

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 679**

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)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2013 PCT/KR2013/002550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13147509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013 E 13769431 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2832363**

54 Título: **Epitopos de antígeno de superficie receptor de factor de crecimiento epidérmico y uso de los mismos**

30 Prioridad:

27.03.2012 US 201261616073 P

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

26.12.2018

73 Titular/es:

**GREEN CROSS CORPORATION (50.0%)
107 Ihyeon-ro 30beon-gil
Giheung-gu, Yongin-si
Gyeonggi-do 446-770, KR y
MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, SE-HO;
HONG, KWANG-WON;
CHANG, KI HWAN;
KIM, MIN-SOO;
LEE, MI-JUNG;
WON, JONG-HWA;
HUR, MIN-KYU;
CHO, HYUN-SOO y
YOO, JI-HO**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 694 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Epitopos de antígeno de superficie receptor de factor de crecimiento epidérmico y uso de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a epítomos en un receptor de factor de crecimiento epidérmico (a continuación en el presente documento denominado 'EGFR') y al uso de los mismos. Los epítomos proporcionados según una realización a modo de ejemplo de la presente invención están altamente conservados y ubicados en un dominio asociado estrechamente con la unión a un factor de crecimiento epidérmico (a continuación en el presente documento denominado 'EGF'). Por tanto, las composiciones de vacuna que incluyen los epítomos, anticuerpos
10 contra los epítomos o composiciones que incluyen los anticuerpos pueden bloquear eficazmente una transducción de señales provocada por la unión de EGFR a EGF, y por tanto pueden ser altamente valiosas y útiles en el tratamiento de diversas enfermedades tales como cáncer. Además, los anticuerpos que se unen a los epítomos pueden inhibir eficazmente la unión de diversos ligandos de EGFR tales como no sólo EGF sino también factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), anfirregulina (AR), betacelulina (BTC), epirregulina (EPR) y un factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF) a EGFR, y por tanto pueden usarse para tratar diversas enfermedades
15 provocadas por la activación de EGFR.

Además, la presente invención se refiere a un método de producción de un anticuerpo específico para los epítomos.

Antecedentes de la invención

20 Los métodos inmunoterapéuticos de tratamiento del cáncer tienen ventajas porque la especificidad para enfermedades diana en pacientes se potencia en comparación con cirugías, radioterapias y quimioterapias, potenciando de este modo los efectos anticancerígenos y reduciendo los efectos secundarios. Se han usado anticuerpos monoclonales específicos de tumores como agente quimioterápico que es muy útil en el tratamiento de tumores seleccionando como diana ciertas proteínas sobreexpresadas específicamente en diversos tipos de cáncer para adquirir efectos anticancerígenos.

25 Un receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína de membrana de tipo 1 que tiene un peso molecular de 170 kDa, y se sabe que se sobreexpresa en diversos tipos de tumores. El EGFR se ha estudiado durante un largo período de tiempo, y se han realizado exitosamente estudios cristalográficos actuales de un dominio celular (Garrett TP *et al.*, Cell, 2002, 110: 763-773) y un dominio cinasa intracelular (Stamos J *et al.*, J. Biol. Chem., 2002, 277: 46265-46272). Estos estudios presentaron información crucial sobre el comportamiento de receptores y ligandos de los mismos. EGFR es una molécula asociada a superficie celular que se activa a través de
30 la unión de ligandos de EGF y factor de crecimiento transformante- α (TGF- α) a la misma. Después de la unión de los ligandos, se dimerizan receptores para fosforilar un dominio tirosina cinasa intracelular. Como resultado, se activan las reacciones en cascada de señales posteriores para inducir el crecimiento y la proliferación de células normales y el crecimiento de células tumorales. En particular, dado que las funciones de las células tumorales dependen principalmente del EGFR, el receptor se ha reconocido como una diana común para el tratamiento debido
35 al grado de probabilidad de inhibición de las funciones reguladoras del EGFR.

La sobreexpresión del EGFR, por ejemplo, se observa en ciertos tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario y cáncer de próstata. Cuando la unión de EGF al EGFR se inhibe usando anticuerpos contra el EGFR, el crecimiento de células cancerosas puede inhibirse para tratar cáncer, lo que ya se demostró
40 experimentalmente usando un anticuerpo monoclonal contra el EGFR.

Mientras tanto, aunque se han realizado intentos para dilucidar las posiciones de los dominios respectivos de EGFR que se unen a EGF (S. Yokoyama *et al.*, Cell, 2002, 110: 775-787), se ha estudiado además si un anticuerpo donde tal dominio de EGFR se usa como un epítomo inhibe la activación de una ruta de transducción de señales de EGFR mediante EGF.

45 En los últimos años, cetuximab (anticuerpo C225, nombre de producto: Erbitux; ImClone, EE.UU.) usado para tratar cáncer colorrectal metastásico en el campo clínico es un anticuerpo quimérico que se obtiene mediante unión de una región variable de un anticuerpo de ratón a una región constante de IgG1 de un anticuerpo humano (que tiene aproximadamente el 30% de una secuencia de aminoácidos de ratón), y por tanto inhibe el crecimiento de células tumorales y la fosforilación de EGFR por EGF *in vitro*, y suprime la formación de tumores humanos en un ratón desnudo. Además, se encontró que el anticuerpo tenía sinergismo con un cierto agente quimioterápico para erradicar los tumores humanos en un modelo de ratón de xenoinjerto. Sin embargo, cetuximab tiene un problema porque provoca una respuesta inmunitaria en pacientes (aproximadamente en el 10%), y sólo puede usarse como terapia de combinación con un agente quimioterápico dado que no tiene un efecto terapéutico satisfactorio usando la
50 terapia aislada.

55 Panitumumab (nombre de producto: Vectibix; Amgen Inc. US), que es otro anticuerpo usado para tratar cáncer colorrectal metastático, es un anticuerpo completamente humano que inhibe el crecimiento de células tumorales y la fosforilación de EGFR por EGF *in vitro*, y suprime la formación de tumores humanos en un ratón desnudo. Además,

se encontró que el anticuerpo tiene sinergismo con un cierto agente quimioterapéutico para erradicar los tumores humanos en un modelo de ratón de xenoinjerto. Panitumumab es diferente de cetuximab porque es un anticuerpo completamente humano, tiene una capacidad de unión a antígeno 10 veces la de cetuximab, reduce la probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria como cetuximab como anticuerpo de tipo IgG2, y presenta sólo un efecto
 5 inhibidor de la transducción de señales por unión de EGFR a EGF debido a las limitaciones de IgG2, aunque se potenció la capacidad de unión para reducir los efectos secundarios y mejorar la eficacia. Por tanto, se notificó que panitumumab tiene efectos clínicos globales similares a cetuximab debido a que no tiene actividades de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) entre el efecto inhibidor de la transducción de señales y las actividades de ADCC de cetuximab conocidas en la técnica relacionada.

10 Además, matuzumab (mAb425), que se desarrolla conjuntamente por Merck Serono y Takeda Pharmaceuticals, no tiene un efecto quimioterápico satisfactorio en la terapia aislada hasta ahora.

Sobre todo, no se permite que se prescriban todos los agentes terapéuticos de anticuerpos convencionales que seleccionan como diana EGFR para tratar cáncer colorrectal mutante para K-ras. Los datos notificados en 2009 confirmaron que el porcentaje de pacientes en los que los dos anticuerpos muestran un efecto terapéutico ascienden a aproximadamente el 21%, y los anticuerpos no muestran ningún efecto terapéutico en el 79% restante de los
 15 pacientes. El 43% del grupo de los pacientes en los que los anticuerpos no muestran ningún efecto terapéutico, es decir, aproximadamente el 30% del número global de pacientes, tienen un K-ras mutante, que pertenece a este grupo de cáncer colorrectal mutante para K-ras. Los agentes terapéuticos de anticuerpos convencionales, cetuximab y panitumumab, muestran un efecto terapéutico sólo en aproximadamente el 1,5% del mutante de K-ras.

20 Por tanto, las demandas de anticuerpos anti-EGFR novedosos que tengan diferenciación y superioridad con los que puedan superarse los problemas y límites de los anticuerpos contra EGFR convencionales inhibiendo la unión de EGFR a EGF más eficazmente tienden a aumentar continuamente.

Baron *et al.* (1997), Hybridoma vol. 16, n.º 3, 259-271 describen anticuerpos monoclonales específicos para epítomos peptídicos del dominio extracelular del receptor de factor de crecimiento epidérmico. El documento US 5459061 describe hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un epítopo continuo en
 25 el receptor de EGF humano y compiten con EGF por la unión al receptor de EGF.

Sumario de la invención

La materia de la invención es tal como se expone en las reivindicaciones.

30 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una secuencia de aminoácidos de RGDSFTH (SEQ ID NO: 2), o un epítopo en EGFR que incluye la misma, y particularmente, un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos de RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3).

35 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método de producción del epítopo, una composición para vacunas contra el cáncer o una vacuna contra el cáncer que incluye el epítopo, un método de producción de un anticuerpo, que tiene la capacidad de unirse específicamente al epítopo, usando el epítopo, y una composición o un agente terapéutico para prevenir y/o tratar cáncer que incluye el anticuerpo producido mediante el método.

Por consiguiente, la invención proporciona un epítopo de un receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que consiste en la secuencia de aminoácidos de RGDSFTH (SEQ ID NO: 2) o RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3).

40 La invención proporciona además un complejo en el que el epítopo anterior se une a un portador, en el que el portador es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un péptido, albúmina sérica, inmunoglobulina, hemocianina y polisacárido.

La invención proporciona además un polinucleótido que codifica para cualquiera de los epítomos anteriores.

La invención proporciona además un vector recombinante que comprende el polinucleótido anterior.

45 La invención proporciona además un microorganismo o virus recombinante transformado con el vector recombinante anterior, en el que el microorganismo o virus recombinante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en una *E. coli* recombinante, una levadura recombinante y un bacteriófago recombinante.

