

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7595176号
(P7595176)

(45)発行日 令和6年12月5日(2024.12.5)

(24)登録日 令和6年11月27日(2024.11.27)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
請求項の数 60 (全54頁)				
(21)出願番号	特願2023-540898(P2023-540898)	(73)特許権者	523252375	
(86)(22)出願日	令和4年1月5日(2022.1.5)		ラノーバ・メディシNZ・ディベロップ	
(65)公表番号	特表2024-503617(P2024-503617		メント・カンパニー・リミテッド	
	A)		LANOVA MEDICINES DE	
(43)公表日	令和6年1月26日(2024.1.26)		VELOPMENT CO. , LTD.	
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/070287		中華人民共和国201315シャNハイ	
(87)国際公開番号	WO2022/148370		、プドン・ニュー・ディストリクト、カン	
(87)国際公開日	令和4年7月14日(2022.7.14)		ンチャオ・タウン、レンナン・ビレッジ	
審査請求日	令和5年8月29日(2023.8.29)		、グループ6、ナンバー177	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/070314	(74)代理人	100145403	
(32)優先日	令和3年1月5日(2021.1.5)		弁理士 山尾 憲人	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100106518	
			弁理士 松谷 道子	
		(74)代理人	100138911	
			弁理士 櫻井 陽子	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗GPRC5Dモノクローナル抗体及びその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞毒にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体－薬物コンジュゲート（ADC）であって、前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒトGタンパク質結合受容体ファミリーC群5メンバーD（GPRC5D）タンパク質に特異的に結合し、配列番号42の重鎖相補性決定領域（HCDR）1アミノ酸配列と、配列番号43のHCDR2アミノ酸配列と、配列番号44のHCDR3アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び配列番号45の軽鎖相補性決定領域（LCDR）1アミノ酸配列と、配列番号46のLCDR2アミノ酸配列と、配列番号47のLCDR3アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、ADC。

【請求項2】

重鎖可変領域が配列番号9、48、49、又は50のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のADC。

【請求項3】

軽鎖可変領域が配列番号10、51、52、又は53のアミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載のADC。

【請求項4】

重鎖可変領域が配列番号9、48、49、又は50のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変領域が配列番号 10、51、52、又は 53 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 5】

重鎖可変領域が配列番号 48 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 51 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 6】

細胞毒にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体－薬物コンジュゲート（ADC）であって、

前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D（GPRC5D）タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 29 の重鎖相補性決定領域（HCDR）1 アミノ酸配列と、配列番号 30 の HCDR2 アミノ酸配列と、配列番号 31 の HCDR3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 32 の軽鎖相補性決定領域（LCDR）1 アミノ酸配列と、配列番号 33 の LCDR2 アミノ酸配列と、配列番号 34 の LCDR3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、ADC。

【請求項 7】

重鎖可変領域が配列番号 7、35、36、又は 37 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の ADC。

【請求項 8】

軽鎖可変領域が配列番号 8、38、39、40、又は 41 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 又は 7 に記載の ADC。

【請求項 9】

重鎖可変領域が配列番号 7、35、36、又は 37 のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変領域が配列番号 8、38、39、40、又は 41 のアミノ酸配列を含む、

請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 10】

重鎖可変領域が配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 38 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 11】

細胞毒にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体－薬物コンジュゲート（ADC）であって、

前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D（GPRC5D）タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 54 の重鎖相補性決定領域（HCDR）1 アミノ酸配列と、配列番号 55 又は 60 の HCDR2 アミノ酸配列と、配列番号 56 の HCDR3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 57 の軽鎖相補性決定領域（LCDR）1 アミノ酸配列と、配列番号 58 の LCDR2 アミノ酸配列と、配列番号 59 の LCDR3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、ADC。

【請求項 12】

重鎖可変領域が配列番号 15、61、62、63、又は 64 のアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の ADC。

【請求項 13】

軽鎖可変領域が配列番号 16、65、66、又は 67 のアミノ酸配列を含む、請求項 11 又は 12 に記載の ADC。

【請求項 14】

重鎖可変領域が配列番号 15、61、62、63、又は 64 のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変領域が配列番号 16、65、66、又は 67 のアミノ酸配列を含む、

請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載の ADC。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

重鎖可変領域が配列番号 61 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 65 のアミノ酸配列を含む、請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 16】

重鎖可変領域が配列番号 63 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 65 のアミノ酸配列を含む、請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 17】

細胞毒にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート (ADC) であって、

前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (GPRC5D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 68 の重鎖相補性決定領域 (HCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 69 の HCDR 2 アミノ酸配列と、配列番号 70 の HCDR 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 71 の軽鎖相補性決定領域 (LCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 72 の LCDR 2 アミノ酸配列と、配列番号 73 の LCDR 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、ADC。

【請求項 18】

重鎖可変領域が配列番号 1、74、75、76、77、78 又は 79 のアミノ酸配列を含む、請求項 17 に記載の ADC。

【請求項 19】

軽鎖可変領域が配列番号 2、81、82、83、84、85、又は 86 のアミノ酸配列を含む、請求項 17 又は 18 に記載の ADC。

【請求項 20】

重鎖可変領域が配列番号 1、74、75、76、77、78、又は 79 のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変領域が配列番号 2、81、82、83、84、85、又は 86 のアミノ酸配列を含む、

請求項 17 から 19 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 21】

重鎖可変領域が配列番号 76 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 82 のアミノ酸配列を含む、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 22】

重鎖可変領域が配列番号 77 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 82 のアミノ酸配列を含む、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 23】

細胞毒がマイタンシノイド又はオーリスタチンである、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 24】

細胞毒が、マイタンシン、N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)、又は N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-マイタンシン (DM1)；モノメチルオーリスタチン-D (MMAD)；モノメチルオーリスタチン E (MMAE)；及びモノメチルオーリスタチン F (MMAF) からなる群から選択される、請求項 23 に記載の ADC。

【請求項 25】

モノメチルオーリスタチン E (MMAE) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート (ADC) であって、

前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (GPRC5D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 42 の重鎖相補性決定領域 (HCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 43 の H C

10

20

30

40

50

D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 4 4 の H C D R 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 4 5 の軽鎖相補性決定領域 (L C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 4 6 の L C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 4 7 の L C D R 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、A D C。

【請求項 2 6】

モノメチルオーリスタチン E (M M A E) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート (A D C) であって、
前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、
配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び
配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む、A D C。

【請求項 2 7】

モノメチルオーリスタチン E (M M A E) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート (A D C) であって、
前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、
配列番号 5 4 の重鎖相補性決定領域 (H C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 5 5 又は 6 0 の H C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 5 6 の H C D R 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 5 7 の軽鎖相補性決定領域 (L C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 5 8 の L C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 5 9 の L C D R 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、A D C。

【請求項 2 8】

モノメチルオーリスタチン E (M M A E) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む、抗体-薬物コンジュゲート (A D C) であって、
前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、
配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び
配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む、A D C。

【請求項 2 9】

モノメチルオーリスタチン E (M M A E) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む抗体-薬物コンジュゲート (A D C) を含む、血液癌を処置するための医薬組成物であって、
前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、
配列番号 4 2 の重鎖相補性決定領域 (H C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 4 3 の H C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 4 4 の H C D R 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 4 5 の軽鎖相補性決定領域 (L C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 4 6 の L C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 4 7 の L C D R 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、医薬組成物。

【請求項 3 0】

モノメチルオーリスタチン E (M M A E) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む抗体-薬物コンジュゲート (A D C) を含む、血液癌を処置するための医薬組成物であって、
前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、
配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び
配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む、医薬組成物。

【請求項 3 1】

モノメチルオーリスタチン E (MMAE) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む抗体-薬物コンジュゲート (ADC) を含む、血液癌を処置するための医薬組成物であって、

前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (GPRC5D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 5 4 の重鎖相補性決定領域 (HCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 5 5 又は 6 0 の HCDR 2 アミノ酸配列と、配列番号 5 6 の HCDR 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 5 7 の軽鎖相補性決定領域 (LCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 5 8 の LCDR 2 アミノ酸配列と、配列番号 5 9 の LCDR 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、医薬組成物。

10

【請求項 3 2】

モノメチルオーリスタチン E (MMAE) にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む抗体-薬物コンジュゲート (ADC) を含む、血液癌を処置するための医薬組成物であって、

前記抗体又はその抗原結合断片が、ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (GPRC5D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び

配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む、医薬組成物。

20

【請求項 3 3】

請求項 2 から 4、6 から 10、12 から 14、及び 16 から 28 のいずれか一項に記載の ADC を含む、血液癌を処置するための医薬組成物。

【請求項 3 4】

血液癌が多発性骨髄腫である、請求項 29 から 33 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (GPRC5D) タンパク質に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、

配列番号 4 2 の重鎖相補性決定領域 (HCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 4 3 の HCDR 2 アミノ酸配列と、配列番号 4 4 の HCDR 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

30

配列番号 4 5 の軽鎖相補性決定領域 (LCDR) 1 アミノ酸配列と、配列番号 4 6 の LCDR 2 アミノ酸配列と、配列番号 4 7 の LCDR 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 6】

重鎖可変領域が配列番号 9、48、49、又は 50 のアミノ酸配列を含む、請求項 35 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 7】

軽鎖可変領域が配列番号 10、51、52、又は 53 のアミノ酸配列を含む、請求項 35 又は 36 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 3 8】

重鎖可変領域が配列番号 9、48、49、又は 50 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 10、51、52、又は 53 のアミノ酸配列を含む、

請求項 35 から 37 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 9】

ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (GPRC5D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び

配列番号 51 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4 0】

50

ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 29 の重鎖相補性決定領域 (H C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 30 の H C D R 2 アミノ酸配列と、に配列番号 31 の H C D R 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 32 の軽鎖相補性決定領域 (L C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 33 の L C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 34 の L C D R 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 41】

重鎖可変領域が配列番号 7、35、36、又は 37 のアミノ酸配列を含む、請求項 40 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 42】

軽鎖可変領域が配列番号 8、38、39、40、又は 41 のアミノ酸配列を含む、請求項 40 又は 41 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 43】

重鎖可変領域が配列番号 7、35、36、又は 37 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 8、38、39、40、又は 41 のアミノ酸配列を含む、

請求項 40 から 42 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 44】

重鎖可変領域が配列番号 35 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 38 のアミノ酸配列を含む、請求項 40 から 43 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 45】

ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 54 の重鎖相補性決定領域 (H C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 55 又は 60 の H C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 56 の H C D R 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 57 の軽鎖相補性決定領域 (L C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 58 の L C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 59 の L C D R 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 46】

重鎖可変領域が配列番号 15、61、62、63、又は 64 のアミノ酸配列を含む、請求項 45 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 47】

軽鎖可変領域が配列番号 16、65、66、又は 67 のアミノ酸配列を含む、請求項 45 又は 46 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 48】

重鎖可変領域が配列番号 15、61、62、63、又は 64 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 16、65、66、又は 67 のアミノ酸配列を含む、

40

請求項 45 から 47 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 49】

重鎖可変領域が配列番号 63 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 65 のアミノ酸配列を含む、請求項 45 から 48 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 50】

ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 61 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び

配列番号 65 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む、抗体又はその抗原結合断片。

50

【請求項 5 1】

ヒト G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) タンパク質に特異的に結合し、

配列番号 6 8 の重鎖相補性決定領域 (H C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 6 9 の H C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 7 0 の H C D R 3 アミノ酸配列とを含む重鎖可変領域、及び

配列番号 7 1 の軽鎖相補性決定領域 (L C D R) 1 アミノ酸配列と、配列番号 7 2 の L C D R 2 アミノ酸配列と、配列番号 7 3 の L C D R 3 アミノ酸配列とを含む軽鎖可変領域、を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 2】

重鎖可変領域が配列番号 1、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、又は 7 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 1 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 3】

軽鎖可変領域が配列番号 2、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、又は 8 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 1 又は 5 2 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 4】

重鎖可変領域が配列番号 1、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、又は 7 9 のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変領域が配列番号 2、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、又は 8 6 のアミノ酸配列を含む、

請求項 5 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 5】

重鎖可変領域が配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 6】

重鎖可変領域が配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 7】

請求項 3 9 に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、血液癌を処置するための医薬組成物。

【請求項 5 8】

請求項 5 0 に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、血液癌を処置するための医薬組成物。

【請求項 5 9】

請求項 3 5 から 3 8、4 0 から 4 9、及び 5 1 から 5 6 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、血液癌を処置するための医薬組成物。

【請求項 6 0】

血液癌が多発性骨髄腫である、請求項 5 7 から 5 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

G タンパク質結合受容体ファミリー C 群 5 メンバー D (G P R C 5 D) は、G タンパク質結合受容体ファミリーのメンバーである。G P R C 5 D は、膜貫通タンパク質である。G P R C 5 D の過剰発現が、多発性骨髄腫患者において観察された。特に、その高い発現は、疾患及び処置の悪い転帰と有意な相関があった。

【0 0 0 2】

悪性細胞上でのその高い特異的発現を考えると、G P R C 5 D に特異的な抗体が、例えば二重特異性 T 細胞リダイレクト抗体を介して、又は抗体依存性細胞傷害活性 (A D C C

10

20

30

40

50

)により、悪性腫瘍を処置するのに有用であり得ることが提唱されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

ヒトGPRC5Dタンパク質に対する親和性が高い抗GPRC5D抗体（そのヒト化誘導体を含む）が、本明細書中で発見される。当該抗体又はその断片は、GPRC5Dを発現する癌細胞を標的とすることができるので、癌、特に血液癌を処置するのに用いることができる。

【0004】

本開示の一実施形態は、ヒトGタンパク質結合受容体ファミリーC群5メンバーD（GPRC5D）タンパク質に対する結合特異性を有する抗体又はその抗原結合断片を提供し、抗体又はその断片は、重鎖相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域（VH）、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。一部の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ：（a）配列番号29～34のアミノ酸配列；（b）配列番号42～47のアミノ酸配列；（c）配列番号54～59のアミノ酸配列；又は（d）配列番号68～73のアミノ酸配列を含む。

【0005】

一部の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号29～34のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号7及び35～37からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号8及び38～41からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号35のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号38のアミノ酸配列を含む。

【0006】

一部の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号42～47のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号9及び48～50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号10及び51～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号48のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号51のアミノ酸配列を含む。

【0007】

一部の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号54～59のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号61～64からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号16及び65～67からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号61のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号65のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号63のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号65のアミノ酸配列を含む。

【0008】

一部の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号68～73のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号1及び74～79からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号2及び80～86からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号76のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号82のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、VHは、配列番号77のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号82のアミノ酸配列を含む。

【0009】

一部の実施形態において、抗体又はその断片は、ヒト化されている。一部の実施形態において、抗体又はその断片は、ADCCコンピテントである。

10

20

30

40

50

【0010】

また、提供される抗体又はその断片は、一部の実施形態において、抗体又はその断片にコンジュゲートした細胞毒性薬物をさらに含む。

【0011】

また、提供されるのは、本開示の抗原結合断片、及び第2の標的タンパク質に対する特異性を有する第2の抗原結合断片を含む二重特異性抗体である。一部の実施形態において、第2の標的タンパク質は、CD3、CD16、CD19、CD28、CD64、及び4-1BBからなる群から選択される。一部の実施形態において、第2の標的タンパク質は、CD3である。一部の実施形態において、第2の標的タンパク質は、4-1BBである。

【0012】

また、提供されるのは、癌の処置を必要とする患者において癌を処置する方法であって、患者に、本開示の抗体又はその断片を投与することを含む方法である。また、提供されるのは、癌の処置を必要とする患者において癌を処置する方法であって、(a) T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、又はマクロファージを、本開示の抗体又はその断片によりインビトロ処理することと、(b) 処理した細胞を患者に投与することを含む方法である。

【0013】

一部の実施形態において、癌は、血液癌、例えば、GPCR5D発現B細胞癌(例えば多発性骨髄腫)である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ハイブリドーマ上清から収集したマウス抗体の、CHO-K1細胞上で発現されるGPCR5Dへの結合を示す。

