



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114585647 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 03

(21) 申请号 202080064510.9

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22) 申请日 2020.07.16

专利代理师 胡志君 黄革生

(30) 优先权数据

62/874,791 2019.07.16 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00 (2006.01)

2022.03.14

A61N 5/10 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/18 (2006.01)

PCT/US2020/042374 2020.07.16

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/011798 EN 2021.01.21

(71) 申请人 华盛顿大学

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 D·哈拉汉 V·卡普尔

A·K·辛格

权利要求书2页 说明书36页

序列表24页 附图33页

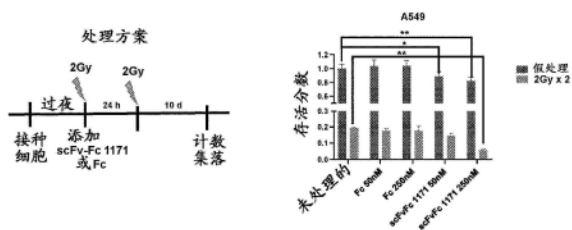
(54) 发明名称

抗GRP78抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及结合GRP78的分离的抗体。具体而言,包含用于识别癌症或肿瘤细胞的抗GRP78抗原结合蛋白的组合物。此外,在一些方面,该抗GRP78抗原结合蛋白用于药物和治疗的肿瘤/癌症特异性递送。在另一方面,所公开的抗原结合蛋白用于增强患有或疑似患有癌症或肿瘤的受试者的放射治疗,其中该抗原结合蛋白与有效负载例如治疗剂、成像剂或其组合缀合。

使用集落形成测定法的GRP78 scFv-Fc 1171和Fc的剂量反应



1. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:72, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:73, 和该重链可变区结构域CDR3选自SEQ ID NO:3、9、23、31、39和47; 以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域, 其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:74, 该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:75, 和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:76。

2. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:1, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:2, 和该重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:3; 以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域, 其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:4, 该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:5, 和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:6。

3. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:7, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:8, 和该重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:9; 以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域, 其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:10, 该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:11, 和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:12。

4. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:21, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:22, 和该重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:23; 以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域, 其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:24, 该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:25, 和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:26。

5. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:29, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:30, 和该重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:31; 以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域, 其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:32, 该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:33, 和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:34。

6. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:37, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:38, 和该重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:39; 以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域, 其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:40, 该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:41, 和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:42。

7. 特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有 CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域, 其中该重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:45, 该重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:46, 和该重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:47;

以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域,其中该轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:48,该轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:49,和该轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:50。

8. 权利要求2的分离的抗体,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:13的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。

9. 权利要求3的分离的抗体,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:15的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。

10. 权利要求4的分离的抗体,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:27的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:28的轻链可变结构域。

11. 权利要求5的分离的抗体,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:35的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:36的轻链可变结构域。

12. 权利要求6的分离的抗体,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:43的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:44的轻链可变结构域。

13. 权利要求7的分离的抗体,其中该抗体包含含有SEQ ID NO:51的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:52的轻链可变结构域。

14. 权利要求1-13中任一项的抗体,其中该抗体选自人源化抗体、单链可变片段(scFv)抗体、抗体片段或嵌合抗体。

15. 权利要求1-14中任一项的抗体,其中该抗体直接或间接地与选自治疗剂、成像剂或其组合的有效负载缀合。

16. 在有需要的受试者中增强放射治疗的方法,其包括施用有效量的包含特异性结合78kDa葡萄糖调节蛋白(GRP78)的抗体的组合物,使得放射治疗得到增强,其中该抗体直接或间接地与选自治疗剂、成像剂或其组合的有效负载缀合,且其中该抗体为权利要求1-13的分离的抗体。

17. 权利要求9的方法,其进一步包括对该受试者施用电离辐射。

18. 权利要求9的方法,其进一步包括对该受试者进行成像。

19. 权利要求9的方法,其中该治疗剂是携带CAR的免疫效应细胞、BITE或DART中的一种或多种。

20. 在有需要的受试者中的肿瘤或癌症进行成像的方法,该方法包括对该受试者施用包含缀合的GRP78的组合物,并使用权利要求1-13的抗体对受试者中的癌症进行成像,其中该抗体与成像剂缀合。

21. 在有需要的受试者中治疗肿瘤或癌症的方法,其包括施用有效量的包含权利要求1-13中任一项的抗体的组合物,其中该抗体直接或间接地与治疗剂缀合。

抗GRP78抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2019年7月16日提交的美国临时申请号62/874,791的权益,其公开内容在此以其整体引入作为参考。

[0003] 政府权利

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院资助的CA170169项目下的政府支持下做出的。政府在本发明中拥有某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涵盖包含用于识别肿瘤细胞和用于药物和治疗的肿瘤特异性递送的抗Grp78抗原结合蛋白的组合物。

背景技术

[0006] 在美国,一个人一生中罹患或死于癌症的概率,男性为1/2,女性为1/3。治疗耐药性是癌症治疗的重要障碍,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)和多形性胶质母细胞瘤(GBM)。NSCLC是全世界最常见的癌症相关死亡原因之一,由于在诊断时表现为晚期,因此仍然难以治愈。在GBM的情况下,尽管采用了多模式联合治疗,但肿瘤的侵袭性和复发导致中位生存期为14个月。为了提高GBM和NSCLC的治疗效果,靶向治疗已经成为一个越来越多的研究课题。已开发了靶向诸如VEGF/VEGFR-2、EGFR和RET的分子的抗体和抑制剂,以利用GBM和NSCLC固有的异常蛋白表达谱。然而,这些治疗方法在疗效上的边际改善突显了发现额外分子靶点的必要性。

[0007] 肿瘤特异性药物递送和治疗方法有可能减少或防止生物体内的肿瘤生长,从而使生物体能够过上更长寿、更健康的生活。然而,许多抗肿瘤药物对非肿瘤细胞也有毒性,导致难以耐受副作用。因此,本领域需要一种将抗肿瘤药物特异性递送至肿瘤细胞以减少肿瘤细胞生长的方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的一个方面涵盖结合78kDa葡萄糖调节蛋白(GRP78)的分离的抗体,其中该抗体包括含有CDR1、CDR2和CDR3的重链可变结构域,其中重链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:15,重链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:5,重链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:11;以及含有CDR1、CDR2和CDR3的轻链可变结构域,其中轻链可变结构域CDR1包含SEQ ID NO:25,轻链可变区结构域CDR2包含SEQ ID NO:19,轻链可变区结构域CDR3包含SEQ ID NO:6。该抗体可识别选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列内的表位。该抗体可选自人源化抗体、单链可变片段(scFv)抗体、抗体片段或嵌合抗体。该抗体可直接或间接地与选自治疗剂、成像剂或其组合的有效负载缀合。

[0010] 本发明的一个方面涵盖使用结合78kDa葡萄糖调节蛋白(GRP78)的抗体增强患有或疑似患有癌症或肿瘤的受试者的放射治疗的方法,其中该抗体直接或间接地与选自治疗剂、成像剂或其组合的有效负载缀合,该方法涉及对该受试者施用药理学有效量的抗体,使

得放射治疗得到增强。该方法可包括对该受试者施用电离辐射。该方法可包括对该受试者成像。该缀合治疗剂可以是抗肿瘤剂。

[0011] 本发明的一个方面涵盖使用结合78kDa葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的抗体对有需要的受试者中的癌症或肿瘤进行成像的方法,其中该抗体与成像剂缀合,该方法包括对该受试者施用该缀合的GRP78,以及对受试者中的癌症进行成像。

[0012] 附图简述

[0013] 本申请文件至少包含一张彩色附图。在请求并支付必要费用后,审查部门将提供本专利申请出版物的带彩色附图的副本。

[0014] 图1显示了显示ELISA测定法中抗GRP78小鼠单克隆抗体与C端GRP78肽结合的图。

[0015] 图2显示了显示抗GRP78小鼠单克隆抗体与GRP78蛋白结合的ELISA测定法。

[0016] 图3显示了GRP78抗体在NSCLC上的细胞表面结合。

[0017] 图4显示了GRP78抗体的表位定位 (SEQ ID NO:63-69)。从GRP78的c端合成了七种肽。每种肽是具有5个氨基酸重叠的12聚体。肽的序列如图所示。每种肽都一式两份包被在硝酸纤维素膜上,并与7A9抗体孵育。洗涤后,用化学发光法显示印迹。箭头表示阳性斑点。

[0018] 图5A-5B显示6F8抗体的表位定位。图5A显示相对应答结合的图。使用Biacore T200进行表位定位。将6F8固定在CM5传感芯片上,并使肽86-90 (6F8免疫原区域的重叠肽) 作为分析物流过。使用BIAevaluation软件分析每种肽对6F8的相对结合应答 (从6F8固定化通道减去空白通道上的应答)。非结合肽的截止值为0RU。图5B显示GRP78蛋白的三维模型,该模型以洋红色表示蛋白质上的表位序列。该图是使用Pymol软件产生的 (SEQ ID NO:71)。

[0019] 图6A-6B显示7A9抗体的表位定位。图6A显示7A9的相对应答结合的图。使用Biacore T200进行表位定位。将7A9固定在CM5传感芯片上,并使肽86-90 (7A9免疫原区域的重叠肽) 作为分析物流过。使用BIAevaluation软件分析每种肽对7A9的相对结合应答 (从7A9固定化通道减去空白通道上的应答)。非结合肽的截止值为0RU。图6B显示GRP78蛋白的三维模型,该模型以红色表示蛋白质上的表位序列。该图是使用Pymol软件产生的 (SEQ ID NO:70)。

[0020] 图7A-7B显示GRP78抗体的细胞表面结合的流式细胞术数据图。图7A显示6F8抗体与A549细胞的细胞表面结合的流式细胞术测定结果。结合条件:0.1x10⁶个细胞与从2.22μM开始3倍稀释的抗体孵育。用FACS缓冲液洗涤细胞2次。第二抗体染色。洗涤两次,在FACS缓冲液中通过流式细胞仪FACS Canto II (BD) 分析。使用Graphpad Prism软件中的“单位点特异性结合”拟合几何平均荧光强度。图7B显示使用Graphpad Prism软件中的“Sigmoidal, 4PL, X为log (浓度)”拟合与A中相同数据的图。

[0021] 图8A-8B是显示阳性A549细胞百分比的散点图。图8A显示小图1-7、未染色对照和第二抗体对照。图8B显示小图8-15。

[0022] 图9A-9B是显示6F8与H460细胞的细胞表面结合的图。图9A显示6F8抗体与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术测定。结合条件:0.1x10⁶个细胞与从0.7μM开始3倍稀释的抗体孵育。用FACS缓冲液洗涤细胞2次。第二抗体染色。洗涤两次,在FACS缓冲液中通过流式细胞仪FACS Canto II (BD) 分析。使用Graphpad Prism软件中的单位点特异性结合拟合几何平均荧光强度。图9B显示使用Graphpad Prism软件中的“Sigmoidal, 4PL, X为log (浓度)”拟合与A中相同的数据的图。

[0023] 图10显示用3倍系列稀释的6F8抗体染色的阳性H460细胞百分比的散点图(图1-6)。散点图由用于检测的荧光色素的荧光强度着色。

[0024] 图11A-11B显示7A9抗体与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术。图11A是7A9抗体与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术测定。结合条件: 0.1×10^6 个细胞与从 $1.0 \mu\text{M}$ 开始3倍稀释的抗体孵育。用FACS缓冲液洗涤细胞2次。第二抗体染色。洗涤两次,在FACS缓冲液中通过流式细胞仪FACS Canto II (BD) 分析。使用Graphpad Prism软件中的单位点特异性结合拟合几何平均荧光强度。图11B显示使用Graphpad Prism软件中的“Sigmoidal, 4PL, X为log(浓度)”拟合与A中相同的数据的图。

[0025] 图12显示用7A9抗体的3倍系列稀释液染色的阳性H460细胞百分比的散点图(小图1-7)。散点图由用于检测的荧光色素的荧光强度着色。

[0026] 图13显示在裸鼠后肢注射GRP78单克隆抗体(未照射肿瘤)A549肿瘤的全身NIR成像。6F8和7A9抗体用IR染料800(Licor)标记。在尾静脉注射每种抗体40ug,每天使用Pearl成像仪成像。

[0027] 图14A-14C显示GRP78单克隆抗体通过NIR成像(未照射肿瘤)的生物分布。图14A显示收获的A549肿瘤的图像。图14B显示每克收获的肿瘤的信号强度的条形图。图14C显示每gm各器官重量的信号强度。

[0028] 图15显示A549细胞中GRP78单克隆抗体的内化。6F8和7A9用pHRodo red pH敏感染料标记,该染料在酸性细胞室中发出红色荧光。

[0029] 图16显示了显示GRP78 scFv-Fc与GRP78全长蛋白结合的斑点印迹。对于该斑点印迹,将重组GRP78全长蛋白一式两份点样在硝酸纤维素膜上。封闭后,将印迹与抗GRP78 scFv Fc 1171和1183孵育。使用抗人Fc-HRP缀合抗体检测scFv-Fc与重组GRP78蛋白的结合。

[0030] 图17显示抗GRP78 scFv 1171-Fc与重组全长GRP78蛋白结合亲和力的biacore分析。scFv1171-Fc的最高浓度为500nM,随后进行两倍系列稀释。结合速率、解离速率和解离常数如表中所示。

[0031] 图18显示抗GRP78 scFv 1171-Fc与重组全长GRP78蛋白结合亲和力的biacore分析。scFv1183-Fc的最高浓度为500nM,随后进行两倍系列稀释。结合速率、解离速率和解离常数如表中所示。

[0032] 图19显示scFv-Fc1171的细胞表面结合的流式细胞术。A549细胞假处理或用3个剂量的3Gy照射。收集细胞,并用指定浓度的scFv-Fc1171抗体孵育。显示了代表性的重叠直方图(蓝色:第二抗体对照;红色:scFv-Fc1171)。

[0033] 图20显示scFv-Fc1171抗体与经照射的A549细胞的细胞表面结合的流式细胞术测定。结合条件: 0.1×10^6 个细胞与从100nM开始4倍稀释的抗体孵育。用FACS缓冲液洗涤细胞2次。第二抗体染色。洗涤两次,在FACS缓冲液中通过流式细胞仪FACS Canto II (BD) 分析。使用GraphPad Prism软件中的单位点特异性结合拟合几何平均荧光强度。显示使用GraphPad Prism软件中的“Sigmoidal, 4PL, X为log(浓度)”拟合的阳性细胞百分比的图。

[0034] 图21显示Fc阴性对照的细胞表面结合的流式细胞术。A549细胞假处理或用3个剂量的3Gy照射。收集细胞,并用指定浓度的Fc阴性对照孵育。显示了代表性叠加直方图(蓝色:第二抗体对照;红色:Fc阴性对照)。

[0035] 图22显示A549细胞中scFv-Fc 1171的内吞作用。A549细胞假处理或用3个剂量的3Gy照射。scFv-Fc 1171用pHRodo red pH敏感染料标记,该染料在酸性细胞室中发出红色荧光。白色箭头指示内化抗体。

[0036] 图23显示使用集落形成测定法的GRP78 scFv-Fc 1171和Fc的剂量反应。接种细胞并在第二天用2Gy照射。以2种不同浓度添加scFv-Fc 1171或Fc对照。接下来的一天再给以另一个2Gy的剂量。计数集落并对存活分数作图。采用双因素方差分析进行统计分析。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

[0037] 图24显示使用H460细胞上的集落形成测定法的GRP78 scFv-Fc 1171和Fc的剂量反应。接种细胞并在第二天用2Gy照射。以2种不同浓度添加scFv-Fc 1171或Fc对照。接下来的一天再给以另一个2Gy的剂量。计数集落并对存活分数作图。scFvFc1171与照射联合使用后,观察到存活分数逐渐下降的趋势。

[0038] 图25显示6F8抗体的核苷酸和氨基酸序列。(SEQ ID NO:55-58)。

[0039] 图26显示7A9抗体的核苷酸和氨基酸序列。(SEQ ID NO:59-62)。

[0040] 图27显示SCFV GRP78--1183抗体的氨基酸序列。(SEQ ID NO:27-28)。

[0041] 图28显示SCFV GRP78--1164抗体的氨基酸序列。(SEQ ID NO:35-36)。

[0042] 图29显示SCFV GRP78--1171抗体的氨基酸序列。(SEQ ID NO:43-44)。

[0043] 图30显示SCFV GRP78--1256抗体的氨基酸序列。(SEQ ID NO:51-52)。

[0044] 发明详述

[0045] 本公开涵盖识别肿瘤细胞的抗原结合蛋白。本公开还提供本文公开的抗原结合蛋白的使用方法。该抗原结合蛋白可用于提供例如药物或治疗剂的肿瘤特异性递送,以及增强放射治疗的疗效。在一个方面,本公开提供可用于对受试者中的癌症进行成像的抗原结合蛋白。在另一方面,本公开提供使用本公开的抗原结合蛋白增强受试者放射治疗的方法。有利的是,这些抗原结合蛋白特异性结合肿瘤细胞而非正常细胞。此外,本公开还提供用于制备本文所述抗原结合蛋白的目的的抗原。

[0046] 在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合蛋白特异性结合暴露在经照射的癌症或肿瘤相关细胞上的表位。例如,本公开的抗体可结合到经照射的癌症或肿瘤相关细胞上的胞外、跨膜或胞内表位。具体而言,本公开提供与78kDa葡萄糖调节蛋白(GRP78)结合的抗原结合蛋白。GRP78是一种多功能蛋白折叠伴侣分子和共同受体,在GBM和NSCLC表面高度表达,非常有望成为癌症特异性靶点。如本文所示,用抗GRP78抗体处理非小细胞肺癌(NSCLC)和多形性胶质母细胞瘤(GBM)癌细胞系,并评估其增殖、集落形成、细胞死亡和PI3K/Akt/mTOR信号传导。经抗GRP78抗体处理的GBM和NSCLC细胞显示细胞增殖减弱、集落形成减弱及凋亡增强。用抗GRP78抗体处理的GBM和NSCLC细胞还显示PI3K/Akt/mTOR信号传导的整体抑制。在小鼠异种移植模型体内测定抗GRP78抗体联合电离辐射(XRT)对肿瘤生长的功效。在NSCLC和GBM异位肿瘤模型中,将抗体与XRT联合可导致显著的肿瘤生长延迟。靶向GRP78的抗体在体外和体内均表现出抗肿瘤活性,并增强NSCLC和GBM的放射治疗效果。这些数据表明,抗GRP78抗原结合蛋白单独或与XRT联合作为癌症治疗是有效的。下文将进一步详细描述抗原结合蛋白及其使用方法。

[0047] I. 抗GRP78抗原结合蛋白

[0048] 在一个方面,如本文所述的GRP78抗原结合蛋白包括这样的抗原结合蛋白,其特异

性结合GRP78,且已分离、表征、纯化,具有功能性,并且已回收(已获得)用于功能性治疗组合物,该组合物对患有或疑似患有癌症或肿瘤的活受试者施用。在一个方面,如本文所述的GRP78抗原结合蛋白包括这样的抗原结合蛋白,其特异性结合GRP78,且已分离、表征、纯化,具有功能性,并且已回收(已获得)用于功能成像组合物,该组合物对患有或疑似患有癌症或肿瘤的活受试者施用。在另一方面,本文中有用的抗原结合蛋白包括这样的抗原结合蛋白,其已分离、表征、纯化,具有功能性,并且已回收(已获得)用于检测从活受试者获得的生物样本中的GRP78和检测受试者中癌症或肿瘤的发展的测定。在另一个方面,本文中有用的抗原结合蛋白包括这样的抗原结合蛋白,其已分离、表征、纯化,具有功能性,并且已回收(已获得)以供使用且在表B中列出,及其变体(例如人源化形式、嵌合形式和免疫学片段)。

