

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290121 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.15(22) Дата подачи заявки
2020.07.16(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61N 5/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ GRP78 И СПОСОБ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/874,791

(32) 2019.07.16

(33) US

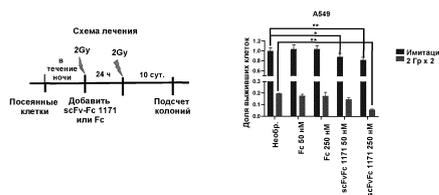
(86) PCT/US2020/042374

(87) WO 2021/011798 2021.01.21

(71) Заявитель:
ВАШИНГТОН ЮНИВЕРСИТИ (US)(72) Изобретатель:
Халлахан Деннис, Капур Вайшали,
Сингх Абхай Кумар (US)(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенным антителам, связывающимся с GRP78. Конкретно, к композициям, содержащим антигенсвязывающие белки против GRP78, которые можно применять при распознавании раковых или опухолевых клеток. Кроме того, в некоторых аспектах указанные антигенсвязывающие белки против GRP78 можно применять для доставки лекарственных и терапевтических средств, специфичной по отношению к опухоли/раку. В еще одном аспекте описанные антигенсвязывающие белки можно применять для улучшения лучевой терапии у субъекта с раком или опухолью или подозрением на них, причем указанный антигенсвязывающий белок конъюгирован с полезной нагрузкой, например, терапевтическим агентом, агентом для визуализации или их комбинацией.

Зависимость от ответа от дозы scFv-Fc 1171 против GRP78 и Fc с использованием анализа образования колоний



A1

202290121

202290121

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ GRP78 И СПОСОБ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США № 62/874791, поданной 16 июля 2019 года, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПРАВА ПРАВИТЕЛЬСТВА

[0002] Настоящее изобретение сделано при поддержке правительства в рамках гранта CA170169, выданного Национальному институту здравоохранения США. Правительство обладает определенными правами на изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение охватывает композиции, содержащие антигенсвязывающие белки против Grp78, которые можно применять для распознавания опухолевых клеток и для опухоль-специфичной доставки лекарственных и терапевтических средств.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] В Соединенных Штатах Америки вероятность развития рака в течение жизни или смерти от рака составляет 1 к 2 у мужчин и 1 к 3 у женщин. Терапевтическая устойчивость является существенным препятствием при лечении рака, и в особенности немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) и мультиформной глиобластомы (GBM). НМРЛ находится среди наиболее частых в мире причин смертности, связанной с раком, и по-прежнему с трудом поддается лечению из-за выявления на поздних стадиях при диагностике. В случае GBM агрессивность и рецидивы опухоли, несмотря на мультимодальную комбинированную терапию, приводят к тому, что медианная выживаемость составляет 14 месяцев. Таргетная терапия является все более интенсивно исследуемой темой, направленной на совершенствование эффективности лечения GBM и НМРЛ. Разработаны антитела и ингибиторы, нацеленные на такие молекулы, как VEGF/VEGFR-2, EGFR и RET и

использующие патологические профили экспрессии белка, присущие GBM И НМРЛ. Однако слабо выраженное улучшение эффективности при использовании этих терапевтических подходов подчеркивает потребность в выявлении дополнительных молекулярных мишеней.

[0005] Опухоль-специфичная доставка лекарственных и терапевтических средств может ослаблять или предотвращать рост опухоли в организмах, обеспечивая им более продолжительную и здоровую жизнь. В то же время многие противоопухолевые лекарственные средства токсичны и для неопухолевых клеток, что приводит к плохо переносимым побочным эффектам. Таким образом, в данной области техники существует потребность в способе специфичной доставки противоопухолевых агентов в опухолевые клетки с целью ослабления роста опухолевых клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Один аспект настоящего изобретения охватывает выделенное антитело, связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем домен CDR1 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 15, домен CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:5, а домен CDR3 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:11; переменный домен легкой цепи содержит CDR1, CDR2 и CDR3, причем домен CDR1 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:25, домен CDR2 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:19, а домен CDR3 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:6. Антитело может распознавать эпитоп в пределах аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. Указанное антитело может быть выбрано из группы, состоящей из гуманизованного антитела, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) антитела, фрагмента антитела или химерного антитела. Антитело можно напрямую или непрямым образом конъюгировать с

полезной нагрузкой, выбранной из группы, состоящей из терапевтического агента, агента для визуализации или их комбинации.

[0007] Один аспект настоящего изобретения охватывает способ улучшения (повышения эффективности) лучевой терапии у субъекта с раком или опухолью или подозрением на них с применением антитела, связывающегося с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело напрямую или непрямым образом конъюгировано с полезной нагрузкой, выбранной из группы, состоящей из терапевтического агента, агента для визуализации или их комбинации, причем указанный способ включает введение фармакологически эффективного количества антитела субъекту, за счет чего происходит улучшение лучевой терапии. Указанный способ может включать облучение субъекта ионизирующим излучением. Указанный способ может включать визуализацию субъекта. Конъюгированный терапевтический агент может представлять собой противоопухолевый объект.

[0008] Один аспект настоящего изобретения охватывает способ визуализации рака или опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, с применением антитела, связывающегося с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело конъюгировано с агентом для визуализации, а указанный способ включает введение конъюгированного GRP78 субъекту и визуализацию рака у субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0009] Файл заявки содержит по меньшей мере один цветной чертеж. Копии настоящей публикации заявки на патент с цветным(и) чертежом(ами) будут предоставлены Управлением после запроса и оплаты в необходимом размере.

[0010] На **ФИГ. 1** изображен график, на котором показано связывание моноклональных антител мыши против GRP78 с С-концевым пептидом GRP78 в ходе твердофазного ИФА.

[0011] На **ФИГ. 2** изображен твердофазный ИФА, демонстрирующий связывание моноклональных антител мыши против GRP78 с белком GRP78.

[0012] На **ФИГ. 3** показано связывание антител против GRP78 с поверхностью клеток НМРЛ.

[0013] На **ФИГ. 4** показано картирование эпитопов антител против GRP78 (SEQ ID NO: 63-69). Из С-конца GRP78 синтезировали семь пептидов. Каждый пептид представлял собой 12-членный пептид с 5 перекрывающимися аминокислотами. Последовательности этих пептидов показаны на фигуре. Каждый из пептидов в двух повторностях наносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с антителом 7A9. После промывки результаты блоттинга проявляли посредством хемилюминесценции. Положительные пятна указаны стрелками.

[0014] На **ФИГ. 5A-5B** показано картирование эпитопов антитела 6F8. На **ФИГ. 5A** изображен график относительного ответа связывания. Картирование эпитопов выполняли с помощью Biacore T200. 6F8 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, пептиды 86-90 (пептиды с перекрыванием в иммуногенной области 6F8) использовали в качестве анализируемых соединений. Относительный ответ связывания (ответ на холостом канале, вычтенный из ответа на канале с иммобилизованным 6F8) каждого пептида с 6F8 анализировали с помощью программного обеспечения BIAevaluation. Пороговое значение для несвязывающихся пептидов составляет 0 ЕО. На **ФИГ. 5B** показана трехмерная модель белка GRP78, на которой малиновым цветом показана последовательность эпитопа в составе белка. Фигуру получили с использованием программного обеспечения PyMol (SEQ ID NO: 71).

[0015] На **ФИГ. 6A-6B** показано картирование эпитопов антитела 7A9. На **ФИГ. 6A** изображен график относительного ответа связывания 7A9. Картирование эпитопов выполняли с помощью Biacore T200. 7A9 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, пептиды 86-90 (пептиды с перекрыванием в иммуногенной области 7A9) использовали в качестве анализируемых соединений. Относительный ответ связывания (ответ на холостом канале, вычтенный из ответа на канале с иммобилизованным 7A9) каждого пептида с 7A9 анализировали с помощью программного обеспечения BIAevaluation. Пороговое значение для несвязывающихся пептидов составляет 0

ЕО. На **ФИГ. 6В** показана трехмерная модель белка GRP78, на которой красным цветом показана последовательность эпитопа в составе белка. Фигуру получили с использованием программного обеспечения PyMol (SEQ ID NO: 70).

[0016] На **ФИГ. 7А-7В** показаны графики проточно-цитометрических данных о связывании антител против GRP78 с поверхностью клеток. На **ФИГ. 7А** показаны результаты проточно-цитометрического анализа связывания антитела 6F8 с поверхностью клеток А549. Условия связывания: $0,1 \times 10^6$ клеток инкубировали с 3-кратными разведениями антитела, начиная с 2,22 мкМ. Клетки 2-кратно промывали буфером для FACS. Окрашивали вторичным антителом. Дважды промывали и анализировали в буфере для FACS на проточном цитометре FACS Canto II (BD). Геометрические средние значения интенсивности флуоресценции аппроксимировали с использованием модели "Специфичное связывание с одним сайтом" в программном обеспечении Graphpad Prism. На **ФИГ. 7В** показан график тех же данных, что и на панели А, аппроксимированных с использованием модели "Сигмоидная, 4PL, X представляет собой десятичный логарифм концентрации" в программном обеспечении Graphpad Prism.

[0017] **ФИГ. 8А-8В** представляют собой графики рассеяния, на которых показан процент положительных клеток А549. На **ФИГ. 8А** показаны графики 1-7, неокрашенный контроль и контрольное вторичное антитело. На **ФИГ. 8В** показаны графики 8-15.

[0018] **ФИГ. 9А-9В** представляют собой графики, на которых показано связывание 6F8 с поверхностью клеток Н460. На **ФИГ. 9А** показан проточно-цитометрический анализ связывания антитела 6F8 с поверхностью клеток Н460. Условия связывания: $0,1 \times 10^6$ клеток инкубировали с 3-кратными разведениями антитела, начиная с 0,7 мкМ. Клетки 2-кратно промывали буфером для FACS. Окрашивали вторичным антителом. Дважды промывали и анализировали в буфере для FACS на проточном цитометре FACS Canto II (BD). Геометрические средние значения интенсивности флуоресценции аппроксимировали с использованием модели специфичного связывания с одним сайтом в программном обеспечении Graphpad Prism. На **ФИГ. 9В** показан график тех же данных, что и на панели А, аппроксимированных с использованием модели

“Сигмоидная, 4PL, X представляет собой десятичный логарифм концентрации” в программном обеспечении Graphpad Prism.

[0019] На **ФИГ. 10** показаны графики рассеяния процента положительных клеток H460, окрашенных 3-кратными последовательными разведениями (графики 1-6) антитела 6F8. Графики рассеяния окрашены по интенсивности флуоресценции флуорохрома, использованного для обнаружения.

[0020] На **ФИГ. 11А-11В** показан проточно-цитометрический анализ связывания антитела 7А9 с поверхностью клеток H460. **ФИГ. 11А** представляет собой проточно-цитометрический анализ связывания антитела 7А9 с поверхностью клеток H460. Условия связывания: $0,1 \times 10^6$ клеток инкубировали с 3-кратными разведениями антитела, начиная с 1,0 мкМ. Клетки 2-кратно промывали буфером для FACS. Окрашивали вторичным антителом. Дважды промывали и анализировали в буфере для FACS на проточном цитометре FACS Canto II (BD). Геометрические средние значения интенсивности флуоресценции аппроксимировали с использованием модели специфичного связывания с одним сайтом в программном обеспечении Graphpad Prism. На **ФИГ. 11В** показан график тех же данных, что и на панели А, аппроксимированных с использованием модели “Сигмоидная, 4PL, X представляет собой десятичный логарифм концентрации” в программном обеспечении Graphpad Prism.

[0021] На **ФИГ. 12** показаны графики рассеяния процента положительных клеток H460, окрашенных 3-кратными последовательными разведениями (графики 1-7) антитела 7А9. Графики рассеяния окрашены по интенсивности флуоресценции флуорохрома, использованного для обнаружения.

[0022] На **ФИГ. 13** показана БИК-визуализация всего тела с использованием моноклональных антител против GRP78 (необлученные опухоли) Опухоли А549 вводили в задние конечности бестимусных мышей. Антитела 6F8 и 7А9 метили ИК-красителем 800 (Licor). 40 мкг каждого антитела вводили в хвостовую вену и ежедневно визуализировали с использованием устройства для визуализации Pearl.

[0023] На **ФИГ. 14А-14С** показано биораспределение моноклональных антител против GRP78 согласно БИК-визуализации (необлученные опухоли). **На**

ФИГ. 14А показаны изображения полученных опухолей А549. **На ФИГ. 14В** показана гистограмма интенсивности сигнала на грамм полученных опухолей. **На ФИГ. 14С** показана интенсивность сигнала всех органов на грамм их массы.

[0024] **На ФИГ. 15** показана интернализация моноклональных антител против GRP78 в клетки А549. 6F8 и 7A9 метили красным рН-чувствительным красителем рHRodo, генерирующим флуоресценцию в красной области спектра в кислых клеточных компартментах.

[0025] **На ФИГ. 16** показан дот-блот-анализ, демонстрирующий связывание scFv-Fc против GRP78 с полноразмерным белком GRP78. Для дот-блоттинга капли рекомбинантного полноразмерного белка GRP78 наносили на нитроцеллюлозную мембрану в двух повторностях. После блокирования блот инкубировали с scFv Fc 1171 и 1183 против GRP78. Указанные scFv-Fc обнаруживали по связыванию с рекомбинантным белком GRP78 с использованием антитела против Fc человека, конъюгированного с ПХ.

[0026] **На ФИГ. 17** показан анализ сродства связывания scFV 1171-Fc против GRP78 с рекомбинантным полноразмерным белком GRP78 с помощью Biacore. Максимальная концентрация scFv1171-Fc составляла 500 нМ, затем выполняли двукратные последовательные разведения. Скорость ассоциации, скорость диссоциации и константа диссоциации показаны в таблице.

[0027] **На ФИГ. 18** показан анализ сродства связывания scFV 1171-Fc против GRP78 с рекомбинантным полноразмерным белком GRP78 с помощью Biacore. Максимальная концентрация scFv1183-Fc составляла 500 нМ, затем выполняли двукратные последовательные разведения. Скорость ассоциации, скорость диссоциации и константа диссоциации показаны в таблице.

[0028] **На ФИГ. 19** показан проточно-цитометрический анализ связывания scFv-Fc1171 с поверхностью клеток. Клетки А549 представляли собой имитацию или были облучены 3 дозами по 3 Гр. Клетки собирали и инкубировали с указанными концентрациями антител scFV-Fc1171. Показаны типичные гистограммы с наложением (синий: контрольное вторичное антитело, красный: scFv-Fc1171).

[0029] На **ФИГ. 20** показан проточно-цитометрический анализ связывания антитела scFv-Fc1171 с поверхностью облученных клеток A549. Условия связывания: $0,1 \times 10^6$ клеток инкубировали с 4-кратными разведениями антитела, начиная с концентрации 100 нМ. Клетки 2-кратно промывали буфером для FACS. Окрашивали вторичным антителом. Дважды промывали и анализировали в буфере для FACS на проточном цитометре FACS Canto II (BD). Геометрические средние значения интенсивности флуоресценции аппроксимировали с использованием модели специфического связывания с одним сайтом в программном обеспечении Graphpad Prism. На графике показан процент положительных клеток, аппроксимированный с использованием модели “Сигмоидная, 4PL, X представляет собой десятичный логарифм концентрации” в программном обеспечении Graphpad Prism.

[0030] На **ФИГ. 21** показан проточно-цитометрический анализ связывания отрицательного контрольного Fc с поверхностью клеток. Клетки A549 представляли собой имитацию или были облучены 3 дозами по 3 Гр. Клетки собирали и инкубировали с указанными концентрациями отрицательного контрольного Fc. Показаны типичные гистограммы с наложением (синий: контрольное вторичное антитело, красный: отрицательный контрольный Fc).

[0031] На **ФИГ. 22** показан эндоцитоз scFv-Fc 1171 в клетки A549. Клетки A549 представляли собой имитацию или были облучены 3 дозами по 3 Гр. scFv-Fc 1171 метили красным pH-чувствительным красителем pHRodo, генерировавшим флуоресценцию в красной области спектра в кислых клеточных компартментах. Интернализированное антитело показано белыми стрелками.

[0032] На **ФИГ. 23** показана зависимость ответа от дозы scFv-Fc 1171 против GRP78 и Fc с использованием анализа образования колоний. Клетки высевали и на следующий день облучали в дозе 2 Гр. scFv-Fc 1171 или Fc-контроль добавляли в 2 различных концентрациях. На следующий день выполняли еще одно облучение в дозе 2 Гр. Колонии подсчитывали, строили график выжившей доли. Для статистического анализа использовали двусторонний дисперсионный анализ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

[0033] На **ФИГ. 24** показана зависимость ответа от дозы scFv-Fc 1171 против GRP78 и Fc с использованием анализа образования колоний клеток H460. Клетки высевали и на следующий день облучали в дозе 2 Гр. scFv-Fc 1171 или Fc-контроль добавляли в 2 различных концентрациях. На следующий день выполняли еще одно облучение в дозе 2 Гр. Колонии подсчитывали, строили график доли выживших клеток. При использовании scFvFc1171 в комбинации с излучением наблюдали тенденцию к снижению доли выживших клеток.

[0034] На **ФИГ. 25** показаны нуклеотидная и аминокислотная последовательности антитела 6F8. (SEQ ID NO: 55-58).

[0035] На **ФИГ. 26** показаны нуклеотидная и аминокислотная последовательности антитела 7A9. (SEQ ID NO: 59-62).

[0036] На **ФИГ. 27** показана аминокислотная последовательность антитела SCFV GRP78--1183. (SEQ ID NO: 27-28).

[0037] На **ФИГ. 28** показана аминокислотная последовательность антитела SCFV GRP78--1164. (SEQ ID NO: 35-36).

[0038] На **ФИГ. 29** показана аминокислотная последовательность антитела SCFV GRP78--1171. (SEQ ID NO: 43-44).

[0039] На **ФИГ. 30** показана аминокислотная последовательность антитела SCFV GRP78--1256. (SEQ ID NO: 51-52).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0040] Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие белки, распознающие опухолевые клетки. В настоящем изобретении также предложены способы применения антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе. Антигенсвязывающие белки можно применять для осуществления опухоль-специфичной доставки, например, лекарственных средств или терапевтических агентов, а также для повышения эффективности лучевой терапии. В одном аспекте настоящего изобретения предложены антигенсвязывающие белки, которые можно применять для визуализации рака у субъекта. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ улучшения лучевой терапии у субъекта с применением антигенсвязывающих

белков согласно настоящему изобретению. Важным преимуществом является способность указанных антигенсвязывающих белков специфично связывать опухолевые клетки, но не нормальные клетки. Кроме того, в настоящем изобретении предложены антигены для целей получения антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе.

[0041] В типичном варианте воплощения антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению специфично связываются с эпитопами, представленными на облученных раковых или имеющих отношение к опухоли клеток. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут связываться с внеклеточными, трансмембранными или внутриклеточными эпитопами облученных раковых или имеющих отношение к опухоли клеток. В частности, в настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие белки, связывающиеся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78). GRP78 является многофункциональным белком, шапероном фолдинга и корецептором, интенсивно экспрессируемым на поверхности клеток GBM и HMPЛ, и перспективной мишенью, специфичной для злокачественных заболеваний. Как показано в настоящем документе, линии клеток немелкоклеточного рака легких (HMPЛ) и мультиформной глиобластомы (GBM) обрабатывали антителами против GRP78 и оценивали на предмет пролиферации, образования колоний, гибели клеток и сигнального пути PI3K/Akt/mTOR. Клетки GBM и HMPЛ, обработанные антителами против GRP78, демонстрировали ослабленную пролиферацию клеток, образование колоний и усиленный апоптоз. Клетки GBM и HMPЛ, обработанные антителами против GRP78, также демонстрировали глобальную суппрессию сигнального пути PI3K/Akt/mTOR. Эффективность антител против GRP78 в отношении роста опухоли в комбинации с ионизирующим излучением (XRT) определяли *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов у мышей. Комбинация антитела с XRT приводила к значимой задержке роста опухоли в моделях гетеротропных опухолей HMPЛ и GBM. Антитела, мишенью которых являются GRP78, демонстрировали противоопухолевую активность и улучшали эффективность облучения при HMPЛ и GBM как *in vitro*, так и *in vivo*. Эти данные показывают эффективность антигенсвязывающих белков против GRP78 в качестве противоракового

терапевтического средства при применении в виде монотерапии или в комбинации с XRT. Антигенсвязывающие белки и способы их применения подробнее описаны ниже.

I. АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОТИВ GRP78

[0042] В одном аспекте антигенсвязывающие белки против GRP78, описанные в настоящем документе, включают антигенсвязывающие белки, специфично связывающие GRP78, и выделенные, изученные, очищенные и извлеченные (полученные) для применения в функциональной терапевтической композиции, которую вводят живому субъекту с раком или опухолью или подозрением на них. В другом аспекте антигенсвязывающие белки против GRP78, описанные в настоящем документе, включают антигенсвязывающие белки, специфично связывающие GRP78, и выделенные, изученные, очищенные и извлеченные (полученные) для применения в функциональной композиции для визуализации, которую вводят живому субъекту с раком или опухолью или подозрением на них. В еще одном аспекте антигенсвязывающие белки, которые можно применять в настоящем документе, включают антигенсвязывающие белки, выделенные, изученные, очищенные и извлеченные (полученные) для применения в анализе для обнаружения GRP78 в биологическом образце, полученном от живого субъекта, и позволяют обнаружить развитие рака или опухоли в организме субъекта. В еще одном аспекте антигенсвязывающие белки, которые можно применять в настоящем документе, включают антигенсвязывающие белки, выделенные, изученные, очищенные и извлеченные (полученные) для применения и перечисленные в **таблице В**, а также их варианты (например, гуманизированные формы, химерные формы и иммунологические фрагменты).

[0043] Белок массой 78 кДа, регулируемый глюкозой, GRP78 (Uniprot ID P11021), также известный как BiP и HSP5a, является многофункциональным белком. На уровне транскрипции GRP78 кодируется геном *Hsp5a*. Хорошо известна роль GRP78 в реакции несвернутых белков (РНБ), активирующейся после стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в клетках. Однако GRP78 участвует в других активностях в зависимости от его положения в клетке. GRP78 располагается

главным образом в ЭПР, однако также встречается в цитоплазме, митохондриях, ядре, плазматической мембране и секретируется, хотя его назначение главным образом состоит в вовлеченности в эндогенные цитопротекторные процессы. Следовательно, GRP78 может контролировать РНБ и макроаутофагию или может активировать фосфатидилинозит-3-киназные (PI3K)/АКТ пути, способствующие выживанию. GRP78 влияет на выживание, пролиферацию и развитие устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии.

[0044] В настоящем документе фраза "специфично связывается" означает, что антигенсвязывающие белки связываются с GRP78 с константой сродства или сродством взаимодействия (KD) менее 300 нМ, менее 250 нМ, менее 200 нМ, менее 150 нМ, менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ, менее 20 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ или менее 1 нМ.

[0045] Термин «антигенсвязывающий белок» относится к любой форме антитела или его фрагмента, демонстрирующего желательную биологическую активность. Таким образом, он используется в самом широком смысле и, конкретно, включает моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность, например, специфично связывают GRP78.

[0046] Термин «антитело» включает термин «моноклональное антитело». Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, происходящему от единственной копии или клона, включая, например, любой клон эукариотической, прокариотической клетки или фага. Моноклональные антитела получают из популяции по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением возможных мутаций, происходящих по естественным причинам, или посттрансляционных модификаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против одиночного антигенного эпитопа. «Моноклональное антитело» не ограничивается антителами, продуцируемыми посредством гибридомной технологии.

Моноклональные антитела можно получить, например, с помощью гибридных методик, хорошо известных в данной области техники, а также рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий или комбинации таких технологий и иных технологий, хорошо известных в данной области техники. Кроме того, моноклональное антитело может быть мечено обнаружимой меткой, иммобилизовано на твердой фазе и/или конъюгировано с гетерологичным соединением (например, ферментом или токсином) в соответствии со способами, известными в данной области техники.

[0047] Термин «фрагмент вышеуказанного» охватывает фрагмент или производное антитела, по существу сохраняющие его биологическую активность. Таким образом, термин «фрагмент антитела» или «фрагмент вышеуказанного» относится к части полноразмерного антитела, обычно к его антигенсвязывающей или вариабельной области. Примеры иммунологически эффективного фрагмента вышеуказанного включают Fab, Fab F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. В некоторых вариантах реализации фрагменты антител, описанные в настоящем документе, включают, в качестве неограничивающих примеров, гибриды с Fc-доменом, цитокином, токсином или ферментом. В некоторых контекстах настоящего документа фрагменты упоминаются специально для подчеркивания, однако следует понимать, что независимо от обозначения фрагментов термин «антитело» включает такие фрагменты.

[0048] Кроме того, определение «антитела» включает, например, одноцепочечные формы, в общем случае обозначаемые как Fv-области, или антитела, обладающие указанной специфичностью. Указанные scFv состоят из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, соединенных линкером. В большинстве случаев (но не всегда) указанный линкер может представлять собой пептид. Длина линкерного пептида предпочтительно составляет от приблизительно 10 до 25 аминокислот. Линкерный пептид предпочтительно богат глицином, а также серином или треонином. scFv можно использовать для облегчения фагового дисплея или для проточной цитометрии, иммуногистохимического анализа или в качестве доменов, обеспечивающих таргетное воздействие. В данной области

техники известны способы изготовления и применения scFv. В предпочтительном варианте реализации scFv согласно настоящему изобретению конъюгированы с константным доменом человека. В некоторых вариантах реализации константный домен тяжелой цепи происходит от домена IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В других вариантах реализации константный домен тяжелой цепи может происходить от IgA, IgM или IgE.

[0049] Термин «антитело» также включает биспецифичные моноклональные антитела (т.е. белок, содержащий фрагменты двух различных моноклональных антител и, следовательно, связывающий два различных антигена). Конкретным примером биспецифичного моноклонального антитела может являться биспецифичный активатор Т-клеток (BiTE), представляющий собой гибридный белок, состоящее из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) различных антител. В некоторых вариантах реализации BiTE образуют звено между Т-клетками и раковыми клетками. Соответственно, один scFv специфичен по отношению к GRP78, а другой scFv связывает Т-клетку. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой химерный рецептор антигена (CAR), также называемый искусственным Т-клеточным рецептором, химерным -клеточным рецептором или химерным иммунорецептором. CAR представляют собой сконструированные рецепторы, придающие произвольную специфичность иммунной эффекторной клетке. В некоторых вариантах реализации CAR, описанные в настоящем документе, экспрессируются на иммунных эффекторных клетках. В настоящем документе термин «иммунная эффекторная клетка» представляет собой клетку, активно вовлеченную в разрушение опухолевых или раковых клеток, например, обладающую противоопухолевой/противораковой активностью. Эти клетки могут включать клетки-макрофаги, клетки-лимфоциты, клетки-естественные киллеры (NK), цитотоксические Т-клетки и Т-клетки памяти, но не ограничиваются ими. Термин «иммунные эффекторные клетки, несущие химерный рецептор антигена (CAR)» означает иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена. Эти клетки могут включать CAR-макрофаг, CAR-Т-клетки или iNKT-клетки, несущие CAR (iNKT-CAR), но не ограничиваются ими. Обычно эти

CAR используют для придания иммунной эффекторной клетке специфичности антигенсвязывающего белка против GRP78.

[0050] Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой переориентирующееся антитело с двойным сродством (DART). Формат DART основан на формате диатела, в котором родственные переменные домены тяжелой и легкой цепей 2 антигенсвязывающих специфичностей разнесены на 2 отдельных полипептидных цепях. Поскольку эти 2 полипептидные цепи нековалентно ассоциируют в формате диатела, формат DART обеспечивает дополнительную стабилизацию за счет С-концевого дисульфидного мостика. Высококачественные DART можно продуцировать в большом количестве, они характеризуются исключительной стабильностью как в буферном составе, так и в сыворотке человека. Кроме того, определение «антитела» включает однодоменные антитела, обычно обозначаемые как sdAb и представляющие собой фрагмент антитела, состоящий из единственного мономерного переменного домена антитела. sdAb-антитело может происходить от антител верблюдовых (VHH-фрагменты) или хрящевых рыб (VNAR-фрагменты). При условии, что белок сохраняет способность специфично связывать свою мишень, он входит в термин «антитело».

[0051] Антитела, которые можно применять в настоящем изобретении, предпочтительно, но не обязательно продуцируют рекомбинантно, поскольку при использовании обычных антител мыши или другого животного, не являющегося человеком, обладающих соответствующей специфичностью, требуются манипуляции с целью преобразования их в гуманизованную форму. Антитела могут быть или не быть гликозилированными, хотя предпочтительными являются гликозилированные антитела. Антитела, как известно, надлежащим образом перекрестно связаны дисульфидными связями. Антитело согласно настоящему изобретению можно модифицировать с целью оптимизации или минимизации эффекторной функции. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению можно модифицировать с целью увеличения периода его полувыведения. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению можно модифицировать с целью

улучшения сродства связывания. В данной области техники известны способы модификации антитела с целью улучшения вышеупомянутых характеристик.

[0052] Простейшая структурная единица антитела, которую можно использовать в настоящей заявке, содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи содержит переменную область размером приблизительно 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственных за распознавание антигена. С-концевая часть каждой цепи ограничивает константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию.

[0053] Легкие цепи классифицируются как гамма-, мю-, альфа- и лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эпсилон-, и определяют изотип антитела - IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. В составе легких и тяжелых цепей переменные и константные области соединены "J"-областью из приблизительно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает "D"-область из приблизительно 10 дополнительных аминокислот.

[0054] Переменные области каждой пары легкая / тяжелая цепь образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело содержит два сайта связывания, хотя рекомбинантные версии могут характеризоваться большей валентностью. Цепи имеют одну и ту же общую структуру - относительно консервативные каркасные области (FR) соединены тремя гиперпеременными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность (здесь и далее - «CDR»). CDR двух цепей выровнены по каркасным областям, обеспечивая связывание с конкретным эпитопом. Как легкая, так и тяжелая цепи обычно содержат по порядку с N- конца к С- концу FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4-домены, соответственно. Присвоение аминокислотных последовательностей каждому домену соответствует известным правилам (см Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991; Chothia, et al, J. Mol. Bio. (1987) 196:901-917; Chothia,

et al., Nature (1989) 342:878-883). Например, можно использовать определение CDR по Kabat, Chothia, их комбинациям или другими известными способами.

[0055] В одном аспекте антитела согласно настоящему изобретению с соответствующей специфичностью получают с использованием стандартных методик иммунизации млекопитающих, образования гибридом из клеток указанных млекопитающих, продуцирующих антитела, или иммортализации их иными способами, и культивирования гибридом или иммортализованных клеток с целью их оценки на предмет соответствующей специфичности. В данном случае такие антитела можно получать путем иммунизации человека, кролика, крысы или мыши, например, пептидом, представляющим собой эпитоп, охватывающий область кодирующих последовательностей белка GRP78 или ее соответствующую часть. Материалы для рекомбинантной манипуляции можно получать путем извлечения нуклеотидных последовательностей, кодирующих желательное антитело, из гибридомы или другой клетки, продуцирующей его. Затем эти нуклеотидные последовательности при желании можно подвергать манипуляциям, выделять, исследовать, очищать и извлекать для представления их в гуманизированной форме.

[0056] В настоящем документе «гуманизированное антитело» включает антитело против GRP78, частично или полностью состоящее из аминокислотных последовательностей, происходящих от зародышевой линии антител человека за счет изменения последовательности антитела, содержащего области, определяющие комплементарность (CDR), нечеловеческого происхождения. Простейшее из таких изменений может состоять из простой замены константной области мыши константной областью антитела человека, что приводит к получению химерного антитела человека/мыши, которое может обладать достаточно низкой иммуногенностью для того, чтобы являться приемлемым для фармацевтического применения. В то же время переменную область антитела и даже CDR также предпочтительно гуманизируют с использованием методик, в настоящее время хорошо известных в данной области техники. Каркасные области переменных областей замещают соответствующим каркасными областями человека, оставляя CDR нечеловеческого происхождения

по существу интактными, или даже заменяя CDR последовательностями, происходящими из генома человека. Кроме того, CDR можно подвергать случайным мутациям, сохраняющим или улучшающим активность и сродство связывания с GRP78 в контексте полностью человеческих каркасных областей зародышевой линии или каркасных областей, являющихся по существу человеческими. По существу человеческие каркасные области характеризуются по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности по отношению к известной каркасной области человека. Полностью функциональные антитела человека получают в генетически модифицированных мышах, иммунную систему которых модифицируют в соответствии с иммунной системой человека. Как упоминалось выше, этого достаточно для применения в способах согласно настоящему изобретению, для использования иммунологически специфичного фрагмента антитела, в том числе фрагментов, представляющих собой одноцепочечные формы.

[0057] Кроме того, в настоящем документе термин «гуманизированное антитело» относится к антителу против GRP78, содержащему каркасные области человека, по меньшей мере одну CDR антитела нечеловеческого происхождения, в котором любая присутствующая константная область по существу идентична константной области иммуноглобулина человека, т.е. идентична по меньшей мере на 85-90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%. Следовательно, все фрагменты гуманизированного антитела, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим фрагментам одной или более из нативных последовательностей иммуноглобулина человека.

[0058] При желании можно сконструировать гуманизированные иммуноглобулины следующим образом. Если аминокислотная последовательность попадает в следующую категорию, то аминокислотную последовательность каркасной области иммуноглобулина человека, который планируют использовать (акцепторного иммуноглобулина) заменяют аминокислотой последовательностью каркасной области иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, содержащего CDR (донорного иммуноглобулина). (а) аминокислотная последовательность каркасной области акцепторного иммуноглобулина человека

является необычной для иммуноглобулинов человека в указанном положении, в то время как соответствующая аминокислотная последовательность донорного иммуноглобулина типична для иммуноглобулинов человека в указанном положении; (b) положение аминокислотной последовательности непосредственно примыкает к одному из CDR; или (c) в трехмерной модели иммуноглобулина любой атом боковой цепи в аминокислотной последовательности каркасной области находится в пределах 5-6 ангстрем (от центра до центра) от любого атома в аминокислотной последовательности CDR (Queen, et al., op. cit., и Co, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2869). Если каждая из аминокислотных последовательностей в каркасной области человека акцепторного иммуноглобулина и соответствующая аминокислотная последовательность в донорной области являются нетипичными для иммуноглобулина человека в этом положении, такую аминокислотную последовательность можно заменить аминокислотной последовательностью, типичной для иммуноглобулина человека в этом положении.

[0059] Антитела согласно настоящему изобретению также можно конъюгировать с полезной нагрузкой, например, терапевтическим агентом, обнаружимой меткой, и/или устройством для доставки (включая липосому или наночастицу, но не ограничиваясь ими), содержащим лекарственное средство или обнаружимую метку. Способы конъюгирования антитела с терапевтическим агентом, обнаружимой меткой, липосомой, наночастицей или другим устройством для доставки известны в данной области техники. Вообще говоря, конъюгирование не должно мешать распознаванию мишени антителом и не должно мешать работе активного центра мишени. В некоторых случаях можно получить антитело с расщепляемой связью между антителом и полезной нагрузкой. Такой линкер может позволять высвободить полезную нагрузку в конкретном местоположении в клетке. Подходящие линкеры включают аминокислотные цепи и алкильные цепи, функционализированные реактивными группами для конъюгирования как с антителом согласно настоящему изобретению, так и с обнаружимой меткой и/или терапевтическим агентом.

[0060] Антигенсвязывающие белки против GRP78, которые можно применять в настоящей заявке, также включают антигенсвязывающие белки, специфично связывающие GRP78 в биологическом образце. В типичном варианте реализации антигенсвязывающий белок, который можно применять в настоящей заявке, включает все антигенсвязывающие белки, специфично связывающие GRP78, присутствующий в биологическом образце.

[0061] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению конъюгирован с терапевтическим агентом. Терапевтический агент предпочтительно ослабляет или мешает росту рака или опухоли или иным образом снижает влияние рака или опухоли в теле или организме. Терапевтический агент, ослабляющий симптомы, возникающие из-за рака или опухоли, или ослабляющий рост рака или опухоли, подходит для настоящего изобретения.

[0062] Кроме того, терапевтический агент, ослабляющий симптомы, ассоциированные с ростом рака или опухоли, действует в целях настоящего изобретения. Неограничивающие примеры терапевтических агентов могут включать иммунные эффекторные клетки, несущие CAR, лекарственные средства, терапевтические соединения, генетические материалы, металлы (например, радиоактивные изотопы), белки, пептиды, углеводы, липиды, стероиды, материалы на основе нуклеиновых кислот или их производные, аналоги или комбинации, в нативной форме или модифицированные гидрофобными или заряженными группами с целью улучшения внедрения или адсорбции в клетку. Такие терапевтические агенты могут быть водорастворимыми или гидрофобными. Неограничивающие примеры терапевтических агентов могут включать агенты, имеющие отношение к иммунной системе, тиреоидные агенты, продукты для лечения респираторных заболеваний, противоопухолевые агенты, противоглистные средства, противомаларийные средства, ингибиторы митоза, гормоны, противопротозойные средства, противотуберкулезные средства, сердечно-сосудистые средства, препараты крови, модификаторы биологического ответа, противогрибковые агенты, витамины, пептиды, противоаллергические агенты, антикоагулянты,

циркулирующие лекарственные средства, усилители метаболизма, противовирусные средства, антиангинальные средства, антибиотики, противовоспалительные средства, противоревматические средства, наркотики, сердечные гликозиды, блокаторы нервно-мышечной проводимости, седативные средства, местные анестетики, общие анестетики или радиоактивные атомы или ионы. Неограничивающие примеры терапевтическими агентами включены в **таблицу А** ниже. Выделенный антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью терапевтическими агентами. В данной области техники известны способы конъюгирования антитела с терапевтическим агентом. Вообще говоря, конъюгирование не должно мешать распознаванию мишени антителом и не должно мешать работе активного центра мишени. В некоторых случаях можно получить scFv с расцепляемой связью между scFv и терапевтическим агентом. Такой линкер может позволять высвобождать терапевтический агент в конкретном местоположении в клетке.

ТАБЛИЦА А: Неограничивающие примеры терапевтических агентов	
Типичный терапевтический агент	Неограничивающие примеры
Агенты, имеющие отношение к иммунной системе	иммунные сыворотки, антитоксины, противоядия, бактериальные вакцины, вирусные вакцины, продукты для профилактики бешенства
тиреоидные агенты	продукты иода и агенты, подавляющие активность щитовидной железы
продукты для лечения респираторных заболеваний	производные ксантина теофиллин и аминофиллин
противоопухолевые агенты	соединения платины (например, спироплатин, цисплатин и карбоплатин), метотрексат, фторурацил, адриамицин, митомицин, ансамицин,

	<p>блеомицин, арабинозид цитозина, арабинозиладенин, меркаптополилизин, винкристин, бусульфан, хлорамбуцил, мелфалан (например, ПАМ, L-ПАМ или фенилаланин-иприт), меркаптопурин, митотан, монометилауристатин Е (ММАЕ), лекарственные средства-майтансиноиды (например, DM1), гидрохлорид прокарбазина, дактиномицин (актиномицин D), гидрохлорид даунорубицина, гидрохлорид доксорубицина, паклитаксел и другие таксаны, рапамицин, манумицин А, TNP-470, гликамицин (митрамицин), аминоклутетимид, фосфат эстрамустина-натрия, флутамид, ацетат лейпролида, ацетат мегестрола, цитрат тамоксифена, тестолактон, трилостан, амсакрин (m-AMSA), аспарагиназа (L-аспарагиназа), аспарагиназа Erwinia, интерферон α-2a, интерферон α-2b, тенипозид (VM-26), сульфат винбластина (VLB), сульфат винкристина, сульфат блеомицина, гидроксимочевина, прокарбазин и дакарбазин</p>
противоглистные средства	памоат пирантела, пиперазин, тетрахлорэтилен, тиабендазол, никлозамид
противомаларийные средства	Хлорохин, амодиахин, антифолатные средства, прогуанил (хлоргуанид), мефлохин, хинин, галофантрин, артемизин и его производные, примахин, доксициклин, тетрациклин и клиндамицин
ингибиторы митоза	этопозид, колхицин и алкалоиды барвинка
гормоны	андрогены прогестины, эстрогены и антиэстрогены, гормон роста,

	меланоцитстимулирующий гормон, эстрадиол, дипропионат беклометазона, бетаметазон, ацетат беклометазона и фосфат беклометазона-натрия, фосфат бетаметазона-динатрия, фосфат бетаметазона-натрия, ацетат кортизона, дексаметазон, ацетат дексаметазона, фосфат дексаметазона-натрия, флунизолид, гидрокортизон, ацетат гидрокортизона, ципионат гидрокортизона, фосфат гидрокортизона-натрия, сукцинат гидрокортизона-натрия, метилпреднизолон, ацетат метилпреднизолона, сукцинат метилпреднизолона-натрия, ацетат параметазона, преднизолон, ацетат преднизолона, фосфат преднизолона-натрия, тебутат преднизолона, преднизон, триамцинолон, ацетонид триамцинолона, диацетат триамцинолона, гексацетонид триамцинолона, ацетат флудрокортизона, окситоцин, вазопрессин, глюкагон и их производные
противопротозойные средства	хлорохин, гидроксихлорохин, метронидазол, хинин и антимолат меглумина
противотуберкулезные средства	парааминосалициловая кислота, изониазид, сульфат капреомицина, циклосерин, гидрохлорид этамбутола, этионамид, пипразинамид, рифампин и сульфат стрептомицина
сердечно-сосудистые средства	хелатирующие агенты и ртутные диуретики и сердечные гликозиды
препараты крови	железо для парентерального введения, гемин, гематопорфирины и их производные
модификаторы биологического ответа	цитокины, мурамилдипептид, мурамидтрипептид, компоненты клеточной стенки микроорганизмов,

