



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116333133 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202211621205.2

(22) 申请日 2017.07.20

(30) 优先权数据

62/364811 2016.07.20 US

(62) 分案原申请数据

201780057838.6 2017.07.20

(71) 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时比尔斯特恩豪特斯路30号

(72) 发明人 R.阿塔 D.钱 S.艾达维塔尔

F.高德 Y.李 L.鲁伊斯特罗

N.马耶维斯基 M.曼登卡

K.皮拉瑞斯迪 A.泰普亚科夫

M.特内塔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

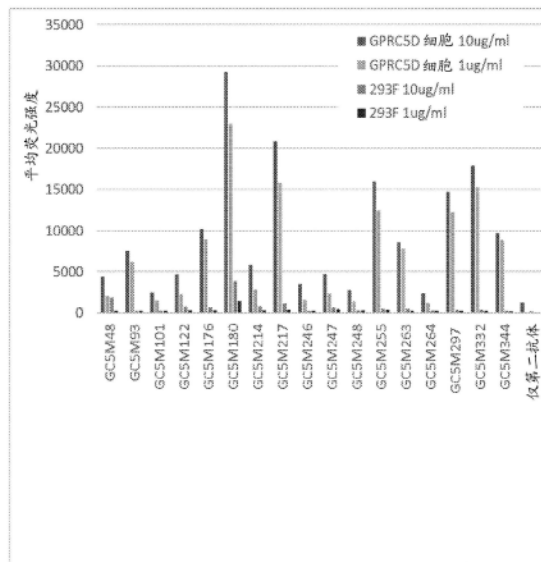
权利要求书6页 说明书81页
序列表(电子公布) 附图29页

(54) 发明名称

抗-GPRC5D抗体、结合GPRC5D和CD3的双特异性抗原结合分子及其用途

(57) 摘要

本文提供了特异性地结合至GPRC5D的抗体。本发明还描述了能够编码所提供的GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所提供的抗体或抗原结合片段的细胞、以及相关载体和带可检测标记的抗体或抗原结合片段。此外,还描述了使用所提供的抗体的方法。例如,所提供的抗体可用于诊断、治疗或监测GPRC5D表达型癌症的进展、消退或稳定性;以用于确定癌症患者是否应该接受治疗;或用于确定受治疗者是否患有GPRC5D表达型癌症,并因此可适于用GPRC5D特异性抗癌治疗剂诸如本文所述的针对GPRC5D和CD3的多特异性抗体治疗。



1. 一种特异性地结合至GPCR5D的分离抗体或其抗原结合片段,所述分离抗体或其抗原结合片段包含:

a. 具有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的重链CDR3;

b. 具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的重链CDR3;

c. 具有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3;

d. 具有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的重链CDR3;

e. 具有SEQ ID NO: 61的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 67的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 72的氨基酸序列的重链CDR3;

f. 具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 28的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 30的氨基酸序列的重链CDR3;

g. 具有SEQ ID NO: 27的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 29的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 73的氨基酸序列的重链CDR3;

h. 具有SEQ ID NO: 27的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 29的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的重链CDR3;

i. 具有SEQ ID NO: 62的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 68的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 74的氨基酸序列的重链CDR3;

j. 具有SEQ ID NO: 63的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 69的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 75的氨基酸序列的重链CDR3;

k. 具有SEQ ID NO: 64的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 70的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的重链CDR3;

l. 具有SEQ ID NO: 65的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 68的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 76的氨基酸序列的重链CDR3;或

m. 具有SEQ ID NO: 66的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO: 71的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 77的氨基酸序列的重链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的分离抗体或抗原结合片段,其中

a. 包含具有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 19的氨基酸序列的轻链CDR3;

b. 包含具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 19的氨基酸序列的轻链CDR3;

c. 包含具有SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体

还包含具有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的轻链CDR3;

d. 包含具有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 18的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 21的氨基酸序列的轻链CDR3;

e. 包含具有SEQ ID NO: 61的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 67的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 72的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 78的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 80的氨基酸序列的轻链CDR3;

f. 包含具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 28的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 30的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 19的氨基酸序列的轻链CDR3;

g. 包含具有SEQ ID NO: 27的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 29的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 73的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的轻链CDR3;

h. 包含具有SEQ ID NO: 27的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 29的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的轻链CDR3;

i. 包含具有SEQ ID NO: 62的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 68的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 74的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 20的氨基酸序列的轻链CDR3;

j. 包含具有SEQ ID NO: 63的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 69的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 75的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 78的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 80的氨基酸序列的轻链CDR3;

k. 包含具有SEQ ID NO: 61的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 67的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 72的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 78的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 80的氨基酸序列的轻链CDR3;

l. 包含具有SEQ ID NO: 65的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 68的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 76的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 95的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 79的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 81的氨基酸序列的轻链CDR3;或

m. 包含具有SEQ ID NO: 66的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO: 71的氨基

酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 77的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO: 18的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO: 21的氨基酸序列的轻链CDR3。

3. 一种分离抗体或其抗原结合片段,所述分离抗体或其抗原结合片段特异性地结合至GPCR5D并且包含选自SEQ ID NO: 52、53、54、55、82、83、84、85、86、87、88、89、或91的可变重(VH)链区。

4. 根据权利要求3所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO: 56、57、58、92、93、或94的可变轻(VL)链区。

5. 根据权利要求3所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO: 52、53、54、55、82、83、84、85、86、87、88、89、或91的VH区以及选自SEQ ID NO: 56、57、58、92、93、或94的VL区。

6. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO: 56的VL链区配对的SEQ ID NO: 52、53、或83。

7. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO: 57的VL链区配对的SEQ ID NO: 54、84、85、86、或90。

8. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO: 58的VL链区配对的SEQ ID NO: 55或88。

9. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO: 92的VL链区配对的SEQ ID NO: 82或87。

10. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO: 93的VL链区配对的SEQ ID NO: 89。

11. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO: 94的VL链区配对的SEQ ID NO: 91。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合至具有SEQ ID NO: 22的氨基酸序列的多肽。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段为人抗体或抗原结合片段。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是重组的。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为Fab片段、Fab2片段或单链抗体。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

17. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段为IgG1或IgG4同种型。

18. 根据权利要求17所述的抗体,其中所述IgG1在其Fc区中具有K409R置换。

19. 根据权利要求17所述的抗体,其中所述IgG1在其Fc区中具有F405L置换。

20. 根据权利要求20所述的抗体,其中所述IgG4在其Fc区中具有F405L置换和R409K置换。

21. 根据权利要求16所述的抗体,所述抗体还在其Fc区中包含S228P置换、L234A置换和L235A置换。

22. 根据权利要求1至14中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合人GPCR5D并与食蟹猴GPCR5D交叉反应。

23. 根据权利要求17中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以小于约28 nM的EC₅₀体外诱导ADCC。

24. 一种分离细胞,所述分离细胞表达根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

25. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述细胞为杂交瘤。

26. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述抗体是重组产生的。

27. 一种分离GPCR5D×CD3双特异性抗体或其GPCR5D×CD3双特异性结合片段,所述分离GPCR5D×CD3双特异性抗体包含:

- a) 第一重链(HC1);
- b) 第二重链(HC2);
- c) 第一轻链(LC1);以及
- d) 第二轻链(LC2),

其中所述HC1和所述LC1配对形成特异性地结合CD3的第一抗原结合位点,并且所述HC2和所述LC2配对形成特异性地结合GPCR5D的第二抗原结合位点。

28. 根据权利要求27所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC1包含SEQ ID NO: 25并且LC1包含SEQ ID NO: 26。

29. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 52并且LC2包含SEQ ID NO: 56。

30. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 53并且LC2包含SEQ ID NO: 56。

31. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 54并且LC2包含SEQ ID NO: 57。

32. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 55并且LC2包含SEQ ID NO: 58。

33. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 82并且LC2包含SEQ ID NO: 92。

34. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 83并且LC2包含SEQ ID NO: 56。

35. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 84并且LC2包含SEQ ID NO: 57。

36. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 85并且LC2包含SEQ ID NO: 57。

37. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 86并且LC2包含SEQ ID NO: 57。

38. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2

包含SEQ ID NO: 87并且LC2包含SEQ ID NO: 92。

39. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 88并且LC2包含SEQ ID NO: 58。

40. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 89并且LC2包含SEQ ID NO: 93。

41. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 91并且LC2包含SEQ ID NO: 94。

42. 根据权利要求28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO: 85并且LC2包含SEQ ID NO: 57。

43. 根据权利要求27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段为IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4同种型。

44. 根据权利要求43所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段为IgG4同种型。

45. 根据权利要求27至42所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或其双特异性结合片段结合人骨髓瘤细胞的表面上的GPCR5D。

46. 根据权利要求27至42所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或其双特异性结合片段结合人多发性骨髓瘤细胞的表面上的GPCR5D。

47. 根据权利要求27至42所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段以小于约0.22nM的 EC_{50} 诱导人T细胞体外活化。

48. 根据权利要求27至42所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段以小于约0.89nM的 EC_{50} 诱导GPCR5D表达型细胞在体外的T细胞依赖性细胞毒性。

49. 一种分离细胞,所述细胞表达根据权利要求27至42中任一项所述的抗体或双特异性结合片段。

50. 根据权利要求49所述的细胞,其中所述细胞为杂交瘤。

51. 根据权利要求49所述的细胞,其中所述抗体或双特异性结合片段是重组产生的。

52. 一种用于治疗患有癌症的受治疗者的方法,所述方法包括:

向其有需要的患者施用治疗有效量的根据权利要求27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段足以治疗所述癌症的时间。