La invención proporciona además un método de preparación del epítopo, en el que dicho epítopo consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que dicho método comprende cultivar el microorganismo o virus recombinante anterior que expresa el vector recombinante anterior.

50 La invención comprende además una composición de vacuna para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en la que dicha composición comprende el epítopo anterior, el complejo anterior que comprende el epítopo o el polinucleótido anterior que codifica para el epítopo.

La invención comprende además un método de producción de un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo

policlonal o monoclonal, o un fragmento del mismo, que une específicamente al epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, usando el epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; un complejo que comprende el epítipo o un polinucleótido que codifica para el epítipo.

- 5 Tal como se describió anteriormente, la presente invención proporciona el epítipo o una secuencia de polinucleótido que codifica para el epítipo. Una divulgación adicional se refiere a una composición y un kit para diagnosticar cáncer que incluye la secuencia de polinucleótido.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es un diagrama que muestra las características de unión de EGFR a un anticuerpo GC1118 de una manera tridimensional.

La figura 2 es un diagrama que muestra las características de unión de EGFR a EGF de una manera tridimensional.

La figura 3 es un diagrama que muestra las características de unión del anticuerpo GC1118 a EGFR al que se une EGF cuando el anticuerpo GC1118 se solapa con el EGFR.

15 La figura 4 es un diagrama que muestra las características de unión de EGFR a cetuximab y matuzumab de una manera tridimensional.

La figura 5 es un diagrama que muestra un procedimiento de síntesis de un gen variante de EGFR y un procedimiento de transformación de células de levadura.

La figura 6 es un diagrama que muestra que las respectivas variantes de EGFR se sintetizan apropiadamente identificando la secuencia de aminoácidos determinada a partir de una secuencia de bases de ADN.

20 La figura 7 es un diagrama que muestra las tasas de expresión de las respectivas variantes de EGFR.

La figura 8 es un diagrama que muestra las capacidades de unión de anticuerpos contra los mutantes de EGFR respectivos: (A) GC1118 y (B) cetuximab (control).

La figura 9 es un diagrama que muestra las capacidades de unión competitiva de ligandos de EGFR a GC1118: (A) GC1118 y (B) cetuximab (control).

25 La figura 10 es un diagrama que muestra las actividades inhibitoras de GC1118 sobre la inducción de proliferación celular.

Descripción detallada de la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

30 Los presentes inventores han dilucidado que una secuencia de aminoácidos de RGDSFTH (SEQ ID NO: 2) o una secuencia de aminoácidos que incluye la misma, especialmente una secuencia de aminoácidos representada por RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3), funciona esencialmente en la unión a EGF entre secuencias de aminoácidos de EGFR, y encontraron que anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos como epítipo inhiben muy eficazmente la unión de EGFR a EGF, y por tanto muestran efectos superiores en el tratamiento del cáncer bloqueando la transducción de señales a partir de la unión. Por tanto, la presente invención se ha completado basándose en estos hechos.

35 La secuencia de aminoácidos de RGDSFTH expuesta en SEQ ID NO: 2 corresponde a los residuos de aminoácido 353° a 359° de una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular de EGFR expuesto en SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de RGDSFTHTP expuesta en SEQ ID NO: 3 corresponde a los residuos de aminoácidos 353° a 361° del dominio extracelular de EGFR expuesto en SEQ ID NO: 1.

40 Los residuos de aminoácido presentes en la secuencia de aminoácidos proporcionada en la presente invención se representan por abreviaturas de tres o de una letra conocidas en la técnica relacionada. Además, en la presente invención, el término "xA" se refiere al aminoácido A° x de una secuencia de EGFR expuesta en SEQ ID NO: 1, y el término "xAz" significa que el aminoácido A° x está sustituido por z. Por ejemplo, el término "R353" se refiere a arginina (Arg) que es el residuo de aminoácido 353° de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1, y el término "R353G" significa que la arginina (Arg) que es el residuo de aminoácido 353° de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 está sustituida por glicina (Gly).

45 Un epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 puede usarse en combinación con un portador con el fin de mantener su propia estructura tridimensional o proporcionar eficacia en uso como composición tal como vacuna contra el cáncer. El portador según una realización a modo de ejemplo de la presente invención es biocompatible, y pueden usarse todos los tipos de portadores en el

presente documento siempre que puedan lograr los efectos deseados. En este caso, el portador puede seleccionarse del grupo que consiste en un péptido, albúmina sérica, una inmunoglobulina, hemocianina y un polisacárido, pero la presente invención no se limita a ello.

5 Un epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 puede usarse por sí mismo, o usar como complejo en combinación con un portador. En este caso, el epítipo o el complejo pueden usarse en una composición de vacuna contra el cáncer. En este caso, la composición de vacuna puede incluir además un adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cualquier tipo de adyuvante puede usarse siempre que pueda servir para potenciar la formación de anticuerpos cuando se inyecte dentro del cuerpo, logrando de ese modo los objetivos de la presente invención. En particular, el adyuvante puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en una sal de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$ o AlPO_4), escualeno, sorbitano, polisorbato 80, CpG, un liposoma, colesterol, monofosforil lípido A (MPL) y glucopiranosil lípido A (GLA), pero la presente invención no se limita a ello.

15 Un polinucleótido que codifica para el epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 proporcionada en la presente invención puede usarse en forma de una vacuna genética contra el cáncer por sí mismo. En este caso, el propio polinucleótido puede usarse sin usar un sistema de administración, o puede administrarse dentro del cuerpo contenido en un sistema de administración vírico o no vírico. Cualquier tipo de sistema de administración vírico o no vírico puede usarse siempre que se sepa que está disponible convencionalmente en la técnica. Específicamente, el sistema de administración vírico incluye preferiblemente un adenovirus, un virus adenoasociado, un lentivirus, un retrovirus, y similares, y el vector no vírico que puede usarse en el presente documento incluye al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un polímero catiónico, un polímero no catiónico, un liposoma, un lípido, fosfolípido, un polímero hidrófilo, un polímero hidrófobo y un complejo de los mismos, pero la presente invención no se limita a ello.

20 La presente invención proporciona un vector recombinante que incluye el polinucleótido que codifica para el epítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, una célula huésped que incluye el vector recombinante y un método de preparación del epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, usando el vector recombinante o la célula huésped según la presente invención.

25 En la presente invención, el término "vector recombinante" se refiere a un vector de expresión que puede expresar una proteína diana en una célula huésped apropiada, es decir, un constructo génico que incluye un elemento regulador esencial operativamente unido para expresar un inserto génico. En la presente invención, el término "operativamente unido" quiere decir que una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína deseada está ligada funcionalmente con una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico para ejecutar funciones generales. La unión operativa con el vector recombinante puede llevarse a cabo usando técnicas de recombinación genética ampliamente conocidas en la técnica, y pueden llevarse a cabo escisión y ligación de ADN específicas de sitio usando enzimas ampliamente conocidas en la técnica.

30 Una expresión apropiada que puede usarse en la presente invención puede incluir secuencias señal para seleccionar como diana la membrana o secreción además de elementos de control de la expresión tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, una señal de poliadenilación y un potenciador. El codón de iniciación y el codón de terminación se considera generalmente que son una porción de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína diana inmunogénica, y por tanto deben funcionar esencialmente en un individuo cuando se administra un constructo génico al individuo, y se inserta en marco con una secuencia codificante. Un promotor común puede ser constitutivo o inducible. Hay promotores Lac, Tac, T3 y T7 presentes en células procariotas, pero no se limitan a ellos. Hay un promotor de β -actina y promotores derivados de hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana, así como promotores derivados de un virus de simio (SV40), un virus de tumor mamario de ratón (mouse mammary tumor virus, MMTV), un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (por ejemplo, un promotor de repeticiones terminales largas (long terminal repeat, LTR) de VIH), un virus de Moloney, un citomegalovirus (CMV), un virus Epstein-Barr (VEB) y un virus del sarcoma de Rous (VSR) presentes en células eucariotas, pero no se limitan a ellos.

35 El vector de expresión puede incluir un marcador de selección para seleccionar una célula huésped que contiene el vector. El marcador de selección se usa para seleccionar células transformadas con el vector. En este caso, los marcadores que dan fenotipos seleccionables tales como tolerancia a fármacos, auxotrofia, tolerancia a agentes citotóxicos o expresión de proteínas de superficie pueden usarse como marcador de selección. Dado que sólo las células que expresan el marcador de selección sobreviven en un ambiente tratado con un agente selectivo, es posible seleccionar las células transformadas. Además, cuando el vector es un vector de expresión replicable, el vector puede incluir un origen de replicación que es una cierta secuencia de ácido nucleico a partir de la que se inicia la replicación. Pueden usarse diversos tipos de vectores tales como un plásmido, un virus y un cósmido como vector de expresión recombinante. Cualquier tipo del vector recombinante puede usarse sin limitación particular siempre que pueda funcionar para expresar un gen deseado en diversas células huésped tales como células procariotas y células eucariotas, y producir una proteína deseada. Sin embargo, un vector, que incluye un promotor que tiene actividades fuertes y puede producir en masa una proteína foránea que tiene una forma similar a la silvestre al tiempo que retiene una intensidad de expresión fuerte, puede usarse preferiblemente como vector

recombinante.

En particular, pueden emplearse diversas combinaciones de huéspedes/vectores de expresión para expresar el epítipo según una realización a modo de ejemplo de la presente invención, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. El vector de expresión adecuado para huéspedes eucariotas puede contener una secuencia reguladora para la expresión, que incluye sin limitación, derivado de SV40, un virus del papiloma bovino, un adenovirus, un virus adenoasociado, un citomegalovirus, un lentivirus y un retrovirus. El vector de expresión que puede usarse en un huésped bacteriano incluye plásmidos bacterianos obtenidos de *Escherichia coli*, tales como pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC vector, col EI, pCRI, pBR322, pMB9 y derivados de los mismos; plásmidos que tienen un amplio intervalo de huéspedes tales como RP4; ADN de fagos que incluyen diversos derivados de fago lambda tales como λ gt10, λ gt11 y NM989; y otros fagos de ADN como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos. Un vector útil para células de insectos es pVL941.

