



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099351
(43) 공개일자 2024년06월28일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7017404
(22) 출원일자(국제) 2022년11월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/129803
(87) 국제공개번호 WO 2023/078382
국제공개일자 2023년05월11일
(30) 우선권주장
202111305149.7 2021년11월05일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
치아타이 티안펑 파마수티컬 그룹 주식회사
중국 지양수 프로빈스 222062 헨원강 시티 위저우
사우스 로드 넘버 369</p> <p>(72) 발명자
루 첸첸
중국 지양수 211100 지양닝 디스트릭트 난징 지양
닝 하이테크 존 후잉 로드 넘버 1099
왕 유지에
중국 지양수 211100 지양닝 디스트릭트 난징 지양
닝 하이테크 존 후잉 로드 넘버 1099
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
하영욱</p> |
|---|--|

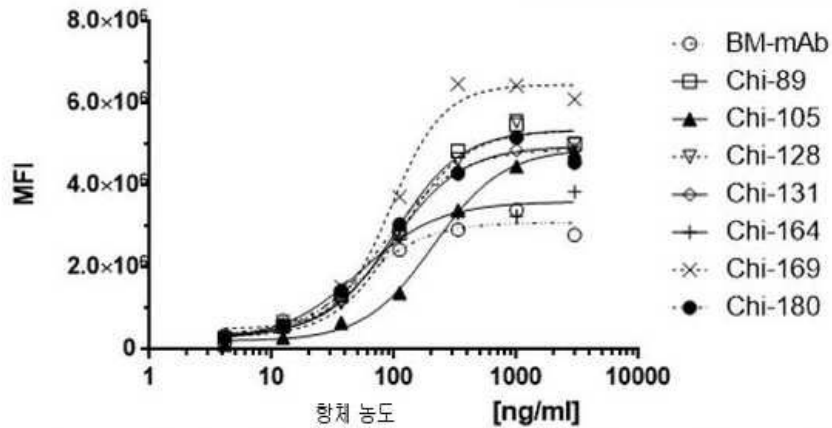
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 GPRC5D에 결합하는 항체 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 GPRC5D와 결합하는 항체 및 그 용도를 제공한다. 구체적으로는, 항-GPRC5D 항체 및 그 항원 결합 단편, 그것을 인코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포 및 그것을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 종양의 감소, 종양 세포 성장의 억제, 질병의 치료 등에서의 이들의 용도를 제공한다.

대표도 - 도2



항체 번호	BM-mAb	Chi-89	Chi-105	Chi-128	Chi-131	Chi-164	Chi-169	Chi-180
EC50(nM)	0.37	0.70	1.44	0.76	0.66	0.36	0.66	0.56

(52) CPC특허분류

A61P 37/06 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

(72) 발명자

펑 슈양리

중국 지양수 211100 지양닝 디스트릭트 난징 지양
닝 하이테크 존 후잉 로드 넘버 1099

장 쟡핑

중국 지양수 211100 지양닝 디스트릭트 난징 지양
닝 하이테크 존 후잉 로드 넘버 1099

명세서

청구범위

청구항 1

항-GPRC5D 항체가,

서열 번호 1, 9, 17, 25 또는 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

서열번호 2, 10, 18, 26 또는 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 3, 11, 19, 27 또는 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 4, 12, 20, 28 또는 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

서열번호 5, 13, 21, 29 또는 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 6, 14, 22, 30 또는 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 항-GPRC5D 항체가,

(i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;

(ii) 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역,

(iii) 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,

서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;

(iv) 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,

서열번호 26으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,
 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
 (v) 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 3

항-GPRC5D 항체가 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 4

제 3 항에 있어서,
 상기 항-GPRC5D 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고; 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 또는 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 및/또는 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
 상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역은 이하의 것 중 어느 하나로부터 선택되는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.
 (i) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다;

(ii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다;

(iii) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다;

(iv) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다; 또는

(v) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단리된 CDR 영역 또는 scFv이고;

선택적으로, 항-GPRC5D 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체이고;

선택적으로, 항-GPRC5D 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아이소타입인, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편은 인간 GPRC5D 항원에 결합하고, 또한 선택적으로 이하의 특성 중 어느 하나 이상을 더 특징으로 하는, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

- (1) 원숭이 GPRC5D 항원과 결합;
- (2) 마우스 GPRC5D 항원과 결합; 또는
- (3) GPRC5A, GPRC5B 및 GPRC5C 중 하나 이상과 결합하지 않음.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-GPRC5D 항체가 단일 특이적 항체 또는 다중 특이적 항체인, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편 또는 제 10 항에 기재된 융합 단백질을 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 인코딩하는, 단리된 핵산.

청구항 13

제 12 항에 기재된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 14

제 13 항에 기재된 벡터를 포함하거나 제 12 항에 기재된 핵산이 게놈에 통합되어 있는, 숙주 세포.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제조하는 방법으로서, GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 숙주 세포 또는 상기 숙주 세포 배양물로부터 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

질병의 치료, 종양의 감소 또는 종양 세포의 성장을 억제하는 약물을 제조하기 위한 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편 또는 제 10 항에 기재된 융합 단백질의 용도로서, 바람직하게는, 상기 질병이 암 또는 자가면역 질병이고, 바람직하게는, 상기 암은 다발성 골수종인, 용도.

청구항 17

대상체의 종양의 감소, 종양 세포 성장의 억제 또는 대상체의 질병을 치료하기 위한 방법으로서, 제 1 항 내지 제 9 항에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 또는 제 10 항에 기재된 융합 단백질 또는 제 11 항에 기재된 약학적 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 바람직하게는, 상기 질병이 암 또는 자가면역 질병이고, 바람직하게는, 상기 암은 다발성 골수종인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항체, 특히 GPRC5D에 결합하는 항체, 이것을 제조하는 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다발성 골수종(MM: multiple myeloma)은 골수 유래 형질 세포의 비정상적 증식을 특징으로 하는 형질 세포 악성 종양이고, 이로 인해 MM 환자는 골괴사, 골수 침윤, 신부전, 및 면역 결핍 등의 다양한 질병 관련 증상을 경험하게 된다. 현재, 다발성 골수종의 치료에는 프로테아좀 억제제, 면역 조절제, 단일 클론 항체 및 줄기 세포 이식 등이 열거된다.

[0003] GPRC5D(G protein-coupled receptor class C group 5 member D; G 단백질 결합 수용체 클래스 C그룹 5멤버 D)는 레티노산 유도 고아 G 단백질 결합 수용체(RAIG) 패밀리의 멤버이다. 이것은 스크로틴의 구조와 관련된 정상적인 생리적 기능을 지닌 345개의 아미노산 잔기로 이루어진 7-트랜스멤브레인 단백질이다. 그러나, GPRC5D의 구체적인 생물학적 기능이나 리간드는 현재 공개되어 있지 않다. 일부 연구에서는 다발성 골수종 환자의 65%에서 GPRC5D가 악성 골수 유래 혈장 세포에 대해 50%를 초과하는 발현 역치를 갖고, 그 발현이 BCMA(B 세포 성숙 항원)와는 관계가 없는 것으로 나타났다. 다른 연구에서는 GPRC5D의 과발현이 다발성 골수종 환자의 종양 부담 및 예후 불량과 관련이 있는 것으로 나타났다. GPRC5D는 피부 모낭 조직과 골수 유래 형질 세포를 제외한 정상 조직에서는 발현되지 않거나 매우 낮은 발현을 갖는다. GPRC5D는 다발성 골수종 환자에게 임상적 전망이 있는 새로운 치료 경로를 제공할 수 있다.

[0004] GPRC5D를 표적으로 하는 여러 항체가 잠재적인 치료 표적으로서 개발되고 있지만, 여전히 제한적이다. 더욱 많은 사용 가능한 옵션이 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 GPRC5D에 결합하는 항체를 제공하고, 또한 제공된 항체를 인코딩하는 관련 핵산, 벡터, 세포,

조성물, 제조 방법 및 용도를 제공한다.

- [0006] 하나의 양태에서, 본 발명은 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 항-GPRC5D 항체는 이하를 포함한다:
- [0007] 서열번호 1, 9, 17, 25 또는 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0008] 서열번호 2, 10, 18, 26 또는 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0009] 서열번호: 3, 11, 19, 27 또는 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0010] 서열번호 4, 12, 20, 28 또는 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0011] 서열번호 5, 13, 21, 29 또는 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0012] 서열번호 6, 14, 22, 30 또는 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0013] 본 발명의 하나의 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 이하를 포함한다:
- [0014] (i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0015] 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0016] 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0017] 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0018] 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0019] 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0020] (ii) 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0021] 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0022] 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0023] 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0024] 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0025] 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0026] (iii) 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0027] 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0028] 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0029] 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0030] 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0031] 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0032] (iv) 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0033] 서열번호 26으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0034] 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0035] 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0036] 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0037] 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0038] (v) 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0039] 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

- [0040] 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0041] 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0042] 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0043] 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0044] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항-GPRC5D 항체는 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0045] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원-결합 단편을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0046] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원-결합 단편, 또는 본원에 기재된 융합 단백질을 포함하고, 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0048] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0049] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 벡터 또는 본원에 기재된 핵산이 게놈에 통합된 숙주 세포를 제공한다.
- [0050] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포 또는 숙주 세포 배양물로부터 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0051] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 질병 치료용 약물을 제조하기 위한 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 융합 단백질의 용도를 제공하며, 여기서, 바람직하게는 상기 질병은 암 또는 자가 면역 질환이다.
- [0052] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 융합 단백질 또는 약학적 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 종양을 감소시키거나 종양 세포의 성장을 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0053] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 융합 단백질 또는 약학적 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 질병을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서, 바람직하게는 상기 질병은 암 또는 자가 면역 질환이다.
- [0054] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 면역 접합체, 또는 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 ELISA에 의해 측정된 CHO-K1-hGPRC5D^{hi}, CHO-K1-cynoGPRC5D(CHO-K1-원숭이 GPRC5D) 및 CHO-K1-murineGPRC5D(CHO-K1-마우스 GPRC5D) 세포를 지닌 일부 마우스 항-hGPRC5D 항체의 OD₄₅₀값을 나타낸다;
- 도 2는 FACS에 의해 측정된 hGPRC5D의 발현이 높은 세포와 키메라 항체의 결합의 MFI 및 EC₅₀값을 나타낸다;
- 도 3은 FACS에 의해 측정된 hGPRC5D의 발현이 낮은 세포와 키메라 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
- 도 4A는 FACS에 의해 측정된 H929 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
- 도 4B는 FACS에 의해 측정된 MM1S 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
- 도 5A는 FACS에 의해 측정된 CHO-K1-cynoGPRC5D 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
- 도 5B는 FACS에 의해 측정된 CHO-K1-murineGPRC5D 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.