【図2】キメラ抗体の、CHO-K1細胞上で発現されるGPCR5Dへの結合を示す。

【図3】抗体結合誘導エンドサイトーシスを示す。

【図4】抗体がADCCコンピテントであったことを示す。

【図5】6G10D9に由来するヒト化抗体の親和性試験結果を示す。

【図6】58F9G10に由来するヒト化抗体の親和性試験結果を示す。

【図7】34D3H1に由来するヒト化抗体の親和性試験結果を示す。

【図8】37B9C4に由来するヒト化抗体の親和性試験結果を示す。

【図9】選択したヒト化抗体の、CHO-K1細胞上で発現されるGPCR5Dへの結合を確認する。

【図10】選択したヒト化抗体の、NCI-H929細胞上で発現されるGPCR5Dへの結合を確認する。

【図11】試験したヒト化抗体のADCC有効性を示す。

【図12】試験したヒト化抗体のインターナリゼーション誘導活性を示す。

【図13】試験した抗体-薬物コンジュゲートの細胞死滅活性を示す。

【図14】試験した抗体の腫瘍阻害活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義

用語「1つの(a)」又は「1つの(an)」実体は、その実体の1つ以上を指すことが認められるべきであり、例えば、「抗体(antibody)」は、1つ以上の抗体を表すことが理解される。したがって、用語「1つの(a)」(又は「1つの(an)」)、「1つ以上」、及び「少なくとも1つ」は、本明細書中で互換的に用いることができる。

【0016】

本明細書中で用いられる用語「ポリペプチド」は、単数形「ポリペプチド」及び複数形「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合(ペプチド結合としても知られている)によって線状に連結されている単量体(アミノ酸)で構成される分子を指す。用

10

20

30

40

50

語「ポリペプチド」は、2つ以上のアミノ酸のあらゆる鎖を指し、特定の長さの生成物を指すものではない。ゆえに、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は2つ以上のアミノ酸の1つ若しくは複数の鎖を指すのに用いられる他のあらゆる用語は、「ポリペプチド」の定義に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれに対しても、代わりに、又は互換的に用いることができる。また、用語「ポリペプチド」は、限定はされないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、知られている保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、又は天然に存在しないアミノ酸による修飾が挙げられるポリペプチドの発現後修飾の生成物を指すことが意図される。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来してもよいし、組換え技術によって生成されてもよいが、必ずしも指定の核酸配列から翻訳されるわけではない。ポリペプチドは、化学合成によるものが挙げられる、あらゆる方法で生成され得る。

10

【0017】

「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つのペプチド間、又は2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較の目的でアラインされ得る各配列内の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列内の位置が、同じ塩基又はアミノ酸によって占められている場合、分子は、当該位置にて相同である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有されるマッチ位置数又は相同位置数の関数である。「関連のない」配列又は「非相同」配列は、本開示の配列の1つと、40%未満の同一性、好ましくは25%未満の同一性を共有する。

20

【0018】

ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド領域（又はポリペプチド若しくはポリペプチド領域）は、もう一方の配列に対する特定のパーセンテージ（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%）の「配列同一性」（アラインされた場合に、塩基（又はアミノ酸）のパーセンテージが、2つの配列を比較した際に同じであることを意味する）を有する。

【0019】

用語「等しい核酸又はポリヌクレオチド」は、核酸又はその相補体のヌクレオチド配列との、特定の程度の相同性又は配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する核酸を指す。二本鎖核酸の相同体は、その相補体との特定の程度の相同性を有するヌクレオチド配列を有する核酸を含むことが意図される。一態様において、核酸の相同体は、核酸又はその相補体にハイブリダイズすることができる。同様に、「等しいポリペプチド」は、参照ポリペプチドのアミノ酸配列との特定の程度の相同性又は配列同一性を有するポリペプチドを指す。一部の態様において、配列同一性は、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%である。一部の態様において、等価のポリペプチド又はポリヌクレオチドは、参照ポリペプチド又はポリヌクレオチドと比較して、1、2、3、4、又は5つの追加、欠失、置換、及びそれらの組合せを有する。一部の態様において、等価の配列は、参照配列の活性（例えばエピトープ結合）又は構造（例えば塩架橋）を保持する。

30

【0020】

本明細書中で用いられる「抗体」又は「抗原結合ポリペプチド」は、抗原を特異的に認識してこれに結合するポリペプチド又はポリペプチド複合体を指す。抗体は、全抗体、及びそのあらゆる抗原結合断片又は単鎖であり得る。ゆえに、用語「抗体」は、抗原に結合する生物活性を有する免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含むあらゆるタンパク質又はペプチド含有分子を含む。そのようなものの例として、以下に限定されないが、重鎖若しくは軽鎖の相補性決定領域（CDR）又はそのリガンド結合部分、重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク（FR）領域、又はそれらのあらゆる部分、或いは結合タンパク質の少なくとも1つの部分が挙げられる。

40

【0021】

本明細書中で用いられる用語「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、 $F(ab')_2$ 、 F

50

(a b)₂、F a b'、F a b、F v、s c F v等の抗体の部分である。構造に拘らず、抗体断片は、インタクト抗体によって認識される同じ抗原と結合する。用語「抗体断片」は、アプタマー、s p i e g e l m e r、及びダイアボディを含む。また、用語「抗体断片」は、特異性抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように作用するあらゆる合成タンパク質又は遺伝子操作されたタンパク質を含む。

【0022】

「単鎖可変断片」又は「s c F v」は、免疫グロブリンの重鎖（V_H）及び軽鎖（V_L）の可変領域の融合タンパク質を指す。一部の態様において、当該領域は、10～約25アミノ酸の短いリンカーペプチドと連結されている。リンカーは、フレキシビリティについてグリシンが、そして可溶性についてセリン又はトレオニンが豊富であり得、V_HのN末端を、V_LのC末端と連結することができ、逆もまた同じである。このキメラ分子は、定常領域が除去され、且つリンカーペプチドが導入されているにも拘わらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持している。S c F v分子は、当該技術において知られており、例えば、米国特許第5,892,019号明細書に記載されている。

【0023】

用語抗体は、生化学的に区別され得る種々の広範なクラスのポリペプチドを包含する。当業者であれば、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロン（γ、μ、α、δ、ε）と分類され、それらの中でいくつかのサブクラスがある（例えば、γ₁～γ₄）ことを理解するであろう。これは、この鎖の、それぞれI g G、I g M、I g A、I g G、又はI g Eとしての抗体の「クラス」を決定する性質である。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g G₅等は、十分に特徴付けられており、機能上の特殊化を付与することが知られている。これらのクラス及びアイソタイプの各々の修飾バージョンが、当業者にとって、本開示に鑑みて容易に識別可能であり、したがって本開示の範囲内である。全ての免疫グロブリンクラスが、明らかに本開示の範囲内であり、以下の考察は、通常、免疫グロブリン分子のI g Gクラスに関する。I g Gに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量およそ23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチドと、分子量53,000～70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチドとを含む。当該4本の鎖は、典型的に、ジスルフィド結合によって「Y字型」の配置で結合されており、ここでは軽鎖が、「Y字型」の開口部から始まって可変領域を通じて続く重鎖を囲っている。

【0024】

本開示の抗体、又はその抗原結合ポリペプチド、変異体、若しくは誘導体として、以下に限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化、霊長類化、又はキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、F a b、F a b'、及びF (a b')₂、F d、F v、単鎖F v (s c F v)、単鎖抗体、ジスルフィド結合F v (s d F v)、V K又はV Hドメインのいずれかを含む断片、F a b発現ライブラリによって生成される断片、並びに抗イディオタイプ（抗I d）抗体（例えば、本明細書中に開示されるL I G H T抗体に対する抗I d抗体が挙げられる）が挙げられる。本開示の免疫グロブリン又は抗体分子は、あらゆる種類（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、及びI g Y）、クラス（例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及びI g A₂）、又はサブクラスの免疫グロブリン分子であり得る。

【0025】

軽鎖は、カッパ又はラムダ（K、λ）のいずれかと分類される。各重鎖クラスにはカッパ軽鎖又はラムダ軽鎖のいずれかが結合している。一般に、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、又は遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって生成される場合、軽鎖と重鎖とは互いに共有結合しており、2本の重鎖の「テール」部分は、共有結合性のジスルフィド結合又は非共有結合によって互いに結合している。重鎖において、アミノ酸配列は、Y配置の分岐末端におけるN末端から、各鎖の底部におけるC末端まで延びている。

【0026】

軽鎖及び重鎖は双方とも、構造的相同性及び機能的相同性の領域に分けられる。用語「

定常」及び「可変」は、機能に関して用いられる。この点に関して、軽鎖部分の可変（V K）ドメイン及び重鎖部分の可変（V H）ドメインの双方が、抗原の認識及び特異性を決定することが認識されるであろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン（C K）及び重鎖の定常ドメイン（C H 1、C H 2、又はC H 3）は、分泌、経胎盤移動度、F c受容体結合、補体結合等の重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの番号付けは、抗原結合部位又は抗体のアミノ末端からより離れるにつれて増加する。N末端部分は可変領域であり、C末端部分は定常領域である；実際には、C H 3ドメイン及びC Kドメインは、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0027】

上記に指摘した通り、抗体は、可変領域によって抗原上のエピトープを選択的に認識してこれに特異的に結合することが可能となる。すなわち、抗体のV Kドメイン及びV Hドメイン、又は相補性決定領域（C D R）のサブセットが組み合わさって、三次元抗原結合部位を定義する可変領域が形成される。この4つ一組の抗体構造は、Y字型の各アームの先に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、V H及びV K鎖の各々の上の3つのC D R（すなわち、C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2、及びC D R－L 3）によって定義される。場合によっては、例えば、ラクダ科動物種に由来するか、又はラクダ科動物免疫グロブリンをベースとして操作された特定の免疫グロブリン分子では、完全な免疫グロブリン分子が、軽鎖なしで重鎖のみからなり得る。例えば、H a m e r s－C a s t e r m a n e t a l. , N a t u r e 363:446-448 (1993) 参照。

【0028】

天然に存在する抗体では、各抗原結合ドメイン内に存在する6つの「相補性決定領域」又は「C D R」は、抗体が水性環境中でその三次元配置をとることに伴い抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置するアミノ酸の短い不連続な配列である。「フレームワーク」領域と称される、抗原結合ドメイン内の残りのアミノ酸は、分子間の変異性をそれ程示さない。フレームワーク領域は概してβシートコンホメーションをとり、C D Rは、そのβシート構造をつなぎ合わせ、且つ場合によってはβシート構造の一部を形成するループを形成する。ゆえに、フレームワーク領域は、鎖間非共有結合性相互作用によってC D Rの正しい向きでの配置をもたらす足場を形成するように作用する。C D Rの配置によって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を定義する。この相補的な表面は、抗体とそのコグネイトエピトープとの非共有結合性の結合を促進する。C D R及びフレームワーク領域をそれぞれ構成するアミノ酸は、正確に定義されているので、所与のあらゆる重鎖又は軽鎖の可変領域について当業者によって容易に特定することができる（“S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t ,” K a b a t , E . , e t a l . , U . S . D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , (1983) ; 及びC h o t h i a a n d L e s k , J . M o l . B i o l . , 196:901-917 (1987) 参照）。

【0029】

当該技術において用いられ、且つ／又は認められている用語に2つ以上の定義がある場合、本明細書中で用いられる用語の定義は、反する旨が明記されない限り、かかる意味の全てを含むことが意図される。具体的な例として、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドの双方の可変領域内に見出される非隣接抗原結合部位を説明する用語「相補性決定領域」（「C D R」）の使用がある。この特定の領域は、K a b a t e t a l . , U . S . D e p t . o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , “S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t” (1983) 及びC h o t h i a e t a l . , J . M o l . B i o l . 196:901-917 (1987)（それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる）によって説明されている。K a b a t 及びC h o t h i a に従うC D R定義は、互いに比較した場合に、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それにも拘わらず、抗体又はその変異型

の C D R に言及するのにいずれかの定義を使用するのは、本明細書中で定義され、且つ用いられる用語の範囲内にあることが意図される。先で引用された各参考文献によって定義される C D R を包含する適切なアミノ酸残基が、以下の表に比較として記載されている。特定の C D R を包含する正確な残基数は、C D R の配列及びサイズに応じて変動することとなる。当業者であれば、どの残基が、抗体の可変領域アミノ酸配列が与えられる特定の C D R を含むかをルーチン的に決定することができる。

【 0 0 3 0 】

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

10

【 0 0 3 1 】

また、K a b a t e t a l . は、あらゆる抗体に適用可能な可変ドメイン配列についての番号付与体系を定義した。当業者であれば、配列自体以外のいかなる実験データにも依存することなく、この「K a b a t 番号付与」体系をあらゆる可変ドメイン配列に明白に割り当てることができる。本明細書中で用いられる「K a b a t 付番」は、K a b a t e t a l . , 米国保健福祉省 (U . S . D e p t . o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s) , “ S e q u e n c e o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t ” (1 9 8 3) によって示される付番方式を指す。

20

【 0 0 3 2 】

上述の表に加えて、K a b a t 付番方式は、C D R 領域を以下で説明する：C D R - H 1 は、およそアミノ酸 3 1 (すなわち、最初のシステイン残基の後ろのおよそ 9 残基) から始まり、およそ 5 ~ 7 個のアミノ酸を含み、そして次のトリプトファン残基で終わる。C D R - H 2 は、C D R - H 1 の末端の後ろの 1 5 番目の残基から始まり、およそ 1 6 ~ 1 9 個のアミノ酸を含み、そして次のアルギニン又はリジン残基で終わる。C D R - H 3 は、C D R - H 2 の末端の後ろのおよそ 3 3 番目のアミノ酸残基から始まり、3 ~ 2 5 個のアミノ酸を含み、そして配列 W - G - X - G (式中、X は任意のアミノ酸である) で終わる。C D R - L 1 は、およそ残基 2 4 (すなわち、システイン残基の後ろ) から始まり、およそ 1 0 ~ 1 7 個の残基を含み、そして次のトリプトファン残基で終わる。C D R - L 2 は、C D R - L 1 の末端の後ろのおよそ 1 6 番目の残基から始まり、そしておよそ 7 個の残基を含む。C D R - L 3 は、C D R - L 2 の末端の後ろのおよそ 3 3 番目の残基 (すなわち、システイン残基の後ろ) から始まり；およそ 7 ~ 1 1 個の残基を含み、そして配列 F 又は W - G - X - G (式中、X は任意のアミノ酸である) で終わる。

30

40

【 0 0 3 3 】

本明細書中に開示される抗体は、あらゆる動物起源のものであり得、鳥類及び哺乳動物由来のものが挙げられる。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、又はニワトリ抗体である。別の実施形態において、可変領域は、軟骨魚 (c o n d r i c t h o i d) 起源 (例えばサメ由来) であり得る。

【 0 0 3 4 】

本明細書中で用いられる用語「重鎖定常領域」には、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。重鎖定常領域を含むポリペプチドは：C H 1 ドメイン、ヒンジ (例えば、上部、中央、及び／又は下部ヒンジ領域) ドメイン、C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン、又はそれらの変異体若しくは断片の少なくとも 1 つを含む。例えば、本開示に用

50

いられる抗原結合ポリペプチドは、C H 1ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、及びC H 2ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1ドメイン及びC H 3ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、及びC H 3ドメインを含むポリペプチド鎖、又はC H 1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、C H 2ドメイン、及びC H 3ドメインを含むポリペプチド鎖を含み得る。別の実施形態において、本開示のポリペプチドは、C H 3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本開示に用いられる抗体は、C H 2ドメインの少なくとも一部分（例えば、C H 2ドメインの全て又は一部）を欠いていてもよい。上記の通り、天然に存在する免疫グロブリン分子とアミノ酸配列が異なるように重鎖定常領域を修飾し得ることは、当業者によって理解されるであろう。

10

【0035】

本明細書中で開示される抗体の重鎖定常領域は、様々な免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖定常領域は、I g G₁分子に由来するC H 1ドメインと、I g G₃分子に由来するヒンジ領域とを含み得る。別の例において、重鎖定常領域は、一部がI g G₁分子に由来し、且つ一部がI g G₃分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、一部がI g G₁分子に由来し、且つ一部がI g G₄分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。

【0036】

本明細書中で用いられる用語「軽鎖定常領域」は、抗体軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖定常領域は、定常カップドメイン又は定常ラムダドメインの少なくとも1つを含む。