	лимфокины (например, бактериальный эндотоксин, например, липополисахарид, фактор активации макрофагов), субъединицы бактерий (например, Mycobacteria, Corynebacteria), синтетический дипептид N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин
противогрибковые агенты	кетоконазол, нистатин, гризеофульвин, флуцитозин (5-фс), миконазол, амфотерицин В, ризин, циклоспорины и β -лактамы антибиотики (например, сульфазецин)
витамины	цианкобаламин, ретиноевая кислота, ретиноиды и их производные, например, пальмитат ретинола, α -токоферол
Пептиды	марганецсодержащая супероксиддисмутаза, ферменты, например, щелочная фосфатаза
противоаллергические агенты	Амлексанокс
антикоагулянты	фенпрокумон и гепарин
циркулирующие лекарственные средства	Пропранолол
усилители метаболизма	Глутатион
противовирусные средства	ацикловир, амантадин, азидотимидин (AZT, DDI, фоскарнет или зидовудин), рибавирин и моногидрат видарабина (арабинозид аденина, ara-A)
антиангинальные средства	дилтиазем, нифедипин, верапамил, тетранитрат эритрита, динитрат изосорбида, нитроглицерин (тринитрат глицерина) и тетранитрат пентаэритрита

антибиотики	дапсон, хлорамфеникол, неомицин, цефаклор, цефадроксил, цефалексин, цефрадин, эритромицин, клиндамицин, линкомицин, амоксициллин, ампициллин, бакампициллин, карбенициллин, диклоксациллин, циклациллин, диклоскациллин, хетациллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, пенициллин, в том числе пенициллин G и пенициллин V, тикарциллин, рифампин, аминогликозиды и тетрациклин
противовоспалительные средства	дифлунисал, ибупрофен, индометацин, меклофенамат, мефенамовая кислота, напроксен, оксифенбутазон, фенилбутазон, пироксикам, сулиндак, толметин, аспирин и салицилаты
противоревматические средства	Адалимумаб, азатиоприн, хлорохин и гидроксихлорохин (противомалерийные средства), циклоспорин (циклоспорин А), D-пеницилламин, этанерцепт, соли золота (ауротиомалат натрия, ауранофин), инфликсимаб, лефлуномид, метотрексат, миноциклин (тетрациклиновый антибиотик), сульфасалазин
наркотики	Камфарная настойка опия, опиаты, кодеин, героин, метадон, морфин и опий
Сердечные гликозиды	десланозид, дигитоксин, дигоксин, дигиталин и наперстянка
блокаторы нервно-мышечной проводимости	мезилат атракурия, триэтиодид галламина, бромид гексафлурония, иодид метокурина, бромид панкурония, хлорид сукцинилхолина (хлорид суксаметония), хлорид тубокурарина и бромид векурония

седативные (снотворные) средства	амобарбитал, апробарбитал, хлоралгидрат, гидрохлорид гидрохлорид гидрохлорид пентобарбитал, фенобарбитал талбутал, темазепам и триазолам	амобарбитал бутабарбитал этхлорвинол, флуразепама, метотримепразина, мидазолама, пентобарбитал натрия, секобарбитал натрия	натрия, натрия, этинамат, глютетимид, метиприлон, паральдегид, натрия, натрия,
местные анестетики	гидрохлорид хлорпрокаина, гидрохлорид мепивакаина, гидрохлорид тетракаина	бупивакаина, гидрохлорид лидокаина, гидрохлорид	гидрохлорид этидокаина, гидрохлорид прокаина и
общие анестетики	дроперидол, дроперидолом, метогекситал натрия и тиопентал натрия	этомидат, гидрохлорид	цитрат фентанила с кетамина, натрия
радиоактивные частицы или ионы	Актиний, свинец ²¹² , радий, стронций, иодид рения, иттрий и радиофармацевтические агенты, например, продукты радиоактивного иода, меди и фосфора		

[0063] Один аспект настоящего изобретения охватывает антитело, связывающееся с GRP78. В некоторых вариантах реализации антитело против GRP79 происходит от гибридомы, обозначаемой как 7A9 или 6F8. В настоящем документе термин «происходит от» означает, что «производное» антитело содержит по меньшей мере одну область CDR антитела, продуцированного 6F8 или 7A9. Иначе говоря, «производное антитело» содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ

ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:12.

[0064] В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может происходить от гибридомы 7A9 и может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:13 и/или может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:14. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может происходить от гибридомы 6F8 и может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:15 и/или может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:16. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:27 и/или может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:28. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:35 и/или может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:36. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной

области тяжелой цепи SEQ ID NO:43 и/или может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:44. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:51 и/или может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью по отношению к вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:52. В каждом из вышеупомянутых вариантов реализации антитело может быть гуманизированным.

[0065] В типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, связывающее GRP78, содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:13 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:14 [т.е. моноклональное антитело под названием 7A9]. В еще одном типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, связывающееся с GRP78, содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:15 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:16 [т.е. моноклональное антитело под названием 6F8]. В еще одном типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, связывающееся с GRP78, содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:27 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:28 [т.е. scFv-антитело под названием GRP78--1183]. В еще одном типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, связывающееся с GRP78, содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:35 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:36 [т.е. scFv-антитело под названием GRP78--1164]. В еще одном типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, связывающееся с GRP78, содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:43 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:44 [т.е.

scFv-антитело под названием GRP78--1171]. В еще одном типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению, связывающееся с GRP78, содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:51 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52 [т.е. scFv-антитело под названием GRP78--1256].

[0066] В одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать CDR1 тяжелой цепи, например, антитело 1, 49, 97, 146, 194 и 242 из **таблицы В**. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать CDR2 тяжелой цепи, например, антитело 4, 52, 100, 149, 197 и 245 из **таблицы В**. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать CDR3 тяжелой цепи, например, антитело 6, 54, 102, 151, 196 и 247 из **таблицы В**. В альтернативном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать комбинацию из двух или трех CDR тяжелой цепи, например, антитела 2, 3, 5, 50, 51, 53, 98, 99, 101, 147, 148, 150, 195, 196 и 198 из **таблицы В**.

[0067] Аналогичным образом, в одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать CDR1 легкой цепи, например, антитело 7, 55, 103, 152, 200 и 248 из **таблицы В**. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать CDR2 легкой цепи, например, антитело 10, 58, 106, 155, 203 и 251 из **таблицы В**. В еще одном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать CDR3 легкой цепи, например, антитело 12, 60, 108, 157, 205 и 253 из **таблицы В**. В альтернативном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать комбинацию из двух или трех CDR легкой цепи, например, антитела 8, 9, 11, 56, 57, 59, 104, 105, 107, 153, 154, 156, 201, 202, 204, 249, 250 и 252 из **таблицы В**.

[0068] В качестве альтернативы, антитело согласно настоящему изобретению может содержать одну или более из CDR легкой цепи и одну или более из CDR тяжелой цепи, например, антитела 13-48, 61-96, 109-145, 158-193, 200-226 и 233-286 из **таблицы В**.

[0069] В типичном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению может содержать последовательности CDR, перечисленные ниже в **таблице В**.

Таблица В: Комбинации CDR, содержащиеся в антителах, распознающих GRP78

Антитело	Тяжелая цепь			Легкая цепь		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1	SEQ ID NO:1					
2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2				
3	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3			
4		SEQ ID NO:2				
5		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3			
6			SEQ ID NO:3			
7				SEQ ID NO:4		
8				SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
9				SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
10					SEQ ID NO:5	
11					SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
12						SEQ ID NO:6
13	SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:4		
14	SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
15	SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
16	SEQ ID NO:1				SEQ ID NO:5	
17	SEQ ID NO:1				SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
18	SEQ ID NO:1					SEQ ID NO:6
19	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:4		
20	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
21	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6

22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:5	
23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
24	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2				SEQ ID NO:6
25	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4		
26	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
27	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
28	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:5	
29	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
30	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3			SEQ ID NO:6
31		SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:4		
32		SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
33		SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
34		SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:5	
35		SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
36		SEQ ID NO:2				SEQ ID NO:6
37		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4		
38		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
39		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
40		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:5	
41		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
42		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3			SEQ ID NO:6
43			SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4		
44			SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	
45			SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
46			SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:5	
47			SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
48			SEQ ID NO:3			SEQ ID NO:6
49	SEQ ID NO:7					
50	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8				

51	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9			
52		SEQ ID NO:8				
53		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9			
54			SEQ ID NO:9			
55				SEQ ID NO:10		
56				SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	
57				SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
58					SEQ ID NO:11	
59					SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
60						SEQ ID NO:12
61	SEQ ID NO:7			SEQ ID NO:10		
62	SEQ ID NO:7			SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	
63	SEQ ID NO:7			SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
64	SEQ ID NO:7				SEQ ID NO:11	
65	SEQ ID NO:7				SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
66	SEQ ID NO:7					SEQ ID NO:12
67	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8		SEQ ID NO:10		
68	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8		SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	

69	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8		SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
70	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8			SEQ ID NO:11	
71	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8			SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
72	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8				SEQ ID NO:12
73	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10		
74	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	
75	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
76	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:11	
77	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
78	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9			SEQ ID NO:12
79		SEQ ID NO:8		SEQ ID NO:10		
80		SEQ ID NO:8		SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	
81		SEQ ID NO:8		SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
82		SEQ ID NO:8			SEQ ID NO:11	
83		SEQ ID NO:8			SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
84		SEQ ID NO:8				SEQ ID NO:12
85		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10		

86		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	
87		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
88		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:11	
89		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
90		SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9			SEQ ID NO:12
91			SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10		
92			SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	
93			SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
94			SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:11	
95			SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
96			SEQ ID NO:9			SEQ ID NO:12
97	SEQ ID NO:21					
98	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22				
99	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23			
100		SEQ ID NO:22				
101		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23			
102			SEQ ID NO:23			
103				SEQ ID NO:24		

104				SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
105				SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
106					SEQ ID NO:25	
107					SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
108						SEQ ID NO:26
109	SEQ ID NO:21			SEQ ID NO:24		
110	SEQ ID NO:21			SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
111	SEQ ID NO:21			SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
112	SEQ ID NO:21				SEQ ID NO:25	
113	SEQ ID NO:21				SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
114	SEQ ID NO:21					SEQ ID NO:26
115	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:24		
116	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
117	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
118	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22			SEQ ID NO:25	
119	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22			SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
120	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22				SEQ ID NO:26

121	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24		
123	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
124	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
125	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:25	
126	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
127	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23			SEQ ID NO:26
128		SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:24		
129		SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
130		SEQ ID NO:22		SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
131		SEQ ID NO:22			SEQ ID NO:25	
132		SEQ ID NO:22			SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
133		SEQ ID NO:22				SEQ ID NO:26
134		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24		
135		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
136		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
137		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:25	
138		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26

139		SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23			SEQ ID NO:26
140			SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24		
141			SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	
142			SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
143			SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:25	
144			SEQ ID NO:23		SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
145			SEQ ID NO:23			SEQ ID NO:26
146	SEQ ID NO:29					
147	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30				
148	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31			
149		SEQ ID NO:30				
150		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31			
151			SEQ ID NO:31			
152				SEQ ID NO:32		
153				SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
154				SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
155					SEQ ID NO:33	
156					SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34

157						SEQ ID NO:34
158	SEQ ID NO:29			SEQ ID NO:32		
159	SEQ ID NO:29			SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
160	SEQ ID NO:29			SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
161	SEQ ID NO:29				SEQ ID NO:33	
162	SEQ ID NO:29				SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
163	SEQ ID NO:29					SEQ ID NO:34
164	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30		SEQ ID NO:32		
165	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30		SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
166	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30		SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
167	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30			SEQ ID NO:33	
168	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30			SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
169	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30				SEQ ID NO:34
170	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32		
171	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
172	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
173	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31		SEQ ID NO:33	

174	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31		SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
175	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31			SEQ ID NO:34
176		SEQ ID NO:30		SEQ ID NO:32		
177		SEQ ID NO:30		SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
178		SEQ ID NO:30		SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
179		SEQ ID NO:30			SEQ ID NO:33	
180		SEQ ID NO:30			SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
181		SEQ ID NO:30				SEQ ID NO:34
182		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32		
183		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
184		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
185		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31		SEQ ID NO:33	
186		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31		SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
187		SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31			SEQ ID NO:34
188			SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32		
189			SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	
190			SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34

191			SEQ ID NO:31		SEQ ID NO:33	
192			SEQ ID NO:31		SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
193			SEQ ID NO:31			SEQ ID NO:34
194	SEQ ID NO:37					
195	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38				
196	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39			
197		SEQ ID NO:38				
198		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39			
199			SEQ ID NO:39			
200				SEQ ID NO:40		
201				SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	
202				SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
203					SEQ ID NO:41	
204					SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
205						SEQ ID NO:42
206	SEQ ID NO:37			SEQ ID NO:40		
207	SEQ ID NO:37			SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	
208	SEQ ID NO:37			SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42

209	SEQ ID NO:37				SEQ ID NO:41	
210	SEQ ID NO:37				SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
211	SEQ ID NO:37					SEQ ID NO:42
212	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38		SEQ ID NO:40		
213	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38		SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	
214	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38		SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
215	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38			SEQ ID NO:41	
216	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38			SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
217	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38				SEQ ID NO:42
218	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40		
219	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	
220	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
221	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39		SEQ ID NO:41	
222	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39		SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
223	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39			SEQ ID NO:42
224		SEQ ID NO:38		SEQ ID NO:40		
225		SEQ ID NO:38		SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	

226		SEQ ID NO:38		SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
227		SEQ ID NO:38			SEQ ID NO:41	
228		SEQ ID NO:38			SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
229		SEQ ID NO:38				SEQ ID NO:42
230		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40		
231		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	
232		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
233		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39		SEQ ID NO:41	
234		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39		SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
235		SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39			SEQ ID NO:42
236			SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40		
237			SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	
238			SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
239			SEQ ID NO:39		SEQ ID NO:41	
240			SEQ ID NO:39		SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
241			SEQ ID NO:39			SEQ ID NO:42
242	SEQ ID NO:45					
243	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46				

244	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47			
245		SEQ ID NO:46				
246		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47			
247			SEQ ID NO:47			
248				SEQ ID NO:48		
249				SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
250				SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
251					SEQ ID NO:49	
252					SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
253						SEQ ID NO:50
254	SEQ ID NO:45			SEQ ID NO:48		
255	SEQ ID NO:45			SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
256	SEQ ID NO:45			SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
257	SEQ ID NO:45				SEQ ID NO:49	
258	SEQ ID NO:45				SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
259	SEQ ID NO:45					SEQ ID NO:50
260	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46		SEQ ID NO:48		

261	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46		SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
262	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46		SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
263	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46			SEQ ID NO:49	
264	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46			SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
265	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46				SEQ ID NO:50
266	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48		
267	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
268	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
269	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47		SEQ ID NO:49	
270	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47		SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
271	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47			SEQ ID NO:50
272		SEQ ID NO:46		SEQ ID NO:48		
273		SEQ ID NO:46		SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
274		SEQ ID NO:46		SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
275		SEQ ID NO:46			SEQ ID NO:49	
276		SEQ ID NO:46			SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
277		SEQ ID NO:46				SEQ ID NO:50

278		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48		
279		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
280		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
281		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47		SEQ ID NO:49	
282		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47		SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50
283		SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:47			SEQ ID NO:50
284			SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48		
285			SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	
286			SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50

[0070] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:72; X1-X2-A-M-N, где X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, а X2 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью. В некоторых вариантах реализации X1 представляет собой гидрофобную алифатическую или полярную нейтральную боковую цепь.

[0071] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению содержит CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:73; R-I-R-S-K-X1-X2-N-Y-A-T-Y-Y-A-D-S-N-K-D, где X1 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью, а X2 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью. В некоторых вариантах

реализации X2 представляет собой аминокислоту с гидрофобной ароматической или полярной нейтральной боковой цепью.

[0072] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению содержит CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:74; x-x-X1-S-X2-x-l-X3-x-H-x-x, где x представляет собой любую аминокислоту, X1 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью; X2 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью, а X3 собой аминокислоту с гидрофобной или с полярной нейтральной боковой цепью. В некоторых вариантах реализации x выбрана из S, M, H, L, R или A. В некоторых вариантах реализации x3 представляет собой аминокислоту с гидрофобной ароматической или полярной нейтральной боковой цепью.

[0073] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению содержит CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:75; X1-X2-S-X3-L-x-S, где x представляет собой любую аминокислоту, X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, X2 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, а X3 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью. В некоторых вариантах реализации x выбрана из A или D. В некоторых вариантах реализации X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной алифатической или полярной нейтральной боковой цепью. В некоторых вариантах реализации X2 представляет собой аминокислоту с гидрофобной алифатической или полярной нейтральной боковой цепью.

[0074] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению содержит CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:76; X1-Q-X2-S-S-Y-P-X3-T, где x представляет собой любую аминокислоту, X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, а X3 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью. В некоторых вариантах реализации X2 выбрана из Y или R. В некоторых вариантах реализации

X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной алифатической или полярной нейтральной боковой цепью.

[0075] В одном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:2, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:3, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и/или может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:5, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:6, несущую от нуля до двух аминокислотных замен. В еще одном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO:7, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:8, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:9, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:10, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:11, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:12, несущую от нуля до двух аминокислотных замен. В одном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:21, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:22, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:23, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и/или может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:24, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:25, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:26, несущую от нуля до двух аминокислотных замен. В еще одном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO:29, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:30, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:31, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, вариабельную область

легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:32, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:33, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:34, несущую от нуля до двух аминокислотных замен. В одном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:38, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:39, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и/или может содержать переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:40, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:41, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:42, несущую от нуля до двух аминокислотных замен. В еще одном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO:45, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:46, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:47, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, SEQ ID NO:49, несущую от нуля до двух аминокислотных замен, и SEQ ID NO:50, несущую от нуля до двух аминокислотных замен.

[0076] В типичном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, and SEQ ID NO:6. В типичном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, and SEQ ID NO:12. В типичном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25,

and SEQ ID NO:26. В типичном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, and SEQ ID NO:34. В типичном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, and SEQ ID NO:42. В типичном варианте реализации антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, and SEQ ID NO:50.

[0077] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение охватывает нуклеиновые кислоты согласно SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 55, 56, 59 или 60. Настоящее изобретение также охватывает соответствующие нуклеотидные последовательности, кодирующие SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 или SEQ ID NO:50, которые легко может определить специалист в данной области техники и которые можно включить в вектор или другую крупную молекулу ДНК, например, хромосому, с целью экспрессии антитела согласно настоящему изобретению.

[0078] Настоящее изобретение также охватывает вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, способную кодировать антитело согласно настоящему изобретению. В настоящем документе «вектор» определяют как молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для переноса

генетического материала. Векторы включают плазмиды, фазмиды, космиды, мобильные генетические элементы, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC), например, ретровирусные векторы (например, векторы, происходящие от вируса лейкоза Молони мышей (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV и т.д.), лентивирусные векторы (например, происходящие от ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВАО, ВВ, ВВК и т.д.), аденовирусные (Ad) векторы, включая их способные к репликации, дефектные по репликации и «выпотрошенные» формы, аденоассоциированные (AAV) векторы, векторы на основе вируса обезьян 40 (SV-40), векторы на основе вируса папилломы КРС, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, герпесвирусные векторы, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе вируса саркомы мышей Харви, векторы на основе вируса опухолей молочной железы мышей, векторы на основе вируса саркомы Рауса, но не ограничиваются ими. Экспрессирующий вектор, кодирующий антитело согласно настоящему изобретению, можно доставлять в клетку с использованием вирусного вектора или посредством невирусного способа переноса. Вирусные векторы, подходящие для внедрения нуклеиновых кислот в клетки, включают ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, рабдовирусы и герпесвирусы. Невирусные способы переноса нуклеиновых кислот включают несвязанные нуклеиновые кислоты, липосомы и конъюгаты белок/нуклеиновая кислота. Экспрессирующий конструкт, кодирующий антитело согласно настоящему изобретению и внедряемый в клетку, может быть линейным или кольцевым, одноцепочечным или двуцепочечным, и может представлять собой ДНК, РНК или любую их модификацию или комбинацию. Настоящее изобретение также охватывает линию клеток, содержащих вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, способную кодировать антитело согласно настоящему изобретению, в неограничивающих примерах, CAR-T-клетки, CAR-иммунные эффекторские клетки и CAR-макрофаги. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающие пептиды, описанные в настоящем документе, применяют для организации таргетного воздействия терапевтического вируса (например, сконструированного аденовируса, онколитического вируса) на опухолевую клетку.