도 6A는 FACS에 의해 측정된 CHO-K1-GPRC5A 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
 도 6B는 FACS에 의해 측정된 CHO-K1-GPRC5B 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
 도 6C는 FACS에 의해 측정된 CHO-K1-GPRC5C 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
 도 7은 FACS에 의해 측정된 CHO-K1 세포와 항-GPRC5D 항체의 결합의 MFI값을 나타낸다.
 도 8은 항-GPRC5D 항체의 내재화 활성 분석을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0056] 본 출원은 본 발명의 실시형태에 대하여 설명하였지만, 본 발명의 보호 범위가 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상 및 개념에 기초하여 다양한 수정, 변형 또는 교체가 이루어질 수 있음이 당업자에게 이해될 수 있을 것이다. 이러한 수정, 변형 또는 교체를 갖는 내용도 본 발명의 범위 내에 속한다.
- [0057] 용어
- [0058] "항체"라는 용어는 그것의 가장 넓은 의미로 사용되며, 단일 클론 항체, 단일 특이적 항체, 다중 특이적 항체 (예를 들면, 이중 특이적 항체, 삼중 특이적 항체, 등), 단일 사슬 항체 등을 포함하지만, 소망의 항원 결합 활성을 나타내는 한, 이들로 한정되지 않는 다양한 구조체의 천연 및 인공 항체를 포함하는 각종 항체 구조체를 포함한다. 항원 결합 단편은, 온전한 항체가 결합하는 항원과 결합한 온전한 항체의 일부를 포함한, 온전한 항체 이외의 분자를 나타낸다. 항원 결합 단편의 예로는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)' 단편, Fv 단편, 단리된 CDR 영역, 단일 사슬 Fv 분자(scFv) 및 당업계에 공지된 기타 항체 단편이 포함된다.
- [0059] "아이소타입"이라는 용어는 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 인코딩되는 항체의 클래스를 의미한다. 일 실시형태에 있어서, 본원에 개시된 항-GPRC5D 항체는 IgG1 또는 IgG4 아이소타입이다. 본 발명의 항-GPRC5D 항체 및 그 항원 결합 단편은 마우스, 래트, 토끼, 영장류, 라마 및 인간을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 항-GPRC5D 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 온전한 인간 항체일 수 있다. 하나의 특정 실시형태에 있어서, 본원에 제공된 항-GPRC5D 항체는 인간화 항체이다. 하나의 특정 실시형태에 있어서, 본원에 제공된 항-GPRC5D 항체는 키메라 항체이다.
- [0060] "키메라 항체"라는 용어는 하나의 종으로부터 유래된 중쇄 가변 영역의 적어도 일부 및 경쇄 가변 영역의 적어도 일부, 및 다른 종으로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부를 갖는 항체를 의미한다. 예를 들면, 일부 실시형태에 있어서, 키메라 항체는 무린 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0061] "인간화 항체"라는 용어는 비인간 항체로부터 유래된 상보성 결정 영역(CDR), 및 인간 항체로부터 유래된 프레임워크 및 불변 영역을 포함하는 항체를 의미한다. 예를 들면, 본원에 제공된 GPRC5D에 결합하는 인간화 항체는 하나 이상의 무린 항체 및 인간 프레임워크 및 불변 영역으로부터 유래된 CDR을 포함할 수 있다.
- [0062] "단일 클론 항체"("mAb")라는 용어는 단일 분자 조성물의 항체 분자를 의미한다. 단일 클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내거나, 이중 특이적 단일 클론 항체의 경우, 2개의 서로 상이한 에피토프에 대한 이중 결합 특이성을 나타낸다. mAb는 단리된 항체의 일레이다. mAb는 하이브리도마 기술, 재조합 기술, 유전자 변이 기술 또는 당업자에게 공지된 기타 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0063] "가변 도메인" 또는 "가변 영역"이라는 용어는 항원에 대한 항체의 결합에 관여하는 항체의 도메인을 의미한다. 예를 들면, 천연 4개 사슬 항체(예를 들면, 인간, 무린 등에서 유래)는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 갖고, 낙타류 또는 상어류 등의 동물로부터 유래된 중쇄 항체는 단일 가변 도메인을 갖는다. 대부분의 경우, 천연 항체의 각각의 가변 도메인은 실질적으로 4개의 "프레임워크 영역"과 3개의 "상보성 결정 영역"으로 이루어진다. 4개의 프레임워크 영역은 각각 프레임워크 영역 1(FR1), 프레임워크 영역 2(FR2), 프레임워크 영역 3(FR3) 및 프레임워크 영역 4(FR4)로 지칭되며; 프레임워크 영역은 당업계에서 지칭하는 것 및 상보성 결정 영역(CDR)으로서 이하에서 지칭하는 것으로 분리된다. 따라서, 가변 도메인의 일반적인 구조는 이하와 같이 나타낼 수 있다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 하나의 구체예에 있어서, 중쇄 가변 영역의 일반적인 구조는 이하와 같이 나타낼 수 있다: FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4. 하나의 구체예에 있어서, 경쇄 가변 영역의 일반적인 구조는 이하와 같이 나타낼 수 있다: FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4.
- [0064] "CDR"(상보성 결정 영역)은 "HVR(초가변 영역)"이라고도 언급된다. 예를 들면, 천연 4개 사슬 항체는, 일반적으로 6개의 CDR을 포함하며, 이 중 3개는 중쇄 가변 영역, 즉 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2) 및 중쇄

CDR3(HCDR3)에 있고 나머지 3개는 경쇄 가변 영역, 즉 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2), 경쇄 CDR3(LCDR3)에 있다. 일반적으로 중쇄 항체 또는 단일 가변 도메인은 3개의 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는다.

- [0065] 현재, CDR을 규정하는 방법에는 여러 가지가 있다. Kabat 스킵이 서열 가변성을 기준으로 CDR을 규정하고, 가장 일반적으로 사용되고(Elvin A. Kabat, et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia 스킵은 구조적 루프의 위치에 기초한 CDR을 규정한다(Cyrus Chothia, et al, Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987)). Kabat 스킵과 Chothia 스킵 사이의 절충안인 AbM 스킵은, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉"은 이용 가능한 복합체의 결정 구조의 분석을 기반으로 하는 CDR을 규정한다. 그러나, 상이한 방법 및 정의에 근거한 동일한 항체의 가변 영역의 CDR의 경계는 서로 상이할 수 있고, 즉, 상이한 방법에 의해 규정된 동일한 항체의 가변 영역의 CDR 서열은 상이할 수 있다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 본원에 규정된 특정 CDR 서열로 규정된 항체에 대해 언급이 이루어지는 경우, 항체의 범위는 다른 임의의 정의로 전환되는 CDR 서열(예를 들면, IMGT, Chothia, AbM 정의 등 중 하나 이상의 조합)에 의해 규정된 항체도 포함한다. 본 발명에 청구된 CDR은 표 S1 및 표 S2에 나타난 서열을 기반으로 하지만, 다른 CDR의 정의 규칙에 따른 상응하는 아미노산 서열도 본 발명의 보호 범위에 속해야 한다. 예를 들면, 또 다른 정의에 따르면, 키메라 항체 Chi-131의 중쇄 CDR1의 아미노산 서열은 NYVMH(서열번호 71)일 수 있다.
- [0066] 용어 "프레임워크 영역"(FR)은 본원에 규정된 CDR 잔기 이외의 가변 도메인의 아미노산 잔기를 의미한다.
- [0067] "단리된"이라는 용어는, 표적 화합물(예를 들면, 항체 또는 핵산)이 자연 환경으로부터 단리되는 것을 의미한다.
- [0068] 본원에 사용된 용어 "EC₅₀"는 최대 유효한 반응의 50%를 유도하는 항체의 농도를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "IC₅₀"는 최대 억제 반응의 50%를 유도하는 항체의 농도를 의미한다. EC₅₀ 및 IC₅₀는 모두 ELISA나 FACS 분석 또는 해당 분야에서 공지된 다른 방법으로 측정할 수 있다.
- [0069] 본원에 사용된 용어 "K_D"는 몰 농도(M)로 표현되는 평형 해리 상수를 의미한다. 항체의 K_D값은 해당 분야에서 널리 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D를 결정하는 하나의 바람직한 방법은, 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 것이며, 더욱 바람직하게는 Biacore 시스템 등의 바이오센서 시스템을 사용하여 행하는 것이다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 또는 비인간 동물을 모두 포함한다. "비인간 동물"이라는 용어는 모든 척추 동물, 예를 들면, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류 등의 포유 동물 및 비포유 동물을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 대상체는 인간이다. 달리 명시하지 않는 한, "환자" 및 "대상체"라는 용어는 상호 교환적으로 사용된다.
- [0071] 본원에 사용된 "암"은 통상, 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 의미한다. 억제되지 않은 세포 분열 및 성장은 인접한 조직을 침범하는 악성 종양의 형성으로 이어질 수 있으며, 림프계나 혈류를 통해 신체의 원위부로 전이될 수도 있다. "암" 또는 "암 조직"은 종양을 포함할 수 있다.
- [0072] "치료하는" 또는 "치료"라는 용어는 치료받는 개인의 질병의 자연 경과를 변경하려는 시도를 의미하며, 예방을 위해 또는 임상 병리 과정 동안에 행해지는 임상적 개입일 수 있다. 치료의 소망의 효과에는 질병의 발생 또는 재발 예방, 증상 완화, 질병의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과 감소, 전이 방지, 질병 진행 속도의 저하, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 예후의 퇴보 또는 개선 등이 포함되지만, 이들에 한정되지는 않는다.
- [0073] 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은 대상체에게 치료적 이점을 제공하는 데 필요한 화합물, 조성물 또는 약학적 조합의 양을 의미한다.
- [0074] 본원에서 "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태에 대해 사용된다.
- [0075] "약학적 조성물"이란 활성 성분과 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 말한다.
- [0076] 아미노산 서열의 "퍼센트(%) 동일성"은, 정렬되는 서열이 본원에 나타난 특정 아미노산 서열로 정렬되고, 경우에 따라 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭이 도입되고, 서열 동일성의 일부로서 임의의 임의의 보존적 치환이 없는 경우, 본원에 나타난 특정 아미노산 서열의 것과 동일한 정렬되는 서열 내 아미노산 잔기의 백

분율을 의미한다. 동일성에 대한 아미노산 서열의 정렬은 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어 등의 해당 분야의 기술 내의 다양한 방법으로 행해질 수 있다. 당업자는 비교된 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 얻는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