[0049] 78kDa葡萄糖调节蛋白GRP78(Uniprot ID P11021)也称为BiP和HSP5a,是一种多功能蛋白质。在转录水平上,GRP78由基因Hsp5a编码。GRP78在细胞内质网(ER)应激后激活的未折叠蛋白反应(UPR)中起着众所周知的作用。然而,GRP78取决于其在细胞内的位置参与其他活动。GRP78主要位于ER中,但也在细胞质、线粒体、细胞核、质膜中观察到,并且分泌,尽管它主要用于参与内源性细胞保护过程。因此,GRP78可控制UPR和大自噬,或者可激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/AKT促存活途径。GRP78影响肿瘤细胞的生存、增殖,并产生耐药性。

[0050] 本文中的短语“特异性结合”是指抗原结合蛋白以小于300nM、小于250nM、小于200nM、小于150nM、小于100nM、小于75nM、小于50nM、小于25nM、小于20nM、小于15nM、小于10nM、小于5nM或小于1nM的亲和力常数或相互作用亲和力(KD)与GRP78结合。

[0051] 术语“抗原结合蛋白”是指表现出所希望的生物活性的任何形式的抗体或其片段。因此,它以最广泛的含义使用,具体而言包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所希望的生物活性,例如特异性结合GRP78。

[0052] 术语“抗体”包括术语“单克隆抗体”。术语“单克隆抗体”是指源自单个拷贝或克隆的抗体,包括例如任何真核、原核或噬菌体克隆。单克隆抗体是从基本上同质的抗体群体获得的,即除了可能存在少量的自然发生的突变或翻译后修饰外,包含于该群体的各抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异的,针对单个抗原表位。“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。单克隆抗体可以使用例如本领域已知的杂交瘤技术,以及重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或此类技术与本领域已知的其他技术的组合来制备。此外,单克隆抗体可按照本领域已知的方法使用可检测标记物标记、固定在固相上和/或与异源化合物(例如酶或毒素)缀合。

[0053] 术语“其片段”涵盖仍然基本保持其生物活性的抗体片段或衍生物。因此,术语“抗体片段”或“其片段”指全长抗体的一部分,通常指其抗原结合区或可变区。其免疫学有效片段的实例包括Fab、Fab',F(ab')₂和Fv片段、双体抗体(diabodies)、线性抗体、单链分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施方案中,本文公开的抗体片段的非限制性实例包括与Fc结构域、细胞因子、毒素或酶的融合。在本文的一些上下文中,为了强调,将特别提到片段;然而,应当理解,无论是否述及片段,术语“抗体”都包括此类片段。

[0054] 例如具有这种特异性的通常命名为抗体Fv区的单链形式也包括在“抗体”的定义中。这些scFv包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区。在大多数但并非所有情况下,

接头可以是肽。接头肽的长度优选为约10至25个氨基酸。优选地,接头肽富含甘氨酸以及丝氨酸或苏氨酸。scFv可用于促进噬菌体展示,或用于流式细胞术、免疫组织化学或作为靶向结构域。本领域已知制备和使用scFv的方法。在优选实施方案中,本公开的scFv与人恒定结构域缀合。在一些实施方案中,重链恒定结构域衍生自IgG结构域,如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在其他实施方案中,重链恒定结构域可衍生自IgA、IgM或IgE。

[0055] 术语“抗体”还包括双特异性单克隆抗体(即,包含两种不同单克隆抗体的片段并因此结合两种不同抗原的蛋白质)。双特异性单克隆抗体的具体实例可以是双特异性T细胞衔接物(Bi-specific T-cell Engager, BiTE),它是由不同抗体的两个单链可变片段(scFv)组成的融合蛋白。在某些实施方案中,BiTE形成T细胞和癌细胞之间的连接物。因此,一个scFv对GRP78特异,一个scFv结合T细胞。此外,本公开的抗体可以是嵌合抗原受体(CAR),也称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。CAR是一种工程化改造受体,可以将任意特异性移植到免疫效应细胞上。在一些实施方案中,本文公开的CAR在免疫效应细胞中表达。本文所用的术语“免疫效应细胞”是主动参与破坏肿瘤或癌细胞的细胞,例如具有抗肿瘤/抗癌活性。这些细胞可以包括但不限于巨噬细胞、淋巴细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T细胞和记忆T细胞。术语“携带嵌合抗原受体(CAR)的免疫效应细胞”是表达嵌合抗原受体的免疫效应细胞。这些细胞可以包括但不限于CAR-巨噬细胞、CAR-T细胞或携带CAR的iNKT细胞(iNKT-CAR)。通常,这些CAR用于将抗GRP78抗原结合蛋白的特异性移植到免疫效应细胞。

[0056] 此外,本公开的抗体可以是双亲和力再靶向抗体(DART)。DART型式基于双抗体型式,该型式将两种抗原结合特异性的重链和轻链的相应可变结构域分离在两条分开的多肽链上。这两条多肽链以双抗体型式非共价缔合,该DART型式通过C端二硫键提供额外的稳定化。DART可以高产量和质量产生,在制剂缓冲液和人血清中都表现出非凡的稳定性。此外,“抗体”的定义中包括单结构域抗体,通常称为sdAb,它是由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。sdAb抗体可以衍生自骆驼类(VHH片段)或软骨鱼类(VNAR片段)。只要该蛋白质保留特异性结合其预期靶标的能力,它就包括在术语“抗体”中。

[0057] 优选地,但并非必然,以重组方式产生用于发现的抗体,因为需要操纵具有适当特异性的通常为鼠或其他非人抗体,以便将其转化为人源化形式。抗体可以是糖基化的,也可以不是糖基化的,但优选糖基化抗体。众所周知,抗体通过二硫键正确交联。可修饰本公开的抗体以优化或最小化效应子功能。此外,可修饰本公开的抗体以延长半衰期。此外,可修饰本公开的抗体以提高结合亲和力。修饰抗体以改善上述特征的方法为本领域已知。

[0058] 本文所用抗体的基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对多肽链具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多氨基酸序列的可变区。每条链的羧基末端定义了主要负责效应子功能的恒定区。

[0059] 轻链分为 γ 、 μ 、 α 和 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,并将抗体的同型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区由约12个或更多氨基酸序列的“J”区连接,重链还包括约10个以上氨基酸序列的“D”区。

[0060] 每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点。因此,完整抗体有两个结合位点,尽管重组形式可具有更高效价。这些链显示由三个高变区(也称为互补决定区(以下称为

“CDR”)连接的相对保守的构架区(FR)的相同一般结构。来自这两条链的CDR由构架区使它们排列在一起,从而能够结合特异性表位。从N端到C端,轻链和重链分别包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个结构域的氨基酸序列的分配符合已知惯例(参见Kabat“Sequences of Proteins of Immunological Interest”National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991; Chothia等, J. Mol. Bio. (1987) 196:901-917; Chothia等, Nature (1989) 342:878-883)。例如,可以使用Kabat、Chothia、其组合或确定CDR的其他已知方法。

[0061] 在一个方面,通过以下的标准技术产生本发明的具有适当特异性的抗体:免疫哺乳动物,从该哺乳动物的产抗体细胞形成杂交瘤或以其他方式使其永生化,并培养该杂交瘤或永生化细胞以针对该适当的特异性对它们进行评估。在本案中,可通过例如用代表包含GRP78蛋白质编码序列的区域或其适当子区域的表位的肽免疫人、兔、大鼠或小鼠来产生此类抗体。可通过从杂交瘤或产生所需抗体的其他细胞获得编码所需抗体的核苷酸序列来获得用于重组操作的材料。如果需要,可以操纵、分离、表征、纯化和回收这些核苷酸序列,以提供其人源化形式。

[0062] 本文所用的“人源化抗体”包括这样的抗GRP78抗体,其部分或全部由衍生自人抗体种系的氨基酸序列组成,通过改变具有非人互补性决定区(“CDR”)的抗体序列。最简单的这种改变可以简单地由用人抗体的恒定区取代鼠恒定区组成,从而产生具有足够低的免疫原性的人/鼠嵌合体,以用于药物用途。然而,优选地,抗体的可变区甚至CDR也通过本领域目前已知的技术进行人源化。用相应的人构架区替换可变区的构架区,使非人CDR基本保持完整,或者甚至用衍生自人基因组的序列替换CDR。CDR也可以随机突变,使得GRP78的结合活性和亲和力在全人种系构架区或基本上是人构架区的背景中得以保持或增强。基本上,人构架与已知的人构架序列具有至少90%、95%或99%的序列同一性。完全有用的人抗体是在免疫系统已改变为与人免疫系统相对应的遗传修饰小鼠体内产生的。如上所述,在本发现的方法中,使用抗体的免疫学特异性片段(包括代表单链形式的片段)就足够了。

[0063] 此外,本文所用的术语“人源化抗体”是指这样的抗GRP78抗体,其包含人构架、来自非人抗体的至少一个CDR,且其中存在的任何恒定区与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即至少约85-90%、优选至少95%同一。因此,可能除CDR外,人源化抗体的所有部分基本上与一个或多个天然人免疫球蛋白序列的对应相同。

[0064] 如果需要,人源化免疫球蛋白的设计可以如下进行。当一个氨基酸序列属于以下类别时,将待使用的人免疫球蛋白(受体免疫球蛋白)的构架氨基酸序列替换为来自提供CDR的非人免疫球蛋白(供体免疫球蛋白)的构架氨基酸序列:(a)受体免疫球蛋白的人构架区中的氨基酸序列在该位置上对于人免疫球蛋白是不寻常的,而供体免疫球蛋白中的相应氨基酸序列在该位置上对于人免疫球蛋白是典型的;(b)氨基酸序列的位置紧邻CDR之一;或(c)在三维免疫球蛋白模型中,构架氨基酸序列的任何侧链原子在CDR氨基酸序列的任何原子的约5-6埃(中心到中心)范围内(Queen等,同上和Co等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2869)。当在该位置上,受体免疫球蛋白的人构架区中的每个氨基酸序列和供体免疫球蛋白中的相应氨基酸序列对于人免疫球蛋白是不寻常的时,将该氨基酸序列替换为该位置上的人免疫球蛋白的典型氨基酸序列。

[0065] 本公开的抗体也可与有效负载缀合,如治疗剂、可检测标记物和/或含有药物或可

检测标记物的递送装置(包括但不限于脂质体或纳米颗粒)。本领域已知将抗体与治疗剂、可检测标记物、脂质体、纳米颗粒或其他递送装置缀合的方法。一般来说,该缀合不应干扰抗体识别其靶标,也不应干扰靶标的活性部位。在一些情况下,抗体可通过抗体和有效负载之间的可切割连接产生。这种接头可允许在特定细胞位置释放有效负载。适宜的接头包括但不限于氨基酸链和烷基链,其官能化有反应性基团,用于缀合本公开的抗体和可检测的标记物和/或治疗剂。

[0066] 本文中有用的抗GRP78抗原结合蛋白还包括在生物样品中特异性结合GRP78的所有抗原结合蛋白。在示例性实施方案中,本文中有用的抗原结合蛋白包括特异性结合生物样品中存在的GRP78的所有抗原结合蛋白。

[0067] 在一些实施方案中,本发明的抗原结合蛋白与治疗剂缀合。该治疗剂优选减少或干扰癌症或肿瘤生长,或以其他方式减少癌症或肿瘤在身体或生物体内的影响。减少癌症或肿瘤产生的症状或减少癌症或肿瘤生长的治疗剂适用于本公开。

[0068] 此外,减少与癌症或肿瘤细胞生长相关的症状的治疗剂将用于本公开的目的。治疗剂的非限制性实例可包括具有CAR的免疫效应细胞、药物、治疗化合物、遗传物质、金属(例如放射性同位素)、蛋白质、肽、碳水化合物、脂质、类固醇、基于核酸的材料、或其天然形式或与疏水或带电部分衍生以增强并入或吸收入细胞中的衍生物、类似物或组合。此类治疗剂可为水溶性或疏水性。治疗剂的非限制性实例可包括免疫相关治疗剂、甲状腺治疗剂、呼吸系统产品、抗肿瘤剂、抗蠕虫药、抗疟疾药、有丝分裂抑制剂、激素、抗原生动物药、抗结核药、心血管产品、血液制品、生物反应调节剂、抗真菌剂、维生素、肽、抗过敏药、抗凝剂、循环药物、代谢增强剂、抗病毒药、抗心绞痛药、抗生素、抗炎药、抗风湿药、麻醉剂(narcotics)、强心甙、神经肌肉阻滞剂、镇静剂、局部麻醉剂(local anesthetics)、全身麻醉剂(general anesthetics)或放射性原子或离子。治疗剂的非限制性实例包含在下表A中。本公开的分离的抗原结合肽可与一种、两种、三种、四种或五种治疗剂缀合。本领域已知将抗体与治疗剂缀合的方法。一般来说,该缀合不应干扰抗体识别其靶标,也不应干扰靶标的活性部位。在一些情况下,scFv可通过scFv和治疗剂之间的可切割连接产生。这种接头可允许在特定细胞位置释放治疗剂。

[0069]

表 A: 治疗剂的非限制性实例

[0070]

示例性治疗剂	非限制性实例
免疫相关治疗剂	免疫血清、抗毒素、抗毒液细菌疫苗、病毒疫苗、狂犬病预防产品
甲状腺治疗剂	碘产品和抗甲状腺治疗剂
呼吸系统产品	黄嘌呤衍生物茶碱和氨茶碱
抗肿瘤治疗剂	铂类化合物（例如螺铂、顺铂和卡铂）、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素、安萨米霉素、博莱霉素、阿糖胞苷、阿糖腺苷、巯基多聚赖氨酸、长春新碱、白消安、氯苯脲、美法仑（例如 PAM、L-PAM 或苯丙氨酸氮芥）、巯基嘌呤、丝裂坦、单甲基奥瑞他汀 E（MMAE）、药物类美坦霉素（例如 DM1）、盐酸丙卡巴嗪达克霉素（放线菌素 D）、盐酸柔红霉素、盐酸阿霉素、紫杉醇和其他紫杉烷类、雷帕霉素、马努霉素 A、TNP-470、褶皱霉素（密特拉霉素）、氨基米特、磷酸雌霉素钠、氟他胺、醋酸亮丙瑞林、醋酸甲地孕酮、枸橼酸他莫昔芬、睾丸内酯、曲洛斯坦、氨沙林（m-AMSA）、天冬酰胺酶（L-天冬酰胺酶）、Erwinia 天冬酰胺酶、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、替尼泊苷（VM-26）、硫酸长春花碱（VLB）、硫酸长春新碱、硫酸博莱霉素、羟基脲、原卡巴嗪和达卡巴嗪
抗蠕虫药	帕莫酸嘧啶、吡嗪、四氯乙烯、噻菌灵、氯硝柳胺
抗疟疾药	氯喹、阿莫地喹、抗叶酸药物、丙谷胺（氯胍）、甲氟喹、奎宁、卤代凡特林、青蒿素及其衍生物、伯喹、强力霉素、四环素和克林霉素
有丝分裂抑制剂	依托泊苷、秋水仙碱和长春花生物碱
激素	雄激素、孕激素、雌激素和抗雌激素、生长激素、黑素细胞刺激激素、雌二醇、二丙酸倍氯米松、倍他米松、倍他米松醋酸酯和倍他米松磷酸钠、维他米松磷酸二钠、维他米松磷酸钠、醋酸可的松、地塞米松、醋酸地塞米松、地塞米松磷酸钠、氟尼醇、氢化可的松、醋酸

[0071]

	氢化可的松、氢化可的松氯比松、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、甲基强的松龙、醋酸甲基强的松龙、甲基强的松龙琥珀酸钠、醋酸对甲松、强的松龙、醋酸强的松龙、强的松龙磷酸钠、戊酸强的松龙、强的松龙、曲安奈德、曲安奈德丙酮化物、二乙酸曲安奈德、己曲安奈德(triamcinolone hexacetonide)、醋酸氟考的松、催产素、血管加压素、胰高血糖素及其衍生物
抗原生动物药	氯喹、羟基氯喹、甲硝唑、奎宁和锑酸甲葡胺(meglumine antimonite)
抗结核药	对氨基水杨酸、异烟肼、硫酸卷曲霉素、环丝氨酸、盐酸乙胺丁醇、乙酰胺、吡嗪酰胺、利福平和硫酸链霉素
心血管产品	螯合剂、汞利尿剂和强心甙
血液制品	肠外铁、血红素、血叶啉及其衍生物
生物反应调节剂	细胞因子、胞壁酰二肽、胞壁酰三肽、微生物细胞壁成分、淋巴因子(例如细菌内毒素,如脂多糖、巨噬细胞活化因子)、细菌亚单位(如分枝杆菌、棒状杆菌)、合成二肽 N-乙酰基-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺
抗真菌药	酮康唑、制霉菌素、灰黄霉素、氟胞嘧啶(5-fc)、咪康唑、两性霉素 B、蓖麻毒素、环孢霉素和 β -内酰胺类抗生素(例如磺胺嘧啶)
维生素	氨基巴拉明内啡酸、维甲酸及其衍生物,如维甲酸棕榈酸酯和 α -生育酚
肽	锰超氧化物歧化酶; 碱性磷酸酶等酶
抗过敏药	Amelexanox
抗凝剂	芬普康蒙和肝素
循环药物	普萘洛尔
代谢增强剂	谷胱甘肽
抗病毒药	阿昔洛韦、金刚烷胺叠氮胸苷(AZT、DDI、膦甲酸钠或齐多夫定)、利巴韦林和一水阿糖胞苷(阿糖胞苷, ara-A)

[0072]

抗心绞痛药	地尔硫卓、硝苯地平、维拉帕米、赤藓糖醇四硝酸酯、硝酸异山梨酯、硝酸甘油（硝酸甘油酯）和季戊四醇四硝酸酯
抗生素	氨基砒、氟霉素、新霉素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢拉定红霉素、克林霉素、林可霉素、阿莫西林、氨苄西林、杆菌氨苄西林、羧苄青霉素、双氯唑西林、环唑西林、吡啶唑西林、异他西林、甲氧西林、萘唑西林、青霉素（包括青霉素 G 和青霉素 V）、替卡西林-利福平、氨基糖苷和四环素
抗炎药	二氟尼柳、布洛芬、吲哚美辛、甲氯芬那酯、甲芬那酸、萘普生、氧苯丁氮酮、苯丁氮酮、吡罗昔康、舒林酸、托美汀、阿司匹林和水杨酸盐
抗风湿药	阿达木单抗、硫唑嘌呤、氯喹和羟基氯喹（抗疟疾药）、环孢素（环孢素 A）、D-青霉胺、依那西普、金盐（金黄酸钠、金诺芬）、英夫利昔单抗、来氟米特、甲氨蝶呤、米诺环素（四环素抗生素）、柳氮磺胺吡啶
麻醉剂	镇痛药、鸦片剂、可待因、海洛因、美沙酮、吗啡和鸦片
强心苷	去羊毛脂苷、洋地黄毒素、地高辛、洋地黄苷和洋地黄
神经肌肉阻滞剂	甲磺酸阿曲库铵、三硫代二胺加拉敏、溴化六氟铵、碘代美托库铵、溴化潘库溴铵、氯化琥珀酰胆碱（氯化苏沙甲铵）、氯化托布卡因和溴化维库溴铵
镇静剂（催眠药）	阿莫巴比妥、阿莫巴比妥钠、阿普巴比妥、丁巴比妥钠、水合氯醛、乙氯炔醇、乙酰胺酯、盐酸氟拉西洋、谷氨酰胺、盐酸甲氧丙嗪、甲基吡咯烷酮、盐酸咪达唑仑、副醛、戊巴比妥、戊巴比妥钠、苯巴比妥钠、速可巴比妥钠、他布他、替马西洋和三唑仑
局部麻醉药	盐酸布比卡因、盐酸氯普鲁卡因、盐酸依替卡因、盐酸利多卡因、盐酸甲哌卡因、盐酸普鲁卡因和盐酸丁卡因
全身麻醉药	氟哌利多、依托咪酯、枸橼酸芬太尼与氟哌利多、盐酸