В одном аспекте терапевтический вирус экспрессирует антигенсвязывающий пептид согласно настоящему изобретению. В еще одном аспекте антигенсвязывающий пептид присоединен к онколитическому

[0079] Каждую из вышеупомянутых последовательностей можно найти ниже в **таблице С.**

Таблица С.	
SEQ ID NO:	Последовательность
1 (CDR1 HC 7A9)	INAMN
2 (CDR2 HC 7A9)	RIRSKSNNYATYYADSVKD
3 (CDR3 HC 7A9)	DITRAGYFDV
4 (CDR1 LC 7A9)	SASSSVIYMH
5 (CDR2 LC 7A9)	STSNLAS
6 (CDR3 LC 7A9)	QQRSSYPLT
7 (CDR1 HC 6F8)	TSAMN
8 (CDR2 HC 6F8)	RIRSKNYNYATYYADSVKD
9 (CDR3 HC 6F8)	PPGFAY
10 (CDR1 LC 6F8)	RTSQEISGHL
11 (CDR2 LC 6F8)	AASSLDS
12 (CDR3 LC 6F8)	LQYSSYPYT
13 (HC 7A9)	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAVSGITFNINAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMN NLKTEDTAMYYCVRDITRAGYFDVWGAGTTVTVSS
14 (LC 7A9)	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVIYMHWFQQKPGTSPKL WIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ RSSYPLTFGAGTKLELK
15 (HC 6F8)	EVQLVESGGGLVLRPKGSLKLSCAASGFTLNNTSAMNWVRQVPG KGLEWVGRIRSKNYNYATYYADSVKDRFTIFRDDSQNMLYLQMN NNLKTEDTAMYYCVRPPGFAYWGQGTTLVTVSA

16 (LC 6F8)	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRTSQEISGHL SWLQQKPDGTI KRLIYAASSLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYCL QYSSYPYTFGGGKLEIK
17 (NT HC 7A9)	GAGGTGCAGCTTGTTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCC TAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGTCTCTGGAATCAC CTTCAATATCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG AAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAA TAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAGGACAGGTTT ACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAA TGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGT GAGAGATATAACTCGGGCCGGGTA CTTCGATGTCTGGGGCG CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
18 (NT LC 7A9)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTC CAGGGGAGAAAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT GTAATTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACTTCT CCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGA GTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTAC TCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACT TATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTATCCGCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
19 (NT HC 6F8)	GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGGCC TAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCAC CCTCAATACCTCCGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGTTCCAG GAAAGGGTTTGAATGGGTTGGTTCGCATAAGAAGTAAAATT ATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTT CACCATTTTTCAGAGATGATTCACAAAACATGCTCTATCTGCAA ATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGT GTGAGGCCCCCGGGTTTGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCT GGTCACTGTCTCTGCA
20 (NT LC 6F8)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCT CTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCGGACAAGTCAGGAA ATTAGTGGTCACTTAAGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGGA ACTATTAACGCCTGATCTACGCCGCATCCAGTTTATAGATTCTG GTGTCCCAAAAAGGTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTTCAGATT ATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGCAGA CTATTACTGTCTACAATATTCTAGTTATCCGTACACGTTCCGGA GGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
21 (CDR1 humIGHV18 2)	GGTFSSYA
22 (CDR2 humIGHV18 2)	ISAYNGNT
23 (CDR3 humIGHV18 2)	ARDPPLRYFDWFRGSDWFDP

24 (CDR1 humIGLV04 8)	SGSIASNY
25 (CDR2 humIGLV04 8)	EDN
26 (CDR3 humIGLV04 8)	QSYDSTNGV
27 (humIGHV1 82)	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDPPLRYFDWFRGSDWFDWPWGQGLTVTS
28 (humIGLV0 48)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGS SPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYCQSYDSTNGVFGGGTKLTVL
29 (CDR1 humIGHV06 2)	GYTFTDYA
30 (CDR2 humIGHV06 2)	INPGSGNT
31 (CDR3 humIGHV06 2)	ARDRQGPDY
32 (CDR1 humIGLV08 3)	NIGSKN
33 (CDR2 humIGLV08 3)	GDS
34 (CDR3 humIGLV08 3)	QWWSNSDHPFV
35 (humIGHV0 62)	WVQLVESGPEVKKPGASVNVSCASGYTFTDYAIHWVRQAPG QRPEWMGWINPGSGNTKYSQKFQVRVTITRDTSASTAYMEMT SLRSEDTAIYYCARDRQGPDYWGQGLTVTS
36 (humIGLV0 83)	SYELMQPPSVSMAPGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKSGQA PVLVHGDSDRPSGIPERISGRNFGNTATLTINRVEAGDEADYY CQWWSNSDHPFVFGTGKTVL
37 (CDR1 humIGHV23 7)	GGTF SNPV
38 (CDR2 humIGHV23 7)	IITMFGTT

39 (CDR3 humIGHV237)	AKDPPMFDY
40 (CDR1 humIGLV120)	QSISSY
41 (CDR2 humIGLV120)	DAS
42 (CDR3 humIGLV120)	QYDNLLALT
43 (humIGHV237)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSNPVISWVRQAPG QGLEWMGGIITMFGTTYGNSVRGRFIVSRDNSKNMLFLQMNS LRAEDTAVYYCAKDPPMFDYWGQGTLVTVS
44 (humIGLV120)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQ QYDNLLALTFGGGKVDIK
45 (CDR1 humIGHV062)	GGYIDRYF
46 (CDR2 humIGHV062)	IYTSGRT
47 (CDR3 humIGHV168)	ARDRQGPDY
48 (CDR1 humIGLV098)	QGIRND
49 (CDR2 humIGLV098)	AAS
50 (CDR3 humIGLV098)	LQHNTYPWT
51 (humIGHV062)	EVQLVETGPGLVKPSQTLSTCSVSGGYIDRYFIHWVRQAPGQR PEWMGWIYTSGRTKYSQKFQVRVTITRDTSASTAYMEMTSLRS EDTAIYYCARDRQGPDYWGQGTLVTVS
52 (humIGLV098)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKA PKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC LQHNTYPWTFGQGTKVEIK
53 (последовательность антигена)	CISKLYGSAGPPPTGEEDTAE

54 (Пептид для биоэннинг а)	ISKLYGSAGPPPTGEEDTAE
55 НС 6F8 с сигнальной последоват ельностью	ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTGGCTTTGTTGTTTTTATC AAGGTGTGCATTGTGAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAG GATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCAG CCTCTGGATTACCCCTCAATACCTCCGCCATGAACTGGGTCC GCCAGGTTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGGTCGCATA AGAAGTAAAAATTATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGT GAAAGACAGGTTCAACATTTTCAGAGATGATTCACAAAACATG CTCTATCTGCAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCC ATGTATTACTGTGTGAGGCCCCCGGGTTTGGTTACTGGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
56 LC 6F8 с сигнальной последоват ельностью	ATGAGGGTTCCTGCTCACGTTTTTGGCTTCTTGTTGCTCTGGT TTCCAGGTACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTT GTCGGACAAGTCAGGAAATTAGTGGTCACTTAAGCTGGCTTC AGCAGAAACCAGATGGAACATTAACGCCTGATCTACGCCG CATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGTTCAAGTGGCA GTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTG AGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTAAGTGTCTACAATATTCTAG TTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA A
57 НС 6F8 с сигнальной последоват ельностью	MLLGLKWVCFVVFYQGVHCEVQLVESGGGLVLRPKGSLKLSCAA SGFTLNTSAMNWVRQVPGKLEWVGRIRSKNYNYATYYADSV KDRFTIFRDDSQNMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPPGFAYWG QGTLVTVSA
58 LC 6F8 с сигнальной последоват ельностью	MRVPAHVFGFLLLWFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC RTSQEISGHLWLQQKPDGTIKRLIYAASSLDGVPKRFSGSRS GSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGKLEIK
59 НС 7A9 с сигнальной последоват ельностью	ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATC AAGGTGTGCATTGTGAGGTGCAGCTTGTTGAGACTGGTGGG GGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAACTCTCATGTGCA GTCTCTGGAATCACCTTCAATATCAATGCCATGAACTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCAT AAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTC GTGAAGGACAGGTTCAACATCTCCAGAGATGATTCACAAAGC ATGCTCTATCTGCAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACA GCCATGTATTACTGTGTGAGAGATATAACTCGGGCCGGGTAC

	TTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC A
60 HC 7A9 с сигнальной последова тельностью	ATGCATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTG CCTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGT CTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCA TAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAATTTACATGCACTGGTT CCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAG CACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGG CAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCCGAAT GGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAG TAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAA
61 HC 7A9 с сигнальной последова тельностью	MLLGLKWVFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAV SGITFNINAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRDITRAGYFDV WGAGTTVTVSS
62 HC 7A9 с сигнальной последова тельностью	MHFVQVQIFSLLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCS ASSSVIYMHWFQQKPGTSPKLIWYSTSNLASGVPARFSGSGSG TSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK
63 Последова тельность 1 для картирован ия эпитопов	EEKIEWLESHQD
64 Последова тельность 2 для картирован ия эпитопов	ESHQDADIEDFK
65 Последова тельность 3 для картирован ия эпитопов	IEDFKAKKKELE
66 Последова тельность 4	KKELEEIVQPII

для картирования эпителий	
67 Последовательность 5 для картирования эпителий	VQPIISKLYGSA
68 Последовательность 6 для картирования эпителий	LYGSAGPPPTGE
69 Последовательность 7 для картирования эпителий	PPTGEEDTAEKD
70 эпитоп 7A9	ISKLYGSAEDTAE
71 эпитоп 6F8	PPTGEEDTAE
72 CDR1 HC	X1-X2-A-M-N, где X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, а X2 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью
73 CDR2 HC	R-I-R-S-K-X1-X2-N-Y-A-T-Y-Y-A-D-S-N-K-D, где X1 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью, а X2 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью
74 CDR1 LC	x-x-X1-S-X2-x-l-X3-x-H-x-x, где x представляет собой любую аминокислоту, X1 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью; X2 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью, а X3 собой аминокислоту с гидрофобной или с полярной нейтральной боковой цепью
75 CDR2 LC	X1-X2-S-X3-L-x-S, где x представляет собой любую аминокислоту, X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, X2

	представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, а X3 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью
76 CDR3 LC	X1-Q-X2-S-S-Y-P-X3-T, где x представляет собой любую аминокислоту, X1 представляет собой аминокислоту с гидрофобной или полярной нейтральной боковой цепью, а X3 представляет собой аминокислоту с полярной нейтральной боковой цепью

II. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

[0100] В еще одном аспекте выделенное антитело согласно настоящему изобретению, описанное выше, можно применять при лечении и профилактике рака и ассоциированных заболеваний у субъекта. Антитела согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с радиоактивными изотопами или химиотерапевтическими соединениями с целью специфичной доставки излучения и химиотерапевтических агентов в область опухоли. Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению могут входить в состав комбинированной терапии. Комбинированная терапия предпочтительно может включать применение антитела согласно настоящему изобретению наряду с лучевой терапией или курсом химиотерапии. Кроме того, предполагают, что моноклональные антитела, например, описанные в настоящем документе, могут повышать подверженность опухолевых клеток влиянию химиотерапии или излучения. В предпочтительных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению можно применять для повышения эффективности лучевой терапии рака.

[0101] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ определения дозы лучевой нагрузки у субъекта или биологического образца, например, биологической дозиметрии. Биологическая дозиметрия относится к применению испытаний биологической материи с целью определения дозы ее облучения. Это особенно полезно при радиационных авариях при невозможности использования физической дозиметрии (например, TLD или ионизационной камеры). В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающие пептиды согласно настоящему изобретению применяют для определения дозы лучевой нагрузки у субъекта.

[0102] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ визуализации рака. Таким образом, антитело согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с агентом для визуализации. Например, scFv можно конъюгировать с агентом для визуализации. Подходящие агенты для визуализации могут включать агенты для визуализации/отслеживания, которые можно применять для микроскопии, например, флуоресцентной микроскопии, конфокальной микроскопии или электронной микроскопии, магнитно-резонансной визуализации, томографии, например, гамма- (ОФЭКТ/КТ, плоскостной) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ/КТ), рентгенографии или ультразвукового исследования, но не ограничиваются ими. Агенты для визуализации/отслеживания могут быть обнаружимыми *in situ*, *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*. В общем случае агенты для визуализации/отслеживания могут включать люминесцентные молекула, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, гасители флуоресценции, окрашенные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтилляторы, массивные метки (для обнаружения по изменению массы), биотин, авидин, стрептавидин, белок А, белок G, антитела или их фрагменты, Grb2, полигистидин, Ni²⁺, Flag-маркеры, мус-маркеры, тяжелые металлы, цирконий (связывается с дезферриоксиамином), ферменты, щелочную фосфатазу, пероксидазу, люциферазу, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и субстраты для колориметрии. Специалист может распознавать другие подходящие метки, не упомянутые выше, которые можно использовать в операциях согласно настоящему изобретению.

[0103] Антитела соответствуют описанию в **разделе I** выше. Субъект, рак и введение антител описаны ниже.

(a) субъект

[0104] Способа согласно настоящему изобретению можно применять для обнаружения или лечения опухоли у субъекта, являющегося человеком, сельскохозяйственным животным, домашним животным, лабораторным животным или животным, содержащимся в зоопарке. В одном варианте реализации субъект может являться грызуном, например, мышью, крысой, морской свинкой и т.д. В еще одном варианте реализации субъект может являться сельскохозяйственным

животным. Неограничивающие примеры подходящих сельскохозяйственных животных могут включать свиней, коров, лошадей, коз, овец, лам и альпак. В еще одном варианте реализации субъект может являться домашним животным. Неограничивающие примеры домашних животных могут включать комнатных животных, например, собак, кошек, кроликов и птиц. В еще одном варианте реализации субъект может являться животным, содержащимся в зоопарке. В настоящем документе «животное, содержащееся в зоопарке» относится к животному, которое может находиться в зоопарке. Такие животные могут включать приматов, не являющихся человеком, больших кошек, волков и медведей. В некоторых вариантах реализации указанное животное является лабораторным животным. Неограничивающие примеры лабораторных животных могут включать грызунов, собачьих, кошачьих и приматов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах реализации указанное животное является грызуном. Неограничивающие примеры грызунов могут включать мышей, крыс, морских свинок и т.д. Генотип стерильного животного может варьировать в зависимости от назначения животного. В вариантах реализации, где животное является мышью, указанная мышь может являться мышью C57BL/6, мышью Balb/c, мышью 129sv, мышью, несущей опухоль GL261, мышью, несущей опухоль D54, или мышью любой другой лабораторной линии.

(b) опухоль

[0105] Антитело согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или распознавания опухоли, происходящей из новообразования, или рака. Новообразование может быть злокачественным или доброкачественным, рак может быть первичным или метастатическим; новообразование или рак могут находиться на ранней или поздней стадии. Неограничивающие примеры новообразований или раковых заболеваний, которые можно лечить, включают острый лимфобластный лейкоз, острый миелолейкоз, карциному коры надпочечников, раковые заболевания, связанные со СПИД, лимфому, связанную со СПИД, рак заднего прохода, рак аппендикса, астроцитомы (детскую астроцитому мозжечка или церебральную астроцитому), базальноклеточную карциному, рак

желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, глиому ствола головного мозга, опухоли головного мозга (астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительного пути и глиому гипоталамуса), рак молочной железы, аденомы/карциноидные опухоли бронхов, менингиому, лимфому Беркитта, карциноидные опухоли (детские, желудочно-кишечного тракта), карциному неизвестной первичной локализации, лимфому центральной нервной системы (первичную), астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, рак шейки матки, раковые заболевания детского возраста, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, кожную Т-клеточную лимфому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга из семейства опухолей Юинга, экстракраниальную герминогенную опухоль (детскую), экстрагонадную герминогенную опухоль, внепеченочный рак желчных протоков, раковые заболевания глаз (интраокулярную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, опухоль стромы желудочно-кишечного тракта, герминогенные опухоли (экстракраниальную детскую, экстрагонадную, герминогенную опухоль яичников), гестационную трофобластическую опухоль, глиомы (взрослых, детскую глиому ствола головного мозга, детскую церебральную астроцитому, детскую глиому зрительного пути и глиому гипоталамуса), карциноидную опухоль желудка, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиому гипоталамуса и зрительного пути (детскую), интраокулярную меланому, карциному из островковых клеток, саркому Капоши, рак почек (почечноклеточный рак), рак гортани, лейкозы (острый лимфобластный, острый миелобластный, хронический лимфоцитарный, хронический миелолейкоз, волосатоклеточный лейкоз), рак губ и полости рта, рак печени (первичный), раковые опухоли легких (немелкоклеточные и мелкоклеточные, лимфомы (связанные со СПИД, лимфому Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому

Ходжкина, неходжкинские лимфомы, первичную лимфому центральной нервной системы), макроглобулинемию (Вальденстрема), злокачественную фиброзную гистиоцитому костей/остеосаркому, медуллобластому (детскую), меланому, интраокулярную меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиомы (злокачественную мезотелиому взрослых, детскую мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной локализацией, рак ротоглотки, синдром множественной эндокринной неоплазии (детский), множественную миелому/плазмаклеточное новообразование, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелолейкоз (хронический, миелоидный лейкоз (острый миелоидный лейкоз взрослых, детский острый миелоидный лейкоз), множественную миелому, миелопролиферативные нарушения (хронический), рак носовой полости и околоносовых пазух, карциному носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей, рак яичников, рак эпителия яичников (поверхностную эпителиально-стромальную опухоль), герминогенную опухоль яичников, пограничную опухоль яичников, рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы (из островковых клеток), рак околоносовых пазух и носовой полости, рак околощитовидных желез, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому герминому шишковидного тела, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли (детские), аденому гипофиза, плазмаклеточное новообразование, плевроролечную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному (рак почек), переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника, ретинобластому, рабдомиосаркому (детскую), рак слюнных желез, саркому (семейство опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки), синдром Сезари, раковые заболевания кожи (не являющиеся меланомой, меланому), карциному кожи (из клеток Меркеля), мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной локализацией (метастатический), рак желудка, супратенториальную примитивную

нейроэктодермальную опухоль (детскую), Т-клеточную лимфому (кожную), рак яичка, рак горла, тимому (детскую), тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, рак щитовидной железы (детский, переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластную опухоль (гестационную), рак неизвестной первичной локализации (взрослых, детский), переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника, рак мочеточника, рак матки (эндометрия), саркому матки, рак влагалища, глиому зрительного пути и гипоталамуса (детскую), рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса (детскую). В предпочтительных вариантах реализации новообразование или рак является немелкоклеточным раком легких.

(с) введение

[0106] В некоторых аспектах субъекту можно вводить фармакологически эффективное количество антитела согласно настоящему изобретению, в том числе его иммунологически активных фрагментов. Введение выполняют с использованием стандартных эффективных методик, в том числе периферически или местно. Периферическое введение включает внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, пульмонарное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, подъязычное введение или введение в виде суппозитория, но не ограничивается ими. Местное введение включает введение непосредственно в рассматриваемую анатомическую область, например, введение непосредственно в центральную нервную систему (ЦНС), включая введение с помощью люмбарного, внутрижелудочкового или интрапаренхиматозного катетера или с помощью хирургически имплантированного состава с контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающие пептиды, описанные в настоящем документе, применяют в комбинации с фокусированным ультразвуком. Фокусированный ультразвук представляет собой неинвазивную технологию терапии на ранней стадии с возможностью лечения многих медицинских нарушений с использованием энергии ультразвука для таргетного воздействия на глубокие ткани организма без разрезов и излучения. Фокусированный ультразвук высокой интенсивности (HIFU) представляет собой неинвазивную терапевтическую

методику, использующую неионизирующие ультразвуковые волны для нагревания тканей. HIFU можно применять для усиления кровотока или лимфотока или для разрушения тканей, например, опухолей, за счет ряда механизмов. HIFU можно использовать в комбинации с другими методиками визуализации, например, медицинским УЗИ или МРТ для улучшения контроля за лечением и мониторинга.

[0107] Фармацевтические композиции для эффективного введения намеренно конструируют в соответствии с выбранным способом введения, и в соответствующих случаях применяют фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, совместимые разрыхлители, буферные агенты, поверхностно-активные вещества, консерванты, солюбилизующие агенты, агенты для поддержания изотоничности, стабилизирующие агенты и т.п. В последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 16Ed ISBN: 0-912734-04-3, полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки, приведено краткое руководство по методикам получения составов, в целом известных практикующим специалистам. Особенно полезным может быть изменение характеристик растворимости антител, которые можно применять в настоящем изобретении, увеличение их липофильности, например, путем их инкапсуляции в липосомы или блокирования полярных групп.