- [0077] "Xn" 및 "Xaa"라는 용어는 등가이며 불특정 아미노산(Unspecified Amino Acid)을 의미하며 그 범위는 관련 설명의 후속 정의에 따라 명시된다.
- [0078] "포함한다", "함유한다" 또는 "구성한다"라는 용어와 그 변형은, "포함하지만 이에 한정되지 않는 것"으로 이해되어야 하며, 이는 열거되는 요소, 성분 및 절차 외에도 특정되지 않은 다른 요소, 성분 및 절차를 포함하는 것을 의미한다.
- [0079] 본원에서 문맥상 명백히 달리 명시하지 않는 한, 단수 용어는 복수 용어를 포함하고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다.
- [0080] 모든 특허, 특허 출원 및 기타 식별된 공보는 설명 및 공개의 목적으로 본원에 참조로 명백하게 포함된다. 이러한 공보는 본 발명의 제출일 이전에 공개되었기 때문에 제공된다. 이 문서의 날짜에 대한 모든 진술 또는 이 문서의 내용에 대한 설명은 출원인이 이용 가능한 정보를 기반으로 하고, 이 문서의 날짜 또는 내용의 정확성을 인정하는 것으로 간주하지 않는다. 또한, 본 발명의 다양한 양태는 이하의 부분에서 더욱 상세히 설명된다.
- [0081] I. 항-GPRC5D 항체 및 그 항원 결합 단편
- [0082] 본원에서, 용어 "인간 GPRC5D" 및 "hGPRC5D"는 상호 교환적으로 사용되며, 용어 "GPRC5D에 결합하는 항체" 및 "항-GPRC5D 항체"는 상호 교환적으로 사용된다.
- [0083] 본 발명은 GPRC5D에 결합하는 신규한 항체를 제공한다. 항-GPRC5D 항체는 치료 또는/및 진단 적용을 위해 다수의 다른 바람직한 특성을 나타낸다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 GPRC5D에 대해 우수한 특이성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 원숭이 GPRC5D 또는/및 마우스 GPRC5D에 결합하여 항체 개발 동안에 약리학적 및/또는 안전성 평가를 용이하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항-GPRC5D 항체는, 일부 공지된 항체에 비해 보다 바람직한 항원-결합 특성, 예를 들면 낮은 GPRC5D 발현을 갖는 세포에 대한 보다 바람직한 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 다발성 골수종 세포 등의 종양 세포에 대해 우수한 사멸 특성을 갖는다.
- [0084] 일 양태에 있어서, 본 발명은 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 항-GPRC5D 항체는,
- [0085] 서열번호 1, 9, 17, 25 또는 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0086] 서열번호 2, 10, 18, 26 또는 34로 표시된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0087] 서열번호 3, 11, 19, 27 또는 35로 표시된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0088] 서열번호 4, 12, 20, 28 또는 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0089] 서열번호 5, 13, 21, 29 또는 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0090] 서열번호 6, 14, 22, 30 또는 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0091] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0092] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0093] 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0094] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0095] 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

- [0096] 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0097] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0098] 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0099] 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0100] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0101] 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 26으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0102] 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0103] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0104] 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0105] 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0106] 일부 실시형태에서, 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 제공되며, 여기서 항-GPRC5D 항체는 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 특정 실시형태에 있어서, 항체의 CDR 영역은 kabat, Chothia, IMGT 또는 다른 정의 하에 있을 수 있다.
- [0107] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0108] 일부 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0109] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 아미

노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0110] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 이러한 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 추가로 포함한다.
- [0111] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 이러한 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 추가로 포함한다.
- [0112] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 이러한 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 추가로 포함한다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 이러한 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 26으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 추가로 포함한다.
- [0114] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 이러한 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 추가로 포함한다.
- [0115] 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0116] 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0117] 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영

역은 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0118] 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0119] 일부 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0120] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항-GPRC5D 항체는 본원에 기재된 상응하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 더하여 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함한다. N-말단으로부터 C-말단까지 중쇄는 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역으로 이루어지고, 경쇄는 경쇄 가변 영역과 경쇄 불변 영역으로 이루어진다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체의 경쇄 불변 영역은 인간 κ 사슬 불변 영역이다. 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체의 경쇄 불변 영역은 인간 λ 사슬 불변 영역이다.
- [0122] 항-GPRC5D 항체의 중쇄 불변 영역은 임의의 타입, 예를 들면 IgG, IgM, IgD, IgA 및 IgE, 및 임의의 아이소타입, 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 불변 영역으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 IgG1 아이소타입이다. 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 IgG4 아이소타입이다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호 69로 표시되는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄 불변 영역은 서열번호 70으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다.
- [0124] 일부 실시형태에서, 중쇄는 서열번호 49로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 51로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 49로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 51로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 다른 일부 실시형태에서, 중쇄는 서열번호 53으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 55로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 55로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 다른 일부 실시형태에서, 중쇄는 서열번호 57로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 59로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 다른 일부 실시형태에서, 중쇄는 서열번호 61로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 63으로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 61로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 63으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 중쇄는 서열번호 65로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 67로 표시되는 서열과 적어도 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 65로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 67로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 원숭이 GPRC5D 항원 또는/및 마우스 GPRC5D 항원과 교차 반응한다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 GPRC5D 항원에 결합하고, 선택적으로 이하의 특성 중 어느 하나 이상을 더 특징으로 한다:
- [0127] (1) 원숭이 GPRC5D 항원과 결합;
- [0128] (2) 마우스 GPRC5D 항원과 결합; 또는

- [0129] (3) GPRC5A, GPRC5B 및 GPRC5C의 하나 이상과 결합하지 않음.
- [0130] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편은 인간 GPRC5D 항원과 결합하고, 원숭이 GPRC5D 항원 및/또는 마우스 GPRC5D 항원과 결합하며, 추가로 GPRC5A, GPRC5B 및 GPRC5C에는 결합하지 않는다.
- [0131] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 단일 클론 항체이다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 단일 특이적 항체이다.
- [0133] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체는 이중 특이적 항체 또는 삼중 특이적 항체 등의 다중 특이적 항체이다.
- [0134] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 임의의 예시적인 항체와 동일한 GPRC5D 상의 에피토프와 결합하는, 예를 들면 Chi-131과 동일한 에피토프와의 결합, 예를 들면, Chi-169와 동일한 에피토프와의 결합, 예를 들면, Chi-89와 동일한 에피토프와의 결합 등의 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 임의의 예시적인 항체와 경쟁하는, 예를 들면 GPRC5D와의 결합을 위해 Chi-131과의 경쟁, 예를 들면 GPRC5D와의 결합을 위해 Chi-169와의 경쟁, 예를 들면 GPRC5D와의 결합을 위해 Chi-131과의 경쟁, 예를 들면, GPRC5D와의 결합을 위해 Chi-169와 경쟁하는 항 GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다. GPRC5D와의 결합은 ELISA, 플로우 사이토메트리, 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석 또는 해당 분야에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0135] 또한, 본 발명은 마우스 항체 mu-89, mu-105, mu-128, mu-131, mu-164, mu-169 및 mu-180을 포함하는, GPRC5D에 결합하는 일부 예시적인 단일 클론 항체와 구축된 키메라 항체 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131, Chi-164, Chi-169 및 Chi-180이 제공된다. 본원에 제공된 일부 예시적인 항-GPRC5D 항체의 HCDR(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)의 아미노산 서열이 이하의 표 S1에 제공되고, LCDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)의 아미노산 서열이 이하의 표 S2에 제공되며, 일부 항체의 가변 영역의 아미노산 서열이 이하의 표 S3에 제공된다.
- [0136] (표 S1) 중쇄 CDR 서열

항체명	중쇄 CDR1	중쇄 CDR2	중쇄 CDR3
Chi-131	GYTFTNYVMH (서열번호 1)	YFNPYNDGTNYNEKFKG (서열번호 2)	GGVRRYFDV (서열번호 3)
Chi-169	GFTFSNYGMS (서열번호 9)	SISSGGGRIYYPDNVKG (서열번호 10)	HAMDN (서열번호 11)
Chi-89	GFTFSSYGMS (서열번호 17)	TISSGGSYTYYPDSVKG (서열번호 18)	QALRYHMDS (서열번호 19)
Chi-105	GYTFTDYVMN (서열번호 25)	YIYPNNGGTGYNQRFKG (서열번호 26)	WGGTRLGYAMDY (서열번호 27)
Chi-128	GFTFSSFGMH (서열번호 33)	YISRGSSTIYYADTVKG (서열번호 34)	SGYGSSSYFDY (서열번호 35)

[0137]

[0138] (표 S2) 경쇄 CDR 서열

명칭	경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
Chi-131	RASQDIGSNLN (서열번호 4)	ATFSLDS (서열번호 5)	QQYANFPPT (서열번호 6)
Chi-169	SASSSVSNMY (서열번호 12)	DTSKLAS (서열번호 13)	QQWSSNPLT (서열번호 14)
Chi-89	KASQNVGTNVA (서열번호 20)	SASYRYS (서열번호 21)	QQYYSYPWT (서열번호 22)
Chi-105	KASQNVGTNVV (서열번호 28)	WASTRHT (서열번호 29)	QQYSRYPYT (서열번호 30)
Chi-128	RASSSIRSSYLH (서열번호 36)	STSNLAS (서열번호 37)	QQFSGYPLT (서열번호 38)

[0139]

[0140] (표 S3) 일부 항체의 가변 영역 서열

명칭	영역	아미노산 서열	서열번호
Chi-131	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWV KQKPGQGLEWIGYFNPYNDGTNYNEKFKGKATLTSKSS NTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGGVRRYFDVWGAGTTV TVSS	7
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNLWLQLGP DGTIKRLIYATFSLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESED FVDYYCQQYANFPPTFGGGTKLEIK	8
Chi-169	VH	EVKLVESSGGLVKGASLKLSCAASGFTFSNYGMSWVR QTSDKRLEWVASISSGGRIYYPDNVKGRFTISRENAKNT LYLQMSLKSSEDALYYCTRHAMDNWGQGTSVIVSS	15
	VL	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSNMYWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTSSMEAE DASTYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELK	16
Chi-89	VH	EVQLVESGGDLVKGGSLLKSCAASGFTFSSYGMSWVRQ TPDKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTFSRDNAKNTL YLQMSLKSSEDAMYYCVRQALRYHMDSWGQGTSVTV SS	23
	VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQ KPGQSPKALIYSASYRYSQVDRFTGSGSGTDFTLTISNVQ SEDLADFFCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	24
Chi-105	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMNWV KQSHGKSLEWIGYIYPNNGGTGYNQRFKATLTADKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCARWGGTRLGYAMDYWGQ GTSVTVSS	31
	VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVVWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQSEDLADYFCQQYSRYPYTFGGGKLEIK	32
Chi-128	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKVSACAASGFTFSSFGMHWVR QAPEKGLEWVAYISRGSSIIYADTVKGRFTISRDNPKNT LFLQMTSLRSEDAMYYCARSYGSSSYFDYWGQGT LTVSS	39
	VL	ENVLTQSPAIMASAPREKVTMTCRASSIRSSYLHWYQQK SGASPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTSSVEA EDAATYYCQQFSGYPLTFGGGKLEIK	40

[0141]

[0142] II. 항체 변이체

[0143] 일부 실시형태에서, 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편의 변이체가 제공된다. 항-GPRC5D 항체의 아미노산 서열 변이체는 항-GPRC5D 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들면 항체의 아미노산 서열 내에서의 아미노산 잔기의 결실, 아미노산 서열 내로의 아미노산 잔기의 삽입, 및/또는 아미노산 서열 내에서의 아미노산 잔기의 치환이다. 최종 변이체가 바람직한 특성, 예를 들면, 항원 결합 효과, 예를 들면, 종양 사멸 효능 등을 갖는 한, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 생성하여 최종 구조물을 얻을 수 있다.