	氯胺酮、甲氧己酯钠和硫喷妥钠
[0073]	放射性粒子或离子 钋、铅 ²¹² 、镭、铯、碘化铯、钷和放射性药物，如放射性碘、铜和磷产品

[0074] 本发明的一个方面涵盖与GRP78结合的抗体。在一些实施方案中，该抗RP78抗体衍生自命名为7A9或6F8的杂交瘤。本文所用的术语“衍生自”意指“衍生的”抗体包含来自6F8或7A9所产生的抗体的至少一个CDR区。换句话说，“衍生的抗体”包含选自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:11或SEQ ID NO:12的至少一个氨基酸序列。

[0075] 在一个实施方案中，本公开的抗体可衍生自杂交瘤7A9，并可包含与SEQ ID NO:13的重链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列，和/或可包含与SEQ ID NO:14的轻链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中，本公开的抗体可衍生自杂交瘤6F8，并可包含与SEQ ID NO:15的重链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列，和/或可包含与SEQ ID NO:16的轻链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中，本公开的抗体可包含与SEQ ID NO:27的重链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列，和/或可包含与SEQ ID NO:28的轻链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中，本公开的抗体可包含与SEQ ID NO:35的重链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列，和/或可包含与SEQ ID NO:36的轻链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中，本公开的抗体可包含与SEQ ID NO:43的重链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列，和/或可包含与SEQ ID NO:44的轻链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中，本公开的抗体可包含与SEQ ID NO:51的重链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列，和/或可包含与SEQ ID NO:52的轻链可变区具有90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。在上述每个实施方案中，该抗体可以是人源化的。

[0076] 在示例性实施方案中，本公开的结合GRP78的抗体包含SEQ ID NO:13的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:14的轻链氨基酸序列[即称为7A9的单克隆抗体]。在另一个示例性实施方案中，本公开的结合GRP78的抗体包含SEQ ID NO:15的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:16的轻链氨基酸序列[即称为6F8的单克隆抗体]。在另一个示例性实施方案中，本公开的结合GRP78的抗体包含SEQ ID NO:27的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:28的轻链氨基酸序列[即称为GRP78--1183的scFV抗体]。在另一个示例性实施方案中，本公开的结合GRP78的抗体包含SEQ ID NO:35的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:36的轻链氨基酸序列[即称为GRP78--1164的scFV抗体]。在另一个示例性实施例中，本公开的结合GRP78的抗体包含SEQ ID NO:43的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:44的轻链氨基酸序列[即称为GRP78--1171的scFV抗体]。在另一个示例性实施方案中，本公开的结合GRP78的抗体包含SEQ ID NO:51的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:52的轻链氨基酸序列[即称为GRP78--1256的scFV抗体]。

[0077] 在一个实施方案中，本公开的抗体可包含重链CDR1，如表B的抗体1、49、97、146、

194和242。在另一个实施方案中,本公开的抗体可包含重链CDR2,如表B的抗体4、52、100、149、197和245。在另一个实施方案中,本公开的抗体可包含重链CDR3,如表B的抗体6、54、102、151、196和247。在备选实施方案中,本公开的抗体可包含两个或三个重链CDR的组合,如表B的抗体2、3、5、50、51、53、98、99、101、147、148、150、195、196和198。

[0078] 类似地,在一个实施方案中,本公开的抗体可包含轻链CDR1,如表B的抗体7、55、103、152、200和248。在另一个实施方案中,本公开的抗体可包含轻链CDR2,如表B的抗体10、58、106、155、203和251。在另一个实施方案中,本公开的抗体可包含轻链CDR3,如表B的抗体12、60、108、157、205和253。在备选实施方案中,本公开的抗体可包含两个或三个轻链CDR的组合,如表B的抗体8、9、11、56、57、59、104、105、107、153、154、156、201、202、204、249、250和252。

[0079] 备选地,本公开的抗体可包含一个或多个轻链CDR和一个或多个重链CDR,如表B的抗体13-48、61-96、109-145、158-193、200-226和233-286。

[0080] 在示例性实施方案中,本公开的抗体可包含下表B中列出的CDR序列的组合。

[0081] 表B: 识别GRP78的包含CDR组合的抗体

[0082]

抗体	重链			轻链		
	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

[0083]

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					

[0084]

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

[0085]

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

[0086]

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					

[0087]

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

[0088]

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

[0089]

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					

[0090]

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

[0091]

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

[0092] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:72;X1-X2-A-M-N的重链CDR1,其中X1为疏水性或极性中性侧链氨基酸,X2为极性中性侧链氨基酸。在一些实施方案中,X1是疏水性脂肪族或极性中性侧链。

[0093] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:73;R-I-R-S-K-X1-X2-N-Y-A-T-Y-Y-A-D-S-N-K-D的重链CDR2,其中X1为极性中性侧链氨基酸;X2为疏水性或极性中性侧链氨基酸。在一些实施方案中,X2为疏水性芳香族或极性中性侧链氨基酸。

[0094] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:74;x-x-X1-S-X2-x-I-X3-x-H-x-x的轻链CDR1,其中x为任意氨基酸;X1为极性中性侧链氨基酸;X2为极性中性侧链氨基酸;X3为疏水性或极性中性侧链氨基酸。在一些实施方案中,x选自S、M、H、L、R或A。在一些实施方案中,x3为疏水性芳香族或极性中性侧链氨基酸。

[0095] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:75;X1-X2-S-X3-L-x-S的轻链CDR2,其中x为任意氨基酸;X1为疏水性或极性中性侧链氨基酸;X2为疏水性或极性中性侧链氨基酸;X3为极性中性侧链氨基酸。在一些实施方案中,x选自A或D。在一些实施方案中,X1为疏水性脂肪族或极性中性侧链氨基酸。在一些实施方案中,X2为疏水性脂肪族或极性中性侧链氨基酸。

[0096] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:76;X1-Q-X2-S-S-Y-P-X3-T的轻链CDR3,其中x为任意氨基酸;X1为疏水性或极性中性侧链氨基酸;X3为极性中性侧链氨基酸。在一些实施方案中,X2选自Y或R。在一些实施方案中,X1为疏水性脂肪族或极性中性侧链氨基酸。

[0097] 在一个实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含重链可变区,该重链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:1、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:2和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:3,和/或可包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:4、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:5和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:6。在另一个实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含重链可变区,该重链可

变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:7、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:8和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:9,包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:10、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:11和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:12。在一个实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含重链可变区,该重链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:21、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:22和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:23,和/或可包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:24、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:25和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:26。在另一个实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含重链可变区,该重链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:29、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:30和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:31,包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:32、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:33和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:34。在一个实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含重链可变区,该重链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:37、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:38和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:39,和/或可包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:40、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:41和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:42。在另一个实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含重链可变区,该重链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:45、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:46和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:47,包含轻链可变区,该轻链可变区包含具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:48、具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:49和具有0到2个氨基酸取代的SEQ ID NO:50。

[0098] 在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的轻链可变区。在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的轻链可变区。在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含含有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的轻链可变区。在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含含有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的轻链可变区。在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含含有SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的轻链可变区。在一个示例性实施方案中,本公开的抗原结合肽可包含含有SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50的轻链可变区。

[0099] 在一些实施方案中,本公开涵盖SEQ ID NO:17、18、19、20、55、56、59或60的核酸。本公开还涵盖编码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: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或SEQ ID NO:50的核酸序列,其可由本领域技术人员容易地确定,并且可以并入载体或其他大DNA分子,如染色体,以表达本公开的抗体。

[0100] 本公开还涵盖包含能够编码本公开的抗体的核酸序列的载体。本文所用的“载体”定义为用作转移遗传物质的载体的核酸分子。载体包括但不限于质粒、噬粒、黏粒、转座元件、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC),如逆转录病毒载体(例如衍生自Moloney鼠白血病病毒载体(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等)、慢病毒载体(例如衍生自HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等)、腺病毒(Ad)载体(包括其有复制能力、复制缺陷和无病毒基因的形式)、腺相关病毒(AAV)载体、猿猴病毒40(SV-40)载体、牛乳头状瘤病毒载体、EB病毒、疱疹病毒载体、痘苗病毒载体、哈维鼠肉瘤病毒载体、鼠乳腺肿瘤病毒载体、劳斯肉瘤病毒载体。编码本公开的抗体的表达载体可使用病毒载体或通过非病毒转移方法递送至细胞。适合将核酸引入细胞的病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、弹状病毒和疱疹病毒。核酸转移的非病毒方法包括裸核酸、脂质体和蛋白质/核酸缀合物。引入细胞的编码本公开的抗体的表达构建体可以是线性的或环状的,可以是单链或双链,也可以是DNA、RNA或其任何修饰或组合。本公开还涵盖细胞系,该细胞系包含载体,该载体包含能够编码本公开的抗体的核酸序列,非限制性实例是CAR T细胞、CAR免疫效应细胞和CAR巨噬细胞。在一些实施方案中,本文所公开的抗原结合肽用于将治疗性病毒(例如改造的腺病毒、溶瘤病毒)靶向肿瘤细胞。在一个方面,该治疗性病毒表达本发明的抗原结合肽。在另一方面,该抗原结合肽附着到溶瘤病毒。

[0101] 上面提到的每个序列可以在下面的表C中找到。

[0102]

表 C.	
SEQ ID NO:	序列
1 (7A9 HC CDR1)	INAMN
2 (7A9 HC CDR2)	RIRSKSNNYATYYADSVKD
3 (7A9 HC CDR3)	DITRAGYFDV
4 (7A9 LC CDR1)	SASSSVIYMH
5 (7A9 LC CDR2)	STSNLAS
6 (7A9 LC CDR3)	QQRSSYPLT
7 (6F8 HC CDR1)	TSAMN
8 (6F8 HC CDR2)	RIRSKNYNYATYYADSVKD
9 (6F8 HC CDR3)	PPGFAY
10 (6F8 LC CDR1)	RTSQEISGHLS
11 (6F8 LC CDR2)	AASSLDS
12 (6F8 LC CDR3)	LQYSSYPYT
13 (7A9 HC)	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAVSGITFNINAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYVCVRDI TRAGYFDVWGAGTTVTVSS
14 (7A9 LC)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVIYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNL ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLEL K
15 (6F8 HC)	EVQLVESGGGLVLRPKGSLKLSCAASGFTLNTSAMNWVRQVPGKGLEWVGR IRSKNYNYATYYADSVKDRFTIFRDDSQNMLYLQMNNLKTEDTAMYVCVR PPGFAYWGQGLVTVSA
16 (6F8 LC)	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRTSQEISGHLSWLQQKPDGTIKRLIYAASSL DSGVPKRFSRSGSDYSLTISSEDFADYYCLQYSSYPYTFGGGKLEIK
17 (7A9 HC NT)	GAGGTGCAGCTTGTTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGT CATTGAAACTCTCATGTGCAGTCTCTGGAATCACCTTCAATATCAATGCCA TGAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCG CATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAA

[0103]

	GGACAGGTTACCCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGC AAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAG AGATATAACTCGGGCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACG GTCACCGTCTCCTCA
18 (7A9 LC NT)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA GAAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAATTTACATGCACT GGTTCAGCAGAAGCCAGGCACCTTCTCCAAACTCTGGATTTATAGCACA TCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGG GACCTTACTCTCTACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCA CTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGTGGG ACCAAGCTGGAGCTGAAA
19 (6F8 HC NT)	GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCGGCCTAAAGGGT CATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCCTCAATACCTCCGCCA TGAAGTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGTGC CATAAGAAGTAAAAATTATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAAGTAA AGACAGGTTACCATTTTCAGAGATGATTCACAAAACATGCTCTATCTGC AAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAG GCCCCCGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTG CA
20 (6F8 LC NT)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGA AAGAGTCAGTCTCACTTGTTCGACAAGTCAGGAAATTAGTGGTCACTTA AGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGGAACATATAAACGCCTGATCTACGC CGCATCCAGTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGTTCAAGTGGCAGTAGGT CTGGGTCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTG CAGACTTACTGTCTACAATATTCTAGTTATCCGTACACGTTCCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAATAAAA
21 (humIGHV1 82 CDR1)	GGTFSSYA
22 (humIGHV1 82 CDR2)	ISAYNGNT
23 (humIGHV1 82 CDR3)	ARDPPLRYFDWFRGSDWFDP
24 (humIGLV04 8 CDR1)	SGSIASNY
25 (humIGLV04 8 CDR2)	EDN
26 (humIGLV04 8 CDR3)	QSYDSTNGV
27 (humIGHV1 82)	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDP PLRYFDWFRGSDWFDPPWGQGLTVTS
28 (humIGLV04 8)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDN QRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSTNGVFGGGT KLTVL
29 (humIGHV0 62 CDR1)	GYTFTDYA
30	INPGSGNT

[0104]

(humIGHV0 62 CDR2)	
31 (humIGHV0 62 CDR3)	ARDRQGPDY
32 (humIGLV08 3 CDR1)	NIGSKN
33 (humIGLV08 3 CDR2)	GDS
34 (humIGLV08 3 CDR3)	QVWDSNSDHPFV
35 (humIGHV0 62)	WVQLVESGPEVKKPGASVNVSCASGYTFTDYAIHWVRQAPGQRPEWMG WINPGSGNTKYSQKFQVRVTITRDTSASTAYMEMTSLRSEDTAIYYCARDR QGPDYWGQGLTIVS
36 (humIGLV08 3)	SYELMQPPSVSMAPGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKSGQAPVLVHGD SDRPSGIPERISGRNFGNTATLTINRVEAGDEADYYCQVWDSNSDHPFVFGT GTKVTVL
37 (humIGHV2 37 CDR1)	GGTFSNPV
38 (humIGHV2 37 CDR2)	IITMFGTT
39 (humIGHV2 37 CDR3)	AKDPPMFDY
40 (humIGLV12 0 CDR1)	QSISSY
41 (humIGLV12 0 CDR2)	DAS
42 (humIGLV12 0 CDR3)	QQYDNLLALT
43 (humIGHV2 37)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSSGGTFSNPVISWVRQAPGQGLEWMGG IITMFGTTYGNSVRGRFIVSRDNSKNMLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPP MFDYWGQGLTIVS
44 (humIGLV12 0)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGTDFFTFTISSLPEDIATYYCQQYDNLLALTFGGGTKVD IK
45 (humIGHV0 62 CDR1)	GGYIDRYF
46 (humIGHV0 62 CDR2)	IYTSGRT

[0105]

47 (humIGHV1 68 CDR3)	ARDRQGPDY
48 (humIGLV09 8 CDR1)	QGIRND
49 (humIGLV09 8 CDR2)	AAS
50 (humIGLV09 8 CDR3)	LQHNTYPWT
51 (humIGHV0 62)	EVQLVETGPGLVKPSQTLSTCSVSGGYIDRYFIHWVRQAPGQRPEWMGWI YTSGRTKYSQKFQVRVTITRDTSASTAYMEMTSLRSEDTAIYYCARDRQGP DYWGQGLVTVS
52 (humIGLV09 8)	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVE IK
53 (抗原序列)	CISKLYGSAGPPPTGEEDTAE
54 (生物淘选 肽)	ISKLYGSAGPPPTGEEDTAE
55 6F8 HC 含信 号序列	ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTGTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTG CATTGTGAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAA AGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCCCTCAATACCT CCGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGT TGGTCGCATAAGAAGTAAAAATTATAATTATGCAACATATTATGCCGATT AGTAAAGACAGGTTCCACATTTTCCAGAGATGATTACAAAACATGCTCT ATCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGT GTGAGGCCCGGGTTTGTCTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTG TCTCTGCA
56 6F8 LC 含信 号序列	ATGAGGGTTCCTGCTCACGTTTTTGGCTTCTTGTGCTCTGGTTTCCAGGT ACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCT CTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCCGACAAGTCAGGAAATTAGTG GTCACTTAAGCTGGCTTCCAGCAGAAACCAGATGGAACATTTAAACGCCTG ATCTACGCCGCATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGTTTCACTGG CAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTG AAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATTCTAGTTATCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
57 6F8 HC 含信 号序列	MLLGLKWVCFVVFYQGVHCEVQLVESGGGLVLRPKGSLKLSCAASGFTLNT SAMNWVRQVPGKGLEWVGRIRSKNYNYATYYADSVKDRFTIFRDDSQNML YLQMNNLKTEDTAMYYCVRPPGFAYWGQGLVTVSA
58 6F8 LC 含信 号序列	MRVPAHVFGFLLLWFPGRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRTSQEISGHL SWLQQKPDGTIKRLIYAASSLDSGVPKRFSRSGSDYSLTISSLESEDFADY YCLQYSSYPYTFGGGKLEIK
59 7A9 HC 含信 号序列	ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTG CATTGTGAGGTGCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTA AAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGTCTCTGGAATCACCTCAATATC AATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGG TTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATT CAGTGAAGGACAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTACAAAAGCATGCT

[0106]

	CTATCTGCAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACT GTGTGAGAGATATAACTCGGGCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA
60 7A9 HC 含信 号序列	ATGCATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTC ATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTC TGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT GTAATTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAAC CTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCA GTGGCAGTGGATCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTATCCGCT CACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
61 7A9 HC 含信 号序列	MLLGLKWVFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAVSGITFNIN AMNWRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLY LQMNNLKTEDTAMYVCVRDITRAGYFDVWGAGTTVTVSS
62 7A9 HC 含信 号序列	MHFVQVQIFSLLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASPGKVTITCSASSSVIYM HWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT YYCQRSSYPLTFGAGTKLELK
63 表位定位序 列 1	EEKIEWLESHQD
64 表位定位序 列 2	ESHQDADIEDFK
65 表位定位序 列 3	IEDFKAKKKELE
66 表位定位序 列 4	KKELEEIVQPII
67 表位定位序 列 5	VQPIISKLYGSA
68 表位定位序 列 6	LYGSAGPPPTGE
69 表位定位序 列 7	PPTGEEDTAEKD
70 7A9 表位	ISKLYGSAEDTAE
71 6F8 表位	PPTGEEDTAE
72 HC CDR1	X1-X2-A-M-N, 其中 X1 为疏水性或极性中性侧链氨基酸, X2 为极 性中性侧链氨基酸
73 HC CDR2	R-I-R-S-K-X1-X2-N-Y-A-T-Y-Y-A-D-S-N-K-D, 其中 X1 为极性中性 侧链氨基酸; X2 是疏水性或极性中性侧链氨基酸
74 LC CDR1	x-x-X1-S-X2-x-I-X3-x-H-x-x, 其中 x 为任意氨基酸; X1 为极性中性 侧链氨基酸; X2 为极性中性侧链氨基酸; X3 为疏水性或极性中性侧

	链氨基酸
[0107] 75 LC CDR2	X1-X2-S-X3-L-x-S, 其中 x 为任意氨基酸; X1 为疏水性或极性中性侧链氨基酸; X2 为疏水性或极性中性侧链氨基酸; X3 为极性中性侧链氨基酸
76 LC CDR3	X1-Q-X2-S-S-Y-P-X3-T, 其中 x 为任意氨基酸; X1 为疏水性或极性中性侧链氨基酸; X3 为极性中性侧链氨基酸

[0108] II. 使用方法

[0109] 在另一方面,如上所述的本发明的分离的抗体可用于在受试者中治疗和预防癌症和相关疾病。本发明的抗体可与放射性同位素或化学治疗化合物缀合,以向肿瘤部位提供特异性的放射和化学治疗的递送。此外,本发明的抗体可以是联合治疗的一部分。优选地,联合治疗将包括使用本发明的抗体以及放射治疗或化学治疗疗程。也有人提出,如本文所述的单克隆抗体可增加肿瘤细胞对化学治疗或放射治疗的敏感性。在优选实施方案中,本发明的抗体可用于增强癌症放射治疗的疗效。

