



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.21

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
202091328

(22) Дата подачи заявки
2018.11.20

(54) АНТИТЕЛА С ПОВЫШЕННОЙ АФФИННОСТЬЮ К РЕЦЕПТОРУ
ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ НИХ ФРАГМЕНТЫ

(31) 2017-0148

(32) 2017.11.28

(33) CU

(43) 2020.09.17

(86) PCT/CU2018/050004

(87) WO 2019/105492 2019.06.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОХИЯ
МОЛЕКУЛАР (CU)

(72) Изобретатель:
Тундидор Кабадо Яйма, Рохас
Дорантес Гертрудис, Леон Монсон
Калет (CU)

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(56) JANICE M. REICHERT: "Marketed therapeutic antibodies compendium", MABS, vol. 4, no. 3, 1 de mayo de 2012 (2012-05-01), paginas 413-415, XP055217424, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.19931 pagina 415; tabla 3
WARK K.L. ET AL. "Latest technologies for the enhancement of antibody affinity", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 5-6, 7 de agosto de 2006 (2006-08-07), paginas 657-670, XP024892147, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2006.01.025, [recuperado el 2006-08-07]. pagina 662

KIM HYUNG-YONG ET AL. "Affinity Maturation of Monoclonal Antibodies by Multi-Site-Directed Mutagenesis", 1 deenerode 2014 (2014-01-01), MONOCLONAL ANTIBODIES: METHODS AND

PROTOCOLS / ED. BY VINCENT OSSIPPOW; NICOLAS FIS; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, ISSN 1064-3745], NEW YORK [U.A.]: HUMANA PR., 2014, US, PAGE(S) 407-420, XP008182231, ISBN: 978-1-62703-991-8, pagina 408

Holger E. Thie: "Affinity maturation by random mutagenesis and phage display" In: "Antibody Engineering Vol. 1", 1 de enero de 2010 (2010-01-01), Springer, Berlin, Heidelberg, DE, XP55310998, vol. 1, paginas 397-409, DOI: 10.1007/978-3-642-01144-3_26, pagina 397 - pagina 205

Juan C. Almagro ET AL. "Antibody engineering: Humanization, affinity maturation, and selection techniques" In: "Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic", 1 de octubre de 2009 (2009-10-01), Wiley, Hoboken, US, XP55311028, paginas 311-334, DOI: 10.1002/9780470485408.ch13, pagina 311 - pagina 330

RENAUT LAURENCE ET AL. "Affinity maturation of antibodies: optimized methods to generate high-quality ScFv libraries and isolate IgG candidates by high-throughput screening", METHODS IN MOLECULAR BIO., vol. 24, 1 deenerode 2007 (2007-01-01), paginas 301-317, XP009185709, DOI: 10.1007/978-1-61779-974-7_26 pagina 451 - pagina 461

"In vitro affinity maturation of recombinant antibodies by combination of pre-selected CDR-library pools", IPCOM JOURNAL, IPCOM INC., WEST HENRIETTA, NY, US, 16 de octubre de 2007 (2007-10-16), XP013122437, ISSN: 1533-0001, pagina 1 - pagina 7

E.-C. BROCKMANN ET AL. "Synthetic single-framework antibody library integrated with rapid affinity maturation by VL shuffling", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 24, no. 9, 16 de junio de 2011 (2011-06-16), paginas 691-700, XP55378273, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzr023, pagina 691 - pagina 699

US-A-5891996

(57) В изобретении предложены новые антитела (АТ) и фрагменты, которые распознают внеклеточную область рецептора эпидермального фактора роста человека (hEGFR) с более высокой аффинностью, чем АТ нимотузумаб, что позволяет более эффективно распознавать линии со средней экспрессией EGFR. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим в качестве активного начала раскрытые в изобретении АТ и их фрагменты, и к их применению при лечении опухолей с экспрессией EGFR. Кроме того, изобретение относится к применению раскрытых в настоящей заявке АТ и фрагментов, связанных с радиоизотопом или флуорофором, для локализации EGFR-положительных опухолей. Кроме того, раскрытые в изобретении АТ и их фрагменты могут быть применены для направления иммунного ответа на EGFR-положительные опухолевые клетки при их слиянии с белком или белковыми доменами, представляющими иммунологический интерес.

Область техники

Изобретение относится к областям биотехнологии и медицины, в частности к вариантам моноклонального антитела (mAb) нимотузумаба и происходящим из них антигенсвязывающим фрагментам, которые имеют мутации в CDR1 и CDR2 варибельной области тяжелой цепи и распознают внеклеточную область рецептора эпидермального фактора роста человека (hEGFR) с большей аффинностью, а также их диагностическое и терапевтическое применение.

Уровень техники

EGFR представляет собой трансмембранный гликопротеин, который имеет внеклеточную лигандсвязывающую область и внутриклеточную область, имеющую тирозинкиназную активность. Указанные лиганды включают: эпидермальный фактор роста (EGF), амфирегулин, трансформирующий фактор роста α , бетацеллюлин, эпирегулин и гепаринсвязывающий EGF (Olayioye, M. et al., *The EMBO Journal*, 19: 3159-3167, 2000; Yarden, Y. and Sliwkowski, M., *Nature Reviews*, 2: 127-137, 2001). Связывание лигандов с рецептором вызывает конформационные изменения и изменения расположения во внеклеточной области, которые вызывают димеризацию и активацию рецептора (Ogiso, H. et al., *Cell* 110: 775-787, 2002). Данный рецептор участвует в различных клеточных процессах, которые способствуют поддержанию и выживанию эпителиальных клеток. Однако нарушение регуляции пути EGFR/EGF вследствие избыточной экспрессии или конститутивной активации способствует пролиферации опухолевых клеток, инвазии, и связана с плохим прогнозом при многих злокачественных новообразованиях (Yarden Y. and Sliwkowski, M., *Nature Reviews*. 2: 127-137, 2001). По этой причине EGFR считают ассоциированным с опухолью антигеном (АГ), который очень важен для разработки противоопухолевой терапии.

В настоящее время на рынке присутствуют три mAb против EGFR: цетуксимаб (Erbix), панитумумаб (Vectibix) и нимотузумаб (TheraCIM) (Reichert, J., *MAbs*.4: 413-415, 2012), и еще семь находятся в фазах I-III клинических испытаний (Reichert, J. and Dhimolea, E., *Drug Discovery Today*, 17: 954-963, 2012). Они были специально разработаны для распознавания внеклеточной области EGFR, конкурентного ингибирования связывания лигандов и димеризации рецептора и, таким образом, ингибирования аутофосфорилирования рецептора и сигнального каскада, который приводит к его активации (Burgess, A. и др., *Molecular Cell*, 12: 541-552, 2003).