20

【0037】

「軽鎖－重鎖対」は、軽鎖のC Lドメインと重鎖のC H 1ドメインとの間のジスルフィド結合により二量体を形成することができる軽鎖及び重鎖のコレクションを指す。

【0038】

前述されるように、種々の免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び三次元配置は周知である。本明細書中で用いられる用語「V Hドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、用語「C H 1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖の最初（最もアミノ末端）の定常領域ドメインを含む。C H 1ドメインは、V Hドメインに隣接しており、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域よりもアミノ末端側にある。

30

【0039】

本明細書中で用いられる用語「C H 2ドメイン」は、従来の付番スキームを用いて、例えば抗体の約残基244～残基360に延在する重鎖分子の部分を含む（残基244～360、Kabat付番方式；及び残基231～340、EU付番方式；Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) 参照)。C H 2ドメインは、もう一方のドメインと緊密な対をなさない点でユニークである。むしろ、インタクトな天然I g G分子の2つのC H 2ドメイン間には2つのN結合型分岐炭水化物鎖が介在する。また、C H 3ドメインがC H 2ドメインからI g G分子のC末端まで延在し、且つおよそ108個の残基を含むことも十分に実証されている。

40

【0040】

本明細書中で用いられる用語「ヒンジ領域」は、C H 1ドメインをC H 2ドメインに連結する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、およそ25個の残基を含み、且つフレキシブルであるので、2つのN末端抗原結合領域が独立して動くのを可能にする。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン：上部、中央、及び下部ヒンジドメインにさらに分割することができる（Roux et al., J. Immunol 161: 4083 (1998)）。

【0041】

本明細書中で用いられる用語「ジスルフィド結合」は、2個の硫黄原子の間に形成され

50

る共有結合を含む。アミノ酸システインは、第2のチオール基とのジスルフィド結合又は架橋を形成し得るチオール基を含む。ほとんどの天然に存在するIgG分子では、CH1領域とCK領域とがジスルフィド結合によって連結され、且つ2つの重鎖が、Kabat付番方式を用いて239及び242に対応する位置（位置226又は229、EU付番方式）にて2つのジスルフィド結合によって連結されている。

【0042】

本明細書中で用いられる用語「キメラ抗体」は、免疫反応性の領域又は部位が第1の種から得られるか、又はこれに由来し、且つ定常領域（本開示に従えば、インタクトであっても、部分的であっても、修飾されていてもよい）が第2の種から得られる、あらゆる抗体を意味すると見なされるものとする。特定の実施形態において、標的結合領域又は部位は、非ヒト源（例えば、マウス又は霊長類）に由来し、定常領域はヒト由来である。

【0043】

本明細書中で用いられる「ヒト化パーセント」は、ヒト化ドメインと生殖細胞系ドメインとの間のフレームワークアミノ酸差（すなわち、非CDR差）の数を求めて、当該数をアミノ酸の総数から引いてから、これをアミノ酸の総数で割って、100を乗算することによって算出される。

【0044】

「特異的に結合する」又は「に対する特異性を有する」とは、概して、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、そして当該結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間で多少の相補性を伴うことを意味する。この定義に従えば、抗体が、ランダムな、関係のないエピトープに結合するよりも容易に、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合する場合、抗体は、そのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書中で、特定の抗体が特定のエピトープに結合する相対的親和性を評価するのに用いられる。例えば、抗体「A」は、抗体「B」よりも所与のエピトープに対して特異性が高いと見なされる場合もあるし、抗体「A」は、関連エピトープ「D」に対するよりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言われる場合もある。

【0045】

本明細書中で用いられる用語「処置する」又は「処置」は、療法的処置及び予防的（prophylactic）又は予防的（preventative）措置の双方を指し、ここでその目的は、癌の進行等の、望ましくない生理的変化又は障害を予防するか、又は減速させる（軽減する）ことである。有益であるか、又は所望される臨床結果として、検出可能か検出不能かに拘わらず、症状の緩和、疾患の程度の減少、安定化した（すなわち増悪していない）疾患状態、疾患進行の遅延又は緩徐化、病態の寛解又は緩和、及び緩解（部分的又は全体的のいずれか）が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延ばすことも意味し得る。処置を必要とする者は、その症状若しくは障害を既に有する者、並びにその症状若しくは障害を有する傾向がある者、又はその症状若しくは障害が予防されるべき者を含む。

【0046】

「対象」、又は「個体」、又は「動物」、又は「患者」、又は「哺乳動物」が意味するのは、診断、予後、又は治療が所望されるあらゆる対象、特に哺乳動物対象である。哺乳動物対象として、ヒト、家畜、農業動物、及び動物園、競技、又は愛玩動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、乳牛等が挙げられる。

【0047】

本明細書中で用いられるフレーズ、例えば「処置が必要な患者に」又は「処置が必要な対象」は、例えば、検出に、診断手順に、且つ／又は処置に用いられる、本開示の抗体又は組成物の投与から利益を得ることとなる対象、例えば哺乳動物対象を含む。

【0048】

抗GPRC5D抗体

ハイブリドーマ技術を用いて、添付の実験例は、いくつかのマウス抗体が得られること

10

20

30

40

50

を示した。マウス抗体のうちの14個を配列決定して、ヒト化抗体を製造した。これらのヒト化抗体は、強力なGPCR5D結合活性を示して、受容体媒介エンドサイトーシスを誘導することができた。インビボ試験は、これらの抗体が、ADCCを誘導して、腫瘍発生を阻害する活性があることを示した。

【0049】

マウス抗体のうちの4つ、34D3H1、37B9C4、58F9G10、及び6G10D9が、ヒト化プロセスを受けた。6-H3L3、6-H4L3（双方とも6G10D9由来）、58-H1L1、58-H3L1（双方とも58F9G10由来）、34-H1L1（34D3H1由来）、及び37-H1L1（37B9C4由来）が挙げられるヒト化抗体のいくつかはさらに、継続的な臨床開発への見込みを示した。

【0050】

したがって、本開示の一実施形態に従えば、提供されるのは、ヒトGタンパク質結合受容体ファミリーC群5メンバーD（GPCR5D）タンパク質への結合特異性を有する抗体又はその抗原結合断片である。抗体又はその断片は、重鎖相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域（VH）、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

【0051】

一の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、（a）配列番号29～34のアミノ酸配列；（b）配列番号42～47のアミノ酸配列；（c）配列番号54～59若しくは配列番号54、60、及び56～59のアミノ酸配列；又は（d）配列番号68～73のアミノ酸配列を含む。

【0052】

一実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号29～34のアミノ酸配列を含む。VHについての例となる配列として、配列番号7及び35～37、又は配列番号7及び35～37のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。VLについての例となる配列として、配列番号8及び38～41、又は配列番号8及び38～41のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。

【0053】

一実施形態において、VHは、配列番号35のアミノ酸配列、又は配列番号35と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態において、VLは、配列番号38のアミノ酸配列、又は配列番号38と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。

【0054】

また、提供されるのは、一の実施形態において、FAP α 上の、これらの抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片である。また、提供されるのは、一の実施形態において、FAP α に結合する際にこれらの抗体のいずれか1つと競合する抗体及びその抗原結合断片、例えば、配列番号35のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号38のアミノ酸配列を含むVLを有するものである。

【0055】

一実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号42～47のアミノ酸配列を含む。VHについての例となる配列として、配列番号9及び48～50、又は配列番号9及び48～50のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。VLについての例となる配列として、配列番号10及び51～53、又は配列番号10及び51～53のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。

【0056】

一実施形態において、VHは、配列番号48のアミノ酸配列、又は配列番号48と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態において、VLは、配列番号51のアミノ酸配列、又は配列番号51と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。

【0057】

また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α 上の、これらの抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片である。また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α に結合する際にこれらの抗体のいずれか1つと競合する抗体及びその抗原結合断片、例えば、配列番号48のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号51のアミノ酸配列を含むVLを有するものである。

10

【0058】

一実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号54～59のアミノ酸配列を含む。VHについての例となる配列として、配列番号61～64、又は配列番号61～64のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。VLについての例となる配列として、配列番号16及び65～67、又は配列番号16及び65～67のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。

【0059】

一実施形態において、VHは、配列番号61のアミノ酸配列、又は配列番号61と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態において、VLは、配列番号65のアミノ酸配列、又は配列番号65と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0060】

また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α 上の、これらの抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片である。また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α に結合する際にこれらの抗体のいずれか1つと競合する抗体及びその抗原結合断片、例えば、配列番号61のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号65のアミノ酸配列を含むVLを有するものである。

【0061】

一実施形態において、VHは、配列番号63のアミノ酸配列、又は配列番号63と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態において、VLは、配列番号65のアミノ酸配列、又は配列番号65と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0062】

また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α 上の、これらの抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片である。また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α に結合する際にこれらの抗体のいずれか1つと競合する抗体及びその抗原結合断片、例えば、配列番号63のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号65のアミノ酸配列を含むVLを有するものである。

40

【0063】

一実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号54、60、及び56～59のアミノ酸配列を含む。VHについての例となる配列として、配列番号15、又は配列番号15のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。VLについての例となる配列として、配列番号16及び65～67、又は配列番号16及び65～67のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。

【0064】

一実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2

50

、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号68～73のアミノ酸配列を含む。VHについての例となる配列として、配列番号1及び74～79、又は配列番号1及び74～79のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。VLについての例となる配列として、配列番号2及び80～86、又は配列番号2及び80～86のいずれかと少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列が挙げられる。

【0065】

一実施形態において、VHは、配列番号76のアミノ酸配列、又は配列番号76と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態において、VLは、配列番号82のアミノ酸配列、又は配列番号82と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0066】

また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α 上の、これらの抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片である。また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α に結合する際にこれらの抗体のいずれか1つと競合する抗体及びその抗原結合断片、例えば、配列番号76のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号82のアミノ酸配列を含むVLを有するものである。

【0067】

一実施形態において、VHは、配列番号77のアミノ酸配列、又は配列番号77と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。一実施形態において、VLは、配列番号82のアミノ酸配列、又は配列番号82と少なくとも85%、90%、若しくは95%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0068】

また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α 上の、これらの抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片である。また、提供されるのは、一部の実施形態において、FAP α に結合する際にこれらの抗体のいずれか1つと競合する抗体及びその抗原結合断片、例えば、配列番号77のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号82のアミノ酸配列を含むVLを有するものである。

【0069】

一部の実施形態において、抗体又はその断片は、ADCCコンピテントである。抗体ADCCコンピテントを製造するのに適した方法及び材料が、当該技術において知られており、例えば、適切なFc断片を用いるか、又はフコシル化を低下させる／除去することによる。

30

【0070】

一部の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、(a)配列番号29～34のアミノ酸配列；(b)配列番号42～47のアミノ酸配列；(c)配列番号54～59若しくは配列番号54、60、及び56～59のアミノ酸配列；又は(d)配列番号68～73のアミノ酸配列を含み、記載されるCDR配列は各々、1、2、又は3つの保存的アミノ酸置換を含む。

【0071】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術において定義されている。ゆえに、免疫グロブリンポリペプチド内の非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換されている。別の実施

40

50

形態において、一連のアミノ酸は、側鎖ファミリーメンバーの順序及び／又は組成が異なる構造的に類似の連なりで置換され得る。

【 0 0 7 2 】

保存的アミノ酸置換の非限定的な例が、以下の表に記載されており、0以上の類似性スコアが、2つのアミノ酸間の保存的置換を示す。

【 0 0 7 3 】

表 A. アミノ酸類似性マトリックス

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

表 B. 保存的アミノ酸置換

対するアミノ酸	以下による置換
アラニン	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
アスパラギン	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
グルタミン	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
イソロイシン	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
リシン	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
メチオニン	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
プロリン	D-Pro
セリン	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
トレオニン	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
チロシン	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
バリン	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

【 0 0 7 5 】

また、本明細書中で開示される抗体は、これが由来する天然に存在する結合ポリペプチド由来のアミノ酸配列が変わるように修飾され得ることが当業者によって理解されるであろう。例えば、指定のタンパク質に由来するポリペプチド配列又はアミノ酸配列は、類似し得、例えば、出発配列に対して特定の同一性パーセントを有し得、例えば、出発配列と 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は 99% 同一であり得る。

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態において、抗 C C R 8 抗体は、非修飾 m A b と比較して、より高い親和性で活性化 F c γ 受容体に結合して、増強した A D C C を媒介する、脱フコシル化重鎖等の修飾重鎖定常領域を含む修飾 m A b である。一部の実施形態において、抗 C C R 8 抗体は、A D C C 機能を増強する L 2 3 4 Y、L 2 3 5 Q、G 2 3 6 W、S 2 3 9 D / M、F 2 4 3 L、H 2 6 8 D、D 2 7 0 E、R 2 9 2 P、S 2 9 8 A、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、K 3 2 6 D、A 3 3 0 L / M、I 3 3 2 E、K 3 3 4 A / E、P 3 9 6 L の 1 つ又は組合せを含むヒト I g G 1 変異型のものである重鎖を含む（全て E U 付番）。

【 0 0 7 7 】

特定の実施形態において、抗体は、抗体と通常関連しないアミノ酸配列又は 1 つ以上の部分を含む。例示的な修飾を、以下でより詳細に説明する。例えば、本開示の抗体は、フレキシブルリンカー配列を含んでもよいし、官能性部分（例えば、P E G、薬物、毒素、

又は標識)が加わるように修飾されていてもよい。

【0078】

本開示の抗体、その変異型又は誘導体として、すなわち、抗体がエピトープに結合するのを共有結合が妨げないような、あらゆる種類の分子の、抗体への共有結合によって修飾されている誘導体が挙げられる。例えば、限定するためではないが、抗体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、リン酸化、アミド化、知られている保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への結合、その他によって修飾することができる。多数の化学修飾はいずれも、以下に限定されないが、特異的の化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成、その他が挙げられる、知られている技術によって実行され得る。加えて、抗体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。

10

【0079】

抗体－薬物コンジュゲート

GPRC5Dは、特定の悪性血液細胞、例えば多発性骨髄腫細胞上で過剰発現される。したがって、本開示の抗体及び断片は、破壊の阻害、不活化のために、悪性細胞を標的とするのに用いることができる。一例において、抗体又は断片は、悪性細胞の阻害、不活化、又は破壊の一助となる剤にコンジュゲートされている。抗体は、GPRC5D媒介エンドサイトーシスを誘導することができる、本明細書中で示されている。

【0080】

一部の実施形態において、抗体又は断片は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生体応答修飾物質、医薬品、又はPEGにコンジュゲートされていてよい。一部の実施形態において、コンジュゲートされる剤は、短い干渉RNA(s iRNA)又は固有のモジュレータ、例えば、インターフェロン遺伝子(STING)アゴニストの刺激因子又はTLR7／8アゴニストであり得る。

20

【0081】

一実施形態において、本開示の抗体又は断片は、薬物部分に共有結合されている。薬物部分は、抗体上のコンジュゲーション点と反応する基であってもよいし、これを含むように修飾されていてもよい。例えば、薬物部分は、(例えば、イブシロン－アミノ基リシン、又は抗体のN－末端での)アルキル化、酸化された炭水化物の還元的アミノ化、ヒドロキシル基とカルボキシル基との間のエステル転移、アミノ基又はカルボキシル基でのアミド化、及びチオールへのコンジュゲーションによって取り付けることができる。

30

【0082】

一部の実施形態において、抗体分子あたりのコンジュゲートする薬物部分数pは、平均1～8；1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、又は1～2に及ぶ。一部の実施形態において、pは、平均2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、又は2～3に及ぶ。他の実施形態において、pは、平均1、2、3、4、5、6、7、又は8である。一部の実施形態において、pは、平均約1～約20、約1～約10、約2～約10、約2～約9、約1～約8、約1～約7、約1～約6、約1～約5、約1～約4、約1～約3、又は約1～約2に及ぶ。一部の実施形態において、pは、約2～約8、約2～約7、約2～約6、約2～約5、約2～約4、又は約2～約3に及ぶ。