[0110] 在一个方面,本公开提供确定受试者或生物样品辐射暴露剂量的方法,例如生物剂量学。生物剂量学是指利用生物物质的测试来确定其暴露的剂量。当无法进行物理剂量测定(如TLD或电离室)时,它在辐射事故中尤其有用。在一些实施方案中,本公开的抗原结合肽用于确定受试者的辐射暴露剂量。

[0111] 在另一方面,本公开提供癌症成像方法。因此,本发明的抗体可与成像剂缀合。例如,scFv可与成像剂缀合。合适的成像剂可包括但不限于可用于显微镜的成像/示踪剂,例如荧光显微镜、共焦显微镜或电子显微镜、磁共振成像、断层扫描,如伽马(SPECT/CT,平面)和正电子发射断层扫描(PET/CT)、射线照相或超声。成像/示踪剂可在原位、体内、离体和体外检测到。一般而言,成像/示踪剂可包括发光分子、化学发光分子、荧光色素、荧光猝灭剂、有色分子、放射性同位素、闪烁剂、大标记物(massive label)(用于通过质量变化检测)、生物素、亲和素、链亲和素、蛋白A、蛋白G、抗体或其片段、Grb2、多聚组氨酸、Ni²⁺、Flag标签、myc标签、重金属、锆(与去铁胺(desferoxamine)结合)、酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、荧光素酶、电子供体/受体、吡啶酯和比色底物。本领域技术人员将容易识别上文未提及的可用于本发明操作的其他有用标记物。

[0112] 抗体如上文第一节所述。受试者、癌症和抗体施用如下文所述。

[0113] (a) 受试者

[0114] 本发明的方法可用于检测或治疗人、家畜、陪伴动物、实验室动物或动物园动物受试者中的肿瘤。在一个实施方案中,该受试者可以是啮齿动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠等。在另一个实施方案中,该受试者可以是家畜。合适的家畜的非限制性实例可以包括猪、牛、马、山羊、绵羊、美洲驼和羊驼。在又一个实施方案中,该受试者可以是陪伴动物。陪伴动物的非限制性实例可以包括宠物,如狗、猫、兔子和鸟。在又一个实施方案中,该受试者可以是动物园动物。本文所用的“动物园动物”指可在动物园中发现的动物。这类动物可以包括非人灵长类动物、大型猫科动物、狼和熊。在优选实施方案中,该动物为实验动物。实验动物的非限制性实例可以包括啮齿动物、犬科动物、猫科动物和非人灵长类动物。在某些实施方案中,该动物是啮齿动物。啮齿动物的非限制性实例可以包括小鼠、大鼠、豚鼠等。无菌动物的基因型可能也可以因动物的预期用途而异。在动物为小鼠的实施方案中,该小鼠可为C57BL/6

小鼠、Balb/c小鼠、129sv小鼠、GL261荷瘤小鼠、D54荷瘤小鼠或任何其他实验室品系。

[0115] (b) 肿瘤

[0116] 本发明的抗体可用于治疗或识别衍生自赘生物或癌症的肿瘤。赘生物可能是恶性的或良性的,癌症可以是原发性的或转移性的;赘生物或癌症可以是早期或晚期。可治疗的赘生物或癌症的非限制性实例包括急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤(儿童小脑或脑)、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干胶质瘤、脑肿瘤(小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤(supratentorial primitive neuroectodermal tumor)、视觉通路和下丘脑胶质瘤)、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌(carcinoid)、脑膜瘤、伯基特淋巴瘤、类癌(儿童期、胃肠道),未知原发性癌症、中枢神经系统淋巴瘤(原发性)、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性骨髓增生性障碍、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤因肿瘤家族中的尤因肉瘤、颅外生殖细胞瘤(儿童)、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌(眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤)、胆囊癌、胃癌(gastric (stomach) cancer)、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤、生殖细胞瘤(儿童颅外、性腺外、卵巢)、妊娠滋养层肿瘤、胶质瘤(成人、儿童脑干、儿童脑星形细胞瘤、儿童视觉通路和下丘脑)、胃类癌、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌(肝癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视觉通路胶质瘤(儿童期)、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、白血病(急性淋巴细胞性、急性髓细胞性、慢性淋巴细胞性、慢性髓细胞性、毛细胞)、唇癌和口腔癌、肝癌(原发性)、肺癌(非小细胞、小细胞)、淋巴瘤(AIDS相关、伯基特、皮肤T细胞、霍奇金、非霍奇金、原发性中枢神经系统)、巨球蛋白血症(**Waldenström**)、骨/骨肉瘤恶性纤维组织细胞瘤、髓母细胞瘤(儿童期)、黑色素瘤、眼内黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤(成人恶性、儿童期)、转移性鳞状颈癌伴隐匿原发性、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征(儿童期)、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、髓系白血病(慢性),髓系白血病(成人急性、儿童急性)、多发性骨髓瘤、骨髓增生性障碍(慢性)、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮间质瘤)、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰腺癌(胰岛细胞)、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤、松叶母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤(儿童期)、垂体腺瘤、浆细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤(儿童期)、涎腺癌、肉瘤(尤因肿瘤家族、卡波西、软组织、子宫)、塞泽里综合征、皮肤癌(非黑色素瘤、黑色素瘤)、皮肤癌(默克尔细胞)、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、颈鳞癌伴隐匿原发性(转移性)、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤(儿童期)、T细胞淋巴瘤(皮肤)、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤(儿童期)、胸腺瘤(thymoma)和胸腺癌(thymic carcinoma)、甲状腺癌、甲状腺癌(儿童期)、肾盂和输尿管移行细胞癌、滋养层肿瘤(妊娠期)、未知原发部位(成人、儿童期)、输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫癌(子宫内膜癌)、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤(儿童期)、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和肾母细胞瘤(儿童期)。在优选实施方案

中,该赘生物或癌症为非小细胞肺癌。

[0117] (c) 施用

[0118] 在某些方面,可对受试者施用本发明的抗体(包括免疫反应性片段)的药理学有效量。使用标准有效技术进行施用,包括外周或局部施用。外周施用包括但不限于静脉内、腹腔内、皮下、肺部、经皮、肌肉内、鼻内、口腔、舌下或栓剂施用。局部施用包括直接施用到相关解剖部位,例如,直接施用到中枢神经系统(CNS),其包括但不限于通过腰椎、脑室或脑实质内导管或使用手术植入的控释制剂。在一些实施方案中,本文所公开的抗原结合肽与聚焦超声联合使用。聚焦超声是一种早期的、非侵入性的治疗技术,通过使用超声波能量靶向身体深处的组织而无需切口或辐射,有可能改变许多医学疾病的治疗。高强度聚焦超声(HIFU)是一种利用非电离超声波加热组织的非侵入性治疗技术。HIFU可以通过多种机制增加血液或淋巴流量,或破坏组织,如肿瘤。HIFU可以与医学超声或MRI等其他成像技术相结合,使得能够指导治疗和监测。

[0119] 用于有效施用的药物组合物故意设计为适合所选施用模式,并根据需要使用可药用赋形剂,如相容的分散剂、缓冲剂、表面活性剂、防腐剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 16Ed ISBN: 0-912734-04-3, 最新版本提供了从业人员普遍了解的制剂技术概要,在此以其整体引入作为参考。例如通过将其包封在脂质体中或通过封闭极性基团来改变在这一发现中有用的抗体的溶解度特征,使其更亲脂,可能特别有用。

[0120] 通过静脉、腹腔或皮下注射进行有效的外周全身递送是对活体患者施用的优选方法。这种注射的适宜载体很简单。然而,除此之外,也可以通过鼻气溶胶或栓剂通过黏膜进行施用。适于这种施用方式的制剂是众所周知的,通常包括促进跨膜转移的表面活性剂。此类表面活性剂通常衍生自类固醇或为阳离子脂质,如N-[1-(2,3-二油基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)或多种化合物,如胆固醇半琥珀酸酯、磷脂酰甘油等。本公开的组合物还可包括螯合剂,如在非限制性实例中,四羧酸(DOTA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N"-三乙酸(NOTA)和去铁胺。

[0121] 待施用的制剂中抗体的浓度为有效量,范围为低至约0.1%(按重量计)至高达约15%或约20%(按重量计),主要根据液体体积、黏度等,根据需要按照所选择的具体施用模式进行选择。对活体患者注射的典型组合物可配制成含有1ml磷酸缓冲盐溶液的无菌缓冲水和约1-1000mg本发现的人源化抗体中的任何一种或其组合。在制备制剂后,可对制剂进行无菌过滤,或以其他方式使其在微生物学上可接受。用于静脉输注的典型组合物的体积可在1-250mL液体(如无菌林格溶液)之间,抗GRP78抗体浓度为1-100mg/ml或更高。本发现的治疗剂可冷冻或冻干储存,并在使用前在合适的无菌载体中重构。冻干和重构可能导致不同程度的抗体活性损失(例如,对于常规免疫球蛋白,IgM抗体的活性损失往往大于IgG抗体)。施用剂量为有效剂量,可能需要调整以补偿。制剂的pH值通常为药品级质量,将进行选择,以平衡抗体稳定性(化学和物理)和施用患者的舒适度。一般来说,pH值在4到8之间是可以耐受的。剂量因个体而异,取决于接受成功施用的个体的体型、体重和其他生理生物学特征。

[0122] 本文所用的术语“有效量”是指对施用该物质的受试者产生可测量且有益的影响(即显著疗效)的物质(如化合物)的量。根据这一发现施用的化合物的有效量或剂量将取决

于病例周围的情况,包括所施用的化合物、施用途径、正在治疗的症状的状态以及类似的患者和施用情况等考虑因素。

[0123] 在一些实施方案中,当抗体是标记有⁶⁴Cu或锆的抗GRP78时,给药剂量可为约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、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019、0.02、0.021、0.022、0.023、0.023、0.023、0.024、0.014、0.014、0.015、0.039、0.028、0.031、0.028、0.028、0.031、0.028、0.027、0.028、0.021、0.027、0.028、0.031、0.027、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、0.094、0.095、0.096、0.097、0.098、0.099或约0.1rem/mCi。

[0124] 根据有效治疗症状的需要,给药频率可以是每天或每周或每月一次、两次、三次或更多。与疾病本身相关的治疗的施用时间和治疗持续时间将取决于病例周围的情况。可以立即开始治疗,如由急救医务人员在受伤的场所施用。治疗可以在医院或诊所本身开始,或者也可以在出院后或在门诊就诊后开始。治疗的持续时间可以从一次性单剂量使用到终生治疗。

[0125] 尽管上述方法通过适当的修改似乎是最方便、最合适、最有效的蛋白质(如抗体)的施用方法,但如果本文使用了适当的制剂,则可采用其他有效的施用技术,如脑室内施用、经皮施用和口服施用。

[0126] 此外,可希望采用使用可生物降解薄膜和基质的控释制剂、或渗透微型泵,或基于葡聚糖珠、藻酸盐或胶原蛋白的递送系统。

[0127] 典型剂量水平可使用标准临床技术确定和优化,并取决于施用方式。

[0128] 定义

[0129] 本文所用的“抗体”指特异性识别GRP78的免疫球蛋白衍生分子。本发明的抗体可以是全长抗体(IgM、IgG、IgA、IgE)或者可以是抗体片段(Fab、F(ab')₂、scFv)。抗体可以是嵌合的,也可以是人源化的。

[0130] 本文所用的“CDR”指“互补决定区”。CDR也可以称为高变区。

[0131] 本文所用的“轻链”是抗体的小多肽亚单位。典型的抗体包含两条轻链和两条重链。

[0132] 本文所用的“重链”是抗体的大多肽亚单位。抗体的重链包含一系列免疫球蛋白结构域,具有至少一个可变结构域和至少一个恒定结构域。

[0133] 本文所用的“人源化”是指使用重组DNA产生单克隆抗体的过程,以产生能够在人细胞培养物中表达的构建体。用于产生这些构建体的任何已知技术对本发明的目的都有效。

[0134] 本文所用的“单链可变片段”或“scFv”或“scFvs”是指通过接头连接的免疫球蛋白重链和轻链的可变区的融合蛋白。在一些实施方案中,该接头是约10至25个氨基酸的肽。

[0135] 用于本发明目的的“治疗剂”是指减少肿瘤生长、任何相关癌症生长或减少与癌细

胞生长相关症状的治疗剂。优选与本发明的抗体缀合的治疗剂优选为生物制剂、药物制剂或化学制剂。上文描述了可适合在本发明中使用的治疗剂的非限制性列表。

[0136] 本文所用的“成像剂”指可用于定位并产生癌细胞生长或肿瘤的图像的任何试剂。上文描述了可适合在本发明中使用的成像剂的非限制性列表。

实施例

[0137] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解，以下实施例中公开的技术代表了发明人发现的在实施本发明中发挥良好作用的技术，因此可以视为构成其实施的优选模式。然而，根据本公开，本领域技术人员应当理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可以在所公开的具体实施例中进行许多改变，并且仍然获得同样或类似的结果。

[0138] 实施例1

[0139] 产生了抗GRP78的单克隆抗体，并命名为6F8和7A9。抗原序列为SEQ ID NO:53 (CISKLYGSAGPPPTGEEDTAE (c端肽))。使用肽KLH缀合物和宿主品系BALB/c小鼠产生免疫原。6F8抗体包含SEQ ID NO:15 (减去前导序列)的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:16 (减去前导序列)的轻链可变区氨基酸序列。7A9抗体包含SEQ ID NO:13 (减去前导序列)的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:14 (减去前导序列)的轻链可变区氨基酸序列。

[0140] 使用宿主品系BALB/c小鼠，用GRP78蛋白作为抗原/免疫原，进行小鼠杂交瘤产生(4A609和4A4A4)。最后，使用生物淘选肽序列SEQ ID NO:54 (ISKLYGSAGPPPTGEEDTAE (c端肽))产生人scFv (1154、1164、1171、1183)。

[0141] 图1显示了显示ELISA测定法中抗GRP78小鼠单克隆抗体与C端GRP78肽结合的图。图2显示ELISA测定法中抗GRP78小鼠单克隆抗体与GRP78蛋白的结合。

[0142] GRP78抗体的细胞表面结合：方法：照射：3Gy-3次(间隔6h和12h)；每个染色组150,000个细胞；多种第一抗体染色(1h)；第二抗体染色：Alexafluor 488抗小鼠IgG(1h)；流式细胞仪获取数据；在获取前立即向每个样本添加PI；对活细胞进行门控，获得10,000个事件。图3显示了GRP78抗体在NSCLC上的细胞表面结合。抗体4A4A4和4A609的浓度为30ug/ml。

[0143] 从GRP78的c端合成了七种肽。每种肽是具有5个氨基酸重叠的12聚体。肽的序列如上文所示。将每种肽一式两份包被在硝酸纤维素膜上，并与7A9抗体孵育。洗涤后，用化学发光法产生印迹。箭头表示阳性斑点，如图4所示。7A9表位：SEQ ID NO:70 (ISKLYGSA·····EDTAE)。图5A-5B，使用Biacore T200进行6F8抗体的表位定位。将6F8固定在CM5传感芯片上，并使肽86-90 (6F8的免疫原区中的重叠肽)作为分析物流过。使用BIAevaluation软件分析每种肽对6F8的相对结合反应(从6F8固定化通道减去空白通道上的反应)。非结合肽的截止值为0RU。GRP78蛋白质的三维模型以洋红色指示蛋白质上的表位序列。该图是使用Pymol软件产生的。

[0144] 图6A-6B，使用Biacore T200进行7A9抗体的表位定位。将7A9固定在CM5传感芯片上，并使肽86-90 (7A9的免疫原区中的重叠肽)作为分析物流过。使用BIAevaluation软件分析每种肽对7A9的相对结合反应(从7A9固定化通道减去空白通道上的反应)。非结合肽的截止值为0RU。GRP78蛋白的三维模型以红色显示蛋白质上的表位序列。该图是使用Pymol软件产生的。

[0145] 对6F8抗体与A549细胞的细胞表面结合进行了流式细胞术测定(图7A-7B)。结合条件: 0.1×10^6 个细胞与从 $2.22 \mu\text{M}$ 开始3倍稀释的抗体孵育。用FACS缓冲液洗涤细胞2次。第二抗体染色。洗涤两次,在FACS缓冲液中通过流式细胞仪FACS Canto II (BD) 分析。使用Graphpad Prism软件中的“单位点特异性结合”拟合几何平均荧光强度。显示使用Graphpad Prism软件(图7B)中的“Sigmoidal, 4PL, X是log(浓度)”拟合与A中相同的数据的图。

[0146] 对6F8与A549细胞的细胞表面结合进行了流式细胞术,结果如图8A-8B所示。图9A-9B和图10中显示了6F8与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术。图11A-11B和图12中显示了7A9抗体与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术。

[0147] 在裸鼠后肢注射A549肿瘤。6F8和7A9抗体用IR染料800 (Licor) 标记。在尾静脉注射每种抗体40ug,每天使用Pearl成像仪成像。图13中显示了用GRP78单克隆抗体进行的全身NIR成像(未经照射的肿瘤)。

[0148] 在裸鼠后肢注射A549肿瘤。6F8和7A9抗体用IR染料800 (Licor) 标记。在尾静脉注射每种抗体40ug,每天使用Pearl成像仪成像。在抗体注射后第7天,对小鼠实施安乐死,采集所有器官,并用Pearl成像仪成像。图14A显示了所收获的A549肿瘤的图像。图14B条形图显示每克所采集的肿瘤的信号强度。图14C显示各器官每gm重量的信号强度。

[0149] 将A549细胞接种到室载玻片中。GRP78抗体按照厂家的流程用pHRodo iFL红色染料(Thermo Scientific) 标记并添加到细胞中。 37°C 孵育24小时后,用PBS洗涤载玻片,并用NucBlue live stain染色来对细胞核进行染色。图像是在倒置荧光显微镜(蔡司)中拍摄的。红色点状染色的存在表明抗体在胞内酸性室中的内吞作用。图15所示的A549细胞中GRP78单克隆抗体的内化。

[0150] 对于斑点印迹(图16),将重组GRP78全长蛋白一式两份涂斑点到硝酸纤维素膜上。封闭后,将印迹与抗GRP78 scFv-Fc 1171和1183孵育。使用抗人Fc-HRP缀合抗体检测scFv-Fc与重组GRP78蛋白的结合。

[0151] 抗GRP78 scFV 1171-Fc与重组全长GRP78蛋白结合亲和力的Biacore分析。scFv1171-Fc的最高浓度为500nM,随后进行两倍系列稀释。结合速率、解离速率和解离常数如表所示(图17)。抗GRP78 scFV 1171-Fc与重组全长GRP78蛋白结合亲和力的Biacore分析。scFv1183-Fc的最高浓度为500nM,随后进行两倍系列稀释。结合速率、解离速率和解离常数如表所示(图18)。A549细胞假处理或用3个剂量的3Gy照射。收集细胞,并用指定浓度的scFV-Fc1171抗体孵育。显示了代表性叠加直方图(蓝色:第二抗体对照;红色:scFv-Fc1171)(图19)。scFv-Fc1171抗体与经照射的A549细胞的细胞表面结合的流式细胞术测定。结合条件: 0.1×10^6 个细胞与从100nM开始4倍稀释的抗体孵育。用FACS缓冲液洗涤细胞2次。第二抗体染色。洗涤两次,在FACS缓冲液中通过流式细胞仪FACS Canto II (BD) 分析。使用GraphPad Prism软件中的单位点特异性结合拟合几何平均荧光强度(图20)。

[0152] 将A549细胞假处理或用3个剂量的3Gy照射。收集细胞,并与指定浓度的Fc阴性对照孵育。显示了代表性叠加直方图(蓝色:第二抗体对照;红色:Fc阴性对照)(图21)。A549细胞假处理或用3个剂量的3Gy照射。scFv-Fc 1171用pHRodo red pH敏感染料标记,该染料在酸性细胞室中发出红色荧光。白色箭头表示内化的抗体(图22)。