53. 一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括:

施用治疗有效量的根据权利要求27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以抑制癌细胞的生长或增殖。

54. 一种使T细胞重定向GPCR5D表达型癌细胞的方法,所述方法包括:

施用治疗有效量的根据权利要求27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以使T细胞重定向癌症。

55. 根据权利要求52、53或54所述的方法,其中所述癌症为血液学癌症。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述血液学癌症为GPCR5D表达型B细胞癌症。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述GPCR5D表达型B细胞癌症为多发性骨髓瘤。

58. 根据权利要求52所述的方法,所述方法包括施用第二治疗剂。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述第二治疗剂为化学治疗剂或靶向抗癌疗法。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述化学治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐、或白介素2。

61. 根据权利要求59所述的方法,其中所述第二治疗剂与所述双特异性抗体同时、顺序或分开施用于所述受治疗者。

62. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求27至42中任一项所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以及药学上可接受的载体。

63. 一种方法,所述方法用于通过培养根据权利要求49至51中任一项所述的细胞来生成根据权利要求27至42中任一项所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段。

64. 一种分离合成多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求27至42中任一项所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段的HC1、HC2、LC1或LC2。

65. 一种试剂盒,所述试剂盒包括如根据权利要求27至42中任一项所定义的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段和/或如根据权利要求63所定义的多核苷酸及其包装。

抗-GPRC5D抗体、结合GPRC5D和CD3的双特异性抗原结合分子及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2016年7月20日的美国临时申请序列号62/364,811的权益。上述申请的全部内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子递交的序列表,所述序列表据此全文以引用方式并入。所述ASCII副本创建于2017年6月28日,命名为PRD3422USNP_SL.txt,并且大小为57,673字节。

技术领域

[0005] 本文所提供的公开内容涉及特异性结合G蛋白偶联受体C5家族亚型D(GPRC5D)的单克隆抗体,特异性结合GPRC5D和簇决定子3(CD3)的多特异性抗体,以及产生和使用所述抗体的方法。

背景技术

[0006] 多发性骨髓瘤(MM)为第二常见的恶性血液肿瘤,并且占有癌症死亡的2%。MM为一种异质性疾病,并且主要由染色体易位引起,尤其是t(11;14)、t(4;14)、t(8;14)、del(13)、del(17)(Drach等人,(1998)Blood 92(3):802-809;Gertz等人,(2005)Blood 106(8):2837-2840;Facon等人,(2001)Blood 97(6):1566-1571)。由于骨髓浸润、骨破坏、肾衰竭、免疫缺陷以及癌症诊断的心理负担,MM影响的患者可能经历各种疾病相关症状。截至2006年,MM的5年相对存活率约为34%,强调MM是目前尚无治愈选择的难治性疾病。

[0007] G蛋白偶联受体C5家族亚型D(GPRC5D)是2001年首次鉴定出的孤儿非典C类GPCR(Bräuner-Osborne等人Biochim Biophys Acta.1518(3):237-248,2001)。GPRC5D及其它5族GPCR通常具有C类受体的较短氨基端结构域,并因此预测在构象上类似于A类受体。就这一点而言,它们较为独特,与C类GPCR具有序列同源性并且所预测的结构拓扑相当于A类受体。GPRC5D活化的功能性结果尚未描述并且配体仍然未知。其基因具有三个外显子并且位于人的染色体12p13.3上。GPRC5D受体在不同物种间高度保守并且与食蟹猴GPRC5D共享92%的同源性。

[0008] GPRC5D mRNA主要表达于MM患者的所有恶性浆细胞中(Atamaniuk JA等人Eur J Clin Invest 42(9)953-960;2012;Frigyesi-blood和Cohen等人Hematology 18(6):348-35;2013)。GPRC5D的表达在患者间有差异并且与浆细胞负荷和遗传畸变如Rb-1缺失密切相关(Atamaniuk JA等人Eur J Clin Invest 42(9)953-960;2012)。

[0009] 该GPRC5D在浆细胞谱系上的独有表达使其被指定为抗骨髓瘤抗体的理想靶标。

发明内容

[0010] 本文提供了特异性地结合至GPRC5D的抗体及其抗原结合片段。本文还描述了能够

编码所提供的GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段的相关多核苷酸、表达所提供的抗体和抗原结合片段的细胞、以及相关载体和带可检测标记的抗体和抗原结合片段。此外,还描述了使用所提供的抗体和抗原结合片段的方法。例如,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段可用于诊断或监测GPRC5D表达型癌症的进展、消退或稳定性;以用于确定癌症患者是否应该接受治疗;或用于确定受治疗者是否患有GPRC5D表达型癌症,并因此可适于用GPRC5D特异性抗癌治疗剂诸如本文所述的针对GPRC5D和CD3的多特异性抗体治疗。

[0011] 本文还提供了免疫特异性地结合至GPRC5D和CD3的多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段。本文还描述了能够编码所提供的GPRC5D×CD3多特异性抗体的相关多核苷酸、表达所提供的抗体的细胞以及相关载体和可检测标记的多特异性抗体。此外,还描述了使用所提供的多特异性抗体的方法。例如,GPRC5D×CD3多特异性抗体可用于诊断或监测GPRC5D表达型癌症的进展、消退或稳定性;以用于确定癌症患者是否应该接受治疗;或用于确定受治疗者是否患有GPRC5D表达型癌症,并因此可适于用GPRC5D特异性抗癌治疗剂诸如本文所述的GPRC5D×CD3多特异性抗体治疗。

[0012] GPRC5D特异性抗体

[0013] 本文描述了特异于GPRC5D的分离抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段结合人GPRC5D。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段结合人GPRC5D和食蟹猴GPRC5D。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段结合具有SEQ ID NO.22的氨基酸序列的多肽的一个或多个残基。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段能够以28nM或更小的 EC_{50} 在体外诱导ADCC。

[0014] 表1提供了本文所述的一些GPRC5D特异性抗体的示例的汇总:

[0015] 表1:针对人GPRC5D生成的mAb的CDR序列

[0016]

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B8 1	SYAIS (SEQ ID NO 1)	GIPIFGTA NYAQKFQ G (SEQ ID NO 5)	ESRWRGY KLD (SEQ ID NO 9)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPL T (SEQ ID NO 19)
GC5B4 65 GC5B5 97	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGS KYYASSV KG (SEQ ID NO 6)	AAFDGFR RAVRLD (SEQ ID NO 10)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPL T (SEQ ID NO 19)
GC5B4 83 GC5B5 99	SYFIG (SEQ ID NO 3)	IYPGKSD TRYSPSFQ G (SEQ ID NO 7)	VYSFGGR HKALFDY (SEQ ID NO 11)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID NO 20)
GC5B5 96	GYTMN (SEQ ID NO 4)	LINPYNDS TNYAQKL QG (SEQ ID NO 8)	VALRVAL DY (SEQ ID NO 12)	KASQNVA THVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYP YT (SEQ ID NO 21)
GC5B3 82	DYGMH (SEQ ID NO 61)	AIKYSGGS TYYADSV KG (SEQ ID NO 67)	RAESGPG LDY (SEQ ID NO 72)	KSSQSVLY SSNNKNY LA (SEQ ID NO 98)	WASTRES (SEQ ID NO 78)	QQYYSTPL T (SEQ ID NO 80)
GC5B3 79	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGS KYYADSV KG (SEQ ID NO 28)	AAWDFGR RAVRLDY (SEQ ID NO 30)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQS (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPL T (SEQ ID NO 19)
GC5B3 73	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IYPGDSD TRYSPSFQ G (SEQ ID	IGFYGRSF RIFDY (SEQ ID	RASQSVSS YLA (SEQ ID	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID NO 20)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
		NO 29)	NO 73)	NO 14)		
GC5B3 76	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIYPGDS TRYSPSFQ G (SEQ ID NO 29)	VYSFGGR HKALFDY (SEQ ID NO 11)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID NO 20)
GC5B3 85	GYAMS (SEQ ID NO 62)	AISGSGGS TYYADSV KG (SEQ ID NO 68)	VDRSFGRS RYTLDY (SEQ ID NO 74)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 14)	DASNRAT (SEQ ID NO 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID NO 20)
GC5B3 70 GC5B5 98	SYGIS (SEQ ID NO 63)	GIIPFGNI NYAQKFQ G (SEQ ID NO 69)	VSRRFKRF AYYFDY (SEQ ID NO 75)	KSSQSVLY SSNNKNY LA (SEQ ID NO 98)	WASTRES (SEQ ID NO 78)	QYYSTPL T (SEQ ID NO 80)
GC5B6 02	GYSFTGYT MN (SEQ ID NO 64)	LINPYNGD TN (SEQ ID NO 70)	VALRVAL DY (SEQ ID NO 12)	KASQNVA THVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYP YT (SEQ ID NO 21)
GC5B6 03	SYAMS (SEQ ID NO 65)	AISGSGGS TYYADSV KG (SEQ ID NO 68)	SNFLPVVF DY (SEQ ID NO 76)	RASQSVR KSLA (SEQ ID NO 95)	TASNRAT (SEQ ID NO 79)	QQYFRAPI T (SEQ ID NO 81)
GC5B6 01	GFSLTSYN VH (SEQ ID NO 66)	VIWAGGS TNYNSAL MS (SEQ ID NO 71)	DGIRLRFA Y (SEQ ID NO 77)	KASQNVA THVG (SEQ ID NO 15)	SASYRYS (SEQ ID NO 18)	QQYNRYP YT (SEQ ID NO 21)

[0017]

