



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118159565 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 07

(21) 申请号 202280073069.X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2022.11.04

C07K 16/28 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

202111305149.7 2021.11.05 CN

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/129803 2022.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/078382 ZH 2023.05.11

(71) 申请人 正大天晴药业集团股份有限公司

地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

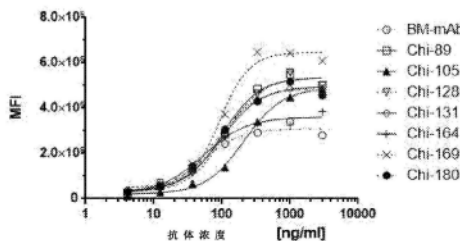
(72) 发明人 陆臻楨 王玉洁 彭双莉 张正平

## (54) 发明名称

结合GPC5D的抗体及其用途

## (57) 摘要

提供了一种结合GPC5D的抗体及其用途。具体地提供了结合抗GPC5D抗体及其抗原结合片段、编码它们的核酸、包含该核酸的载体、包含该载体的细胞、包含它们的药物组合物,还提供了其在减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长、治疗疾病等方面的用途。



抗体编号	EM-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

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年5月11日 (11.05.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/078382 A1**

(51) 国际专利分类号:  
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/129803

(22) 国际申请日: 2022年11月4日 (04.11.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202111305149.7 2021年11月5日 (05.11.2021) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(72) 发明人: 陆臻楨(LU, Zhenzhen); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号(江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 王玉洁(WANG, Yujie); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号(江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 彭双莉(PENG, Shuangli); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号(江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 张正平(ZHANG,

Zhengping); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号(江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。

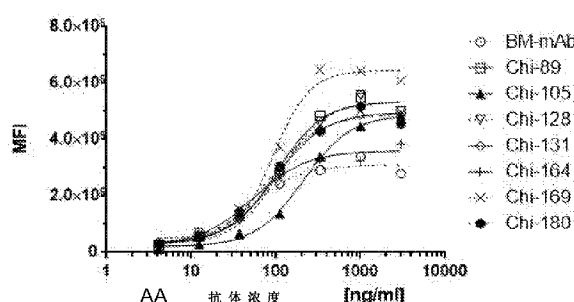
(74) 代理人: 北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市金融街35号国际企业大厦A座16层, Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,

(54) Title: ANTIBODY BINDING TO GPRC5D AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合GPRC5D的抗体及其用途



抗体编号	BM mAb	Chi-89	Chi-105	Chi-128	Chi-131	Chi-164	Chi-169	Chi-180
EC50 (nM)	0.37	0.79	1.44	0.76	0.66	0.36	0.66	0.56

图 2

AA Antibody concentration

(57) Abstract: Provided are an antibody binding to GPRC5D and a use thereof. Specifically provided are an anti-GPRC5D antibody and an antigen-binding fragment thereof, a nucleic acid encoding same, a vector comprising the nucleic acid, a cell comprising the vector, and a pharmaceutical composition comprising same. Further provided is a use thereof in reducing tumors or inhibiting tumor cell growth, treating diseases, etc.

(57) 摘要: 提供了一种结合GPRC5D的抗体及其用途。具体地提供了结合抗GPRC5D抗体及其抗原结合片段、编码它们的核酸、包含该核酸的载体、包含该载体的细胞、包含它们的药物组合物, 还提供了其在减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长、治疗疾病等方面的用途。

[见续页]



WO 2023/078382 A1

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,  
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,  
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG)。

**本国际公布：**

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

## 结合 GPRC5D 的抗体及其用途

### 技术领域

5 本公开涉及抗体，尤其涉及结合 GPRC5D 的抗体、制备方法及其用途。

### 背景技术

多发性骨髓瘤 (Multiple myeloma, MM) 是一种浆细胞恶性肿瘤，其特征是骨髓来源的浆细胞异常增生，继而导致 MM 患者经历骨坏死、骨髓浸润、肾衰竭和免疫缺陷等多种疾病相关症状。目前，多发性骨髓瘤的治疗方案包括蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物、单克隆抗体和干细胞移植等。

10 GPRC5D (G protein-coupled receptor class C group 5 member D, G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D) 属于视黄酸诱导的孤儿 G 蛋白偶联受体 (RAIG) 家族，是由 345 个氨基酸残基组成的 7 次跨膜蛋白，其正常生理功能与硬角蛋白结构相关，但目前尚未揭示 GPRC5D 的具体生物学功能或配体。一些研究表明，GPRC5D 在 65% 的多发性骨髓瘤患者的恶性骨髓来源的浆细胞上具有超过 50% 的表达阈值，且其表达独立于 BCMA (B 细胞成熟抗原)；另有研究表明，GPRC5D 的过表达与多发性骨髓瘤患者的肿瘤负荷及预后不良相关。GPRC5D 在正常组织中，除皮肤的毛囊组织和骨髓来源的浆细胞外，均无表达或极低表达；GPRC5D 可能为多发性骨髓瘤患者提供了新的治疗思路，凸显其临床价值。

作为潜在的治疗靶点，已有一些靶向 GPRC5D 的抗体在开发过程中，但仍然是有限的，需要更多可用的选择。

20

### 发明内容

本公开提供了结合 GPRC5D 的抗体，还提供了能够编码所提供的抗体的相关核酸、载体、细胞、组合物、制备方法及其用途。

一方面，本公开提供了一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 GPRC5D 抗体包

25

含：

重链可变区，其包含：

HCDR1，其包含 SEQ ID NO: 1、9、17、25 或 33 所示的氨基酸序列，

HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 2、10、18、26 或 34 所示的氨基酸序列，和

HCDR3，其包含 SEQ ID NO: 3、11、19、27 或 35 所示的氨基酸序列；和

30

轻链可变区，其包含：

LCDR1，其包含 SEQ ID NO: 4、12、20、28 或 36 所示的氨基酸序列，

LCDR2，其包含 SEQ ID NO: 5、13、21、29 或 37 所示的氨基酸序列，和

LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6、14、22、30 或 38 所示的氨基酸序列。

在本公开的一个实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体包含：

35

(i)重链可变区，其包含：

包含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的 HCDR1，

包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 HCDR2，和

包含 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

轻链可变区，其包含：

40

包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的 LCDR1，

包含 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的 LCDR2，和

包含 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的 LCDR3；

(ii)重链可变区，其包含：

45

包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 HCDR1，

包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 HCDR2，和

包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

轻链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 LCDR3;

5 (iii)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:

10 包含 SEQ ID NO: 20 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 22 所示氨基酸序列的 LCDR3;

(iv)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 25 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
15 包含 SEQ ID NO: 26 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 27 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:

20 包含 SEQ ID NO: 28 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 30 所示氨基酸序列的 LCDR3 ; 或

(v)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 33 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 34 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
25 轻链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 36 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的 LCDR3。

30 一方面, 本公开提供了一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体包  
含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示可变区序列的  
HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示可变区序列的  
LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一方面, 本公开提供了一种融合蛋白, 其包含本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

35 一方面, 本公开提供了一种药物组合物, 其包含根据本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、  
或所述的融合蛋白, 其还进一步包含药学上可接受的载体。

一方面, 本公开提供了一种分离的核酸, 其编码本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

一方面, 本公开提供了一种载体, 其包含本文所述的核酸。

一方面, 本公开提供了一种宿主细胞, 其包含本文所述的载体或在其基因组中整合有本文所述的核酸。

40 一方面, 本公开提供了一种制备本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的方法, 包括: 培养所  
述的宿主细胞, 从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

一方面, 本公开提供了所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白在制备治疗疾病的  
药物中的用途, 优选所述疾病是癌症或自身免疫疾病。

45 一方面, 本公开提供了一种用于在受试者中减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的方法, 其中所述方法包括  
向所述受试者施用治疗有效量的根据本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白或所  
述的药物组合物。

一方面, 本公开提供了一种在受试者中治疗疾病的方法, 其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有  
效量的根据本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白、或所述的药物组合物, 优选

所述疾病是癌症或自身免疫疾病。

一方面，本公开提供了一种试剂盒，其包含根据本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的免疫偶联物、或所述的药物组合物。

## 5 附图说明

图 1 为部分小鼠抗 hGPRC5D 抗体与 CHO-K1-hGPRC5D<sup>hi</sup>、CHO-K1-cynoGPRC5D (CHO-K1-猴 GPRC5D) 及 CHO-K1-murineGPRC5D (CHO-K1-小鼠 GPRC5D) 的细胞 ELISA 测定 OD<sub>450</sub>;

图 2 为 FACS 检测嵌合抗体与高表达 hGPRC5D 细胞结合的 MFI 及 EC<sub>50</sub>;

图 3 为 FACS 检测嵌合抗体与低表达 hGPRC5D 细胞结合的 MFI;

10 图 4A 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 H929 细胞结合的 MFI;

图 4B 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 MM1S 细胞结合的 MFI;

图 5A 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 CHO-K1-cynoGPRC5D 细胞结合的 MFI;

图 5B 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 CHO-K1-murineGPRC5D 细胞结合的 MFI;

图 6A 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 CHO-K1-GPRC5A 细胞结合的 MFI;

15 图 6B 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 CHO-K1-GPRC5B 细胞结合的 MFI;

图 6C 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 CHO-K1-GPRC5C 细胞结合的 MFI;

图 7 为 FACS 检测抗 GPRC5D 抗体与 CHO-K1 细胞结合的 MFI;

图 8 为抗 GPRC5D 抗体的内化活性测定。

## 20 具体实施方式

本文对本公开进行了示例性的实施方式的描述，但是本领域技术人员将理解的是本公开的保护范围并不限于此，而是可基于本公开的精神和构思进行各种修饰、修改或改变，这些修饰、修改或改变后的内容仍然落在本公开的范围之内。

### 术语

25 术语“抗体”以其最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体、三特异性抗体等）、单链抗体等，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗原结合片段指完整抗体以外的分子，其包含完整抗体的部分，该部分结合该完整抗体所结合的抗原。抗原结合片段包括 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)' 片段、Fv 片段、分离的 CDR 区、单链 Fv 分子 (scFv) 和本领域已知的其它抗体片段。

30 术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体种类。在一个实施方案中，本文公开的抗 GPRC5D 抗体为 IgG1 或 IgG4 同种型。本文的抗 GPRC5D 抗体和其抗原结合片段可以衍生自任何物种，其包括但不限于小鼠、大鼠、兔、灵长类动物、美洲驼和人。所述抗 GPRC5D 抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体或完整的人抗体。在一个特定的实施方案中，本文提供的所述抗 GPRC5D 抗体是人源化的。在一个特定的实施方案中，本文提供的所述抗 GPRC5D 抗体是嵌合的。

35 术语“嵌合抗体”是下述抗体：所述抗体具有衍生自一种物种的重链可变区的至少一部分和轻链可变区的至少一部分；以及衍生自另一物种的恒定区的至少一部分。例如，在一些实施方案中，嵌合抗体可以包含鼠类可变区和人恒定区。

“人源化抗体”是下述抗体：所述抗体含有衍生自非人抗体的互补决定区 (CDR)；和衍生自人抗体的框架区以及恒定区。例如，本文提供的结合 GPRC5D 的人源化抗体可以包含衍生自一种或多种鼠类抗体的 CDR 以及人框架区和恒定区。

40 术语“单克隆抗体” (“mAb”) 是指单分子组合物的抗体分子。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力，或就双特异性单克隆抗体而言，显示出对于两种不同表位的双重结合特异性。mAb 是分离的抗体的一个例子。通过本领域技术人员已知的杂交瘤技术、重组技术、转基因技术或其它技术，可以生产 mAb。

45 术语“可变结构域”或“可变区”是指抗体的涉及该抗体与抗原结合的结构域。例如天然四链抗体（例如来源于人、鼠等）具有重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，来源于骆驼科或鲨鱼等动物的仅重链抗体具有单可变结构域。大多数情况下，天然抗体的每个可变结构域基本上由四个“框架区”和三个“互补决定区”

