовать при комнатной температуре в течение 30 минут, и затем ее промывали пять раз PBST (включающим 0,05% Твин 20; рН 7,4). Затем смесь вторично подвергали взаимодействию с антителами против IgG человека (Fc-специфичными), конъюгированными с пероксидазой (Sigma A0170, США), при комнатной температуре в течение 30 минут, и затем ее промывали пять раз PBST. Последовательно, к каждой лунке добавляли 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) субстрата пероксидазы для микропланшетов (KPL 50-76-03 США), и затем измеряли значения ОП (оптической плотности) при 405 нм. Было отмечено, что два реагирующих компонента (антитело и лиганд) конкурировали друг с другом, если способность к связыванию GC1118 с EGFR снижалась при возрастающей концентрации лиганда, указывая на то, что два реагирующих компонента имели идентичные эпитопы с EGFR, или имели очень близкое совпадение. Конкуренция между антителом и лигандами показана на фиг. 9 и приведена в таблице 6. В результате можно видеть, что GC1118 имеет превосходящую способность к ингибированию связывания EGF, TGF- $\alpha$ , BTC, EPR и HB-EGF по сравнению с цетуксимабом.

Таблица 5	
Использованные лиганды EGFR	
Лиганды EGFR человека	Подробности
EGF	Эпидермальный фактор роста
TGF- $\alpha$	Трансформирующий фактор роста- $\alpha$
AR	Амфирегулин
BTC	$\beta$ -Целлюлин
EPR	Эпирегулин
HB-EGF	Гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста

Таблица 6				
Способность конкурентного связывания лигандов EGFR с GC1118				
	Антитело		Связывание (%)	
	GC1118		Цетуксимаб	
Антитело:лиганд (молярное соотношение)	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>
EGF	30,2	15,2	61,8	22,5
TGF- $\alpha$	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

**Пример 4: Ингибирующий эффект на пролиферацию клеток, индуцируемую лигандами EGFR**

Для сравнения ингибирующего эффекта GC1118 настоящего изобретения и цетуксимаба на пролиферацию раковых клеток, индуцируемую лигандами EGFR, клеточную линию колоректального рака, LS174T (ATCC, CL-188), распределяли в 96-луночном микропланшете (Nunc) таким образом, чтобы количество клеток количественно составляло 3000 клеток/лунка. Через один день, культуральную среду удаляли, и культуральные среды, не включающие бычьего сывороточного альбумина, обрабатывали GC1118 и контрольным антителом, цетуксимаб, при концентрациях, равных 0,1, 1 и 10 мкг/мл. В то же самое время, если проводили обработку антителами, культуральную среду обрабатывали лигандами EGFR по типу при концентрациях (EGF: 50 нг/мл, TGF- $\alpha$ : 100 нг/мл, амфирегулин: 100 нг/мл, эпирегулин: 300 нг/мл, HB-EGF: 50

нг/мл и  $\beta$ -целлюлин: 100 нг/мл), и затем инкубировали при 37°C в течение 3 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для измерения уровня пролиферации раковых клеток через 3 дня, к раковым клеткам, инкубированным в 96-луночной планшете, добавляли 40 мкл раствора MTS (CellTiter 96 Aqueous One solution Reagent, Promega), реакцию осуществляли при 37°C в течение 3 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, и затем измеряли значения ОП при 490 нм.

В результате, можно видеть, что GC1118 намного более эффективно ингибировало пролиферацию раковых клеток, индуцированную лигандами EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF и BTC, по сравнению с цетуксимабом, что указывает на соответствие этих результатов результатам примера 3.

Исходя из полученных результатов, было продемонстрировано, что антитела, имеющие эпитопы, в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, показали превосходящий ингибирующий эффект на пролиферацию клеток, поскольку антитела имели различные эпитопы с цетуксимабом и, таким образом, обладали способностью ингибировать связывание лиганда (см. фиг. 10). В частности, антитела, связывающиеся с эпитопами, в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенного в качестве примера, способны к применению для лечения различных заболеваний, таких как рак, развивающийся при активации EGFR благодаря связыванию не только с EGF, но также других лигандов EGFR, поскольку антитела эффективно ингибируют связывание различных лигандов EGFR, таких как, но, не ограничиваясь ими, EGF, а также TGF- $\alpha$ , AR, BTC, EPR и HB-EGF с EGFR.

#### ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

Эпитопы EGFR, предоставленные в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенном в качестве примера, являются высококонсервативными и расположены в домене, тесно связанном со связыванием с EGF. Следовательно, композиции, содержащие антитела против эпитопов, или композиции вакцин, содержащих эпитопы, могут эффективно блокировать передачу сигналов, вызванную связыванием EGF и EGFR, и, таким образом, могут иметь важное значение при использовании для лечения различных заболеваний, таких как злокачественные новообразования.

#### (57) Формула изобретения

1. Эпитоп рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), имеющий аминокислотную последовательность RGDSFTH (SEQ ID NO: 2) или аминокислотную последовательность RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3).

2. Эпитоп по п.1, который имеет аминокислотную последовательность RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3).

3. Комплекс для лечения злокачественного новообразования, связанного с активацией EGFR, содержащий эпитоп по п.1 или 2, который связан с носителем, где носитель представляет собой по меньшей мере один носитель, выбранный из группы, состоящей из пептида, сывороточного альбумина, иммуноглобулина, гемоцианина и полисахарида.

4. Полинуклеотид, кодирующий эпитоп по п.1 или 2.

5. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.4.