[0153] 使用集落形成测定法的scFv-Fc 1171对A549细胞的剂量依赖性影响。接种细胞并在第二天用2Gy照射。以2种不同浓度添加scFv-Fc 1171或Fc对照。接下来的一天再给以另

一个剂量的2Gy。计数集落并对存活分数作图。采用双因素方差分析进行统计分析。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (图23)。使用集落形成测定法测定scFv-Fc 1171对H460细胞的影响。接种细胞并在第二天用2Gy照射。以2种不同浓度添加scFv-Fc 1171或Fc对照。接下来的一天再给以另一个剂量的2Gy。计数集落并对存活分数作图。与照射联合使用scFvFc1171,观察到存活分数逐渐下降的趋势(图24)。

序列表

<110> 华盛顿大学
 <120> 抗 GRP78 抗体及其使用方法
 <130> 047563-658405
 <150> 62/874,791
 <151> 2019-07-16
 <160> 76
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 1
 Ile Asn Ala Met Asn
 1 5
 <210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 2
 Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Asp

 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 3
 Asp Ile Thr Arg Ala Gly Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 4

[0001]

[0002]

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

Thr Ser Ala Met Asn

1 5

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Arg Ile Arg Ser Lys Asn Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的
 <400> 9
 Pro Pro Gly Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 10
 Arg Thr Ser Gln Glu Ile Ser Gly His Leu Ser
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 11
 [0003] Ala Ala Ser Ser Leu Asp Ser
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 12
 Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 13
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Phe Asn Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Asp Ile Thr Arg Ala Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 14
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 14
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met
 20 25 30
 [0004] His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 <210> 15
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asn Thr Ser
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45	
	Gly Arg Ile Arg Ser Lys Asn Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp			
	50	55	60	
	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met			
	65	70	75	80
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr			
		85	90	95
	Tyr Cys Val Arg Pro Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110	
	Val Thr Val Ser Ala			
	115			
	<210> 16			
	<211> 107			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 16			
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
	1	5	10	15
	Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Thr Ser Gln Glu Ile Ser Gly His			
		20	25	30
[0005]	Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile			
		35	40	45
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
	Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser			
	65	70	75	80
	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr			
		85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105		
	<210> 17			
	<211> 363			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 17			
	gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc			60
	tcatgtgcag tctctggaat caccttcaat atcaatgcca tgaactgggt cgcagcagct			120
	ccaggaaagg gtttggaaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaaca			180
	tattatgccg attcagtgaa ggacaggttc accatctcca gagatgattc acaaagcatg			240
	ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgaga			300

	gatataactc gggccgggta cttegatgtc tggggcgag ggaccacggt caccgtctcc	360
	tca	363
	<210> 18	
	<211> 318	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 18	
	caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
	ataacctgca gtgccagctc aagtgttaatt tacatgcaact ggttccagca gaagccaggc	120
	acttctccca aactctggat ttatagcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc	180
	ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa	240
	gatgctgcca cttattactg ccagcaaagg agtagttatc cgctcacgtt cgggtgctggg	300
	accaagctgg agctgaaa	318
	<210> 19	
	<211> 351	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 19	
[0006]	gagggtgcagc ttgttgagtc tgggtggagga ttggtgcggc ctaaagggtc attgaaactc	60
	tcatgtgcag cctctggatt caccctcaat acctccgcca tgaactgggt cgcagcagtt	120
	ccaggaagg gtttggaatg ggttggtcgc ataagaagta aaaattataa ttatgcaaca	180
	tattatgccg attcagtgaa agacaggttc accattttca gagatgattc acaaaacatg	240
	ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgagg	300
	cccccggtt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc a	351
	<210> 20	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 20	
	gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt	60
	ctcacttgtc ggacaagtca ggaaattagt ggtcacttaa gctggettca gcagaaacca	120
	gatggaacta ttaaaccctt gatctacgcc gcatccagtt tagattctgg tgtcccaaaa	180
	aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag ccttgagtct	240
	gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattctagtt atccgtacac gttcggaggg	300
	gggaccaage tggaaataaa a	321
	<210> 21	
	<211> 8	
	<212> PRT	

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 21
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 22
 Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 23
 [0007] Ala Arg Asp Pro Pro Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Arg Gly Ser Asp
 1 5 10 15
 Trp Phe Asp Pro
 20
 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 24
 Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr
 1 5
 <210> 25
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 25
 Glu Asp Asn
 1

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 26
 Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Asn Gly Val
 1 5
 <210> 27
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 27
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Pro Pro Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Arg Gly Ser Asp
 100 105 110
 Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 <210> 28
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 28
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

[0008]

1 5
 <210> 33
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 33
 Gly Asp Ser
 1
 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 34
 Gln Val Trp Asp Ser Asn Ser Asp His Pro Phe Val
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 35
 Trp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Asn Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gln Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser
 115
 <210> 36
 <211> 109

[0010]

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 36
 Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Met Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val His
 35 40 45
 Gly Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Arg
 50 55 60
 Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Asn Ser Asp His
 85 90 95
 Pro Phe Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

Gly Gly Thr Phe Ser Asn Pro Val
 1 5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

Ile Ile Thr Met Phe Gly Thr Thr
 1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

[0011]

[0012]

Ala Lys Asp Pro Pro Met Phe Asp Tyr

1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

Asp Ala Ser

1

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Ala Leu Thr

1 5 10

<210> 43

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asn Pro

20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Thr Met Phe Gly Thr Thr Tyr Tyr Gly Asn Ser Val

50 55 60

<400> 46
 Ile Tyr Thr Ser Gly Arg Thr
 1 5
 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 47
 Ala Arg Asp Arg Gln Gly Pro Asp Tyr
 1 5
 <210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 48
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5
 [0014] <210> 49
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 49
 Ala Ala Ser
 1
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 50
 Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 51
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成的
 <400> 51
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Arg Tyr
 20 25 30
 Phe Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Thr Ser Gly Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 50 55 60
 Val Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Arg Gln Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser

[0015]

<210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 52
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 53
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

20 25 30
 Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Phe
 35 40 45
 Asn Ile Asn Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Ile Thr Arg Ala Gly Tyr Phe Asp
 115 120 125
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 62

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 62

[0019]

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ile Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
 50 55 60
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
 100 105 110
 Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 63
 Glu Glu Lys Ile Glu Trp Leu Glu Ser His Gln Asp
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 64
 Glu Ser His Gln Asp Ala Asp Ile Glu Asp Phe Lys
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 65
 Ile Glu Asp Phe Lys Ala Lys Lys Lys Glu Leu Glu
 1 5 10
 [0020] <210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 66
 Lys Lys Glu Leu Glu Glu Ile Val Gln Pro Ile Ile
 1 5 10
 <210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 67
 Val Gln Pro Ile Ile Ser Lys Leu Tyr Gly Ser Ala
 1 5 10
 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成的
 <400> 68
 Leu Tyr Gly Ser Ala Gly Pro Pro Pro Thr Gly Glu
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 69
 Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Lys Asp
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 70
 Ile Ser Lys Leu Tyr Gly Ser Ala Glu Asp Thr Ala Glu
 1 5 10
 [0021] <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 71
 Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu
 1 5 10
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可以是任一疏水性氨基酸或任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> Xaa 可以是任一极性中性侧链氨基酸
 <400> 72
 Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala Ala Met Asn
 1 5
 <210> 73
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 可以是任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa 可以是任一疏水性氨基酸或任一极性中性侧链氨基酸
 <400> 73
 Arg Ile Arg Ser Lys Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala Asn Tyr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15
 [0022] Tyr Ala Asp Ser Asn Lys Asp
 20
 <210> 74
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 可以是任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

- <223> Xaa 可以是任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14).. (14)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18).. (18)
 <223> Xaa 可以是任一疏水性或极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21).. (21)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25).. (25)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28).. (28)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <400> 74
 [0023] Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala Ser Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala
 1 5 10 15
 Ile Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala His Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala
 20 25 30
 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1).. (1)
 <223> Xaa 可以是任一疏水性氨基酸或任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa 可以是任一疏水性氨基酸或任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8).. (8)
 <223> Xaa 可以是任一极性中性侧链氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <400> 75
 Xaa Ala Ala Xaa Ala Ala Ser Xaa Ala Ala Leu Xaa Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 [0024] <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 可以是任一疏水性氨基酸或任一极性中性侧链氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 可以是任一天然存在的氨基酸
 <400> 76
 Xaa Gln Xaa Ser Ser Tyr Pro Xaa Thr
 1 5

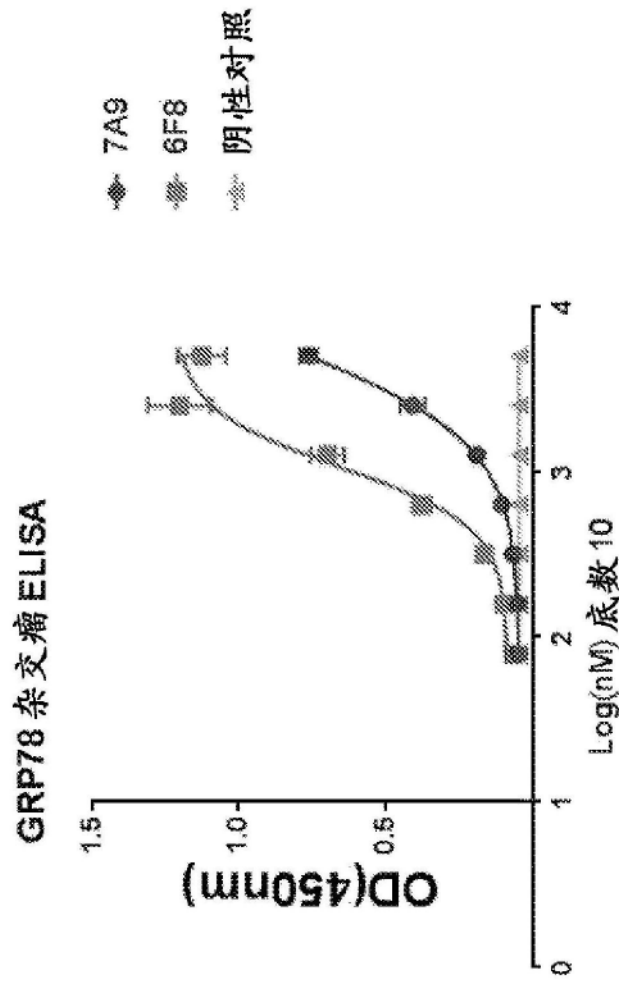


图1

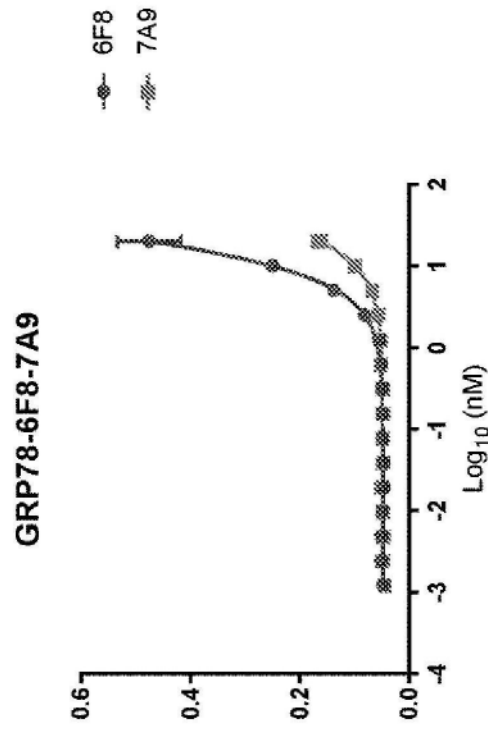


图2

GRP78抗体在NSCLC上的细胞表面结合

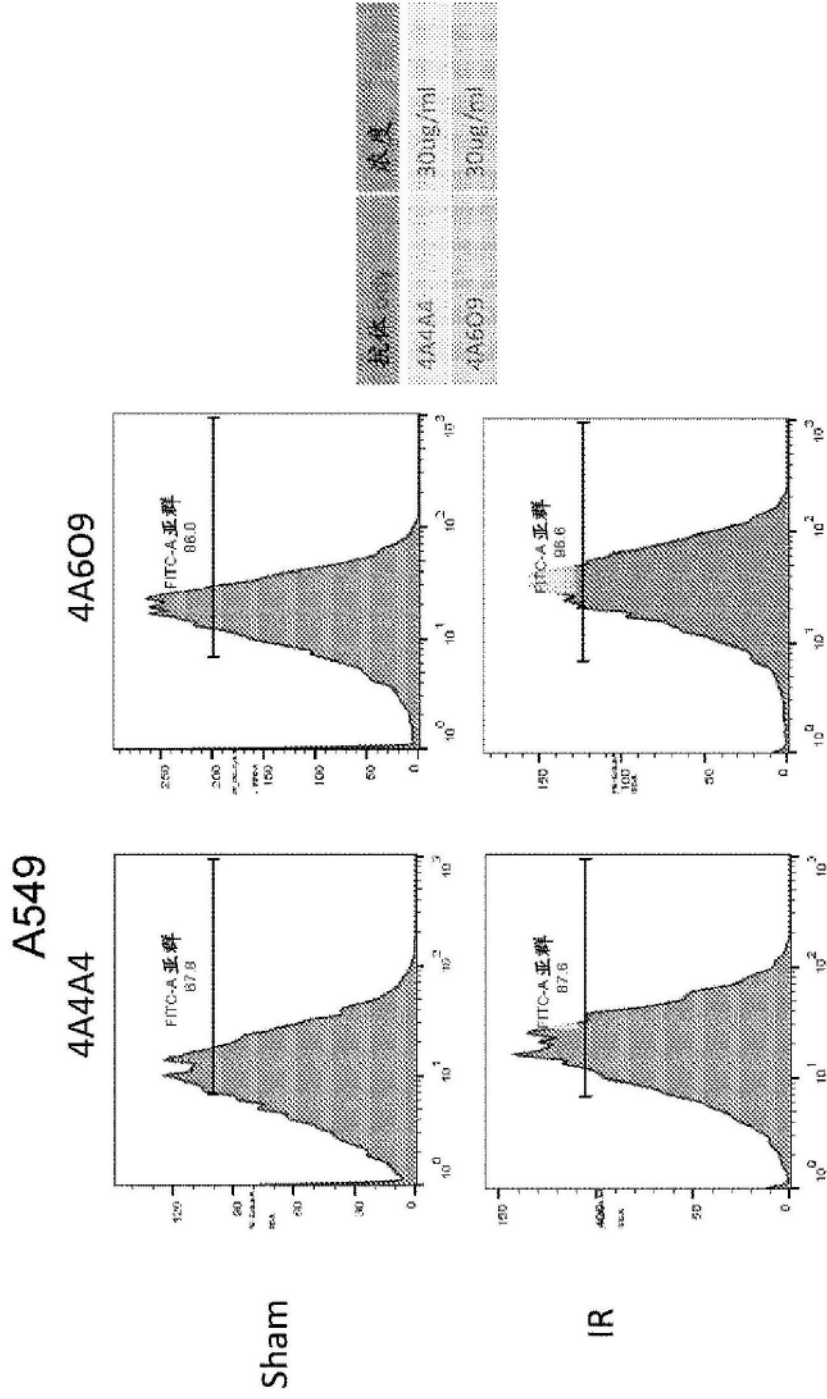
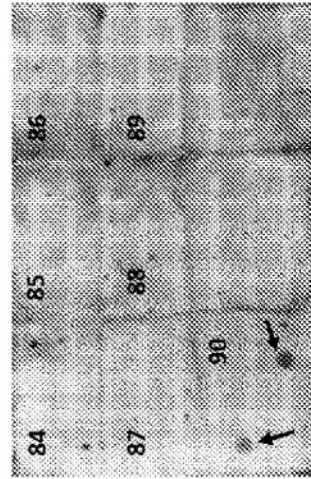


图3

GRP78抗体的表位图谱

7A9



- 肽序列
- 84. EEKIEWLESHQD
 - 85. ESHQDADIEDFK
 - 86. IEDFKAKKKELE
 - 87. KKELEEIVQPII
 - 88. VQPIISKLYGSA
 - 89. LYGSAGPPPTGE
 - 90. PPTGEEDTAEKD