[0018] 在一些实施方案中,提供了GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段,它们包含含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,提供了GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段,它们包含含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的轻链。在本文所述的一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段与包含含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的轻链的抗体或抗原结合片段竞争性结合GPCR5D。

[0019] 人IgG类分为四种同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。它们在Fc区的氨基酸序列中共享大于95%的同源性,但显示的主要差别在于铰链区的氨基酸组成和结构。Fc区介导效应子功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在ADCC中,抗体的Fc区结合至免疫效应子细胞(诸如自然杀伤细胞和巨噬细胞)的表面上的Fc受体(FcγR),导致靶细胞的吞噬作用或裂解。在CDC中,抗体通过触发细胞表面的补体级联反应来杀伤靶细胞。本文所述的抗体包括具有与任何IgG同种型组合的可变域的所述特征的抗体,包括其中Fc序列已经被修饰以实现不同效应子功能的修饰型式。

[0020] 对于治疗性抗体的许多应用,Fc介导的效应子功能不是作用机制的一部分。这些Fc介导的效应子功能可能是有害的,并可能通过引起机制外毒性而带来安全风险。修饰效应子功能可通过改造Fc区以减弱其与FcγR或补体因子的结合来实现。IgG与活化性FcγR

(FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa和FcγRIIIb)和抑制性FcγR(FcγRIIb)或补体(C1q)的第一组分的结合取决于位于铰链区和CH2结构域中的残基。已经在IgG1、IgG2和IgG4中引入突变以降低或沉默Fc功能。本文所述的抗体可包括这些修饰形式。

[0021] 在一个实施方案中,抗体包含具有以下特性中的一者或多者的Fc区:(a)与亲本Fc相比效应子功能降低;(b)对FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIb和/或FcγRIIIa的亲合力降低;(c)对FcγRI的亲合力降低;(d)对FcγRIIa的亲合力降低;(e)对FcγRIIb的亲合力降低;(f)对FcγRIIIb的亲合力降低;或(g)对FcγRIIIa的亲合力降低。

[0022] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型。在其中抗体具有IgG1同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区中含有L234A、L235A和/或K409R置换。在其中抗体具有IgG4同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区中含有S228P、L234A和L235A置换。本文所述的抗体可包括这些修饰形式。

[0023] 除所述GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段之外,还提供了能够编码所述抗体和抗原结合片段的多核苷酸序列。还提供了包含所述多核苷酸的载体,以及表达本文提供的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段的细胞。还描述了能够表达所公开的载体的细胞。这些细胞可为哺乳动物细胞(诸如293F细胞、CHO细胞)、昆虫细胞(诸如Sf7细胞)、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞(诸如大肠杆菌)。所述抗体也可由杂交瘤细胞产生。

[0024] 使用GPCR5D特异性抗体的方法

[0025] 还公开了使用所述GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段的方法。用于本部分所讨论的方法中的特定抗体包括具有针对表1中的抗体所述的那组CDR的那些抗体。例如,这些抗体或抗原结合片段可用于治疗癌症,通过干扰GPCR5D-受体相互作用或其中抗体缀合至毒素,从而将毒素靶向GPCR5D表达型癌症。此外,这些抗体或抗原结合片段还可用于检测生物样品诸如血液或血清中GPCR5D的存在;用于定量分析生物样品诸如血液或血清中GPCR5D的量;用于诊断GPCR5D表达型癌症;用于确定治疗患有癌症的受治疗者的方法;或用于监测受治疗者中GPCR5D表达型癌症的进展。在一些实施方案中,GPCR5D表达型癌症可为淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤(MM)。所述方法可在受治疗者接受GPCR5D表达型癌症的治疗,诸如用针对GPCR5D和CD3的多特异性抗体治疗之前进行。此外,所述方法可在受治疗者接受GPCR5D表达型癌症的治疗,诸如用本文所述针对GPCR5D和CD3的多特异性抗体治疗之后进行。

[0026] 所述检测生物样品中的GPCR5D的方法包括将生物样品暴露于本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种。

[0027] 所述诊断受治疗者中GPCR5D表达型癌症的方法还包括将生物样品暴露于本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种;然而,该方法还包括定量存在于样品中的GPCR5D的量;将存在于样品中的GPCR5D的量与已知标准品或参照样品进行比较;并确定受治疗者的GPCR5D水平是否落入与癌症相关的GPCR5D水平内。

[0028] 本文还描述了监测受治疗者中GPCR5D表达型癌症的方法。所述方法包括将生物样品暴露于本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种;定量存在于由抗体或其抗原结合片段结合的样品中的GPCR5D的量;将存在于样品中的GPCR5D的量与已知标准品或参照样品或先前从受治疗者中获得的类似样品中的GPCR5D的量进行比较;以及基于所比较的样品中GPCR5D的量的差异,确定受治疗者的GPCR5D水平是否指示癌症进展、消退或稳定疾病。

[0029] 从受治疗者中获得或来源于受治疗者的样品是生物样品,诸如尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞、组织、手术切除的肿瘤组织、活体组织切片、细针抽吸样品或组织学制备物。

[0030] 可对所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段进行标记以用于所述方法或本领域技术人员已知的其它方法。例如,本文所述的抗体或其抗原结合片段可用放射标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物、酶、钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和β-半乳糖苷酶,或者聚组氨酸或本领域已知的类似此类标记物进行标记。

[0031] GPCR5D特异性抗体试剂盒

[0032] 本文描述了包括所公开的GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段的试剂盒。所述试剂盒可用于实施使用本文提供的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段的方法或本领域技术人员已知的其它方法。在一些实施方案中,所述试剂盒可包括本文所述的抗体或抗原结合片段以及用于检测生物样本中是否存在GPCR5D的试剂。因此,所述试剂盒可包括本文所述的抗体或其抗原结合片段中的一种或多种,以及用于在不使用时盛装抗体或片段的容器、抗体或片段的使用说明、附连于固体支持物的抗体或片段和/或如本文所述的抗体或片段的可检测标记形式。

[0033] GPCR5D×CD3多特异性抗体

[0034] 通过TCR/CD3复合体将T淋巴细胞重定向至表达GPCR5D的MM细胞代表了一种有吸引力的替代方法。T淋巴细胞的TCR/CD3复合体由在细胞表面共表达的TCRα/β或TCRγ/δ异二聚体与CD3标记的γ、δ、ε、ζ和η的不变亚基组成。人CD3ε以UniProt P07766描述(CD3E_HUMAN)。现有技术中所述的抗CD3ε抗体是SP34(Yang SJ, The Journal of Immunology, (1986) 137;1097-1100)。SP34与灵长类和人CD3反应。SP34购自Pharmingen。现有技术中所述的另一种抗CD3抗体是UCHT-1(参见W02000041474)。现有技术中所述的另一种抗CD3抗体是BC-3(Fred Hutchinson Cancer Research Institute,用于GvHD的I/II期试验, Anasetti等人, Transplantation, 54:844(1992))。SP34与UCHT-1和BC-3的不同之处在于, SP-34识别仅存在于CD3的ε链上的表位(参见Salmeron等人, 1991年, J. Immunol., 第147卷, 第3047页), 而UCHT-1和BC-3识别由ε链和γ链二者贡献的表位。在W02008119565、W02008119566、W02008119567、W02010037836、W02010037837和W02010037838中提到了具有与抗体SP34相同序列的抗体的序列。在US8236308(W02007042261)中提到了与抗体SP34的VH具有96%同一性的序列。

[0035] 本文描述了结合GPCR5D和CD3的分离多特异性抗体(“GPCR5D×CD3多特异性抗体”)及其多特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,提供了免疫特异性地结合至GPCR5D的分离抗体或其抗原结合片段。

[0036] 在一些实施方案中,多特异性抗体的GPCR5D特异性臂结合人GPCR5D和食蟹猴GPCR5D。在一些实施方案中,GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的GPCR5D特异性臂结合人GPCR5D的细胞外结构域。在优选的实施方案中,GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段是双特异性抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,提供了包含以下的分离GPCR5D×CD3双特异性抗体或其GPCR5D×CD3双特异性结合片段:a)第一重链(HC1);b)第二重链(HC2);c)第一轻链(LC1);和d)第二轻链(LC2),其中HC1和LC1配对形成免疫特异性地

结合GPC5D的第一抗原结合位点,并且HC2和LC2配对形成免疫特异性地结合CD3的第二抗原结合位点。在另一个实施方案中,提供了表达所述抗体或双特异性结合片段的分离细胞。在一些实施方案中,GPRC5D×CD3多特异性抗体的GPC5D结合臂(或“GPC5D特异性臂”)来源于自本文所述的GPC5D抗体(例如,来源于具有表1所列的CDR序列的抗体)。

[0037] 在一些实施方案中,GPRC5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的GPC5D特异性臂为IgG或其衍生物。在一些实施方案中,GPRC5D×CD3多特异性抗体的CD3结合臂(或“CD3特异性臂”)来源于小鼠单克隆抗体SP34,一种小鼠IgG3/λ同种型(K.R.Abhinandan和A.C.Martin,2008年,Mol.Immunol.,45,3832-3839)。在一些实施方案中,GPRC5D×CD3多特异性抗体的CD3结合臂包含选自表2的一个VH结构域和一个VL结构域。

[0038] 表2:CD3特异性抗体和抗原结合片段的重链和轻链:

VH	VL
CD3B219 (SEQ ID NO: 99) : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHG NFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	CD3B219 (SEQ ID NO: 100) : QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAV TTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLQGP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAFTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS

[0040] 人IgG类分为四种同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。它们在Fc区的氨基酸序列中共享大于95%的同源性,但显示的主要差别在于铰链区的氨基酸组成和结构。Fc区介导效应子功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在ADCC中,抗体的Fc区结合至免疫效应子细胞(诸如自然杀伤细胞和巨噬细胞)的表面的Fc受体(FcγR),导致靶细胞的吞噬作用或裂解。在CDC中,抗体通过触发细胞表面的补体级联反应来杀伤靶细胞。

[0041] 对于治疗性抗体的许多应用,Fc介导的效应子功能不是作用机制的一部分。这些Fc介导的效应子功能可能是有害的,并可能通过引起机制外毒性而带来安全风险。修饰效应子功能可通过改造Fc区以减弱其与FcγR或补体因子的结合来实现。IgG与活化性FcγR(FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa和FcγRIIIb)和抑制性FcγR(FcγRIIb)或补体(C1q)的第一组分的结合取决于位于铰链区和CH2结构域中的残基。已经在IgG1、IgG2和IgG4中引入突变以降低或沉默Fc功能。

[0042] 在一个实施方案中,抗体包含具有以下特性中的一者或多者的Fc区:(a)与亲本Fc相比效应子功能降低;(b)对FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIb和/或FcγRIIIa的亲合力降

低；(c)对FcγRI的亲合力降低；(d)对FcγRIIa的亲合力降低；(e)对FcγRIIb的亲合力降低；(f)对FcγRIIIb的亲合力降低；或(g)对FcγRIIIa的亲合力降低。

[0043] 在一些实施方案中，衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物。在一些实施方案中，衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段是IgG1或其衍生物。在一些实施方案中，例如，衍生CD3结合臂的CD3特异性IgG1抗体的Fc区在其Fc区中包含L234A、L235A和F405L置换。在一些实施方案中，衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段是IgG4或其衍生物。在一些实施方案中，例如，衍生CD3结合臂的CD3特异性IgG4抗体的Fc区在其Fc区中包含S228P、L234A、L235A、F405L和R409K置换。在一些实施方案中，衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段结合原代人T细胞和/或原代食蟹猴T细胞上的CD3ε。在一些实施方案中，衍生多特异性抗体的CD3特异性臂的CD3特异性抗体或抗原结合片段激活原代人CD4+T细胞和/或原代食蟹猴CD4+T细胞。

[0044] 除所述GPCR5D×CD3多特异性抗体之外，还提供了能够编码所述GPCR5D×CD3多特异性抗体的多核苷酸序列。在一些实施方案中，提供了编码GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段的HC1、HC2、LC1或LC2的分离合成多核苷酸。还提供了包含所述多核苷酸的载体，以及表达本文提供的GPCR5D×CD3多特异性抗体的细胞。还描述了能够表达所公开的载体的细胞。这些细胞可为哺乳动物细胞（诸如293F细胞、CHO细胞）、昆虫细胞（诸如Sf7细胞）、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞（诸如大肠杆菌）。所述抗体也可由杂交瘤细胞产生。在一些实施方案中，提供了用于通过培养细胞产生GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段的方法。

[0045] 本文还提供了包含GPCR5D×CD3多特异性抗体或抗原结合片段的药物组合物以及药学上可接受的载体。

[0046] 使用GPCR5D×CD3多特异性抗体的方法

[0047] 还公开了使用所述GPCR5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段的方法。例如，GPCR5D×CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段可用于治疗对其有需要的受治疗者中的GPCR5D表达型癌症。在一些实施方案中，GPCR5D表达型癌症为淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤。

[0048] 所述治疗对其有需要的受治疗者中GPCR5D表达型癌症的方法包括对受治疗者施用治疗有效量的所述GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段。在一些实施方案中，受治疗者是哺乳动物，优选是人。在优选的实施方案中，提供了通过向对其有需要的患者施用治疗有效量的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性抗原结合片段足以治疗癌症的时间，从而治疗患有癌症的受治疗者的方法。

[0049] 本文还提供了用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法，该方法通过施用治疗有效量的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以抑制癌细胞的生长或增殖。

[0050] 本文还提供了将T细胞重定向至GPCR5D表达型癌细胞的方法，该方法通过施用治疗有效量的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段而将T细胞重定向至癌症。

[0051] GPCR5D×CD3特异性抗体试剂盒

[0052] 本文描述了包括所公开的GPCR5D×CD3多特异性抗体的试剂盒。所述试剂盒可用于实施使用本文提供的GPCR5D×CD3多特异性抗体的方法或本领域技术人员已知的其它方

法。在一些实施方案中,所述试剂盒可包括本文所述的抗体和用于治疗GPCR5D表达型癌症的试剂。因此,所述试剂盒可包括本文所述的多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段中的一种或多种、以及用于在不使用时盛装抗体或片段的容器和/或抗体或片段的使用说明、附连于固体支持物的抗体或片段和/或如本文所述的抗体或片段的可检测标记形式。

附图说明

[0053] 图1:所选抗GPCR5D mAb针对人GPCR5D和未转染的HEK293细胞的浓度依赖性结合特征。三种mAb即GC5B36、GC5B168和GC5B205也被观察到结合未转染的(GPCR5D空白)HEK293细胞。

[0054] 图2:抗GPCR5D×CD3双特异性抗体对人GPCR5D HEK293F细胞的剂量依赖性结合。

[0055] 图3:利用FACS,将双特异性抗体对MM1R和H929细胞的结合特征与过表达的人GPCR5D HEK293细胞和未转染的HEK293细胞进行比较。

[0056] 图4A和4B:抗GPCR5D×CD3抗体对人GPCR5D表达型细胞的T-细胞介导的细胞毒性和T细胞活化。

[0057] 图5A和5B:抗GPCR5D×CD3抗体对cyno GPCR5D表达型细胞的T-细胞介导的细胞毒性和T细胞活化。

[0058] 图6A和6B:GPCR5D×CD3 Ab在预防NSG小鼠模型中有效地杀伤H929细胞。GCDB32(6A)和GCDB35(6B)在10ug剂量下导致完全肿瘤生长抑制,并且GCDB32也能够在1ug剂量下100%抑制肿瘤生长。

[0059] 图7A和7B:在不存在(7A)和存在(7B)Fc阻断时效力的比较。

[0060] 图8A-8D:GCDB32、GCDB35、GCDB40和GCDB43与Fc γ 受体的结合。

[0061] 图9A和9B:杂交瘤衍生的mAb的FACS结合评估。

[0062] 图10A和10B:GPCR5D×CD3双特异性抗体针对H929细胞的T-细胞介导的细胞毒性。

[0063] 图11A-11E:结合GPCR5D阳性(H929,MM1R,LP1,OPM2)和阴性细胞系(NALM6)的GPCR5D×CD3双特异性抗体。

[0064] 图12A-12D:GPCR5D×CD3双特异性Ab是体内有效的肿瘤抑制剂。所有的GPCR5D×CD3双特异性Ab(示于12A的GCDB32,示于12B的GCDB53,示于12C的GCDB61,以及示于12D的GCDB72)在10ug和1ug剂量下完全抑制多发性骨髓瘤细胞(H929)肿瘤生长。在0.1ug剂量下观察到分化,并且观察到GCDB72具有80%的肿瘤生长抑制。

[0065] 图13:将GPCR5D⁺MM1.R细胞系用各种浓度前导抗体染色60分钟,以测量表面结合特征(n=3)。藻红蛋白标记的人IgG4Fc用作第二抗体来捕获信号(Southern Biotech,克隆HP6025)。结合表示为归一化几何平均荧光强度,如由FACS所测。使用具有可变斜率(四个参数)的非线性回归和最小二乘拟合法在GraphPad Prism6中完成数据的作图和拟合。

[0066] 图14A和14B:将GPCR5D⁺细胞系用各种浓度的FAB6300和GC5M481抗体染色60分钟,以测量表面结合特征。藻红蛋白标记的人IgG4Fc用作第二抗体来捕获信号(Southern Biotech,克隆HP6025)。结合表示为柱状图(黑线代表同种型,并且红线代表特异性GPCR5D抗体)(图14A)。图14B示出前导分子对GPCR5D⁺多发性骨髓瘤细胞系的结合模式。暗色虚线指示同种型对照,并且实线指示前导分子结合。

[0067] 图15A和15B:相比于IgG4同种型对照,使用来自两名不同MM患者的冷冻骨髓衍生

的单核细胞来评估GPRC5D×CD3双特异性抗体结合、浆细胞毒性和T-细胞活化。就细胞毒性测定而言,将来自正常健康供体的T细胞外源加入患者BMMNC样本并与四种前导分子温育48小时。GPRC5D×CD3双特异性抗体以剂量依赖性方式结合至所有供体样品的浆细胞,并且在Y轴上记录平均荧光强度。注意到响应于GPRC5D×CD3双特异性抗体处理,活的浆细胞(CD138⁺)损失并且T细胞上的CD25同时上调。

[0068] 图16:在第0天,经皮下给NSG小鼠植入MM.1S人多发性骨髓瘤细胞。在研究第7天静脉内接种人PBMC。在15、18、22、24、29、32和36天静脉内给予PBS、GCDB72(0.1 μ g,1 μ g,10 μ g和50 μ g/动物(分别等同于0.005mg/kg,0.05mg/kg,0.5mg/kg和2.5mg/kg))和空白对照抗体。皮下肿瘤每周测量两次,并且结果表示为平均肿瘤体积(以各组的mm³±SEM表示)。相比于PBS,GCDB72抗体处理在以1 μ g(0.05mg/kg)给予时显著抑制sc肿瘤生长(TGI=64%,p≤0.0001)。10 μ g/动物(0.5mg/kg)和50 μ g/动物(2.5mg/kg)的GCDB72剂量使肿瘤生长完全退化(p≤0.0001)。空白对照抗体具有可忽略的影响或无影响。利用Graph Pad Prism软件(版本6),使用Tukey的多重比较测试进行多重比较,用双因素方差分析对统计显著性进行评价。当概率值(p)≤0.05时,组之间的差异被认为是显著的。