El vector recombinante se introduce dentro de células huésped para formar transformantes. Las células huésped adecuadas pueden incluir procariontes tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus sp.*; hongos tales como *Aspergillus sp.*; células de levaduras tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp.* y *Neurospora crassa*; y otros eucariotas inferiores, y células eucariotas superiores tales como células de insecto. Adicionalmente, las células huésped pueden derivarse preferiblemente de plantas, y mamíferos tales como células de riñón de mono (COS7), células NSO, SP2/0, células de ovario de hámster chino (CHO), W138, células de riñón de cría de hámster (BHK), MDCK, un línea celular de mieloma, células HuT 78 y células HEK293, sin limitación. Se prefieren particularmente las células CHO.

En la presente invención, el término "transformación" dentro de las células huésped abarca cualquier método de introducción de una secuencia de ácido nucleico en un organismo, una célula, un tejido o un órgano, y pueden llevarse a cabo usando técnicas convencionales adecuadas para la célula huésped tal como se conocen en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, tal como electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio (CaPO_4), precipitación con cloruro de calcio (CaCl_2), agitación usando fibras de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacterias, un método de PEG, un método de sulfato de dextrano, un método de lipofectamina y transformación mediada por secado/supresión. El epítipo según una realización a modo de ejemplo de la presente invención, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, puede someterse a producción a gran escala cultivando los transformantes que expresan el vector recombinante en un medio de nutrientes. El medio y las condiciones de cultivo pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de la célula huésped. Las condiciones tales como temperatura, pH del medio y el tiempo de cultivo pueden ajustarse apropiadamente para permitir el crecimiento eficaz de células y la producción en masa de una proteína. Tal como se describió anteriormente, el epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 puede recuperarse recombinantemente a partir de un medio, o un lisado celular, y puede separarse y purificarse usando técnicas de separación bioquímicas convencionales (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deucher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990)). Las técnicas de separación bioquímicas que pueden usarse en el presente documento pueden incluir, sin limitación, electroforesis, centrifugación, filtración en gel, precipitación, diálisis, cromatografía (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía inmunoabsorbente o cromatografía de exclusión molecular), isoelectroenfoque y diversos métodos modificados y combinados de los mismos.

La presente invención proporciona un método de expresión de un epítipo, que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, en la superficie de microorganismos o virus. En este método, pueden usarse un vector recombinante caracterizado porque comprende una secuencia que codifica para un promotor inducible o una proteína señal, y diversos microorganismos o virus que comprenden el vector recombinante. Los microorganismos o virus particularmente apropiados incluyen, sin limitación, *E. coli* recombinante, levaduras recombinantes y bacteriófagos recombinantes. Pueden usarse técnicas de presentación ampliamente conocidas en la técnica para expresar el epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en la superficie del microorganismo o virus. Particularmente, un método de unión de una secuencia de polinucleótido que codifica para el epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, a una secuencia que codifica para un promotor o una proteína señal para inducir la expresión del epítipo en la superficie de células microbianas o víricas, o un método de delección de una porción de un gen que codifica para una proteína expresada originalmente en la superficie de las células microbianas o víricas e inserción de una secuencia de polinucleótido que codifica para el epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, dentro del gen delecionado parcialmente, puede usarse en el presente documento, pero no se limita a ello. El epítipo expresado en las superficies de los microorganismos o virus, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, puede separarse y purificarse por sí mismo, y puede usarse para el propósito de uso específico según una realización a modo de ejemplo de la presente

invención, y puede usarse para cribar un anticuerpo que se une específicamente al epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, cuando se expresa en la superficie de los microorganismos o virus, para obtener el anticuerpo.

Además, la presente invención proporciona un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, un anticuerpo que se une específicamente al epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, usando un complejo que incluye el epítipo o un polinucleótido que codifica para el epítipo, o un método de producción de un fragmento de un anticuerpo de este tipo. Un anticuerpo de este tipo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, y el fragmento del anticuerpo se encuentra dentro del alcance de la presente invención siempre que retenga características para unirse al epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En particular, el anticuerpo o su fragmento según una realización a modo de ejemplo de la presente invención incluye, sin limitación, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fd, scFv, anticuerpos de dominio, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, scAb, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgM, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4, derivados de regiones constantes de los anticuerpos y anticuerpos artificiales basándose en armazones proteicos, siempre que tengan una actividad de unión al epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. Además, están abarcados anticuerpos que tienen mutaciones en regiones variables de los mismos dentro del alcance de la presente invención siempre que retengan sus características según una realización a modo de ejemplo de la presente invención. A modo de ejemplo, las mutaciones pueden incluir sustituciones conservativas de aminoácidos en las regiones variables. La sustitución conservativa se refiere a la sustitución de una secuencia de aminoácidos original por otro residuo de aminoácido que tiene una característica similar. Por ejemplo, los residuos de lisina, arginina e histidina son similares en cuanto a que tienen una cadena lateral básica. Además, los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico son similares en cuanto a que tienen una cadena lateral ácida. Además, los residuos de glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína y triptófano son similares en cuanto a que tienen una cadena lateral polar, no cargada, y los residuos de alanina, valina, leucina, treonina, isoleucina, prolina, fenilalanina y metionina son similares en cuanto a que tienen una cadena lateral no polar. Además, los residuos de tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina son similares en cuanto a que tienen una cadena lateral aromática. Por tanto, es evidente para los expertos en la técnica que las sustituciones de aminoácidos entre el grupo de los aminoácidos que tienen las características similares tal como se describió anteriormente no provocarán ningún cambio en las características. Como resultado, un método de producción de un anticuerpo que tiene mutaciones por sustituciones conservadoras en una región variable del mismo se encuentra dentro del alcance de la presente invención siempre que retenga sus características.

La unión del anticuerpo al epítipo según la presente invención, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, puede obtenerse usando métodos ampliamente conocidos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Específicamente, el anticuerpo puede prepararse inoculando en un animal no humano un epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, un complejo que incluye el epítipo, o un polinucleótido que codifica para el epítipo y produciendo y cribando un anticuerpo que se une específicamente al epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, a partir del animal inoculado.

En este caso, el animal es preferiblemente un animal transformado para producir un anticuerpo que tiene la misma secuencia que una secuencia derivada de ser humano, especialmente una rata transformada. En este caso, puede prepararse un anticuerpo completamente humano que tiene inmunogenicidad reducida usando la rata transformada según métodos dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.569.825; 5.633.425; y 7.501.552. Cuando el animal no humano no se transforma para producir el anticuerpo que tiene la misma secuencia que la secuencia derivada de ser humano, puede llevarse a cabo además una etapa de humanización o desinmunización en el anticuerpo obtenido a partir del animal no humano de modo que el anticuerpo se vuelve adecuado para un uso de tratamiento en el cuerpo, tal como se describe en los métodos dados a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.225.539; 5.859.205; 6.632.927; 5.693.762; 6.054.297; y 6.407.213; y el documento WO 1998/52976. Específicamente, la etapa de humanización o desinmunización puede incluir una etapa de injerto de CDR de injertar una secuencia de CDR del anticuerpo producido a partir del animal dentro de la región de entramado (FR) de un anticuerpo humano, y una etapa de paseo de CDR de sustituir, insertar o delecionar al menos una secuencia de aminoácidos con el fin de potenciar adicionalmente la afinidad o reducir la inmunogenicidad.

Cuando un EGFR de longitud total en vez del epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, el complejo que incluye el epítipo o el polinucleótido que codifica para el epítipo, se usa como inmunógeno, puede usarse también un método de cribado de un anticuerpo, que incluye cribar principalmente anticuerpos que tienen capacidad de unión al EGFR y cribar el anticuerpo que reconoce específicamente el epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, entre los anticuerpos cribados principalmente. En este caso, puede usarse también en el presente documento un método de cribado de un anticuerpo, que incluye inducir mutaciones en un sitio de unión crucial del epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, y cribar los

anticuerpos que tienen capacidad de unión perdida o reducida al EGFR debido a las mutaciones en el sitio de unión crucial del epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, entre los anticuerpos cribados principalmente que se unen al EGFR.

5 Además, puede producirse y cribarse un anticuerpo humano que se une al epítipo expuesto en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 usando una técnica de presentación conocida ampliamente en la técnica a la que pertenece la presente invención. La técnica de presentación es preferiblemente al menos una seleccionada del grupo que consiste en técnicas de presentación en fagos, presentación en bacterias y presentación e ribosomas, pero la presente invención no se limita a ellas. La preparación y presentación de una biblioteca puede llevarse a cabo fácilmente tal como se da a conocer en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.733.743; 7063943; 6172197; 6.348.315; 10 y 6.589.741. Particularmente, la biblioteca usada en la presentación se diseña preferiblemente para que tenga una secuencia del anticuerpo derivado de ser humano. Específicamente, el método se caracteriza porque incluye cribar sólo anticuerpos que se unen específicamente al epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, usando el epítipo, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, o 15 el complejo que incluye el epítipo.

Finalmente, la presente invención proporciona un epítipo que consiste en una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, un complejo que incluye el epítipo o una composición para vacunas contra el cáncer que incluye un polinucleótido que codifica para el epítipo.

20 La presente invención se describirá en detalle adicional a través de las realizaciones a modo de ejemplo a continuación.