图4

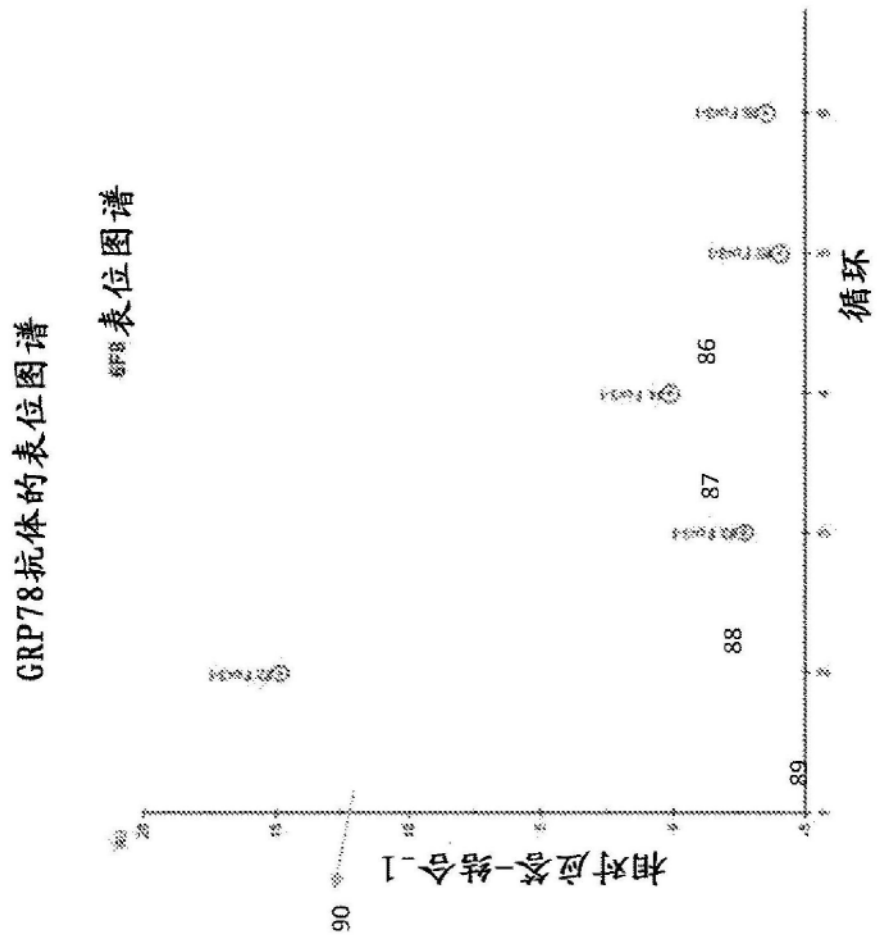


图5A

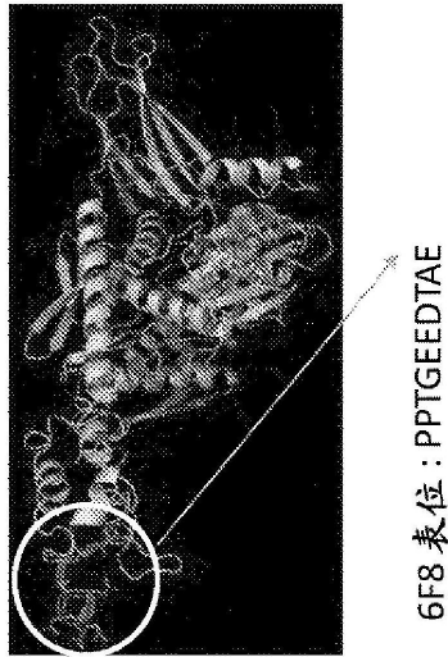


图5B

GRP78抗体的表位图谱

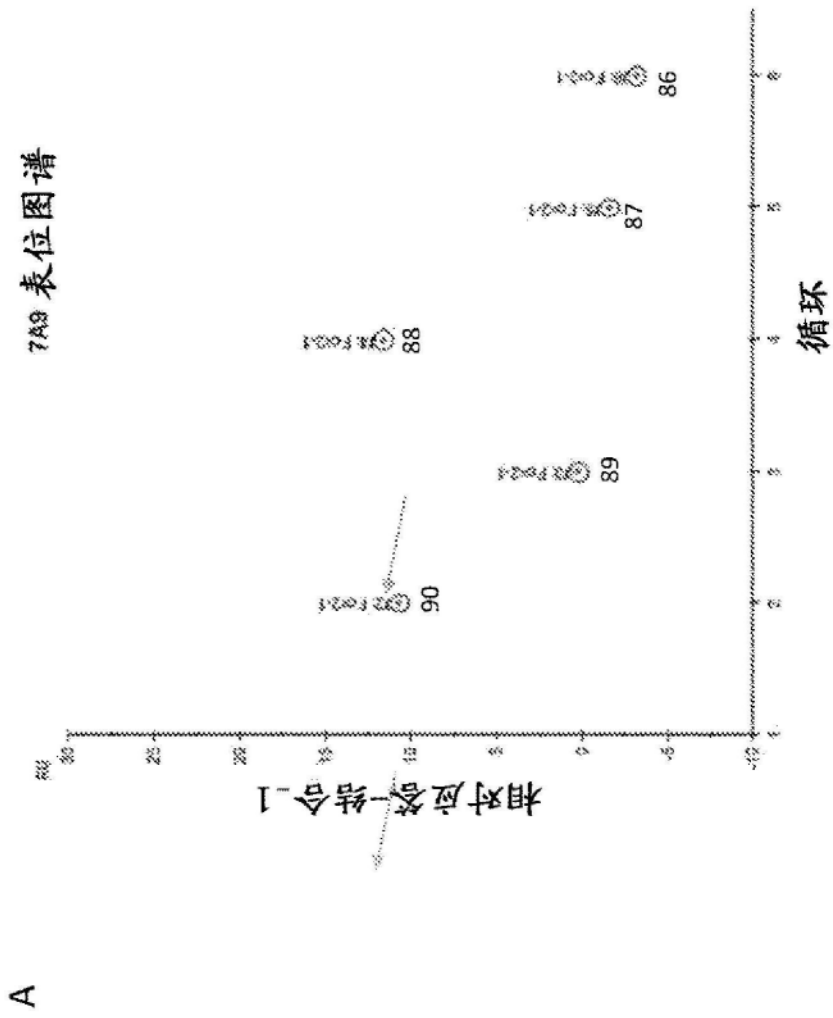


图6A

GRP78抗体的细胞表面结合的流式细胞术

A549_6F8抗体

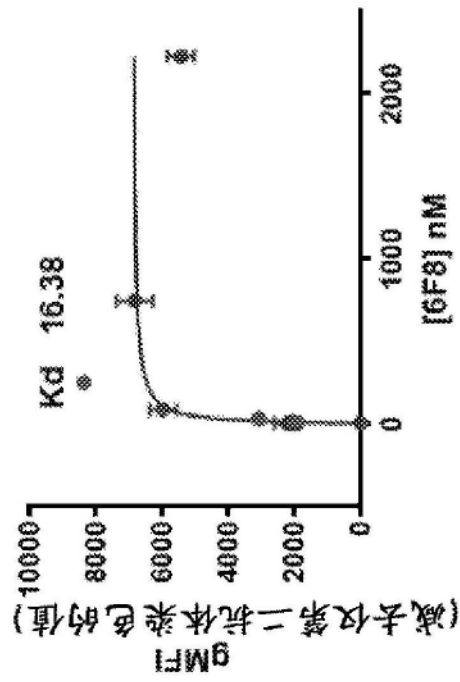
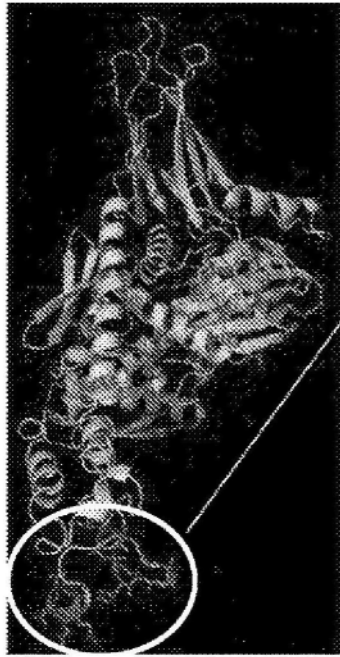