6. Рекомбинантный вектор по п.5, который содержит промотор, индуцирующий экспрессию эпитопа на поверхности клетки микроорганизма или вируса, или нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный белок.

7. Рекомбинантный микроорганизм для получения эпитопа по п.1 или 2, трансформированный рекомбинантным вектором по п.5 или 6.

8. Рекомбинантный микроорганизм по п.7, который выбран из группы, состоящей из рекомбинантной E. coli и рекомбинантных дрожжей.

9. Рекомбинантный вирус для получения эпитопа по п.1 или 2, трансформированный рекомбинантным вектором по п.5 или 6.

5 10. Рекомбинантный вирус по п.9, который представляет собой рекомбинантный бактериофаг.

11. Способ получения эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, включающий культивирование рекомбинантного микроорганизма или по п.7 или 8; и  
10 выделение и очистку указанного эпитопа из культуральной среды.

12. Способ получения антитела или его фрагмента с использованием эпитопа, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент специфически связываются с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, при этом используется эпитоп,  
15 имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; комплекс по п.3, рекомбинантный вектор экспрессии по п.5, рекомбинантный микроорганизм по п.7 или 8, или рекомбинантный вирус по п.9 или 10.

13. Способ по п.12, где антитело представляет собой поликлональное антитело или  
20 моноклональное антитело.

14. Способ по п.12, который включает стадии:  
введения животному, не являющемуся человеком, эпитопа, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; комплекса по п.3, рекомбинантного вектора  
25 экспрессии по п.5, рекомбинантного микроорганизма по п.7 или 8, или рекомбинантного вируса по п.9 или 10; и

пэннинга антитела, специфически связывающегося с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, из животного, не являющегося человеком.

30 15. Способ по п.14, который дополнительно включает стадию осуществления гуманизации или деиммунизации.

16. Способ по п.15, где гуманизация включает прививку последовательности CDR антитела, полученного из животного к каркасу (FR) антитела человека.

35 17. Способ по п.16, который дополнительно включает стадию осуществления замены, введения или делеции по меньшей мере одной аминокислоты для улучшения аффинности или снижения иммуногенности.

18. Способ по п.14, где животное представляет собой трансгенное животное, которое может продуцировать антитело, имеющее аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности антитела человека.

40 19. Способ по п.18, где трансгенное животное представляет собой трансгенную мышь.

20. Способ по п.12, в котором используют технологию дисплея.

21. Способ по п.20, где технология дисплея представляет собой по меньшей мере одну технологию, выбранную из группы, состоящей из фагового дисплея, дисплея  
45 бактерий и дисплея рибосом.

22. Способ по п.20 или 21, где в дисплее используют библиотеку, сконструированную так, что она содержит последовательность антитела, происходящего от человека.

23. Способ по п.20 или 21, который включает пэннинг антитела, специфически



связывающегося с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, используя эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, или комплекс по п.3.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Green Cross Corporation  
 Mogam Biotechnology Research Institute

<120> Эпитопы поверхностного антигена рецептора эпидермального фактора роста и их применение

<130> PP-1202

<150> 61/616,073  
 <151> 2012-03-27

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1  
 <211> 621  
 <212> PRT  
 <213> человеческий

<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  
 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  
<212> PRT  
<213> человеческий

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

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> человеческий

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

<210> 4  
<211> 29  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> pCTCON-Прямой

<400> 4  
cggctagcct ggaggaag aaagtttgc 29

<210> 5  
<211> 27  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> pCTCON-Обратный

<400> 5  
cgacgcgttg gacgggatct taggccc 27

<210> 6  
<211> 33  
<212> ДНК

4

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; R353G-Прямой

&lt;400&gt; 6

ctgccggtgg catttggcgg tgactccttc aca

33

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; R353G-Обратный

&lt;400&gt; 7

tgtgaaggag tcaccgcaa atgccaccgg cag

33

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; F357G-Прямой

&lt;400&gt; 8

tttaggggtg actccggcac acatactcct cct

33

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; F357G-Обратный

&lt;400&gt; 9

aggaggagta tgtgtgccgg agtcaccctt aaa

33

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; H359G-Прямой

&lt;400&gt; 10

ggtgactcct tcacaggcac tcctcctctg gac

33

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 33

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> H359G-Обратный  
  
 <400> 11  
 gtccagagga ggagtgcctg tgaaggagtc acc 33  
  
 <210> 12  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> R353G, F357G-Прямой  
  
 <400> 12  
 ctgccggtgg catttggcgg tgactccggg acacatactc ctccct 45  
  
 <210> 13  
 <211> 45  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> R353G, F357G-Обратный  
  
 <400> 13  
 aggaggagta tgtgtcccg agtcaccgcc aaatgccacc ggcag 45  
  
 <210> 14  
 <211> 39  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> F357G, H359G-Прямой  
  
 <400> 14  
 tttaggggtg actccggcac agggactcct cctctggac 39  
  
 <210> 15  
 <211> 39  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> F357G, H359G-Обратный  
  
 <400> 15  
 gtccagagga ggagtccctg tgccggagtc acccctaаа 39  
  
 <210> 16

<211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> R353G, H359G-Прямой  
  
  
 <400> 16  
 ctgccggtgg catttggcgg tgactccttc acaggtactc ctcctctgga c 51  
  
  
 <210> 17  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> R353G, H359G-Обратный  
  
  
 <400> 17  
 gtccagagga ggagtacctg tgaaggagtc accgccaaat gccaccggca g 51  
  
  
 <210> 18  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> R353G, F357G, H359G-Прямой  
  