[0108] Эффективная периферическая системная доставка посредством внутривенной или внутрибрюшинной или подкожной инъекции является предпочтительным способом введения живому пациенту. Подходящие носители для таких инъекций являются общедоступными. В то же время введение также можно осуществлять через слизистые оболочки в виде назальных аэрозолей или суппозиторияев. Подходящие составы для таких моделей введения общеизвестны и обычно содержат поверхностно-активные вещества, облегчающие перенос через мембраны. Такие поверхностно-активные вещества часто являются производными стероидов или катионных липидов, например, хлорид N-[1-(2,3-диолеил)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA) или различные соединения, например, гемисукцинат холестерина, фосфатидилглицерина и т.п. Композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать хелатирующие агенты, например,

в неограничивающих примерах, тетракарбоновую кислоту (DOTA), 1,4,7-триазациклононан-N,N',N"-триуксусную кислоту (NOTA) и дефероксамин.

[0109] Концентрация антитела во вводимых составах представляет собой эффективное количество и находится в диапазоне от 0,1 масс. % до приблизительно 15 или приблизительно 20 масс.%; ее выбор, при желании, главным образом основан на объеме жидкости, вязкости и т.д., в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Типичная композиция для инъекции живому пациенту может содержать 1 мл стерильной забуференной воды в физиологическом растворе с фосфатным буфером и приблизительно 1-1000 мг любого гуманизованного антитела согласно настоящему изобретению или их комбинации. Состав после получения можно стерилизовать фильтрацией или сделать приемлемым с микробиологической точки зрения иным образом. Типичная композиция для внутривенного вливания может содержать 1-250 мл жидкости, например, стерильного раствора Рингера, и антитело против GRP78 в концентрации 1-100 мг/мл или более. Терапевтические агенты согласно настоящему изобретению можно замораживать или лиофилизировать для хранения и разводить в соответствующем стерильном носителе перед применением. Лиофилизация и разведение могут приводить к различной степени потери активности антитела (например, для обычных иммуноглобулинов, IgM-антитела в общем случае характеризуются большей потерей активности, чем IgG-антитела). Вводимые дозировки представляют собой эффективные дозировки, их можно корректировать в целях компенсации. pH составов в общем случае соответствует качеству для фармацевтического применения и выбрано в целях поддержания баланса между стабильностью антитела (химической и физической) и удобством для пациента при введении. В общем случае pH между 4 и 8 хорошо переносится. Дозы зависят от размера, массы и других физиологических характеристик индивида, получающего введение.

[0110] В настоящем документе термин «эффективное количество» означает количество вещества, например, соединения, приводящее к измеримым и благоприятным эффектам для субъекта, которому вводят указанное вещество, т.е. значимой эффективности. Эффективное количество или дозу соединения,

вводимого в соответствии с настоящим изобретением, определяют в зависимости от обстоятельств, имеющих место в конкретном случае, включая, в числе прочего, вводимое вещество, путь введения, состояние симптомов, подлежащих лечению, и соображений касательно аналогичных пациентов и обстоятельств введения.

[0111] В некоторых вариантах реализации, где антитело представляет собой антитело против GRP78, меченое ^{64}Cu или цирконием, вводимая доза может составлять приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,011, 0,012, 0,013, 0,013, 0,014, 0,015, 0,016, 0,017, 0,018, 0,019, 0,02, 0,021, 0,022, 0,023, 0,023, 0,024, 0,025, 0,026, 0,027, 0,028, 0,029, 0,03, 0,031, 0,032, 0,033, 0,033, 0,034, 0,035, 0,036, 0,037, 0,038, 0,039, 0,04, 0,041, 0,042, 0,043, 0,043, 0,044, 0,045, 0,046, 0,047, 0,048, 0,049, 0,05, 0,051, 0,052, 0,053, 0,053, 0,054, 0,055, 0,056, 0,057, 0,058, 0,059, 0,06, 0,061, 0,062, 0,063, 0,063, 0,064, 0,065, 0,066, 0,067, 0,068, 0,069, 0,07, 0,071, 0,072, 0,073, 0,073, 0,074, 0,075, 0,076, 0,077, 0,078, 0,079, 0,08, 0,081, 0,082, 0,083, 0,083, 0,084, 0,085, 0,086, 0,087, 0,088, 0,089, 0,09, 0,091, 0,092, 0,093, 0,093, 0,094, 0,095, 0,096, 0,097, 0,098, 0,099 или приблизительно 0,1 бэр/мКи.

[0112] Частота приема может быть ежедневно или один, два, три раза или более в неделю или в месяц, в соответствии с потребностями для эффективного лечения симптомов. Сроки введения в ходе лечения в связи с самим заболеванием и продолжительностью лечения определяют в зависимости от обстоятельств, имеющих место в конкретном случае. Лечение можно начать немедленно, например, в области повреждения при введении персоналом скорой помощи. Лечение можно начать в самой больнице или клинике или после выписки из больницы или после наблюдения в поликлинике. Продолжительность лечения может находиться в диапазоне от единственной однократно введенной дозы до курса лечения, продолжающегося пожизненно.

[0113] Хотя вышеуказанные способы представляются наиболее удобными, подходящими и эффективными для введения белков, например, антител, при соответствующей адаптации можно использовать и другие эффективные методики введения, например, внутривенное введение, трансдермальное введение и пероральное введение, при условии использования надлежащего состава.

[0114] Кроме того, может быть желательно применять составы с контролируемым высвобождением с использованием биоразлагаемых пленок и матриц, или осмотических мини-насосов, или систем доставки на основе гранул декстрана, альгината или коллагена.

[0115] Типичные уровни дозировок можно определять и оптимизировать с использованием стандартных клинических методик; они зависят от способа введения.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0116] В настоящем документе «антитело» относится к молекуле-производному иммуноглобулина, специфично распознающей GRP78. Антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой полноразмерное антитело (IgM, IgG, IgA, IgE) или фрагмент антитела (Fab, F(ab')₂, scFv). Антитело может быть химерным или гуманизированным.

[0117] В настоящем документе «CDR» означает «область, определяющую комплементарность». CDR также можно называть гипервариабельными областями.

[0118] В настоящем документе «легкая цепь» представляет собой малую полипептидную субъединицу антитела. Типичное антитело содержит две легких цепи и две тяжелых цепи.

[0119] В настоящем документе «тяжелая цепь» представляет собой большую полипептидную субъединицу антитела. Тяжелая цепь антитела содержит серию иммуноглобулиновых доменов, в которую входит по меньшей мере один вариабельный домен и по меньшей мере один константный домен.

[0120] В настоящем документе «гуманизированный» относится к процессу продукции моноклональных антител с использованием рекомбинантных ДНК с целью создания конструкторов, способных экспрессироваться в культуре клеток человека. Для целей настоящего изобретения можно использовать любую известную методику получения этих конструкторов.

[0121] В настоящем документе «одноцепочечные вариабельные фрагменты» или “scFv” относится к гибридным белкам вариабельных областей

тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, соединенным линкером. В некоторых вариантах реализации линкер представляет собой пептид из приблизительно 10-25 аминокислот.

[0122] «Терапевтический агент» для целей настоящего изобретения относится к агенту, замедляющему рост опухоли, рост любого связанного злокачественного новообразования или ослабляющему симптомы, ассоциированные с ростом раковых клеток. Терапевтический агент, предпочтительно конъюгированный с антителом согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой биологический, фармацевтический или химический агент. Неограничивающий список терапевтических агентов, которые могут подходить для применения в настоящем изобретении, описан выше.

[0123] В настоящем документе «агент для визуализации» относится к любому агенту, который можно применять для локализации и получения изображения роста раковых клеток или опухолей. Неограничивающий список агентов для визуализации, которые могут подходить для применения в настоящем изобретении, описан выше.

ПРИМЕРЫ

[0124] Для демонстрации предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения в заявку включены следующие примеры. Специалисты должны принимать во внимание, что методики, описанные в нижеследующих примерах, представляют собой методики, которые, как было обнаружено авторами изобретения, хорошо функционировали при реализации изобретения, и таким образом могли рассматриваться в качестве основы предпочтительных способов его реализации. Вместе с тем, в свете настоящего описания специалисты должны принять во внимание, что в конкретные описанные варианты реализации можно внести большое количество изменений и при этом получить сходный или аналогичный результат, не выходя за рамки настоящего изобретения.

Пример 1

[0125] Получили моноклональные антитела против GRP78 и присвоили им названия 6F8 и 7A9. Последовательность антигена представляла собой SEQ ID NO: 53 (CISKLYGSAGPPPTGEEDTAE (С-концевой пептид)). Иммуногены получали с использованием конъюгатов «пептид-KLH» и акцепторной линии мышей BALB/c. Антитело 6F8 содержало переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:15 (за вычетом последовательности лидера) и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:16 (за вычетом последовательности лидера). Антитело 7A9 содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:13 (за вычетом последовательности лидера) и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:14 (за вычетом последовательности лидера).

[0126] Получение гибридомы мыши (4A6O9 и 4A4A4) выполняли с использованием белка GRP78 в качестве антигена/иммуногена и акцепторной линии мышей BALB/c. Наконец, получали scFv человека (1154, 1164, 1171, 1183) с использованием последовательности пептида для биопэннинга SEQ ID NO:54 (ISKLYGSAGPPPTGEEDTAE (С-концевой пептид)).

[0127] На **фиг 1** изображен график, на котором показано связывание моноклональных антител мыши против GRP78 с С-концевым пептидом GRP78 в ходе твердофазного ИФА. На **фиг. 2** продемонстрировано связывание моноклональных антител мыши против GRP78 с белком GRP78 в ходе твердофазного ИФА.

[0128] Связывание антител против GRP78 с поверхностью клеток: Способы: Облучение: 3 Гр - 3 раза (через 6 ч и 12 часов); 150000 клеток на группу окрашивания; окрашивание различными первичными антителами (1 ч); окрашивание вторичным антителом: антитело против IgG мыши, меченое Alexafluor 488 (1 ч); регистрация данных на проточном цитометре; к каждому образцу добавляли PI непосредственно перед регистрацией; выполняли селекцию живых клеток и регистрировали 10000 событий. На **фиг. 3** показано связывание антител

против GRP78 с поверхностью клеток НМРЛ. Антитело 4А4А4 и 4А6О9 использовали в концентрации 30 мкг/мл.

[0129] Из С-конца GRP78 синтезировали семь пептидов. Каждый пептид представлял собой 12-членный пептид с 5 перекрывающимися аминокислотами. Последовательности этих пептидов показаны выше. Каждый из пептидов в двух повторностях наносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с антителом 7А9. После промывки результаты блоттинга проявляли посредством хемилюминесценции. Положительные пятна указаны стрелками, **фиг. 4**. эпитоп 7А9: SEQ ID NO: 70 (ISKLYGSA.....EDTAE). **Фиг. 5А -5В** Картирование эпитопов антитела 6F8 выполняли с помощью Biacore T200. 6F8 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, пептиды 86-90 (пептиды с перекрыванием в иммуногенной области 6F8) использовали в качестве анализируемых соединений. Относительный ответ связывания (ответ на холостом канале, вычтенный из ответа на канале с иммобилизованным 6F8) каждого пептида с 6F8 анализировали с помощью программного обеспечения BIAevaluation. Пороговое значение для несвязывающихся пептидов составляет 0 ЕО. Трехмерная модель белка GRP78, на которой малиновым цветом показана последовательность эпитопа в составе белка. Фигуру получили с использованием программного обеспечения PyMol.

[0130] **Фиг. 6А -6В** Картирование эпитопов антитела 7А9 выполняли с помощью Biacore T200. 7А9 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, пептиды 86-90 (пептиды с перекрыванием в иммуногенной области 7А9) использовали в качестве анализируемых соединений. Относительный ответ связывания (ответ на холостом канале, вычтенный из ответа на канале с иммобилизованным 7А9) каждого пептида с 7А9 анализировали с помощью программного обеспечения BIAevaluation. Пороговое значение для несвязывающихся пептидов составляет 0 ЕО. Трехмерная модель белка GRP78, на которой красным цветом показана последовательность эпитопа в составе белка. Фигуру получили с использованием программного обеспечения PyMol.

[0131] Выполнили проточно-цитометрический анализ связывания антитела 6F8 с поверхностью клеток А549 (**фиг. 7А-7В**). Условия связывания: $0,1 \times 10^6$ клеток инкубировали с 3-кратными разведениями антитела, начиная с 2,22

мкМ. Клетки 2-кратно промывали буфером для FACS. Окрашивали вторичным антителом. Дважды промывали и анализировали в буфере для FACS на проточном цитометре FACS Canto II (BD). Геометрические средние значения интенсивности флуоресценции аппроксимировали с использованием модели “Специфичное связывание с одним сайтом” в программном обеспечении Graphpad Prism. На графике показаны те же данные, что и на панели А, аппроксимированные с использованием модели “Сигмоидная, 4PL, X представляет собой десятичный логарифм концентрации” в программном обеспечении Graphpad Prism (**фиг. 7В**).

[0132] Выполнили проточно-цитометрический анализ связывания 6F8 с поверхностью клеток А549, результаты показаны на **фиг. 8А-8В**. Проточно-цитометрический анализ связывания 6F8 с поверхностью клеток Н460 показан на **фиг. 9А-9В** и **фиг. 10**. Проточно-цитометрический анализ связывания антитела 7А9 с поверхностью клеток Н460 показан на (**фиг. 11А-11В** и **фиг. 12**).

[0133] Опухоли А549 вводили в заднюю конечность бестимусных голых мышей. Антитела 6F8 и 7А9 метили ИК-красителем 800 (Licor). 40 мкг каждого антитела вводили в хвостовую вену и ежедневно визуализировали с использованием устройства для визуализации Pearl. БИК-визуализация всего тела с использованием моноклональных антител против GRP78 (необлученные опухоли) показана на **фиг. 13**.

[0134] Опухоли А549 вводили в заднюю конечность бестимусных голых мышей. Антитела 6F8 и 7А9 метили ИК-красителем 800 (Licor). 40 мкг каждого антитела вводили в хвостовую вену и ежедневно визуализировали с использованием устройства для визуализации Pearl. На 7 день после инъекции антител выполняли эвтаназию мышей, сбор всех органов и визуализацию с помощью устройства для визуализации Pearl. **На фиг. 14А** показаны изображения полученных опухолей А549. **На фиг. 14В** показана гистограмма интенсивности сигнала на грамм полученных опухолей. **На фиг. 14С** показана интенсивность сигнала всех органов на грамм их массы.

[0135] Клетки А549 высевали в предметные стекла с лунками. Антитела против GRP78 метили красным красителем pHRodo iFL (Thermo Scientific) в соответствии с протоколом производителя и добавляли к клеткам. После 24 ч

инкубирования при 37°C стекла промывали PBS и окрашивали прижизненным красителем *picblue* для окрашивания ядер. Изображения получали на инвертированном флуоресцентном микроскопе (Zeiss). Наличие красного точечного окрашивания указывало на эндоцитоз антител во внутриклеточные кислые компартменты. Интернализация моноклональных антител против GRP78 в клетки A549 показана на **фиг. 15**.

[0136] Для дот-блоттинга (**фиг. 16**) капли рекомбинантного полноразмерного белка GRP78 наносили на нитроцеллюлозную мембрану в двух повторностях. После блокирования блот инкубировали с scFv Fc 1171 и 1183 против GRP78. Указанные scFv-Fc обнаруживали по связыванию с рекомбинантным белком GRP78 с использованием антитела против Fc человека, конъюгированного с ПХ.

[0137] Анализ сродства связывания scFV-Fc 1171 против GRP78 с рекомбинантным полноразмерным белком GRP78 с помощью *Biacore*. Максимальная концентрация scFv1171-Fc составляла 500 нМ, затем выполняли двукратные последовательные разведения. Скорость ассоциации, скорость диссоциации и константа диссоциации показаны в таблице (**фиг. 17**). Анализ сродства связывания scFV-Fc 1171 против GRP78 с рекомбинантным полноразмерным белком GRP78 с помощью *Biacore*. Максимальная концентрация scFv1183-Fc составляла 500 нМ, затем выполняли двукратные последовательные разведения. Скорость ассоциации, скорость диссоциации и константа диссоциации показаны в таблице (**фиг. 18**). Клетки A549 представляли собой имитацию или были облучены 3 дозами по 3 Гр. Клетки собирали и инкубировали с указанными концентрациями антител scFV-Fc1171. Показаны типичные гистограммы с наложением (синий: контрольное вторичное антитело, красный: scFv-Fc1171) (**фиг. 19**). Проточно-цитометрический анализ связывания антитела scFv-Fc1171 с поверхностью облученных клеток A549. Условия связывания: $0,1 \times 10^6$ клеток инкубировали с 4-кратными разведениями антитела, начиная с концентрации 100 нМ. Клетки 2-кратно промывали буфером для FACS. Окрашивали вторичным антителом. Дважды промывали и анализировали в буфере для FACS на проточном цитометре FACS Canto II (BD). Геометрические средние значения интенсивности

флуоресценции аппроксимировали с использованием модели специфичного связывания с одним сайтом в программном обеспечении Graphpad Prism (**фиг. 20**).

[0138] Клетки A549 представляли собой имитацию или были облучены 3 дозами по 3 Гр. Клетки собирали и инкубировали с указанными концентрациями отрицательного контрольного Fc. Показаны типичные гистограммы с наложением (синий: контрольное вторичное антитело, красный: отрицательный контрольный Fc) (**фиг. 21**). Клетки A549 представляли собой имитацию или были облучены 3 дозами по 3 Гр. scFv-Fc 1171 метили красным pH-чувствительным красителем pHRedo, генерировавшим флуоресценцию в красной области спектра в кислых клеточных компартментах. Интернализированное антитело показано белыми стрелками (**фиг. 22**).

[0139] Зависимость эффекта на клетках A549 от дозы scFv-Fc 1171 с использованием анализа образования колоний. Клетки высевали и на следующий день облучали в дозе 2 Гр. scFv-Fc 1171 или Fc-контроль добавляли в 2 различных концентрациях. На следующий день выполняли еще одно облучение в дозе 2 Гр. Колонии подсчитывали, строили график доли выживших клеток. Для статистического анализа использовали двусторонний дисперсионный анализ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (**фиг. 23**). Зависимость эффекта на H460 от scFv-Fc 1171 с использованием анализа образования колоний. Клетки высевали и на следующий день облучали в дозе 2 Гр. scFv-Fc 1171 или Fc-контроль добавляли в 2 различных концентрациях. На следующий день выполняли еще одно облучение в дозе 2 Гр. Колонии подсчитывали, строили график доли выживших клеток. При использовании scFvFc1171 в комбинации с излучением наблюдали тенденцию к снижению доли выживших клеток (**фиг. 24**).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 72, домен CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:73, а домен CDR3 переменной области тяжелой цепи выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, 9, 23, 31, 39 и 47; и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:74, домен CDR2 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:75, а домен CDR3 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:76.
2. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 1, домен CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:2, а домен CDR3 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:3; и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:4, домен CDR2 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:5, а домен CDR3 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:6.
3. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 7, домен CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8, а домен CDR3 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:9; и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем

CDR1 варибельного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:10, домен CDR2 варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:11, а домен CDR3 варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:12.

4. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 варибельного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 21, домен CDR2 варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:22, а домен CDR3 варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:23; и варибельный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 варибельного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:24, домен CDR2 варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:25, а домен CDR3 варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:26.
5. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 варибельного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:29, домен CDR2 варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:30, а домен CDR3 варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:31; и варибельный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 варибельного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:32, домен CDR2 варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:33, а домен CDR3 варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:34.
6. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 варибельного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:37, домен CDR2 варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:38, а домен CDR3 варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:39;

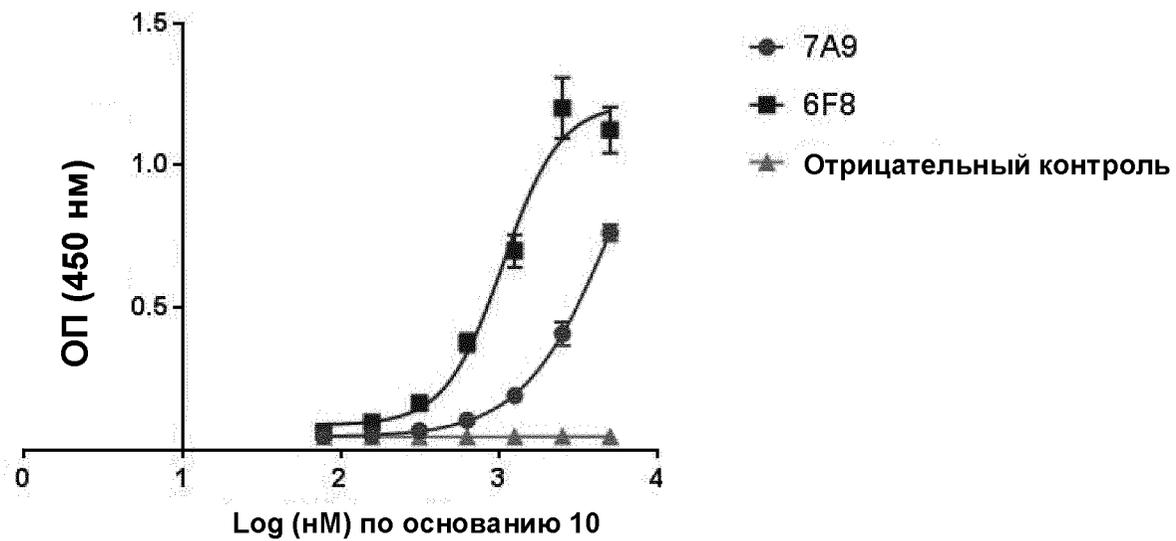
и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:40, домен CDR2 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:41, а домен CDR3 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:42.