图7A

GRP78抗体的表位图谱



7A9表位: ISKLYGSA .EDTAE

图6B

GRP78抗体的细胞表面结合的流式细胞术

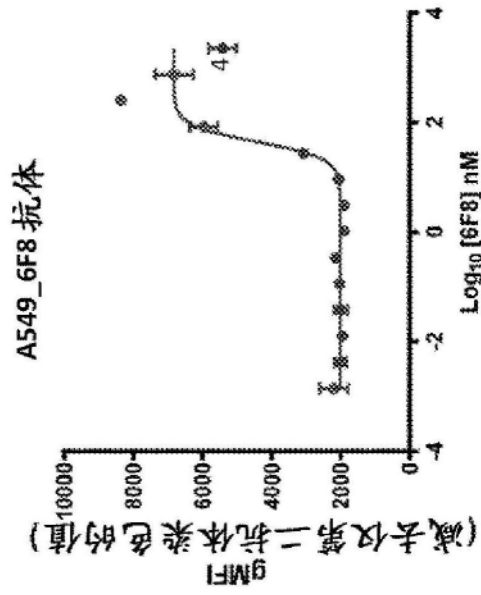


图7B

6F8与A549细胞的细胞表面结合的流式细胞术

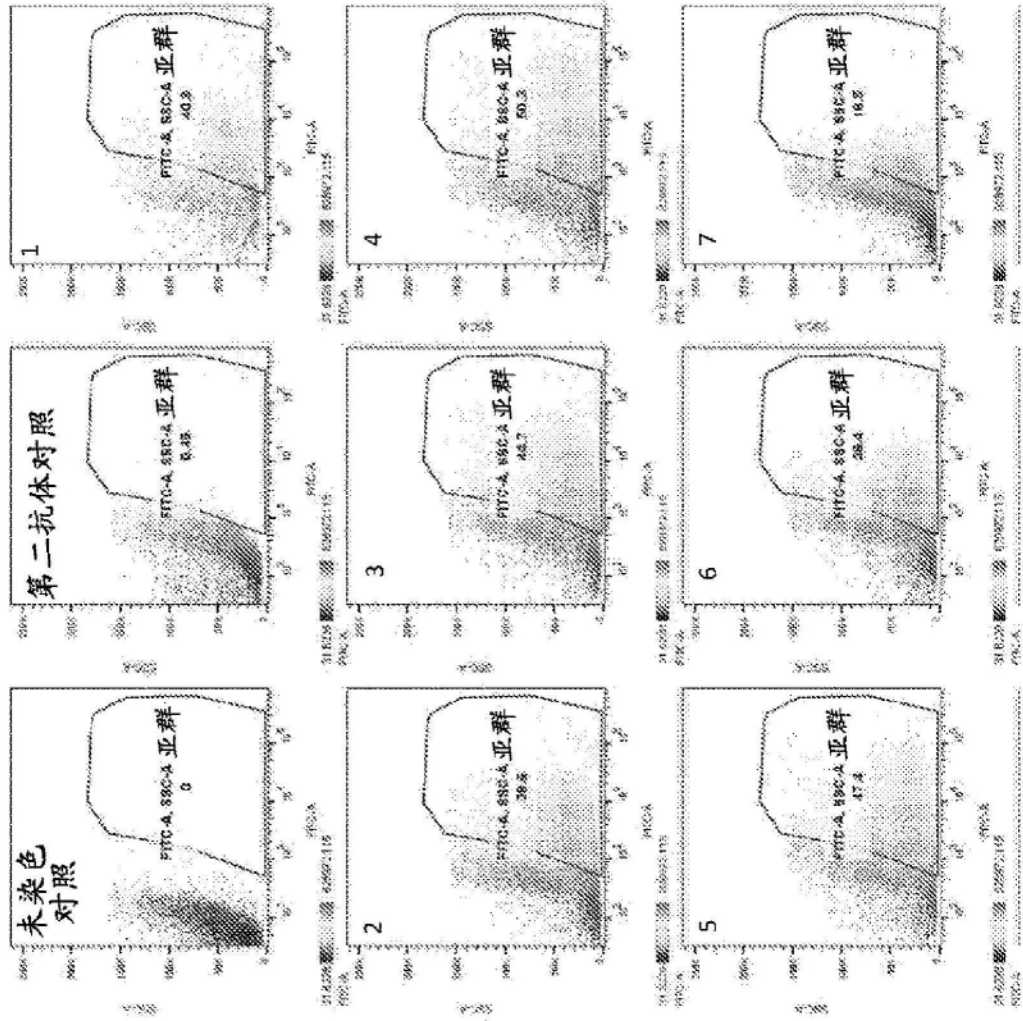


图8A

6F8与A549细胞的细胞表面结合的流式细胞术

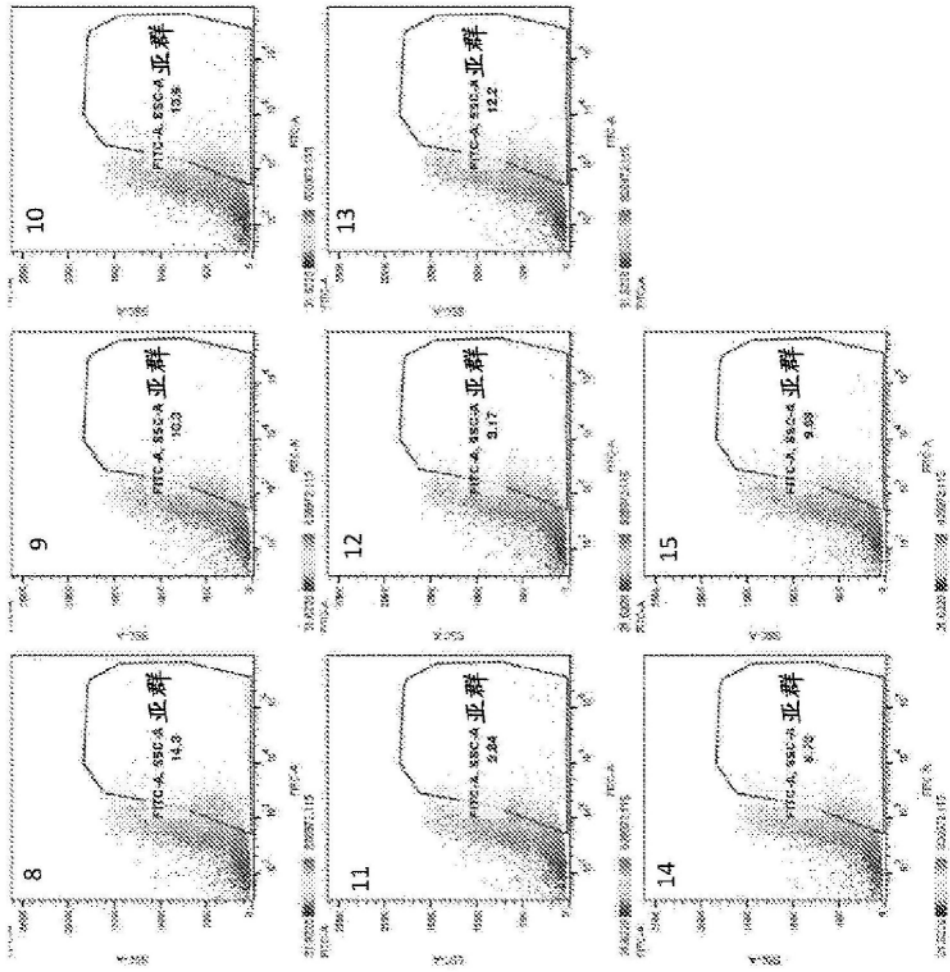


图8B

6F8与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术

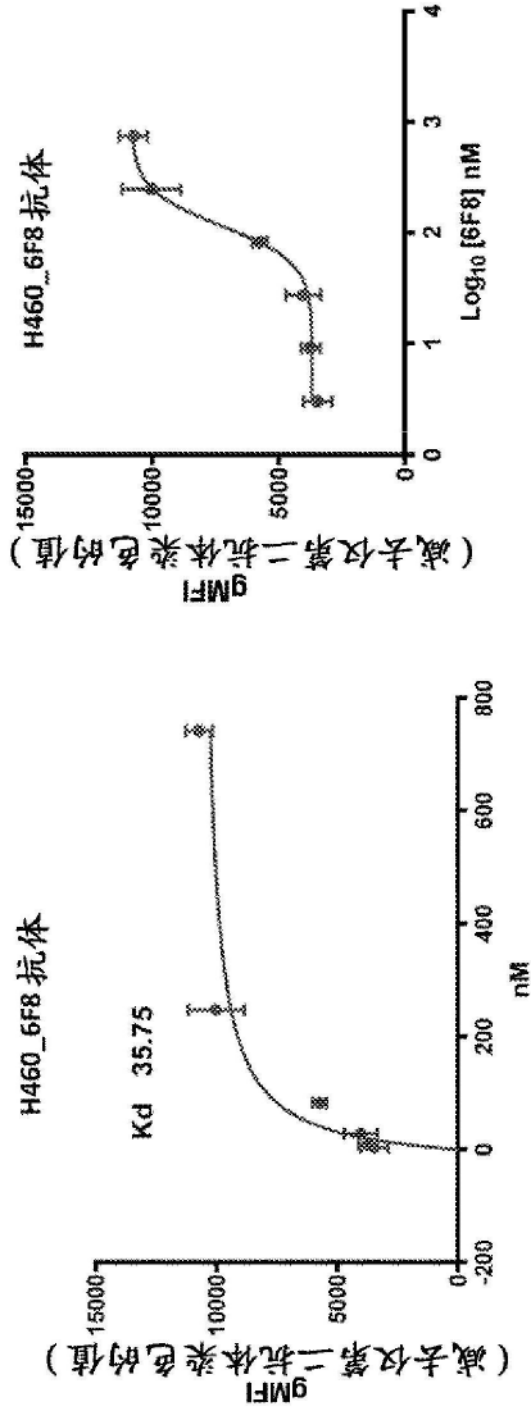


图9A-9B

6F8与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术

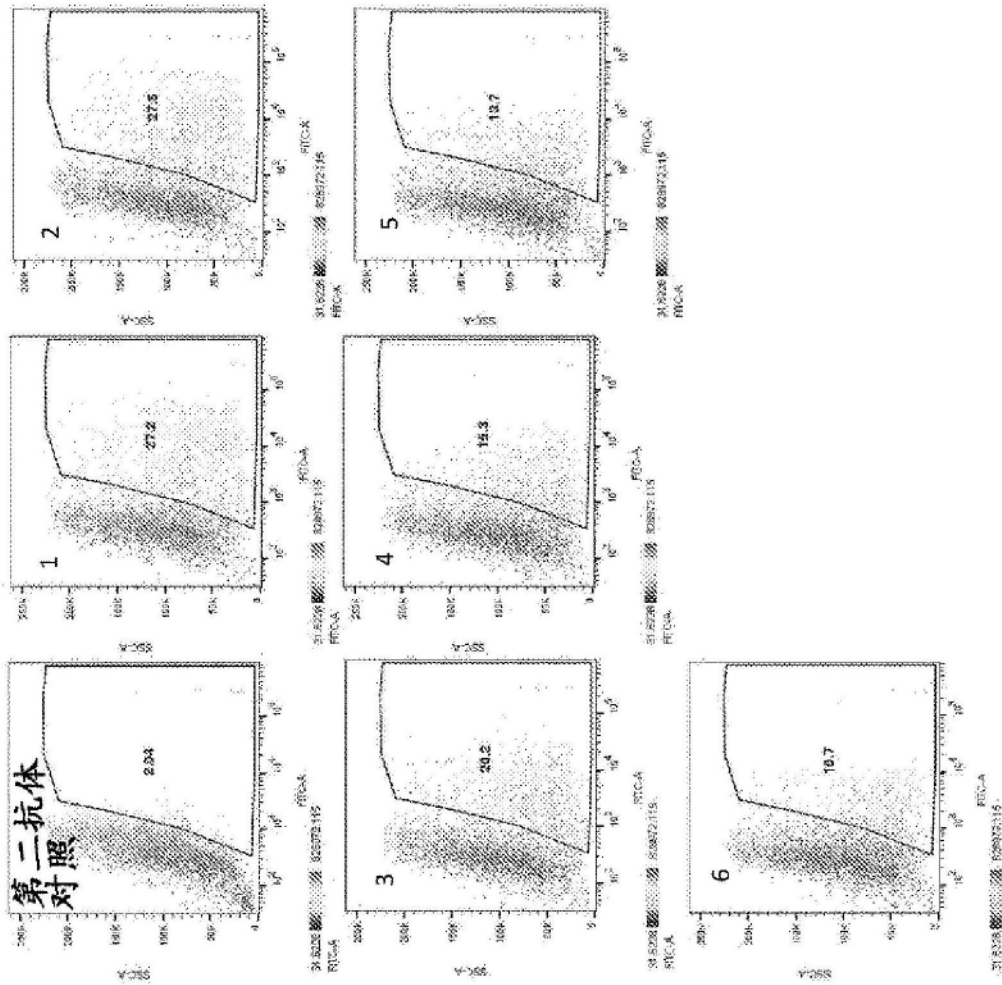


图10

7A9抗体与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术

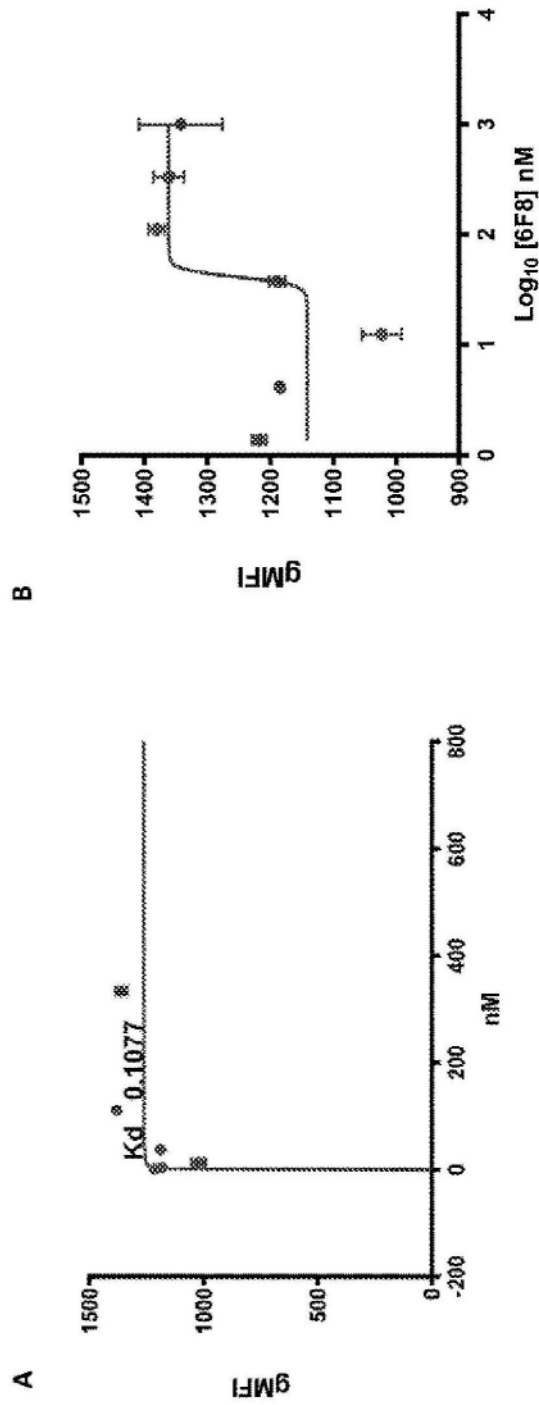


图11A-11B

7A9抗体与H460细胞的细胞表面结合的流式细胞术

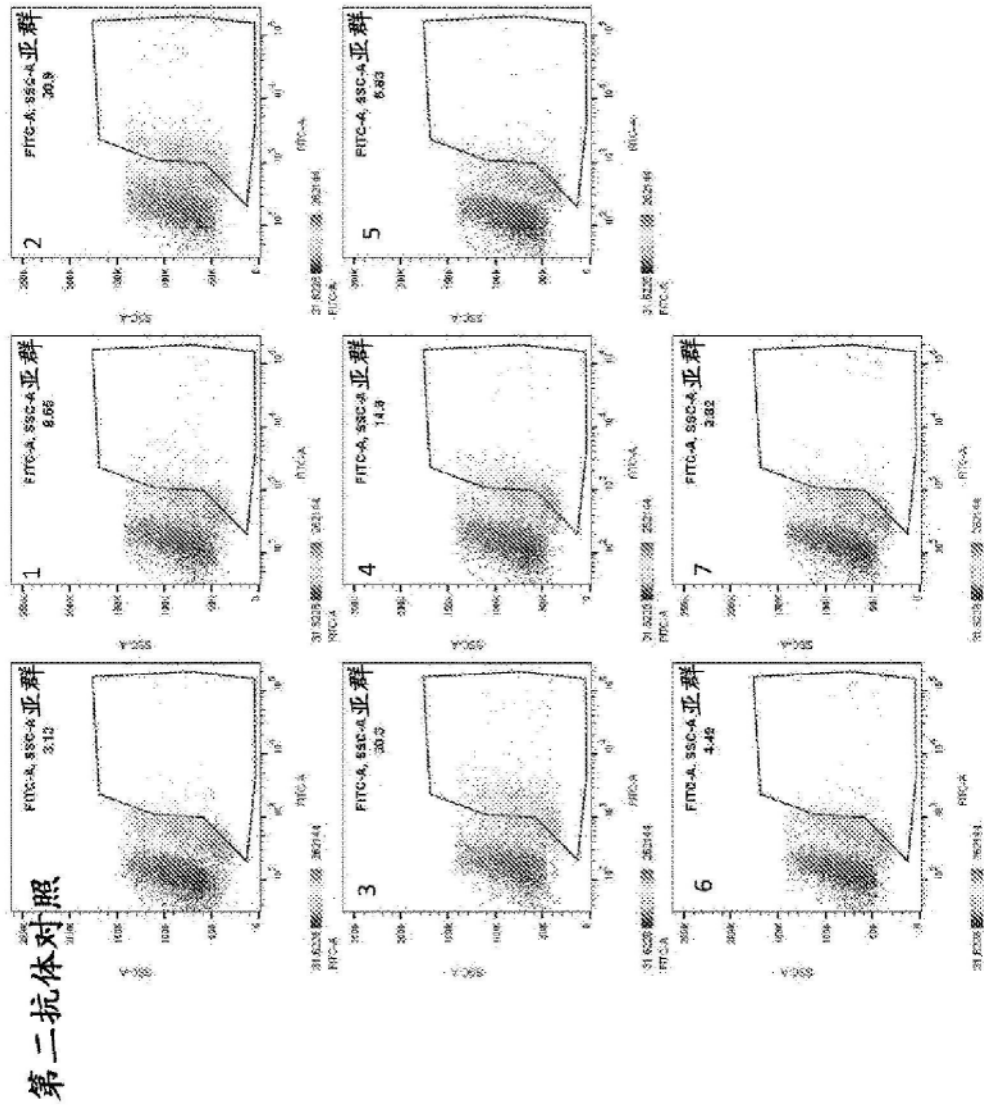


图12

用GRP78单克隆抗体的全身NIR成像(未照射肿瘤)

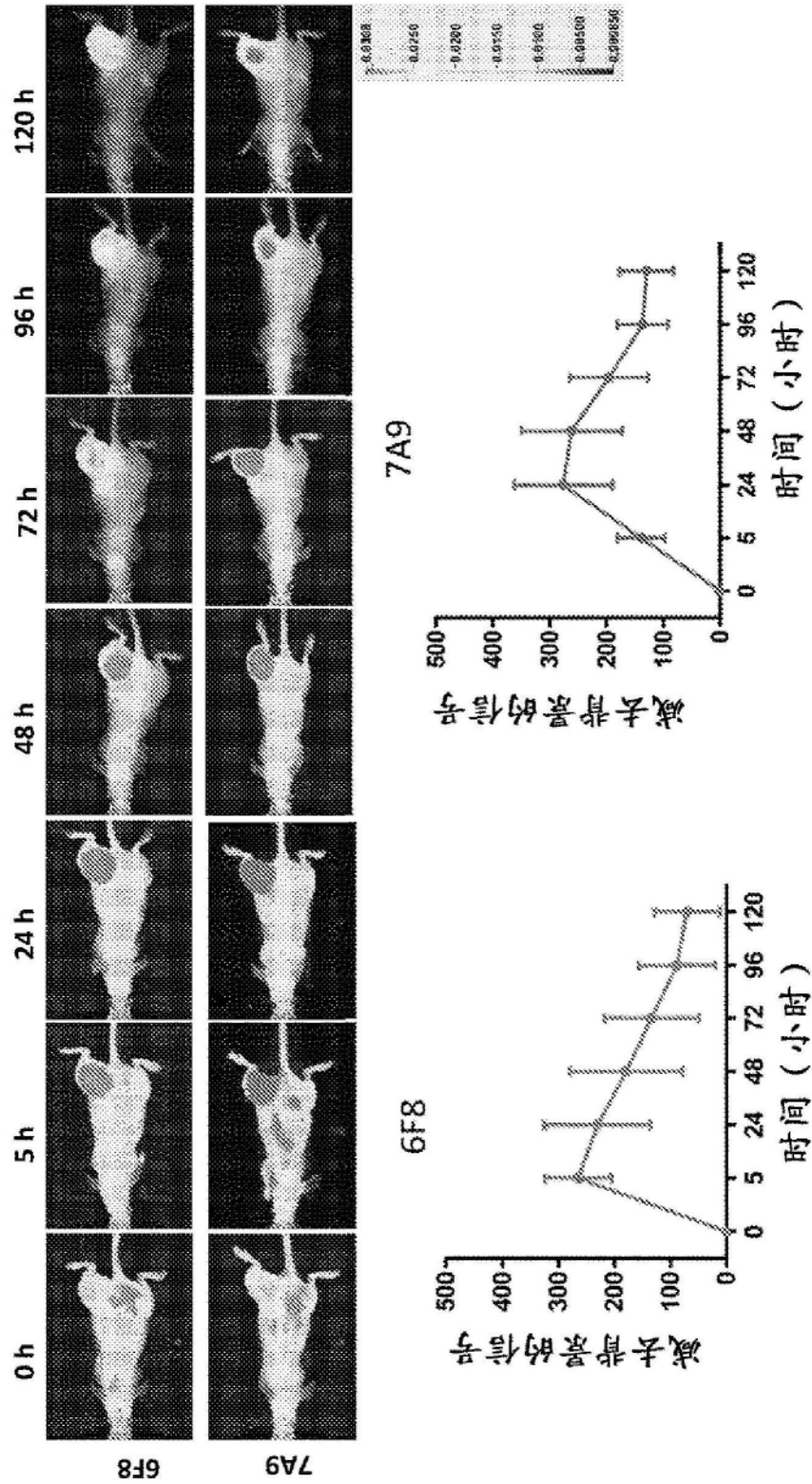


图13

GRP78单克隆抗体通过NIR成像(未照射肿瘤)的生物分布

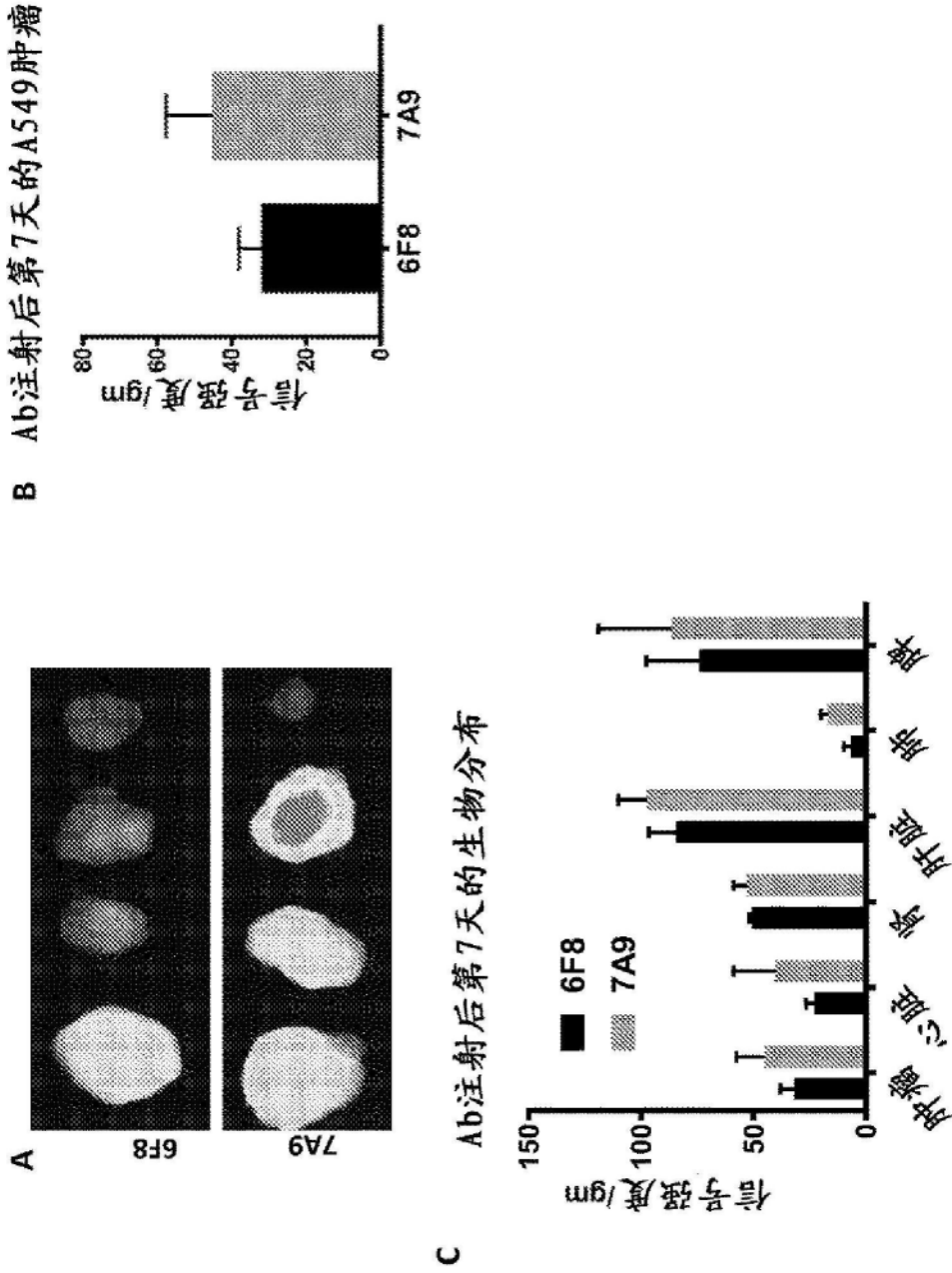


图14A-14C

A549细胞中GRP78单克隆抗体的内化

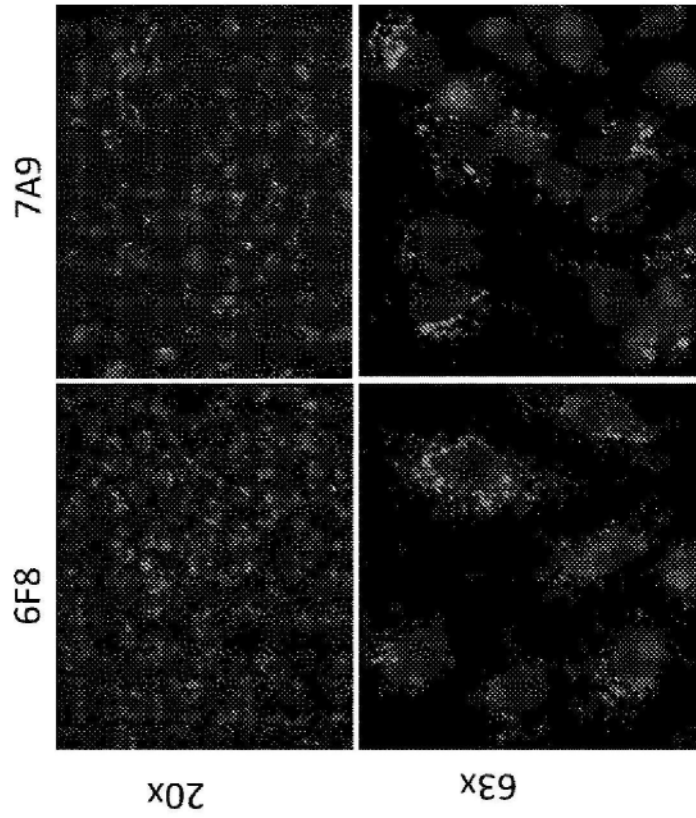


图15

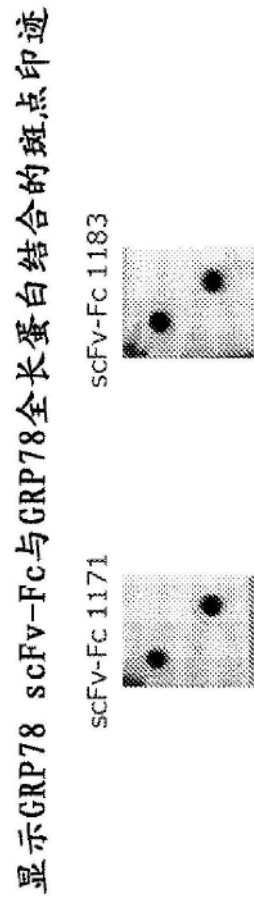
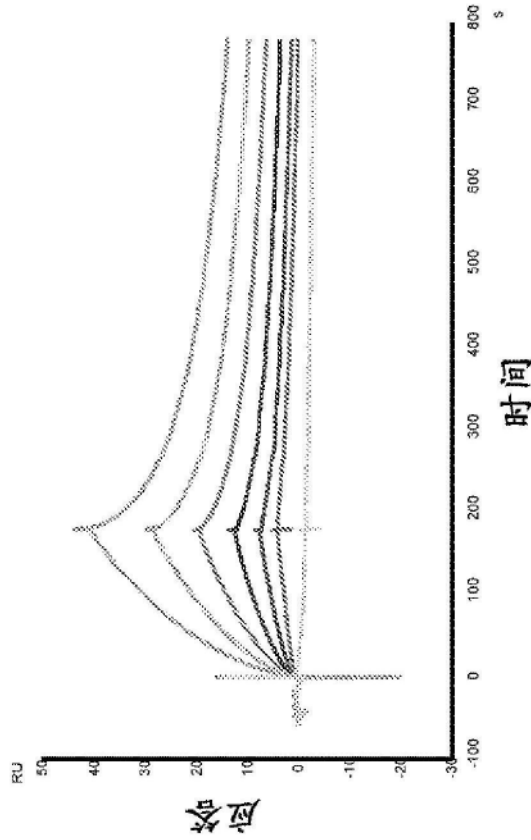


图16

scFv 1171-Fc



k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
6.79×10^3	3.24×10^{-3}	4.77×10^{-9}