  
 <400> 18  
 ctgccggtgg catttggcgg tgactccgga acaggtactc ctcctctgga c 51  
  
  
 <210> 19  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> R353G, F357G, H359G-Обратный  
  
  
 <400> 19  
 gtccagagga ggagtacctg ttccggagtc accgccaaat gccaccggca g 51  
  
  
 <210> 20  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> seq-F1  
  
  
 <400> 20  
 atgaaggttt tgattgtctt gttgg 25

<210> 21  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> seq-F1

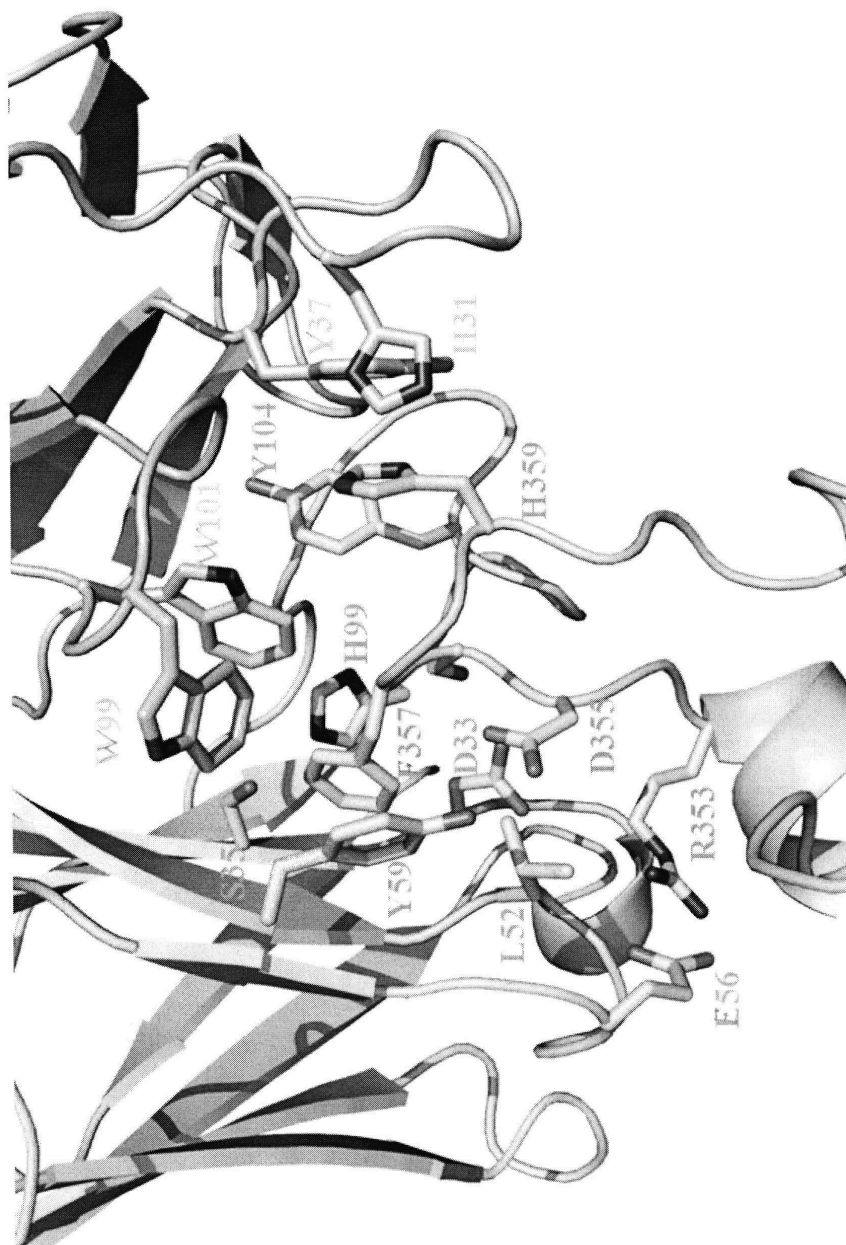
<400> 21  
ccagtgactg ctgccacaac cagtg 25