[0069] 图17:在第0天,经皮下给NSG植入MM.1S人多发性骨髓瘤细胞。在研究第7天静脉内接种人PBMC。在15、18、22、24、29、32和36天静脉内给予PBS、GCDB72(0.1 μ g,1 μ g,10 μ g和50 μ g/动物(分别等同于0.005mg/kg,0.05mg/kg,0.5mg/kg和2.5mg/kg))和空白对照抗体。体重表示为处理开始到研究结束的绝对体重。

具体实施方式

[0070] 定义

[0071] 与说明书的各方面相关的各种术语在说明书和权利要求书中通篇使用。除非另外指明,否则此类术语被赋予本领域的普通含义。其它具体定义的术语应按照与本文所提供的定义相符的方式理解。

[0072] 如本说明书和所附权利要求中所用,除非内容另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括两个或更多个细胞的组合等等。

[0073] 如本文所用,术语“约”在涉及可测量值诸如量、时距等时,意指涵盖与指定值至多±10%的变化,因为这类变化适合执行本发明所公开的方法。除非另外指明,否则说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、特性诸如分子量、反应条件等的所有数字在所有情况下均应理解为被术语“约”修饰。因此,除非有相反的说明,否则在下述说明书和所附权利要求书中列出的数值参数均为近似值,这些近似值可根据本发明寻求获得的期望特性而变化。在最低程度上且不试图将等同原则的应用限制到权利要求书的保护范围的前提下,至少应当根据所报告的数值的有效数位并通过应用惯常的四舍五入法来解释每一个数值参数。

[0074] 尽管用以阐明本发明之宽范围的数值范围和参数是近似的,但在具体的实施例中提出的数值却是尽可能精确地报告的。然而,任何数值均固有地包含某些误差,所述误差必然会由存在于其各自测试测量法中的标准偏差产生。

[0075] “分离”意指生物组分(诸如核酸、肽或蛋白质)已经与组分天然存在的生物体的其

它生物组分(即其它染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白质)基本上分离、分开得到或从其中纯化出来。因此,已经“分离”的核酸、肽和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。“分离”核酸、肽和蛋白质可为组合物的一部分,并且如果这样的组合物不是核酸、肽或蛋白质自身环境的一部分,则仍然是分离的。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸、肽和蛋白质以及化学合成的核酸。如本文所用,“分离”抗体或抗原结合片段旨在意指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体或抗原结合片段的抗体或抗原结合片段(例如,特异性地结合至GPC5D的分离抗体基本上不含特异性地结合除GPC5D以外的抗原的抗体)。然而,特异性地结合至GPC5D的表位、亚型或变体的分离抗体可与其它相关抗原,例如来自其它物种(诸如GPC5D物种同源物)的抗原具有交叉反应性。

[0076] 同义地称为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”的“多核苷酸”是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的DNA、为单链区和双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区和双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更典型地为双链或者为单链区和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子。此外,“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA,以及具有出于稳定性或其它原因而被修饰的主链的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和稀有碱基诸如肌苷。可对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括通常天然存在的多核苷酸的化学修饰、酶修饰或代谢修饰形式,以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的核酸链,通常被称为寡核苷酸。

[0077] “基本上相同”的含义可根据使用该术语的上下文而不同。由于重链和轻链以及编码它们的基因之间可能存在的天然序列变异,预期在氨基酸序列或编码本文所述的抗体或抗原结合片段的基因中发现一定程度的变异,而对其独特的结合特性(例如,特异性和亲和力)产生的影响很小或无影响。此类预期部分归因于遗传密码的简并性以及保守氨基酸序列变异的成功进化,但这不会明显改变所编码蛋白质的性质。因此,在核酸序列的上下文中,“基本上相同”意指两个或更多个序列之间具有至少65%的同源性。优选地,该术语是指两个或更多个序列之间具有至少70%的同源性,更优选至少75%的同源性,更优选至少80%的同源性,更优选至少85%的同源性,更优选至少90%的同源性,更优选至少91%的同源性,更优选至少92%的同源性,更优选至少93%的同源性,更优选至少94%的同源性,更优选至少95%的同源性,更优选至少96%的同源性,更优选至少97%的同源性,更优选至少98%的同源性,以及更优选至少99%或更高的同源性。两个序列之间的百分比同源性是序列所共有的相同位置数目的函数(即,同源性% = 相同位置的数目/位置总数 × 100),考虑到空位的数目和每个空位的长度,需要引入这些参数用于两个序列的最佳比对。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同源性可例如使用E. Meyers和W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988)的算法(该算法已经并入ALIGN程序(版本2.0)中),使用PAM120加权残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同源性可使用Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970)的算法来确定。

[0078] 在蛋白质的氨基酸序列中可能发生的对蛋白质功能没有实质性影响的变异程度远低于核酸序列的变异程度,因为相同的简并性原则不适用于氨基酸序列。因此,在抗体或抗原结合片段的上下文中,“基本上相同”意指与所述抗体或抗原结合片段具有90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的抗体或抗原结合片段。其它实施方案包括具有框架、支架或其它非结合区的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段,其不与本文所述的抗体和抗原结合片段具有显著的同源性,但确实并入一个或多个CDR或赋予与本文所述的此类序列具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的结合所需的其它序列。“载体”是复制子,诸如质粒、噬菌体、粘粒或病毒,其中可以可操作地插入另一核酸区段以引起该区段的复制或表达。

[0079] “克隆”是来源于单细胞或共同祖细胞通过有丝分裂产生的细胞群。“细胞系”是能够在体外稳定生长许多代的原代细胞的克隆。在本文提供的一些示例中,通过用DNA转染细胞来转化细胞。

[0080] 术语“表达”和“产生”在本文中同义使用,并且是指基因产物的生物合成。这些术语涵盖基因到RNA的转录。这些术语还涵盖RNA到一个或多个多肽的翻译,并且还涵盖所有天然存在的转录后和翻译后修饰。抗体或其抗原结合片段的表达或产生可在细胞的细胞质内,或者在胞外环境中诸如细胞培养物的生长培养基中。

[0081] 术语“治疗”(“treating”或“treatment”)是指在减轻或改善损伤、病变或病症方面取得的任何成功或成功迹象,包括任何客观或主观参数,诸如症状减轻、缓解、削弱或使患者更能耐受病症,减缓退变或衰退速率,使退变终点衰竭程度降低,改善受治疗者的身体或心理健康,或延长存活时间。可通过客观或主观参数评估治疗;包括体格检查、神经学检查或精神评价的结果。

[0082] “有效量”或“治疗有效量”是指在所需剂量和时间段内有效实现所需治疗结果的量。GPCR5D×CD3抗体的治疗有效量可根据因素诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引发所需应答的能力而变化。治疗有效量也是其中抗体或抗体部分的治疗有益效应远远超过任何毒性或有害效应的量。

[0083] 除非另有说明,否则“抗体”是指包括各种单体、聚合和嵌合形式的免疫球蛋白的所有同种型(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD和IgY)。术语“抗体”具体地涵盖多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)和抗体样多肽,诸如嵌合抗体和人源化抗体。

[0084] “抗原结合片段”是对特定抗原表现出结合亲和力的任何蛋白质性结构。抗原结合片段包括通过任何已知技术诸如酶切割、肽合成和重组技术提供的那些。一些抗原结合片段由完整抗体的保留亲本抗体分子的抗原结合特异性的部分组成。例如,抗原结合片段可包含已知结合特定抗原的抗体的至少一个可变区(重链可变区或轻链可变区)或者一个或多个CDR。合适的抗原结合片段的示例包括但不限于双体抗体和单链分子以及Fab、F(ab')₂、Fc、Fabc和Fv分子;单链(Sc)抗体;单个抗体轻链;单个抗体重链;抗体链或CDR与其它蛋白质之间的嵌合融合体;蛋白质支架;重链单体或二聚体;轻链单体或二聚体;由一条重链和一条轻链组成的二聚体;由VL、VH、CL和CH1域组成的单价片段;或如W02007059782中所述的单价抗体;包含由铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;基本上由V.sub.H和C.sub.H1域组成的Fd片段;基本上由抗体的单臂的VL域和VH域组成的Fv片段;基本上由VH域组成的dAb片段(Ward等人,Nature 341,544-546(1989)),并且也被称为域抗体(Holt等人,Trends Biotechnol.,2003年11月,21(11):484-90);羊驼或纳米抗体(Revetts等人,Expert Opin Biol Ther.,2005年1月,5(1):111-24);分离互补决定区(CDR)等。所有抗体同种型均可用于产生抗原结合片段。另外,抗原结合片段可包括非抗体蛋白质性框架,

其可成功地以赋予感兴趣的给定抗原(诸如蛋白质支架)亲和力的取向并入多肽区段。抗原结合片段可重组产生或通过对完整抗体的酶切割或化学切割产生。短语“抗体或其抗原结合片段”可用于表示给定的抗原结合片段并入该短语中提及的抗体的一个或多个氨基酸区段。