Ejemplo 1: Identificación de la estructura de unión de EGFR a Fab de GC1118

Para identificar una estructura de unión de EGFR a un fragmento de unión a antígeno (Fab) de GC1118 (véase el documento KR 10-2011-0034914 A) desarrollado por un grupo de investigadores de la presente invención, se obtuvieron los datos de difracción de rayos X de una estructura cristalina de un material compuesto de EGFR/Fab de 25 GC1118 usando la línea de haz BL26B2 (Spring-8 Institution, Japón), y se indexaron y aumentaron a escala usando el software HKL2000 (HKL Research Inc., EE.UU.), y se obtuvo entonces un mapa de densidad de electrones temprano del material compuesto de EGFR/GC1118 usando un método de reemplazo molecular (MR). Para emplear el método de MR, se necesitaron los datos de una estructura tridimensional de una proteína que tenía una estructura similar a la del material compuesto de EGFR/anticuerpo diana. En este caso, se usó una estructura de un material compuesto de EGFR/cetuximab (PDB ID: 1 YY9) como estructura para el material compuesto de EGFR/GC1118. Se 30 obtuvo la información en una fase temprana del material compuesto de EGFR/GC1118 usando el programa Molrep (<http://www.ytbl.york.ac.uk/~alexei/molrep.html>), y se llevó a cabo una tarea de construcción de modelo usando un instrumental orientado a objetos cristalográfico (COOT: <http://www.biop.ox.ac.uk/coot/>), basándose en la información obtenida en la fase temprana. Después, se completó una tarea de refinado usando el software Refmac5 (<http://www.ccp4.ac.uk/html/refmac5.html>) y software de ambiente jerárquico basado en el lenguaje Python para cristalografía integrada (PHENIX: <http://www.phenix-online.org/>).

35 Como resultado, se reveló que el epítipo en EGFR de GC1118 estaba colocado en el 3º dominio de EGFR, y particularmente el epítipo era una región de bucle corto del 3º dominio, que consiste en 9 residuos de aminoácido que abarcan los residuos de aminoácido 353º hasta 361º de la secuencia de aminoácidos (véase SEQ ID NO: 1 y la figura 1). Esta región de bucle sobresale hacia el exterior, y está rodeada por CDR del anticuerpo. En particular, los residuos de aminoácido que desempeñan un papel crucial en la unión entre GC1118 y EGFR son F357 y H359 del EGFR. Los dos residuos de aminoácido están rodeados por residuos de aminoácido de una región CDR del anticuerpo GC1118, y funcionan formando enlaces hidrófobos y enlaces de hidrógeno con los residuos de aminoácido de la región CDR con el fin de mantener firmemente la unión entre EGFR y GC1118. Además, R353 40 contribuye a la unión adicionalmente al anticuerpo por medio de enlaces iónicos a una región variable (VH) de una cadena pesada del anticuerpo GC1118 (véase la figura 1).

Mientras tanto, la región a la que se une EGF está colocada entre los dominios 1º y 3º de EGFR. En este caso, EGF se une en primer lugar al 1º dominio de EGFR (véase la figura 2) para inducir un cambio estructural del dominio de EGFR, y después se une al 3º dominio (véase la figura 3). En este caso, el residuo de aminoácido de EGFR 50 importante que participa en la unión a EGF es D355 del 3º dominio (Ferguson *et al.*, Molecular Cell, 2003, 11:507-517). En este caso, el residuo de aminoácido está presente en un bucle que contiene R353, F357 y H359 que son los epítopos de GC1118. Es decir, dado que los epítopos en EGFR a los que se une GC1118 están presentes en la misma región que la región a la que se une EGF, la unión del anticuerpo a los epítopos de GC1118 puede inhibir directamente la unión de EGF al 3º dominio de EGFR. Esto se confirma adicionalmente por comparación con la estructura de EGFR unido a EGF. Por consiguiente, cuando la estructura de EGFR activada a través de la unión de EGF se solapa con la de GC1118, pudo observarse que la región VH de GC1118 y EGF se solapan entre sí (véase la figura 3).

55 En comparación con la unión del cetuximab actualmente usado a EGFR, el cetuximab tenía epítopos colocados en el 3º dominio de EGFR, pero los sitios de unión de cetuximab estaban ampliamente dispersos sobre la superficie del

3° dominio. Por tanto, algunos de los epítomos tuvieron una influencia indirecta en la unión de EGF (véase la figura 4A). Matuzumab, que era otro anticuerpo, también tenía epítomos colocados en el 3° dominio de EGFR, pero los epítomos de matuzumab estaban presentes en posiciones diferentes que los epítomos según una realización a modo de ejemplo de la presente invención, y estaban colocados en una región distinta de la región a la que se unía EGF de forma que los epítomos de matuzumab no podían dificultar directamente la unión de EGF (véase la figura 4B).

Ejemplo 2: verificación de epítomos en EGFR de GC1118 usando el método de expresión en superficie de célula de levadura

Para verificar los epítomos (residuos de aminoácido R353, F357 y H359) de EGFR contra GC1118 encontrados a través de un modelo de estructura, los residuos de aminoácido correspondientes se sustituyeron por glicina que no tiene reactividad de unión para producir las variantes, y después se expresaron en las superficies de células de levadura. Después de eso, se confirmó la unión de GC1118 a variantes de EGFR en las que se expresaron los epítomos en las superficies de las células de levadura usando citometría de flujo (BD FACSCalibur™, EE.UU.). Como resultado, se confirmó que la afinidad de unión a GC1118 se redujo en todas las variantes de EGFR.

2.1 Construcción de variantes de EGFR

Se construyeron las variantes de EGFR sustituyendo uno o más de R353, F357 y H359 de la secuencia de aminoácidos de EGFR (véase SEQ ID NO: 1) por glicina usando un método de PCR solapante en el que una secuencia génica que codifica para un dominio extracelular de EGFR humano se usó como molde. Los resultados se enumeran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Variantes de EGFR sustituidas con glicina (Gly)				
Variantes de EGFR	Sustitución de aminoácidos	Detalles		
		Posición	Antes de la sustitución	Después de la sustitución
Variante 1	R353G	353	Arg	Gly
Variante 2	F357G	357	Phe	Gly
Variante 3	H359G	359	His	Gly
Variante 4	R353G + F357G	353	Arg	Gly
		357	Phe	Gly
Variante 5	F357G + H359G	357	Phe	Gly
		359	His	Gly
Variante 6	R353G + H359G	353	Arg	Gly
		359	His	Gly
Variante 7	R353G + F357G + H359G	353	Arg	Gly
		357	Phe	Gly
		359	His	Gly

2.1.1 Reacción PCR para la síntesis de variantes de EGFR

Se sintetizaron dos fragmentos génicos (de aproximadamente 1.150 pb y 720 pb) que incluían comúnmente cada una de las variantes de EGFR llevando a cabo una reacción PCR usando AccuPower™ TLA PCR PreMix (Bioneer, Corea) que incluían una secuencia génica del EGFR de ser humano como molde, y un juego de cebadores (véase la tabla 2) diseñados para inducir mutación de un gen de EGFR. Los dos fragmentos génicos sintetizados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el ADN de cada uno de los fragmentos génicos se purificó usando un kit de Qiagen (Qiagen 28706, Alemania). Posteriormente, se llevó a cabo una reacción PCR solapante usando el ADN del juego de los dos fragmentos génicos purificados como molde y cebadores que tenían las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOS: 4 a 19 (véase la tabla 2), sintetizando de ese modo los genes variantes de EGFR finales (véase la figura 5). Los genes sintetizados se escindieron usando las enzimas de restricción NheI/MluI (New England BioLabs, EE.UU.). El término "For" que sigue a los nombres de cebadores según se enumeran en la tabla 2 representa un cebador directo, y el término "Rev" representa un cebador inverso.

Tabla 2

Cebadores usados en reacción PCR para construir variantes de EGFR			
Nombre del cebador	Variantes diana	Secuencia	SEQ ID NO
pCTCON-For	Control	5'-CGGCTAGCCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGC-3'	4
pCTCON-Rev		5'-CGACGCGTTGGACGGGATCTTAGGCC-3'	5
R353G-For	Variante	5'-CTGCCGGTGGCATTGGCCGGTGACTCCTCACA-3'	6
R353G-Rev	1	5'-TGTGAAGGAGTCACCGCAAATGCCACCGGCAG-3'	7
F357G-For	Variante	5'-TTTAGGGGTGACTCCGGCACACATACTCCTCCT-3'	8

F357G-Rev	2	5'-AGGAGGAGTATGTGTGCCGGAGTCACCCCTAAA-3'	9
H359G-For	Variante	5'-GGTGACTCCTTCACAGGCACTCCTCCTGGAC-3'	10
H359G-Rev	3	5'-GTCCAGAGGAGGAGTGCCTGTGAAGGAGTCACC-3'	11
R353G,F357G-For	Variante	5'-CTGCCGGTGGCATTGGCGGTGACTCCGGGACACATACTCCTCCT-3'	12
R353G,F357G-Rev	4	5'-AGGAGGAGTATGTGTCCCGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'	13
F357G,H359G-For	Variante	5'-TTTAGGGGTGACTCCGGCACAGGGACTCCTCCTGGAC-3'	14
F357G,H359G-Rev	5	5'-GTCCAGAGGAGGAGTCCCTGTGCCGGAGTCACCCCTAAA-3'	15
R353G,H359G-For	Variante	5'-CTGCCGGTGGCATTGGCGGTGACTCCTTCACAGGTACTCCTCCTGGAC-3'	16
R353G,H359G-Rev	6	5'-GTCCAGAGGAGGAGTACCTGTGAAGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'	17
R353G,F357G,H359G-For	Variante	5'-CTGCCGGTGGCATTGGCGGTGACTCCGGAACAGGTACTCCTCCTGGAC-3'	18
R353G,F357G,H359G-Rev	7	5'-GTCCAGAGGAGGAGTACCTGTTCCGGAGTCACCGCCAAATGCCACCGGCAG-3'	19

2.1.2 Ligación y transformación de variantes de EGFR

Se escindió un vector de expresión de superficie de levaduras pCTCON (Boder, E.T. *et al.*, Nat Biotechnol. 1997, 15(6):553-7) usando enzimas de restricción NheI/MluI, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó usando un kit de Qiagen. Los ADN de variantes de EGFR preparados en el ejemplo 2.1.1 se mezclaron con pCTCON, y se añadió a ellos una ADN ligasa de T4 (New England Biolabs, EE.UU.), y se hicieron reaccionar a 25°C durante 2 horas. La mezcla de ligación se transformó con células de *E. coli* XL1-blue (Stratagene, EE.UU.) a través de electroporación usando Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.), y se incubó durante una hora en un total de 2 ml de un medio. Después de eso, las células transformadas se propagaron en una placa de agar LB suplementado con carbenicilina (Sigma, EE.UU.). Posteriormente, las células se incubaron durante la noche a 37°C.