7. Выделенное антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), причем указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:45, домен CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:46, а домен CDR3 переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:47; и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3, причем CDR1 переменного домена легкой цепи содержит SEQ ID NO:48, домен CDR2 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:49, а домен CDR3 переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO:50.
8. Выделенное антитело по п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 13, и/или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14.
9. Выделенное антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 15, и/или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 16.
10. Выделенное антитело по п. 4, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 27, и/или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 28.
11. Выделенное антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, и/или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 36.

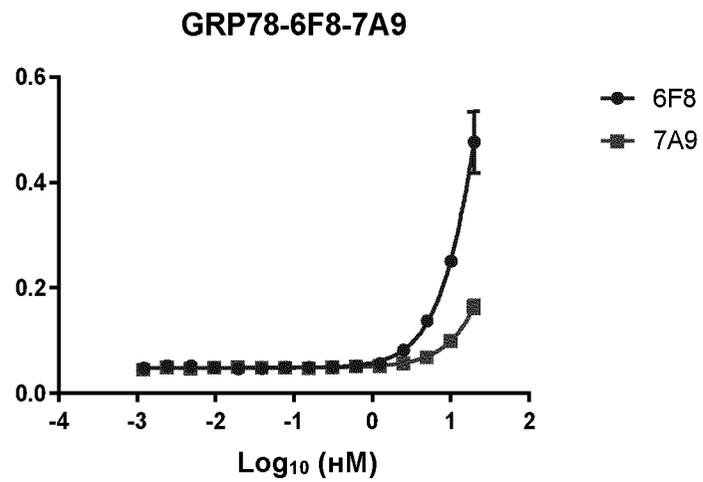
12. Выделенное антитело по п. 6, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 43, и/или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 44.
13. Выделенное антитело по п. 7, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 51, и/или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 52.
14. Антитело по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что указанное антитело выбрано из группы, состоящей из гуманизованного антитела, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) антитела, фрагмента антитела или химерного антитела.
15. Антитело по любому из пп. 1-14; отличающееся тем, что указанное антитело напрямую или непрямым образом конъюгировано с полезной нагрузкой, выбранной из группы, состоящей из терапевтического агента, агента для визуализации или их комбинации.
16. Способ улучшения лучевой терапии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей антитело, специфично связывающееся с белком массой 78 кДа, регулируемым глюкозой (GRP78), таким образом, что происходит улучшение лучевой терапии, причем указанное антитело напрямую или непрямым образом конъюгировано с полезной нагрузкой, выбранной из группы, состоящей из терапевтического агента, агента для визуализации или их комбинации, и указанное антитело представляет собой выделенное антитело по пп. 1-13,.
17. Способ по п. 9, дополнительно включающий облучение субъекта ионизирующим излучением.
18. Способ по п. 9, дополнительно включающий визуализацию субъекта.

19. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный терапевтический агент является одним или более из несущей CAR иммунной эффекторной клетки, BITE или DART.
20. Способ визуализации опухоли или рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей конъюгированный GRP78, и визуализацию рака у субъекта с использованием антитела по пп. 1-13, причем указанное антитело конъюгировано с агентом для визуализации.
21. Способ лечения опухоли или рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей антитело по пп. 1-13, причем указанное антитело напрямую или непрямым образом конъюгировано с терапевтическим агентом.

Твердофазный ИФА
гибридомы против GRP78



ФИГ. 1



ФИГ. 2

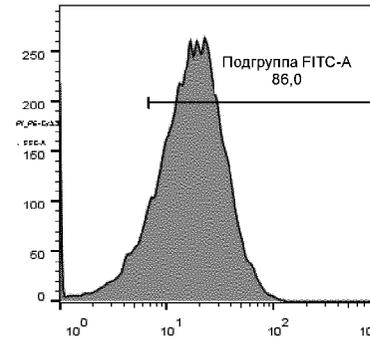
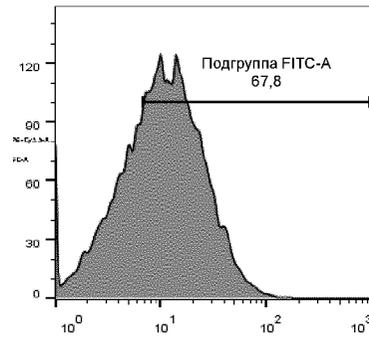
**Связывание антител против GRP78 с поверхностью
клеток НМРЛ**

A549

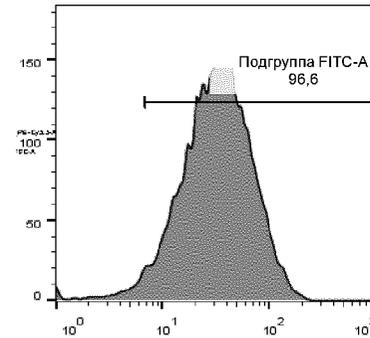
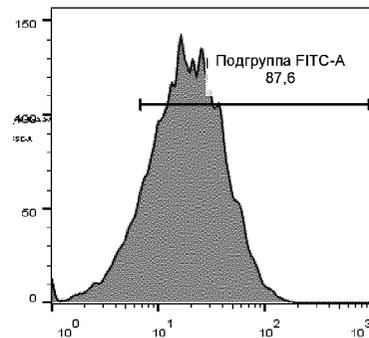
4A4A4

4A6O9

Имитация



IR

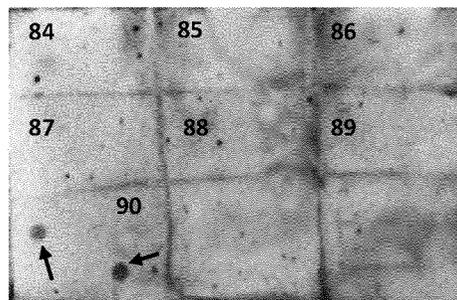


Антитело	Концентрация
4A4A4	30 мкг/мл
4A6O9	30 мкг/мл

3/34

ФИГ. 3

Картирование эпитопов антител против GRP78
7A9

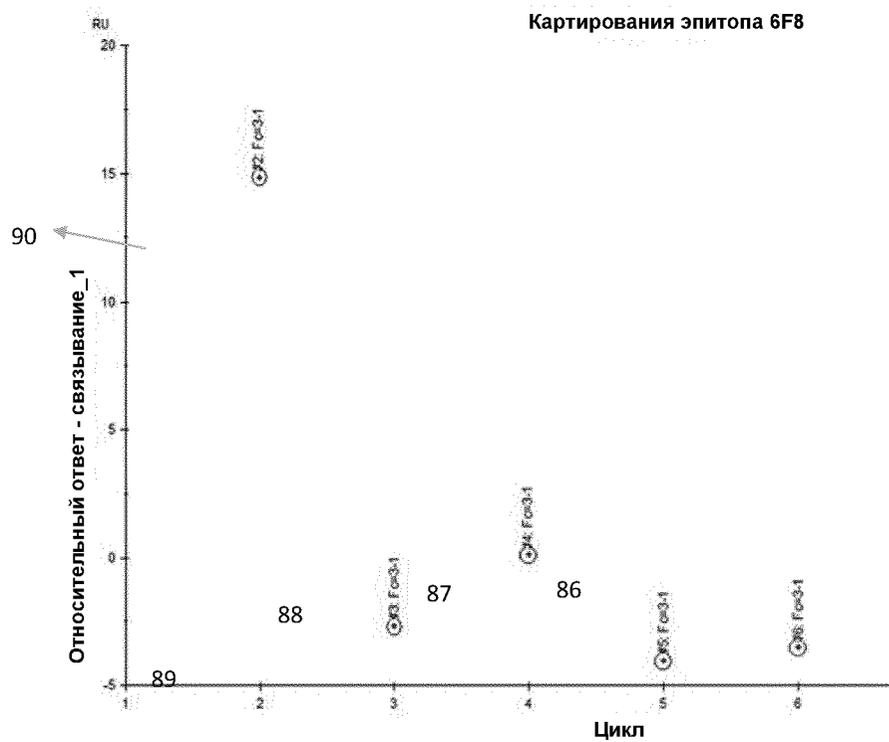


Пептидные последовательности

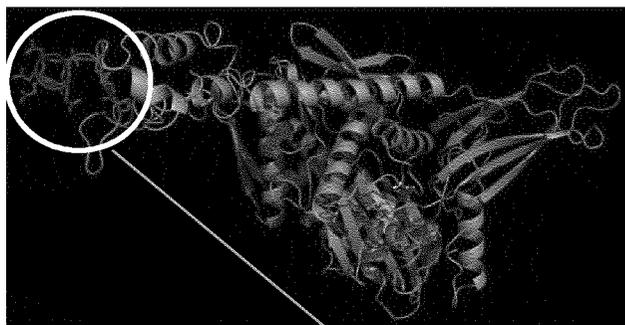
- 84. EEKIEWLESHQD
- 85. ESHQDADIEDFK
- 86. IEDFKAKKKELE
- 87. KKELEEIVQPPII
- 88. VQPIISKLYGSA
- 89. LYGSAGPPPTGE
- 90. PPTGEEDTAEKD

ФИГ. 4

Картирование эпитопов антител против GRP78



ФИГ. 5А

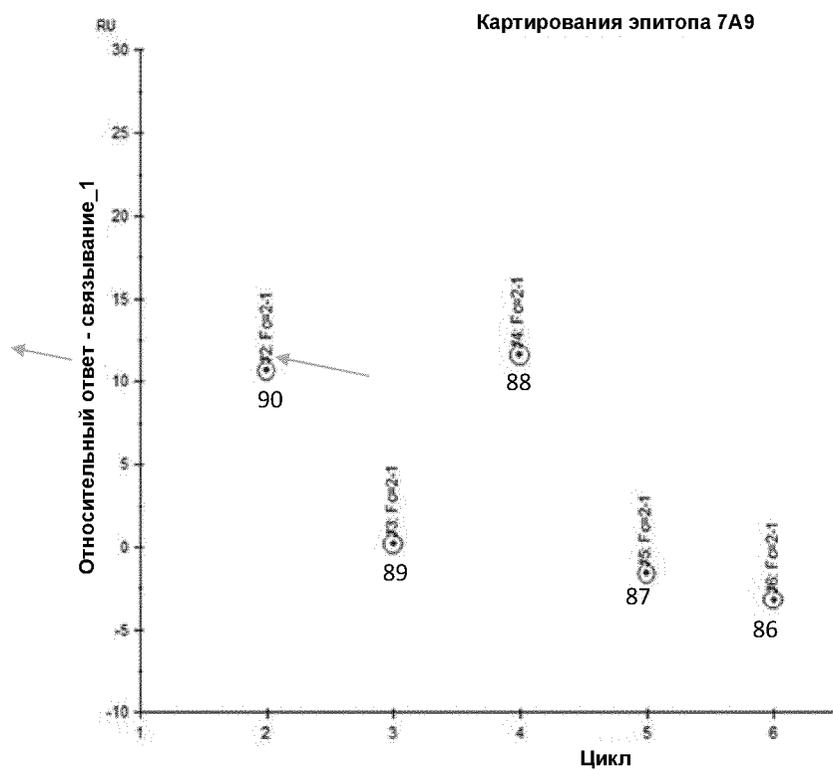


Эпитоп 6F8: PPTGEEEDTAE

ФИГ. 5В

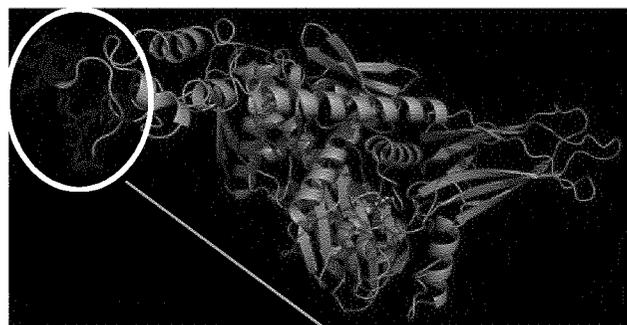
Картирование эпитопов антител против GRP78

A



ФИГ. 6А

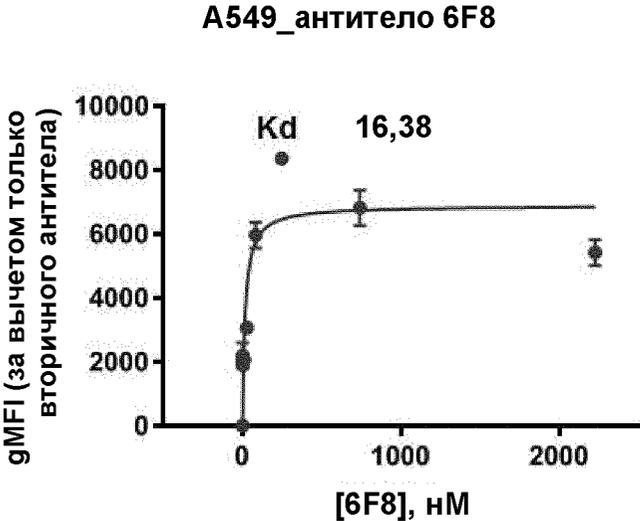
Картирование эпитопов антител против GRP78



Эпитоп 7A9: ISKLYGSA.....EDTAE

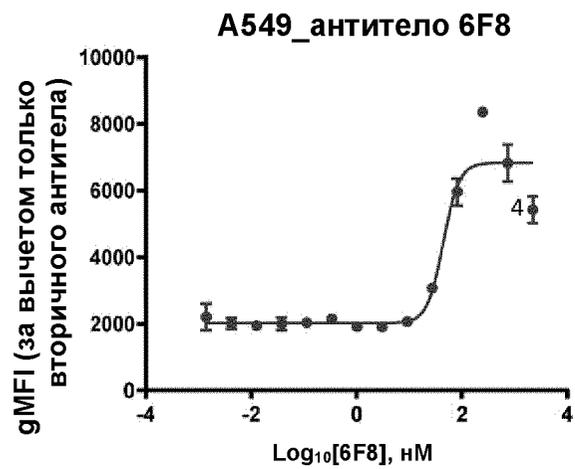
ФИГ. 6В

Проточно-цитометрический анализ связывания антител против GRP78 с поверхностью клеток



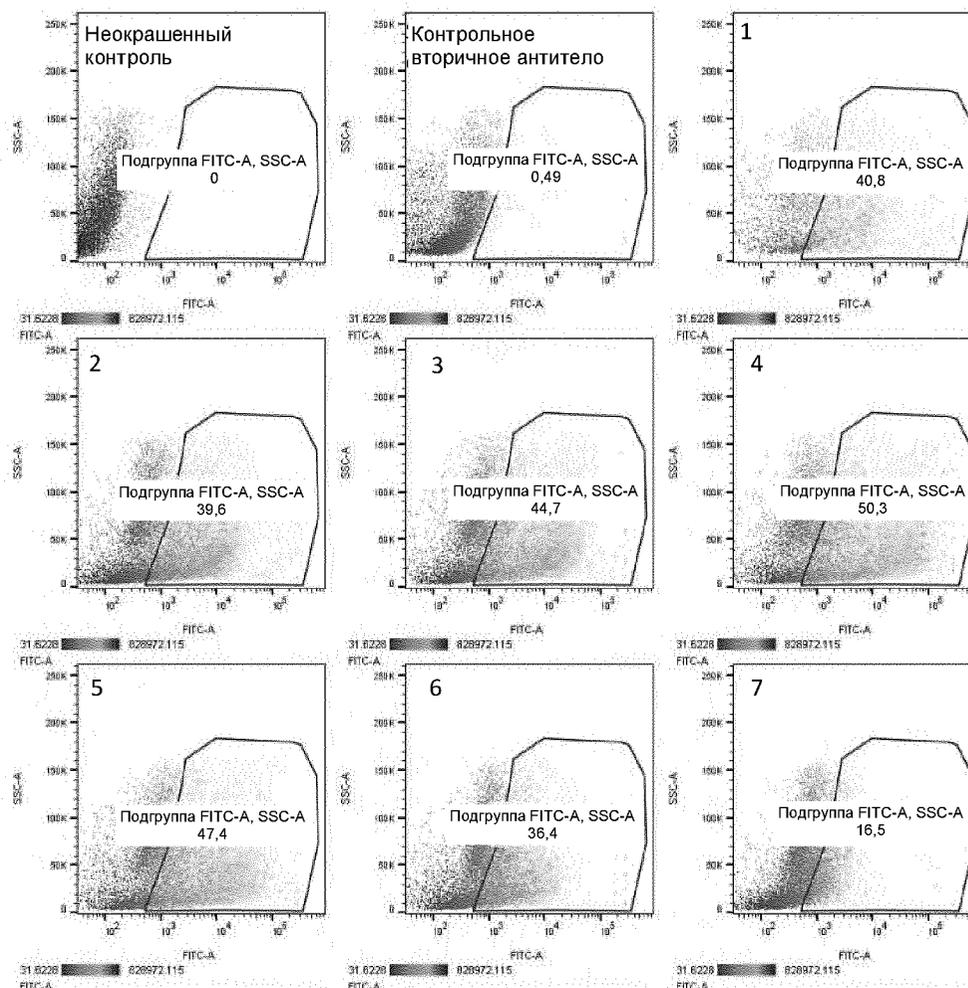
ФИГ. 7А

Проточно-цитометрический анализ связывания антител против GRP78 с поверхностью клеток



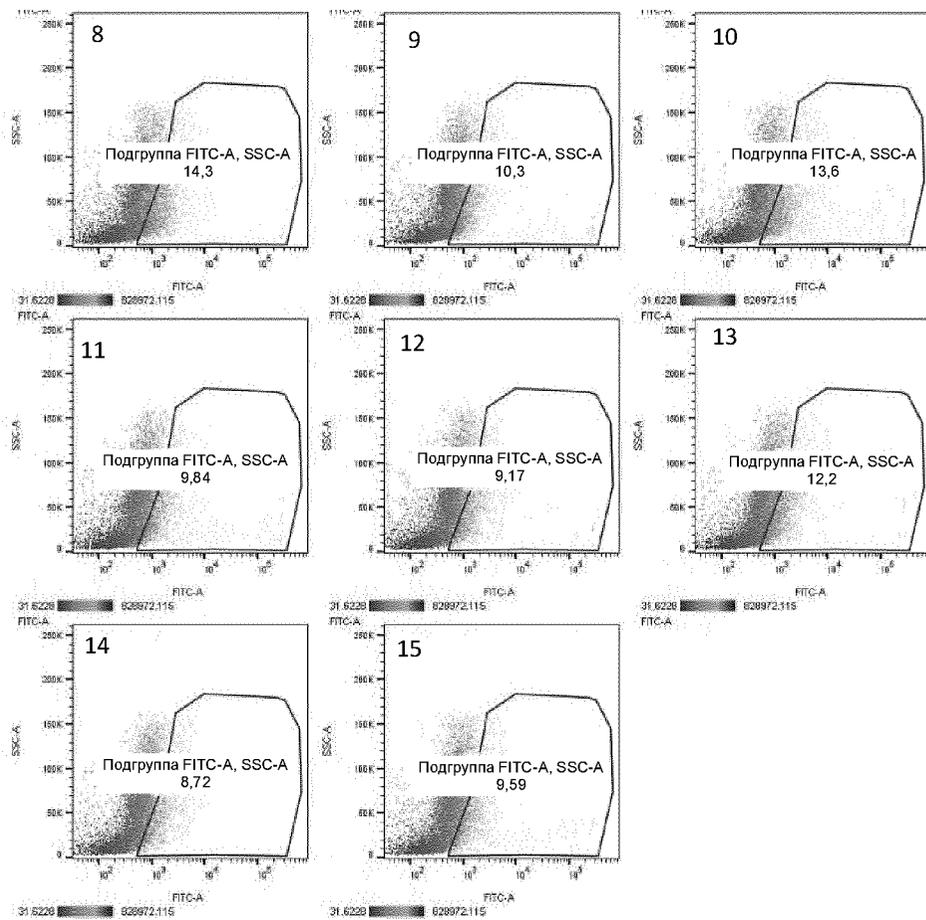
ФИГ. 7В

Проточно-цитометрический анализ связывания 6F8 с поверхностью клеток A549



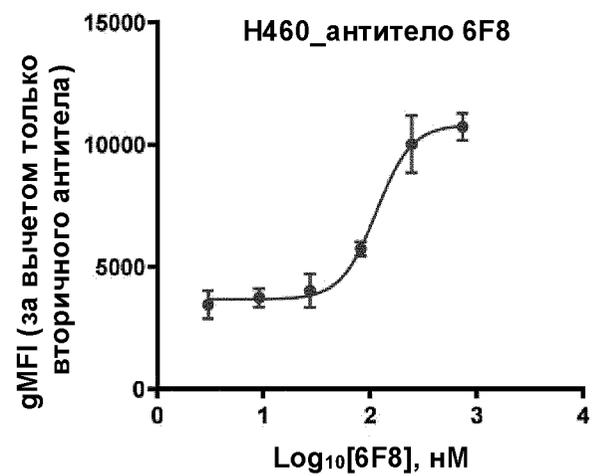
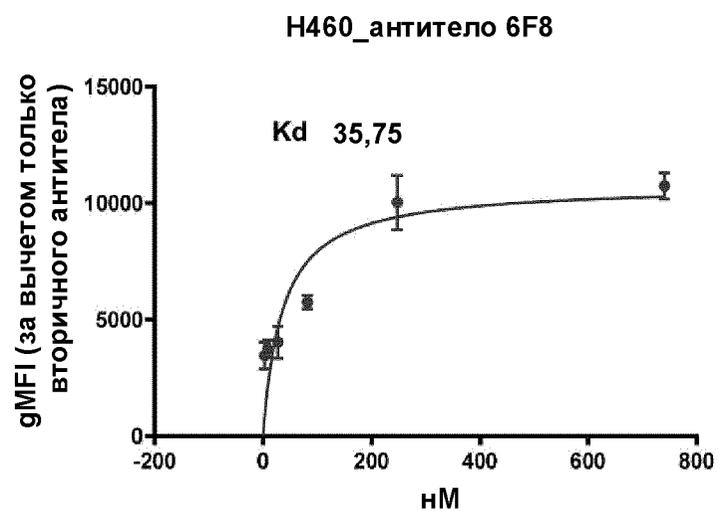
ФИГ. 8А