<210> 22  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> seq-F1

<400> 22  
cgtcggcctg aacataacat ccttg 25





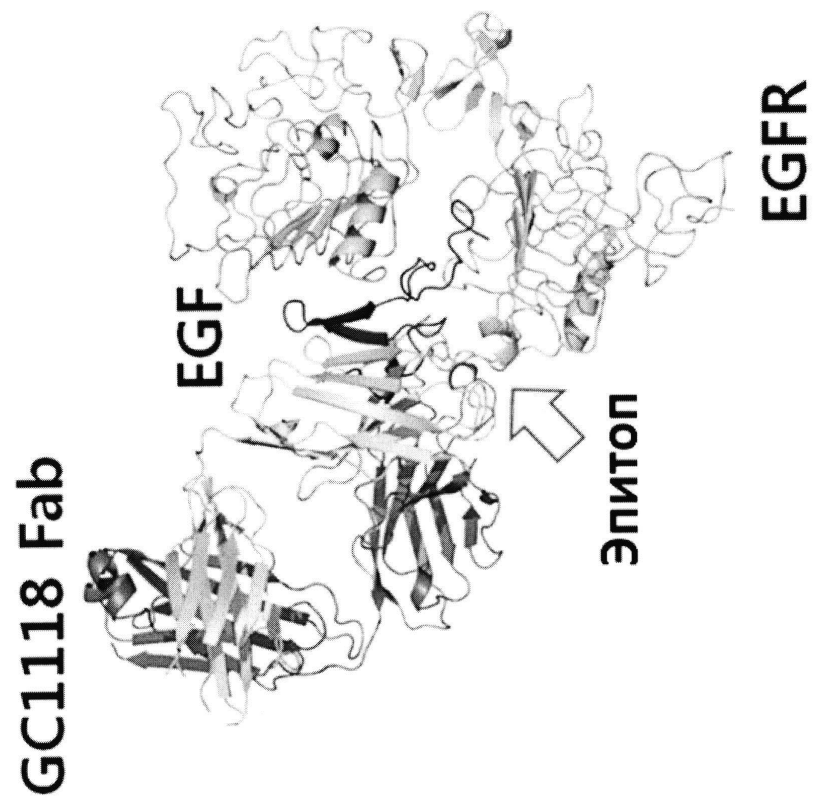
ФИГ. 1

2/11



ФИГ. 2