40

【0083】

例えば、タンパク質の化学活性化が遊離チオール基の形成をもたらす場合、タンパク質は、スルフヒドリル反応剤とコンジュゲートされていてもよい。一態様において、剤は、遊離チオール基に対して実質的に特異的であるものである。そのような剤の例として、マレイミド、ハロアセトアミド(例えば、ヨード、ブロモ、又はクロロ)、ハロエステル(例えば、ヨード、ブロモ、又はクロロ)、ハロメチルケトン(例えば、ヨード、ブロモ、又はクロロ)、ハロゲン化ベンジル(例えば、ヨウ化、臭化、又は塩化)、ビニルスルホン、及びピリジルチオが挙げられる。

【0084】

薬物は、リンカーによって抗体又は断片に連結することができる。適切なリンカーの例

50

として、切断型リンカー及び非切断型リンカーが挙げられる。切断型リンカーは典型的に、細胞内条件下で切断を受け易い。適切な切断型リンカーの例として、細胞内プロテアーゼ、例えばリソソームプロテアーゼ又はエンドソームプロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーが挙げられる。例示的な実施形態において、リンカーは、ジペプチドリンカー、例えば、バリン-シトルリン (val-cit)、フェニルアラニン-リシン (phe-lys) リンカー、又はマレイミドカプロン-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル (mc-val-cit-PABA) リンカーであり得る。別のリンカーとして、スルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサ-1-カルボキシラート (smcc) がある。Sulfo-smcc コンjugーションは、スルフヒドリル (チオール、-SH) と反応するマレイミド基を介して起こる一方、その Sulfo-NHS エステルは、一次アミン (リシン、及びタンパク質又はペプチド N 末端において見出される) に対して反応性である。さらに別のリンカーとして、マレイミドカプロイル (mc) がある。他の適切なリンカーとして、特定の pH 又は pH 範囲にて加水分解性のリンカー、例えばヒドラゾンリンカーが挙げられる。追加の適切な切断型リンカーとして、ジスルフィドリンカーが挙げられる。例えば mc リンカー等のリンカーは、抗体が細胞内で分解されて薬物が放出されなければならない程度に、抗体に共有結合され得る。

【0085】

リンカーは、抗体への結合用の基を含み得る。例えば、リンカーは、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、又はスルフヒドリル反応基 (例えば、マレイミド、ハロアセトアミド (例えば、ヨード、ブロモ、又はクロロ)、ハロエステル (例えば、ヨード、ブロモ、又はクロロ)、ハロメチルケトン (例えば、ヨード、ブロモ、又はクロロ)、ハロゲン化ベンジル (例えば、ヨウ化、臭化、又は塩化)、ビニルスルホン、及びピリジルチオ) を含み得る。

【0086】

一部の実施形態において、薬物部分は、細胞毒性剤又は細胞増殖抑制剤、免疫抑制剤、放射性同位体、毒素等である。コンjugेटは、腫瘍細胞又は癌細胞の増殖を阻害して、腫瘍若しくは癌細胞内でアポトーシスを引き起こすのに、又は患者において癌を処置するのに用いることができる。コンjugेटは、それに応じて、動物癌の処置のために種々の設定で用いることができる。コンjugेटは、薬物を腫瘍細胞又は癌細胞に送達するのに用いることができる。理論によって拘束されるものではないが、一部の実施形態において、コンjugेटは、GPCR5D を発現する癌細胞に結合するか、又はこれに関連し、そしてコンjugेट及び／又は薬物は、受容体媒介エンドサイトーシスにより腫瘍細胞又は癌細胞の内側に取り込まれ得る。

【0087】

一旦細胞の内側に入ると、コンjugेट内 (例えば、リンカー内) の 1 つ以上の特定のペプチド配列が、1 つ以上の腫瘍細胞又は癌細胞関連プロテアーゼによって加水分解的に切断されて、薬物が放出される。続いて、放出された薬物は、細胞内で自由に移動して、細胞毒性若しくは細胞増殖抑制、又は他の活性を誘導する。一部の実施形態において、薬物は、腫瘍細胞又は癌細胞の外側で抗体から切断されて、薬物はその後、細胞に侵入するか、又は細胞表面にて作用する。

【0088】

薬物部分又はペイロードの例が、DM1 (マイタンシン、N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-又は N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-マイタンシン)、mc-MMA D (6-マレイミドカプロイル-モノメチルオーリスタチン-D 又は N-メチル-L-バリル-N-[(1S, 2R)-2-メトキシ-4-[(2S)-2-[(1R, 2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[[(1S)-2-フェニル-1-(2-チアゾリル)エチル]アミノ]プロピル]-1-ピロリジニル]-1-[(1S)-1-メチルプロピル]-4-オキソブチル]-N-メチル-(9Cl)-Lバリンアミド)、mc-MMA F (マレイ

ミドカプロイルーモノメチルオーリスタチンF又はN-[6-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)-1-オキソヘキシル]-N-メチル-L-バリル-L-バリル-(3R,4S,5S)-3-メトキシ-5-メチル-4-(メチルアミノ)ヘプタノイル-(αR,βR,2S)-β-メトキシ-α-メチル-2-ピロリジンプロパノイル-L-フェニルアラニン)、及びmc-Val-Cit-PABA-MM AE(6-マレイミドカプロイル-Val-Cit-(p-アミノベンジルオキシカルボニル)-モノメチルオーリスタチンE又はN-[4-[N-[6-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)-1-オキソヘキシル]-L-バリル-N5-(アミノカルボニル)-L-オルニチル]アミノ]フェニル]メトキシ]カルボニル]-N-メチル-L-バリル-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-ヒドロキシ-1-メチル-2-フェニルエチル]アミノ]-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]-1-ピロリジニル]-2-メトキシ-1-[(1S)-1-メチルプロピル]-4-オキソブチル]-N-メチル-L-バリンアミド)からなる群から選択される。DM1は、チューブリン阻害剤マイタンスンの誘導体である一方、MMAD、MMAE、及びMMAFは、オーリスタチン誘導体である。一部の実施形態において、薬物部分は、mc-MMAF及びmc-Val-Cit-PABA-MMAEからなる群から選択される。一部の実施形態において、薬物部分は、マイタンスノイド又はオーリスタチンである。

【0089】

抗体又は断片は、検出可能な標識、例えば、放射性の標識、免疫調節物質、ホルモン、酵素、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤又は診断剤、細胞毒性剤(薬物であっても毒素であってもよい)、超音波増強剤、非放射性の標識、それらの組合せ、及び当該技術において知られている他のそのような剤が挙げられ得る治療剤にコンジュゲートしていても融合していてもよい。

【0090】

抗体は、これを化学発光化合物に結合させることによって、検出可能的に標識することができる。次に、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することによって、化学発光タグが付けられた抗原結合ポリペプチドの存在が判定される。特に有用な化学発光標識化合物の例として、ルミノール、イソルミノール、テロマトリックアクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルがある。

【0091】

また、抗体は、蛍光発光金属、例えば¹⁵²Eu、又はランタニド系列の他のものを用いて検出可能的に標識することができる。当該金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)又はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)のような金属キレート基を用いて抗体に取り付けることができる。種々の部分を抗体にコンジュゲートさせるための技術が周知である。例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled

10

20

30

40

50

Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985)、及び Thorpe et al., “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev. (52:119-58 (1982)) 参照。

【0092】

二官能性分子及び併用療法

GPRC5Dは、特定の悪性血液細胞、例えば多発性骨髄腫細胞上で過剰発現される。したがって、本開示の抗体及び断片は、破壊の阻害、不活化のために、悪性細胞を標的とするのに用いることができる。一部の実施形態において、GPRC5Dタンパク質及び免疫細胞の双方を標的とする二官能性又は二重特異性分子／抗体が提供される。

【0093】

一部の実施形態において、免疫細胞は、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、食細胞、ナチュラルキラー細胞、好酸球、好塩基球、及び肥満細胞からなる群から選択される。標的とされ得る免疫細胞上の分子の例として、CD3、CD16、CD19、CD28、CD64、及び4-1BB (CD137としても知られている) が挙げられる。他の例として、PD-1、CTLA-4、LAG-3 (CD223としても知られている)、CD28、CD122、TIM3、OX-40又はOX40L、CD40又はCD40L、LIGHT、ICOS/ICOSL、GITR/GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVM又はBTLA (CD272としても知られている)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、及びCD47が挙げられる。二重特異性の具体例として、限定されないが、GPRC5D/CD3が挙げられる。

【0094】

また、二重特異性抗体の様々なフォーマットが提供される。一部の実施形態において、抗PD-L1断片及び第2の断片が各々、独立して、Fab断片、単鎖可変断片 (scFv)、又は単ドメイン抗体から選択される。一部の実施形態において、二重特異性抗体はさらに、Fc断片を含む。

【0095】

抗体をコードするポリヌクレオチド及び抗体を調製する方法

また、本開示は、本開示の抗体、その変異型又は誘導体をコードする単離ポリヌクレオチド又は核酸分子を提供する。本開示のポリヌクレオチドは、同じポリヌクレオチド分子上で、又は別々のポリヌクレオチド分子上で抗原結合ポリペプチド、その変異型又は誘導体の重鎖及び軽鎖可変領域全体をコードしていてもよい。加えて、本開示のポリヌクレオチドは、同じポリヌクレオチド分子上で、又は別々のポリヌクレオチド分子上で抗原結合ポリペプチド、その変異型又は誘導体の重鎖及び軽鎖可変領域の部分をコードしていてもよい。

【0096】

抗体を製造する方法は、当該技術において周知であり、本明細書中に記載されている。特定の実施形態において、本開示の抗原結合ポリペプチドの可変領域及び定常領域は双方とも、完全ヒトである。完全ヒト抗体は、当該技術において記載されており、そして本明細書中に記載されている技術を用いて製造することができる。例えば、特異性抗原に対する完全ヒト抗体は、抗原を、抗原チャレンジに応答してそのような抗体を産生するように修飾されているが、内因性遺伝子座が無効にされているトランスジェニック動物に投与することによって、調製することができる。そのような抗体を製造するのに用いることができる例示的な技術が、米国特許第：6,150,584号明細書；6,458,592号明細書；6,420,140号明細書（それらの全体が参照により組み込まれる）に記載されている。

【0097】

処置方法

本明細書中に記載される本開示の抗体、変異型又は誘導体は、特定の処置及び診断法に用いられ得る。

【0098】

本開示はさらに、本明細書中に記載される障害又は症状の1つ以上を処置するための、動物、哺乳動物、及びヒト等の患者に本開示の抗体を投与することを含む抗体ベースの治療法に関する。本開示の治療化合物として、以下に限定されないが、本開示の抗体（本明細書中に記載されるその変異型及び誘導体が挙げられる）及び本開示の抗体をコードする核酸又はポリヌクレオチド（本明細書中に記載されるその変異型及び誘導体が挙げられる）が挙げられる。

10

【0099】

また、本開示の抗体は、癌を処置又は阻害するのに用いることができる。先で提供されるGPC5Dは、癌細胞、特に多発性骨髄腫において過剰発現され得る。GPC5Dの阻害は、癌を処置するのに有用であることが示されている。

【0100】

したがって、一部の実施形態において、提供されるのは、癌の処置を必要とする患者において癌を処置する方法である。当該方法は、一実施形態において、患者に、本開示の抗体の有効な量を投与することを伴う。一部の実施形態において、患者における癌細胞の少なくとも1つが、GPC5Dを過剰発現する。一部の実施形態において、抗体又は断片は、ADCCコンピテントである。一部の実施形態において、抗体又は断片はさらに、細胞毒性剤を含む。一部の実施形態において、免疫細胞、例えば細胞傷害性T細胞をさらに標的とする抗体は、二重特異性である。

20

【0101】

また、細胞療法、例えばキメラ抗原受容体（CAR）T細胞（又はNK細胞、マクロファージ）療法が、本開示において提供される。本開示の抗GPC5D抗体と接触する（又はこれ以外にも、本開示の抗GPC5D抗体を発現するように操作されている）適切な細胞を用いることができる。そのような接触又は操作により、細胞をその後、処置が必要な癌患者に導入することができる。癌患者は、本明細書中で開示されるあらゆるタイプの癌を有し得る。細胞（例えばT細胞）は、限定されないが、例えば、腫瘍浸潤Tリンパ球、CD4+T細胞、CD8+T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、又はそれらの組合せであり得る。

30

【0102】

一部の実施形態において、細胞を、癌患者自身から単離した。一部の実施形態において、細胞を、ドナーによって、又は細胞バンクから用意した。細胞が癌患者から単離される場合、不所望の免疫反応を最小にすることができる。

【0103】

癌の非限定的な例として、血液癌、例えば多発性骨髄腫が挙げられる。他の例として、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球、及び赤白血病が挙げられる））、慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球）白血病及び慢性リンパ球性白血病））、リンパ腫（例えば、ホジキン病及び非ホジキン病）、及び多発性骨髄腫が挙げられる。

40

【0104】

特定のあらゆる患者のための具体的な投与量及び処置レジメンが、用いられる特定の抗体、その変異型又は誘導体、患者の年齢、体重、健康状態、性別、及び食事、投与の時間、排泄率、薬物組合せ、並びに処置されることとなる特定の疾患の重症度が挙げられる種々の要因によって決まることとなる。医療介護者によるそのような要因の判断は、当該技術において通常の技術の範囲内である。また、量は、処置されることとなる個々の患者、投与経路、製剤のタイプ、用いられる化合物の特徴、疾患の重症度、及び所望される効果によって決まることとなる。用いる量は、当該技術において周知の薬理学的原理及び薬物

50

動態学的原理によって決定することができる。

【0105】

抗体の投与方法として、限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられる。抗原結合ポリペプチド又は組成物は、例えば、点滴又はボーラス注射、上皮又は皮膚粘膜（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を通じた吸収といった好都合なあらゆる経路によって投与され得、そして他の生物活性剤と共に投与され得る。ゆえに、本開示の抗原結合ポリペプチドを含有する医薬組成物は、経口投与、経直腸投与、非経口投与、大槽内投与、腔内投与、腹膜内投与、局所投与（粉末、軟膏、点滴薬、又は経皮パッチによる）、頬内投与、又は経口薬若しくは点鼻薬として投与され得る。

10

【0106】

本明細書中で用いられる用語「非経口的に」は、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下、並びに関節内注射及び点滴が挙げられる投与方法を指す。

【0107】

投与は、全身性又は局所性であり得る。加えて、本開示の抗体を、脳室内注射及びクモ膜下腔内注射が挙げられる適切なあらゆる経路によって中枢神経系中に導入することが所望されてもよい；脳室内注射は、例えば、リザーバー、例えばOmmayaリザーバーに取り付けられた、脳室内カテーテルによって容易にされてもよい。また、例えば、吸入器又はネブライザーの使用、及びエアロゾル化剤との製剤化により、肺投与を使用することができる。

20

【0108】

処置が必要な領域に本開示の抗原結合ポリペプチド又は組成物を局所的に投与することが所望されてよい；これは、例えば、限定するためではないが、外科手術中の局所点滴、例えば手術後の創傷包帯と併せた、局所塗布によって、注射によって、カテーテルによって、坐薬によって、又は移植片によって達成され得、前記移植片は、多孔性、非多孔性、又はゼラチン状の材料のものであり、膜、例えばsilastic膜、又は繊維が挙げられる。好ましくは、本開示の、抗体が挙げられるタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収されない材料を用いることに配慮すべきである。

【0109】

炎症性、免疫、又は悪性の疾患、障害、又は症状の処置、阻害、及び予防に有効である本開示の抗体の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、インビトロアッセイを任意選択的に使用して、最適投与量範囲を特定する一助とすることができる。また、製剤に使用されることとなる正確な用量は、投与経路、及び疾患、障害、又は症状の重篤度によって決まることとなり、実施者の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。有効な用量が、インビトロ又は動物モデル試験系から誘導された用量応答曲線から外挿され得る。

30

【0110】

一般的な提案として、本開示の抗原結合ポリペプチドの、患者に投与される投与量は、典型的に、 $0.1\text{ mg}/\text{患者の体重 kg} \sim 100\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.1\text{ mg}/\text{患者の体重 kg} \sim 20\text{ mg}/\text{kg}$ 、又は $1\text{ mg}/\text{患者の体重 kg} \sim 10\text{ mg}/\text{kg}$ である。一般的には、ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫応答に起因して、他の種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。ゆえに、多くの場合、より低投与量のヒト抗体且つより低頻度の投与が可能である。さらに、本開示の抗体の投与量及び投与頻度は、例えば脂質化等の修飾によって、抗体の（例えば脳中への）取込み及び組織浸透を増強することによって引き下げられ得る。