2.1.3 Secuenciación de bases de variantes de EGFR

Se incubaron colonias sobre la placa cultivada en el ejemplo 2.1.2 durante la noche en 2 ml de un medio LB suplementado con 50 µg/ml de carbecilina, y se separó entonces un plásmido recombinante usando un minikit de plásmidos de Qiagen (Qiagen 27106, Alemania) para determinar las secuencias de bases de ADN de las variantes de EGFR insertadas dentro del plásmido. Se usaron cebadores que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 20 a 22 como cebadores de secuenciación usados para la secuenciación de bases (véase la tabla 3), y la secuenciación de bases la llevó a cabo y la analizó Genotech Corporation (Daejeon, República de Corea) según un método conocido. La secuencia de bases de EGFR humano se usó como control. Después de que se determinaran las secuencias de bases de ADN de las variantes de EGFR, se tradujeron las secuencias de bases de ADN determinadas en secuencias de aminoácidos usando un programa basado en la Web (www.expasy.org: herramienta de traducción de ADN a proteínas) que traduce una secuencia de bases a una secuencia de aminoácidos. Los resultados de la traducción se muestran en la figura 6. Después, se confirmó que todos los genes de variantes de EGFR enumerados en la tabla 1 se insertaron correctamente en los vectores pCTCON.

Tabla 3

Cebadores usados en la reacción de secuenciación		
Tipos de cebadores	Secuencia	SEQ ID NO
seq-F1	5'-ATGAAGGTTTTGATTGTCTTGTGG	20
seq-F1	5'-CCAGTGACTGCTGCCACAACCAAGTG	21
seq-F1	5'-CGTCGGCCTGAACATAACATCCTTG	22

2.2 Análisis de expresión de variantes de EGFR en superficies de células de levadura y unión al anticuerpo

2.2.1 Procedimiento de expresión de variantes de EGFR en superficies de células de levadura

Se transformó una cepa de levadura EBY100 (*S. cerevisiae*) con el pCTCON-EGFR verificado en el ejemplo 2.1 usando Gene Pulser de Bio-Rad Laboratories, Inc. (figura 1). Las colonias transformadas se incubaron a 30°C durante 20 horas en un medio selectivo, un medio líquido SD-CAA (glucosa 20 g/l, base de nitrógeno de levaduras sin aminoácidos 6,7 g/l, Na₂HPO₄ 5,4 g/l, NaH₂PO₄H₂O 8,6 g/l y casaminoácidos 5 g/l). Después de eso, se indujo la expresión de la variante del EGFR en las superficies de células de levadura incubando las colonias transformadas a 30°C durante 20 horas en un medio selectivo, un medio líquido SD-CAA (galactosa 20 g/l, base de nitrógeno de levaduras sin aminoácidos 6,7 g/l, Na₂HPO₄ 5,4 g/l, NaH₂PO₄H₂O 8,6 g/l y casaminoácidos 5 g/l).

2.2.2 Determinación de la expresión de variantes de EGFR en superficies de células de levadura

Se confirmó la expresión de las variantes de EGFR en las superficies de las células de levadura usando BD FACS Calibur™ (Becto Dickinson). Las células de levadura expresadas a una densidad de aproximadamente 1 x 10⁷ células/ml se hicieron reaccionar con AcM 9E10 anti-c-myc (dilución de 1:100) en 0,1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBSB que incluye BSA 1 mg/ml; pH 7,4) (a 25°C durante 30 minutos), y se lavaron con PBSB. Las células de levadura se hicieron reaccionar en segundo lugar con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con R-ficoeritrina (dilución de 1:25) en hielo durante 15 minutos, se lavaron con PBSB y después se

analizaron usando BD FACS Calibur™. A partir de los resultados de análisis, se reveló que las variantes de EGFR se expresaron bien sobre las superficies de las células de levadura (véase la figura 7).

2.2.3 Análisis de la unión entre variantes de EGFR y GC1118 usando citometría de flujo

5 La unión entre GC1118 y las variantes de EGFR expresadas en las superficies de las células de levadura se confirmó usando BD FACS Calibur™ (Becton Dickinson). Se usó cetuximab como anticuerpo de control. Las células de levadura expresadas a una densidad de aproximadamente 1×10^7 células/ml se hicieron reaccionar con 1 μ g de cada uno de los anticuerpos en 0,1 ml de PBSB (incluyendo BSA 1 mg/ml; pH 7,4) (a 25°C durante 30 minutos), y se lavaron con PBSB. Las células de levadura se hicieron reaccionar en segundo lugar con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con FITC (dilución de 1:50) en hielo durante 15 minutos, se lavaron con PBSB y después se midieron por 10 determinar la intensidad de fluorescencia media usando BD FACS Calibur™. Los resultados de medición se enumeran en la tabla 4 y se muestran en la figura 8. Tal como se observa a partir de la tabla 4, se demostró que la unión de GC1118 se inhibió en las variantes de EGFR en las que los epítomos (R353, F357 y H359 según una realización a modo de ejemplo de la presente invención a través del análisis estructural) se sustituyeron por glicina, y por tanto los residuos de aminoácido sustituidos fueron los epítomos de GC1118.

15 Tabla 4

Unión de antagonista a variantes de EGFR			
Variantes de EGFR	Nivel de expresión (%)	Actividad de unión a antagonista (%)	
		GC1118	Cetuximab
EGFR (tipo natural)	100	100	100
Variante 1 (R353G)	66,5	30,4	23,8
Variante 2 (F357G)	91,3	26,1	88,3
Variante 3 (H359G)	89,3	34,1	82,9
Variante 4 (R353G+F357G)	71,4	14,1	34,8
Variante 5 (F357G+H359G)	74,4	15	77,3
Variante 6 (R353G+H359G)	68	13,7	35,2
Variante 7 (R353G+F357G+H359G)	69,2	13,61	42,6

Ejemplo 3: Análisis de la unión competitiva de GC1118 y ligandos a EGFR

Para determinar si GC1118 y seis ligandos enumerados en la tabla 5 tenían sitios de unión idénticos o similares para EGFR, se llevó a cabo una prueba de unión competitiva. Se usó cetuximab como anticuerpo de control. En primer lugar, se hicieron reaccionar entre sí una concentración predeterminada de un anticuerpo (1,5 nM) y diversas 20 concentraciones de un ligando en una placa recubierta con 2 μ g/ml de EGFR. En este caso, el ligando estaba presente a una concentración tal que la razón molar del anticuerpo y el ligando ascendió a 1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵. La mezcla resultante se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se lavó cinco veces con PBST (incluyendo Tween20 al 0,05%; pH 7,4). Después, la mezcla se hizo reaccionar en segundo lugar con anticuerpo anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado con peroxidasa (Sigma A0170, EE.UU.) 25 a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se lavó cinco veces con PBST. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de una disolución de sustrato de peroxidasa de micropocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL 50-76-03, EE.UU.), y después se midió para determinar los valores de D.O. a 405 nm. Se observó que dos reactivos (el anticuerpo y el ligando) compitieron entre sí cuando la afinidad de unión de GC1118 a EGFR se redujo con una concentración creciente del ligando, indicando que los dos reactivos tenían los epítomos idénticos al EGFR, o estaban en una coincidencia muy cercana. La competición entre el anticuerpo y los ligandos se muestra en la 30 figura 9 y se enumera en la tabla 6. Como resultado, pudo observarse que GC1118 tiene una capacidad superior para inhibir la unión de EGF, TGF- α , BTC, EPR y HB-EGF, en comparación con cetuximab.

Tabla 5

Ligandos de EGFR usados	
Ligandos de EGFR humano	Detalles
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
TGF- α	Factor de crecimiento transformante- α
AR	Anfirregulina
BTC	B-celulina
EPR	Epirregulina
HB-EGF	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina

Tabla 6

Capacidades de unión competitiva de ligandos de EGFR frente a GC1118	
	Unión a anticuerpo (%)

Anticuerpo:ligando (razón molar)	GC1118		Cetuximab	
	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

Ejemplo 4: Efecto inhibitor sobre la proliferación celular inducido por ligandos de EGFR

Para comparar un efecto inhibitor en GC1118 de la presente invención y cetuximab sobre la proliferación de células cancerosas inducida por ligandos de EGFR, se propagó una línea celular de cáncer colorrectal, LS174T (ATCC, CL-188), en una placa de 96 pocillos (Nunc) de modo que el número de células ascendió a 3.000 células/ml. Después de un día, se retiró el medio de cultivo, y se trataron los medios de cultivo que no incluían albúmina sérica bovina con GC1118 y el anticuerpo de control, cetuximab, a concentraciones de 0,1, 1 y 10 μ g/ml. Al mismo tiempo que el tratamiento con anticuerpos, se trataron los medios de cultivo con ligandos de EGFR por tipo a concentraciones (EGF; 50 ng/ml, TGF- α ; 100 ng/ml, anfirregulina; 100 ng/ml, epirregulina; 300 ng/ml, HB-EGF; 50 ng/ml y β -celulina; 100 ng/ml), y después se incubaron a 37°C durante 3 días en un incubador de CO₂. Para medir el nivel de proliferación de células cancerosas después de 3 días, se añadieron 40 μ l de una disolución de MTS (reactivo de disolución CellTiter 96 Aqueous One, Promega) a las células cancerosas incubadas en la placa de 96 pocillos, se hicieron reaccionar a 37°C durante 3 horas en un incubador de CO₂ y después se midieron para determinar los valores de D.O. a 490 nm.