组成。四个框架区分别称为框架区 1 (FR1)、框架区 2 (FR2)、框架区 3 (FR3)、及框架区 4 (FR4)；所述框架区由本领域及下文中分别称为互补决定区 (CDR) 间隔开。因此，可变结构域的一般结构可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。一个具体的例子，重链可变区的一般结构可如下表示为：FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4。一个具体的例子，轻链可变区的一般结构可如下表示为：FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4。

“CDR” (互补决定区)，也称为“高变区 (HVR)”。例如天然四链抗体通常包含六个 CDR，三个在重链可变区中，分别为重链 CDR1 (HCDR1)、重链 CDR2 (HCDR2) 和重链 CDR3 (HCDR3)，另外三个在轻链可变区中，分别为轻链 CDR1 (LCDR1)、轻链 CDR2 (LCDR2) 和轻链 CDR3 (LCDR3)。仅重链抗体或单可变结构域通常具有三个 CDR (CDR1、CDR2 和 CDR3)。

当前有许多方法来划分定义 CDR。其中，Kabat 定义基于序列可变性划分 CDR，并且是最常用的 (Elvin A.Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))；而 Chothia 定义则基于结构环的位置 (Cyrus Chothia, et al, Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM 定义是 Kabat 定义和 Chothia 定义之间的折衷方案，并且被 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件使用。“接触 (contact)”定义 CDR 的基础是对可用的复合物晶体结构的分析。然而，应当注意的是，基于不同的方法划分定义获得的同一抗体可变区的 CDR 的边界可能有所差异，即不同方法划分定义的同一抗体可变区的 CDR 序列可能有所不同。因此，在涉及用本公开某些划分定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了转换为其他任意定义 (例如 IMGT、Chothia、AbM 等定义中的一种或几种的结合) 的 CDR 序列限定的抗体。虽然本公开中请求保护的 CDR 是基于表 S1 和表 S2 示出的序列，但是根据其它 CDR 的定义规则所对应的氨基酸序列也应当落在本公开的保护范围内。例如，在另一种定义下，嵌合抗体 Chi-131 重链 CDR1 的氨基酸序列为 NYVMH (SEQ ID NO: 71)。

术语“框架区” (FR) 是除了本文定义的 CDR 残基之外的那些可变结构域的氨基酸残基。

术语“分离的”是指已经从其天然环境中分离的目标化合物 (例如，抗体或核酸)。

如本文所用，术语“EC<sub>50</sub>”是指有效浓度，抗体的 50%最大应答。如本文所用，术语“IC<sub>50</sub>”是指抑制浓度，抗体的 50%最大应答。EC<sub>50</sub> 和 IC<sub>50</sub> 两者均可以通过 ELISA 或 FACS 分析或本领域已知的任何其他方法进行测量。

术语“K<sub>D</sub>”在用于本文时指平衡解离常数，以摩尔浓度 (M) 表示。抗体的 K<sub>D</sub> 值可以使用本领域公知的方法测定。一种优选的测定抗体 K<sub>D</sub> 的方法是使用表面等离子共振 (surface plasmon resonance)，更优选使用生物传感器系统，例如 Biacore 系统。

如本文所用，术语“受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。优选地，根据本公开的受试者是人。除非标明，术语“患者”或“受试者”可以互换使用。

如本文所用，“癌症”是指哺乳动物中特征通常在于不受调控的细胞生长的生理病状。未受控制的细胞分裂和生长可以导致形成侵入相邻组织的恶性肿瘤，并且还可通过淋巴系统或血流转移到身体的远侧部分。“癌症”或“癌症组织”可包括肿瘤。

术语“治疗”指试图改变治疗个体中疾病的自然进程，并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发，缓解症状，降低疾病的任何直接或间接病理学后果，预防转移，减缓疾病进展率，改善或减轻疾病状态，及消退或改善的预后。

如本文所用，术语“治疗有效量”是指向受试者提供治疗性益处所必需的化合物、组合物或药物组合的量。

术语“药学上可接受的”是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

“药物组合物是指包含活性成分和药学上可接受的载体的组合物。

氨基酸序列的“同一性百分数 (%)”是指将待比对序列与本文中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不以任何保守置换作为序列同一性的一部分时，待比对序列中与本文中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。氨基酸序列

的同一性比对可以采用本领域范围内的多种方式进行，例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于比对序列的适宜参数，包括在比较序列的全长里获得最大比对需要的任何算法。

术语“Xn”和“Xaa”等同，是指未指定的氨基酸（Unspecified Amino Acid），通过相关表述中的后续定义来指定其涵盖的范围。

术语“包括”、“含有”或“包含”及其变体应理解为“包括但不限于”，意味着除所列出的要素、组分和步骤外，还可涵盖其它未指明的要素、组分和步骤。

在本文中，除非上下文另有明确规定，否则单数术语涵盖复数指代物，反之亦然。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本公开的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。本公开的各个方面将在下述部分中进一步详细描述。

#### 1. 抗 GPRC5D 抗体和其抗原结合片段

本文中，术语“人 GPRC5D”和“hGPRC5D”在本文中可互换使用；“结合 GPRC5D 的抗体”与“抗 GPRC5D 抗体”之间彼此可以互换的使用。

本公开提供了新颖的结合 GPRC5D 的抗体。抗 GPRC5D 抗体显示了其他诸多用于治疗性应用或/和诊断性应用的期望的特性。例如，在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体与 GPRC5D 具有良好的特异性。在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体可以与猴 GPRC5D 或/和鼠 GPRC5D 结合，从而便于抗体开发过程中的药理或/和安全性评价。在一些实施方案中，与一些已知的抗体相比，本文提供的抗 GPRC5D 抗体显示了更好的抗原结合性能，例如对 GPRC5D 低表达的细胞具有更好的结合能力。在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体对肿瘤细胞例如多发性骨髓瘤细胞具有良好的杀伤性能。

一方面，本公开提供了一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 GPRC5D 抗体包含：

重链可变区，其包含：

HCDR1，其包含 SEQ ID NO：1、9、17、25 或 33 所示的氨基酸序列，

HCDR2，其包含 SEQ ID NO：2、10、18、26 或 34 所示的氨基酸序列，和

HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3、11、19、27 或 35 所示的氨基酸序列；和

轻链可变区，其包含：

LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4、12、20、28 或 36 所示的氨基酸序列，

LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5、13、21、29 或 37 所示的氨基酸序列，和

LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6、14、22、30 或 38 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体包含：

重链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO：1 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO：2 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO：3 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

轻链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO：4 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO：5 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体包含：

重链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO：9 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO：10 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO：11 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

轻链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO：12 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO：13 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体包含：

重链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO：19 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

轻链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO：20 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO：21 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO：22 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体包含：

重链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO: 25 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 26 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 27 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

5 轻链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO: 28 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 30 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体包含：

重链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO: 33 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 34 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的 HCDR3；和

10 轻链可变区，其包含：包含 SEQ ID NO: 36 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中，提供了分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 GPRC5D 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 31 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 32 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 39 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些实施方案中，在这些具体的实施方案中，抗体的 CDR 区可以是根据 kabat、Chothia、IMGT 或其他定义下的。

25 在一些实施方案中，所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中，所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示的氨基酸序列。

35 在一些实施方案中，所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，并且所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示的氨基酸序列，并且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示的氨基酸序列。

40 在一些实施方案中，所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。进一步的，在一些这种实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体还包含：包含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 HCDR2、包含 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的 HCDR3、包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的 LCDR3。

45

在一些实施方案中,所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 15 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 16 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。进一步的,在  
5 一些这种实施方案中,所述抗 GPRC5D 抗体还包含:包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 HCDR2、包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 HCDR3、包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中,所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 23 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 24 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。进一步的,在  
10 一些这种实施方案中,所述抗 GPRC5D 抗体还包含:包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 HCDR2、包含 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列的 HCDR3、包含 SEQ ID NO: 20 所示氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 22 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中,所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 31 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 32 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。进一步的,在  
20 一些这种实施方案中,所述抗 GPRC5D 抗体还包含:包含 SEQ ID NO: 25 所示氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 26 所示氨基酸序列的 HCDR2、包含 SEQ ID NO: 27 所示氨基酸序列的 HCDR3、包含 SEQ ID NO: 28 所示氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 30 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些实施方案中,所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 39 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。进一步的,在  
25 一些这种实施方案中,所述抗 GPRC5D 抗体还包含:包含 SEQ ID NO: 33 所示氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 34 所示氨基酸序列的 HCDR2、包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的 HCDR3、包含 SEQ ID NO: 36 所示氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的 LCDR3。

在一些具体的实施方案中,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

35 在一些具体的实施方案中,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

40 在一些具体的实施方案中,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中,所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

45 在一些实施方案中,本文提供的抗 GPRC5D 抗体包含重链和轻链,重链和轻链除了包含相应的本文所述的重链可变区和轻链可变区外,还包括恒定区。由 N 端至 C 端,所述重链由重链可变区和重链恒定区组成,所述轻链由轻链可变区和轻链恒定区组成。

在一些实施方案中,抗 GPRC5D 抗体的轻链恒定区是人  $\kappa$  链恒定区。在一些实施方案中,抗 GPRC5D 抗体的轻链恒定区是人  $\lambda$  链恒定区。

抗 GPRC5D 抗体的重链恒定区可来自任何类型的恒定区，例如 IgG、IgM、IgD、IgA 和 IgE；以及任何同种型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在一些实施方案中，抗 GPRC5D 抗体为 IgG1 同种型。在一些实施方案中，抗 GPRC5D 抗体为 IgG4 同种型。

5 在一些实施方案中，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 所示，所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 70 所示。

10 在一些实施方案中，所述重链包含与 SEQ ID NO: 49 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，所述轻链包含与 SEQ ID NO: 51 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，所述抗 GPRC5D 抗体包含 SEQ ID NO: 49 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 51 所示氨基酸序列的轻链。在另一些实施方案中，所述重链包含与 SEQ ID NO: 53 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，所述轻链包含与 SEQ ID NO: 55 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，所述抗 GPRC5D 抗体包含 SEQ ID NO: 53 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 55 所示氨基酸序列的轻链。在另一些实施方案中，所述重链包含与 SEQ ID NO: 57 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，所述轻链包含与 SEQ ID NO: 59 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，所述抗 GPRC5D 抗体包含 SEQ ID NO: 57 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 59 所示氨基酸序列的轻链。在另一些实施方案中，所述重链包含与 SEQ ID NO: 61 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，所述轻链包含与 SEQ ID NO: 63 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，所述抗 GPRC5D 抗体包含 SEQ ID NO: 61 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 63 所示氨基酸序列的轻链。在另一些实施方案中，所述重链包含与 SEQ ID NO: 65 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列，所述轻链包含与 SEQ ID NO: 67 所示序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，所述抗 GPRC5D 抗体包含 SEQ ID NO: 65 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 67 所示氨基酸序列的轻链。

15 在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体与猴 GPRC5D 抗原或/和鼠 GPRC5D 抗原具有交叉反应。

20 在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原片段结合人 GPRC5D 抗原，可选的，还具有以下任意一种或几种性质：

- 25 (1) 结合猴 GPRC5D 抗原；  
30 (2) 结合鼠 GPRC5D 抗原；或  
35 (3) 不结合 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 中的一种或几种。

40 在一些实施方案中，抗 GPRC5D 抗体或其抗原片段结合人 GPRC5D 抗原，还结合猴 GPRC5D 抗原或/和鼠 GPRC5D 抗原，并进一步不结合 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C。

45 在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体为单克隆抗体。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体为单特异性抗体。

在一些实施方案中，所述抗 GPRC5D 抗体为多特异性抗体。例如，双特异抗体或者三特异性抗体等。

在另一方面，本文提供了与本文提供的任何示例性抗体结合 GPRC5D 上的相同表位的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，例如与 Chi-131 结合相同表位，例如与 Chi-169 结合相同表位，例如与 Chi-89 结合相同表位等。在另一方面，本文提供了与本文提供的任何示例性抗体竞争的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，例如与 Chi-131 竞争结合 GPRC5D，例如与 Chi-131 竞争结合 GPRC5D，例如与 Chi-169 竞争结合 GPRC5D。可以通过 ELISA、流式细胞术、表面等离子体共振 (SPR) 测定或本领域已知的任何其他方法测量与 GPRC5D 的结合。