40

【0111】

追加の実施形態において、本開示の組成物は、サイトカインと組み合わせて投与される。本開示の組成物と共に投与され得るサイトカインとして、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、抗CD40、CD40L、及びTNF- α が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0112】

追加の実施形態において、本開示の組成物は、他の治療レジメン又は予防レジメン、例えば放射線療法と組み合わせて投与される。

【0113】

診断方法

GPRC5Dの過剰発現が、特定の腫瘍試料内で観察され、そしてGPRC5D過剰発現細胞を有する患者はおそらく、本開示の抗GPRC5D抗体による処置に応答する。したがって、本開示の抗体はまた、診断目的及び予測目的に用いることができる。

【0114】

好ましくは細胞を含む試料を、癌患者又は診断を所望する患者であり得る患者から得ることができる。細胞は、患者由来の腫瘍組織若しくは腫瘍ブロック、血液試料、尿試料、又はあらゆる試料の細胞である。試料の任意選択的な前処置により、抗体を、試料中に潜在的に存在するGPRC5Dタンパク質と相互作用させるのを可能にする条件の下で、試料を本開示の抗体とインキュベートさせることができる。抗GPRC5D抗体を活用するELISA等の方法を用いて、試料中のGPRC5Dタンパク質の存在を検出することができる。

【0115】

試料中のGPRC5Dタンパク質の存在（任意選択で量又は濃度による）は、患者が、抗体による処置に適している指標として、又は患者が癌処置に応答した（又はしなかった）という指標として、癌の診断に用いることができる。予測方法について、処置の進捗を示すために、癌処置の開始と同時に、特定の病期にて、1回、2回、又はそれを超えて検出を行うことができる。

【0116】

組成物

本発明はまた、医薬組成物を提供する。そのような組成物は、有効量の抗体及び許容可能な担体を含む。一部の実施形態において、組成物はさらに、第2の抗癌剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）を含む。

【0117】

特定の実施形態において、用語「薬学的に許容される」は、動物、より詳細にはヒトに用いられる、連邦又は州政府の監督官庁によって認可されているか、又は米国薬局方若しくは他の一般に認められている薬局方に収載されていることを意味する。さらに、「薬学的に許容される担体」は、通常、非毒性の固体、半固体、又は液体の、あらゆるタイプの充填剤、希釈剤、カプセル化材料、又は製剤助剤である。

【0118】

用語「担体」は、治療薬と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。そのような薬学的担体として、滅菌液、例えば水及び油があり得、石油、動物、植物、又は合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等が挙げられる。水は、医薬組成物が静脈内投与される場合に好ましい担体である。また、生理食塩水及び水性デキストロース及びグリセロール溶液を、特に注射溶液用の液体担体として使用することができる。適切な薬学的賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。また、組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤、例えばアセタート、シトラート、又はホスファートを含むし得る。また、抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウム；キレート化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；及び張度の調整用の剤、例えば塩化ナトリウム又はデキストロースが想定される。当該組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、タブレット、ピル、カプセル、粉末、持続性製剤等の形態をとることができる。組成物は、坐剤として、従来型の結合剤、及びトリグリセリド等の担体と製剤化することができる。経口

製剤として、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体が挙げられ得る。適切な薬学的担体の例が、E. W. MartinによってRemington's Pharmaceutical Sciences（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されている。そのような組成物は、患者に適切な投与形態を提供するように、適した量の担体と共に、治療有効量の抗原結合ポリペプチドを、好ましくは精製された形態で含有する。製剤は、投与様式に適する必要がある。親調製物は、ガラス若しくはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、又は多用量バイアル内に封入することができる。

【0119】

一実施形態において、組成物は、ヒトへの静脈内投与に適応した医薬組成物として、ルーチンの手技に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張水性バッファ中の溶液である。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤、及び注射部位での疼痛を緩和させるためのリグノカイン等の局所麻酔薬を含み得る。一般的には、成分は、別々に、又はユニット剤型に混合一体化されて、例えば、活性剤の量を表示するアンプル又はサシェ等の密閉容器内に凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、供給される。組成物は、点滴によって投与されることとなる場合、滅菌医薬品グレード水又は生理食塩水を含有する点滴ボトルによって、分注され得る。組成物が注射によって投与される場合、成分を投与前に混合することができるように、滅菌注射用水又は生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0120】

本開示の化合物は、中性又は塩形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩として、アニオンと形成されるもの、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するもの、及びカチオンと形成されるもの、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、第二鉄水酸化物、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するものが挙げられる。

本開示は、例えば、以下に関する。

【1】

ヒトGタンパク質結合受容体ファミリーC群5メンバーD（GPCR5D）タンパク質に対する結合特異性を有する抗体又はその抗原結合断片であって、前記抗体又はその断片は、重鎖相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域（VH）、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、前記CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ：

（a）配列番号42～47のアミノ酸配列；

（b）配列番号29～34のアミノ酸配列；

（c）配列番号54～59のアミノ酸配列；又は

（d）配列番号68～73のアミノ酸配列

を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【2】

前記CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3は、それぞれ、配列番号42～47のアミノ酸配列を含む、前記【1】に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【3】

前記VHは、配列番号9及び48～50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号10及び51～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記【2】に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【4】

前記VHは、配列番号48のアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号51のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む、前記〔2〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔5〕

前記CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号29～34のアミノ酸配列を含む、前記〔1〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔6〕

前記VHは、配列番号7及び35～37からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号8及び38～41からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記〔5〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔7〕

前記VHは、配列番号35のアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号38のアミノ酸配列を含む、前記〔5〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔8〕

前記CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号54～59のアミノ酸配列を含む、前記〔1〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔9〕

前記VHは、配列番号61～64からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号16及び65～67からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記〔8〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔10〕

前記VHは、配列番号61のアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号65のアミノ酸配列を含む、前記〔8〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔11〕

前記VHは、配列番号63のアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号65のアミノ酸配列を含む、前記〔8〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔12〕

前記CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ、配列番号68～73のアミノ酸配列を含む、前記〔1〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔13〕

前記VHは、配列番号1及び74～79からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号2及び80～86からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記〔12〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔14〕

前記VHは、配列番号76のアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号82のアミノ酸配列を含む、前記〔12〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔15〕

前記VHは、配列番号77のアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号82のアミノ酸配列を含む、前記〔12〕に記載の抗体又はその抗原結合断片。

〔16〕

ヒト化されている、前記〔1〕～〔15〕のいずれか一つに記載の抗体又はその断片。

〔17〕

ADCCコンピテントである、前記〔1〕～〔16〕のいずれか一つに記載の抗体又はその断片。

〔18〕

前記抗体又はその断片にコンジュゲートした細胞毒性薬物をさらに含む、前記〔1〕～〔16〕のいずれか一つに記載の抗体又はその断片。

〔19〕

前記〔1〕～〔16〕のいずれか一つに記載の抗原結合断片、及び第2の標的タンパク

10

20

30

40

50

質に対する特異性を有する第2の抗原結合断片を含む二重特異性抗体。

[20]

前記第2の標的タンパク質は、CD3、CD16、CD19、CD28、CD64、及び4-1BBからなる群から選択される、前記[19]に記載の二重特異性抗体。

[21]

前記第2の標的タンパク質はCD3である、前記[19]に記載の二重特異性抗体。

[22]

癌の処置を必要とする患者において癌を処置する方法であって、前記患者に、前記[1]～[21]のいずれか一つに記載の抗体又はその断片を投与することを含む方法。

[23]

癌の処置を必要とする患者において癌を処置する方法であって、(a) T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、又はマクロファージを、前記[1]～[21]のいずれか一つに記載の抗体又はその断片によりインビトロ処理することと、(b) 処理した前記細胞を前記患者に投与することを含む方法

[24]

工程(a)の前に、前記T細胞、前記NK細胞、又は前記マクロファージを個体から単離することをさらに含む、前記[23]に記載の方法。

[25]

前記T細胞、前記NK細胞、又は前記マクロファージは、前記患者から単離されている、前記[24]に記載の方法。

[26]

前記T細胞は、腫瘍浸潤Tリンパ球、CD4+T細胞、CD8+T細胞、又はそれらの組合せである、前記[23]に記載の方法。

[27]

前記癌は血液癌である、前記[22]～[26]のいずれか一つに記載の方法。

[28]

前記血液癌はGPCR5D発現B細胞癌である、前記[27]に記載の方法。

[29]

前記GPCR5D発現B細胞癌は多発性骨髄腫である、前記[28]に記載の方法。

【実施例】

【0121】

実施例1：ヒトGPCR5Dに対するマウスモノクローナル抗体の生成

ヒトGPCR5Dタンパク質を用いて、マウスの様々な株を免疫化して、それに応じてハイブリドーマが生成した。20種を超えるハイブリドーマクローンを、更なる分析のために収集した。

【0122】

ハイブリドーマの上清から収集した抗体を、CHO K1細胞上に発現されるヒトGPCR5Dタンパク質への結合について試験した。安定してヒトGPCR5Dが発現されるCHO-K1細胞を、フラスコから収集した。1×10⁶個の細胞/mlの100μlを、3倍段階希釈液中のマウス抗体と、氷上で30分間インキュベートした。200μlのFACSバッファで2回洗浄した後に、細胞を第2の抗体と、氷上で30分間インキュベートした。細胞を、200μlのFACSバッファで2回洗浄して、BD Falcon 5mlチューブに移して、FACSによって分析した。研究の結果は、マウス抗体がヒトGPCR5Dに高いEC50で結合することができることを示した(図1)。結果を以下の表に示す。それらは全て、良好な結合活性を示した。

【0123】

10

20

30

40

50

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
2D3C12	46110	835137	0.4535	1.132	2.841	789027
6G10D9	6870	1429638	0.9116	0.9535	8.159	1422768
11C1H10	40235	859162	0.5274	1.101	3.368	818927
14C2A11C6	5573	728662	0.9934	0.8801	9.849	723089
14C2F7C6	15616	751279	0.9634	0.9615	9.193	735663
14F3H2	20428	872785	0.8744	1.146	7.489	852357
21C3C11B3	57013	1508205	0.6538	1.1	4.506	1451192
26E1D12	52742	677713	0.2246	1.303	1.677	624970
29A7H11B9D3	71394	1385928	0.4219	1.259	2.642	1314534
29A7H11H4C12	43439	1461931	0.7377	1.109	5.466	1418492
29B2C10	68634	1607305	0.6201	1.305	4.17	1538671
31H11C10H7	16791	961550	0.9534	1.134	8.983	944759
34D3F8B5	-16109	1407656	1.084	0.7475	12.12	1423765
34D3H1	-13314	1412131	0.8843	0.8042	7.662	1425446
34D4A10	2737	921851	1.019	0.8496	10.44	919114
36F11E9H3	13852	766682	0.8732	1.087	7.468	752830
37B9C4	10880	1758861	0.5917	0.9933	3.906	1747981
38A10E9A11	24016	1785041	0.9472	1.099	8.854	1761025
39D2B6	7833	1774093	0.5469	0.98	3.523	1766260
40A5B2	25394	1196144	0.5108	0.9236	3.242	1170750
57G11D4A10	-22363	2089505	0.9703	0.8141	9.34	2111868
58F9G10	-14744	2052463	0.9635	0.8313	9.194	2067207

10

20

30

【 0 1 2 4 】

1 4 種のハイブリドーマをサブクロニングして、V H / V L 配列を決定した（表 1 参照）。

【 0 1 2 5 】

40

50

【表 1 - 1】

表 1. リードマウス抗体の VH/VL 配列

名前	配列(CDR に下線を引いている)	配列 番号
6G10D9 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYTMH</u> WVKQRPQGLEWLG <u>Y</u> <u>INPSSGYTNYNQKFKD</u> KATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>LR</u> <u>SRGYFDY</u> WGQGTTLTVSS	1
6G10D9 VL	DIVMTQSQTTFMSTSVGDRVRITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKTGQSPRLLI <u>YS</u> <u>ASNR</u> YTGVPDRFTGSGSGDFTLTISNMQSEDLADFFC <u>QQYSSYPYT</u> FGG GTKLEIK	2
21C3C11B3 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFIN <u>YLTIE</u> WIKQRPQGLEWIG <u>M</u> <u>INPGSGGTNYNEKFKD</u> KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR <u>NW</u> <u>DV</u> WGQGTTLTVSS	3
21C3C11B3 VL	DVVMTQSPLSLPVSLGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTGNTYLH</u> WYLQKPGQSPK LLI <u>YKVS</u> NR <u>FS</u> GVDPDRFSGSGSGDFTLKISRVEAEDLGVYFC <u>SQSTHVP</u> <u>WT</u> FGGGTKLEIK	4
29B2C10 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKLSCKASGYSFT <u>GYTMH</u> WVKQSHGENLEWIG <u>L</u> <u>INPYNGGTNYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELLSSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDY</u> WGQGTSTVTVSS	5
29B2C10 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVGSNVA</u> WYQQKPGQSPKALI <u>YS</u> <u>ASRY</u> SGVPDRFTGNGSGDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QQYYNSPWT</u> FGG GTKLEIK	6

10

20

【 0 1 2 6 】

30

40

50

【表 1 - 2】

34D3H1 VH	EVHLES GGDLVKPGGSLKLSAASGFTFS <u>SYGMSWVRQTPDKRLEWVAT</u> <u>ISSGGSYTYYPDSVKGR</u> FTISRDNAKNTLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR <u>OG</u> <u>GDAMDYWGQGTSTVTVSS</u>	7
34D3H1 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC <u>RASQSI</u> NNNLHWYQQKSHESPRLLIKY <u>ASQSI</u> SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFC <u>QOQNSRLT</u> FGAG TKLELK	8
37B9C4 VH	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFS <u>DYWMN</u> WVRQSPEKGLEWVAE <u>IRLKSNNYATHYAESVKGR</u> FTISRDDS KSSVYLQMNLR AEDTGIYYCTR <u>PLLWFRRYYAMDYWGQGTSTVTVSS</u>	9
37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRITIS <u>CASQGISNYLN</u> WYQQKPDGTVKLLIYY <u>TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPADIATYYC</u> <u>QQYSKLPFT</u> FGS GTKLEIK	10
38A10E9A11 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYTMH</u> WVKQRPQGQLEWIGY <u>INPSSGYTNYNQKFKD</u> KATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS <u>LR</u> <u>SRGYFDY</u> WGRGTTLVSS	11
38A10E9A11 VL	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITC <u>KASONVGTAVA</u> WYQKPGQSPKLLIYS <u>ASNRYT</u> GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLAGYFC <u>QQYSSYPYT</u> FGG GTKLEIK	12
40A5B2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>RNIMH</u> WVKQKPGQGLEWIGY <u>INPYNAGSKYNEKFKG</u> KATLTS DISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR <u>EE</u> <u>VYYRYGAWFAYWGHGTLTVSA</u>	13
40A5B2 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS <u>RASQSVSTSSYSYM</u> HWYQQKPGQPPKL LIKY <u>ASNLES</u> GVPARFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDATATYYC <u>QHSWEIPR</u> <u>TFGGG</u> TKLEIK	14
58F9G10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISKASGYSFT <u>GYTIH</u> WVKQSHGKLEWIGY <u>ISCYNGATSFNQKFKG</u> KATFTVDTSSSTAYMQFNLSLTSEDSAVYYCAR <u>TE</u> <u>LRGPWFAYW</u> GQGTTLTVSA	15
58F9G10 VL	QTVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCS <u>SASSSVSYM</u> NWYQKSGTSPKRWIY <u>DT</u> <u>SKLAS</u> GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEADAATYYC <u>QQWSNNPLT</u> FGAG TKLELK	16
2D3C12 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFI <u>NYLIE</u> WIKQRPQGQLEWIGM <u>INPGSGGTNYNEKFKD</u> KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARN <u>W</u> <u>DVWGQGTTLTVSS</u>	17
2D3C12 VL	DVMTQSPSLSPVSLGDQASVSC <u>RSSQSLVHSTGNTYLH</u> WYLQKPGQSPK LLIYK <u>VSNRES</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC <u>SQSTHVP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIK	18
14C2A11C6 VH	QVHLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFT <u>TYTMH</u> WVKQRPQGQLEWIGY <u>INPNSAYTNYNQKFKD</u> KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR <u>RV</u> <u>LLLRVLDFDYWGQGTTLTVSS</u>	19
14C2A11C6 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINC <u>RASKSINKYL</u> TWYQEKPGKTNKLLIYS <u>GSTLOS</u> GIPSRFSGSGSGSDFTLTISSEPEDFAMYYC <u>QOHNEYPLT</u> FGT GTKLELK	20
14F3H2 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISKASGYSFT <u>GYTMN</u> WVKQSHGKNLEWIGL <u>INPYNGGIRYNOKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR <u>WG</u> <u>LRRAMDYWGQGTSTVTVSS</u>	21
14F3H2 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASONVGTINVA</u> WYQKPGQSPKALIYS <u>ASYRYS</u> GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QQYNSSPWT</u> FGG GTKLEIK	22
26E1D12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISKASGYSFT <u>GYTMN</u> WVKQSHGKNLEWIGL <u>INPYNGGTNYNOKFKG</u> KATLAVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYYCSR <u>WG</u> <u>LRRAMDYWGQGTSTVTVSS</u>	23
26E1D12 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASONVGSNVA</u> WYQKPGQSPKALIYS <u>ASYRYS</u> GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>QQYNNSPWT</u> FGG GTKLEIK	24