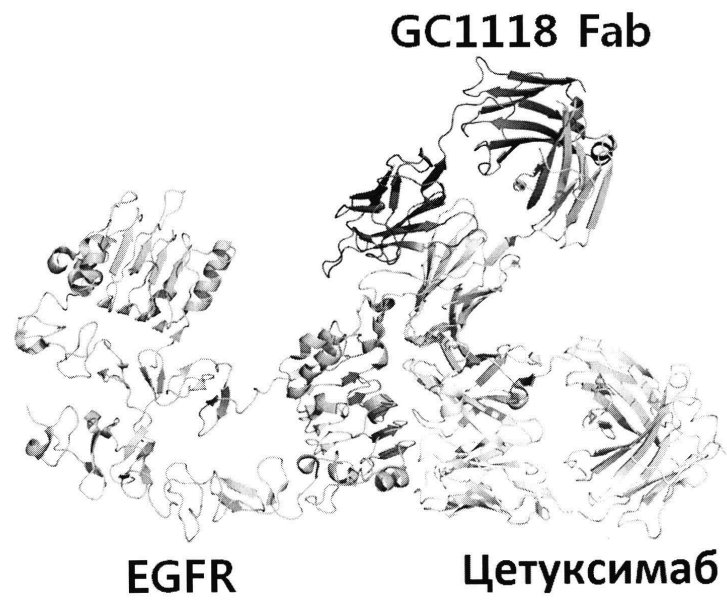
3/11



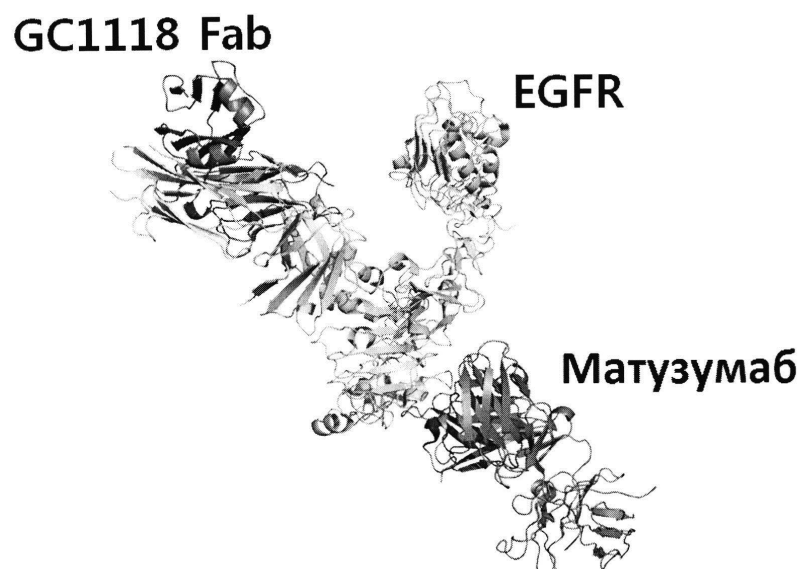
ФИГ. 3

4/11

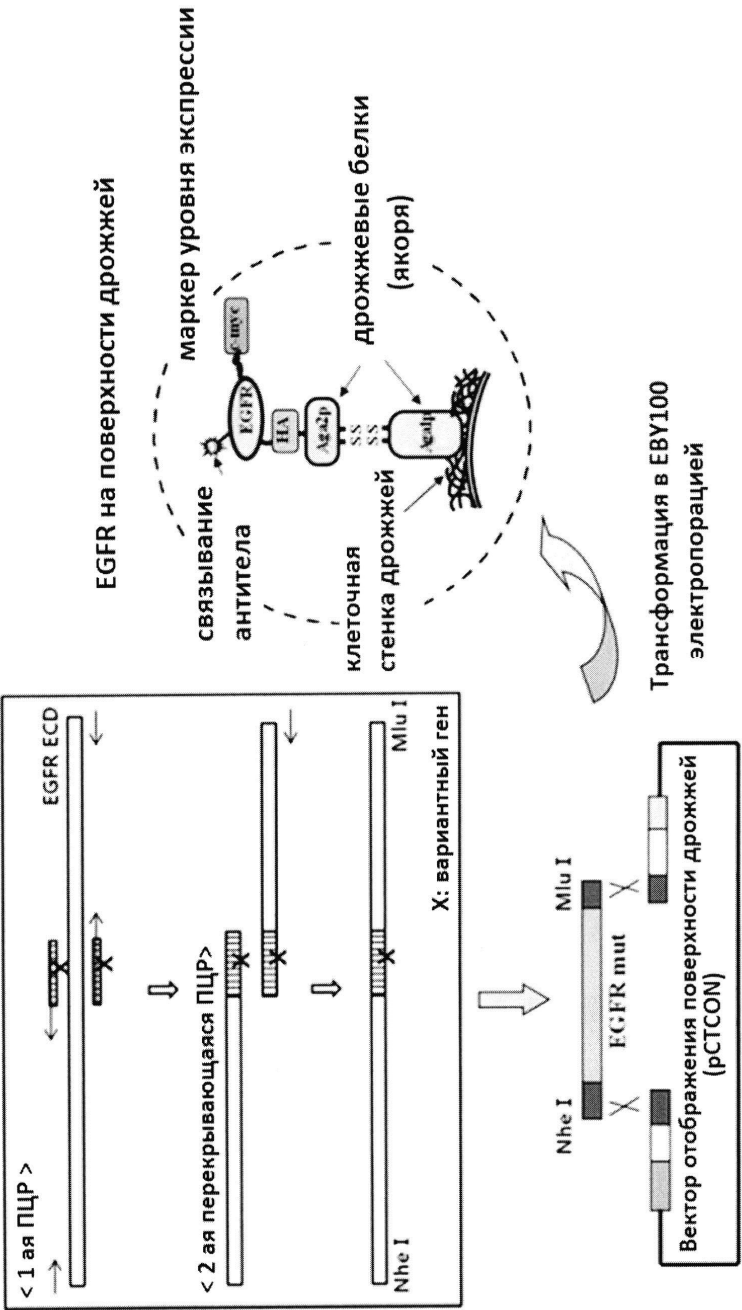
(A)



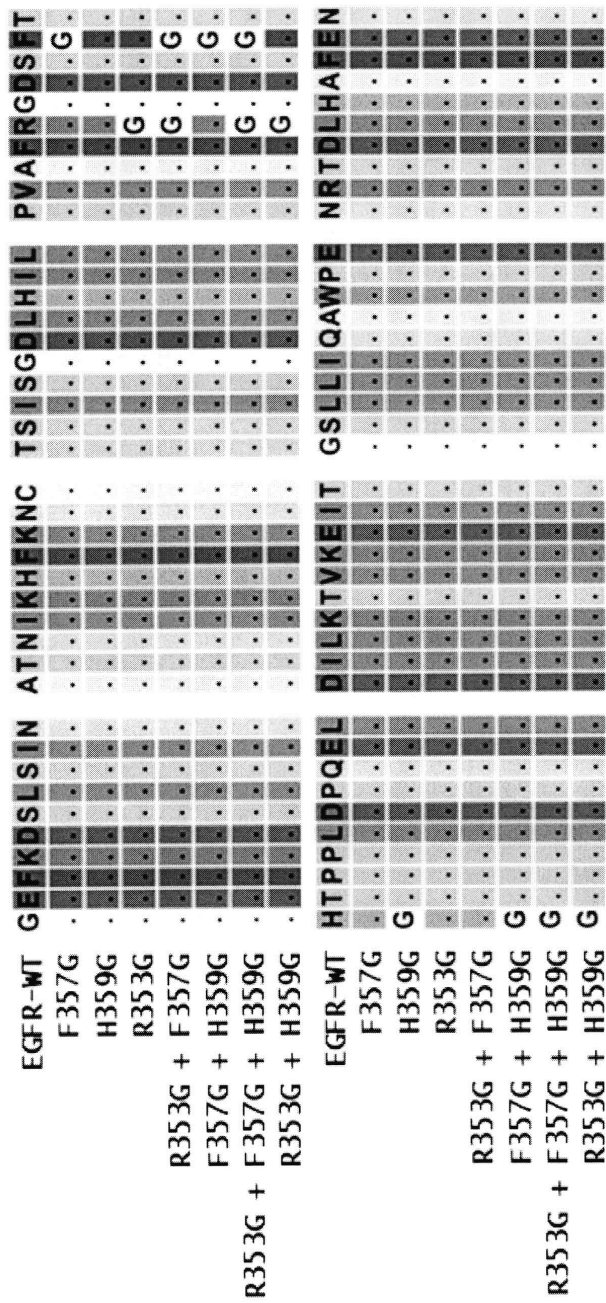
(B)