本文还提供了一些示例性的结合 GPRC5D 的单克隆抗体, 包括鼠抗 mu-89、mu-105、mu-128、mu-131、mu-164、mu-169 和 mu-180 及构建的嵌合抗体 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131、Chi-164、Chi-169 和 Chi-180。本文提供的部分示例性的抗 GPRC5D 抗体的 HCDR (HCDR1、HCDR2 和 HCDR3) 的氨基酸序列提供于下表 S1 中, LCDR (LCDR1、LCDR2 和 LCDR3) 的氨基酸序列提供于下表 S2 中, 部分抗体可变区的氨基酸序列提供于下表 S3 中。

表 S1: 重链 CDR 序列

抗体名称	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3
Chi-131	GYTFTNYVMH (SEQ ID NO: 1)	YFNPYNDGTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2)	GGVRRYFDV (SEQ ID NO: 3)
Chi-169	GFTFSNYGMS (SEQ ID NO: 9)	SISSGGGRIIYPDNVKG (SEQ ID NO: 10)	HAMDN (SEQ ID NO: 11)
Chi-89	GFTFSSYGMS (SEQ ID NO: 17)	TISSGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 18)	QALRYHMDS (SEQ ID NO: 19)
Chi-105	GYTFTDYMN (SEQ ID NO: 25)	YIYPNNGGTGYNQRFKG (SEQ ID NO: 26)	WGGTRLGYYAMDY (SEQ ID NO: 27)
Chi-128	GFTFSSFGMH (SEQ ID NO: 33)	YISRGSSIIYADTVKG (SEQ ID NO: 34)	SGYGSSSYFDY (SEQ ID NO: 35)

表 S2: 轻链 CDR 序列

名称	轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3
Chi-131	RASQDIGSNLN (SEQ ID NO: 4)	ATFSLDS (SEQ ID NO: 5)	QQYANFPPT (SEQ ID NO: 6)
Chi-169	SASSSVSNMY (SEQ ID NO: 12)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 13)	QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 14)
Chi-89	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 20)	SASYRYS (SEQ ID NO: 21)	QQYYSYPWT (SEQ ID NO: 22)
Chi-105	KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 28)	WASTRHT (SEQ ID NO: 29)	QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 30)
Chi-128	RASSIRSSYLH (SEQ ID NO: 36)	STSNLAS (SEQ ID NO: 37)	QQFSGYPLT (SEQ ID NO: 38)

表 S3: 部分抗体可变区序列

名称	区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Chi-131	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWV KQKPGQGLEWIGYFNPYNDGTNYNEKFKGKATLTSKSS NTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGGVRRYFDVWGAGTTV TVSS	7
	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNLWLQLGP DGTIKRLIYATFSLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESED FVDYYCQQYANFPPTFGGGTKLEIK	8
Chi-169	VH	EVKLVESGGGLVKPGASLKLSCAASGFTFSNYGMSWVR QTSDKRLEWVASISSGGGRIIYPDNVKGRFTISRENAKNT LYLQMSSLKSEDTALYCTRHAMDNWGGQTSVIVSS	15
	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSNMYWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTSSMEAE DASTYYCQQWSSNPLTFGAGTTLELK	16
Chi-89	VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFESSYGMSWVRQ	23

		TPDKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTFSRDNAKNTL YLQMSSLKSEDTAMYYCVRQALRYHMDSWGQGTSTV SS	
	VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQ KPGQSPKALIYSASYRYSVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQ SEDLADFFCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	24
Chi-105	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNWV KQSHGKSLEWIGYIYPNNGGTGYNQRFK GKATLTADKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCARWGGTRLGYAMDYWGQ GTSVTVSS	31
	VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQSEDLADYFCQQYSRYPYTFGGGKLEIK	32
Chi-128	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKVS CAASGFTFSSFGMHWVR QAPEKGLEWVAYISRGSSIIYADTVKGRFTISRDNPKNT LFLQMTSLRSEDTAMYYCARSGYGSSSYFDYWGQGT LTVSS	39
	VL	ENVLTQSPAIMASPREKVTMTCRASSSIRSSYLHWYQQK SGASPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISV EDAATYYCQQFSGYPLTFGGGKLEIK	40

**II. 抗体变体**

5 在一些实施方案中，提供所述抗 GPRC5D 抗体的变体或其抗原结合片段。可以通过向编码所述抗 GPRC5D 抗体的核苷酸序列引入适当修饰或通过肽合成制备抗 GPRC5D 抗体的氨基酸序列变体。此类修饰，例如，从抗体的氨基酸序列内部缺失氨基酸残基，将氨基酸残基插入所述氨基酸序列，或/和置换所述氨基酸序列中的氨基酸残基。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体，只要所述最终变体拥有想要的特征，例如抗原结合作用，例如肿瘤杀伤效能等。

**III. 融合蛋白**

在一些实施方案中，本公开提供了融合蛋白，其包含本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

**IV. 药物组合物**

10 本公开提供了药物组合物，其包含所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、或所述的融合蛋白，其还进一步包含药学上可接受的载体。在一些实施方案中，将 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131、Chi-164、Chi-169 和 Chi-180 抗体的任意一个或几个，以及药学上可接受的载体制成药物组合物。药学上可接受的载体包括，例如，赋形剂、稀释剂、封装材料、填充剂、缓冲剂或其他试剂。

**V. 分离的核酸**

15 本公开提供了分离的核酸，其编码本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述核酸编码抗原结合片段，如 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131、Chi-164、Chi-169 或 Chi-180 的抗原结合片段。在一些实施方案中，所述核酸编码抗体，如 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131、Chi-164、Chi-169 和 Chi-180。序列表中示例性的列举了一些抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

**VI. 载体**

20 本公开提供了包含所述的分离的核酸的载体。在一些实施方案中，所述的载体为克隆载体；在另一些实施方案中，所述的载体为表达载体。所述表达载体可选的能够表达本文所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的任意表达载体，一个具体的例子，表达载体为 pcDNA3.1。

**VII. 宿主细胞**

25 在一些实施方案中，本公开提供一种宿主细胞，其包含本文所述的载体或在其基因组中整合有所述的核酸。宿主细胞为用于克隆或表达抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的适当宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为原核细胞。在另一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳细胞或适用于制备抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的其他细胞。哺乳细胞例如为中国仓鼠

卵巢 (CHO) 细胞、CHO-S 细胞。

### VIII. 制备抗 GPRC5D 抗体和其抗原结合片段的方法

5 在一些实施方案中，本公开提供了制备所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括：培养本文所述的宿主细胞，从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

为了产生所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，将编码所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的核酸插入载体，用于在宿主细胞中进一步克隆或/和表达。所述核酸可以采用基因拼接、化学合成等多种本领域所熟知的方法获取。所述回收时，可以采用离心、亲和层析等步骤进行。

### IX. 用途

10 在一些实施方案中，本文提供的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白可以用于治疗癌症、减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长。

本公开提供了所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、或所述的融合蛋白在制备药物中的用途。在一些实施方案中，所述用途为制备治疗疾病的药物。在一些实施方案中，所述用途为制备减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的药物。

15 本公开提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤细胞生长的方法，其中所述方法包括向所述的受试者施用治疗有效量的所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白或所述的药物组合物。

本公开提供了在受试者中治疗疾病的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白、或所述的药物组合物。需要治疗的受试者包括那些已经患有疾病或病状的受试者，以及可能患疾病或病状并且其目的是预防、延迟或减弱疾病或病状的受试者。

20 其中，上述疾病为癌症或自身免疫疾病。在一些实施方案中，所述自身免疫疾病为例如系统性红斑狼疮和/或类风湿性关节炎。在一些实施方案中，所述癌症是多发性骨髓瘤。

在一些实施方案中，提供了检测或测量样品中的 GPRC5D 的方法，其包括使所述样品与本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段接触并且检测或测量结合复合物。

### X. 试剂盒

25 本公开提供了一种试剂盒，其包含本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白、或所述的药物组合物。

30 本文描述了包括所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白、或所述的药物组合物的试剂盒。所述试剂盒可用于实施本文提供的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白、或所述的药物组合物的用途或其他用途。在一些实施方案中，所述试剂盒可包括本文所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、所述的融合蛋白、或所述的药物组合物以及用于检测生物样本中是否存在 GPRC5D 的试剂。所述试剂盒还可以包括使用说明书。所述试剂盒还可以包括从商业和用户的角度所需要的其它材料，例如可以包括其它缓冲液、稀释剂、针、注射器等。

本公开还提供了以下一些具体的实施方案，但本公开的保护范围不限于此：

35 实施方案1. 一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 GPRC5D 抗体包含：  
重链可变区，其包含：

HCDR1，其包含 SEQ ID NO：1、9、17、25 或 33 所示的氨基酸序列，

HCDR2，其包含 SEQ ID NO：2、10、18、26 或 34 所示的氨基酸序列，和

HCDR3，其包含 SEQ ID NO：3、11、19、27 或 35 所示的氨基酸序列；和

40 轻链可变区，其包含：

LCDR1，其包含 SEQ ID NO：4、12、20、28 或 36 所示的氨基酸序列，

LCDR2，其包含 SEQ ID NO：5、13、21、29 或 37 所示的氨基酸序列，和

LCDR3，其包含 SEQ ID NO：6、14、22、30 或 38 所示的氨基酸序列。

45 实施方案2. 根据实施方案 1 所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗 GPRC5D 抗体包含：

(i)重链可变区，其包含：

包含 SEQ ID NO：1 所示氨基酸序列的 HCDR1，

包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的 LCDR1,

5 包含 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的 LCDR3;

(ii)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 HCDR1,

10 包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 LCDR1,

包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和

包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 LCDR3;

15 (iii)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 HCDR1,

包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和

包含 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和

轻链可变区, 其包含:

20 包含 SEQ ID NO: 20 所示氨基酸序列的 LCDR1,

包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和

包含 SEQ ID NO: 22 所示氨基酸序列的 LCDR3;

(iv)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 25 所示氨基酸序列的 HCDR1,

25 包含 SEQ ID NO: 26 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和

包含 SEQ ID NO: 27 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和

轻链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 28 所示氨基酸序列的 LCDR1,

包含 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和

30 包含 SEQ ID NO: 30 所示氨基酸序列的 LCDR3 ; 或

(v)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 33 所示氨基酸序列的 HCDR1,

包含 SEQ ID NO: 34 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和

包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和

35 轻链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 36 所示氨基酸序列的 LCDR1,

包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和

包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的 LCDR3。

40 实施方案3. 一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体包含重链可  
变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示可变区序列的 HCDR1、  
HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示可变区序列的 LCDR1、  
LCDR2 和 LCDR3。

45 实施方案4. 根据实施方案 3 所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体  
包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2  
和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 所述重  
链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ  
ID NO: 16 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 所示可

变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 31 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 32 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;或,所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 39 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

5 实施方案5. 根据实施方案 1-4 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

实施方案6. 根据实施方案 1-5 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

10 实施方案7. 根据实施方案 1-6 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

实施方案8. 根据实施方案 7 所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区和轻链可变区选自以下任一项:

15 (i)所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

(ii)所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 15 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 16 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

20 (iii)所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 23 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 24 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

(iv)所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 31 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 32 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列;或,

(v)所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 39 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 所示序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

25 实施方案9. 根据实施方案 7 所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区和轻链可变区选自以下任一项:

(i)所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列;

30 (ii)所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列;

(iii)所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列;

(iv)所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列;或,

35 (v)所述的重链可变区包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

实施方案10. 根据实施方案 1-9 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为 Fab 片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fd 片段、Fv 片段、分离的 CDR 区或 scFv。

40 实施方案11. 根据实施方案 1-10 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述的抗 GPRC5D 抗体是嵌合的、人源化的或全人源的。

实施方案12. 根据实施方案 1-11 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗 GPRC5D 抗体为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。

实施方案13. 根据实施方案 1-12 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原片段结合人 GPRC5D 抗原,可选的,还具有以下任意一种或几种性质:

45 (1) 结合猴 GPRC5D 抗原;

(2) 结合鼠 GPRC5D 抗原;

(3) 不结合 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 中的一种或几种。

实施方案14. 根据实施方案 1-13 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体为单特异性抗体或多特异性抗体。