[0144] III. 융합 단백질

[0145] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0146] IV. 약학적 조성물

[0147] 본 발명은 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 융합 단백질을 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 항체 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131, Chi-164, Chi-169 및 Chi-180 중 임의의 하나 이상 및 약학적으로 허용 가능한 담체는 약학적 조성물로 제제화된다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 예를 들면, 부형제, 희석제, 캡슐화 물질, 필터, 완충제 또는 기타 제제가 포함된다.

[0148] V. 단리된 핵산

[0149] 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131, Chi-164, Chi-169 또는 Chi-180의 항원 결합 단편 등의 항원 결합 단편을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131, Chi-164, Chi-169 및 Chi-180 등의 항체를 인코딩한다. 서열목록에 있어서, 일부 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편의 핵산 서열이 예시적으로 열거된다.

[0150] VI. 벡터

[0151] 본 발명은 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 클로닝 벡터이고, 다른 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 선택적으로, 발현 벡터는 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 발현할 수 있는 임의의 발현 벡터이다. 구체적인 일례로서, 발현 벡터는 pcDNA3.1이다.

[0152] VII. 숙주 세포

[0153] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 벡터를 포함하거나 게놈에 통합된 핵산을 갖는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 클로닝하거나 발현하는데 적합한 숙주 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 일부 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 효모 세포, 포유동물 세포, 또는 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제조하는데 적합한 다른 세포로부터 선택된다. 포유동물 세포는, 예를 들면 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포 및 CHO-S 세포이다.

[0154] VIII. 항-GPRC5D 항체 및 그 항원 결합 단편의 제조 방법

[0155] 일부 실시형태에서, 본 발명은 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포 또는 숙주 세포 배양물로부터 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함한다.

[0156] 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제조하기 위해, 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산을 벡터에 삽입하여 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 행한다. 핵산은 유전자 스플라이싱 및 화학적 합성 등 해당 분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 단리는 원심분리 또는 친화성 크로마토그래피 등의 절차를 통해 행해질 수 있다.

[0157] IX. 용도

[0158] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 융합 단백질은 암을 치료하거나, 종양을 감소시키거나, 종양 세포 성장을 억제시키는 데 사용될 수 있다.

[0159] 본 발명은 의약품 제조를 위해 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 융합 단백질의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 그 용도는 질병 치료용 약제를 제조하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 그 용도는 종양 감소 또는 종양 세포 성장 억제용 약제를 제조하기 위한 것이다.

[0160] 본 발명은 대상체의 종양 세포 성장을 감소 또는 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료 유효량의 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 융합 단백질 또는 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0161] 본 발명은 대상체의 질병을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료 유효량의 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 융합 단백질 또는 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0162] 치료가 필요한 대상체는 질병 또는 상태를 지니고 있는 대상체뿐만 아니라 질병 또는 상태를 지닐 가능성이 있어 질병 또는 상태를 예방, 지연 또는 약화시키는 것이 목적인 대상체도 포함된다.

- [0163] 상술한 질병으로는 암 또는 자가면역 질병이다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질병은 예를 들면, 전신 홍반성 루푸스 및/또는 류마티스 관절염이다. 일부 실시형태에서, 암은 다발성 골수종이다.
- [0164] 일부 실시형태에서, 샘플에서 GPRC5D를 검출하거나 측정하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 샘플을 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계 및 결합 복합체를 검출하거나 측정하는 단계를 포함한다.
- [0165] X. 키트
- [0166] 본 발명은 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 융합 단백질, 또는 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0167] 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 융합 단백질 또는 약학적 조성물을 포함하는 키트가 본원에 기재된다. 키트는 본원에 제공된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 융합 단백질 또는 약학적 조성물의 용도 또는 다른 용도를 구현하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 융합 단백질, 또는 약학적 조성물 및 생물학적 샘플에서의 GPRC5D의 존재를 검출하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 키트는 사용 지침이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 키트는 기타 완충액, 희석제, 니들, 시린지 등과 같이 상업적 및 사용자 관점에서 필요한 기타 재료가 포함될 수 있다.
- [0168] 본 발명은 이하의 구체적인 실시형태를 제공하지만, 본 발명의 범위는 이것에 한정되는 것으로 의도되지 않는다.
- [0169] 실시형태 1. 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편으로서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0170] 서열번호 1, 9, 17, 25 또는 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0171] 서열번호 2, 10, 18, 26 또는 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0172] 서열번호 3, 11, 19, 27 또는 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0173] 서열번호 4, 12, 20, 28 또는 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0174] 서열번호 5, 13, 21, 29 또는 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0175] 서열번호 6, 14, 22, 30 또는 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0176] 실시형태 2. 실시형태 1에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항-GPRC5D 항체는,
- [0177] (i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0178] 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0179] 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0180] 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0181] 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0182] 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0183] (ii) 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0184] 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0185] 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0186] 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0187] 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0188] 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0189] (iii) 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0190] 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

- [0191] 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0192] 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0193] 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0194] 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0195] (iv) 서열번호 25로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0196] 서열번호 26으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0197] 서열번호 27로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- [0198] 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0199] 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0200] 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0201] (v) 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0202] 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0203] 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0204] 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0205] 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0206] 서열번호 38로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0207] 실시형태 3. 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편으로서, 항-GPRC5D 항체는 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0208] 실시형태 4. 실시형태 3에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항-GPRC5D 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고; 또는 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 가변 영역 서열의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 가변 영역 서열의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다.
- [0209] 실시형태 5. 실시형태 1-4 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0210] 실시형태 6. 실시형태 1-5 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0211] 실시형태 7. 실시형태 1-6 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 서열번호 7, 15, 23, 31 또는 39로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 16, 24, 32 또는 40으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0212] 실시형태 8. 실시형태 7에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 이하의 것 중 어느 하나로부터 선택된다:

- [0213] (i) 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0214] (ii) 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0215] (iii) 중쇄 가변 영역은 서열번호 23로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0216] (iv) 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 또는
- [0217] (v) 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0218] 실시형태 9. 실시형태 7에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 이하로 이루어지는 군 중 어느 하나로부터 선택된다:
- [0219] (i) 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0220] (ii) 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0221] (iii) 중쇄 가변 영역은 서열번호 23으로 표시된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0222] (iv) 중쇄 가변 영역은 서열번호 31로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 또는,
- [0223] (v) 중쇄 가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0224] 실시형태 10. 실시형태 1-9 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단리된 CDR 영역 또는 scFv이다.
- [0225] 실시형태 11. 실시형태 1-10 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항-GPRC5D 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체이다.
- [0226] 실시형태 12. 실시형태 1-11 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항-GPRC5D 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아이소타입이다.
- [0227] 실시형태 13. 실시형태 1-12 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편은 인간 GPRC5D 항원과 결합하고, 선택적으로 이하의 특성 중 어느 하나 이상을 더 특징으로 포함한다:
- [0228] (1) 원숭이 GPRC5D 항원과 결합;
- [0229] (2) 마우스 GPRC5D 항원과 결합;
- [0230] (3) GPRC5A, GPRC5B 및 GPRC5C의 하나 이상과 결합하지 않음.
- [0231] 실시형태 14. 실시형태 1-13 중 어느 하나에 따른 단리된 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편에 있어서, 항-GPRC5D 항체는 단일 특이적 항체 또는 다중 특이적 항체이다.
- [0232] 실시형태 15. 융합 단백질이 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0233] 실시형태 16. 약학적 조성물이 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 또는 실시형태 15에 따른 면역 접합체를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0234] 실시형태 17. 단리된 핵산이 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 인

코딩한다.

- [0235] 실시형태 18. 벡터가 실시형태 17에 따른 핵산을 포함한다.
- [0236] 실시형태 19. 숙주 세포가 실시형태 18에 따른 벡터를 포함하거나, 실시형태 17에 따른 핵산과 게놈에 통합된다.
- [0237] 실시형태 20. 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제조하는 방법은, 실시형태 19에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 숙주 세포 또는 숙주 세포 배양물로부터 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함한다.
- [0238] 실시형태 21. 질병을 치료하거나, 종양을 감소시키거나, 또는 종양 세포 성장을 억제시키기 위한 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 실시형태 15에 따른 융합 단백질, 또는 실시형태 16에 따른 약학적 조성물로서, 바람직하게는 상기 질병은 암 또는 자가면역 질병이다.
- [0239] 실시형태 22. 질병을 치료하거나, 종양을 감소시키거나, 종양 세포의 성장을 억제시키기 위한 의약품을 제조하는, 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 및 실시형태 15에 따른 융합 단백질로서, 바람직하게는 상기 질병은 암 또는 자가면역 질병이다.
- [0240] 실시형태 23. 대상체의 종양을 감소시키거나 종양 세포의 성장을 억제시키는 방법은, 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 실시형태 15에 따른 융합 단백질 또는 실시형태 16에 따른 약학적 조성물을 치료 유효량으로 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0241] 실시형태 24. 대상체의 질병을 치료하는 방법은, 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 실시형태 15에 따른 융합 단백질 또는 실시형태 16에 따른 약학적 조성물을 치료 유효량으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 바람직하게는 상기 질병은 암 또는 자가면역 질병이다.
- [0242] 실시형태 25. 실시형태 21, 22 및 24 중 어느 하나에 따른 실시형태에 있어서, 암은 다발성 골수종이다.
- [0243] 실시형태 26. 키트가 실시형태 1-14 중 어느 하나에 따른 항-GPRC5D 항체 또는 그 항원 결합 단편, 실시형태 15에 따른 융합 단백질, 또는 실시형태 16에 따른 약학적 조성물을 포함한다.