Como resultado, pudo observarse que GC1118 inhibió mucho más eficazmente la proliferación de las células cancerosas inducida por los ligandos EGF, TGF- α , HB-EGF y BTC, en comparación con cetuximab, lo que indica que estos resultados se correspondían con los del ejemplo 3.

A partir de los resultados anteriores, se reveló que los anticuerpos que tienen los epítomos según una realización a modo de ejemplo de la presente invención mostraban un efecto inhibitor superior sobre la proliferación celular dado que los anticuerpos tenían epítomos diferentes de cetuximab, y por tanto tenían la capacidad para inhibir la unión al ligando (véase la figura 10). En particular, los anticuerpos que se unen a los epítomos según una realización a modo de ejemplo de la presente invención pueden usarse para tratar diversas enfermedades tales como cáncer desarrolladas por la activación de EGFR debido a la unión de no sólo EGF sino también los otros ligandos de EGFR ya que los anticuerpos inhiben eficazmente la unión de los diversos ligandos de EGFR tales como no sólo EGF sino también TGF- α , AR, BTC, EPR y HB-EGF a EGFR.

25 **Aplicabilidad industrial**

Los epítomos en EGFR proporcionados según una realización a modo de ejemplo de la presente invención están altamente conservados y ubicados en un dominio asociado estrechamente con la unión a EGF. Por tanto, las composiciones que incluyen anticuerpos contra los epítomos, o las composiciones de vacuna que incluyen los epítomos pueden bloquear eficazmente la transducción de señales provocada por la unión de EGR a EGFR, y por tanto pueden ser altamente valiosas y útiles en el tratamiento de diversas enfermedades tales como cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Green Cross Corporation
Mogam Biotechnology Research Institute

35 <120> Epítomo y uso de receptor de factor de crecimiento epidérmico

<130> PP-1202

40 <150> 61/616.073

<151> 27-03-2012

<160> 22

45 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 621

<212> PRT

50 <213> humano

ES 2 694 679 T3

<400>

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

ES 2 694 679 T3

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									
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									
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									
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				
						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				

ES 2 694 679 T3

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
5 <212> PRT
<213> humano

<400> 2
Arg Gly Asp Ser Phe Thr His
1 5
10

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> humano
15

<400> 3
Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro
1 5
20

<210> 4
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> pCTCON-For

<400> 4
cggctagcct ggaggaaaag aaagttgc 29

<210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> pCTCON-Rev

<400> 5
cgacgcgttg gacgggatct taggccc 27

<210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> R353G-For

<400> 6
50 ctgccggtgg cattggcgg tgactcctc aca 33

<210> 7
<211> 33

ES 2 694 679 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> R353G-Rev

 <400> 7
 tgtgaaggag tcaccgcaa atgccaccgg cag 33

 10 <210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> F357G-For

 <400> 8
 20 ttaggggtg actccggcac acatactct cct 33

 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> F357G-Rev

 <400> 9
 30 aggaggagta tgtgtgccgg agtcaccct aaa 33

 <210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> H359G-For

 <400> 10
 40 ggtgactct tcacaggcac tcctcctg gac 33

 <210> 11
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> H359G-Rev
 50
 <400> 11
 gtccagagga ggagtcctg tgaaggagtc acc 33

 <210> 12
 55 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> R353G,F357G-For

 <400> 12
 ctgccggtgg catttggcgg tgactccggg acacatactc ctct 45

 65 <210> 13
 <211> 45

ES 2 694 679 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> R353G,F357G-Rev	
	<400> 13	
	aggaggagta tgtgtcccgg agtcaccgcc aaatgccacc ggcag	45
10	<210> 14	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> F357G,H359G-For	
	<400> 14	
20	tttaggggtg actccggcac agggactcct cctctggac	39
	<210> 15	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> F357G,H359G-Rev	
	<400> 15	
30	gtccagagga ggagtccctg tgccggagtc acccctaaa	39
	<210> 16	
	<211> 51	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> R353G,H359G-For	
40	<400> 16	
	ctgccggtgg catttggcgg tgactcctc acaggtactc ctctctgga c	51
	<210> 17	
	<211> 51	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> R353G,H359G-Rev	
50	<400> 17	
	gtccagagga ggagtacctg tgaaggagtc accgccaat gccaccggca g	51
	<210> 18	
55	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> R353G,F357G,H359G-For	
	<400> 18	
	ctgccggtgg catttggcgg tgactccgga acaggtactc ctctctgga c	51
65	<210> 19	
	<211> 51	

ES 2 694 679 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> R353G,F357G,H359G-Rev

<400> 19
gtccagagga ggagtacctg tccggagtc accgcaaat gccaccggca g 51

10 <210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> seq-FI

<400> 20
20 atgaaggttt tgattgtctt gttgg 25

<210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> seq-FI

<400> 21
30 ccagtgactg ctgccacaac cagtg 25

<210> 22
<211> 25
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> seq-FI

<400> 22
40 cgtcggcctg aacataacat ccttg 25

REIVINDICACIONES

1. Epítopo de un receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que consiste en la secuencia de aminoácidos de RGDSFTH (SEQ ID NO: 2) o RGDSFTHTP (SEQ ID NO: 3).
- 5 2. Complejo en el que el epítopo según la reivindicación 1 se une a un portador, en el que el portador es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un péptido, albúmina sérica, inmunoglobulina, hemocianina y polisacárido.
3. Polinucleótido que codifica cualquiera de los epítomos según la reivindicación 1.
4. Vector recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 3.
- 10 5. Vector recombinante según la reivindicación 4, que comprende un promotor que induce la expresión del epítopo en la superficie de una célula de microorganismo o virus, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína señal.
6. Microorganismo o virus recombinante transformado con el vector recombinante según la reivindicación 4 ó 5, en el que el microorganismo o virus recombinante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en una *E. coli* recombinante, una levadura recombinante y un bacteriófago recombinante.
- 15 7. Método de preparación del epítopo, en el que dicho epítopo consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que dicho método comprende cultivar el microorganismo o virus recombinante según la reivindicación 6 que expresa el vector recombinante según la reivindicación 4 o reivindicación 5.
- 20 8. Composición de vacuna para uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que dicha composición comprende el epítopo según la reivindicación 1, el complejo según la reivindicación 2 que comprende el epítopo o el polinucleótido según la reivindicación 3 que codifica para el epítopo.
9. Composición de vacuna para su uso según la reivindicación 8, que comprende además un adyuvante farmacéuticamente aceptable que mejora la formación de un anticuerpo cuando se inyecta dentro de un organismo, en el que el adyuvante es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en sales de aluminio (Al(OH)₃, AlPO₄), escualeno, sorbitano, polisorbato 80, CpG, liposoma, colesterol, MPL (monofosforil lípido A) y GLA (glucopiranosil lípido A).
- 25 10. Composición de vacuna para su uso según la reivindicación 8, en la que el polinucleótido se incluye en un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en la que el portador farmacéuticamente aceptable es un portador vírico o no vírico.
- 30 11. Método de producción de un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo policlonal o monoclonal, o un fragmento del mismo, que se une específicamente al epítopo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3,
usando el epítopo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; un complejo que comprende el epítopo o un polinucleótido que codifica para el epítopo.
- 35 12. Método según la reivindicación 11, que comprende las etapas de:
administrar a un animal no humano el epítopo, el complejo que comprende el epítopo o el polinucleótido que codifica para el epítopo; y
cribar el anticuerpo del animal que se une específicamente al epítopo.
- 40 13. Método según la reivindicación 12, que comprende además la etapa de llevar a cabo
• humanización, que comprende preferiblemente injertar una secuencia de CDR del anticuerpo producido en el animal en la región de entramado (FR) de un anticuerpo humano; o
• desinmunización.
- 45 14. Método según la reivindicación 13, que comprende además la etapa de llevar a cabo sustitución, inserción o delección de al menos un aminoácido para mejorar la afinidad o reducir la inmunogenicidad.
15. Método según la reivindicación 12 en el que el animal no humano es un animal transgénico que puede producir un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un anticuerpo humano, en el que el animal transgénico es preferiblemente un ratón transgénico.
16. Método según la reivindicación 11, que emplea una técnica de presentación en el que la técnica de

presentación se selecciona preferiblemente del grupo que comprende presentación en fagos, presentación en bacterias y presentación en ribosomas, y en el que la presentación emplea preferiblemente una biblioteca diseñada para comprender una secuencia de anticuerpo originada en ser humano.

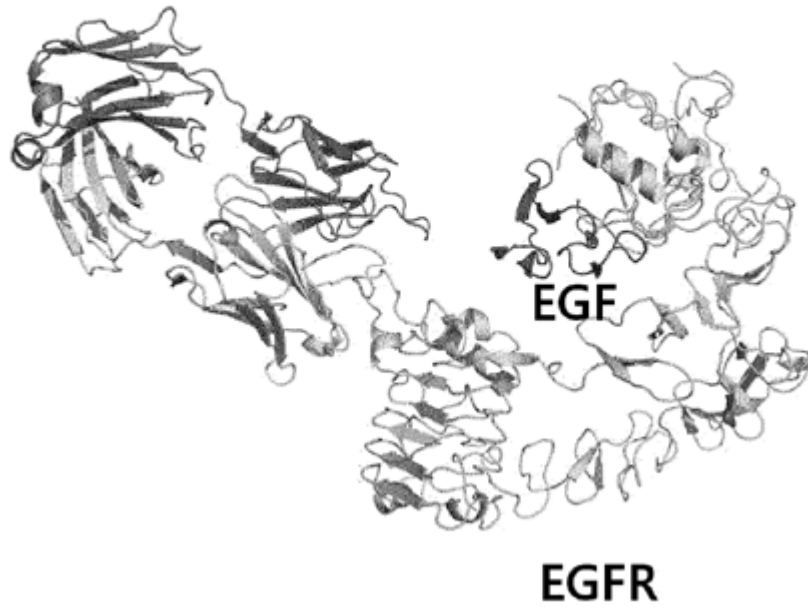
- 5 17. Método según la reivindicación 16, que comprende cribar el anticuerpo que se une específicamente al epítipo, o al complejo que comprende el epítipo.