ФИГ. 4

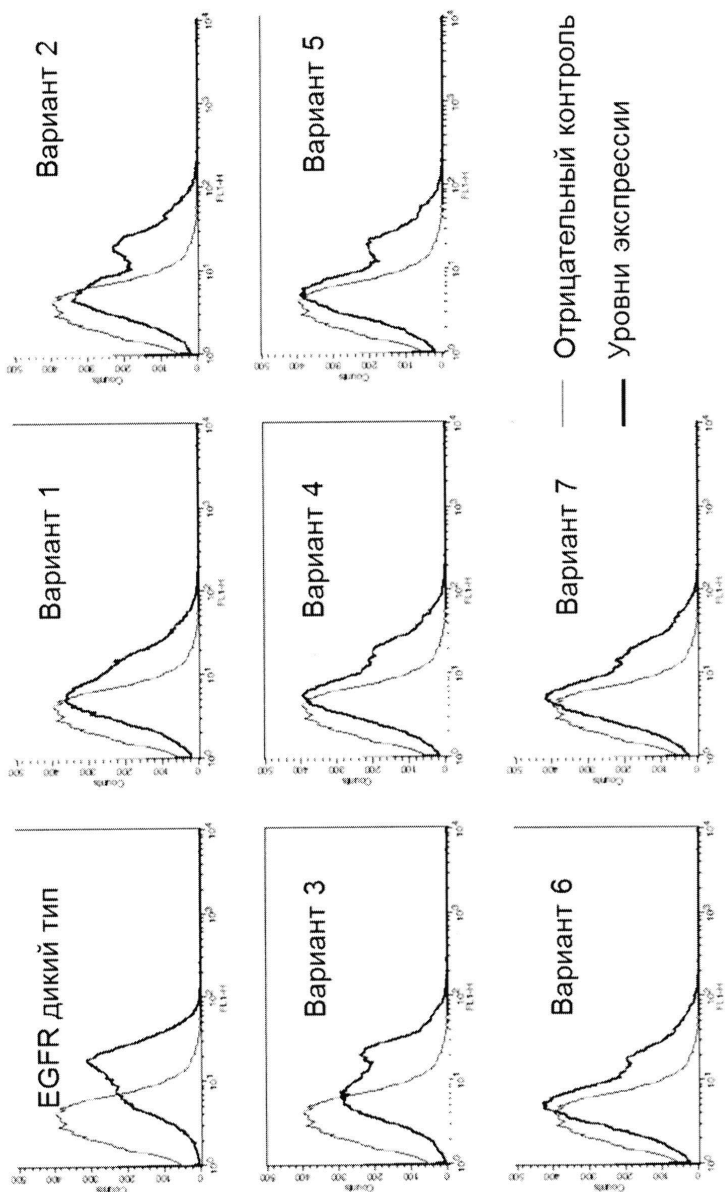


ФИГ. 5



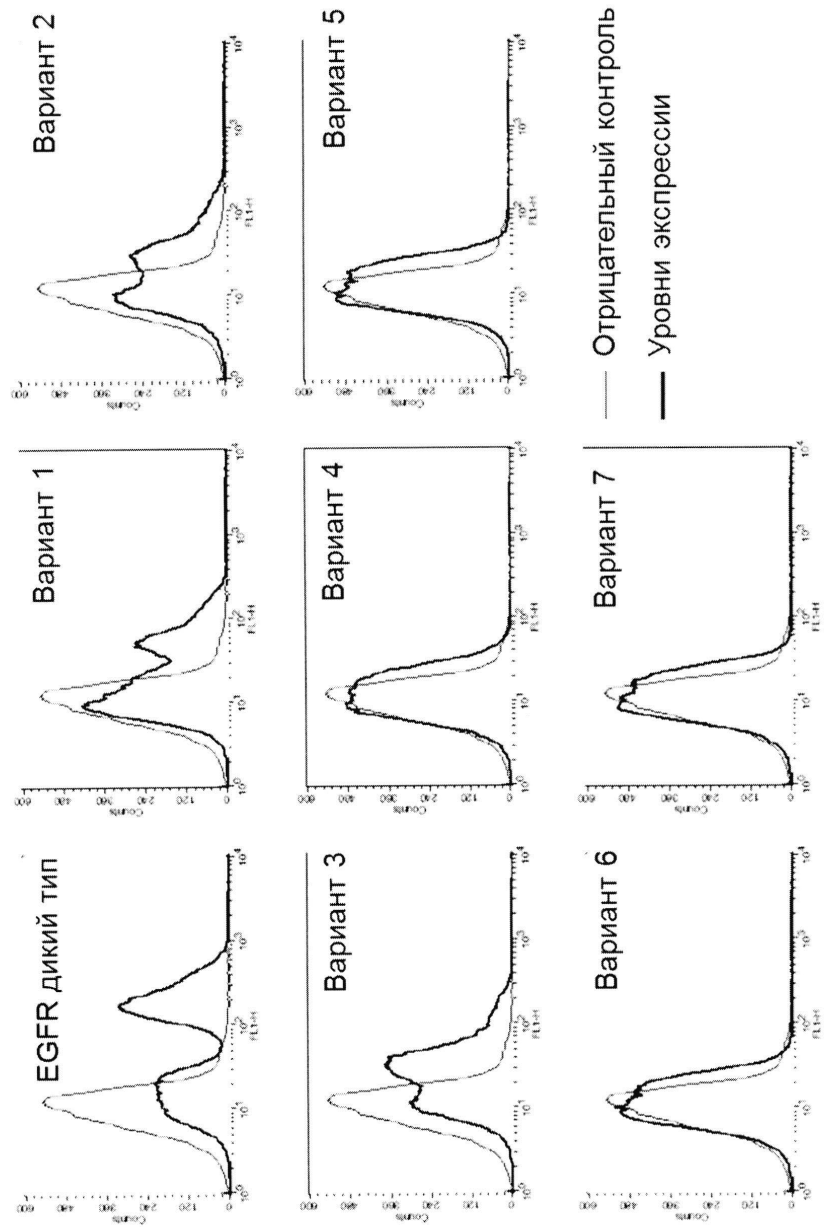
ФИГ. 6