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

29A7H11H4C12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMHWVKQSHGENLEWIGL INPYNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCSRWG LRRAMDYWGQGTSTVTVSS	25
29A7H11H4C12 VL	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQKPGQSPKALIYS ASYRYS GVPDRFTGNSSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYYNSPWTFGG GTKLEIK	26
34D4A10 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFISYLIIEWIKQRPQGQGLEWIGM INPGSGGTNYNEKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARNW DVWGQGTTLTVSS	27
34D4A10 VL	DVVMTSQSLSLPVSLGDAQSVSCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPK LLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSSTHVP WTFGGGTGLEIK	28

10

【0128】

実施例 2. GPRC5D へのキメラ抗体の結合

マウス VH 及び VK 遺伝子を合成的に生成してから、それぞれ、ヒトガンマ 1 及びヒト
カッパ定常ドメインを含有するベクター中にクローニングした。精製キメラ抗体を、形質
移入した CHO 細胞から生成した。

【0129】

ヒト GPRC5D を安定して発現する CHO-K1 細胞を、フラスコから収集した。1
× 10⁶ 個の細胞 / ml の 100 μl を、300 nM から始まって 0.001 nM までの
3 倍段階希釈液中の一次キメラ抗体と、氷上で 30 分間インキュベートした。200 μl
の FACS バッファで 2 回洗浄した後に、細胞を二次抗体と、氷上で 30 分間インキュベ
ートした。細胞を、200 μl の FACS バッファで 2 回洗浄して、BD Falcon
5 ml チューブに移して、FACS によって分析した。研究の結果は、キメラ抗体がヒト
GPRC5D に高い EC50 で結合することができることを示した（図 2）。

20

【0130】

結果を以下の表に示す。

【0131】

	底部	上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
58F9G10	-521.8	414579	0.3596	0.8258	2.289	415101
40A5B2	1487	440269	0.3436	0.8189	2.206	438781
38A9E10A11	3016	386984	0.2453	1.037	1.759	383968
37B9C4	2078	405062	0.249	1.045	1.774	402985
34D3H1	3448	507844	0.5214	1.012	3.322	504396
29B2C10	4326	430443	0.342	1.041	2.198	426116
21C3C11B3	5774	403938	0.2293	1.286	1.696	398164
6G10D9	6886	458124	0.1012	1.343	1.262	451238

30

40

【0132】

実施例 3. CHO-GPRC5D 細胞上でのキメラ GPRC5D 抗体のインターナリゼー
ションの EC50

pHAb 色素は、pH > 7 にて蛍光が非常に低くて、溶液の pH が酸性になるにつれて
、蛍光の増大が劇的になる pH センサー色素である。pHAb 色素は、532 nm にて励
起最大 (Ex) を、そして 560 nm にて放射最大 (Em) を有する。pHAb 色素コン
ジュゲート抗体を、受容体媒介抗体インターナリゼーションを監視するのに用いることが
できる。抗体-pHAb 色素コンジュゲートは、細胞膜上のその受容体に結合する場合、

50

最小蛍光を示す。しかしながら、受容体媒介インターナリゼーションにより、抗体-pH A b色素コンジュゲートが、エンドソーム及びリソソームベシクルに移り、そこではpHが酸性であり、pH A b色素が蛍光を発する。この蛍光を、適切なフィルタによる細胞イメージング、フローサイトメトリ、及び蛍光プレートベースのリーダーが挙げられる種々の技術を用いて検出することができる。

【0133】

安定して形質移入されたヒトGPRC5D CHO細胞を、0.05%トリプシン/EDTA (Gibco、25300-054)により収集して、96ウェル黒色プレート (Thermo Scientific #165305)内に、ウェルあたり90µlあたり10Kの密度にてプレATINGした。プレートを、pH A b標識抗体による処理前に、20~24時間インキュベートした。

10

【0134】

インターナリゼーションについて、pH A bコンジュゲートキメラGPRC5D抗体を、異なって (at different) 細胞に加えて、プレートミキサーにより1~2分間穏やかに混合してから、一晚インキュベートして、インターナリゼーションを可能にした (インターナリゼーションは、数時間で検出することができる)。プレートを、Tecan Infinity M1000 Pro上の蛍光プレートリーダーにより、Ex/Em: 532nm/560nmにて読んだ。より高い感受性を達成するために、プレートを読む前に、培地をPBSによって置換した。

20

【0135】

DARにより正規化した結果を図3に示す。図3に示すように、試験したキメラ抗体は、強力なインターナリゼーション活性を有する。

【0136】

実施例4. 抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) の試験

ADCCリポーターバイオアッセイは、ADCC MOA経路活性化:エフェクタ細胞におけるNFAT (活性化T細胞の核因子) 経路を介した遺伝子転写の活性化におけるより早期の点での代替りのリードアウトを用いる。加えて、ADCCリポーターバイオアッセイは、FcγRIIIa受容体、V158 (高親和性) 変異型、及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答要素を安定して発現する操作されたJurkat細胞をエフェクタ細胞として用いる。ADCC MOAにおける抗体生物活性が、NFAT経路活性化の結果として生成されるルシフェラーゼを介して定量化される;エフェクタ細胞におけるルシフェラーゼ活性が、発光リードアウトにより定量化される。シグナルは高く、アッセイバックグラウンドは低い。

30

【0137】

GPRC5Dキメラモノクローナル抗体の段階希釈液を、ADCCバイオアッセイ標的細胞 (GPRC5D) あり、又はなしで、操作したJurkatエフェクタ細胞 (ADCC Bioassay Effector Cell) と、37℃にて6時間の誘導のためにインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を、Bio-Glo (商標) 試薬を用いて定量化した (図4)。試験した抗体は全て、ADCCを誘導する強力な能力を示した。

【0138】

40

実施例5. マウスmAbのヒト化

マウス抗体可変領域遺伝子を使用して、ヒト化mAbを作出した。このプロセスの第1の工程において、mAbのVH及びVLのアミノ酸配列を、ヒトIg遺伝子配列の利用可能なデータベースに対して比較して、最もマッチするヒト生殖細胞系Ig遺伝子配列全体を見出した。

【0139】

ヒト化抗体のアミノ酸配列を、以下に記載する。

【0140】

ヒト化配列

A. 34D3H1

50

【 0 1 4 1 】

【表 2 A】

表 2A. 34D3H1 のヒト化 – VH

名前	配列	配列番号
34D3H1 VH	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSS <u>SYGMS</u> WVRQTPDKRLEWVAT <u>ISSGGSYTYYPDSVKGR</u> FTISRDNAKNTLNLQMSSLKSEDTAMYYCAR <u>QG</u> <u>GDAMDYWGQGT</u> SVTVSS	7
V1 (CDR グラフテイング)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYGMS</u> WVRQAPGKGLEWVST <u>ISSGGSYTYYPDSVKGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QG</u> <u>GDAMDYWGQGT</u> LTVTVSS	35
V2(復帰突然 変異あり)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQ <u>I</u> PGKGLEWVAT ISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM <u>S</u> SLRAEDTAVYYCARQG GDAMDYWGQGT LTVTVSS	36
V3(復帰突然 変異あり)	EV <u>H</u> LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQ <u>I</u> PGK <u>R</u> LEWVAT ISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSL <u>N</u> LQM <u>S</u> SLRAEDTAVYYCARQG GDAMDYWGQGT LTVTVSS	37

10

【 0 1 4 2 】

【表 2 B】

表 2B. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-H1	SYGMS	29
CDR-H2	TISSGGSYTYYPDSVKG	30
CDR-H3	QGGDAMDY	31

20

【 0 1 4 3 】

【表 2 C】

表 2C. 34D3H1 のヒト化 – VL

名前	配列	配列番号
34D3H1 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSLCRASQSINNNLHWYQQKSHESPRLLIKYA <u>SQSI</u> SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFC <u>QQSNSRLT</u> FGAGTK LELK	8
V1 (CDR グラフテイング)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSINNNLHWYQQKPGKAPKLLIYYA <u>SQSI</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQSNSRLT</u> FGGGTK VEIK	38
V2(復帰突然 変異あり)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSINNNLHWYQQKPGKAPKLLIYYA SQSISG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFTLTISS <u>V</u> QPEDFATY <u>E</u> CQQSNSRLTFGGGK VEIK	39
V3(復帰突然 変異あり)	DIQ <u>L</u> TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSINNNLHWYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYYA SQSISG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFTLTISS <u>V</u> QPEDFATY <u>E</u> CQQSNSRLTFGGGK <u>L</u> EIK	40
V4(復帰突然 変異あり)	DIV <u>L</u> TQSPSSLS <u>S</u> VGDRVIT <u>L</u> TCRASQSINNNLHWYQQKPGK <u>S</u> PKLLIYYA SQSISG <u>I</u> PSRFSGSGSGTDFTLTISS <u>V</u> QPEDFATY <u>E</u> CQQSNSRLTFGGGK <u>L</u> EIK	41

40

【 0 1 4 4 】

50

【表 2 D】

表 2D. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-L1	RASQSINNNLH	32
CDR-L2	YASQSIG	33
CDR-L3	QQSNSRLT	34

10

【 0 1 4 5 】

【表 2 E】

表 2E. ヒト化抗体

	VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4
VH	34-XI				
VH v1		34-H1L1	34-H1L2	34-H1L3	34-H1L4
VH v2		34-H2L1	34-H2L2	34-H2L3	34-H2L4
VH v3		34-H3L1	34-H3L2	34-H3L3	34-H3L4

20

【 0 1 4 6 】

B. 3 7 B 9 C 4

【 0 1 4 7 】

【表 3 A】

表 3A. 37B9C4 のヒト化 – VH

名前	配列	配列番号
37B9C4 VH	EVNLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSDYWMNWVRQSPKGLEWVAE IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTR PLLWFRYYAMDYWGQGTSTVSS	9
V1(CDR グラフトイング)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWVRQAPKGLEWVAE IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR PLLWFRYYAMDYWGQGTSLTVSS	48
V2(復帰突然 変異あり)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWVRQSPKGLEWVAE IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR PLLWFRYYAMDYWGQGTSLTVSS	49
V3(復帰突然 変異あり)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWVRQSPKGLEWVAE IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTR PLLWFRYYAMDYWGQGTSLTVSS	50

30

40

【 0 1 4 8 】

【表 3 B】

表 3B. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-H1	DYWMN	42
CDR-H2	EIRLKSNNYATHYAESVKG	43
CDR-H3	PLLWFRYYAMDY	44

50

【 0 1 4 9 】

【表 3 C】

表3C. 37B9C4 のヒト化 – VL

名前	配列	配列番号
37B9C4 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRITISC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKPDGTVKLLIYY <u>TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPAD</u> IATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGS GTKLEIK	10
V1 (CDR グラフトニング)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIYY <u>TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS</u> SLQPEDFATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGQ GTKLEIK	51
V2(復帰突然 変異あり)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKPGK <u>TV</u> KLLIYY TSSLHSGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> LTISLQPEDFATYYCQQYSKLPFTFGQ GTKLEIK	52
V3(復帰突然 変異あり)	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKPGK <u>TV</u> KLLIYY TSSLHSGVPSRFSGSGSGTD <u>Y</u> LTISLQPEDFATYYCQQYSKLPFTFG <u>S</u> GTKLEIK	53

10

【 0 1 5 0 】

【表 3 D】

表3D. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-L1	SASQGISNYLN	45
CDR-L2	YTSSLHS	46
CDR-L3	QQYSKLPFT	47

20

【 0 1 5 1 】

【表 3 E】

表3E. ヒト化抗体

	VL	VL v1	VL v2	VL v3
VH	37B9C4-XI			
VH v1		37-H1L1	37-H1L2	37-H1L3
VH v2		37-H2L1	37-H2L2	37-H2L3
VH v3		37-H3L1	37-H3L2	37-H3L3

30

【 0 1 5 2 】

C . 5 8 F 9 G 1 0

【 0 1 5 3 】

40

50

【表 4 A】

表4A. 58F9G10 のヒト化 – VH

名前	配列	配列番号
58F9G10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFTGY ~~YYIH~~ WVKQSHGKSLEWIGY <u>IS</u> CYNGATSFN ~~QKFKG~~ KATFTVDTSSSTAYMQFNLSLSEDSAVYYCARTE <u>LRGPWFAY</u> WGQGTLLTVSA	15
V1 (CDR グラフトイング)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGY ~~YYIH~~ WVRQAPGQGLEWMGY <u>IS</u> SYNAATSFN ~~QKFKG~~ RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARTE <u>LRGPWFAY</u> WGQGTLLTVSS	61
V2(復帰突然 変異あり)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGY ~~YYIH~~ WVRQAPGQGLEWIGY ISSYNAATSFN ~~QKFKG~~ RVTETVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARTE LRGPWFAYWGQGTLLTVSS	62
V3(復帰突然 変異あり)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGY ~~YYIH~~ WVKQAPGQGLEWIGY ISSYNAATSFN ~~QKFKG~~ RVTETVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARTE LRGPWFAYWGQGTLLTVSS	63
V4(復帰突然 変異あり)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTGY ~~YYIH~~ WVKQAPGQGLEWIGY ISSYNAATSFN ~~QKFKG~~ RATETVDTSTSTAYMESSLRSEDSAVYYCARTE LRGPWFAYWGQGTLLTVSS	64

10

20

【 0 1 5 4】

【表 4 B】

表4B. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-H1	GY ~~YYIH~~	54
CDR-H2	YISCYNGATSFN ~~QKFKG~~ YISSYNAATSFN ~~QKFKG~~	60 55
CDR-H3	TEL ~~RG~~ PWFAY	56

30

【 0 1 5 5】

【表 4 C】

表4C. 58F9G10 のヒト化 – VL

名前	配列	配列番号
58F9G10 VL	QTVLTQSPA ~~IM~~ SASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQSGTSPKRWIYDT <u>SKLAS</u> GV ~~PAR~~ FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQ ~~QWS~~ NNPLTFGAG TKLELK	16
V1 (CDR グラフトイング)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIYDT <u>SKLAS</u> GV ~~PS~~ RFSGSGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QPEDFATYYCQ ~~QWS~~ NNPLTFGQG TKLEIK	65
V2 (復帰突然 変異あり)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLLIYDT SKLASGV ~~PS~~ RFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQ ~~QWS~~ NNPLTFGQG TKLEIK	66
V3 (復帰突然 変異あり)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLLIYDT SKLASGV ~~PS~~ RFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQ ~~QWS~~ NNPLTFGQG TKLEIK	67

40

50

【 0 1 5 6 】
【表 4 D】

表4D. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-L1	SASSSVSYMN	57
CDR-L2	DTSKLAS	58
CDR-L3	QQWSNNPLT	59