Нимотузумаб (mAb R3) представляет собой гуманизированное mAb изотипа IgG1, которое распознает hEGFR, полученное путем клонирования ДНК гиперварибельных областей мышинных mAb ior egf/r3 и каркасов варибельных и константных областей тяжелых и легких цепей человека (REI и NEWN соответственно) (Mateo, C. et al., *Immunotechnology* 3: 71-8, 1997). MAb R3 распознает EGFR с аналогичной аффинностью и обладает такой же способностью ингибировать связывание EGF с рецептором, что и его мышинный предшественник. Данный вариант является менее иммуногенным, чем химерный вариант mAb ior egf/r3 (Mateo, C. et al., *Immunotechnology* 3: 71-8, 1997). Нимотузумаб распознает эпитоп в домене III внеклеточной области EGFR, который перекрывается с сайтом связывания лигандов в этом домене, что объясняет его способность блокировать связывание лиганда и последующую активацию рецептора (Tundidor, Y. et al., *MAbs* 6: 1013-1025, 2014). Эффективность нимотузумаба была продемонстрирована в клинических испытаниях на пациентах с опухолью головы и шеи (Crombet, T. et al., *J Clin Oncol* 22: 1646-1654, 2004), глиомой (Ramos, T. et al., *Cancer Biol. Ther.*5: 375-379, 2006; MacDonald, T. et al., *Neuro Oncol.*, 13: 1049-1058, 2011) и опухолью пищевода (Ramos-Suzarte, M. et al., *Cancer Biology & Therapy* 13: 600-605, 2012). Данное антитело (АТ) находится в фазе III клинических испытаний при раке носоглотки, локально прогрессирующем раке пищевода и плоскоклеточной карциноме пищевода (Galluzzi, L. et al., *Oncolmmunology*, 1: 28-37, 2012).

В отличие от других АТ, направленных против EGFR, как в доклинических испытаниях на зеленых обезьянах *Sercopithecus aethiops sabaecus* (Arteaga, M. и др., *Cancer Biology & Therapy*. 6: 1390-1395, 2007), так и в клинических испытаниях (Crombet, T. et al. *J Clin Oncol* 22: 1646-1654, 2004; Ramos T. et al., *Cancer Biol Ther* 5: 375-379, 2006; Ramos-Suzarte M. et al., *Cancer Biology & Therapy* 13: 600-605, 2012; Strumberg, D. et al., *Invest New Drugs*, 30: 1138-1143, 2010) нимотузумаба не было обнаружено никаких признаков тяжелой токсичности, обычно связанных с препаратами, направленными против этого АГ. Эти данные свидетельствуют о том, что нимотузумаб является единственным анти-EGFR агентом, который можно применять на постоянной основе (Allan, D., *The Oncologist*, 10: 760-761, 2005). Профиль низкой токсичности, но с противоопухолевым эффектом, данного mAb может быть обусловлен его средней аффинностью (10-8) (Crombet, T. et al., *J Clin Oncol* 22: 1646-1654, 2004). Авторы предполагают, что mAb с промежуточной аффинностью должны обладать высоким противоопухолевым эффектом и низкой токсичностью, поскольку усвоение в опухоли (высокая экспрессия EGFR) преобладает над усвоением в нормальной кани (низкая экспрессия EGFR). С другой стороны, высокоаффинные mAb (такие как цетуксимаб) будут захвачены как опухолевыми, так и нормальными клетками; и низкая аффинность mAb будет иметь небольшой эффект из-за низкого включения в опухоли (Crombet, T. et al., *J Clin Oncol* 22: 1646-1654, 2004). Однако было описано, что противоопухолевый эффект нимотузумаба зависит от экспрессии EGFR, поскольку его эффективность снижается в опухолях со средней или низкой экспрессией этого рецептора (Akashi, Y. et al., *British Journal of Cancer*, 98: 749-755, 2008). Следовательно, получение варианта нимотузумаба с умеренно увеличенной аффинностью к рецептору может обеспечить получение ан-

титела (АТ) с более сильным противоопухолевым эффектом, но в то же время сохраненной низкой токсичностью. Получение этого варианта нимотузумаба со средней аффинностью и сохранение его точной специфичности к эпитопу (которая является уникальной среди терапевтических АТ против EGFR) (Tundidor, Y. et al., MAbs 6: 1013-1025, 2014) будет способствовать сохранению ценных свойств исходного антитела.

Аффинное созревание АТ представляет собой процесс, который происходит естественным образом; однако с развитием комбинаторной биологии это явление было воспроизведено в лаборатории. Такие технологии направленной эволюции требуют разных этапов: мутации, отображения (дисплея), селекции и амплификации (Wark, K. and Hudson, P., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 657-670, 2006). Технология фагового дисплея обеспечивает мощную платформу для создания новых АТ человека, а также для улучшения их аффинности *in vitro* (Hoogenboom, H., *Nat Biotechnol*, 23: 1105-1116, 2005).

Авторы настоящего изобретения обнаружили отображенные на фагах мутантные варианты нимотузумаба с повышенной способностью связываться с внеклеточной областью hEGFR. Набор мутаций, которыми обладают эти варианты, ранее не был описан и не может быть предсказан, исходя из анализа кристаллической структуры антигенсвязывающего фрагмента (Fab) нимотузумаба. Следовательно, новизна настоящего изобретения заключается в обеспечении новых фрагментов и mAb, которые распознают hEGFR с более высокой аффинностью (в 3-4 раза выше), таким образом, указанные фрагменты и mAb могут распознавать линии со средней экспрессией EGFR более эффективно, чем нимотузумаб. Аналогично, данные mAb показали большую способность ингибировать лиганд-опосредованное фосфорилирование EGFR по сравнению с нимотузумабом, что указывает на то, что они обладают более сильным противоопухолевым эффектом, чем нимотузумаб. Все вышеперечисленное подтверждает возможность применения этих фрагментов и mAb в диагностике или лечении опухолей со средней экспрессией EGFR.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным mAb, которые распознают внеклеточную область hEGFR Her1 и обладают более, чем 95% идентичностью по отношению к антителу нимотузумаб.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к mAb, где последовательности области, определяющей комплементарность (CDR), CDR2 вариательной области тяжелых цепей, выбраны из группы, включающей:

SEQ ID NO. 20 и

SEQ ID NO. 21,

последовательности CDR1 и CDR3 тяжелых цепей представляют собой SEQ ID NO. 9 и SEQ ID NO. 3 соответственно, и последовательности CDR вариательной области легких цепей представляют собой:

CDR 1 SEQ ID NO. 22,

CDR 2 SEQ ID NO. 23,

CDR 3 SEQ ID NO. 24.