实施方案15. 一种融合蛋白, 其包含根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

5 实施方案16. 一种药物组合物, 其包含根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、或实施方案 15 所述的免疫偶联物, 其还进一步包含药学上可接受的载体。

实施方案17. 一种分离的核酸, 其编码根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

实施方案18. 一种载体, 其包含根据实施方案 17 所述的核酸。

10 实施方案19. 一种宿主细胞, 其包含根据实施方案 18 所述的载体或在其基因组中整合有实施方案 17 所述的核酸。

实施方案20. 一种制备根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的方法, 包括: 培养实施方案 19 所述的宿主细胞, 从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。

15 实施方案21. 根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、实施方案 15 所述的融合蛋白或实施方案 16 所述的药物组合物, 其用于治疗疾病, 或减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长; 优选所述疾病是癌症或自身免疫疾病。

实施方案22. 根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、实施方案 15 所述的融合蛋白在制备治疗疾病或制备减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的药物中的用途, 优选所述疾病是癌症或自身免疫疾病。

20 实施方案23. 一种用于在受试者中减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的方法, 其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、根据实施方案 15 所述的融合蛋白或实施方案 16 所述的药物组合物。

实施方案24. 一种在受试者中治疗疾病的方法, 其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、根据实施方案 15 所述的融合蛋白、或实施方案 16 所述的药物组合物, 优选所述疾病是癌症或自身免疫疾病。

实施方案25. 根据实施方案 21、22 或 24 所述的方案, 其中所述癌症为多发性骨髓瘤。

实施方案26. 一种试剂盒, 其包含根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、根据实施方案 15 所述的融合蛋白、或实施方案 16 所述的药物组合物。

30

## 实施例

### 实施例 1: 抗原免疫

#### 1、DNA 抗原免疫

35 将编码人 GPRC5D 蛋白(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41)的 cDNA 序列通过基因合成获得, 并亚克隆到表达载体 pcDNA3.1(+)中, 构建质粒 pcDNA3.1-hGPRC5D。按照去内毒大提试剂盒(QIAGEN, Cat:12391)的操作说明进行大规模质粒制备。

40 以质粒 pcDNA3.1-hGPRC5D 作为抗原, 分别免疫 A/J 小鼠(南京大学模式动物研究所)、BALB/c 小鼠(上海灵畅)和 SJL 小鼠(北京维通利华)。首先, 采用透明质酸酶(Sigma, Cat: H4272)预注射至每只小鼠的左右后肢肌肉进行预处理; 其后, 按照质量比 1:1 混匀 CpG (InvivoGen, Cat: tlr1-1826)与质粒 pcDNA3.1-hGPRC5D, 将混匀的抗原复合物通过活体基因导入仪(上海塔瑞莎生物技术有限公司, II 型)注射到小鼠预处理过的肌肉部位, 每隔 2-3 周重复上述相同的免疫一次, 共免疫 4 次。免疫结束后, 收集每只小鼠的血清。

#### 2、小鼠血清滴度评价

45 为了评估 DNA 抗原免疫小鼠体内所产生的抗人 GPRC5D 抗体的免疫反应, 通过 FACS 检测小鼠血清的抗体滴度。选取血清滴度较高的小鼠进行后续脾细胞融合前的冲击免疫。

#### 3、细胞抗原免疫

按照 lipofectamin3000 转染试剂(Thermo, Cat: L3000015)的操作说明, 将质粒 pcDNA3.1-hGPRC5D

转染到 CHO-K1 细胞中, 获得稳定高表达 hGPCR5D 细胞系 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup>。采用上述 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 细胞作为抗原进行小鼠的冲击免疫: 脾细胞融合前 3-4 天, 将细胞终浓度为  $5 \times 10^7$  个/mL 的 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 细胞悬液与终浓度为 0.5mg/mL 的 CpG (InvivoGen, Cat: tlr1-1826) 混匀后, 按 100  $\mu$ L/只, 经腹腔注射入小鼠。

## 5 实施例 2: 小鼠抗人 GPCR5D 抗体的筛选

### 1、杂交瘤细胞的制备

在融合当天, 无菌摘取小鼠脾脏, 研磨后加入红细胞裂解液 (Sigma, Cat: R7757), PBS 溶液洗涤细胞后, 以电融合缓冲液 (BTX, Cat: 47-0001) 将脾细胞重悬, 然后按照细胞数目 2:1 的比例, 将脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞混匀, 使用电融合仪 (BTX) 进行脾细胞融合。加入含有  $1 \times \text{HAT}$  (Gibco, Cat: 21060-017) 的杂交瘤培养基 (Gibco, Cat: 12045-076) 稀释融合的细胞, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7-10 天以制备杂交瘤细胞。收集杂交瘤细胞的培养上清, 用于小鼠抗人 GPCR5D 抗体的筛选。

### 2、稳定细胞系的构建

为了评价小鼠抗人 GPCR5D 抗体在细胞水平的种属交叉结合活性, 构建以下细胞系: 分别将编码全长猴 GPCR5D (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42) 和小鼠 GPCR5D (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43) 的 cDNA 通过基因合成获得, 然后亚克隆至载体 pcDNA3.1(+) 中, 得到 pcDNA3.1-cynoGPCR5D 和 pcDNA3.1-murineGPCR5D 重组质粒。参照 lipofectamin3000 转染试剂 (Thermo, Cat: L3000015) 的操作说明, 将质粒 pcDNA3.1-cynoGPCR5D 和 pcDNA3.1-murineGPCR5D 分别转染到 CHO-K1 细胞中, 获得 CHO-K1-cynoGPCR5D 和 CHO-K1-murineGPCR5D 稳定细胞系。

### 3、细胞 ELISA 初筛

收集对数生长期的 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 细胞, 并以含体积百分数 10% FBS 的 DMEM/F-12 (Gibco, Cat: 11320033) 培养基重悬, 调节细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 按 100  $\mu$ L/孔铺板于 96 孔平底板, 并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养条件下孵育过夜; 第二天, PBS 洗涤细胞板, 加入 4% (体积百分数) 多聚甲醛 (碧云天, Cat: P0099) 于室温固定 30 分钟; PBS 洗涤后, 按 200  $\mu$ L/孔加入含 3% (体积百分数) BSA 的 PBS 溶液, 于室温封闭 2 小时。封闭结束后, 向细胞板加入 100  $\mu$ L/孔的杂交瘤细胞培养上清, 于室温孵育 2 小时; PBS 洗涤, 再加入 HRP 偶联山羊抗鼠 IgG+IgM(H+L) 抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 115-035-068), 室温孵育 1 小时; PBS 洗涤后, 加入 100  $\mu$ L/孔的 TMB 反应液 (索莱宝, Cat: RP1200), 室温避光孵育 5 分钟, 并用 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应; 使用 Bio-rad iMark 酶标仪读取 OD450 吸光值。选取吸光度大于 1.0 的培养上清所对应的杂交瘤细胞作为阳性克隆, 进行后续的 FACS 筛选。

### 4、流式细胞术 FACS 筛选抗体

将细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的 CHO-K1-cynoGPCR5D 的细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板于 96 孔 U 底板中, 加入 100  $\mu$ L/孔的阳性克隆的培养上清液, 混匀后于 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤后, 加入 AlexaFluor488 偶联山羊抗鼠 IgG+IgM(H+L) 抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 115-545-044), 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤并重悬细胞, 使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号, 通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体与 CHO-K1-cynoGPCR5D 细胞的结合。

### 5、亚克隆制备

挑取经细胞 ELISA 和 FACS 筛选后, 与 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 和 CHO-K1-cynoGPCR5D 均为阳性结合的杂交瘤细胞进行扩增培养。将扩增后的细胞按照体积比 1:10 的比例与半固体培养基 D (Stemcell, Cat: 3810) 混匀, 然后置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养条件下孵育培养 5 天, 4 倍镜检吸取单克隆细胞团并转移至铺有杂交瘤培养基 (Gibco, Cat: 12045-076) 的 96 孔板中, 继续在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 2 天。收集每孔亚克隆细胞培养上清, 进一步用于亚克隆的筛选。

### 6、亚克隆筛选

#### (1) 抗 hGPCR5D 抗体的 FACS 筛选

将细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL 的 H929 (即 NCI-H929) 细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板置于 96 孔 U 底板中, 加入 100  $\mu$ L/孔的亚克隆细胞培养上清或等体积的培养基 (以下简称 Medium), 混匀后于 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞后, 加入 AlexaFluor488 偶联山羊抗鼠 IgG+IgM(H+L) 抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 115-545-044), 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤

细胞并重悬，使用流式细胞仪（Sartorius, IQue3）检测荧光信号，通过染色的平均荧光强度（MFI）来分析小鼠抗 hGPCR5D 抗体与 H929 细胞的结合，部分结果见表 1。

表 1 部分小鼠抗 hGPCR5D 抗体与 H929 细胞的 FACS 结合测定

克隆编号	H929MFI	克隆编号	H929MFI	克隆编号	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

(2) 抗 hGPCR5D 抗体的细胞 ELISA 筛选

- 5 分别收集对数生长期的 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 细胞、CHO-K1-cynoGPCR5D 细胞、CHO-K1-murineGPCR5D 细胞和 CHO-K1 细胞，用含 10%（体积百分数）FBS 的 DMEM/F-12（Gibco, Cat: 11320033）培养基重悬，并调节细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL，按 100  $\mu$ L/孔铺板于 96 孔平底板，并在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养条件下孵育过夜；第二天，PBS 洗涤细胞板，加入 4%（体积百分数）多聚甲醛（碧云天, Cat: P0099）于室温固定 30 分钟；PBS 洗涤后，按 200  $\mu$ L/孔加入含 3%（体积百分数）BSA 的 PBS 溶液，于室温封闭 2 小时。封闭结束后，向细胞板各加入 50  $\mu$ L/孔的亚克隆细胞培养上清，于室温孵育 2 小时；PBS 洗涤，再加入 HRP 偶联山羊抗鼠 IgG+IgM(H+L) 抗体（Jackson Immuno Research, Cat: 115-035-068），室温孵育 1 小时；PBS 洗涤后，加入 100  $\mu$ L/孔的 TMB 反应液（索莱宝, Cat: RP1200），室温避光孵育 5 分钟，并用 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应；使用 Bio-rad iMark 酶标仪读取 OD450 吸光值。使用 Graphpad Prism 绘制亚克隆吸光值柱状图，如图 1 展示典型的小鼠抗 hGPCR5D 抗体（例如 mu-89、mu-105、mu-126、mu-128、mu-131、mu-153、mu-164、mu-169、mu-180 和 mu-183 等），其针对 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 细胞、CHO-K1-cynoGPCR5D 细胞和（或）CHO-K1-murineGPCR5D 细胞的吸光值与对照细胞 CHO-K1 相比，具有至少 2 倍的吸光值差异。

**实施例 3：抗 hGPCR5D 嵌合抗体的制备**

1、编码小鼠抗 hGPCR5D 抗体的可变区测序

- 20 按照 RNA 提取试剂盒（Takara, Cat: 9767）操作说明分离筛选出的杂交瘤细胞中的总 RNA，并通过逆转录试剂盒（Thermo, Cat: K1652）合成第一链 cDNA。以第一链 cDNA 作为模板，分别与小鼠的重链和轻链恒定区引物混合，使用聚合酶链式反应（PCR）技术，克隆并测序获得小鼠抗 hGPCR5D 抗体可变区序列。

2、嵌合抗体表达载体的构建

- 25 采用化学合成方法，将小鼠抗 hGPCR5D 抗体的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）的核苷酸序列分别与人 IgG1 重链恒定区和 Kappa 轻链恒定区的核苷酸序列连接，利用 pcDNA3.1(+) 载体构建重组人-鼠嵌合抗体表达载体，用于转染表达以制备嵌合抗体。各嵌合抗体全长以及 VH/VL 的核苷酸序列和氨基酸序列详见表 2。