[Fig. 1]



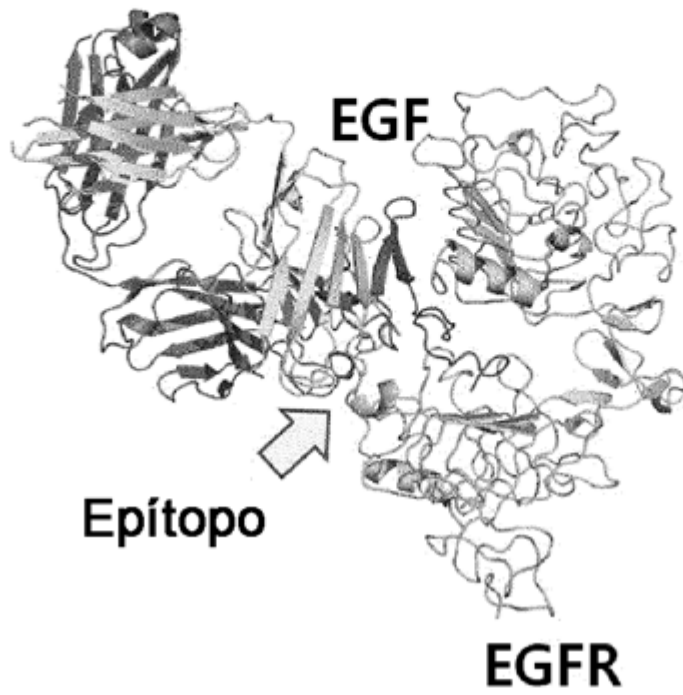
[Fig. 2]

Fab de GC1118



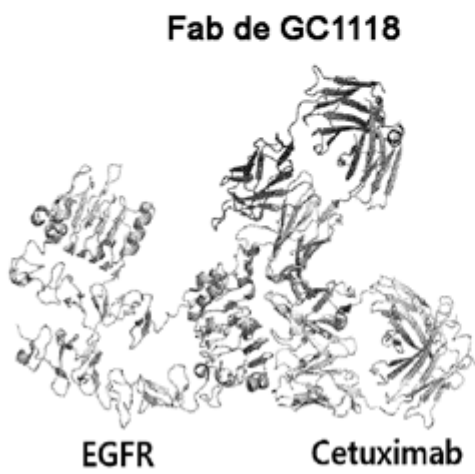
[Fig. 3]

Fab de GC1118

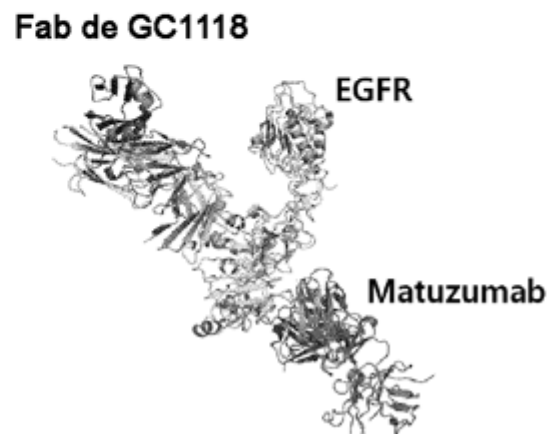


[Fig. 4]

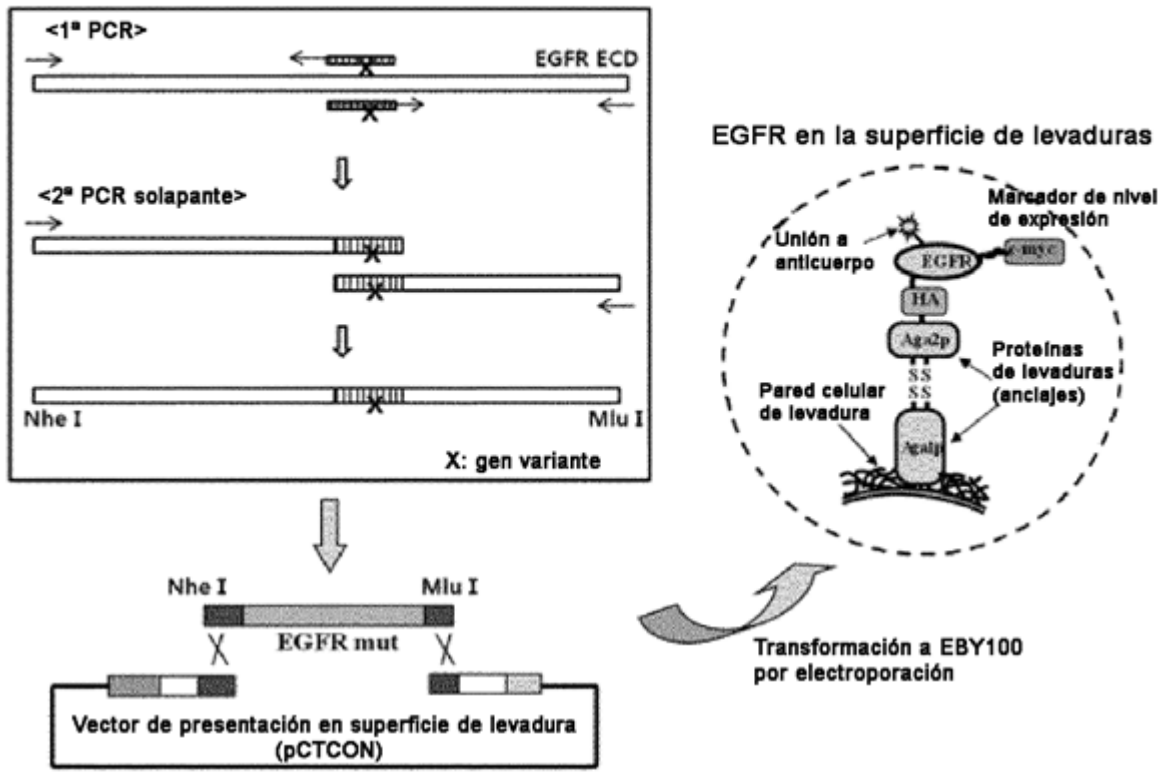
(A)



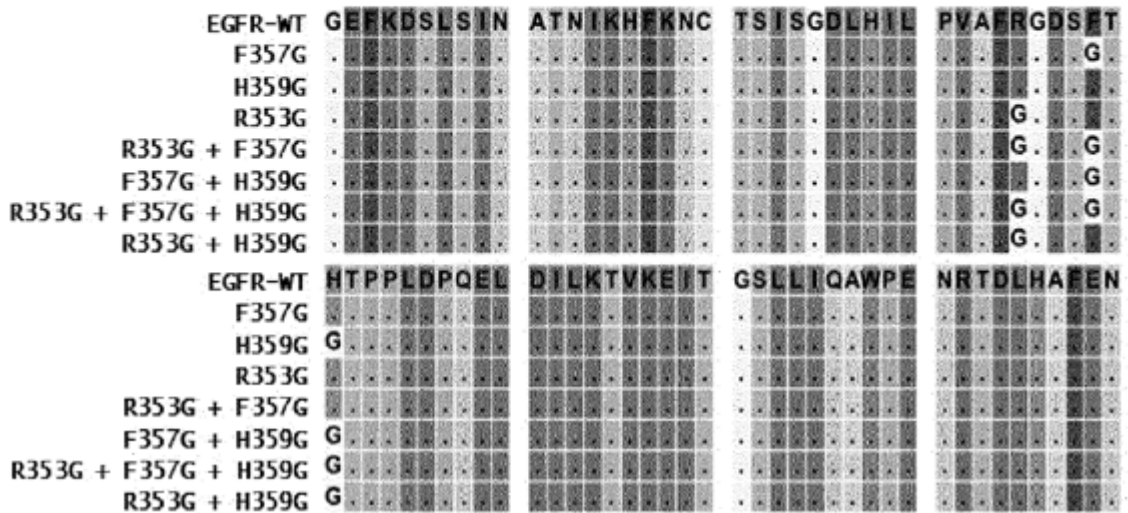
(B)



[Fig. 5]