[0085] 术语“CDR”是指互补决定区(CDR),其中三个构成轻链可变区(CDRL1、CDRL2和CDRL3)的结合特征,三个构成重链可变区(CDRH1、CDRH2和CDRH3)的结合特征。CDR有助于抗体分子的功能活性,并且由包含支架或框架区的氨基酸序列分开。确切定义的CDR边界和长度受限于不同的分类和编号系统。因此,可通过Kabat、Chothia、contact或任何其它边界定义来引用CDR。尽管边界不同,但这些系统中的每一个在可变序列内构成所谓的“高变区”的方面具有一定程度的重叠。因此,根据这些系统的CDR定义可在长度和相对于相邻框架区域的边界区域方面不同。参见例如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH出版物号91-3242(1991); Chothia等人, “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, *J.Mol.Biol.*196:901(1987); 以及 MacCallum等人, “Antibody-Antigen Interactions:Contact Analysis and Binding Site Topography”, *J.Mol.Biol.*262:732(1996); 这些文献中的每一篇全文据此均以引用方式并入。

[0086] 通常, CDR形成可被分类为规范结构的环状结构。术语“规范结构”是指抗原结合(CDR)环所采用的主链构象。从比较结构研究中, 已发现六个抗原结合环中有五个仅具有受限的可用构象库。每个规范结构可由多肽主链的扭转角来表征。因此, 抗体之间的对应环可具有非常相似的三维结构, 尽管环的大部分区域具有高氨基酸序列可变性(Chothia等人, “Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, *J.Mol.Biol.*196:901(1987); Chothia等人, “Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions”, *I* 342:877(1989); Martin和Thornton, “Structural Families in Loops of Homologous Proteins:Automatic Classification,Modelling and Application to Antibodies”, *J.Mol.Biol.*263:800(1996); 这些文献中的每一篇全文均以引用方式并入)。此外, 采用的环状结构与其周围的氨基酸序列之间存在关系。特定规范类的构象由环的长度以及位于环内以及保守框架内(即, 环外部)关键位置的氨基酸残基确定。因此, 可基于这些关键氨基酸残基是否存在来进行对特定规范类的分配。

[0087] 术语“多肽”可与术语“蛋白质”互换使用, 并且从其最广泛的意义上讲, 是指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或模拟肽物的化合物。亚基可由肽键连接。在另一实施方案中, 亚基可由其它键连接, 例如, 酯、醚等。如本文所用, 术语“氨基酸”是指天然和/或非天然氨基酸或者合成的氨基酸, 包括甘氨酸以及D光学异构体和L光学异构体、氨基酸类似物和模拟肽物。在肽链短的情况下, 通常将三个或更多个氨基酸的肽称为寡肽。如果肽链较长, 所述肽通常称为多肽或蛋白质。

[0088] 当在抗体或抗体片段的上下文中使用时, “特异性结合”或“特异地结合”或其衍生术语表示通过由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的结构域结合至感兴趣的蛋白质的一个或多个表位, 而不优先结合含有混合分子群的样品中的其它分子。通常, 抗体以如通过表面等离子共振测定或细胞结合测定来测量的小于约 1×10^{-8} M的 K_d 结合至同源抗原。短语诸如“[抗原]特异性”抗体(例如, GPRC5D特异性抗体)意在表达所述抗体特异性

地结合所述抗原。

[0089] 同义地称为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”的“多核苷酸”是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的DNA、为单链区和双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区和双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更典型地为双链或者为单链区和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子。此外,“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA,以及具有出于稳定性或其它原因而被修饰的主链的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和稀有碱基诸如肌苷。可对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括通常天然存在的多核苷酸的化学修饰、酶修饰或代谢修饰形式,以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的核酸链,通常被称为寡核苷酸。

[0090] “载体”是复制子,诸如质粒、噬菌体、粘粒或病毒,其中可以可操作地插入另一核酸区段以引起该区段的复制或表达。

[0091] 如本文所用,术语“宿主细胞”可为任何类型的细胞,例如,原代细胞、培养中的细胞或来自细胞系的细胞。在具体的实施方案中,术语“宿主细胞”是指用核酸分子转染的细胞和此类细胞的后代或潜在后代。此类细胞的后代可与用核酸分子转染的亲本细胞不同,例如,由于可在后代中发生的突变或环境影响或者由于核酸分子整合到宿主细胞基因组中。术语“表达”和“产生”在本文中同义使用,并且是指基因产物的生物合成。这些术语涵盖基因到RNA的转录。这些术语还涵盖RNA到一个或多个多肽的翻译,并且还涵盖所有天然存在的转录后和翻译后修饰。抗体或其抗原结合片段的表达或产生可在细胞的细胞质内,或者在胞外环境中诸如细胞培养物的生长培养基中。“基本上相同”的含义可根据使用该术语的上下文而不同。由于重链和轻链以及编码它们的基因之间可能存在的天然序列变异,预期在氨基酸序列或编码本文所述的抗体或抗原结合片段的基因中发现一定程度的变异,而对其独特的结合特性(例如,特异性和亲和力)产生的影响很小或无影响。此类预期部分归因于遗传密码的简并性以及保守氨基酸序列变异的成功进化,但这不会明显改变所编码蛋白质的性质。因此,在核酸序列的上下文中,“基本上相同”意指两个或更多个序列之间具有至少65%的同一性。优选地,该术语是指两个或更多个序列之间具有至少70%的同一性,更优选至少75%的同一性,更优选至少80%的同一性,更优选至少85%的同一性,更优选至少90%的同一性,更优选至少91%的同一性,更优选至少92%的同一性,更优选至少93%的同一性,更优选至少94%的同一性,更优选至少95%的同一性,更优选至少96%的同一性,更优选至少97%的同一性,更优选至少98%的同一性,以及更优选至少99%或更高的同一性。两个序列之间的百分比同一性是序列所共有的相同位置数目的函数(即,同源性% = 相同位置的数目/位置总数 × 100),考虑到空位的数目和每个空位的长度,需要引入这些参数用于两个序列的最佳比对。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性可例如采用E. Meyers和W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988)的算法(该算法已经并入ALIGN程序(版本2.0)中),使用PAM120加权残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970)的算法来确定。

[0092] 在蛋白质的氨基酸序列中可能发生的对蛋白质功能没有实质性影响的变异程度

远低于核酸序列的变异程度,因为相同的简并性原则不适用于氨基酸序列。因此,在抗体或抗原结合片段的上下文中,“基本上相同”意指与所述抗体或抗原结合片段具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的抗体或抗原结合片段。其它实施方案包括具有框架、支架或其它非结合区的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段,其不与本文所述的抗体和抗原结合片段具有显著的同源性,但确实并入一个或多个CDR或赋予与本文所述的此类序列具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的结合所需的其它序列。

[0093] 术语“受治疗者”是指人和非人动物,包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物诸如非人灵长类动物、小鼠、兔、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在所述方法的许多实施方案中,受治疗者是人。

[0094] 如本文所用,术语“重定向”或“重新定向”是指GPCR5D×CD3抗体使T细胞的活性由其固有同源特异性有效地向抗GPCR5D表达型细胞的反应性交换的能力。

[0095] 如本文所用,术语“样品”是指与受治疗者分离的类似流体、细胞或组织(例如,手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)以及存在于受治疗者中的流体、细胞或组织的集合。在一些实施方案中,样品是生物流体。生物流体通常是在生理温度下的液体,并且可包括存在于受治疗者或生物来源中,从受治疗者或生物来源中抽取、表达或以其它方式提取的天然存在的流体。某些生物流体来源于特定组织、器官或局部区域,并且某些其它生物流体可更全身性或系统性地位于受治疗者或生物来源中。生物流体的示例包括血液,血清和浆膜液,血浆,淋巴液,尿液,唾液,囊液,泪液,粪便,痰,分泌组织和器官的粘膜分泌物,阴道分泌物,腹水诸如与非实体肿瘤相关的那些,胸膜、心包、腹膜、腹部和其它体腔的流体,通过支气管灌洗收集的流体等。生物流体还可包括与受治疗者或生物来源接触的液体溶液,例如细胞和器官培养基,包括细胞或器官条件培养基、灌洗液等。如本文所用,术语“样品”涵盖从受治疗者中取出的物质或存在于受治疗者中的物质。

[0096] “已知标准品”可为具有已知量或已知浓度的GPCR5D的溶液,其中所述溶液可为天然存在的溶液,诸如来自已知患有早期、中度、晚期、进行性或静态癌症的患者的样品;或者所述溶液可为合成溶液,诸如其中稀释了已知量的GPCR5D的缓冲水溶液。本文所述的已知标准品可包括从受治疗者中分离的GPCR5D、重组或纯化的GPCR5D蛋白质或与疾病病症相关的GPCR5D浓度值。

[0097] 如本文所用,术语“G蛋白偶联受体C5家族亚型D”和“GPCR5D”特别包括人GPCR5D蛋白,例如,如GenBank登录号BC069341、NCBI参考序列:NP_061124.1和UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZD1中所描述的那些(还可参见Brauner-Osborne, H等人,2001, *Biochim. Biophys. Acta* 1518, 237-248)。

[0098] 术语“CD3”是指人CD3蛋白质多亚基复合体。CD3蛋白质多亚基复合体由6个不同的多肽链构成。这些多肽链包括CD3 γ 链(SwissProt P09693)、CD3 δ 链(SwissProt P04234)、两条CD3 ϵ 链(SwissProt P07766)和一条CD3 ζ 链同源二聚体(SwissProt 20963),并且该复合体与T细胞受体 α 和 β 链缔合。除非另有说明,否则术语“CD3”包括由细胞(包括T细胞)天然表达或者能够在用编码那些多肽的基因或cDNA转染的细胞上表达的任何CD3变体、同种型和物种同源物。