表 2 嵌合抗体全长以及 VH/VL 的核苷酸序列和氨基酸序列

克隆编号	重链氨基酸/核苷酸序列	VH 氨基酸序列	轻链氨基酸/核苷酸序列	VL 氨基酸序列
Chi-89	SEQ ID NO:49/50	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:51/52	SEQ ID NO:24
Chi-105	SEQ ID NO:53/54	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:55/56	SEQ ID NO:32
Chi-128	SEQ ID NO:57/58	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:59/60	SEQ ID NO:40
Chi-131	SEQ ID NO:61/62	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:63/64	SEQ ID NO:8
Chi-169	SEQ ID NO:65/66	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:67/68	SEQ ID NO:16

- 30 3、阳性参照抗体表达载体的构建

选择 GC5B596 作为参照抗体（单抗，来源 WO2018017786A2），采用化学合成的方法获取抗体 VH（SEQ ID NO: 44）和 VL（SEQ ID NO: 45）的核苷酸序列，并分别与人 IgG1 重链恒定区和 Kappa 轻链恒定区的

核苷酸序列连接, 利用 pcDNA3.1 (+) 载体构建得到表达阳性参照抗体的表达载体, 用于转染表达以制备阳性参照抗体。阳性参照抗体 (单抗) 在本文中命名为 BM-mAb。

#### 4、抗 hGPCR5D 嵌合抗体和阳性参照抗体的制备

根据 expiCHO 表达系统 (Gibco, Cat: A29129) 的操作手册进行抗 hGPCR5D 抗体的瞬时转染表达, 转染后将 expiCHO 细胞置于 37°C、含 8% CO<sub>2</sub> 的条件下振荡培养 7 天; 收集细胞培养上清液, 然后将澄清的培养上清液分别上样至蛋白 A 柱 (G.E.Healthcare, Cat: 17-5474), 加入 10 倍柱体积的 PBS 缓冲液洗涤蛋白 A 柱, 再加入醋酸缓冲液 (300 mM 醋酸, pH 3.6) 洗脱和收集与蛋白 A 柱结合的 IgG 抗体, 将收集的 IgG 抗体组分通过超滤装置 (分子量截止值 30 kDa, Millipore, Cat: UFC903024) 置换于 PBS 缓冲液中, 获得抗 hGPCR5D 抗体溶液。

### 10 实施例 4: 抗 hGPCR5D 抗体与稳定表达人 GPCR5D 细胞的结合活性测定

#### 1、抗 hGPCR5D 嵌合抗体与稳定高表达人 GPCR5D 细胞的结合性质

将细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL 的 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> (GPCR5D 表达丰度为约  $2E+06$ - $3E+06$  个抗原/细胞) 细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板置于 96 孔 U 底板中, 加入梯度稀释抗 hGPCR5D 抗体 (终浓度范围是 4.1-3000 ng/mL, 3 倍梯度稀释), 混匀后于 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞后, 加入 PE 偶联山羊抗人 IgG Fc $\gamma$  抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 109-116-170), 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞并重悬, 使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号, 通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体与 CHO-K1-hGPCR5D<sup>hi</sup> 细胞的结合。经 GraphpadPrism 计算 EC<sub>50</sub> 的分析结果如图 2 所示, 嵌合抗体 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131、Chi-164、Chi-169 和 Chi-180 在高表达 hGPCR5D 细胞上均体现浓度梯度依赖的结合活性, 具有比 BM-mAb 更高的抗原最大结合量。

#### 2、抗 hGPCR5D 嵌合抗体与稳定低表达人 GPCR5D 细胞的结合性质

按照 lipofectamin3000 转染试剂 (Thermo, Cat: L3000015) 的操作说明, 将质粒 pcDNA3.1-hGPCR5D 转染到 CHO-K1 细胞中, 获得 CHO-K1-hGPCR5D<sup>low</sup> 稳定低表达细胞系 (GPCR5D 表达丰度为约 2000-2500 个抗原/细胞)。将细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL 的 CHO-K1-hGPCR5D<sup>low</sup> 细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板置于 96 孔 U 底板中, 加入梯度稀释抗 hGPCR5D 抗体 (终浓度范围是 4.1-3000 ng/mL, 3 倍梯度稀释), 混匀后于 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞后, 加入 PE 偶联山羊抗人 IgGFc $\gamma$  抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 109-116-170), 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞并重悬, 使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号, 通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体与 CHO-K1-hGPCR5D<sup>low</sup> 细胞的结合。如图 3 所示, 在低表达 hGPCR5D 的细胞上, 嵌合抗体 Chi-89、Chi-105、Chi-164、Chi-180 与 BM-mAb 相比, 其结合水平相当, 而 Chi-128、Chi-131 和 Chi-169 则体现出较强的靶点结合能力。

### 30 实施例 5: 抗 hGPCR5D 抗体与肿瘤细胞的结合活性测定

分别将细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL 的 H929 和 MM1S 人骨髓瘤细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板置于 96 孔 U 底板中, 加入梯度稀释抗 hGPCR5D 抗体 (终浓度范围是 4.1-1000 ng/mL, 3 倍梯度稀释), 混匀后于 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞后, 加入 PE 偶联山羊抗人 IgGFc $\gamma$  抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 109-116-170), 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞并重悬, 使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号, 通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体与人骨髓瘤细胞的结合, 应用 Graphpad Prism 作图 4A 和图 4B 可知, 嵌合抗体 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131 和 Chi-169 在 H929 和 MM1S 细胞上均呈现浓度梯度依赖的结合活性。

### 40 实施例 6: 抗 hGPCR5D 抗体的种属交叉活性测定

分别将细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的 CHO-K1-cynoGPCR5D 和 CHO-K1-murineGPCR5D 细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板于 96 孔 U 底板中, 加入梯度稀释抗 hGPCR5D 抗体 (终浓度范围是 4.6-10000 ng/mL, 3 倍梯度稀释), 混匀后于 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤后, 加入 PE 偶联山羊抗人 IgGFc $\gamma$  抗体 (Jackson Immuno Research, Cat:109-116-170), 4°C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤并重悬细胞, 使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号, 通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体与 CHO-K1-cynoGPCR5D 和 CHO-K1-murineGPCR5D 细胞的结合。如图 5A 和 5B 所示, 嵌合抗体 Chi-89、Chi-128、Chi-131 和 Chi-169 在 CHO-K1-cynoGPCR5D 和 CHO-K1-murineGPCR5D

细胞都体现了浓度梯度依赖的结合活性,表明这些抗 hGPCR5D 抗体与 BM-mAb 相比,同时具备猴与小鼠的 GPCR5D 交叉结合活性;而嵌合抗体 Chi-105 仅与猴 GPCR5D 具交叉结合活性。

#### 实施例 7: 抗 hGPCR5D 抗体的特异性验证

##### 1、抗 hGPCR5D 嵌合抗体在细胞水平上与同家族蛋白结合的验证

5 已知 GPCR 家族蛋白除 GPCR5D 以外,还包括 GPCR5A (RAIG1)、GPCR5B (RAIG2) 和 GPCR5C (RAIG3)。分别将编码全长 GPCR5A (SEQ ID NO:46)、GPCR5B (SEQ ID NO:47) 和 GPCR5C (SEQ ID NO:48) 的 cDNA 通过基因合成获得,然后亚克隆到载体 pcDNA3.1(+)中,得到 pcDNA3.1-GPCR5A-GFP、pcDNA3.1-GPCR5B-GFP 和 pcDNA3.1-GPCR5C-GFP 重组质粒。参照 lipofectamin3000 转染试剂 (Thermo, Cat: L3000015) 的操作说明,将上述重组质粒 DNA 分别转染到 CHO-K1 细胞中,获得 CHO-K1-GPCR5A、  
10 CHO-K1-GPCR5B 和 CHO-K1-GPCR5C 稳定细胞系。

分别将细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的 CHO-K1-GPCR5A、CHO-K1-GPCR5B 和 CHO-K1-GPCR5C 细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板于 96 孔 U 底板中,加入梯度稀释抗 hGPCR5D 抗体(终浓度范围是 4.1-3000 ng/mL, 3 倍梯度稀释),混匀后于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤后,加入 APC 偶联山羊抗人 IgGFc $\gamma$  抗体 (Jackson Immuno Research, Cat: 109-135-098), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤并重悬细胞,使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号,通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体与 CHO-K1-GPCR5A、CHO-K1-GPCR5B 和 CHO-K1-GPCR5C 细胞的结合。如图 6A、6B 和 6C 所示,嵌合抗体 Chi-89、Chi-105、Chi-128、Chi-131 和 Chi-169 在 4.1-3000 ng/mL 浓度范围内与 CHO-K1-GPCR5A、CHO-K1-GPCR5B 和 CHO-K1-GPCR5C 细胞均不结合, BM-mAb 在大于 1000 ng/mL 浓度下与 CHO-K1-GPCR5A 细胞出现非特异性结合。  
15

##### 20 2、抗 hGPCR5D 嵌合抗体与 CHO-K1 细胞的结合验证

首先,按照 EZ-linkNHS-Biotin 生物素试剂 (Thermo, Cat: 20217) 的操作说明,分别制备生物素偶联抗 hGPCR5D 抗体,分别命名为 Biotin-BM-mAb、Biotin-Chi-89、Biotin-Chi-128 和 Biotin-Chi-131,其中 Biotin 表示生物素。

将细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL 的 CHO-K1 细胞悬液按 100  $\mu$ L/孔铺板置于 96 孔 U 底板中,加入梯度稀释的生物素偶联抗 hGPCR5D 抗体 (3 倍梯度稀释,终浓度范围是 4.6-10000 ng/mL),混匀后于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞后,加入 PE 偶联链霉亲和素 (BD, Cat: 554061), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞并重悬,使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号,通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析经过生物素偶联后, MFI 信号放大的抗 hGPCR5D 抗体与 CHO-K1 细胞是否具有非特异性结合。结果如图 7 所示,生物素偶联的嵌合抗体 Chi-89、Chi-128 和 Chi-131 与 CHO-K1 细胞均产生不结合信号。  
25  
30

#### 实施例 8: 抗 hGPCR5D 抗体的内化活性

将 MM1S 细胞用含 10% (体积百分数) FBS 的 RPMI1640 培养基 (Gibco, Cat: 22400071) 重悬并调节细胞浓度到  $2 \times 10^6$  个/mL,按 20  $\mu$ L/孔铺于 96 孔 V 底板。分别将抗体内化试剂 (Sartorius, Cat: 90564) 加入到抗 hGPCR5D 抗体 BM-mAb、Chi-89、Chi-128 和 Chi-131,以及同型对照抗体 hIgG1 (Biointron, Cat: B117901) 中,并置于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 分钟。然后用含 10% (体积百分数) FBS 的 RPMI1640 培养基 (Gibco, Cat: 22400071) 对上述抗体进行梯度稀释 (终浓度范围是 0.46-1000 ng/mL, 3 倍梯度稀释),吸取 20 $\mu$ L/孔与细胞悬液混匀,并置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。孵育结束后,用含 2% (体积百分数) FBS 的 PBS 洗涤细胞并重悬,使用流式细胞仪 (Sartorius, IQue3) 检测荧光信号,通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来分析抗 hGPCR5D 抗体的内化活性。结果如图 8 所示,嵌合抗体 Chi-89、Chi-128 和 Chi-131 介导的靶点 GPCR5D 的内化与 BM-mAb 相比水平相当,仅产生微弱的内化作用。  
35  
40

权利要求书

1. 一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体包含:
- 5 重链可变区, 其包含:
- HCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 1、9、17、25 或 33 所示的氨基酸序列,  
HCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 2、10、18、26 或 34 所示的氨基酸序列, 和  
HCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 3、11、19、27 或 35 所示的氨基酸序列; 和  
轻链可变区, 其包含:
- 10 LCDR1, 其包含 SEQ ID NO: 4、12、20、28 或 36 所示的氨基酸序列,  
LCDR2, 其包含 SEQ ID NO: 5、13、21、29 或 37 所示的氨基酸序列, 和  
LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6、14、22、30 或 38 所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体包含:
- (i)重链可变区, 其包含:
- 15 包含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:  
包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
20 包含 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的 LCDR3;
- (ii)重链可变区, 其包含:
- 包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
25 包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:  
包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 LCDR3;
- 30 (iii)重链可变区, 其包含:  
包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:  
35 包含 SEQ ID NO: 20 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 22 所示氨基酸序列的 LCDR3;
- (iv)重链可变区, 其包含:
- 包含 SEQ ID NO: 25 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
40 包含 SEQ ID NO: 26 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 27 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:  
包含 SEQ ID NO: 28 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
45 包含 SEQ ID NO: 30 所示氨基酸序列的 LCDR3 ; 或
- (v)重链可变区, 其包含:

包含 SEQ ID NO: 33 所示氨基酸序列的 HCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 34 所示氨基酸序列的 HCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 35 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和  
轻链可变区, 其包含:

- 5 包含 SEQ ID NO: 36 所示氨基酸序列的 LCDR1,  
包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的 LCDR2, 和  
包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的 LCDR3。

3. 一种分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,  
10 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

4. 根据权利要求 3 所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 15 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 16 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 23 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 24 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 31 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 32 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 39 所示可变区序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 40 所示可变区序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7、15、23、31 或 39 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列; 或/和,

所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8、16、24、32 或 40 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 5 所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链可变区和轻链可变区选自以下任一项:

(i) 所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 7 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 8 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;

(ii) 所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 15 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 16 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;

(iii) 所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 23 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 24 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;

(iv) 所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 31 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 32 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列; 或,

(v) 所述的重链可变区包含与 SEQ ID NO: 39 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 所述的轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 40 所示序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段为 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fd 片段、Fv 片段、分离的 CDR 区或 scFv;

可选地, 所述的抗 GPRC5D 抗体是嵌合的、人源化的或全人的;

40 可选地, 所述抗 GPRC5D 抗体为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原片段结合人 GPRC5D 抗原, 可选的, 还具有以下任意一种或几种性质:

(1) 结合猴 GPRC5D 抗原;

(2) 结合鼠 GPRC5D 抗原; 或

45 (3) 不结合 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 中的一种或几种。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的分离的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗 GPRC5D 抗体为单特异性抗体或多特异性抗体。

10. 一种融合蛋白，其包含根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。
11. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 10 所述的融合蛋白，其还进一步包含药学上可接受的载体。
12. 一种分离的核酸，其编码根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段。
- 5 13. 一种载体，其包含根据权利要求 12 所述的核酸。
14. 一种宿主细胞，其包含根据权利要求 13 所述的载体或在其基因组中整合有权利要求 12 所述的核酸。
15. 一种制备根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的方法，包括：培养宿主细胞，从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，所述宿主细胞包含编码所述 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段的核酸。
- 10 16. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 10 所述的融合蛋白在制备治疗疾病或制备减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的药物中的用途，优选所述疾病是癌症或自身免疫疾病；优选，所述癌症是多发性骨髓瘤。
17. 一种用于在受试者中减少肿瘤或抑制肿瘤细胞生长、或者在受试者中治疗疾病的方法，其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-9 中任一项所述的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段、  
15 根据权利要求 10 所述的融合蛋白或权利要求 11 所述的药物组合物；优选所述疾病是癌症或自身免疫疾病；优选，所述癌症是多发性骨髓瘤。

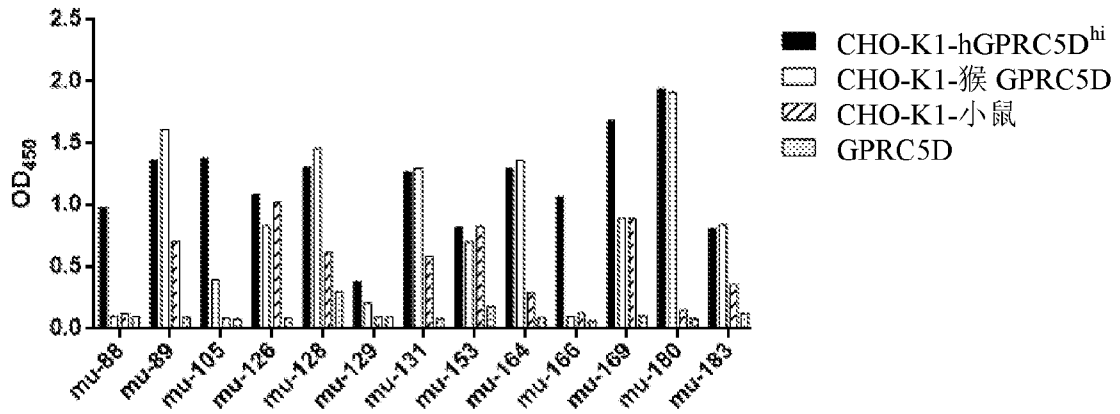
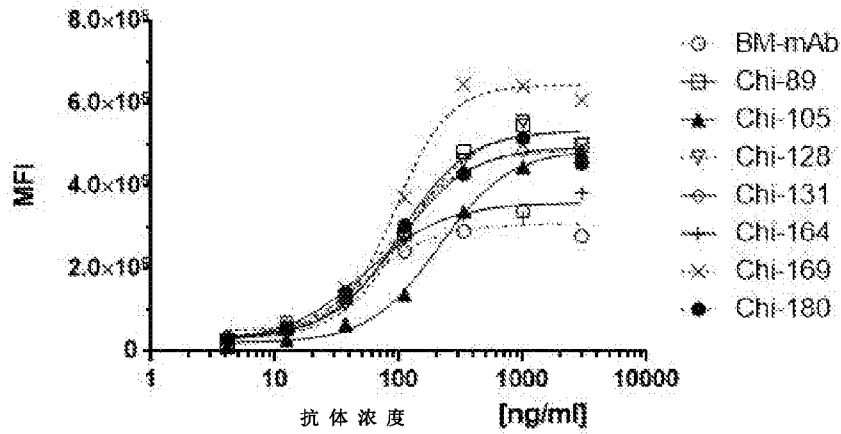