图17

scFv 1183-FC

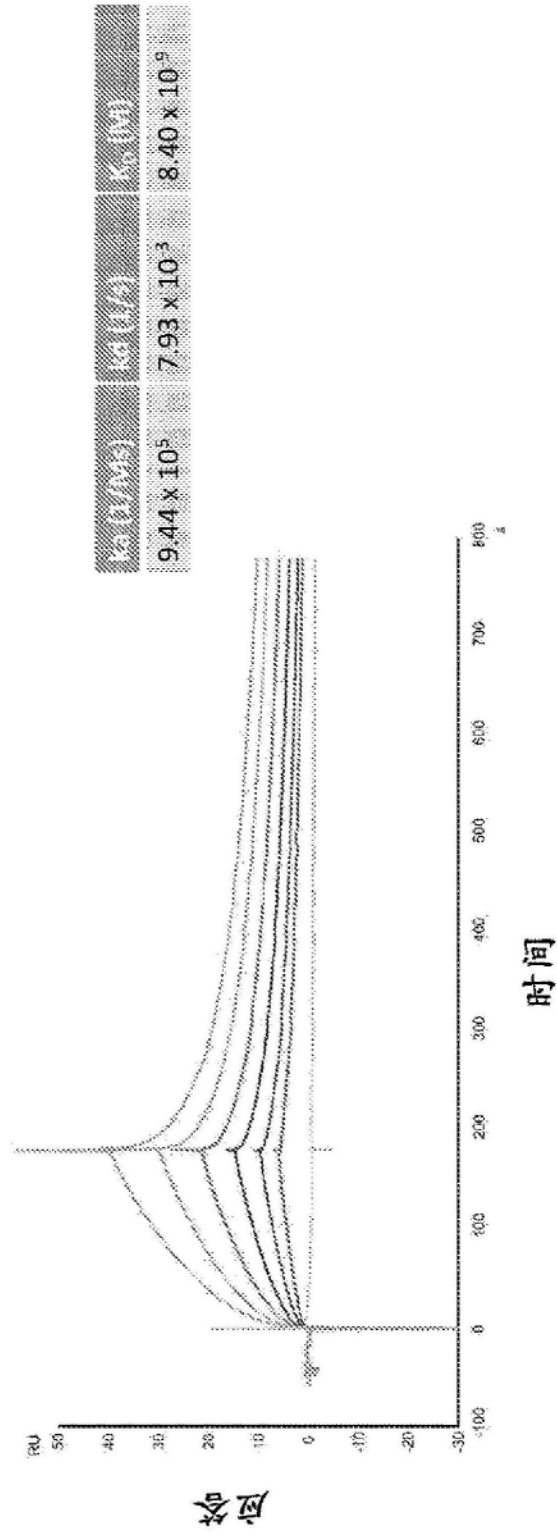


图18

scFv-Fc1171的细胞表面结合的流式细胞术

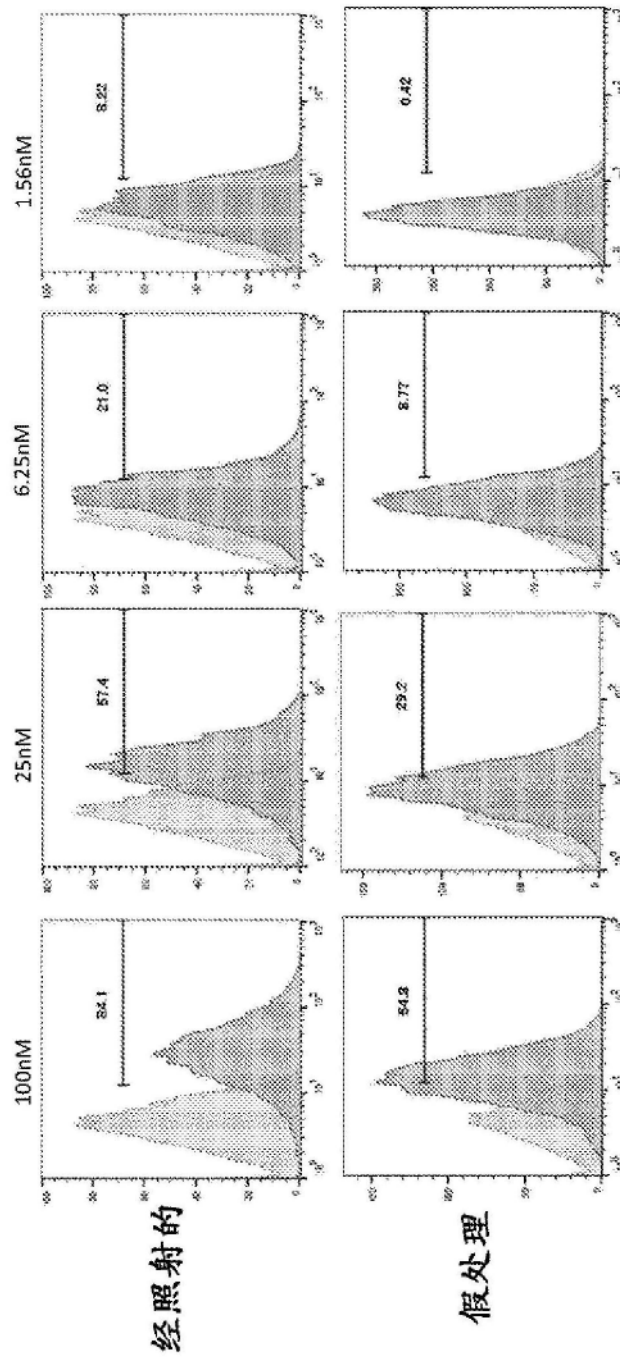


图19

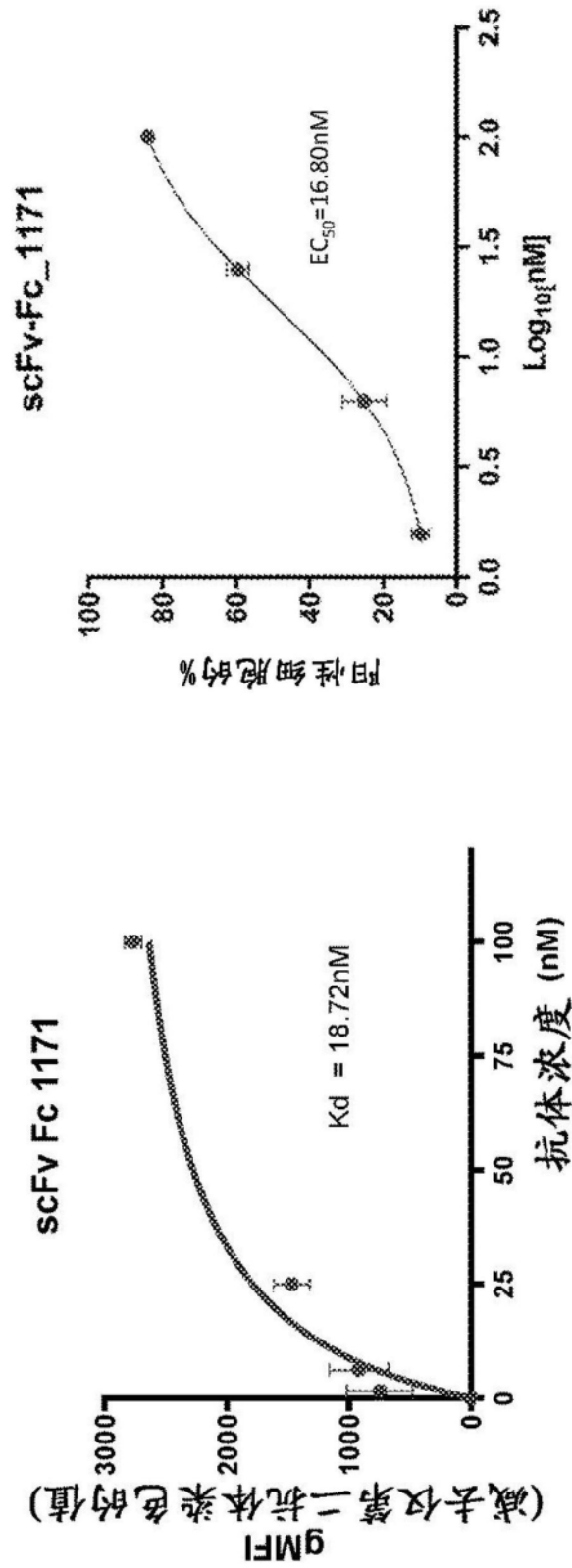


图20

Fc阴性对照的细胞表面结合的流式细胞术

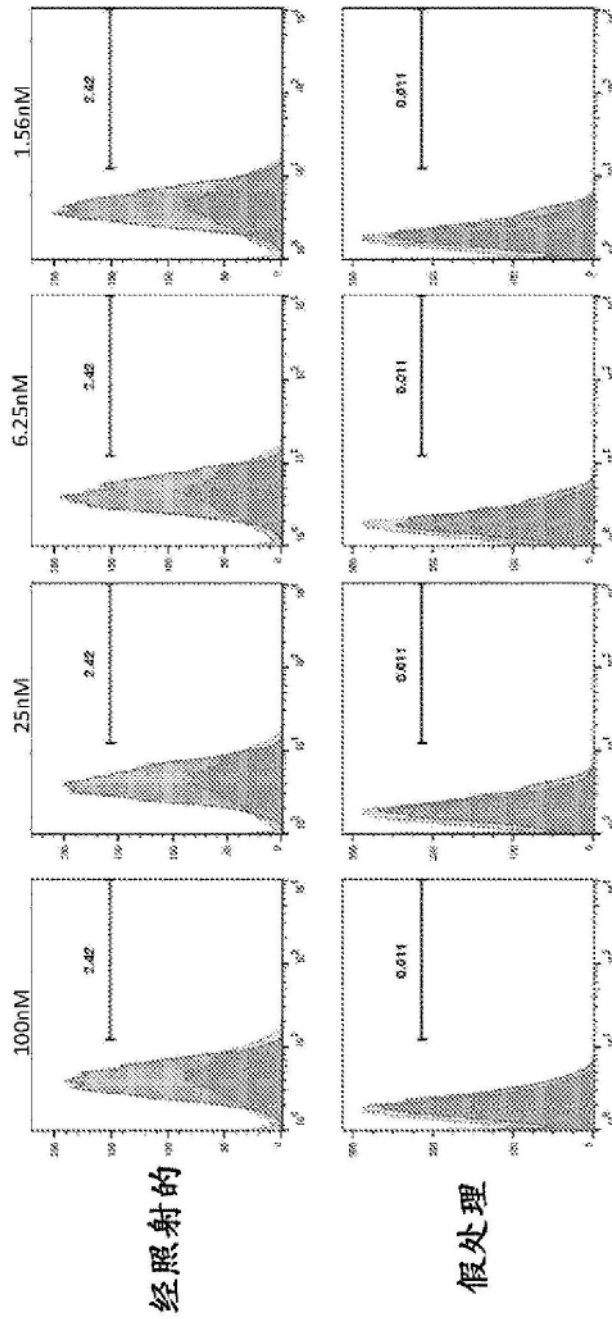
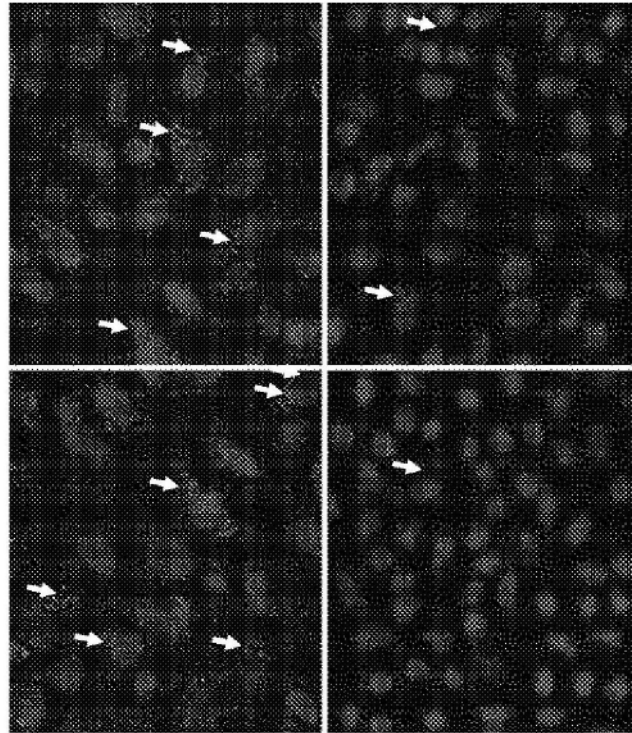


图21

AS49细胞中scFv-Fc 1171的内吞作用



经照射的

假处理

图22

使用集落形成测定法的GRP78 scFv-Fc 1171和Fc的剂量反应

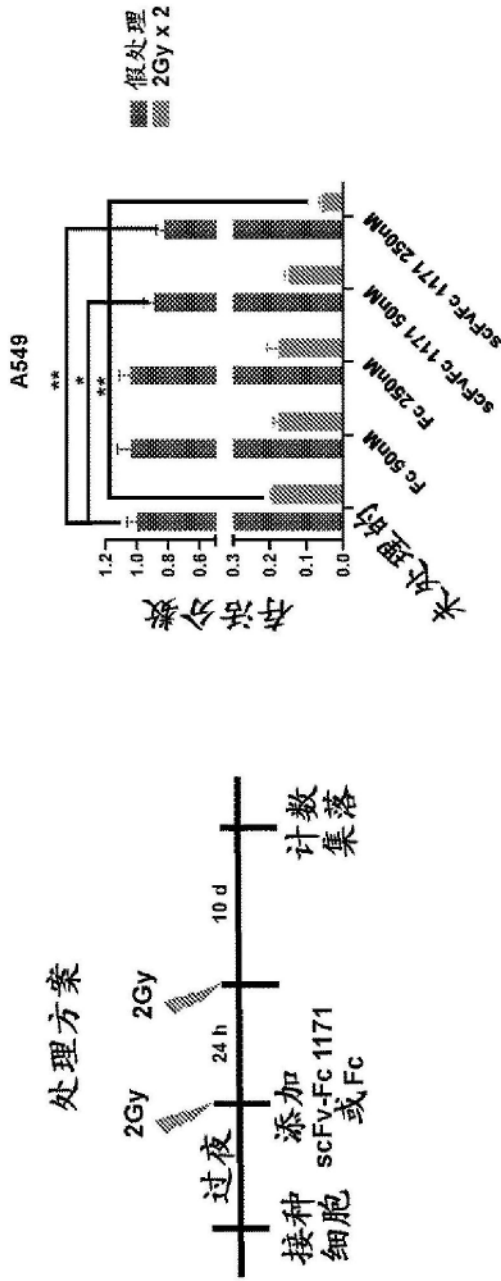


图23

使用H460细胞上的集落形成测定法的GRP78 scFv-Fc 1171和Fc的剂量反应

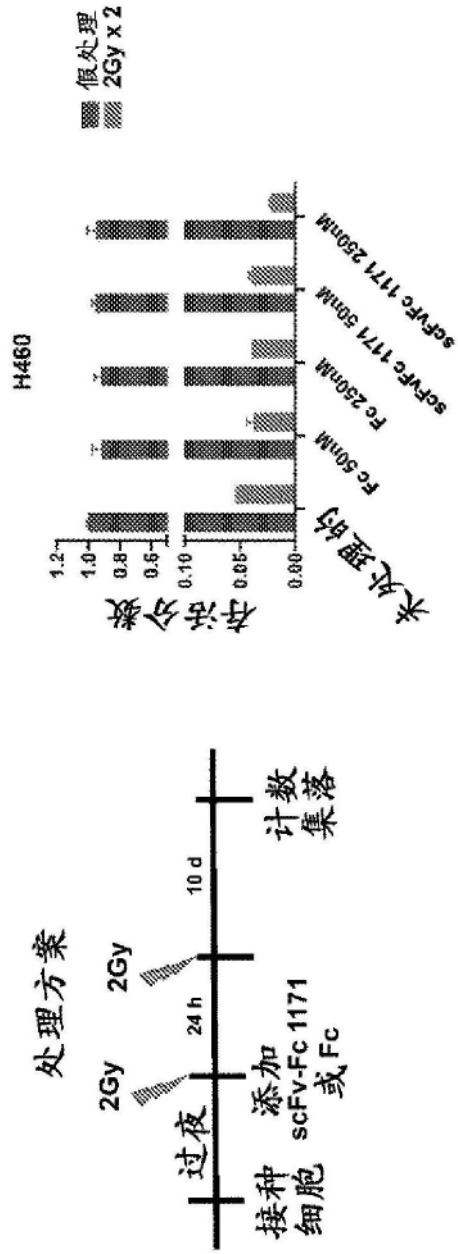


图24

GRP78单克隆抗体序列

6F8

重链: DNA序列(408 bp)

信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTGGCTTTGTTGTTTTATCAAGGTGTGCATTTGTAGGGTGCAGCTTGT
TGAGTCTGGTGCAGGATGGTGGGCCAAAGGGTCATTTGAAACTCTCATGTGTCAGCCCTGTGATTCACCC
TCAATACCTCCGCCATGAACGGGTCAGGTTCCAGGAAGGTTTGGAAATGGGTTGGTCCGATAAGA
AGTAAAAATTATAAATTATGCCAACATATATGCCGATTCAGTGAAGACAGAGTTCAACCATTTTCAGAGATGA
TTCACAAAACATGCTCTATCTGCCAAATGAACAACCTGAAAACAGTGAAGACACAGCCATGTATTACTGTGGA
GGCCCCCGGGTTTGGCTTACTGGGGCCCAAGGGACTCTGGTCACTGCTCTGCA

重链: 氨基酸序列(136 aa)

信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MLLGLKWCVFVYQGVHCEVQLVESGGSLVPRPKGSLKLSCAAAGFTLNTSAMNWVROVPGKGLMVGRI
SKNYNYAYIYADSVKDRFTLFRDSSQNNMLYLQNNLKTETPIAMYICVRFPPGFAYWGGQLLVTVSA

轻链: DNA序列(381 bp)

信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGGGTTCCTGCTCAGCTTTTGGCTTCTTGTGCTCTGTTTCCAGGTACCAGATGTGACATCCAGAT
GACCCASTCTCCATCCTCCTTAATCTGCTCTCTGGGAGAAAGAGTCACTCACTGTGCGACAAGTCAGG
AAATTAGTGGTCACTTAAGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGGAACATAAAGCCCTCATCTACGCCGCA
TCCAGTTTAGATTCCTGGTGTCCGAAAAGGTTCAAGTGGCAGTAGGCTTGGGTCAAGATATCTCTCAACCA
CAGCAGCCCTTGAGTCTGAGATTTTGCAGACTATTAATCTACAAATATCTAGTAAATCCGTACACAGTTCG
GAGGGGGACCAAGCTGGAAAATAAAA

轻链: 氨基酸序列(127 aa)

信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRVPAHVFGFLLWFPGRCDIOMTQSPSSLASLGERVSLTQRTSQEISGHLWLOKPEDGTRRLIYAR
SSLDSGVFKRFSGSRSSGSDYSLLTSSLESEDEADYICLQYSSPYTFGGGKLEIK

图25

GRP78单克隆抗体序列

7A9

重链: DNA 序列(420 bp)

信号序列-FR1-CDR1-FRC-CDR2-FR3-CDR3-FR4
 ATGCTGTTGGGCTGAAGTGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTCATTGTCAGGTCAGCTTGTTCAG
 ACTGCTGAGGATGGTGGAGCCTAAGGGTCAATGAACCTCAATGTCAGTCCTGGAATCACCTTCAATATC
 AATGCCATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGSAAAGSGTTTGGAAATGGTTCCTCCATPAGAAGTAAAAGTAAT
 AATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAGGACAGGTCACCAATCCTCCAGAGATGATTCACAAGCATGCTC
 TATCTGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGALACAGCCATGTAATTAATGTTGTCAGAGATATAACTCGGGCCGGG
 TACTTCGATGCTGGGGCCGAGGACCACGGTCAACCCCTCTCTCA

重链: 氨基酸序列(140 aa)

信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MLLGLKWFVFFVYQGVHCEVQLVEITGGGLVQPNLSLKLSCAVSGITFFINAMNWVQAQFGKLELWVARIERKSN
 NYATYYADSVKDRFTIISRDSSQLYLQMNHLKTEFTAMYVCVRDITRAGYFDVWGAGTIVTVSS

轻链: DNA 序列(384 bp)

信号序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
 ATGCATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTTGTT
 CTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGCTGTGCATCTCCAGGGAAGGTCACCAATACCTGGAGTCCAGCTCAAGT
 GTAAATTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACCTTCGCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAACCTG
 GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTCAGTGCAGTGGATCTGGACCTCTTACTCTCAAAATCAGCCGGAATGGAG
 CCTGAAATGCTGCCCACCTTATTACTGCCAGCAAGGAGTAGTAACTCCGCTCACCGTTCGGTCTGGGACCAAGCTG
 GAGCTGAAA

轻链: 氨基酸序列(128 aa)

信号肽-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MHFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLTQS PALMSASPEGEKVTITCSASSSVIYMHWFQKQKFTSPKIKIYSTSNL
 ASGVPARFSGSSSCTSYSLTISRMEAEAAIYYCQRSSSYPLITFGAGTLEELK

图 26

GRP78 scFV 序列

SCFV GRP78--1183

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

humIGLV048 SGSIASNY....___EDN.....___QSYDSTNGV

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRS~~SGSIASNY~~VQWYQQRP~~SGSSPTTVYE~~DNQRPSGV~~PD~~RFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYC~~OSY~~
DSTNQVFGGKLTVL

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

GGTFSSYA....___ISAYNGNT..___ARDPPLRYFDWFRGSDWFDP

QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY~~AI~~SWVRQAPGGQGLEWMGW~~ISA~~YNGNTNYAQKLGGRVTMTTDTSTSTAYMELRSL
RSDDTAVYYC~~ARDPPLRYFDWFRGSDWFDP~~WGQGLTVTS

图27

GRP78 scFV 序列

SCFV GRP78--1164

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

humIGLV083 NIGSKN....._GDS....._QVWDSNSDHPFV

SYELMQPPSVSMAPGGQTARITCGGN#GSKVHWYQQKSGQAPVLVWHQDSDRPSGIPERISGRNFGNTATLTINRVEAGDEADYY
CQVWDSNSDHPFVFGTGKVTVL

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

GYTFTDYA...._INPGSGNT.__ARDRQGPDY

WVQLVESGPEVKKPGASVNVSKASGYTFTDYAIHWVWRQAPQRPEWWMGW#NPGSGNTKYSQKFKQVRVTITRDTTSASTAYM
EMTSLRSEDTAIYYC#ARDRQGPDYWGQGLVTVS

图 28

GRP78 scFV序列

SCFV GRP78--1171

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

humIGKV120 QSISSY....._DAS....._QQYDNLALT

DIQLTQSPSSLASVGDRTTTCRASQSSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGGTDFTFTISSLQPEDIAITY
YCCQYDNLALTFFGGGKVDIK

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

GGTFSNPV...._IITMFGTT..... AKDPPMFDY

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKSSGGTFSNPVISWWRQAPGGGLEWMGGIITMFDITTYGNSVGRFIVSRDNSKNMFLQMNSLRAEDTAV
YYCAKDFP#FDYWGQGLTVTS

图 29

GRP78 scFV 序列

Scfv 1256

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

humIGKV098 QGIRND....._AAS....._LQHNTYPWT

DIVMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIKNDLGVYQQKPGKAPKRLIYAASLQSGVPSRFSGSGGTEFTLTISSLQPEDFATYY
CLOHNTYPWTFGQGTKEIK

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

GGYIDRYF..._IYTSGR..._... ARDRQGPDY

EVQLVETGPGLVKPSQTLSTCSVSGGYIDRYFIHWVRQAPGQRPEWMGMWYTSGRKIKYSQKFGQVRVTITRDTSASTAYMEM
TSLRSEDTAIYYCARDRQGPDYWGQGLTVTS

图30