Проточно-цитометрический анализ связывания 6F8 с поверхностью клеток A549



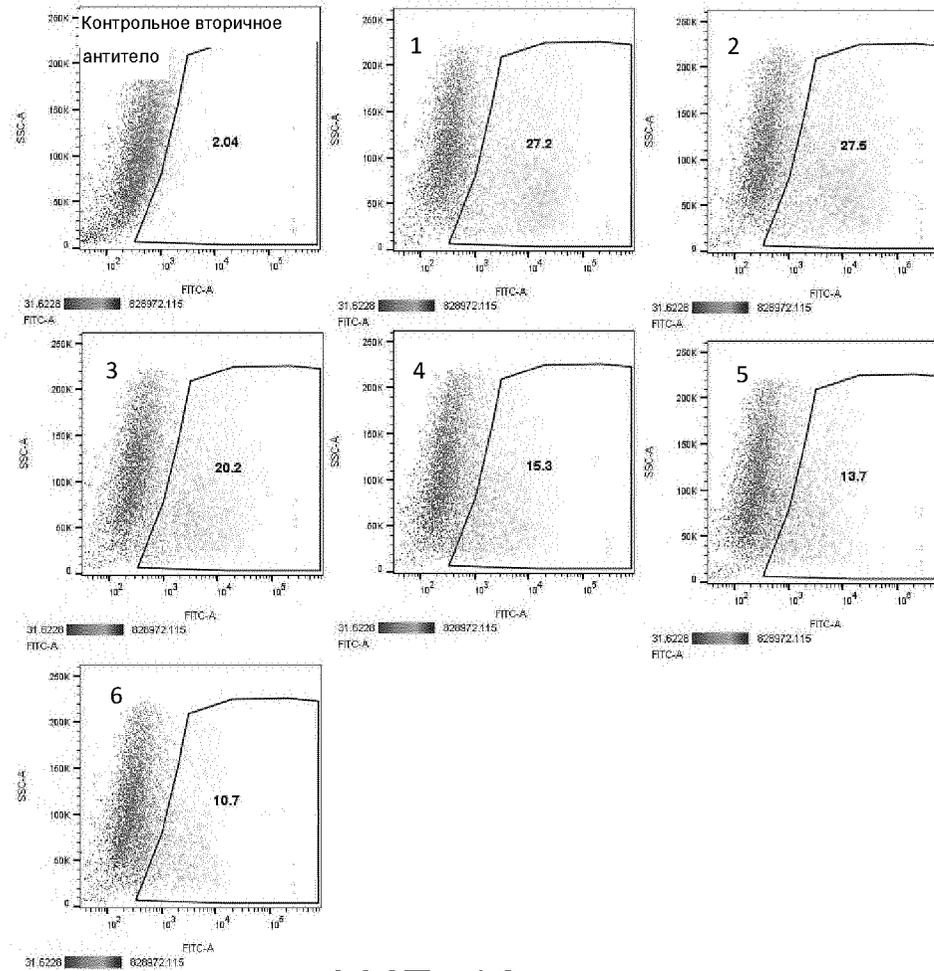
ФИГ. 8В

Проточно-цитометрический анализ связывания 6F8 с поверхностью клеток H460



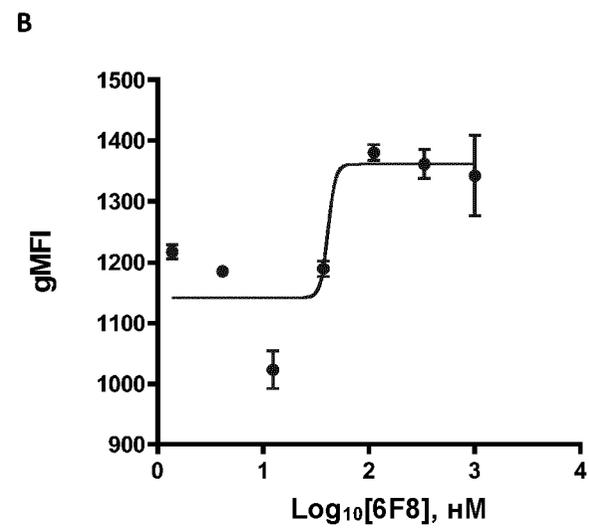
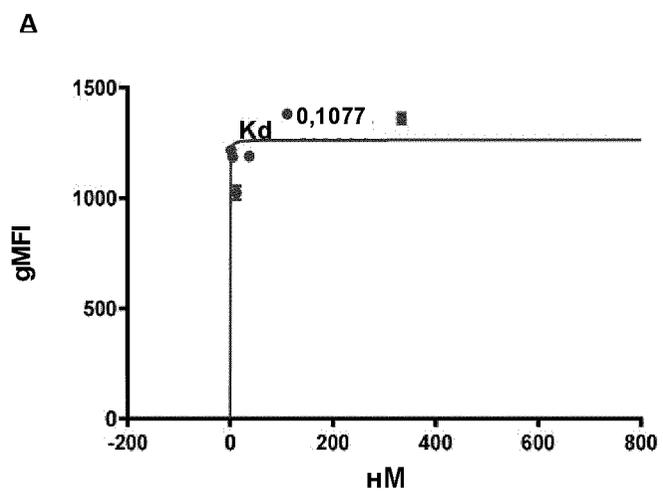
ФИГ. 9А-9В

Проточно-цитометрический анализ связывания 6F8 с поверхностью клеток H460



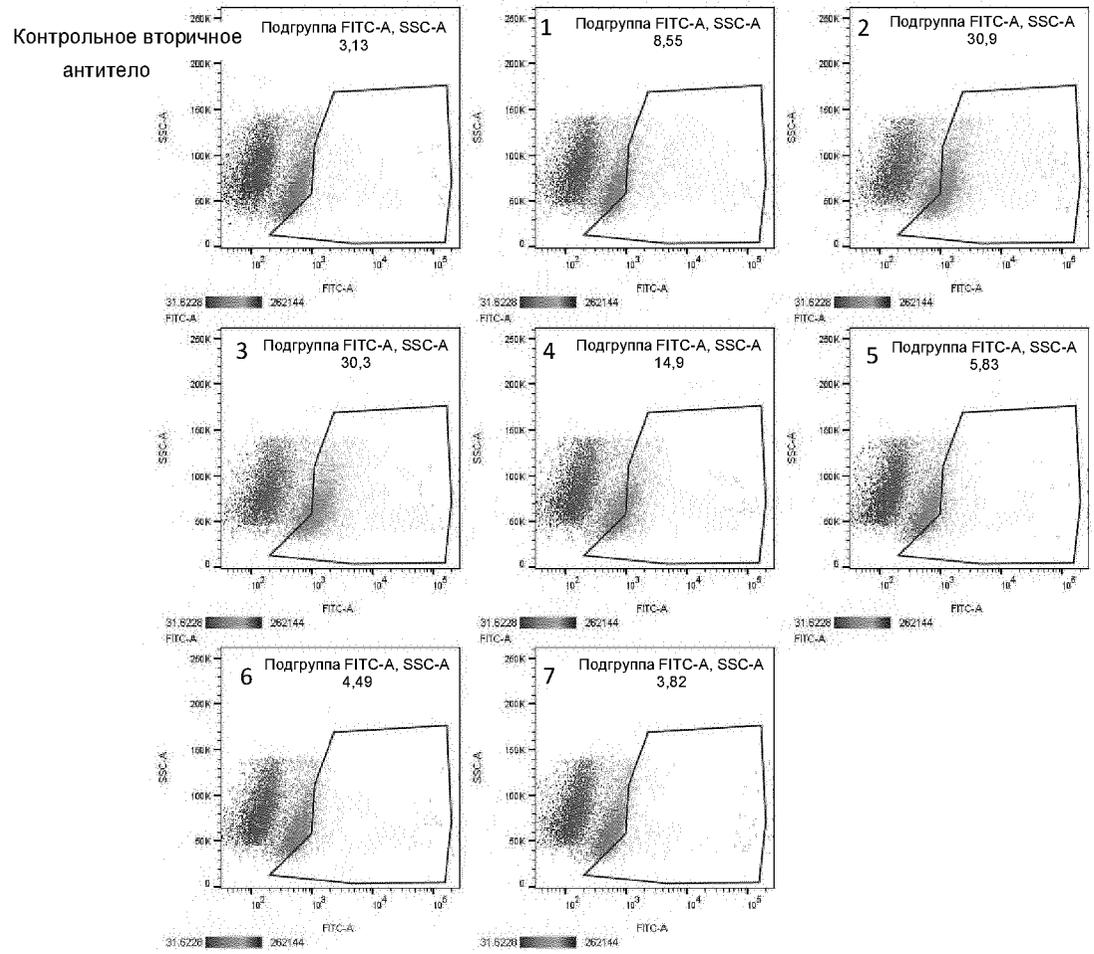
ФИГ. 10

Проточно-цитометрический анализ связывания 7A9 с поверхностью клеток H460



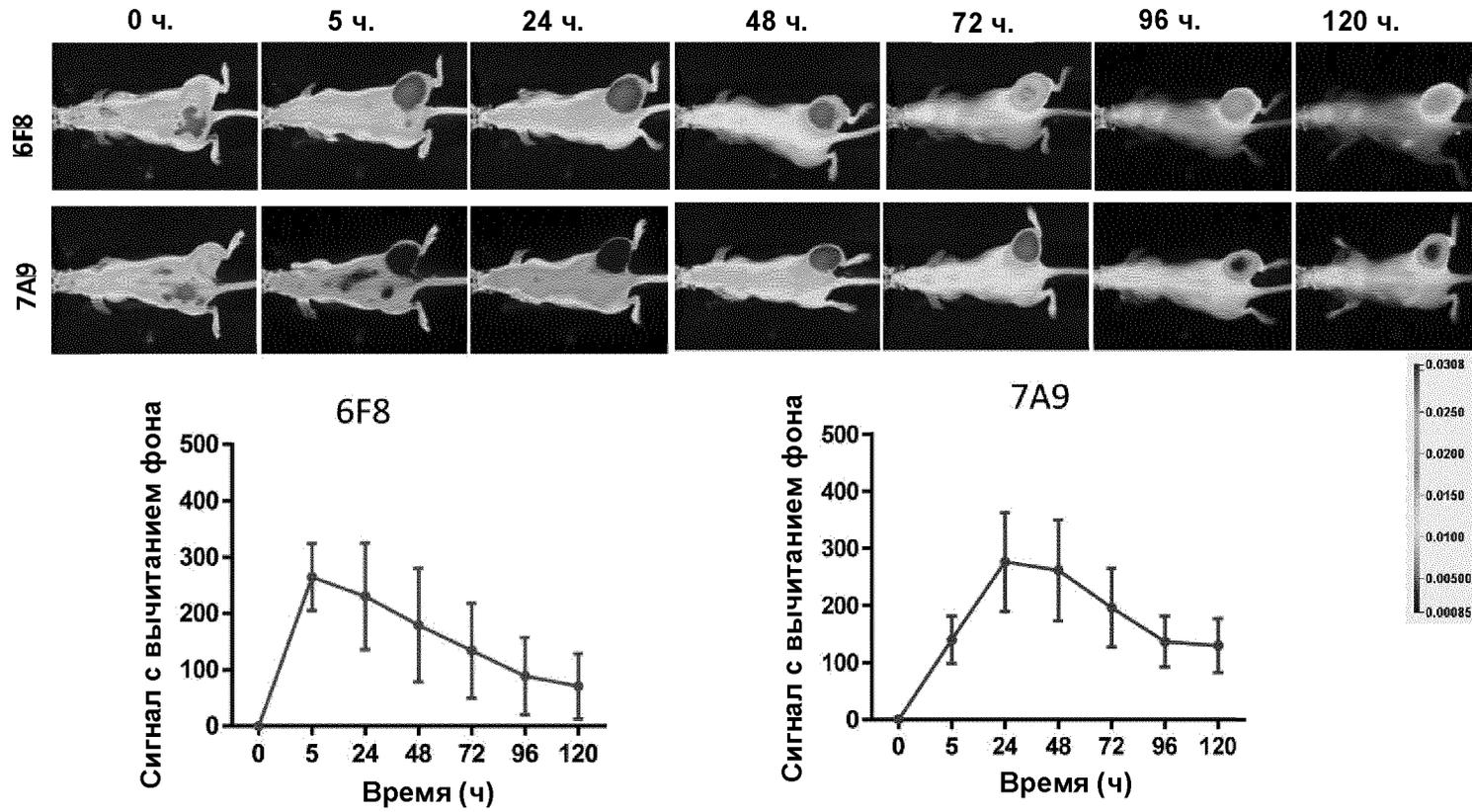
ФИГ. 11А-11В

Проточно-цитометрический анализ связывания 7A9 с поверхностью клеток H460



ФИГ. 12

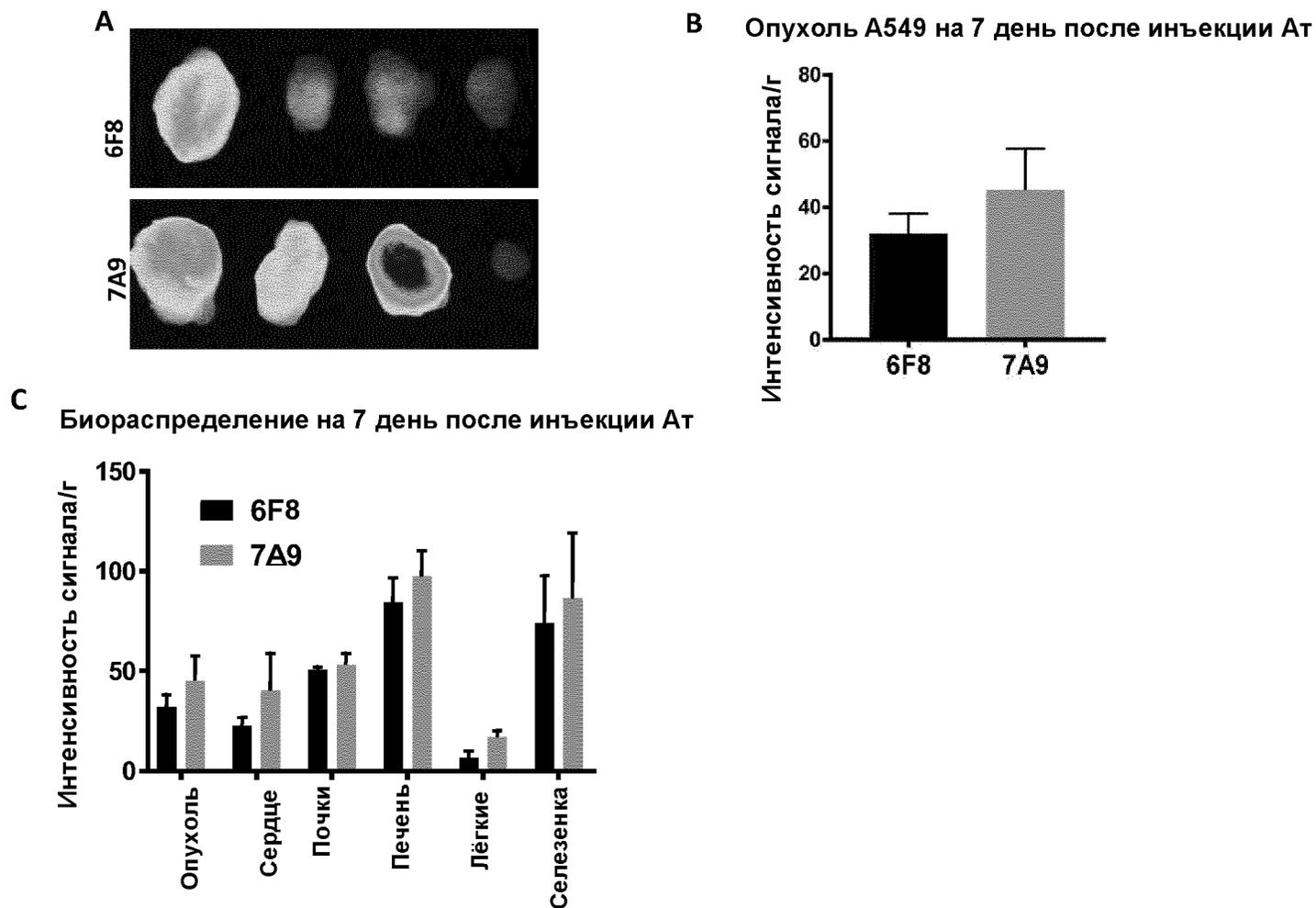
БИК-визуализация всего тела с использованием моноклональных антител против GRP78 (необлученные опухоли)



17/34

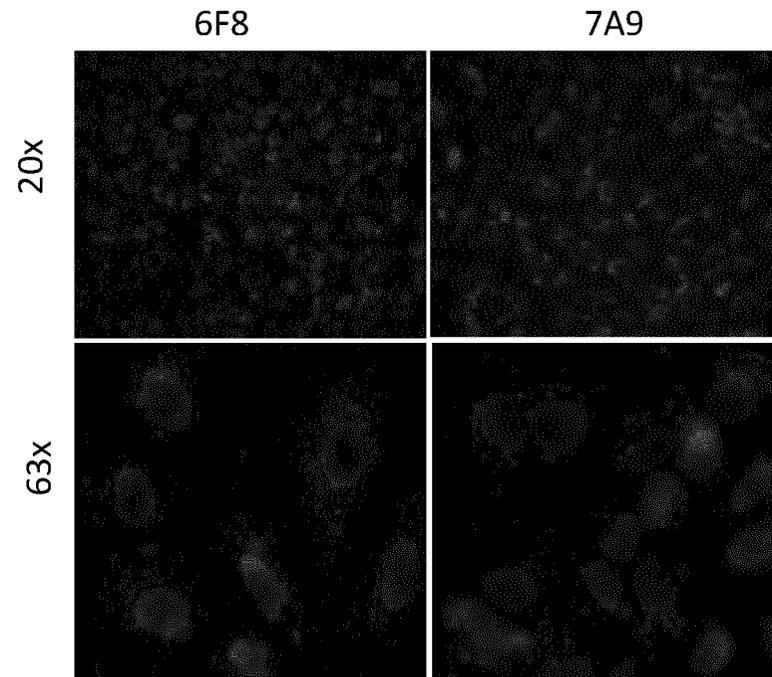
ФИГ. 13

Биораспределение моноклональных антител против GRP78 согласно БИК-визуализации (необлученные опухоли)