10

【 0 1 5 7 】
【表 4 E】

表4E. ヒト化抗体

	VL	VL v1	VL v2	VL V3
VH	58F9G10-XI			
VH v1		58-H1L1	58-H1L2	58-H1L3
VH v2		58-H2L1	58-H2L2	58-H2L3
VH v3		58-H3L1	58-H3L2	58-H3L3
VH v4		58-H4L1	58-H4L2	58-H4L3

20

【 0 1 5 8 】
D . 6 G 1 0 D 9
【 0 1 5 9 】

30

40

50

【表 5 A】

表5A. 6G10D9 のヒト化 – VH

名前	配列	配列番号
6G10D9 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPQGLEWLGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ KATLTAGKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS ~~LR~~ SRGYFDYWGGTTLTVSS	1
V1 (CDR グラフテイング)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYTMHWVRQAPQGLEWMGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ RVTMT ~~RD~~ TSTSTVYME ~~LS~~ LRSEDTAVYYC ~~SR~~ LR SRGYFDYWGGTLTVSS	74
V2 (復帰突然 変異あり)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYTMHWVRQAPQGLEWLGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ RVTMT ~~AD~~ TSTSTVYME ~~LS~~ LRSEDTAVYYC ~~AR~~ LR SRGYFDYWGGTLTVSS	75
V3 (復帰突然 変異あり)	QVQLVQSGAEV ~~AK~~ PGASVKVSKASGYTFTTYTMHW ~~VK~~ QAPQGLEWLGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ RVTMT ~~AD~~ TSTSTVYME ~~LS~~ LRSEDTAVYYC ~~AS~~ LR SRGYFDYWGGTLTVSS	76
V4 (復帰突然 変異あり)	QVQLVQSGAEV ~~AK~~ PGASVK ~~M~~ SCKASGYTFTTYTMHW ~~VK~~ QAPQGLEWLGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ RVT ~~L~~ T ~~AD~~ TSTSTVYME ~~LS~~ LRSEDTAVYYC ~~AS~~ LR SRGYFDYWGGTLTVSS	77
V5 (復帰突然 変異あり)	QVQL ~~QQ~~ SGAEV ~~AK~~ PGASVK ~~M~~ SCKASGYTFTTYTMHW ~~VK~~ QRPQGLEWLGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ RVT ~~L~~ T ~~AD~~ KSTSTVYME ~~LS~~ LRSEDTAVYYC ~~AS~~ LR SRGYFDYWGGTLTVSS	78
V6 (復帰突然 変異あり)	QVQL ~~QQ~~ SGAEV ~~AK~~ PGASVK ~~M~~ SCKASGYTFTTYTMHW ~~VK~~ QRPQGLEWLGY INPSSGYTNYNQKF ~~KD~~ RAT ~~L~~ T ~~AG~~ KSTSTVYME ~~LS~~ LRSEDTAVYYC ~~AS~~ LR SRGYFDYWGGTLTVSS	79

【 0 1 6 0 】

【表 5 B】

表5B. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-H1	TYTMH	68
CDR-H2	YINPSSGYTNYNQKF ~~KD~~	69
CDR-H3	LRSRGYFDY	70

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 5 C】

表 5C. 6G10D9 のヒト化 – VL

名前	配列	配列番号
6G10D9 VL	DIVMTQSQTFMSTSVGDRVRITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKTGQSPRLLIYS <u>ASNRYT</u> GVPSRFGSGSGTEFTLTISNMQSEDLADFFC <u>QQYSSYPYTF</u> GG GTKLEIK	2
V1 (CDR グラフトイング)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITC <u>KASQNVGTAVV</u> WYQQKPGKAPKLLIYS <u>ASNRYT</u> GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSSYPYTF</u> GG GTKLEIK	80
V2 (復帰突然 変異あり)	DIQLTQSPSFLSISVGDRTITCKASQNVGTAVVWYQQKPGKSPKLLIYS ASNRYTGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATFYCQQYSSYPYTFGG GTKLEIK	81
V3 (復帰突然 変異あり)	DIQMTQSPSFLSISVGDRTITCKASQNVGTAVVWYQQKPGKSPKLLIYS ASNRYTGVPSRFGSGSGTEFTLTISLMQPEDFATFFCQQYSSYPYTFGG GTKLEIK	82
V4 (復帰突然 変異あり)	DIVMTQSPSFLSISVGDRTITCKASQNVGTAVVWYQQKPGKSPKLLIYS ASNRYTGVPSRFGSGSGTEFTLTISLMQPEDFATFFCQQYSSYPYTFGG GTKLEIK	83
V1a (CDR グラフトイング バージョン a)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTAVVWYQQKPGQAPRLLIYS <u>ASNRYT</u> GIPARFSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC <u>QQYSSYPYTF</u> GG GTKLEIK	84
V2a (復帰突然 変異あり)	EIVMTQSPATLSISPGERATLSCKASQNVGTAVVWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPDRFSGSGTEFTLTISLQSEDFAVFFCQQYSSYPYTFGG GTKLEIK	85
V3a (復帰突然 変異あり)	EIVMTQSPATLSISPGERVTISCKASQNVGTAVVWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPDRFISGSGTDFTLTISLMQSEDFAVFFCQQYSSYPYTFGG GTKLEIK	86

【 0 1 6 2 】

【表 5 D】

表 5D. CDR 配列

CDR	配列	配列番号
CDR-L1	<u>KASQNVGTAVV</u>	71
CDR-L2	<u>SASNRYT</u>	72
CDR-L3	<u>QQYSSYPYT</u>	73

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 5 E】

表 5E. ヒト化抗体

	VL	VL v1	VL v2	VL v3	VL v4	VL v1a	VL v2a	VL v3a
VH	6G10D9-XI							
VH v1		6-H1L1	6-H1L2	6-H1L3				
VH v2		6-H2L1	6-H2L2	6-H2L3				
VH v3		6-H3L1	6-H3L2	6-H3L3				
VH v4		6-H4L1	6-H4L2	6-H4L3				
VH v5								
VH v6								

10

【0164】

実施例 6 . ヒト化抗体の試験

本実施例は、ヒト化抗体の一部を、CHO-K1細胞上で発現されるGPCR5Dに結合する能力について試験した。

【0165】

試験したもののうち、6G10D9、6-H2L1、及び6-H3L3に由来するヒト化抗体が、他のものよりも優れていた（図5、表6）。

20

【0166】

【表 6】

表 6. GPCR5D に結合する 6G10D9 のヒト化抗体の活性

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
6G10D9-XI	6858	121725	0.2992	1.525	1.991	114867
6-H1L1	192.6	約6397	約3.102	1.198	約1264	約6205
6-H1L2	191.9	898894	5.224	1.19	167639	898702
6-H1L3	226.2	16478302	5.389	1.156	244790	16478076
6-H2L1	189.1	661560	5.039	1.232	109294	661371
6-H2L2	192.5	1271084	5.37	1.191	234364	1270892
6-H2L3	215.7	10592380	5.039	1.23	109279	10592164
6-H3L1	-205.1	74293	2.352	0.8392	225.1	74498
6-H3L2	68.94	47463	2.244	0.9532	175.3	47394
6-H3L3	3994	119304	0.9553	1.13	9.022	115310
6-H4L1	61.5	50293	1.654	0.9277	45.05	50231
6-H4L2	9.56	39449	1.976	0.911	94.63	39440
6-H4L3	2344	126413	0.9049	1.052	8.033	124069

30

40

【0167】

図6及び表7に示すように、58F9G10のヒト化バージョンは全て、良好なパフォーマンスを有するようであった。

【0168】

50

【表 7】

表 7. GPRC5D に結合する 58F9G10 のヒト化抗体の活性

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
58F9G10-XI	6697	127349	0.2925	1.292	1.961	120652
58-H1L1	15047	107881	0.2519	1.342	1.786	92834
58-H1L2	5500	114432	0.2632	1.238	1.833	108932
58-H1L3	4227	105346	0.2308	1.14	1.701	101119
58-H2L1	3617	109672	0.3776	1.064	2.386	106055
58-H2L2	4837	107888	0.3448	1.091	2.212	103050
58-H2L3	1229	91713	0.2697	0.9633	1.861	90483
58-H3L1	9887	103663	-0.1918	1.382	0.643	93776
58-H3L2	5981	105458	0.3742	1.195	2.367	99476
58-H3L3	4022	97718	0.3177	1.105	2.078	93695
58-H4L1	4993	104559	0.3655	1.179	2.32	99566
58-H4L2	4600	105051	0.3407	1.143	2.191	100451
58-H4L3	6249	102650	0.2874	1.27	1.938	96401

10

【0169】

同様に、図 7 及び表 8 に示すように、34D3H1 のヒト化バージョンは全て、キメラ抗体に匹敵する良好なパフォーマンスを有するようであった。

【0170】

【表 8】

表 8. GPRC5D に結合する 34D3H1 のヒト化抗体の活性

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
34-XI	16525	192054	0.4947	1.454	3.124	175530
34-H1L1	10921	196570	0.5908	1.314	3.898	185650
34-H1L2	13856	182030	0.5836	1.436	3.834	168174
34-H1L3	10620	185840	0.5732	1.167	3.743	175220
34-H1L4	10299	188925	0.5999	1.195	3.98	178626
34-H2L1	7854	187153	0.6188	1.173	4.157	179298
34-H2L2	8736	178873	0.6254	1.118	4.221	170137
34-H2L3	7063	185842	0.5832	1.11	3.83	178779
34-H2L4	4393	192405	0.6092	1.041	4.066	188012
34-H3L1	11139	178248	0.5207	1.228	3.317	167109
34-H3L2	9036	179809	0.6464	1.146	4.43	170773
34-H3L3	9118	192976	0.6508	1.1	4.475	183858
34-H3L4	12751	192533	0.5981	1.263	3.963	179782

30

40

【0171】

また、図 8 及び表 9 に示すように、37B9C4 のヒト化バージョンは全て、キメラ対応物に匹敵する良好なパフォーマンスを有するようであった。

【0172】

50

【表 9】

表 9. GPRC5D に結合する 37B9C4 のヒト化抗体の活性

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
37B9C4-XI	11711	188479	0.2364	1.502	1.723	176769
37-H1L1	9596	178413	0.3574	1.613	2.277	168817
37-H1L2	8848	181865	0.3502	1.534	2.24	173017
37-H1L3	10445	173229	0.2332	1.528	1.711	162784
37-H2L1	9184	175072	0.351	1.583	2.244	165888
37-H2L2	9383	175293	0.3455	1.656	2.216	165910
37-H2L3	8049	168032	0.3334	1.564	2.155	159982
37-H3L1	6372	179261	0.2921	1.35	1.96	172889
37-H3L2	9193	179304	0.3153	1.428	2.067	170111
37-H3L3	7780	181053	0.2846	1.305	1.926	173273

10

【0173】

上述のデータに基づいて、ヒト化抗体 6-H3L3、6-H4L3、58-H1L1、58-H3L1、34-H1L1、及び 37-H1L1 を、更なる確証試験のために選択した。

20

【0174】

実施例 7. 選択したヒト化抗体の確証試験

本実施例は、ヒト化抗体の一部（6-H3L3、6-H4L3、58-H1L1、58-H3L1、34-H1L1、及び 37-H1L1）を、CHO-K1 細胞及び NC1-H929 細胞上で発現されるヒト GPRC5D タンパク質に結合する能力について試験した。

【0175】

CHO-K1 への結合データを、図 9 に作図し、そして以下の表 10 に要約する。

【0176】

30

【表 10】

表 10. CHO-K1 細胞上の GPRC5D への結合

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
6-XI	523.9	104077	0.4723	1.095	2.967	103553
58-XI	52.25	107000	0.5562	0.9481	3.599	106948
6-H3L3	172	134045	1.412	0.8045	25.82	133873
6-H4L3	109.4	145833	1.421	0.7392	26.34	145724
58-H1L1	275.4	99454	0.579	0.972	3.793	99178
58-H3L1	75.37	104402	0.612	0.9135	4.093	104326
34-XI	688.6	117714	0.5776	1.054	3.781	117025
37-XI	792.6	113379	0.3877	1.175	2.442	112586
34-H1L1	170.8	119038	0.781	0.8745	6.04	118867
37-H1L1	523.2	102496	0.511	1.042	3.244	101973

40

【0177】

50

【表 1 1】

表 11. NCI-H929 細胞上の GPRC5D への結合

	底部	最上部	LogEC50	HillSlope	EC50	幅
6-XI	269.4	13785	0.05146	1.313	1.126	13515
58-XI	261.4	14738	0.1596	1.269	1.444	14476
6-H3L3	129.8	21859	1.465	0.8063	29.18	21730
6-H4L3	80.05	28987	1.606	0.7142	40.33	28907
58-H1L1	281	13474	0.1648	1.319	1.462	13193
58-H3L1	275.5	13934	0.3	1.297	1.995	13658
34-XI	181.1	18146	0.7587	0.9911	5.738	17965
34-H1L1	199.3	17911	0.8048	1.011	6.379	17712
37-XI	337.6	13807	-0.05621	1.41	0.8786	13470
37-H1L1	341.8	13534	-0.1991	1.419	0.6323	13192

10

【0 1 7 8】

したがって、これらのデータは、これらの選択されたヒト化抗体が、更なる臨床開発に適していることを確認する。

20

【0 1 7 9】

実施例 8 . ヒト化抗体の A D C C

A D C C リポーターバイオアッセイは、A D C C M O A 経路活性化：エフェクタ細胞における N F A T（活性化 T 細胞の核因子）経路を介した遺伝子転写の活性化におけるより早期の点での代替りのリードアウトを用いる。加えて、A D C C リポーターバイオアッセイは、F c γ R I I I a 受容体、V 1 5 8（高親和性）変異型、及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動する N F A T 応答要素を安定して発現する操作された J u r k a t 細胞をエフェクタ細胞として用いる。A D C C M O A における抗体生物活性が、N F A T 経路活性化の結果として生成されるルシフェラーゼを介して定量化される；エフェクタ細胞におけるルシフェラーゼ活性が、発光リードアウトにより定量化される。シグナルは高く、アッセイバックグラウンドは低い。

30

【0 1 8 0】

G P R C 5 D h u A b の段階希釈液を、A D C C バイオアッセイ標的細胞（G P R C 5 D を発現）ありで、操作した J u r k a t エフェクタ細胞（A D C C B i o a s s a y E f f e c t o r C e l l）と、37℃にて6時間の誘導のためにインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を、B i o - G l o（商標）試薬を用いて定量化した。

【0 1 8 1】

結果を図 1 1 に示しており、これは、これらのヒト化抗体が、G P R C 5 D 過剰発現細胞株及び内因性 M M（多発性骨髄腫）細胞株に対して強い A D C C 活性を誘導したことを示している。

40

【0 1 8 2】

実施例 9 . ヒト化抗体のインターナリゼーション

本実施例は、ヒト化抗体を、国際化誘導活性について試験した。実施例は、新しい親水性の、明るい pH センサー色素（p H A b 色素）を用いた。これは、インターナリゼーションにより、中性 pH にて蛍光性ではないが、酸性 pH にて高度に蛍光性である。これを、インターナリゼーションのプロセスを検出するのに用いることができる。N C I - H 9 2 9 細胞及び M M . 1 R 細胞は、標的細胞として、ヒト G P R C 5 D を内生的に発現した。p H A b 色素により標識された検出抗体を加えて、G P R C 5 D h u 抗体のインターナリゼーションをインビトロ評価した。

【0 1 8 3】

50

GPRC5D hu 抗体の段階希釈液を、37℃にて24時間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性を検出した。結果は、図12において、これらのヒト化抗体が、GPRC5D過剰発現細胞株及び内因性MM細胞株の双方に対する非常に強いインターナリゼーション活性を有することを示している。

【0184】

実施例10. GPRC5D ADCの死滅活性

本実施例は、2つの抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を、標的細胞の死滅活性について試験した。これらのADCは、毒性薬物モノメチルオーリスタチンE(MMAE)にコンジュゲートしたそれぞれ37B9C4及び58F9G10を含んだ。