图 1



抗体编号	EM-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

图 2

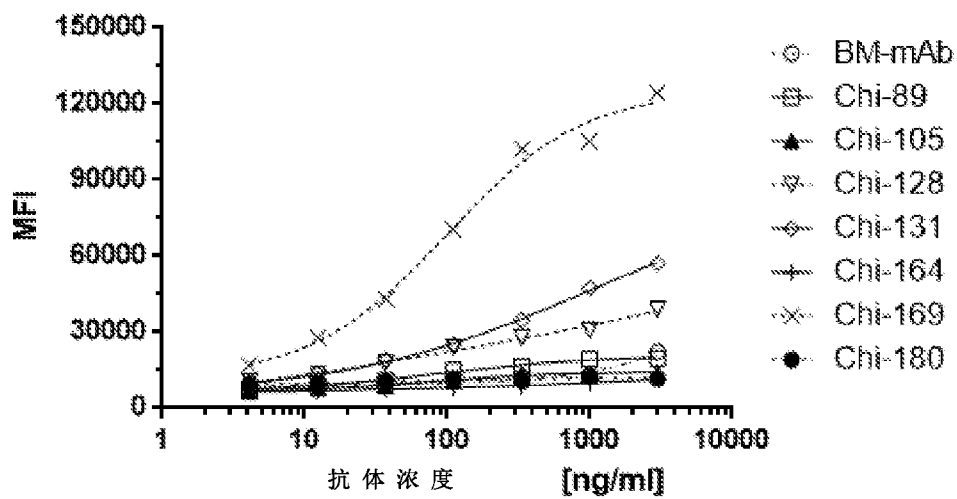


图 3

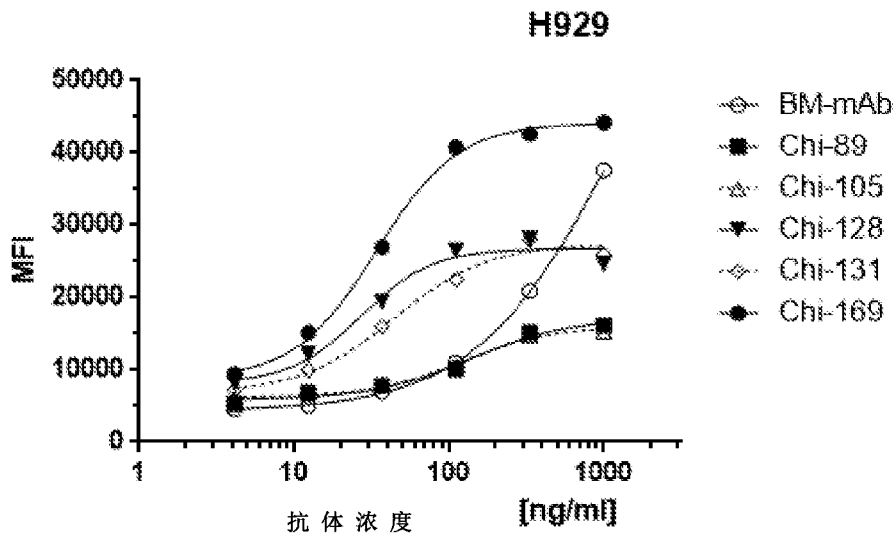


图 4A

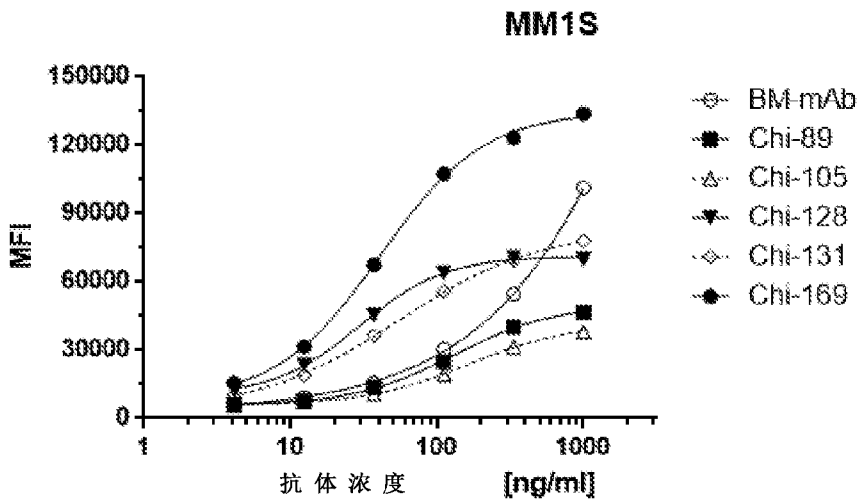


图 4B

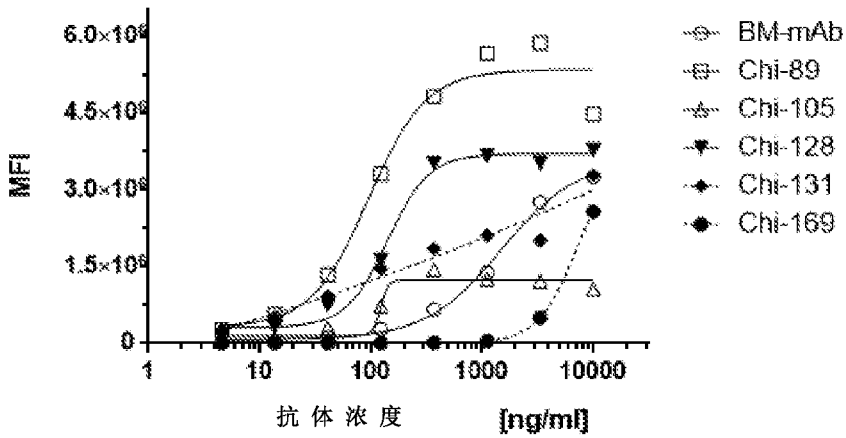


图 5A

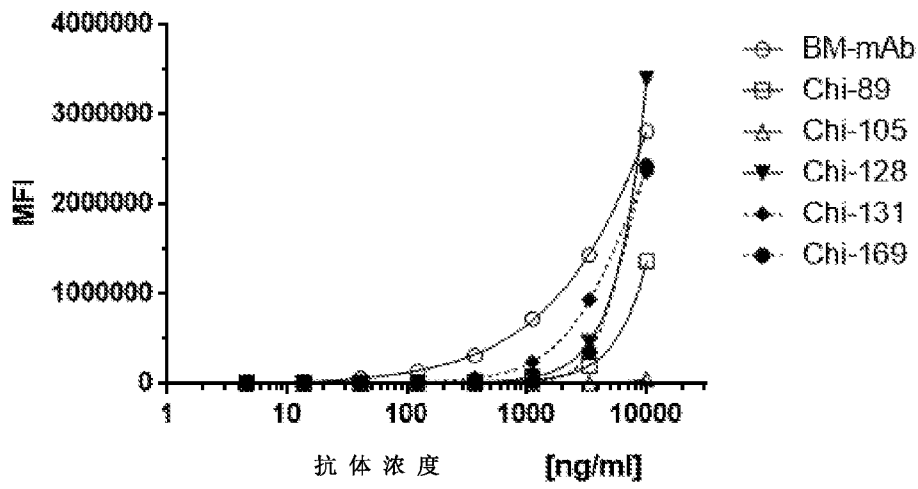


图 5B

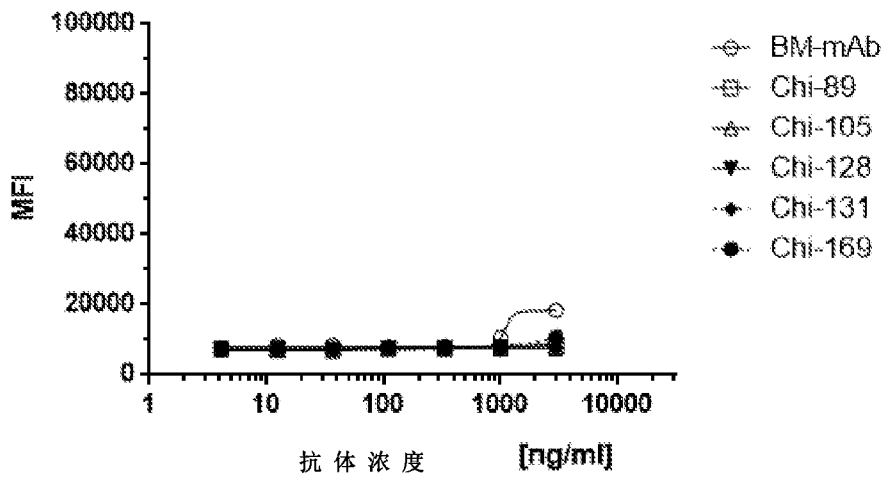


图 6A

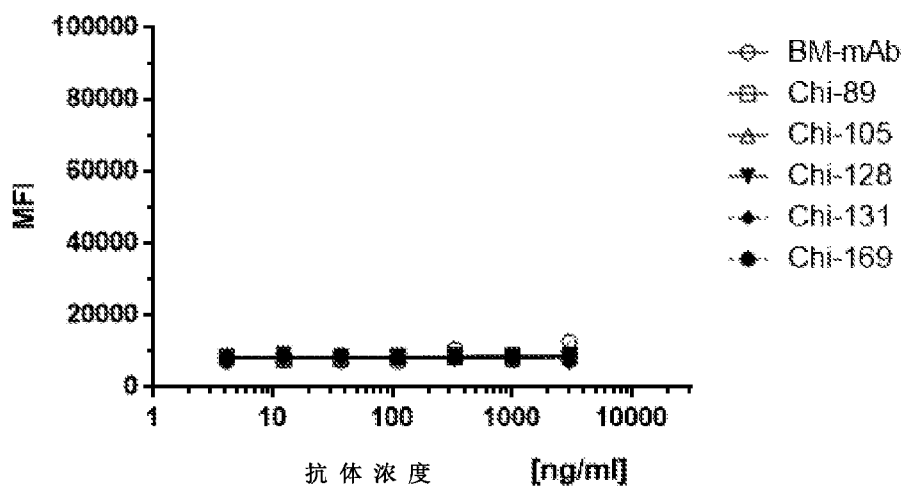


图 6B

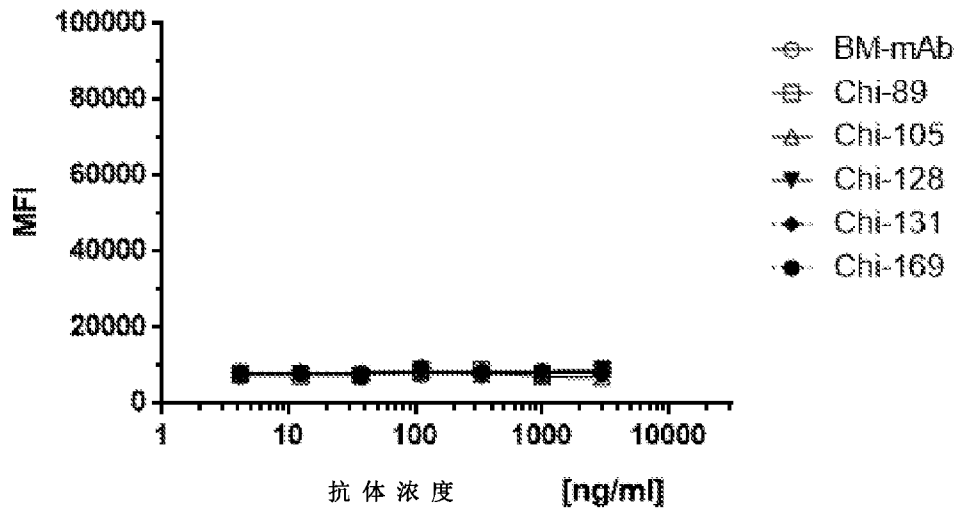


图 6C

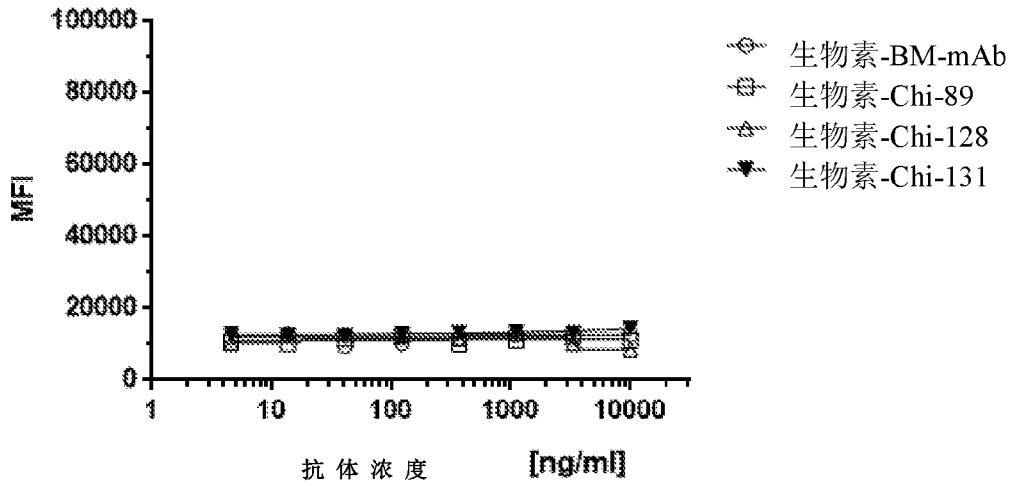


图 7

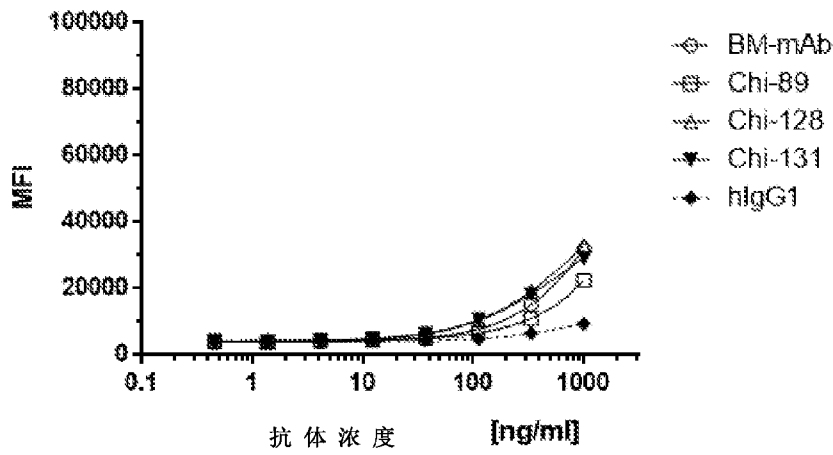


图 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/129803

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, Web of Science, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, HimmPat, incoPat, 中国生物序列检索系统, Chinese Biological Sequence Retrieval System, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, GPRC5D, G蛋白偶联受体家族C组5成员D, G protein-coupled receptor class C group 5 member D, 序列1-71		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109715667 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 03 May 2019 (2019-05-03) entire document	1-17
A	CN 107206077 A (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER et al.) 26 September 2017 (2017-09-26) entire document	1-17
A	CN 110462038 A (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 15 November 2019 (2019-11-15) entire document	1-17
A	CN 111788231 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 16 October 2020 (2020-10-16) entire document	1-17
A	CN 113597433 A (JANSSEN BIOTECHNOLOGY, INC.) 02 November 2021 (2021-11-02) entire document	1-17
A	WO 2021018859 A2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 04 February 2021 (2021-02-04) entire document	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>21 December 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>04 January 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2022/129803**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KODAMA, T. et al. "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." <i>MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS.</i> , Vol. 18, No. 9, 03 July 2019 (2019-07-03), pp. 1555-1564	1-17
.....		

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
  - [1] The actually submitted sequence table is an XML file in Standard ST.26.

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claim 17 relates to a method for treating a disease, belonging to the subject matter as defined in PCT Rule 39.1(iv) that does not warrant a search conducted by the international searching authority. However, a search was conducted on the basis that the subject matter is amended to a corresponding pharmaceutical use.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/129803**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109715667	A	03 May 2019	AR	109499	A1	19 December 2018
				CR	20190025	A	14 March 2019
				ZA	201901066	B	28 October 2020
				NI	201900005	A	10 May 2019
				BR	112019001055	A2	01 October 2019
				TW	201809005	A	16 March 2018
				UY	37340	A	31 January 2018
				KR	20190028534	A	18 March 2019
				EP	3487882	A2	29 May 2019
				PH	12019500152	A1	14 October 2019
				EC	SP19012075	A	28 February 2019
				CA	3031472	A1	25 January 2018
				EA	201990346	A1	28 June 2019
				CL	2019000146	A1	26 April 2019
				SG	11201900468	Y A	27 February 2019
				AU	2017299673	A1	07 February 2019
				IL	264334	A	28 February 2019
				MA	45712	A	29 May 2019
				WO	2018017786	A2	25 January 2018
				JP	2019527061	A	26 September 2019
				US	2018037651	A1	08 February 2018
PE	20190392	A1	13 March 2019				
CO	2019001114	A2	19 February 2019				
MX	2019000825	A	04 September 2019				
CN	107206077	A	26 September 2017	HK	1243955	A1	27 July 2018
				EP	3227324	A2	11 October 2017
				US	2020123249	A1	23 April 2020
				JP	2022044638	A	17 March 2022
				US	2018118822	A1	03 May 2018
				BR	112017011932	A2	16 January 2018
				IL	285101	A	31 August 2021
				RU	2017123545	A	14 January 2019
				IL	252646	D0	31 July 2017
				SG	10201913937	Q A	30 March 2020
				KR	20170108945	A	27 September 2017
				CN	113429484	A	24 September 2021
				PH	12017501039	A1	05 March 2018
				MX	2017007247	A	25 January 2018
				JP	2020120684	A	13 August 2020
				JP	2018504890	A	22 February 2018
				JP	2020191900	A	03 December 2020
				CN	113429482	A	24 September 2021
				CA	2969886	A1	09 June 2016
				US	2020123250	A1	23 April 2020
				RU	2020120613	A	06 December 2021
				SA	517381664	B1	27 December 2021
				AU	2015357535	A1	29 June 2017
				SG	11201704552	T A	28 July 2017
JP	2022103382	A	07 July 2022				
AU	2020217320	A1	27 August 2020				