ФИГ. 14А-14С

Интернализация моноклональных антител против GRP78 в клетки A549

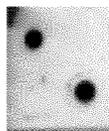


19/34

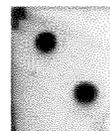
ФИГ. 15

Дот-блот-анализ, демонстрирующий связывание scFv-Fc против GRP78 с полноразмерным белком GRP78

scFv-Fc 1171



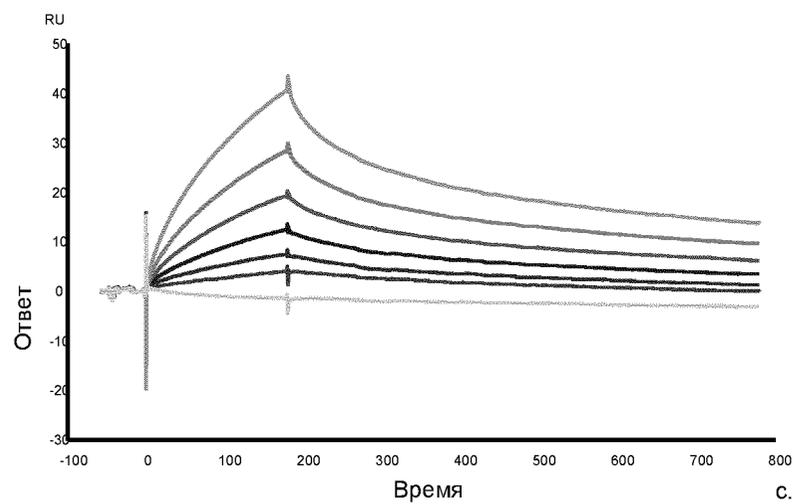
scFv-Fc 1183



20/34

ФИГ. 16

scFv 1171-Fc

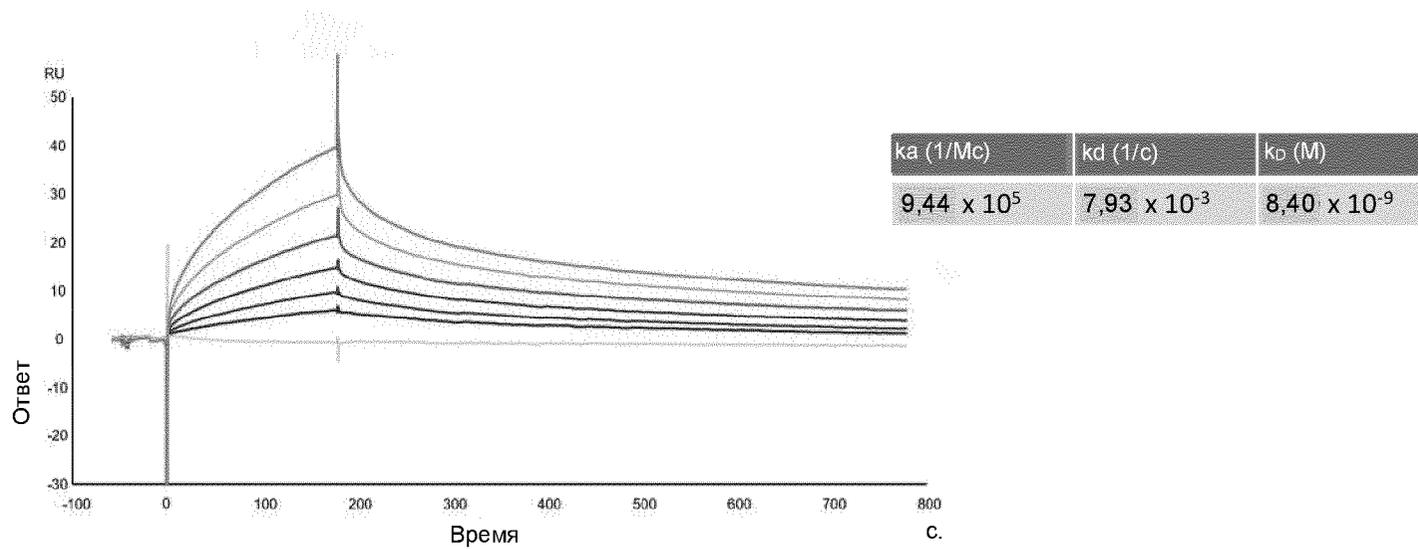


k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)
$6,79 \times 10^5$	$3,24 \times 10^{-3}$	$4,77 \times 10^{-9}$

21/34

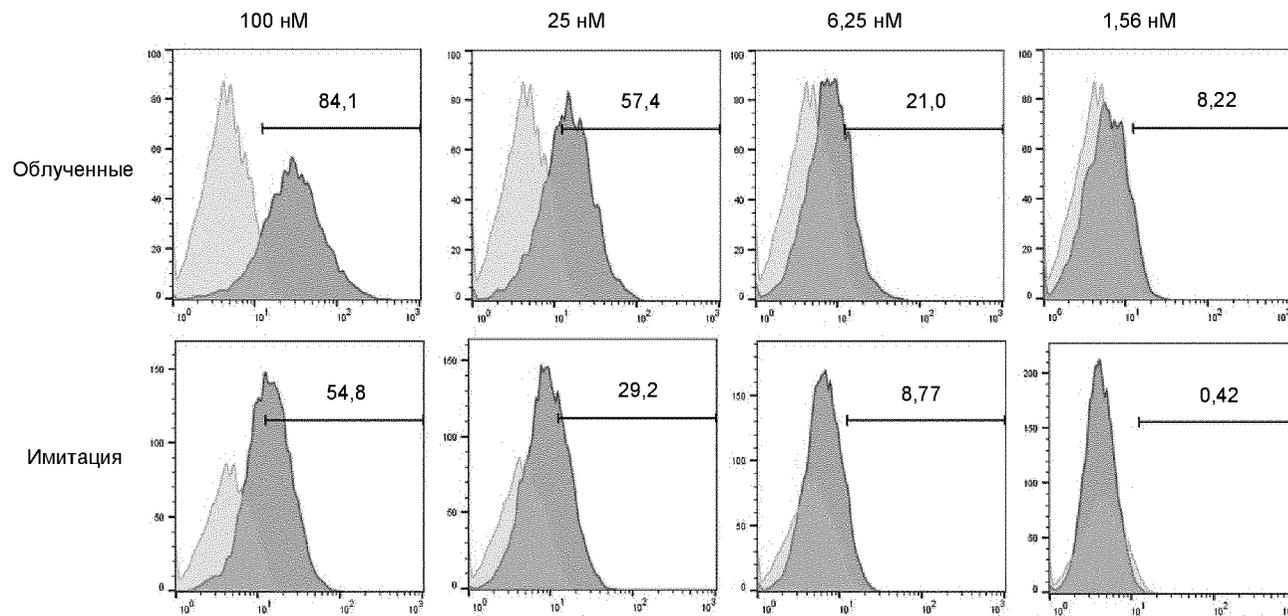
ФИГ. 17

scFv 1183-Fc

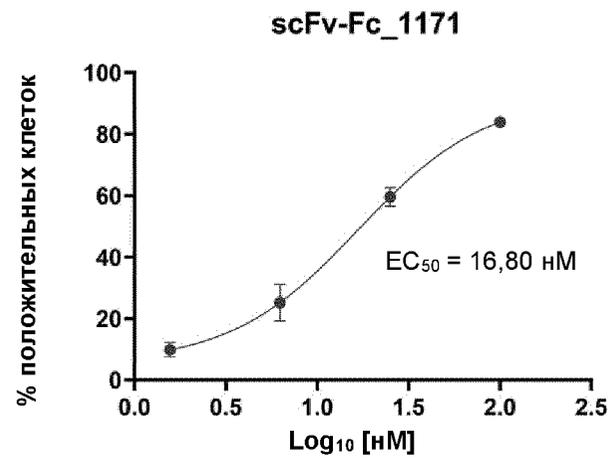
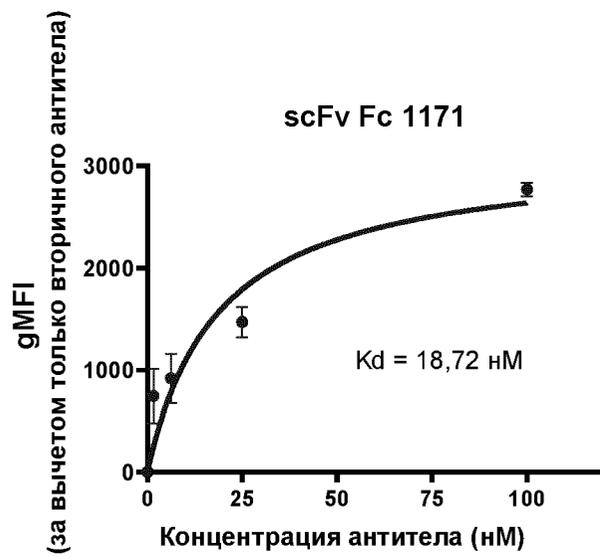


ФИГ. 18

Проточно-цитометрический анализ связывания scFv-Fc1171 с поверхностью клеток

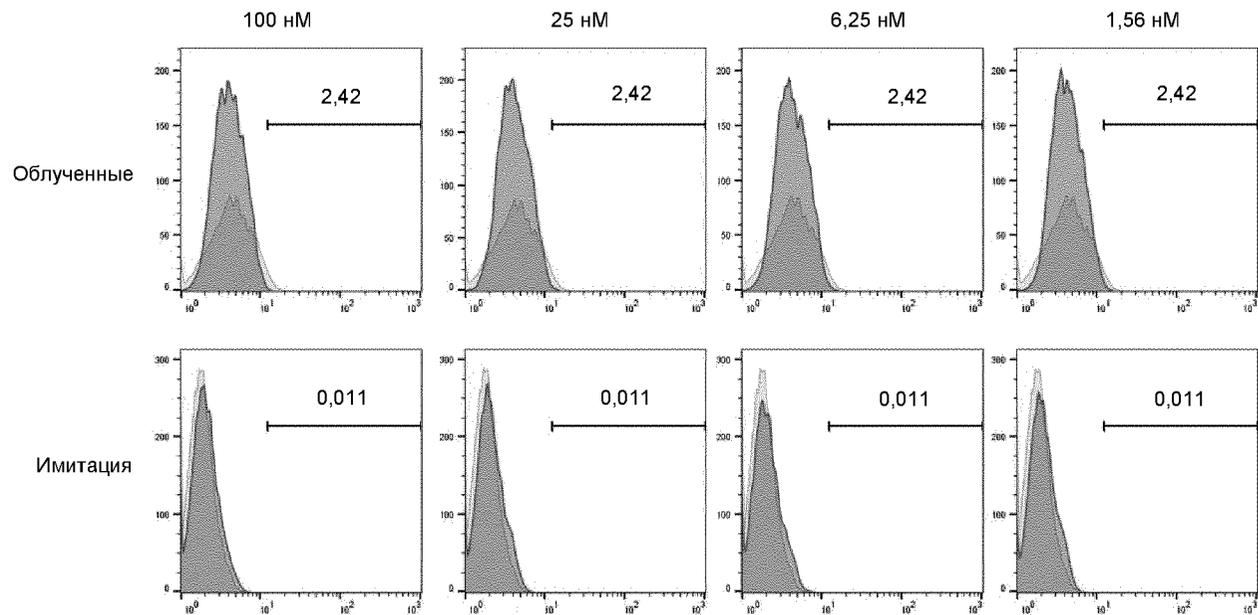


ФИГ. 19



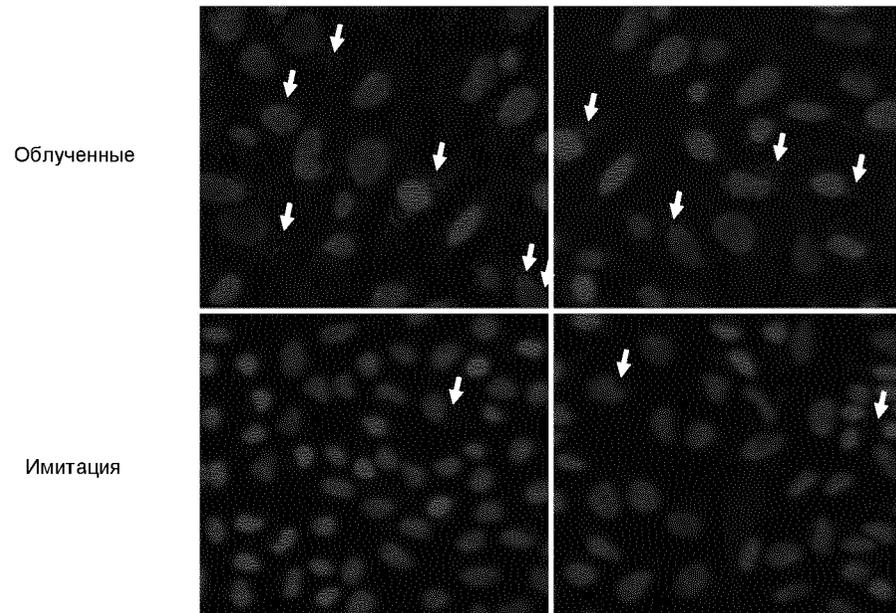
ФИГ. 20

Проточно-цитометрический анализ связывания scFv-Fc1171 с поверхностью клеток



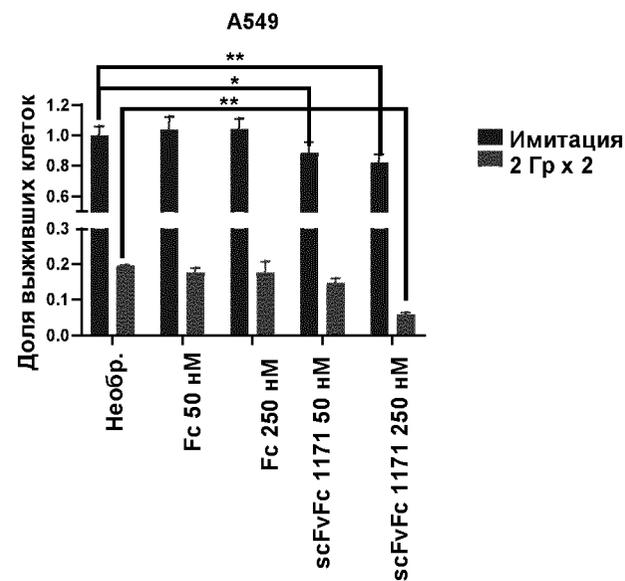
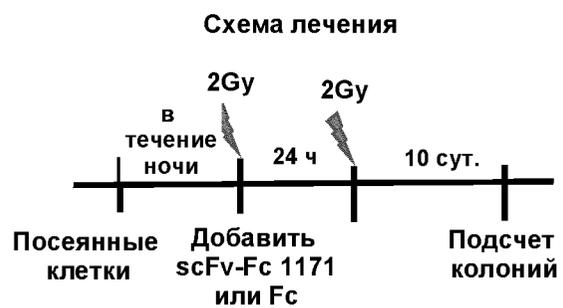
ФИГ. 21

Эндоцитоз scFv-Fc 1171 в клетки A549



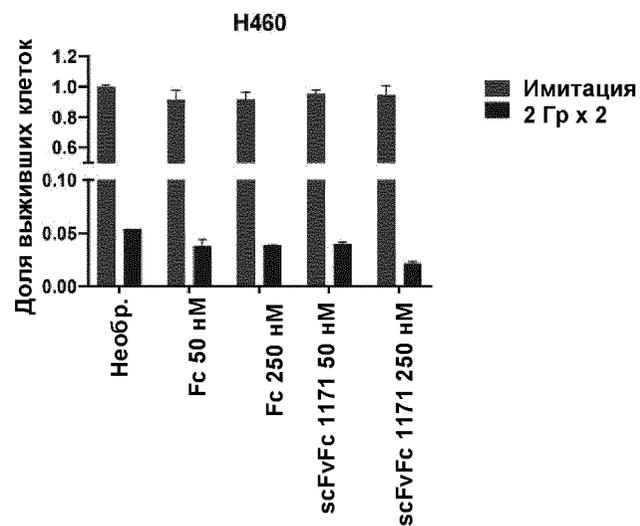
ФИГ. 22

Зависимость ответа от дозы scFv-Fc 1171 против GRP78 и Fc с использованием анализа образования колоний



ФИГ. 23

Зависимость ответа от дозы scFv-Fc 1171 против GRP78 и Fc с использованием анализа образования колоний клеток H460



ФИГ. 24

Последовательность моноклонального антитела против GRP78

6F8

Тяжелая цепь: Последовательность ДНК (408 п.о.)

Сигнальная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCCTTTGTTGTTTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAGGTGCAGCTTGT
TGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACCC
TCAATACCTCCGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGTGCATAAGA
AGTAAAAATTATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCCACCATTTTCAGAGATGA
TTCACAAAACATGCTCTATCTGCAAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGA
GGCCCCCGGGTTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Тяжелая цепь: Аминокислотная последовательность (136 АК)

Сигнальный пептид-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MLLGLKWVCFVVFYQGVHCEVQLVESGGGLVLRPKGSLKLSCAASGFTLNTSAMNWRQVPGKGLEWVGRIR
SKNYNYATYADSVKDRFTIFRDDSQNMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPPGFAYWGQGLVTVSA

Легкая цепь: Последовательность ДНК (381 п.о.)

Сигнальная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGGGTTCCTGCTCACGTTTTTGGCTTCTTGTGCTCTGGTTTTCCAGGTACCAGATGTGACATCCAGAT
GACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCCGACAAGTCAGG
AAATTAGTGGTCACTTAAGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGGAACATTAACGCCTGATCTACGCCGCA
TCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCCAGATTATTCTCTCACCAT
CAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATTCTAGTTATCCGTACACGTTCC
GAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

Легкая цепь: Аминокислотная последовательность (127 АК)

Сигнальный пептид-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRVPAHVFGFLLWFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRTSQEISGHLISWLQQKPDGTIKRLIYAA
SSLDSGVPKRFSGRSGSDYSLTISSELEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGTKLEIK

29/34

Последовательность моноклонального антитела против GRP78

7A9

Тяжелая цепь: Последовательность ДНК (420 п.о.)

Сигнальная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAGGTGCAGCTTGTTGAG
ACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGTCTCTGGAATCACCTTCAATATC
AATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAAT
AATTATGCAACATATTATGCCGATTTCAGTGAAGGACAGGTTACCCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTC
TATCTGCAAATGAACAACCTTGAAAAGTGAAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGAGATATAACTCGGGCCGGG
TACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Тяжелая цепь: Аминокислотная последовательность (140 АК)

Сигнальный пептид-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MLLGLKWFVFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAVSGITFNINAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKSN
NYATYADSVKDRFTISRDDSQSMPLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRDITRAGYFDVWGAGTTVTVSS

Легкая цепь: Последовательность ДНК (384 п.о.)

Сигнальная последовательность-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGCATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTT
CTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT
GTAATTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTG
GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTG
GAGCTGAAA

Легкая цепь: Аминокислотная последовательность (128 АК)

Сигнальный пептид-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MHFVQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVIYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNL
ASGVPARFSGSGSSTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK

ФИГ. 26

Последовательность scFV против GRP78

SCFV GRP78--1183

----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3-----

humIGLV048 SGSIASNY....__EDN.....__QSYDSTNGV

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSY
DSTNGVFGGGTKLTVL

humIGHV182 ----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3-----

GGTFSSYA....__ISAYNGNT..__ARDPPLRYFDWFRGSDWFDP

QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL
RSDDTAVYYCARDPPLRYFDWFRGSDWFDPWGQGLTVTS

ФИГ. 27

Последовательность scFV против GRP78

SCFV GRP78--1164

----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----

humIGLV083 NIGSKN.....__GDS.....__QVWDSNSDHPFV

SYELMQPPSVSMAPGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKSGQAPVLVWHGSDRPSGIPERISGRNFGNTATLTINRVEAGDEADYY
CQVWDSNSDHPFVFGTGKVTVL

humIGHV062 ----CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3----

GYTFTDYA....__INPGSGNT..__ARDRQGPDY

WVQLVESGPEVKKPGASVNVCKASGYTFTDYAIHWVRQAPGQRPEWMMGWINPGSGNTKYSQKFQVRVTITRDTASASTAYM
EMTSLRSEDTAIYYCARDRQGPDYWGQGLVTVS

32/34

ФИГ. 28

Последовательность scFV против GRP78

SCFV GRP78--1171

----CDR1----> <--CDR2--> <----CDR3-----

humIGKV120 QSISSY.....__DAS.....__QQYDNLLALT

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY
YCQQYDNLLALTFGGGKVDIK

humIGHV237 ----CDR1----> <--CDR2--> <----CDR3-----

GGTFSNPV....__IITMFGTT.....AKDPPMFDY

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKSSGGTFSNPVISWVRQAPGQGLEWMGGIITMFGTTYGNSVRGRFIVSRDNSKNMLFLQMNSLRAEDTAV
YYCAKDPPMFDYWGQGLVTVS

ФИГ. 29

Последовательность scFV против GRP78

Scfv 1256

----CDR1----> <--CDR2--> <---CDR3-----

humIGKV098 QGIRND.....__AAS.....__LQHNTYPWT

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY
CLQHNTYPWTFGQGTKVEIK

humIGHV062 ----CDR1----> <--CDR2--> <---CDR3-----

GGYIDRYF....__IYSGRT...__... ARDRQGPDY

EVQLVETGPGLVKPSQTLSTCSVSGGYIDRYFIHWVRQAPGQRPEWMGWYITSGRTKYSQKFQVRVTITRDTASASTAYMEM
TSLRSEDTAIYYCARDRQGPDYWGQGTLVTVS

ФИГ. 30