В другом варианте реализации рекомбинантные mAb согласно настоящему изобретению характеризуются тем, что последовательность CDR2 вариательной области тяжелых цепей выбрана из группы, включающей:

SEQ ID NO. 10,

SEQ ID NO. 11,

SEQ ID NO. 12,

SEQ ID NO. 17,

SEQ ID NO. 18 и

SEQ ID NO. 29,

последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO. 9, и последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO.3 в указанных тяжелых цепях, и последовательности CDR вариательной области легких цепей представляют собой:

CDR 1 SEQ ID NO. 22,

CDR 2 SEQ ID NO. 23,

CDR 3 SEQ ID NO. 24.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к mAb, где последовательность CDR2 вариательной области тяжелых цепей выбрана из группы, включающей:

SEQ ID NO. 2 и

SEQ ID NO. 8,

последовательности CDR1 и CDR3 тяжелых цепей представляют собой SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 3, соответственно, и последовательности CDR вариательной области легких цепей представляют собой:

CDR 1 SEQ ID NO. 22,

CDR 2 SEQ ID NO. 23,

CDR 3 SEQ ID NO. 24.

В дополнительном варианте реализации mAb согласно настоящему изобретению характеризуются тем, что последовательность CDR1 вариательной области тяжелых цепей выбрана из группы, включающей:

SEQ ID NO. 13 и
SEQ ID NO. 19,
последовательности CDR2 и CDR3 тяжелых цепей представляют собой SEQ ID NO. 14 и SEQ ID NO. 3, соответственно, и последовательности CDR варибельной области легких цепей представляют собой:

CDR 1 SEQ ID NO. 22,
CDR 2 SEQ ID NO. 23,
CDR 3 SEQ ID NO. 24.

В частности, настоящее изобретение относится к mAb, характеризующемуся наличием следующей последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей:

Тяжелая цепь
CDR1 SEQ ID NO. 15,
CDR2 SEQ ID NO. 16,
CDR3 SEQ ID NO. 3,

Легкая цепь
CDR 1 SEQ ID NO. 22,
CDR 2 SEQ ID NO. 23,
CDR 3 SEQ ID NO. 24.

Настоящее изобретение включает все вышеуказанные mAb, в которых при этом каркасные области (FW) варибельной области тяжелой и легкой цепей имеют следующие последовательности:

Тяжелая цепь
FW 1 SEQ ID NO. 4,
FW 2 SEQ ID NO. 5,
FW 3 SEQ ID NO. 6,
FW 4 SEQ ID NO. 7,

Легкая цепь
FW 1 SEQ ID NO. 25,
FW 2 SEQ ID NO. 26,
FW 3 SEQ ID NO. 27,
FW 4 SEQ ID NO. 28.

Кроме того, раскрытые AT включают константные области тяжелой цепи IgG1 человека и области легкой цепи каппа человека.

В конкретном варианте реализации настоящее изобретение относится к фрагментам, полученным из вышеуказанных AT, где указанные фрагменты могут быть Fab-типа, (Fab)₂ и одноцепочечными фрагментами варибельной области.

В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которую можно применять при лечении рака, которая в качестве активного начала имеет раскрытые в настоящей заявке mAb или их фрагменты в диапазоне от 50 до 400 мг, и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которую можно применять в диагностике опухолей, активным началом которой являются раскрытые в настоящей заявке mAb или их фрагменты в диапазоне от 1 до 9 мг, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к применению раскрытых в настоящей заявке mAb и их фрагментов для лечения опухолей, которые экспрессируют EGFR; а также при диагностике опухолей, несущих EGFR, при этом указанные mAb и фрагменты конъюгированы с соответствующим маркером. Настоящее изобретение также относится к применению указанных mAb и их фрагментов для направления иммунного ответа против EGFR-положительных опухолей, при этом указанные mAb и фрагменты конъюгированы с белками или белковыми доменами, представляющими иммунологический интерес.

Подробное описание изобретения

Получение фрагментов с повышенной способностью связываться с внеклеточной областью EGFR человека, происходящих из нимотузумаба.

Настоящее изобретение относится к 13 фрагментам, происходящим из нимотузумаба, которые имеют более 97% идентичности с его аминокислотной последовательностью и обладают повышенной способностью связываться с внеклеточной областью hEGFR. Мутации в вариантах, описанные в настоящем изобретении, приводят к получению вариантов нимотузумаба со способностью распознавать большее количество клеток человека со средней экспрессией EGFR по сравнению с исходным Fab нимотузумаба.

Фрагменты, описанные в настоящем изобретении, благодаря их способности связываться с внеклеточной областью hEGFR, могут быть получены путем отбора мутантных вариантов Fab нимотузумаба из библиотек, содержащих более 10⁷ молекул, отобранных на нитчатых фагах. Соответствующие этим вариантам гены могут быть встроены в векторы экспрессии фагмидного типа (слиты с одним из генов, кодирующих белки капсида нитчатого фага) и применены для получения вирусных частиц, которые экс-

понируют на своей поверхности варианты белков. Исходные библиотеки могут включать различную степень многообразия в наборе позиций областей, определяющих комплементарность (CDR), что может позволить тщательно изучить эту область, которая функционально важна для взаимодействия АГ-АТ. Каждый из исходных остатков в этих положениях может быть заменен комбинацией из 20 аминокислот, заранее определенным набором остатков, которые обладают некоторым(и) общими физико-химическим(и) свойством(ами), таким(и) как гидрофобность, ароматический характер, суммарный заряд и/или размер, или подвергаться небольшой случайной рандомизации путем введения незначительной доли случайной комбинации нуклеотидов в каждой соответствующей позиции кодона (что будет поддерживать преобладание исходной последовательности). Выбранные позиции могут быть варьировать одновременно в одной библиотеке или в нескольких отдельных библиотеках. Эти библиотеки могут содержать различные пропорции молекул с одной или несколькими мутациями, консервативными или нет, по отношению к исходному Fab нимотузумаба.

Отбор аналогичных фрагментов и mAb нимотузумаба с повышенной способностью связывания с внеклеточной областью hEGFR.

Отбор фагов, имеющих варианты с повышенной способностью связываться с внеклеточной областью hEGFR, может быть основан на инкубации смесей фагов из библиотек в контакте с иммобилизованным на твердой поверхности АГ hEGFR, удалении не связавшихся фагов путем промывания и элюирования связанных фагов в условиях, которые мешают взаимодействию белков. Несколько последовательных циклов селекции можно выполнять в одинаковых условиях. Анализ последовательностей ДНК, встроенных в выбранные фагмиды, может выявить закономерности, приводящие к выявлению наиболее распространенной замены, которая может быть связана с увеличенной способностью к связыванию с EGFR. Обнаруженные повторяющиеся мутации, будь то индивидуальные модификации или комбинации изменений, выбранные непосредственно из библиотек, могут быть объединены между собой для формирования новых вариантов и обеспечения дополнительного увеличения способности к связыванию с EGFR.

Способность к связыванию с hEGFR каждого из вариантов, выбранных непосредственно из библиотек или спроектированных и сконструированных позже, может быть оценена иммунохимическими методами с использованием преимуществ формата фагового дисплея, который позволяет одновременно характеризовать несколько вариантов.

В качестве альтернативы, фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть получены путем использования других платформ комбинаторной биологии, таких как рибосомы или дрожжевые дисплеи.