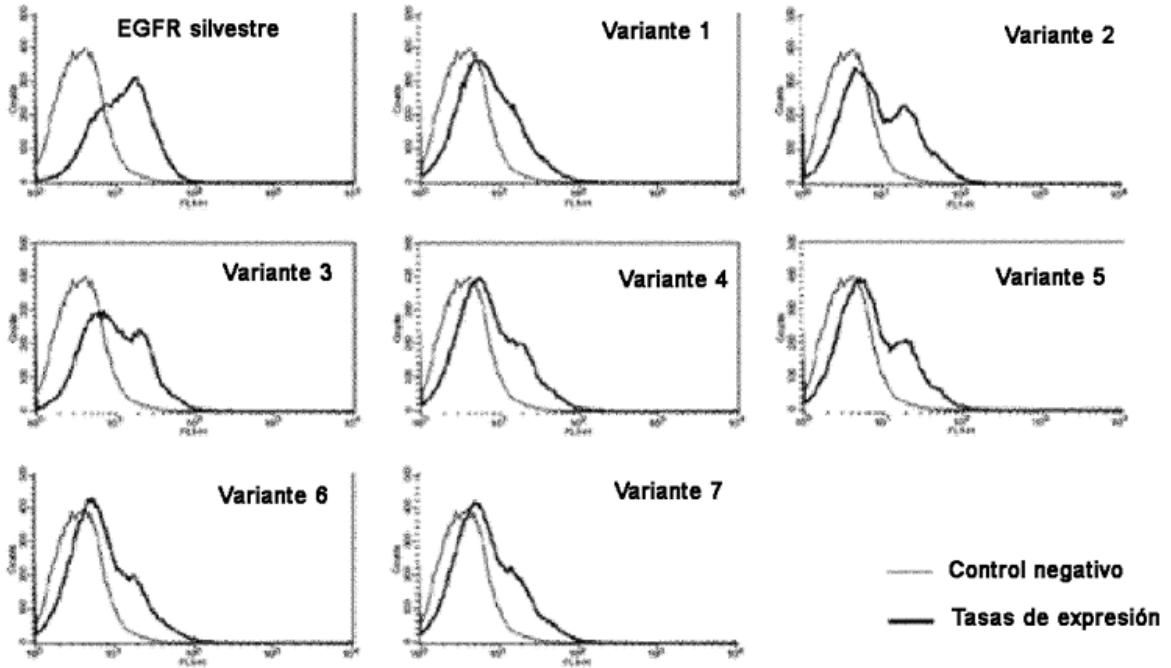


[Fig. 6]



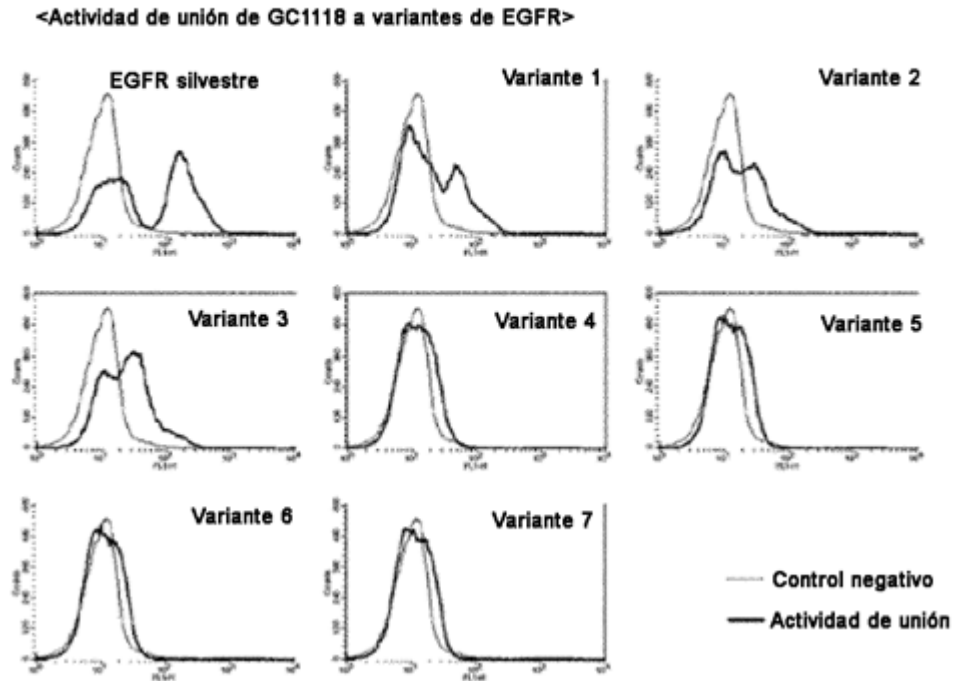
[Fig. 7]

<Tasas de expresión de variantes de EGFR>

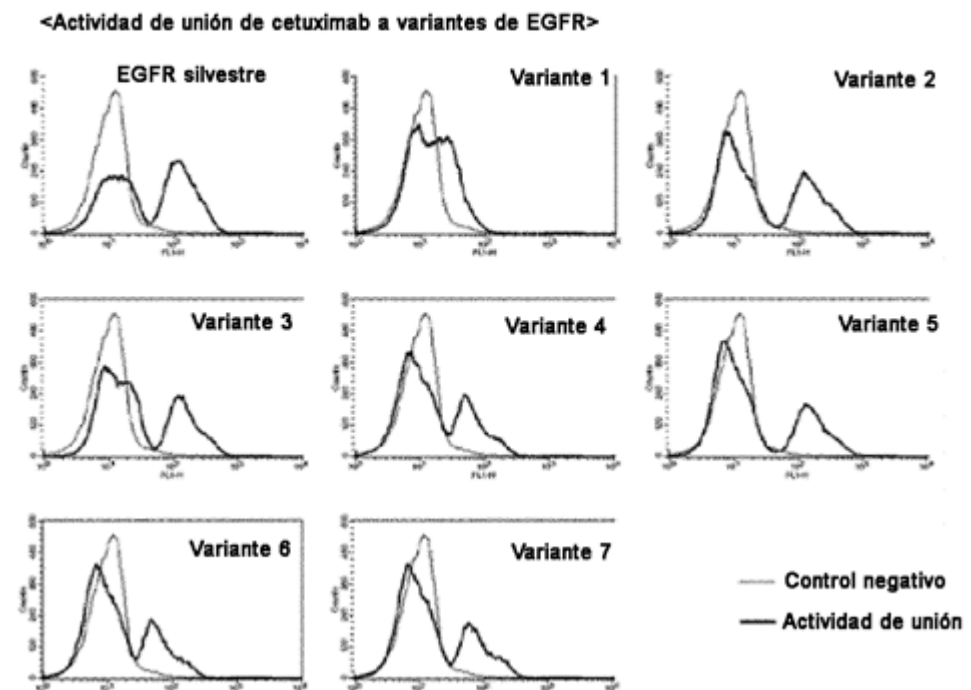


[Fig. 8]

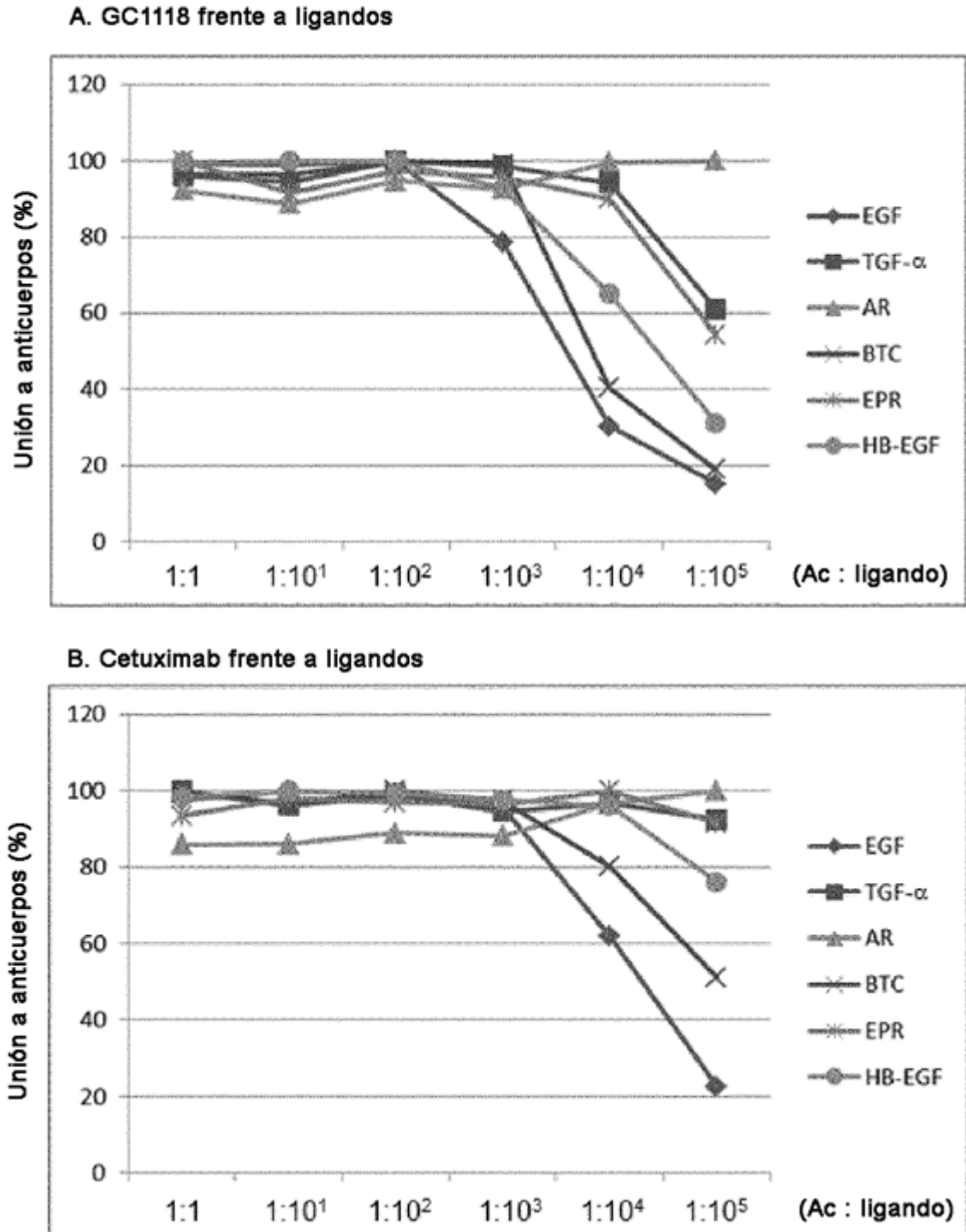
(A)



(B)



[Fig. 9]



[Fig. 10]