[0099] “GPCR5D×CD3抗体”为多特异性抗体,任选为双特异性抗体,其包含两个不同的抗

原结合区,其中一个结合区特异性地结合至抗原GPCR5D,并且其中另一个结合区特异性地结合至CD3。多特异性抗体可为双特异性抗体、双体抗体或类似分子(关于双体的描述,参见例如PNAS USA, 90(14), 6444-8(1993))。除GPCR5D的一部分之外,本文提供的双特异性抗体、双体抗体等可结合任何合适的靶。术语“双特异性抗体”应理解为具有由不同抗体序列限定的两个不同抗原结合区的抗体。这能够被理解为不同的靶结合,但也包括结合至一个靶中的不同表位。

[0100] “参照样品”是可与另一个样品诸如测试样品进行比较以表征所比较样品的样品。参照样品将具有一些特征属性,作为与测试样品进行比较的基础。例如,参照样品可用作指示受治疗者患有癌症的GPCR5D水平的基准。参照样品不一定必须与测试样品并行分析,因此在一些情况下,参照样品可为先前确定用于表征给定条件的数值或范围,诸如指示受治疗者患有癌症的GPCR5D水平。该术语还包括已知与生理状态或疾病病症(诸如GPCR5D表达型癌症)相关但具有未知量的GPCR5D的用于比较目的的样品。

[0101] 如在GPCR5D表达型癌症的进展的上下文中使用的术语“进展”包括癌症从不太严重状态到较严重状态的变化。这可包括肿瘤的数量或严重性、癌细胞转移程度、癌症生长或扩散的速度等增大。例如,“结肠癌的进展”包括此类癌症从不太严重状态到较严重状态的进展,诸如从I期到II期、从II期到III期等的进展。

[0102] 如在GPCR5D表达型癌症的消退的上下文中使用的术语“消退”包括癌症从较严重状态到不太严重状态的变化。这可包括肿瘤的数量或严重性、癌细胞转移程度、癌症生长或扩散的速度等减小。例如,“结肠癌的消退”包括此类癌症从较严重状态到不太严重状态的消退,诸如从III期到II期、从II期到I期等的进展。

[0103] 如在稳定的GPCR5D表达型癌症的上下文中使用的术语“稳定”旨在描述疾病病症在临床相关时间段内未或尚未出现显著变化以被认为是进展性癌症或消退性癌症。

[0104] 本文所述的实施方案并不限于特定的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,这些方法、试剂、化合物、组合物或生物系统当然能够变化。

[0105] GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段

[0106] 本文描述了特异性地结合GPCR5D的分离单克隆抗体或抗原结合片段。抗体分子的一般结构包括抗原结合域,该域包含重链和轻链以及Fc域,并发挥多种功能(包括补体固定和结合抗体受体)。

[0107] 所述GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段包括所有同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,以及四链免疫球蛋白结构的合成多聚体。所述抗体或抗原结合片段也包括通常存在于母鸡或火鸡血清和母鸡或火鸡蛋黄中的IgY同种型。

[0108] GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段可通过重组方式来源于任何物种。例如,抗体或抗原结合片段可为小鼠、大鼠、山羊、马、猪、牛、鸡、兔、羊驼、驴、人或其嵌合型式。为适于施用于人,非人源抗体或抗原结合片段可在施用于人类患者时被基因或结构改变成抗原性较低。

[0109] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是嵌合的。如本文所用,术语“嵌合”是指抗体或其抗原结合片段的至少一个可变域的至少某些部分来源于非人哺乳动物、啮齿动物或爬行动物的抗体氨基酸序列,而抗体或其抗原结合片段的其余部分来源于人。

[0110] 在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。人源化抗体可为含有来源于非人免疫球

蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合亚序列)。在很大程度上,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的互补决定区(CDR)中的残基由具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的CDR中的残基替换。一般来讲,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,并且一般是两个可变域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白序列的那些框架区。人源化抗体可包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。

[0111] 本文所述的抗体或抗原结合片段能够以多种形式存在,但将包含表1所示的抗体CDR中的一者或多者。

[0112] 本文描述了免疫特异性地结合至GPCR5D的分离抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段为人IgG或其衍生物。虽然本文例示的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段是人的,但是所例示的抗体或抗原结合片段也可为嵌合的。

[0113] 在一些实施方案中,提供了GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段,它们包含含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,提供了GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段,它们包含含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链以及含有表1所述抗体中的任一抗体的CDR1、CDR2和CDR3的轻链。

[0114] 在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1的重链CDR1、含有SEQ ID NO:5的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:9的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:1的重链CDR1、含有SEQ ID NO:5的重链CDR2、含有SEQ ID NO:9的重链CDR3、含有SEQ ID NO:13的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:16的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:19的轻链CDR3。该GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:52基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:52基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:56基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPCR5D臂。

[0115] 在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:2的重链CDR1、含有SEQ ID NO:6的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:10的重链CDR3。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:2的重链CDR1、含有SEQ ID NO:6的重链CDR2、含有SEQ ID NO:10的重链CDR3、含有SEQ ID NO:13的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:16的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:19的轻链CDR3。该GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:53基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:53基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:56基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPCR5D臂。

[0116] 在一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:3的重链CDR1、含有SEQ ID NO:7的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:11的重链CDR3。在一些实施方

案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:3的重链CDR1、含有SEQ ID NO:7的重链CDR2、含有SEQ ID NO:11的重链CDR3、含有SEQ ID NO:14的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:17的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:20的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:54基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:54基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:57基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0117] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:4的重链CDR1、含有SEQ ID NO:8的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:12的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:4的重链CDR1、含有SEQ ID NO:8的重链CDR2、含有SEQ ID NO:12的重链CDR3、含有SEQ ID NO:15的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:18的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:21的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:55基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:55基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:58基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0118] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:61的重链CDR1、含有SEQ ID NO:67的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:72的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:61的重链CDR1、含有SEQ ID NO:67的重链CDR2、含有SEQ ID NO:72的重链CDR3、含有SEQ ID NO:13的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:78的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:80的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:82基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:82基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:92基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0119] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:2的重链CDR1、含有SEQ ID NO:28的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:30的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:2的重链CDR1、含有SEQ ID NO:28的重链CDR2、含有SEQ ID NO:30的重链CDR3、含有SEQ ID NO:13的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:16的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:19的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:83基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:83基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:56基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0120] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:27的

重链CDR1、含有SEQ ID NO:29的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:73的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:27的重链CDR1、含有SEQ ID NO:29的重链CDR2、含有SEQ ID NO:73的重链CDR3、含有SEQ ID NO:14的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:17的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:20的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:84基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:84基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:57基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0121] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:27的重链CDR1、含有SEQ ID NO:29的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:11的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:27的重链CDR1、含有SEQ ID NO:29的重链CDR2、含有SEQ ID NO:11的重链CDR3、含有SEQ ID NO:14的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:17的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:20的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:85基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:85基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:57基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0122] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:62的重链CDR1、含有SEQ ID NO:68的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:74的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:62的重链CDR1、含有SEQ ID NO:68的重链CDR2、含有SEQ ID NO:74的重链CDR3、含有SEQ ID NO:14的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:17的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:20的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:86基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:86基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:57基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0123] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:63的重链CDR1、含有SEQ ID NO:69的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:75的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:63的重链CDR1、含有SEQ ID NO:69的重链CDR2、含有SEQ ID NO:75的重链CDR3、含有SEQ ID NO:13的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:78的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:80的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:87基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:87基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:92基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0124] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:64的重链CDR1、含有SEQ ID NO:70的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:12的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:64的重链CDR1、含有SEQ ID NO:70的重链CDR2、含有SEQ ID NO:12的重链CDR3、含有SEQ ID NO:15的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:18的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:21的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:88基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:88基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:58基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0125] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:65的重链CDR1、含有SEQ ID NO:68的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:76的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:65的重链CDR1、含有SEQ ID NO:68的重链CDR2、含有SEQ ID NO:76的重链CDR3、含有SEQ ID NO:95的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:79的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:81的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:89基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:89基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:93基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0126] 在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:66的重链CDR1、含有SEQ ID NO:71的重链CDR2以及含有SEQ ID NO:77的重链CDR3。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:66的重链CDR1、含有SEQ ID NO:71的重链CDR2、含有SEQ ID NO:77的重链CDR3、含有SEQ ID NO:15的轻链CDR1、含有SEQ ID NO:18的轻链CDR2以及含有SEQ ID NO:21的轻链CDR3。该GPRC5D特异性抗体或抗原结合片段可包含人框架序列。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:91基本上相同或相同的重链可变结构域。在一些实施方案中,GPRC5D特异性抗体和抗原结合片段包含与SEQ ID NO:91基本上相同或相同的重链可变结构域以及与SEQ ID NO:94基本上相同或相同的轻链可变结构域。本段中所讨论的抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域适于包含在双特异性构建体中,其中一个臂为抗-GPRC5D臂。

[0127] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是IgG或其衍生物,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型。在其中抗体是IgG1同种型的一些实施方案中,抗体包含IgG1 Fc区(SEQ ID NO.60)。

[0128] SEQ ID NO.60

[0129] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0130] 在其中抗体具有IgG4同种型的一些实施方案中,所述抗体在其Fc区中含有S228P、L234A和L235A置换(SEQ ID NO.59)。

[0131] SEQ ID NO.59

[0132] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0133] 由上述段落中讨论的CDR和/或可变结构域序列限定的特异性抗体可包含这些修饰。