Кроме того, гены, которые кодируют новые переменные области, могут быть клонированы в векторы экспрессии клеток млекопитающих и могут производить рекомбинантные mAb, содержащие новые мутации. Также можно подтвердить, что при использовании данного формата полученные mAb по сравнению с нимотузумабом сохраняют способность преимущественно распознавать внеклеточную область hEGFR посредством измерений аффинности на основе поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore).

Демонстрация функционального превосходства новых mAb и их фрагментов, происходящих из нимотузумаба.

Функциональное превосходство каждого из вариантов фрагментов, выбранных непосредственно из библиотек или впоследствии сконструированных в виде фрагментов или в формате полных АТ, может быть продемонстрировано в анализах *in vitro* или *in vivo*. Для каждого варианта распознавание клеточных линий с различной экспрессией EGFR можно оценить с помощью проточной цитометрии, удостоверившись, что новые варианты распознают более высокий процент положительных клеток и с более высокой средней интенсивностью флуоресценции; и этот эффект более выражен в линиях со средней или низкой экспрессией EGFR. Для этой цели будут применять клетки со следующими характеристиками:

высокая экспрессия EGFR: такая как плоскоклеточная карцинома A431 человеческого происхождения, аденокарцинома молочной железы MDA-MB-468 с метастазами в плевральную жидкость человеческого происхождения, не ограничиваясь указанными;

средняя экспрессия EGFR: аденокарцинома легкого H125 и H292 человеческого происхождения, не ограничиваясь указанными;

низкая экспрессия EGFR: мелкоклеточный рак легкого U1906 человеческого происхождения, аденокарцинома молочной железы MDA-MB-231 человеческого происхождения, карцинома яичника SKOV3, рак молочной железы SKBR3, не ограничиваясь указанными.

Способность каждого mAb или его фрагмента ингибировать фосфорилирование EGFR, опосредованное его лигандом (EGF), также можно оценивать при различных концентрациях и в клеточных линиях с различной экспрессией EGFR. Анализы ингибирования пролиферации с помощью Alamar blue также можно проводить на линиях с различной экспрессией рецептора. Кроме того, способность каждого mAb индуцировать АТ-зависимую клеточную цитотоксичность может быть определена в линиях с различной экспрессией рецептора. Во всех случаях можно ожидать, что варианты с более высокой аффинностью демонстрируют больший эффект и что он будет более выражен в линиях со средней или низкой экспрессией EGFR.

С другой стороны, может быть измерен противоопухолевый эффект mAb или их фрагментов у бестимусных мышей, несущих человеческие опухоли, с различной экспрессией EGFR, где будет измеряться задержка роста опухоли.

Кроме того, фрагменты или mAb с радиоактивными изотопами или флуорофорами могут быть помечены и инокулированы в бестимусных мышей, несущих человеческие опухоли, с различной экспрессией EGFR. Это позволяет оценить способность фрагментов распознавать опухоли *in vivo*, что подтверждает их применение в качестве инструментов для диагностики рака путем получения изображений.

Терапевтическое применение и способы лечения новыми mAb и происходящими из них фрагментами.

Новые mAb и их фрагменты, полученные в настоящем изобретении, имеют более высокую аффинность, чем нимотузумаб, что позволяет применять их в сценариях, где у нимотузумаба есть ограничения, например, в клетках с низкой или средней экспрессией EGFR. Указанные mAb могут быть применены при лечении пациентов с опухолями головы и шеи, глиомой, раком пищевода, легких и поджелудочной железы.

Для терапевтического применения mAb и их фрагменты должны быть введены субъекту, имеющему заболевание, либо независимо, либо в сочетании с традиционными способами лечения рака, такими как лучевая терапия или химиотерапия, для усиления их терапевтического действия. Путь введения может быть любым из описанных в уровне техники для парентерального введения лекарств, предпочтительно внутривенным или подкожным путем.

Чтобы получить желаемый терапевтический эффект, mAb и их фрагменты согласно настоящему изобретению следует вводить в дозах, которые находятся в диапазоне концентраций, в которых они оказывают противоопухолевое действие без токсических проявлений. Диапазон исследуемых доз может варьировать от 50 до 400 мг на пациента в течение 6 недельных циклов лечения. Лечение новыми вариантами с более высокой аффинностью может быть скорректировано для введения более низких доз и поддержания эффекта, подобного действию нимотузумаба, или можно применять рекомендованную дозу для нимотузумаба (200 мг), показавший большой противоопухолевый эффект, который будет зависеть от профиля токсичности новых mAb и их фрагментов.

mAb и их фрагменты согласно настоящему изобретению могут найти применение в диагностике EGFR-положительных опухолей путем их конъюгирования с радиоизотопами или флуорофорами; поскольку они обладают большей аффинностью и способностью распознавать клетки со средней или низкой экспрессией EGFR, что является преимуществом по сравнению с нимотузумабом в диагностике опухолей с этой особенностью.

Чтобы применять их в качестве инструментов для детекции, указанные mAb и их фрагменты должны быть введены пациентам с опухолями для идентификации их путем визуализации местоположения опухоли или возможных метастазов, положительных по EGFR. mAb и их фрагменты, конъюгированные с радиоизотопами или флуорофорами, следует вводить в дозах в диапазоне концентраций, для которых кинетика распределения в тканях и их выведение позволяют быстро получать изображения высокого качества. Этот диапазон может составлять от 0,5 до 9 мг на пациента, предпочтительно 3 мг.

Кроме того, фрагменты, раскрытые в настоящем изобретении, могут быть слиты с белками или белковыми доменами, представляющими иммунологический интерес, с целью направления иммунного ответа на EGFR-положительные опухолевые клетки. Данное применение имеет преимущество, так как комбинирует потенциальные возможности обеих терапевтических средств по отдельности, концентрируя ответ в области опухоли; Fab-фрагменты обеспечивают специфичность в отношении опухолевых клеток, которые экспрессируют АГ, в то время как белки или слитые белковые домены играют свою иммунологическую роль, что может иметь превосходящий эффект по сравнению с монотерапией.

Фармацевтические композиции.

Описанные в настоящем изобретении mAb и их фрагменты вводят как часть фармацевтической композиции, которую можно применять для лечения рака. Предпочтительно, настоящее изобретение охватывает фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются перечисленным: солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и тому подобное. Другие буферные агенты, диспергирующие агенты и нетоксичные инертные вещества, подходящие для введения пациенту, могут быть включены в композиции согласно настоящему изобретению. Композиции обычно стерильны и не содержат нежелательных частиц.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется следующими примерами и чертежами. Однако эти примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Оценка методом ELISA распознавания нитчатых фагов, отображающих FabR3. Различные препараты очищенных фагов доводили до концентрации, эквивалентной 10^{12} вирусных частиц/мл. Поглощение измеряли при 490 нм.