[0244] **실시에**

[0245] **실시에 1: 항원 면역**

[0246] 1. DNA 항원 면역

[0247] 인간 GPRC5D 단백질을 인코딩하는 cDNA 서열(서열번호 41로 표시되는 아미노산 서열)이 유전자 합성에 의해 얻어지고, 발현 벡터 pcDNA3.1(+에 서브클로닝되어 플라스미드 pcDNA3.1-hGPRC5D를 구축하였다. EndoFree Plasmid Giga Kit(QIAGEN, Cat. No.: 12391)의 지침에 따라서 다량의 플라스미드가 제조되었다.

[0248] 플라스미드 pcDNA3.1-hGPRC5D가 항원으로 사용되어 A/J 마우스(Nanjing University의 Model Animal Institute), BALB/c 마우스(Shanghai Lingchang) 및 SJL 마우스(Beijing Vital River)를 각각 면역화시켰다. 우선, 전치리를 위해 히알루로니다아제(Sigma, Cat. No.: H4272)를 각각의 마우스의 좌우 뒷다리 근육에 미리 주입하였다. 이어서, CpG(InvivoGen, Cat. No.: tlr1-1826) 및 플라스미드 pcDNA3.1-hGPRC5D를 1:1의 질량비로 잘 혼합하였고, 잘 혼합된 항원 복합체를 인비보 유전자 도입기기(Shanghai Teresa Biotechnology Co., Ltd., type II)로 마우스 근육의 전치리된 부위에 주입하였다. 상기 면역 절차를 2~3주에 한번씩 반복하여 총 4회 면역화를 행했다. 상기 면역의 완료 후, 각각의 마우스로부터 혈청을 수집하였다.

[0249] 2. 마우스 혈청 역가 평가

[0250] DNA 항원으로 면역화된 마우스에서 제조된 항-인간 GPRC5D 항체의 면역 반응을 평가하기 위해, 마우스 혈청의 항체 역가를 FACS에 의해 검출하였다. 이후의 비장 세포 융합 전에 집중 면역화를 위하여 보다 높은 혈청 역가를 지닌 마우스가 선택되었다.

[0251] 3. 세포 항원 면역화

[0252] 리포펙타민 3000 트랜스펙션 시약(Thermo, Cat. No.: L3000015)의 지침에 따라서 플라스미드 pcDNA3.1-hGPRC5D를 CHO-K1 세포에 트랜스펙션시켜 안정한 고발현의 hGPRC5D를 지닌 세포주 CHO-K1-hGPRC5D^{hi}를 얻었다. 항원으

로서 상기 CHO-K1-hGPCR5D^{hi} 세포에 의해 마우스가 집중 면역화가 실시되었다: 비장 세포 융합 3-4일 전, CHO-K1-hGPCR5D^{hi} 세포 현탁액을 최종 세포 농도 5×10^7 세포/mL 및 최종 농도 0.5mg/mL의 CpG(InvivoGen, Cat. No.: tlr1-1826)를 잘 혼합한 후, 100 μ L/마우스로 마우스 복강 내 주사하였다.

[0253] **실시예 2: 마우스 항-인간 GPCR5D 항체의 스크리닝**

[0254] 1. 하이브리도마 세포의 제조

[0255] 융합 당일, 적혈구 용해 완충액(Sigma, Cat. No.: R7757)을 첨가하기 전에 마우스 비장을 무균적으로 수집하고 분쇄하였다. PBS 용액으로 세포를 세척한 후, 비장 세포를 전기 융합 완충액(BTX, Cat. No.: 47-0001)에 재현탁시켰고, SP2/0 마우스 골수종 세포와 세포수비 2:1로 잘 혼합하였다. 전기 융합 시스템(BTX)을 사용하여 비장 세포 융합이 행해졌다. 1 \times HAT(Gibco, Cat. No.: 21060-017)을 함유하는 하이브리도마 배지(Gibco, Cat.No.: 12045-076)를 첨가하여 융합된 세포를 희석하였고, 이어서 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂에서 7-10 일간 배양하여 하이브리도마 세포를 제조하였다. 마우스 항-인간 GPCR5D 항체의 스크리닝을 위해 하이브리도마 세포의 배양 상층액을 수집하였다.

[0256] 2. 안정적인 세포주의 구축

[0257] 세포 수준에서 마우스 항-인간 GPCR5D 항체의 중 교차-결합 활성을 평가하기 위해, 이하의 세포주를 구축하였다: 전체 길이 원숭이 GPCR5D(서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열) 및 마우스 GPCR5D(서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열)를 인코딩하는 cDNA가 유전자 합성에 의해 얻어진 후, 벡터 pcDNA3.1(+)에 서브클로닝되어 pcDNA3.1-cynoGPCR5D 및 pcDNA3.1-murineGPCR5D 재조합 플라스미드를 얻었다. 리포펙타민 3000 트랜스펙션 시약(Thermo, Cat. No.: L3000015)의 지침에 따라서, 플라스미드 pcDNA3.1-cynoGPCR5D 및 pcDNA3.1-murineGPCR5D를 각각 CHO-K1 세포에 트랜스펙션시켜 안정한 세포주 CHO-K1-cynoGPCR5D 및 CHO-K1-murineGPCR5D를 얻었다.

[0258] 3. ELISA에 의한 예비 세포 스크리닝

[0259] 로그 성장 단계에서 CHO-K1-hGPCR5D hi 세포를 수집하였고, 10%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 DMEM/F-12 배지(Gibco, Cat. No.: 11320033)에 재현탁하였다. 세포 농도를 1×10^6 세포/mL로 조정하였다. 세포가 96웰 편평한 바닥 플레이트에 100 μ L/웰로 평판 배양되었고, 이어서 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂에서 밤새 배양되었다. 다음날, 세포 플레이트를 4%(부피 기준으로) 과라포름알데히드 고정액(Beyotime, Cat. No.: P0099)이 첨가되기 전에 PBS로 세척하였고, 실온에서 30분 동안 방치하였다. 플레이트가 PBS로 세척된 후, 3%(부피 기준으로) BSA를 함유하는 PBS 용액이 200 μ L/well로 첨가되었다. 상기 혼합물이 실온에서 2시간 동안 블로킹되었다. 블로킹 후, 하이브리도마 세포 배양 상층액이 100 μ L/well로 세포 플레이트에 첨가되었고, 상기 혼합물이 실온에서 2시간 동안 배양되었다. 플레이트가 PBS로 세척되었다. 이어서, HRP-콘쥬게이팅된 염소 항-마우스 IgG+IgM(H+L) 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 115-035-068)가 첨가되었고, 상기 혼합물이 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 플레이트가 PBS로 세척된 후, TMB 반응 용액(Solarbio, Cat. No.: RP1200)이 100 μ L/웰로 첨가되었고, 혼합물이 5분 동안 암실의 실온에서 배양되었다. 반응이 0.5M H₂SO₄에 의해 정지되었다. Bio-rad iMark 마이크로플레이트 리더를 사용하여 OD450 흡광도가 관독되었다. FACS에 의한 후속 스크리닝을 위한 포지티브 클론으로서, 흡광도가 1.0보다 큰 배양 상층액에 해당하는 하이브리도마 세포가 선택되었다.

[0260] 4. 플로우 사이토메트리 FACS에 의한 항체 스크리닝

[0261] 96웰 U-바닥 플레이트에 5×10^5 세포/mL의 세포 농도로 CHO-K1-cynoGPCR5D 세포 현탁액이 100 μ L/웰로 평판 배양하였다. 포지티브 클론의 배양 상층액이 100 μ L/웰로 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양되었다. 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세포가 세척되었다. AlexaFluor488 콘쥬게이팅된 염소 항-마우스 IgG+IgM(H+L) 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 115-545-044)가 첨가되었고, 상기 혼합물이 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토메트리(Sartorius, IQue3)를 사용하여 형광 시그널이 검출되었다. 항-hGPCR5D 항체와 CHO-K1-cynoGPCR5D 세포의 결합이 염색의 평균 형광 강도(MFI)로 분석되었다.

[0262] 5. 서브클론의 제조

[0263] ELISA 및 FACS로 세포 스크리닝 후, CHO-K1-hGPCR5D^{hi} 및 CHO-K1-cynoGPCR5D에 모두 포지티브적으로 결합하는

하이브리도마 세포가 확장 배양을 위해 선택되었다. 확장된 세포가 반고형 배지 D(Stemcell, Cat. No.: 3810)와 부피비 1:10으로 잘 혼합된 후, 37°C/5% CO₂에서 5일 동안 배양되었다. 단일 클론 세포 질량이 4배 현미경 관찰에 하에 피펫팅되었고, 하이브리도마 배지(Gibco, Cat. No.: 12045-076)를 사용하여 평판 배양된 96웰 플레이트로 트랜스퍼되었다. 이어서, 단일 클론 세포 질량이 2일 동안 37°C/5% CO₂로 배치되어 배양이 지속되었다. 서브클론의 추가 스크리닝을 위해 각 웰의 서브클로닝된 세포 배양 상청액을 수집하였다.

[0264] 6. 서브클론의 스크리닝

[0265] (1) FACS에 의한 항-hGPCR5D 항체의 스크리닝

[0266] H929(즉, NCI-H929) 세포 현탁액을 3×10⁵ 세포/mL의 세포 농도로 96웰 U-바닥 플레이트에 100 μL/웰로 평판 배양하였다. 서브클로닝된 세포 배양 상청액을 100 μL/웰 또는 등량의 배양 배지(이하, Medium이라 함)로 첨가되었다. 혼합물이 잘 혼합된 후, 4°C에서 1시간 동안 배양되었다. 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세포를 세척하였다. AlexaFluor488-콘주게이팅된 염소 항-마우스 IgG+IgM(H+L) 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 115-545-044)가 첨가되었고, 상기 혼합물이 4°C에서 1시간 동안 배양되었다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후 재현탁되었다. 플로우 사이토메트리(Sartorius, IQue3)를 사용하여 형광 시그널이 검출되었다. 마우스 항-hGPCR5D 항체와 H929 세포의 결합이 염색의 평균 형광 강도(MFI)에 의해 분석되었다. 결과의 일부가 표 1에 나타내어진다.