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/129803**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				WO	2016090329	A2	09 June 2016
CN	110462038	A	15 November 2019	BR	112019016204	A2	07 July 2020
				KR	20190133160	A	02 December 2019
				EP	3581651	A1	18 December 2019
				PH	12019501824	A1	14 September 2020
				MX	2019009358	A	02 December 2019
				ZA	201905905	B	25 May 2022
				IL	268588	A	26 September 2019
				SG	10201912368 X	A	27 February 2020
				SG	11201907321 T	A	27 September 2019
				WO	2018147245	A1	16 August 2018
				AU	2018218753	A1	26 September 2019
				TW	201837174	A	16 October 2018
				CA	3052938	A1	16 August 2018
				RU	2019128134	A	09 March 2021
				JP	WO2018147245	A1	21 November 2019
				US	2019367612	A1	05 December 2019
				CO	2019009680	A2	07 February 2020
CN	111788231	A	16 October 2020	TW	201936641	A	16 September 2019
				RU	2020129004	A	09 March 2022
				KR	20200119833	A	20 October 2020
				EP	3749692	A1	16 December 2020
				PE	20201341	A1	25 November 2020
				CO	2020008940	A2	31 August 2020
				IL	276537	A	30 September 2020
				MX	2020007012	A	07 September 2020
				MA	51734	A	19 May 2021
				JP	2021513334	A	27 May 2021
				AU	2019219061	A1	06 August 2020
				CR	20200341	A	02 November 2020
				US	2021054094	A1	25 February 2021
				WO	2019154890	A1	15 August 2019
				CL	2020001854	A1	23 October 2020
				SG	11202007578 S	A	29 September 2020
				BR	112020015297	A2	08 December 2020
				CA	3088730	A1	15 August 2019
				AR	117392	A1	04 August 2021
				PH	12020551211	A1	17 May 2021
CN	113597433	A	02 November 2021	CA	3127025	A1	23 July 2020
				JP	2022518708	A	16 March 2022
				CO	2021010075	A2	19 August 2021
				EA	202191939	A1	12 October 2021
				IL	284744	A	31 August 2021
				US	2020231686	A1	23 July 2020
				EC	SP21060675	A	30 September 2021
				EP	3911677	A1	24 November 2021
				AU	2020209257	A1	05 August 2021
				WO	2020148677	A1	23 July 2020
				UY	38546	A	31 July 2020
				CL	2021001883	A1	21 January 2022

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/129803**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				KR	20210116562	A	27 September 2021
				TW	202043263	A	01 December 2020
				SG	11202107708 X	A	30 August 2021
				PE	20211977	A1	05 October 2021
				AR	119676	A1	05 January 2022
WO	2021018859	A2	04 February 2021	AR	119553	A1	29 December 2021
				US	2022259318	A1	18 August 2022
				BR	112022001460	A2	22 March 2022
				CA	3144524	A1	04 February 2021
				JP	2022543553	A	13 October 2022
				PE	20220394	A1	18 March 2022
				EP	4003526	A2	01 June 2022
				AU	2020323686	A1	11 November 2021
				CL	2022000127	A1	28 October 2022
				IL	287613	A	01 December 2021
				KR	20220028035	A	08 March 2022
				CR	20220019	A	11 February 2022
				SG	11202112491 W	A	30 December 2021
				CN	114174342	A	11 March 2022
				CO	2022000803	A2	07 February 2022
				TW	202112823	A	01 April 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/129803

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 16/28 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXTX, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, Web of Science, 百度学术, HimmPat, incoPat, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, GPRC5D, G蛋白偶联受体家族C组5成员D, G protein-coupled receptor class C group 5 member D, 序列1-71</p>																										
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 109715667 A (詹森药业有限公司) 2019年5月3日 (2019 - 05 - 03) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107206077 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心等) 2017年9月26日 (2017 - 09 - 26) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110462038 A (第一三共株式会社) 2019年11月15日 (2019 - 11 - 15) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111788231 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2020年10月16日 (2020 - 10 - 16) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113597433 A (詹森生物科技公司) 2021年11月2日 (2021 - 11 - 02) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021018859 A2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2021年2月4日 (2021 - 02 - 04) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KODAMA, T. 等. "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS., 第18卷, 第9期, 2019年7月3日 (2019 - 07 - 03), 第1555-1564页</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 109715667 A (詹森药业有限公司) 2019年5月3日 (2019 - 05 - 03) 全文	1-17	A	CN 107206077 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心等) 2017年9月26日 (2017 - 09 - 26) 全文	1-17	A	CN 110462038 A (第一三共株式会社) 2019年11月15日 (2019 - 11 - 15) 全文	1-17	A	CN 111788231 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2020年10月16日 (2020 - 10 - 16) 全文	1-17	A	CN 113597433 A (詹森生物科技公司) 2021年11月2日 (2021 - 11 - 02) 全文	1-17	A	WO 2021018859 A2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2021年2月4日 (2021 - 02 - 04) 全文	1-17	A	KODAMA, T. 等. "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS., 第18卷, 第9期, 2019年7月3日 (2019 - 07 - 03), 第1555-1564页	1-17
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
A	CN 109715667 A (詹森药业有限公司) 2019年5月3日 (2019 - 05 - 03) 全文	1-17																								
A	CN 107206077 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心等) 2017年9月26日 (2017 - 09 - 26) 全文	1-17																								
A	CN 110462038 A (第一三共株式会社) 2019年11月15日 (2019 - 11 - 15) 全文	1-17																								
A	CN 111788231 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2020年10月16日 (2020 - 10 - 16) 全文	1-17																								
A	CN 113597433 A (詹森生物科技公司) 2021年11月2日 (2021 - 11 - 02) 全文	1-17																								
A	WO 2021018859 A2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2021年2月4日 (2021 - 02 - 04) 全文	1-17																								
A	KODAMA, T. 等. "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS., 第18卷, 第9期, 2019年7月3日 (2019 - 07 - 03), 第1555-1564页	1-17																								
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年12月21日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年1月4日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>冯晓亮</p> <p>电话号码 86-(10)-53961927</p>																								

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a.  作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列列表是ST. 26标准的XML文件。

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 17  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求17涉及疾病的治疗方法，属于PCT实施细则39.1(iv)规定的不要国际检索单位检索的主题。但是，基于上述主题修改为相应的制药用途进行检索。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/129803

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109715667	A	2019年5月3日	AR	109499	A1	2018年12月19日
				CR	20190025	A	2019年3月14日
				ZA	201901066	B	2020年10月28日
				NI	201900005	A	2019年5月10日
				BR	112019001055	A2	2019年10月1日
				TW	201809005	A	2018年3月16日
				UY	37340	A	2018年1月31日
				KR	20190028534	A	2019年3月18日
				EP	3487882	A2	2019年5月29日
				PH	12019500152	A1	2019年10月14日
				EC	SP19012075	A	2019年2月28日
				CA	3031472	A1	2018年1月25日
				EA	201990346	A1	2019年6月28日
				CL	2019000146	A1	2019年4月26日
				SG	11201900468Y	A	2019年2月27日
				AU	2017299673	A1	2019年2月7日
				IL	264334	A	2019年2月28日
				MA	45712	A	2019年5月29日
				WO	2018017786	A2	2018年1月25日
				JP	2019527061	A	2019年9月26日
				US	2018037651	A1	2018年2月8日
				PE	20190392	A1	2019年3月13日
				CO	2019001114	A2	2019年2月19日
				MX	2019000825	A	2019年9月4日
CN	107206077	A	2017年9月26日	HK	1243955	A1	2018年7月27日
				EP	3227324	A2	2017年10月11日
				US	2020123249	A1	2020年4月23日
				JP	2022044638	A	2022年3月17日
				US	2018118822	A1	2018年5月3日
				BR	112017011932	A2	2018年1月16日
				IL	285101	A	2021年8月31日
				RU	2017123545	A	2019年1月14日
				IL	252646	D0	2017年7月31日
				SG	10201913937Q	A	2020年3月30日
				KR	20170108945	A	2017年9月27日
				CN	113429484	A	2021年9月24日
				PH	12017501039	A1	2018年3月5日
				MX	2017007247	A	2018年1月25日
				JP	2020120684	A	2020年8月13日
				JP	2018504890	A	2018年2月22日
				JP	2020191900	A	2020年12月3日
				CN	113429482	A	2021年9月24日
				CA	2969886	A1	2016年6月9日
				US	2020123250	A1	2020年4月23日
				RU	2020120613	A	2021年12月6日
				SA	517381664	B1	2021年12月27日
				AU	2015357535	A1	2017年6月29日
				SG	11201704552T	A	2017年7月28日
				JP	2022103382	A	2022年7月7日
				AU	2020217320	A1	2020年8月27日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/129803

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
-----				WO	2016090329	A2	2016年6月9日
CN	110462038	A	2019年11月15日	BR	112019016204	A2	2020年7月7日
				KR	20190133160	A	2019年12月2日
				EP	3581651	A1	2019年12月18日
				PH	12019501824	A1	2020年9月14日
				MX	2019009358	A	2019年12月2日
				ZA	201905905	B	2022年5月25日
				IL	268588	A	2019年9月26日
				SG	10201912368X	A	2020年2月27日
				SG	11201907321T	A	2019年9月27日
				WO	2018147245	A1	2018年8月16日
				AU	2018218753	A1	2019年9月26日
				TW	201837174	A	2018年10月16日
				CA	3052938	A1	2018年8月16日
				RU	2019128134	A	2021年3月9日
				JP	WO2018147245	A1	2019年11月21日
				US	2019367612	A1	2019年12月5日
				CO	2019009680	A2	2020年2月7日
-----							
CN	111788231	A	2020年10月16日	TW	201936641	A	2019年9月16日
				RU	2020129004	A	2022年3月9日
				KR	20200119833	A	2020年10月20日
				EP	3749692	A1	2020年12月16日
				PE	20201341	A1	2020年11月25日
				CO	2020008940	A2	2020年8月31日
				IL	276537	A	2020年9月30日
				MX	2020007012	A	2020年9月7日
				MA	51734	A	2021年5月19日
				JP	2021513334	A	2021年5月27日
				AU	2019219061	A1	2020年8月6日
				CR	20200341	A	2020年11月2日
				US	2021054094	A1	2021年2月25日
				WO	2019154890	A1	2019年8月15日
				CL	2020001854	A1	2020年10月23日
				SG	11202007578S	A	2020年9月29日
				BR	112020015297	A2	2020年12月8日
				CA	3088730	A1	2019年8月15日
				AR	117392	A1	2021年8月4日
				PH	12020551211	A1	2021年5月17日
-----							
CN	113597433	A	2021年11月2日	CA	3127025	A1	2020年7月23日
				JP	2022518708	A	2022年3月16日
				CO	2021010075	A2	2021年8月19日
				EA	202191939	A1	2021年10月12日
				IL	284744	A	2021年8月31日
				US	2020231686	A1	2020年7月23日
				EC	SP21060675	A	2021年9月30日
				EP	3911677	A1	2021年11月24日
				AU	2020209257	A1	2021年8月5日
				WO	2020148677	A1	2020年7月23日
				UY	38546	A	2020年7月31日
				CL	2021001883	A1	2022年1月21日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/129803

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				KR	20210116562	A	2021年9月27日
				TW	202043263	A	2020年12月1日
				SG	11202107708X	A	2021年8月30日
				PE	20211977	A1	2021年10月5日
				AR	119676	A1	2022年1月5日
WO	2021018859	A2	2021年2月4日	AR	119553	A1	2021年12月29日
				US	2022259318	A1	2022年8月18日
				BR	112022001460	A2	2022年3月22日
				CA	3144524	A1	2021年2月4日
				JP	2022543553	A	2022年10月13日
				PE	20220394	A1	2022年3月18日
				EP	4003526	A2	2022年6月1日
				AU	2020323686	A1	2021年11月11日
				CL	2022000127	A1	2022年10月28日
				IL	287613	A	2021年12月1日
				KR	20220028035	A	2022年3月8日
				CR	20220019	A	2022年2月11日
				SG	11202112491W	A	2021年12月30日
				CN	114174342	A	2022年3月11日
				CO	2022000803	A2	2022年2月7日
				TW	202112823	A	2021年4月1日