Фиг. 2. Оценка методом ELISA реакционной способности смеси фагов, несущих библиотеку FabR3, после трех раундов селекции против внеклеточной области EGFR человека. Различные очищенные пре-

параты фага доводили до концентрации, эквивалентной 10^{11} вирусных частиц/мл. Поглощение измеряли при 490 нм.

Фиг. 3. Выравнивание аминокислотной последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи (VH) нимотузумаба и 11 вариантов FabR3 с уникальными последовательностями после трех раундов селекции библиотеки против внеклеточной области EGFR человека. Черточки показывают, что исходная аминокислота сохранялась в этой позиции. Количество раз, когда последовательность повторялась, указано в скобках.

Фиг. 4. Оценка методом ELISA распознавания отображенных на фагах вариантов FabR3 с уникальными последовательностями, полученными из библиотеки путем небольшой рандомизации после трех раундов селекции против внеклеточной области EGFR человека. Препараты фагов предварительно нормализовали в соответствии с отображаемым количеством белка. (А) Варианты, включенные в группу 1, имеют мутации только в CDR2 VH. (Б) Варианты группы 2, присутствуют мутации в CDR1 и CDR2 VH. Поглощение измеряли при 490 нм.

Фиг. 5. Варианты FabR3 на фагах, сконструированные из комбинации наиболее повторяющейся мутации CDR1 и мутаций CDR2 лучших вариантов FabR3 группы 1. (А) Выравнивание аминокислотной последовательности трех CDR VH исходного нимотузумаба и двух сконструированных вариантов. (Б) Оценка методом ELISA распознавания сконструированных вариантов. Поглощение измеряли при 490 нм.

Фиг. 6. Распознавание клеток линии H125 с помощью Fab mAb K4 и K5, происходящих из нимотузумаба. (А) Точечная диаграмма, показывающая процент распознанных EGFR-положительных клеток. (Б) Гистограммы средней интенсивности флуоресценции (EGFR-положительные клетки).

Фиг. 7. Ингибирование фосфорилирования EGFR, опосредованного EGF и индуцированного нимотузумабом и mAb K4 и K5. (А) Линия H125, которая имеет среднюю экспрессию EGFR. (Б) линия MDA-MB-468 с высокой экспрессией EGFR.

Примеры

Пример 1: Успешное отображение на нитчатом фаге M13 антигенсвязывающего фрагмента нимотузумаба (FabR3).

Гены, кодирующие варибельные области легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей нимотузумаба, фланкированные сайтами рестрикции ApaLI/XhoI и SfiI/BstEII, соответственно, амплифицировали с помощью ПЦР. Фрагменты обоих генов VL и VH клонировали в вектор pCES1 (Haard, H., *Methods in Molecular Biology*. 178: 87-100, 2002), после чего следовали гены, кодирующие константную область легкой цепи каппа (СК) и константную область тяжелой цепи (СН1), соответственно. Ген, кодирующий область СН1, связан с геном, кодирующим пептидную метку с-тус, и следует за геном III. Эта генетическая конструкция кодировала АГ-связывающий фрагмент, происходящий из нимотузумаба (FabR3). Компетентные бактерии штамма TG1 вида *Escherichia coli* трансформировали полученными генетическими конструкциями и применяли для получения и очистки отображенного на фаге FabR3, слитого с белком Р3 вирусного капсида, в объеме 50 мл (Marks, J. et al. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1991). Специфическое распознавание очищенных отображенных на фагах молекул оценивали с помощью ELISA (фиг. 1). С этой целью полистироловые планшеты (MaxiSorp, США) покрывали АГ нимотузумаба, внеклеточной областью EGFR человека (Her1) (Ramirez, B. et al., *Int. J. Cancer*, 119: 2190-2199, 2006), антителом к метке с-тус mAb 9E10 (Центр геной инженерии и биотехнологии Sancti Spiritus, Куба) и BSA в качестве несвязанной молекулы. Связанные фаги обнаруживали с помощью mAb против M13, конъюгированного с пероксидазой хрена (GE Healthcare, США), и соответствующего субстрата фермента. Как показано на фиг. 1, отображенный на фагах FabR3 имел правильный фолдинг, что измерили распознаванием mAb 9E10, которые показывают уровни отображения, и потому сохранил способность нимотузумаба к специфическому распознаванию Her1.

Пример 2. Отбор и характеристика отображенных на нитчатых фагах фрагментов вариантов FabR3 с большей реакционной способностью по отношению к внеклеточной области EGFR человека.

Разработали стратегию небольшой рандомизации из 25 остатков, расположенных в выступающих сегментах трех CDR (согласно определению AbM) тяжелой цепи нимотузумаба. Большинство из них (24/25) заменили комбинацией, которая потенциально содержала все 20 аминокислот, но сохраняла первоначальный остаток в большинстве молекул библиотеки. С этой целью вводили вырожденные кодоны, которые сохранили исходный нуклеотид в 90% в каждой позиции, в то время как оставшиеся 10% соответствовали эквимоллярной смеси трех других нуклеотидов. Другой остаток (F29) заменяли только другими гидрофобными остатками (I, L, M, V), хотя исходный остаток преобладал в большинстве молекул библиотеки. Чтобы сделать это, применяли вырожденный кодон, в положениях 1 и 3 триплета в 90% случаев содержался исходный нуклеотид (Т и С соответственно), в то время как оставшиеся 10% случаев соответствовали эквимоллярной смеси трех других нуклеотидов, вторую позицию триплета (Т) не модифицировали. Разработанную библиотеку конструировали в формате Fab путем клонирования варибельных областей в вектор pCES-1. Таким образом, создавали библиотеку вариантов Fab нимотузумаба, состоящую из $1,5 \times 10^7$ членов.

Фаги, полученные из библиотеки, очищали осаждением с полиэтиленгликолем в соответствии с ра-

нее установленными процедурами (Marks, J. et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991). Для выделения функциональных отобранных на фаге мутированных вариантов FabR3, обладающих большей способностью связываться с их антигеном, вирусные частицы инкубировали на иммунотрубках (Nunc, Дания), покрытых Her1. После удаления не связавшихся фагов с помощью промывки, связавшиеся фаги элюировали инкубацией с основным раствором триэтиламина. Бактерий штамма TG1 инфицировали отобранными фагами, которые амплифицировали фагом-помощником M13KO7, и применяли в качестве исходного материала для нового раунда селекции. Проводили три раунда селекции фагов и наблюдали увеличение реакционной способности смеси фагов в отношении Her1 по мере увеличения числа циклов (фиг. 2). Секвенирование генов, встроенных в отобранную фагмиду, полученную в третьем цикле селекции, выявило 11 уникальных последовательностей, разделенных на две группы (фиг. 3). Первая группа состояла из вариантов, в которых рандомизировали только CDR2, и вторая группа включала молекулы, в которых появились мутации в CDR1 и CDR2.