[0267] (표 1) FACS에 의해 마우스 항-hGPCR5D 항체와 H929 세포의 결합 분석

클론 번호	H929MFI	클론 번호	H929MFI	클론 번호	H929MFI
mu-7	53151	mu-74.3	18078	mu-131	12826
mu-9	10704	mu-89	11919	mu-153	46867
mu-45	21606	mu-105	13248	mu-164	14184
mu-38.1	75956	mu-125	11670	mu-169	59318
mu-35	54719	mu-126	10271	mu-180	26579
mu-51	95531	mu-128	15661	mu-183	27008
mu-58	464150	mu-129	7904	Medium	8242

[0268]

[0269] (2) 항-hGPCR5D 항체의 세포 ELISA 스크리닝

[0270] 로그 성장 단계의 CHO-K1-hGPCR5D^{hi} 세포, CHO-K1-cynoGPCR5D 세포, CHO-K1-murineGPCR5D 세포 및 CHO-K1 세포를 각각 수집하고, 10%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 DMEM/F-12(Gibco, Cat. No.: 11320033) 배지에 재현탁시켰다. 세포 농도는 1×10⁶ 세포/mL로 조정되었다. 세포가 100 μL/웰로 96웰 편평한 바닥 플레이트에 평판 배양된 후 37°C/5% CO₂에서 밤새 배양되었다. 다음날, 4%(부피 기준으로) 파라포름알데히드 고정액(Beyotime, Cat. No.: P0099)을 첨가하기 전에 세포 플레이트를 PBS로 세척하였고, 실온에서 30분 동안 방치하였다. 상기 플레이트를 PBS로 세척한 후, 3%(부피 기준으로) BSA를 함유하는 PBS 용액을 200 μL/웰로 첨가하였다. 상기 혼합물이 2시간 동안 실온에서 블로킹되었다. 블로킹 후, 서브클로닝된 세포 배양 상청액이 50 μL/웰로 각각의 세포 플레이트에 첨가되었고, 상기 혼합물이 실온에서 2시간 동안 배양되었다. 상기 플레이트가 PBS로 세척되었다. 이어서, HRP-콘주게이팅된 염소 항-마우스 IgG+IgM(H+L) 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 115-035-068)가 첨가되었고, 상기 혼합물이 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 상기 플레이트가 PBS로 세척된 후, TMB 반응액(Solarbio, Cat. No.: RP1200)이 100 μL/웰로 첨가되고, 상기 혼합물이 실온의 암소에서 5분 동안 배양되었다. 반응이 0.5M H₂SO₄를 사용하여 중지되었다. Bio-rad iMark 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 OD450 흡광도가 판독되었다. 대조구 셀 CHO-K1과 비교하여 CHO-K1-hGPCR5D^{hi} 세포, CHO-K1-cynoGPCR5D 세포 및(또는) CHO-K1-murineGPCR5D 세포의 흡광도에서 적어도 2배의 차이를 갖는 일반적인 마우스 항-hGPCR5D 항체(예를 들면, mu-89, mu-105, mu-126, mu-128, mu-131, mu-153, mu-164, mu-169, mu-180 및 mu-183 등)에 대해서, 도 1에 나타내는 바와 같이 Graphpad Prism을 사용하여 서브클론 흡광도 히스토그램을 생성하였다.

[0271] 실시예 3: 항-hGPCR5D 키메라 항체의 제조

[0272] 1. 마우스 항-hGPCR5D 항체의 가변 영역의 시퀀싱

[0273] 선별된 하이브리도마 세포의 전체 RNA는 RNA 추출 키트(Takara, Cat. No.: 9767)의 지시에 따라 단리되었고, 역전사 키트(Thermo, Cat. No.: K1652)에 의해 제 1 가닥 cDNA를 합성하였다. 제 1 가닥 cDNA가 템플릿으로서 사용되었고, 마우스 중쇄 불변 영역 프라이머 및 경쇄 불변 영역 프라이머와 각각 혼합되었다. 이어서, 상기 cDNA가 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 클로닝되고 시퀀싱되어 마우스 항-hGPCR5D 항체의 가변 영역의 서열이 얻어졌다.

[0274] 2. 키메라 항체의 발현 벡터의 구축

[0275] 화학적 합성에 의해, 마우스 항-hGPCR5D 항체의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 뉴클레오티드 서열을 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 Kappa 경쇄 불변 영역의 뉴클레오티드 서열과 결합시켰다. 트랜스팩션 및 발현을 위해, pcDNA3.1(+) 벡터를 이용하여 재조합 인간-마우스 키메라 항체 발현 벡터를 구축하여 키메라 항체를 제조하였다. 상기 키메라 항체의 전체 길이와 VH/VL의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 표 2에 상세히 기재된다.

[0276] (표 2) 키메라 항체의 전체 길이와 VH/VL의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열

클론 번호	중쇄 아미노산/뉴클레오티드 서열	VH 아미노산 서열	경쇄 아미노산/뉴클레오티드 서열	VL 아미노산 서열
Chi-89	서열번호 49/50	서열번호 23	서열번호 51/52	서열번호 24
Chi-105	서열번호 53/54	서열번호 31	서열번호 55/56	서열번호 32
Chi-128	서열번호 57/58	서열번호 39	서열번호 59/60	서열번호 40
Chi-131	서열번호 61/62	서열번호 7	서열번호 63/64	서열번호 8
Chi-169	서열번호 65/66	서열번호 15	서열번호 67/68	서열번호 16

[0277]

[0278] 3. 포지티브 참조 항체의 발현 벡터의 구축

[0279] GC5B596을 참조 항체(W02018017786A2에서의 단일 클론 항체)로서 선택하였다. 화학적 합성에 의해 상기 항체의 VH(서열번호 44) 및 VL(서열번호 45)의 뉴클레오티드 서열을 얻었고, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역과 Kappa 경쇄 불변 영역의 뉴클레오티드 서열에 각각 연결하였다. 트랜스팩션 및 발현을 위해, pcDNA3.1(+) 벡터를 이용하여 포지티브 참조 항체를 발현하는 발현 벡터를 구축해서 포지티브 참조 항체를 제조하였다. 본원에서, 포지티브 참조 항체(단일 클론 항체)를 BM-mAb로 명명한다.

[0280] 4. 항-hGPCR5D 키메라 항체 및 포지티브 참조 항체의 제조

[0281] expiCHO 발현 시스템(Gibco, Cat. No.: A29129)의 사용 설명서에 따라서, 항-hGPCR5D 항체가 일시적으로 세포로 트랜스팩션되었다. 트랜스팩션된 expiCHO 세포를 37°C/8% CO₂에서 7일 동안 진탕 배양시켰다. 세포 배양 상층액을 수집한 후, 정제된 배양 상층액을 단백질 A 컬럼(G.E. Healthcare, Cat. No.: 17-5474)에 로딩하였다. 컬럼 부피의 10배에 해당하는 PBS 완충액으로 단백질 A 컬럼을 세척하였다. 단백질 A 컬럼에 결합된 IgG 항체를 아세트산 완충액(300mM 아세트산, pH 3.6)으로 용리하고, 수집하였다. 수집된 IgG 항체 성분을 한외여과 장치(분자량 컷오프 30kDa, Millipore, Cat. No.: UFC903024)에 의해 PBS 완충액으로 옮겨서 항-hGPCR5D 항체 용액을 얻었다.

[0282] 실시예 4: 인간 GPCR5D를 안정적으로 발현하는 세포에 대한 항-hGPCR5D 항체의 결합 활성 분석

[0283] 1. 안정한 고발현 인간 GPCR5D의 세포에 대한 항-hGPCR5D 키메라 항체의 결합 특성

[0284] 세포 농도 3×10⁵ 세포/mL의 CHO-K1-hGPCR5D^{hi} (GPCR5D 발현 레벨이 약 2E+06~3E+06 항원/세포임) 세포 상층액이 100 μL/웰로 96웰 U-바닥 플레이트에 평판 배양되었다. 연속 희석 항-hGPCR5D 항체(최종 농도 범위 4.1~3000ng/mL, 연속적으로 3배 희석)가 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 1시간 동안 4°C에서 배양되었다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척되었다. PE-콘주게이팅된 염소 항-인간 IgG Fc γ 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 109-116-170)가 첨가되었고, 상기 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토미터

(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. 항-hGPCR5D 항체와 CHO-K1-hGPCR5D^{hi} 세포의 결합을 염색의 평균 형광 강도(MFI)로 분석하였다. GraphpadPrism으로 계산된 EC₅₀의 분석 결과는 도 2에 나타내었다. 키메라 항체 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131, Chi-164, Chi-169 및 Chi-180은 모두 hGPCR5D의 높은 발현의 세포에 대해 농도 구배 의존적 방법으로 결합 활성을 나타내었고, BM-mAb보다 높은 항원에 대한 최대 결합량을 가졌다.

[0285] 2. 안정한 저발현 인간 GPCR5D의 세포에 대한 항-hGPCR5D 키메라 항체의 결합 특성

[0286] 리포펙타민3000 트랜스펙션 시약(Thermo, Cat. No.: L3000015)의 지침에 따라, 플라스미드 pcDNA3.1-hGPCR5D를 CHO-K1 세포로 트랜스펙션하여 안정한 저발현의 세포주 CHO-K1-hGPCR5D^{low}를 얻었다(약 2000-2500 항원/세포의 GPCR5D 발현 레벨). 세포 농도 3×10^5 세포/mL의 CHO-K1-hGPCR5D^{low} 세포 상청액이 100 μ L/웰로 96웰 U-바닥 플레이트에 평균 배양되었다. 연속 희석 항-hGPCR5D 항체(최종 농도 범위 4.1-3000ng/mL, 연속적으로 3배 희석)가 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 1시간 동안 4°C에서 배양되었다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척되었다. PE-콘주게이팅된 염소 항-인간 IgG Fc γ 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 109-116-170)를 첨가하였고, 상기 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토미터(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. 항-hGPCR5D 항체와 CHO-K1-hGPCR5D^{low} 세포의 결합을 염색의 평균 형광 강도(MFI)에 의해 분석하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, hGPCR5D의 발현이 낮은 세포에 대해, 키메라 항체 Chi-89, Chi-105, Chi-164 및 Chi-180은 BM-mAb에 필적하는 결합 레벨을 나타내는 반면에, Chi-128, Chi-131 및 Chi-169는 강력한 표적 결합 능력을 나타내었다.