Скорость экспрессии вариантов EGFR



ФИГ. 7

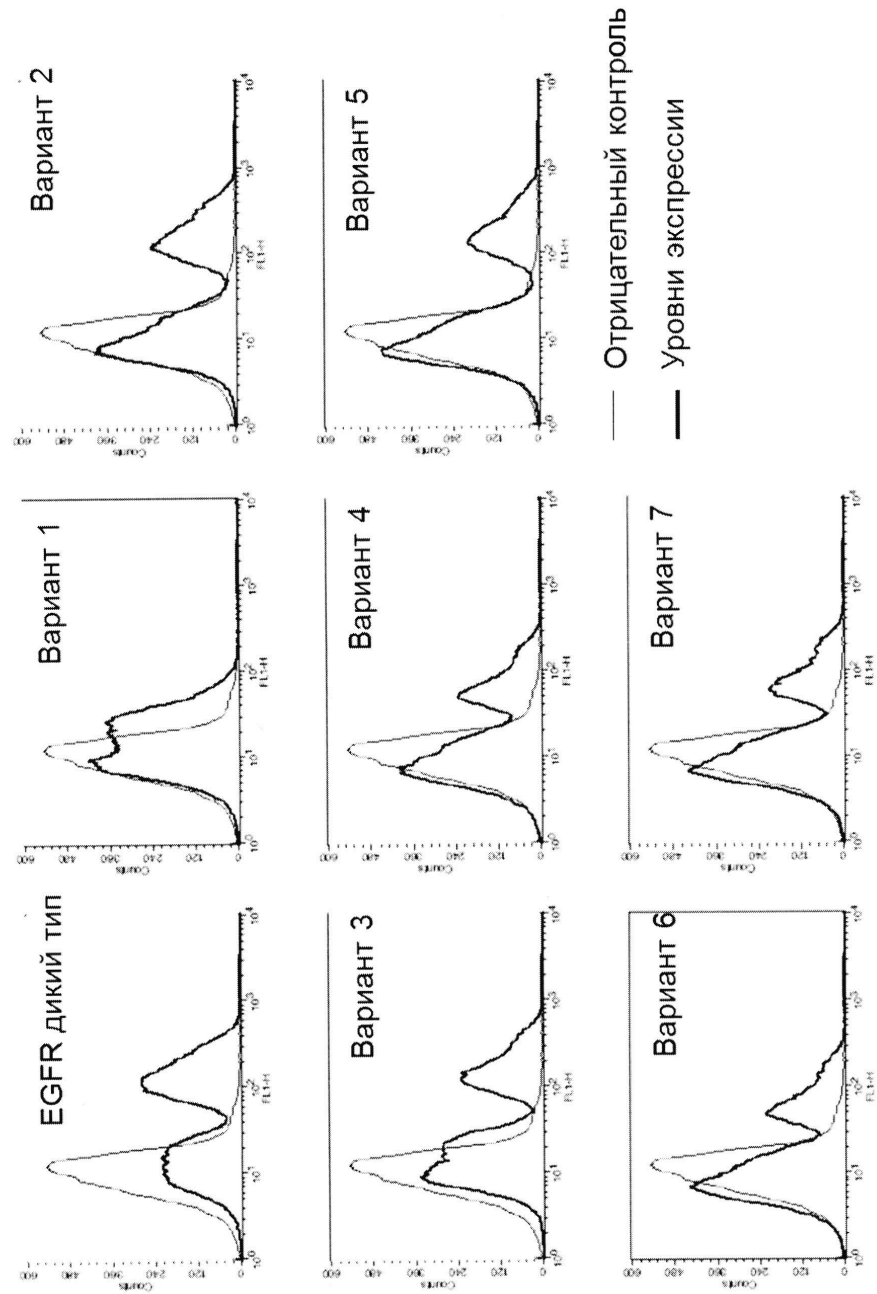
Активность связывания GC118 с вариантами EGFR



ФИГ. 8(А)