Пример 3: Демонстрация повышения реактивности новых отобранных на нитевидных фагах вариантов FabR3 по отношению к внеклеточной области hEGFR.

Компетентных бактерий штамма E.coli TG1 трансформировали выявленными после трех раундов селекции генетическими конструкциями, которые содержали уникальные последовательности, отличные от последовательности исходного нимотузаба. На основании этих последовательностей получали и очищали фаги, отображающие варианты FabR3. Для определения реакционной способности этих новых вариантов в отношении Her1 определяли распознавание препаратов фагов препаратов при различных концентрациях вирусных частиц с помощью ELISA. Все оцененные варианты, 6 с мутациями исключительно в CDR2 (фиг. 4А) и 5 с мутациями в CDR1 и CDR2 (фиг. 4Б), показали более высокую реактивность по отношению к Her1, чем исходный FabR3 при различных протестированных концентрациях. Кроме того, с помощью мутагенеза по Кункелю сконструировали два новых варианта, сочетавшие мутации CDR2, которые больше всего повышали реактивность, и наиболее часто повторяющуюся мутацию CDR1 (фиг. 5А). Распознавание этих новых вариантов оценивали с помощью ELISA. Комбинация мутаций была совместима, потому что оба варианта показали более высокую реактивность к Her1, чем исходный FabR3, отображенный на фаге (фиг. 5Б).

Пример 4. Демонстрация повышенной аффинности новых вариантов нимотузаба, продуцируемых в виде растворимого белка в клетках млекопитающих.

Гены, кодирующие исходный VH нимотузаба (R3 mAb) и VH двух сконструированных вариантов нимотузаба с мутациями в CDR1 и CDR2, как описано в примере 3 (фиг. 5А), которые были названы K4 и K5, а также исходную переменную область легкой цепи каппа (VK) нимотузаба клонировали в векторы экспрессии клеток млекопитающих pSV-gpt и pSV-hyg соответственно (Orlandi, R. et al., PNAS: 3833-3837, 1989). Векторы с представляющими интерес генами линейаризовали ферментом Pvu I и осаждали в присутствии этанола. ДНК, восстановленную в фосфатно-солевом буферном растворе, применяли для электропорации клеток NS0. Для получения клонов, продуцирующих mAb R3, K4 и K5, ко-трансфицировали 4 мкг вектора pSV-gpt с соответствующим VH (табл. 1) и 8 мкг вектора pSV-hyg-VK исходного нимотузаба. Процедуру получения стабильных клонов проводили с использованием ксантина, гипоксантина и микофеноловой кислоты в качестве агентов для селекции. Эта методология позволила получить три представляющие интерес молекулы, такие как AT изотипа IgG1 и с легкой цепью каппа. Полученные AT очищали от супернатанта с помощью аффинной хроматографии с белком А.

Таблица 1

Описание генов VH и VL, примененных в ко-трансфекции клеток NS0 с целью получения mAb R3, K4 и K5

| | pSV-gpt-VH | pSV-hyg-Vk |
|-------------|-------------------------|------------|
| Моно- AT R3 | Исходный | Исходный |
| mAb K4 | Мутированный 3AS4+3AS22 | Исходный |
| mAb K5 | Мутированный 3AS4+3AS30 | Исходный |

Чтобы продемонстрировать, что мутации, полученные на фагах, которые в этом формате проявляли большую реактивность по отношению к Her1, вызывали тот же эффект в полноразмерных AT, было принято решение измерить аффинность по Biacore. Во-первых, Fab, полученные из mAb R3, K4 и K5, получали ферментативным расщеплением папаином и последующим разделением белком А. Как показано в табл. 2, новые mAb K4 и K5 показали увеличение аффинности в 3 и 3,6 раз, соответственно, по отношению к mAb R3.

Таблица 2
Увеличение аффинности mAb K4 и K5 по отношению к нимотузумабу

| | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) | KD (M) | Возрастание |
|--------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------|
| MAb R3 | 1,879*10 ⁴ | 12,483*10 ⁻⁴ | 6,643*10 ⁻⁸ | - |
| MAb K4 | 2,743*10 ⁴ | 6,019*10 ⁻⁴ | 2,194*10 ⁻⁸ | 3X |
| MAb K5 | 3,305*10 ⁴ | 6,098*10 ⁻⁴ | 1,845*10 ⁻⁸ | 3,6X |

Пример 5. Fab, полученный из mAb K4 и K5, продуцируемых в клетках млекопитающих, показал большее распознавание линии клеток аденокарциномы легкого H125 человека, чем Fab, полученный из нимотузумаба.

Определили способность Fab, происходящих из mAb K4 и K5, распознавать молекулу Her1. В этом случае распознавание Her1 оценивали с помощью проточной цитометрии в клеточной линии, в естественном контексте этой молекулы. С этой целью Fab, происходящие из mAb R3, K4 и K5, инкубировали в концентрации 1,25 мкг/мл с клеточной линией аденокарциномы легкого H125 человека, которая имеет среднюю экспрессию рецептора. Fab, связанные с Her1 на мембране клеток, детектировали с помощью мышиных mAb против легкой цепи каппа человека, конъюгированных с фикоэритрином. Как показано на фиг. 6А, Fab, происходящий из mAb K4 и K5, распознавали более высокий процент Her1-положительных клеток и с более высокой средней интенсивностью флуоресценции (FMI) (фиг. 6Б) по сравнению с Fab, происходящим из mAb R3.

Пример 6: Увеличение аффинности mAb K4 и K5 приводило к большей способности этих АТ ингибировать EGF-опосредованное фосфорилирование EGFR.

Чтобы определить способность новых mAb ингибировать EGF-опосредованное фосфорилирование, проводили анализ методом вестерн-блоттинга. Применяли две клеточные линии:

линия клеток аденокарциномы легкого человека H125 (средняя экспрессия EGFR);
аденокарцинома молочной железы с метастазами в плевральную жидкость человеческого происхождения MDA-MB-468 (высокая экспрессия EGFR).