【0185】

ヒトGPRC5D発現HEK293及びNCI-H929操作細胞(HEK293/H_GPRC5D及びNCI-H929/H_GPRC5D)、GPRC5D内生的発現NCI-H929及びMM.1R細胞を、1ウェルあたり3000~4000個の細胞にて、96ウェルプレートに播種した。細胞を、37B9C4-MMAE及び58F9G10-MMAEにより、それぞれの濃度にて5日間処理した。細胞生存度を、96ウェルプレートに、r-Glo試薬と共に1ウェルあたり3000~4000個の細胞にて播種したCellTiteによって測定した。ルシフェラーゼ活性を、Envisionによって検出した。結果は、図13及び表12において、これらのヒト化抗体が非常に強い死滅活性を有することを示している。

【0186】

【表12】

表 12. ADC 死滅活性

	Hek-293/H_GPRC5D (IC50, nM)	MM.1R (IC50, nM)	NCI-H929 (IC50, nM)	NCI-H929/GPRC5D (IC50, nM)
37B9C4-MMAE	0.025	0.14	0.23	0.11
58F9G10-MMAE	0.026	0.07	0.99	0.14

【0187】

実施例11. インビボ抗腫瘍活性

本実施例は、CDX動物モデルを用いて、抗体37B9C4(H1L1)の抗腫瘍活性を試験した。

【0188】

本研究において、6~8週齢の雌NCGマウス(Jiangsu Jicui Yaokang Biotechnology Co., Ltd)を用いた。各マウスに、腫瘍成長のために、マトリゲル入りPBS(V:V=1:1)の0.1ml中MM.1R腫瘍細胞(2×10⁶個)を、右腋窩(外側)にて皮下接種した。動物を、腫瘍容積がおよそ60mm³に達したときにランダムにグループ化してから、有効性研究のための処置を始めた。1mg/kg、3mg/kg、及び10mg/kgの用量での37B9C4を、0日目、7日目、14日目に、静脈(i.v.)を介して管理した。ビヒクル群における平均腫瘍容積が2000mm³を超えた19日目に、実験を終了した。PBS群、37B9C4(1mg/kg)群、37B9C4(3mg/kg)群、及び37B9C4(10mg/kg)群の平均腫瘍容積は、それぞれ2498.58mm³、1196.15mm³、0.00mm³(6/6CR)、及び0.00mm³(6/6CR)であった。腫瘍サイズを、ノギスを用いて二次元で週3回測定して、容積を式： $V = 0.5a \times b^2$ (式中、「a」及び「b」はそれぞれ、腫瘍の長径及び短径である)を用いてmm³で表した。データポイントは群(n=6)平均を表し、誤差棒は平均の標準誤差(SEM)を表す。

【0189】

MM.1R腫瘍を有するマウスの体重を、毒性の間接的な尺度として、定期的に監視し

た。図 1 4 A は、3 7 B 9 C 4 の投与後の、MM．1 R 腫瘍を有するマウスの腫瘍増殖曲線を示す。抗体は、この腫瘍モデルにおける腫瘍増殖を用量依存的に阻害し、そして 3 m g / k g 以上で完全な腫瘍阻害を達成した。

【 0 1 9 0 】

投与後の MM．1 R 腫瘍を有するマウスの体重の詳細な変化及び体重の相対変化を図 1 4 B に示す。投与期間の間に、マウスの全ての群に、有意な体重ロスがなく、投与群におけるマウスは、寛容性が良好であり、処置の安全性を実証した。

【 0 1 9 1 】

本開示は、本開示の個々の態様の 1 つの例示として意図される、記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるものではなく、機能的に均等であるあらゆる組成物又は方法が、本開示の範囲内である。種々の修正及び変更が、本開示の精神又は範囲を逸脱しない範囲で、本開示の方法及び組成物になされ得ることが、当業者に明らかであろう。ゆえに、添付の特許請求の範囲及びその均等物の範囲内にあるならば、本開示は、本開示の修正及び変更をカバーすることが意図される。

【 0 1 9 2 】

本明細書中で述べた全ての刊行物及び特許出願は、あたかも各刊行物又は特許出願が、具体的且つ個別に参照により組み込まれると示されているかの如く、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1 - 1】

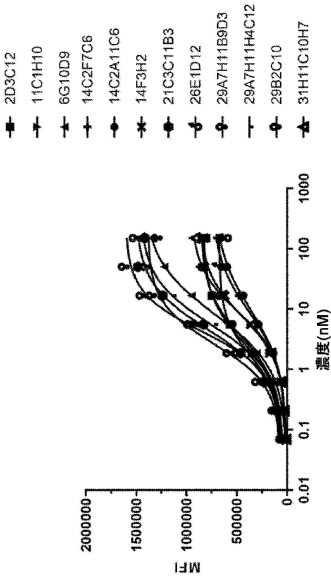


図1

【図 1 - 2】

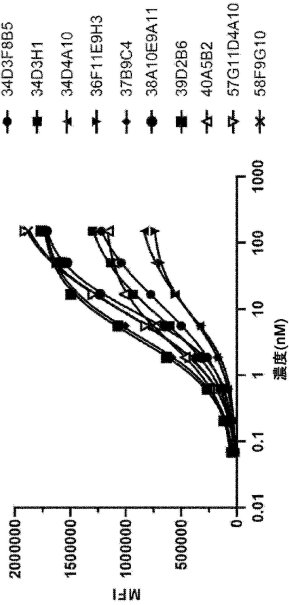


図1(続き)

【図 2】

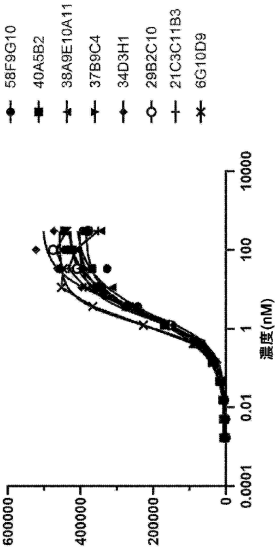


図2

【図 3】

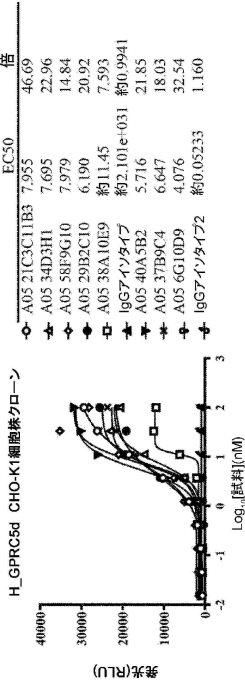


図3

10

20

30

40

50

【図 4】

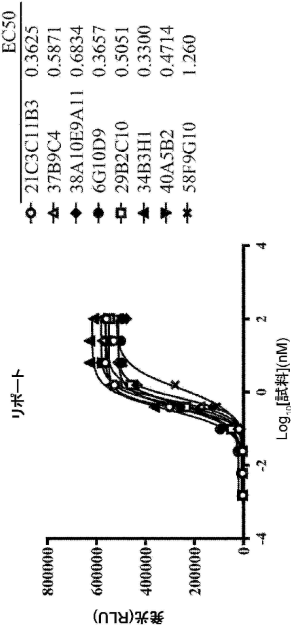


図4

【図 5】

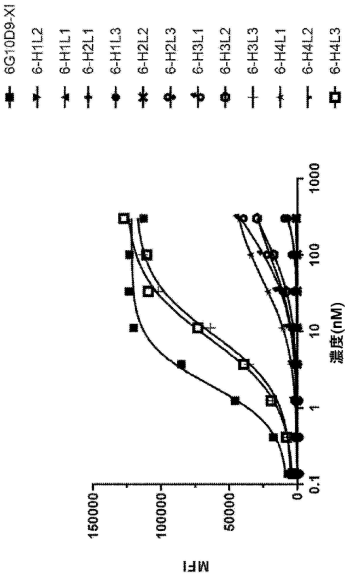


図5

【図 6】

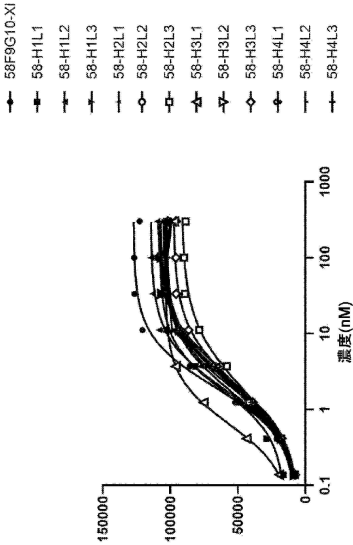


図6

【図 7】

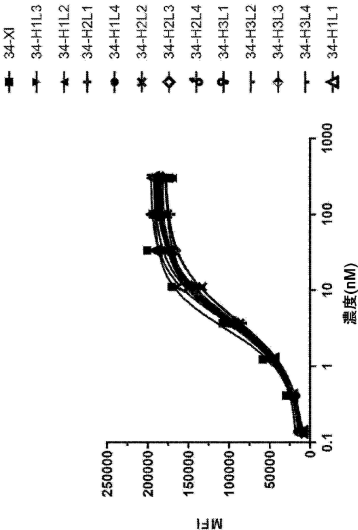


図7

10

20

30

40

50

【図 8】

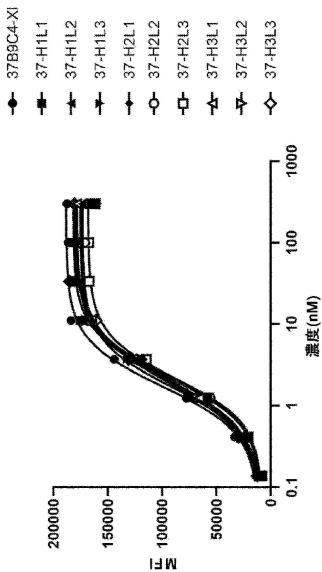


図8

【図 9】

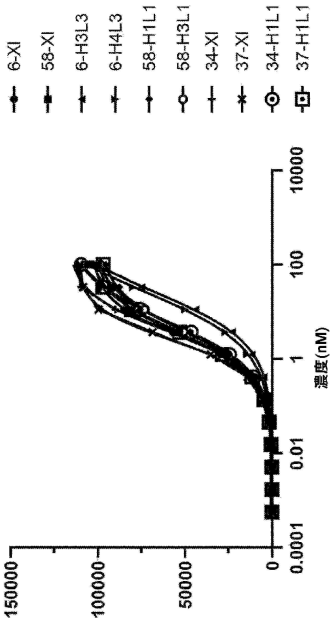


図9

【図 10】

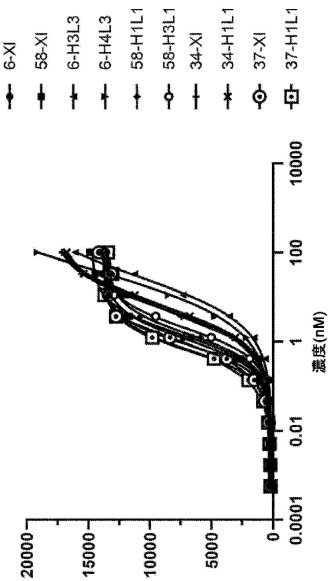


図 10

【図 11 - 1】

GPC5D:過剰発現細胞株

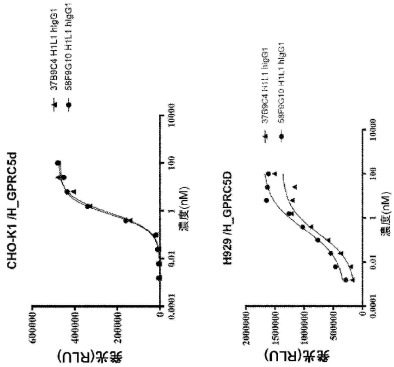


図11

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 2】

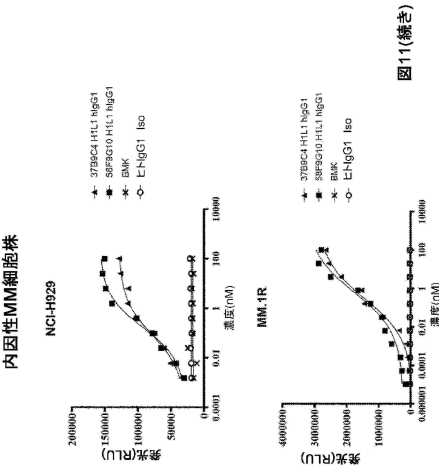


図11(続き)

【図 1 2 - 1】

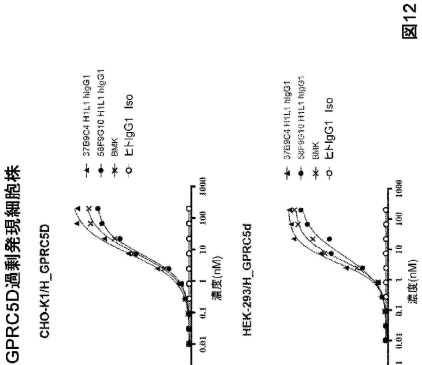


図12

【図 1 2 - 2】

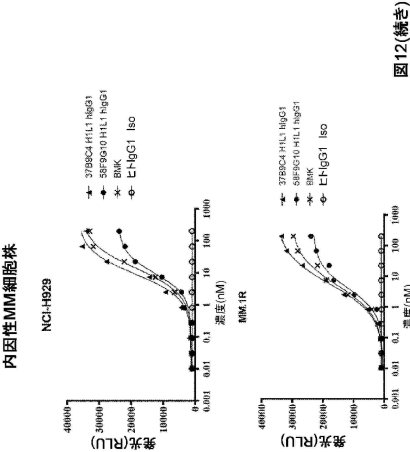


図12(続き)

【図 1 3 - 1】

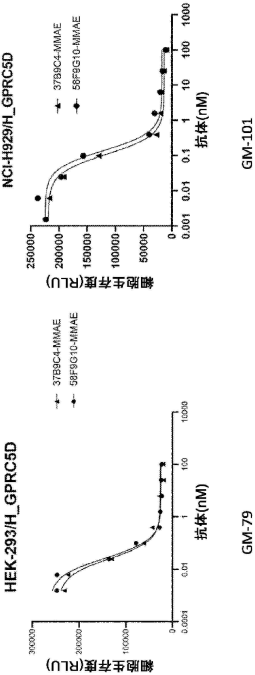


図13

【図 13 - 2】

【図 14】

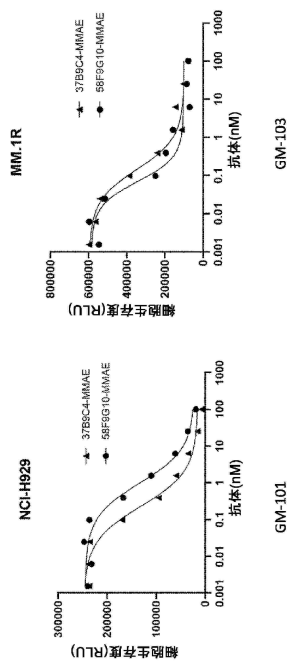


図13(続き)

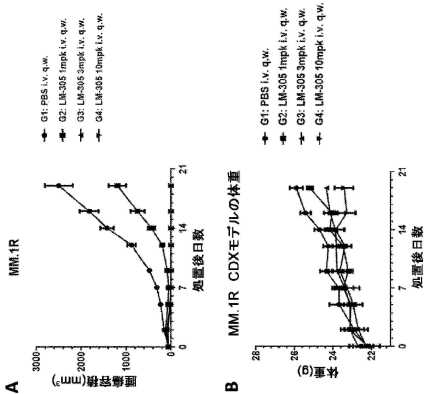


図14

【配列表】

0007595176000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 リイ, ルンション

中華人民共和国201315シャanghai、プドン・ニュー・ディストリクト、カンチャオ・タウン、レンナン・ビレッジ、グループ6、ナンバー177

(72)発明者 ホアン, ウェンタオ

中華人民共和国201315シャanghai、プドン・ニュー・ディストリクト、カンチャオ・タウン、レンナン・ビレッジ、グループ6、ナンバー177

審査官 坂井田 京

(56)参考文献 特表2019-527061 (JP, A)

国際公開第2019/154890 (WO, A1)

特表2018-524284 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46

C12N 15/00-15/90

A61K 39/395

A61K 47/68

A61P 35/00

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)