[0287] 실시예 5: 종양 세포에 대한 항-hGPCR5D 항체의 결합 활성 분석

[0288] 3×10^5 세포/mL의 세포 농도로 H929 및 MM1S 인간 골수종 세포 현탁액을 96웰 U-바닥 플레이트에 100 μ L/웰로 각각 평균 배양하였다. 연속 희석된 항-hGPCR5D 항체(최종 농도 범위 4.1-3000ng/mL, 연속적으로 3배 희석)가 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 1시간 동안 4°C에서 배양되었다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척되었다. PE-콘주게이팅된 염소 항-인간 IgG Fc γ 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 109-116-170)를 첨가하였고, 상기 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토미터(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. 항-hGPCR5D 항체와 인간 골수종 세포의 결합을 염색의 평균 형광 강도(MFI)로 분석하였다. Graphpad Prism을 사용하여 플로팅된 도 4A 및 도 4B에 나타내는 바와 같이, 키메라 항체 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131 및 Chi-169가 모두 H929 및 MM1S 세포에 대한 농도 구배 의존적 방법에서 결합 활성을 나타내었다.

[0289] 실시예 6: 항-hGPCR5D 항체의 종 교차 활성 분석

[0290] 96웰 U-바닥 플레이트에 100 μ L/well로 5×10^5 세포/mL의 세포 농도로 CHO-K1-cynoGPCR5D 및 CHO-K1-murineGPCR5D 세포 현탁액을 각각 평균 배양하였다. 연속 희석된 항-hGPCR5D 항체(최종 농도 범위 4.6-10000ng/mL, 연속적으로 3배 희석)가 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 1시간 동안 4°C에서 배양되었다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척되었다. PE-콘주게이팅된 염소 항-인간 IgG Fc γ 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 109-116-170)를 첨가하였고, 상기 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포가 2%(부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토미터(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. CHO-K1-cynoGPCR5D 및 CHO-K1-murineGPCR5D 세포와 항-hGPCR5D 항체의 결합이 염색의 평균 형광 강도(MFI)에 의해 분석되었다. 도 5A 및 도 5B에 나타낸 바와 같이, 키메라 항체 Chi-89, Chi-128, Chi-131 및 Chi-169는 모두 CHO-K1-cynoGPCR5D 및 CHO-K1-murineGPCR5D 세포에 대한 농도 구배 의존적 방법에서 결합 활성을 나타내었고, 이것은 이러한 항-hGPCR5D 항체가 BM-mAb에 비하여 원숭이 및 마우스 GPCR5D와 교차 결합 활성을 갖는 반면에, 키메라 항체 Chi-105는 원숭이 GPCR5D와만 교차 결합 활성을 갖는 것을 나타낸다.

[0291] 실시예 7: 항-hGPCR5D 항체의 특이성 검증

[0292] 1. 세포 레벨에서 다른 패밀리 멤버 단백질에 대한 항-hGPCR5D 키메라 항체의 결합 검증

[0293] GPCR 패밀리는 GPCR5D 외에도 GPCR5A(RAIG1), GPCR5B(RAIG2) 및 GPCR5C(RAIG3)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 전체 길이 GPCR5A(서열번호 46), GPCR5B(서열번호 47) 및 GPCR5C(서열번호 48)를 인코딩하는 cDNA를 유

전자 합성에 의해 얻은 후, 벡터 pcDNA3.1(+)에 서브클로닝하여 pcDNA3.1-GPRC5A-GFP, pcDNA3.1-GPRC5B-GFP 및 pcDNA3.1-GPRC5C-GFP 재조합 플라스미드를 얻었다. 리포펙타민3000 트랜스펙션 시약(Thermo, Cat. No.: L3000015)의 지침에 따라서, 상기 재조합 플라스미드 DNA를 CHO-K1 세포에 각각 트랜스펙션하여 안정한 세포주 CHO-K1-GPRC5A, CHO-K1-GPRC5B 및 CHO-K1-GPRC5C를 얻었다.

[0294] 96웰 U-바닥 플레이트에 100 μ L/well로 5×10^5 세포/mL의 세포 농도로 CHO-K1-GPRC5A, CHO-K1-GPRC5B 및 CHO-K1-GPRC5C 세포 현탁액을 각각 평판 배양하였다. 연속 희석된 항-hGPRC5D 항체(최종 농도 범위 4.1-3000ng/mL, 연속적으로 3배 희석)가 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 1시간 동안 4°C에서 배양되었다. 세포가 2% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척되었다. APC-콘주게이팅된 염소 항-인간 IgG Fc γ 항체(Jackson Immuno Research, Cat. No.: 109-135-098)를 첨가하였고, 상기 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포가 2% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토미터(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. CHO-K1-GPRC5A, CHO-K1-GPRC5B 및 CHO-K1-GPRC5C 세포와 항-hGPRC5D 항체의 결합이 염색의 평균 형광 강도(MFI)에 의해 분석되었다. 도 6A, 6B 및 6C에 나타낸 바와 같이, 키메라 항체 Chi-89, Chi-105, Chi-128, Chi-131 및 Chi-169는 4.1-3000ng/mL의 농도 범위로 CHO-K1-GPRC5A, CHO-K1-GPRC5B 및 CHO-K1-GPRC5C 세포 모두와 결합 활성을 나타내지 않았고, BM-mAb는 1000ng/mL 이상의 농도에서 CHO-K1-GPRC5A 세포에 대한 비특이적 결합을 나타내었다.

[0295] 2. CHO-K1 세포에 대한 항-hGPRC5D 키메라 항체의 결합 검증

[0296] 우선, EZ-linkNHS-Biotin 시약(Thermo, Cat: 20217)의 지침에 따라 비오틴 콘주게이팅된 항-hGPRC5D 항체를 제조하였고, Biotin-BM-mAb, Biotin-Chi-89, Biotin-Chi-128 및 Biotin-Chi-131로 각각 명명하였다.

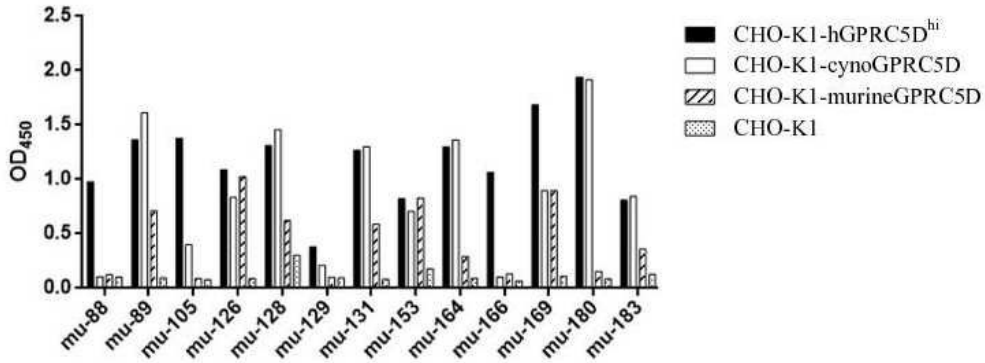
[0297] 96웰 U-바닥 플레이트에 100 μ L/well로 3×10^5 세포/mL의 세포 농도로 CHO-K1 세포 현탁액을 평판 배양하였다. 연속 희석된 비오틴 콘주게이팅된 항-hGPRC5D 항체(최종 농도 범위 4.6-10000ng/mL, 연속적으로 3배 희석)가 첨가되었다. 상기 혼합물이 잘 혼합된 후, 1시간 동안 4°C에서 배양되었다. 세포가 2% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척되었다. PE-콘주게이팅된 스트렙타비딘(BD, Cat. No.: 554061)을 첨가하였고, 상기 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포가 2% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척된 후, 재현탁되었다. 플로우 사이토미터(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. 증폭된 MFI 신호에 의해 비오틴 콘주게이팅된 항-hGPRC5D 항체가 CHO-K1 세포에 비특이적으로 결합하는지의 여부를 염색의 평균 형광 강도(MFI)를 사용하여 분석하였다. 결과는 도 7에 나타내어진다. 비오틴-콘주게이팅된 키메라 항체 Chi-89, Chi-128 및 Chi-131은 모두 CHO-K1 세포와 비결합 신호를 생성하였다.

[0298] **실시예 8: 항-hGPRC5D 항체의 내재화 활성**

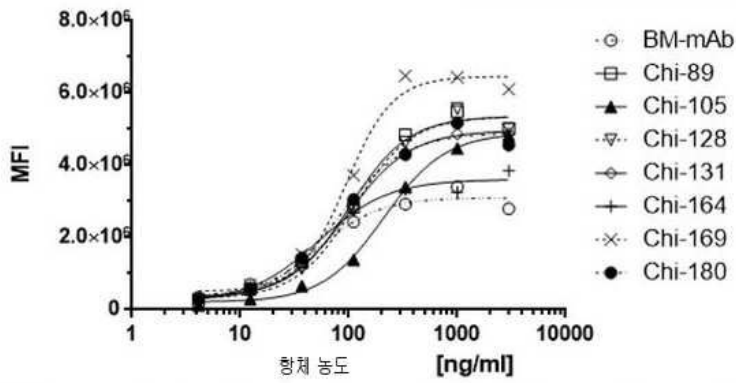
[0299] 10% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 RPMI1640 배지(Gibco, Cat. No.: 22400071)에 MM1S 세포가 재현되었다. 세포 농도를 2×10^6 세포/mL로 조정하였다. 그런 후, 상기 세포를 20 μ L/웰로 96웰 V 바닥 플레이트에 평판 배양하였다. 항-hGPRC5D 항체 BM-mAb, Chi-89, Chi-128 및 Chi-131, 및 아이소타입 대조구 항체 hIgG1(Biointron, Cat. No.: B117901)에 항체 내재화 시약(Sartorius, Cat. No.: 90564)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 암소에서 37°C로 배양하였다. 이어서, 10% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 RPMI1640 배지(Gibco, Cat. No.: 22400071)를 사용하여 상기 항체가 연속적으로 희석되었다(최종 농도 범위는 0.46-1000ng/mL, 연속적으로 3배 희석). 상기 혼합물이 20 μ L/웰로 피펫팅되었고, 세포 현탁액과 잘 혼합되었고, 37°C에서 2시간 동안 배양되었다. 배양이 완료된 후, 세포를 2% (부피 기준으로) FBS를 함유하는 PBS로 세척한 후, 재현탁하였다. 플로우 사이토미터(Sartorius, IQue3)를 이용하여 형광 신호를 검출하였다. 항-hGPRC5D 항체의 내재화 활성을 염색의 평균 형광 강도(MFI)로 분석하였다. 그 결과는 도 8에 나타내어진다. 키메라 항체 Chi-89, Chi-128 및 Chi-131에 의해 매개되는 표적 GPRC5D의 내재화는 BM-mAb와 필적하였으며 약한 내재화만 얻어졌다.