Клетки обрабатывали в течение 2 часов mAb R3, K4 и K5 в концентрациях 10 мкг/мл, 5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл. Затем среду удаляли для элиминации не связавшихся с клетками mAb, добавляли свежую среду с EGF человека в течение 10 минут, чтобы вызвать фосфорилирование рецептора. Затем в буфере RIPA данные клетки, подвергнутые различным видам обработки, подвергали лизису. Концентрацию белка определяли количественно в соответствии с инструкциями набора реагентов для бицинхониновой кислоты (Pierce). 25 мкг белка из лизата наносили в 9% SDS-PAGE гель и белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Первичные АТ против pEGFR (Y1068) полученные в кролике, применяли для обнаружения фосфорилированного EGFR (Phospho-EGFR). Содержание белка визуализировали с помощью вторичных антител против антител кролика, связанных с флуорофором HRP, с последующим добавлением хемиллюминесцентного субстрата (Pierce). На графиках показан сигнал, полученный с помощью Phospho-EGFR, который показывает количество данного белка в клеточном лизате. Как показано на фиг. 7, при всех оцененных концентрациях mAb K4 и K5 показали большую способность ингибировать EGF-опосредованное фосфорилирование EGFR в обеих клеточных линиях по сравнению с нимотузумабом. Кроме того, оба mAb при самой низкой протестированной концентрации имеют больший или тот же эффект, что и нимотузумаб при самой высокой оцененной концентрации (в 4 раза более концентрированной). Хотя для всех mAb ингибирование больше в линии MDA-MB-468 с более высокой экспрессией рецептора (фиг. 7Б), важно подчеркнуть, что ингибирующий эффект mAb K4 и K5 не теряется в клеточной линии с более низкой экспрессией рецептора (фиг. 7А), как это происходит с нимотузумабом. Вышеуказанное обеспечивает преимущество применения таких новых mAb, полученных путем включения мутаций в варибельную область нимотузумаба, которые приводят к большей аффинности к его лиганду и более высокой биологической активности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантное моноклональное антитело (mAb), которое распознает внеклеточную область рецептора эпидермального фактора роста человека (Her1), характеризующееся тем, что последовательность CDR2 вариательной области тяжелых цепей выбрана из группы, содержащей:

SEQ ID NO. 17,
SEQ ID NO. 18,
SEQ ID NO. 10,
SEQ ID NO. 11,
SEQ ID NO. 12 и
SEQ ID NO. 29,

последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO. 9, и последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO. 3 в указанных тяжелых цепях, и последовательности CDR вариательной области легких цепей представляют собой:

CDR1 SEQ ID NO. 22,
CDR2 SEQ ID NO. 23,
CDR3 SEQ ID NO. 24.

2. mAb, которое распознает Her1, которое характеризуется тем, что последовательность CDR2 вариательной области тяжелых цепей выбрана из группы, содержащей:

SEQ ID NO. 2 и
SEQ ID NO. 8,

последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO. 1, и последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO. 3 в указанных тяжелых цепях, и последовательности CDR вариательной области легких цепей показаны ниже:

CDR1 SEQ ID NO. 22,
CDR2 SEQ ID NO. 23,
CDR3 SEQ ID NO. 24.

3. mAb, которое распознает Her1, которое характеризуется тем, что последовательность CDR1 вариательной области тяжелых цепей выбрана из группы, содержащей:

SEQ ID NO. 13 и
SEQ ID NO. 19,

последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO. 14, и последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO. 3 в указанных тяжелых цепях, и последовательности CDR вариательной области легких цепей представляют собой:

CDR1 SEQ ID NO. 22,
CDR2 SEQ ID NO. 23,
CDR3 SEQ ID NO. 24.

4. mAb, которое распознает Her1, которое характеризуется тем, что CDR вариательной области тяжелой и легкой цепей содержит следующие последовательности:

тяжелая цепь:
CDR1 SEQ ID NO. 15,
CDR2 SEQ ID NO. 16,
CDR3 SEQ ID NO. 3;

легкая цепь:
CDR1 SEQ ID NO. 22,
CDR2 SEQ ID NO. 23,
CDR3 SEQ ID NO. 24.

5. mAb по пп.1-4, отличающееся тем, что каркасные области (FW) вариательной области тяжелой и легкой цепей имеют следующие последовательности:

тяжелая цепь:
FW 1 SEQ ID NO. 4;
FW 2 SEQ ID NO. 5;
FW 3 SEQ ID NO. 6;
FW 3 SEQ ID NO. 7;

легкая цепь:
FW 1 SEQ ID NO. 25;
FW 2 SEQ ID NO. 26;
FW 3 SEQ ID NO. 27;
FW4 SEQ ID NO. 28.

6. mAb по пп.1-5, отличающееся тем, что последовательность константных областей тяжелой цепи представляет собой области IgG1 человека.

7. mAb по пп.1-5, отличающиеся тем, что константные области легкой цепи представляют собой области каппа цепи человека.

8. Фрагмент, распознающий Her1, происходящий из mAb по пп.1-7, который характеризуется тем, что указанный фрагмент представляет собой фрагмент типа Fab.

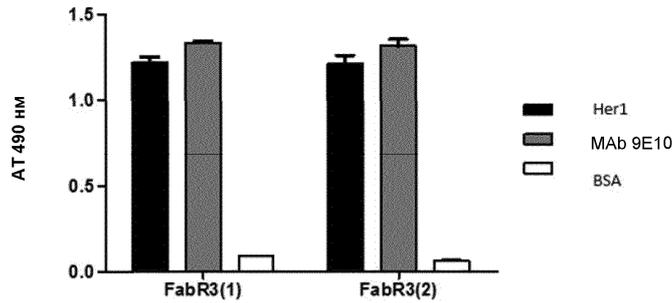
9. Фрагмент, распознающий Her1, происходящий из mAb по пп.1-7, который характеризуется тем, что указанный фрагмент представляет собой фрагмент типа (Fab)2.

10. Фрагмент, распознающий Her1, происходящий из mAb по пп.1-7, который характеризуется тем, что указанный фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент переменной области.

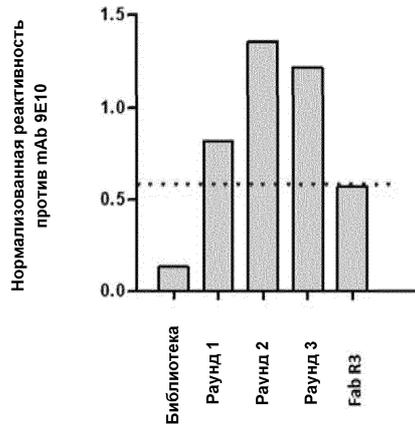
11. Применение mAb по пп.1-7 и фрагментов по пп.8-10 при лечении опухолей, экспрессирующих EGFR.

12. Применение mAb по пп.1-7 и фрагментов по пп.8-10, при этом указанные mAb и фрагменты конъюгированы с соответствующим маркером, для диагностики опухолей, несущих EGFR.

13. Применение mAb по пп.1-7 и фрагментов по пп.8-10, при этом указанные mAb или фрагменты конъюгированы с белками или белковыми доменами, представляющими иммунологический интерес, для направления иммунного ответа против EGFR-положительных опухолей.