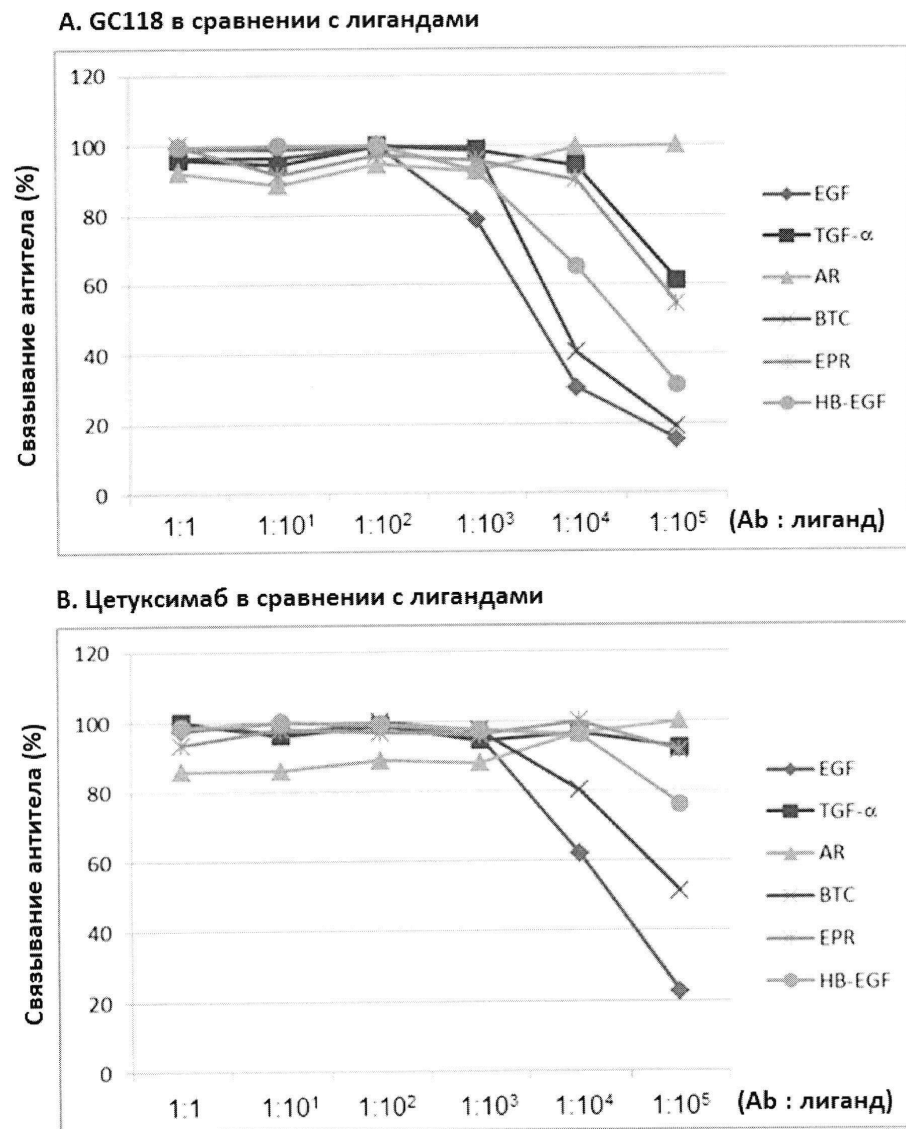


Активность связывания цетуксимаба с вариантами EGFR



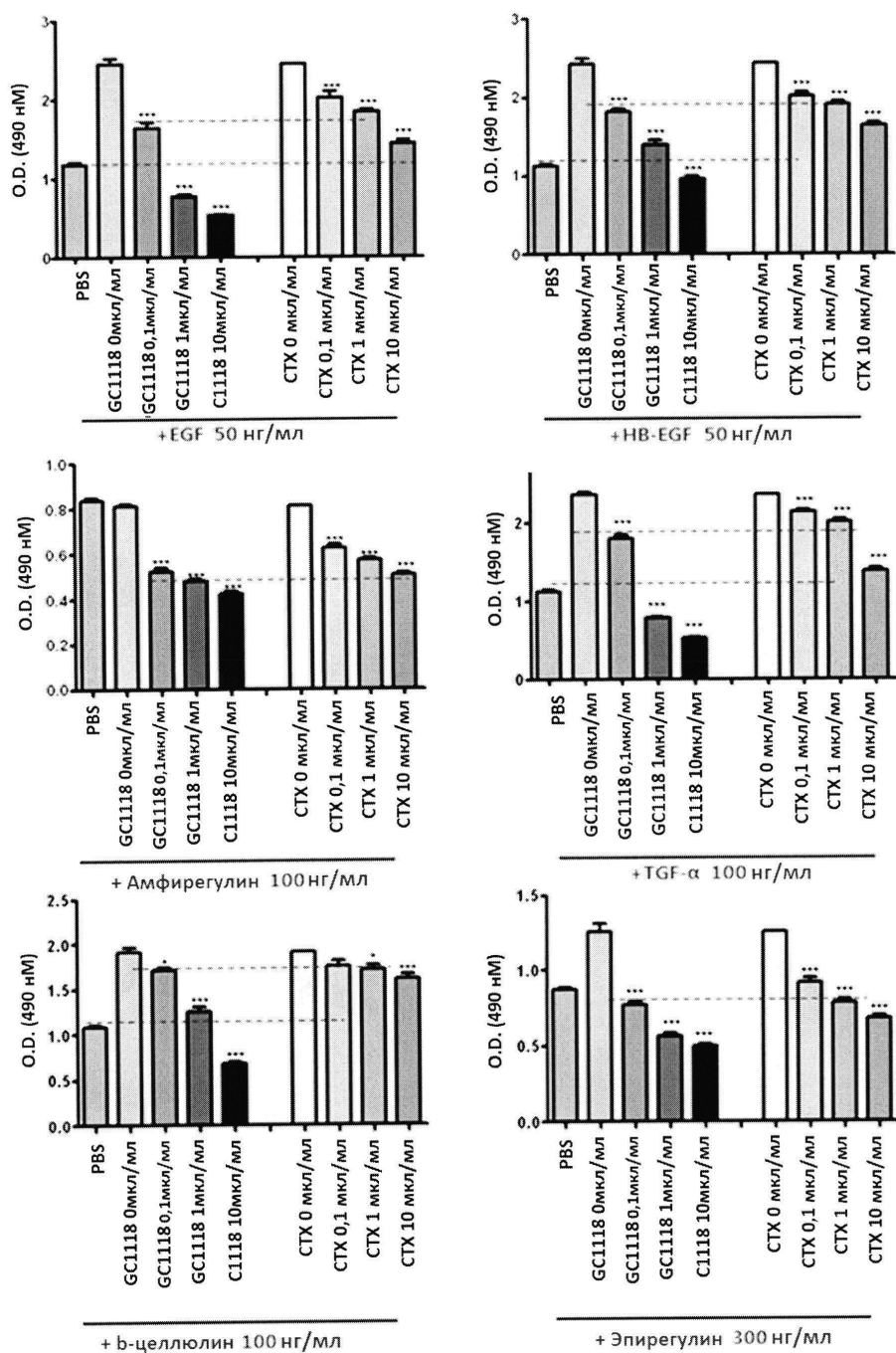
ФИГ. 8(В)

10/11



ФИГ. 9

11/11



ФИГ.10