도면

도면1

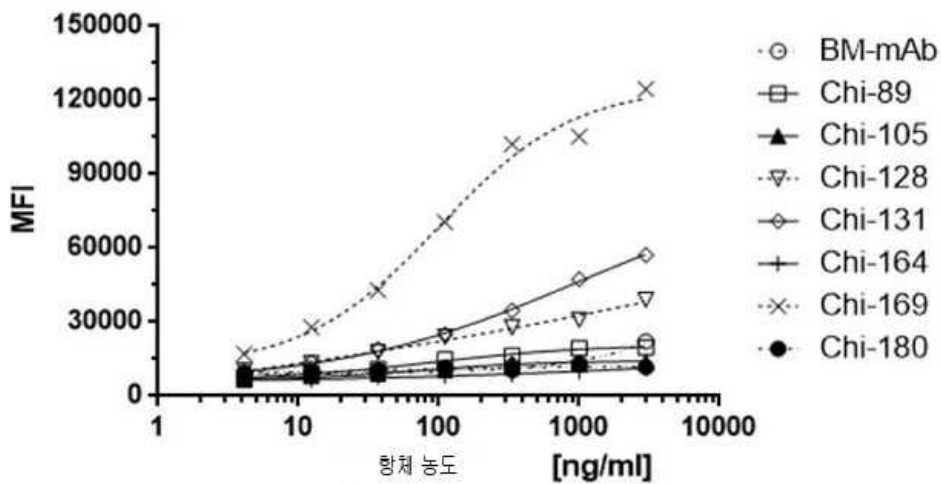


도면2

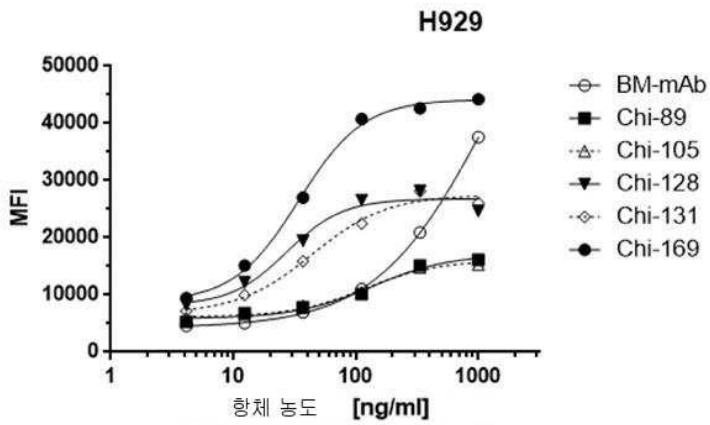


항체 번호	BM-mAb	Chi-89	Chi-105	Chi-128	Chi-131	Chi-164	Chi-169	Chi-180
EC50(nM)	0.37	0.70	1.44	0.76	0.66	0.36	0.66	0.56

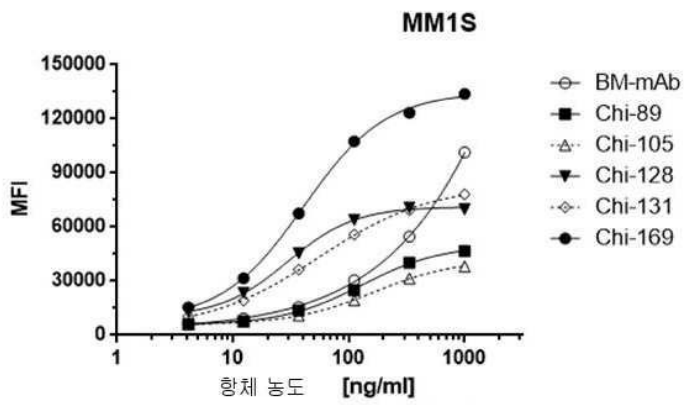
도면3



도면4

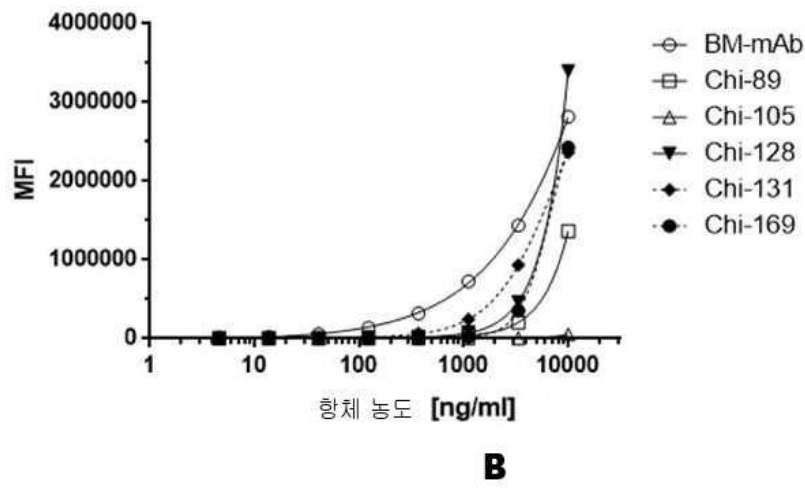
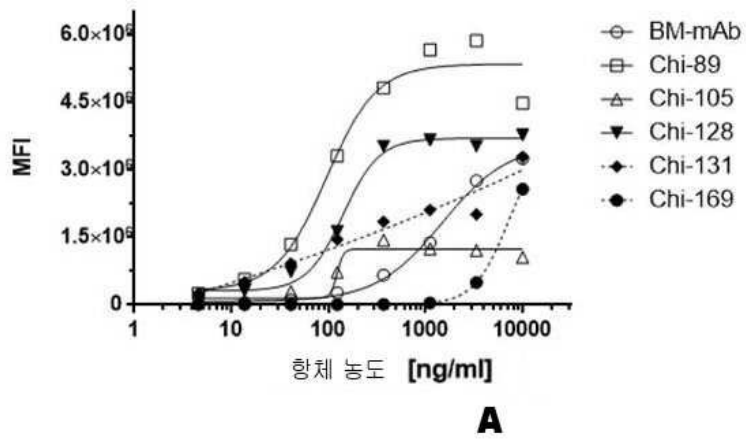


A

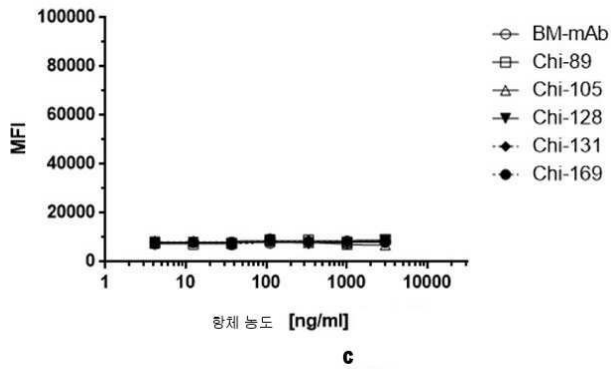
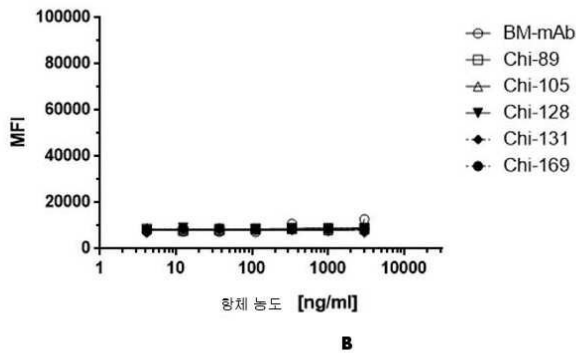
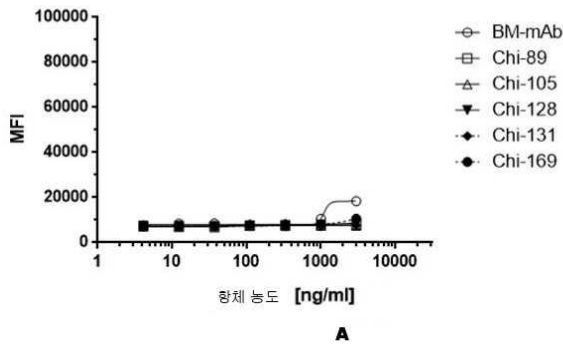


B

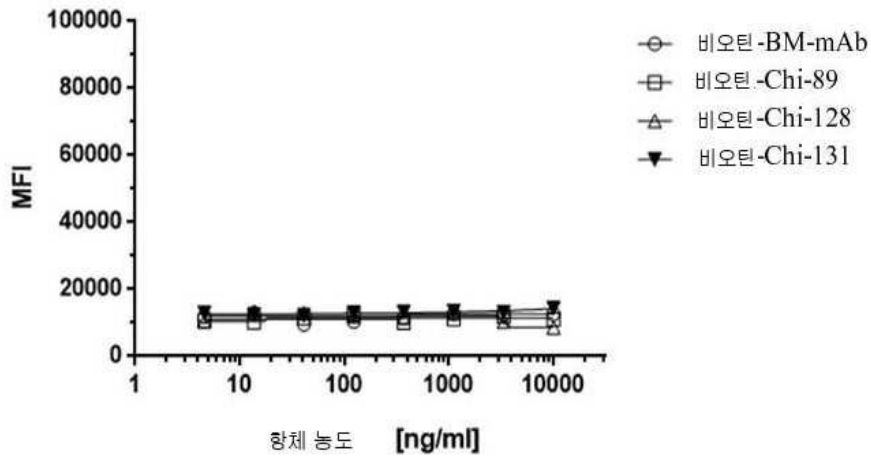
도면5



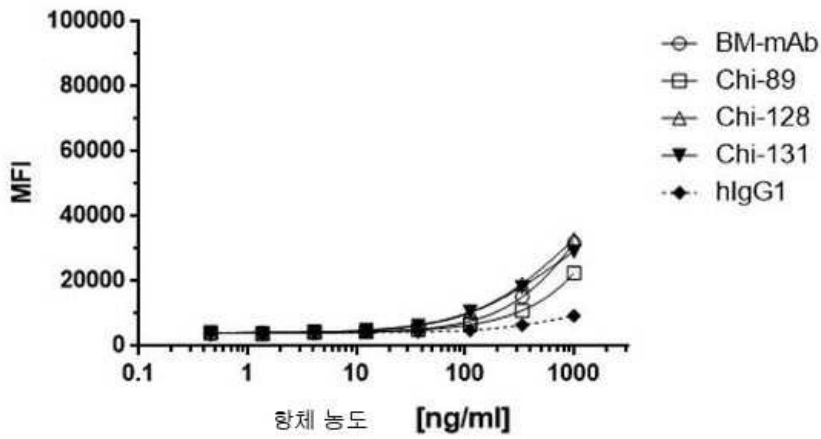
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.