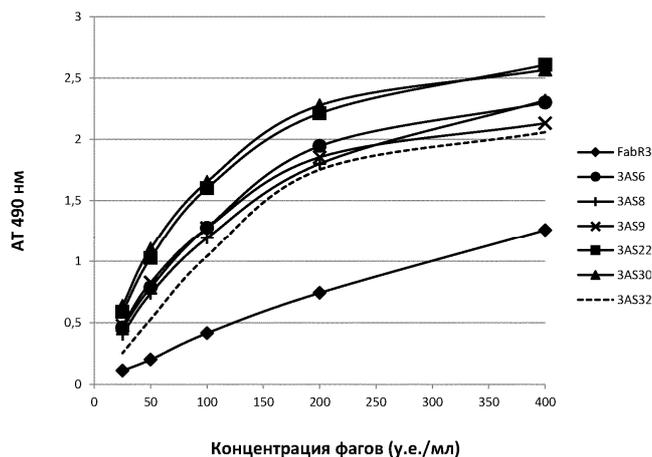
Фиг. 1



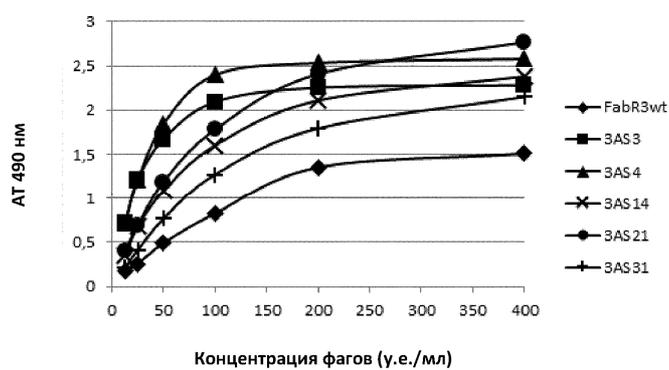
Фиг. 2

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|----------------|------------------|---------------------------|------------------------|
| FabR3 исходный | GYTFTNYIY | GGINFTSGGSNFNEKPKT | TRQGLWFDS DGRGF |
| 3AS22 | ----- | ----NNQQ-H----- | ----- (6) |
| 3AS9 | ----- | ----QQNH----- | ----- (3) |
| 3AS8 | ----- | ----LR-QAV----- | ----- (7) |
| 3AS30 | ----- | ----VTQRPV----- | ----- (3) |
| 3AS6 | ----- | ----THAQA----- | ----- (4) |
| 3AS32 | ----- | ----I----- | ----- (1) |
| 3AS4 | ----D---- | ----T----- | ----- (3) |
| 3AS3 | ----D---- | ----- | ----- (1) |
| 3AS21 | --N--D---- | -----H----- | ----- (1) |
| 3AS14 | --P-S---- | -----V----- | ----- (1) |
| 3AS31 | --P----- | -----V----- | ----- (1) |

Фиг. 3



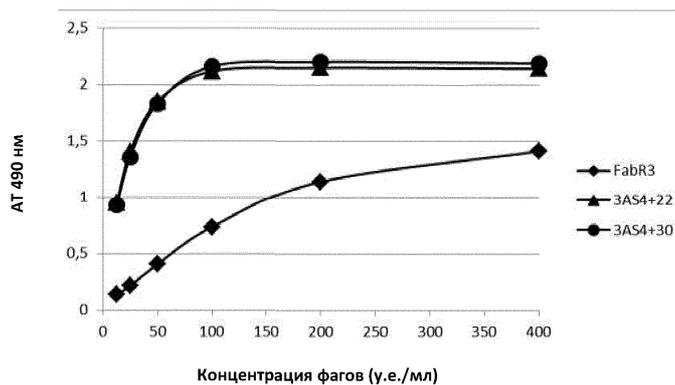
Фиг. 4А



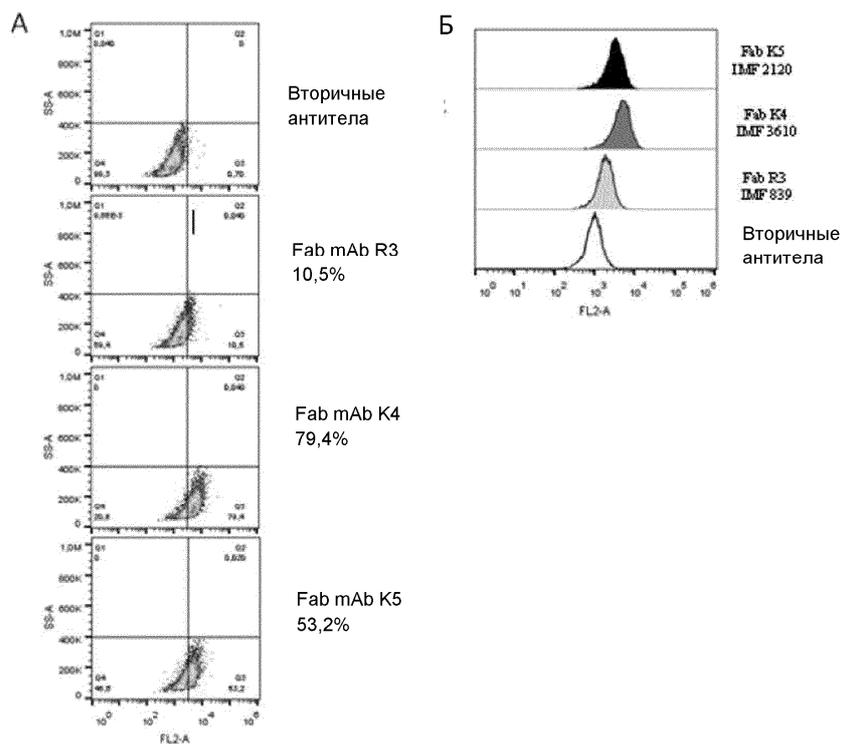
Фиг. 4Б

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 | A |
|----------------|--|---|---|---|
| FabR3 исходный | GYTF ^T NY ^Y I ^Y | GGINP ^T SGGS ^N FNEK ^F KT | TRQGLW ^F DS ^D GR ^G F | |
| 3AS4+22 | -----D----- | -----NNQQ-H----- | ----- | |
| 3AS4+30 | -----D----- | -----VTQRPV----- | ----- | |

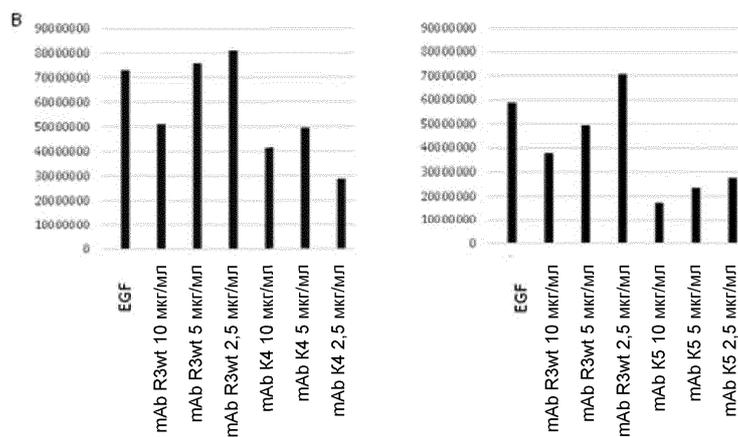
Фиг. 5А



Фиг. 5Б



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2