[0134] 本发明还公开了编码免疫特异性地结合至GPCR5D的抗体或抗原结合片段的分离多核苷酸。能够编码本文提供的可变域区段的分离多核苷酸可包括在相同或不同的载体上以产生抗体或抗原结合片段。编码GPCR5D抗体的示例性多核苷酸序列在以下示出:

[0135] 重链序列(SEQ ID NO:96):

[0136] atggcctgggtctggaccctgctgttctctgatggccgctgccagagcatccaggcccaggtgcagct ggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacagcttc accggctacaccatgaactgggtgcggcaggccccggccagggcctggagtgatgggctgatcaaccctaca acagcgacaccaactacgccagaagctgcagggccgggtgaccatgaccaccgacaccagcaccagcaccgccta catggagctgcggagcctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgcgcccgggtggcctgcgggtggcctg gactactggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgcctccaccaagggccatccgtcttccccctggcgc cctgctccaggagcaccctccgagagcacagccgcctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgac ggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctac tcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaatattggtccccatgccaccatgccagcacctgaggc cgccgggggaccatcagctcttctgttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtc acgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgc ataatgccaagacaaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgca ccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaacc atctccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaaga accaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctaccccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaggctaacc gtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactaca cacagaagagcctctccctgtctctgggtaaata

[0137] 轻链序列(SEQ ID NO:90):

[0138] atgcgggtgctggccagctgctgggactgctgctgctgctgcttccctggcgccagatgcgacatcca gatgaccagagccccagcagcctgagcggcagcgtgggcgaccgggtgaccatcactgcaaggccagccagaac gtggccaccacgtgggctggtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagcggctgatctacagcggcagctacc ggtacagcggcgtgccagccggtcagcggcagcggcagcggcaccgagttaccctgaccatcagcaacctgca gcccagagacttgcaccactactgcccagcagtagcaaccgggtaccctacaccttggccagggcaccagctg

gagatcaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactg
cctctgtttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca
atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacg
ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgccaagtcacccatcaggcctgagctcgcccgtca
caaagagcttcaacaggggagagtgttga

[0139] 编码重组抗原结合蛋白的多核苷酸也在本公开的范围内。在一些实施方案中,所述多核苷酸(及其编码的肽)包含前导序列。可采用本领域已知的任何前导序列。前导序列可包含但不限于限制性位点或翻译起始位点。

[0140] 本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段包括这样的变体:其具有保留所述GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段的生物特性(例如,结合亲和力或免疫效应活性)的单个或多个氨基酸置换、缺失或添加。在本发明的上下文中,除非另有说明,否则以下符号用于描述突变;i)给定位置处氨基酸的置换被书写为例如S228P,其意指228位的丝氨酸被脯氨酸置换;以及ii)对于特定变体,使用特定的三字母或单字母代码(包括代码Xaa和X)指示任何氨基酸残基。因此,丝氨酸置换228位的精氨酸表示为:S228P,或者任何氨基酸残基置换228位的丝氨酸表示为S228P。在228位的丝氨酸缺失的情况下,用S228*表示。技术人员可制备具有单个或多个氨基酸置换、缺失或添加的变体。

[0141] 这些变体可包括:(a)其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸置换的变体,(b)其中一个或多个氨基酸添加到多肽或从多肽缺失的变体,(c)其中一个或多个氨基酸包括取代基的变体,以及(d)其中多肽与另一种肽或多肽(诸如融合配偶体、蛋白质标签或其它化学部分)融合的变体,其可赋予多肽有用的特性,诸如例如抗体的表位、多组氨酸序列、生物素部分等。本文所述的抗体或抗原结合片段可包括这样的变体:其中来自一个物种的氨基酸残基在保守位置或非保守位置处置换为另一物种中的对应残基。在其它实施方案中,非保守位置处的氨基酸残基被保守或非保守残基置换。得到这些变体的技术,包括基因技术(缺失、突变等)、化学技术和酶技术,是本领域普通技术人员已知的。

[0142] 本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段可包括若干抗体同种型,诸如,IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在一些实施方案中,抗体同种型为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型,优选为IgG1或IgG4同种型。抗体或其抗原结合片段的特异性主要是由CDR的氨基酸序列和排列决定的。因此,一种同种型的CDR可转变为另一种同种型而不改变抗原特异性。或者,已经建立技术使杂交瘤从产生一种抗体同种型转换到产生另一种同种型(同种型转换)而不改变抗原特异性。因此,这类抗体同种型在所述抗体或抗原结合片段的范围内。

[0143] 还提供了包含本文所述的多核苷酸的载体。载体可为表达载体。因此,预期包含编码感兴趣多肽的序列的重组表达载体也在本公开的范围内。表达载体可含有一个或多个附加的序列,诸如但不限于调控序列(如启动子、增强子)、选择标记和聚腺苷酸化信号。用于转化多种宿主细胞的载体是熟知的,并且包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、杆状病毒、杆粒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)以及其它细菌、酵母和病毒载体。

[0144] 本说明书范围内的重组表达载体包括合成的、基因组或cDNA衍生的核酸片段,这些片段编码可操作地连接至合适的调控元件的至少一种重组蛋白。此类调节元件可包含转录启动子、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译的终止的序列。表达载体,特别是哺乳动物表达载体还可包含一个或多个非转录元件,诸如复制起点、连接到

待表达的基因的合适启动子和增强子、其它5'或3'侧翼非转录序列、5'或3'非翻译序列(诸如必需的核糖体结合位点)、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点或转录终止序列。也可并入赋予在宿主中复制能力的复制起点。

[0145] 用于转化脊椎动物细胞的表达载体中的转录和翻译控制序列可由病毒源提供。示例性载体可如Okayama和Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983) 所述那样构建。

[0146] 在一些实施方案中, 将抗体编码序列或抗原结合片段编码序列置于强效组成型启动子(诸如用于以下基因的启动子: 次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸等)的控制下。此外, 许多病毒启动子在真核细胞中组成性地发挥功能, 并适合与上述实施方案一起使用。这类病毒启动子包括但不限于细胞巨化病毒 (CMV) 立即早期启动子、SV40的早期和晚期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、马罗尼白血病毒病毒的长末端重复序列 (LTR)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、EB病毒 (EBV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 和其它逆转录病毒, 以及单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子。在一个实施方案中, 将GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段编码序列置于诱导型启动子(诸如, 金属硫蛋白启动子、四环素诱导型启动子、多西环素诱导型启动子、含有一种或多种干扰素刺激的反应元件 (ISRE) (诸如蛋白激酶R 2', 5'-寡腺苷酸合成酶、Mx基因、ADAR1等)的启动子)的控制下。

[0147] 本文所述的载体可含有一个或多个内部核糖体进入位点 (IRES)。IRES序列包含在融合载体中可能有利于增强一些蛋白质的表达。在一些实施方案中, 载体系统将包括一个或多个聚腺苷酸化位点(例如, SV40), 这些位点可在任何上述核酸序列的上游或下游。载体组分可连续地连接, 或以提供用于表达基因产物的最佳间距的方式(即通过在ORF之间引入“间隔区”核苷酸)排列, 或以另一种方式定位。调控元件诸如IRES基序也可被布置成提供用于表达的最佳间距。

[0148] 载体可包含本领域熟知的选择标记。选择标记包括阳性选择标记和阴性选择标记, 例如抗生素抗性基因(例如新霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、四环素抗性基因、青霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因)、谷氨酰胺合酶基因、HSV-TK、用于更昔洛韦选择的HSV-TK衍生物或用于6-甲基嘌呤选择的细菌嘌呤核苷磷酸化酶基因(Gadi等人, 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000))。编码选择标记或克隆位点的核酸序列可在编码感兴趣的多肽或克隆位点的核酸序列的上游或下游。

[0149] 本文所述的载体可用于用编码所述抗体或抗原结合片段的基因转化各种细胞。例如, 该载体可用于生成GPCR5D特异性抗体或产生抗原结合片段的细胞。因此, 另一方面的特征是用包含编码特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所描述和例示的抗体或抗原结合片段)的核酸序列的载体转化的宿主细胞。

[0150] 本领域已知用于将外来基因引入细胞中的多种技术, 并且出于实施所述方法的目的, 这些技术可用于根据本文所描述和例示的各种实施方案构建重组细胞。所使用的技术应当使得异源基因序列向宿主细胞稳定转移, 以致异源基因序列是可遗传的并且可由细胞子代表达, 从而受体细胞的必要发育和生理功能不被破坏。可使用的技术包括但不限于染色体转移(例如细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移)、物理方法(例如转染、原生质球融合、显微注射、电穿孔、脂质体载体)、病毒载体转移(例如, 重组DNA病毒、重组RNA病毒)等(描述于Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985))。也可使用磷酸钙沉淀

和聚乙二醇(PEG)诱导的细菌原生质体与哺乳动物细胞的融合来转化细胞。

[0151] 适用于表达本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段的细胞优选为真核细胞,更优选为植物、啮齿动物或人来源的细胞,例如但不限于NS0、CHO、CHO K1、perC.6、Tks13、BHK、HEK293细胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L细胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0骨髓瘤细胞和BHK细胞系等。此外,可使用杂交瘤细胞完成抗体的表达。用于产生杂交瘤的方法是本领域中已良好建立的。

[0152] 可选择或筛选用本文所述的表达载体转化的细胞用于本文所述的抗体或抗原结合片段的重组表达。扩增和筛选重组阳性细胞,筛选表现出所需表型(诸如高水平表达、增强的生长特性或例如由于蛋白质修饰或改变的翻译后修饰产生具有所需生化特征的蛋白质的能力)的亚克隆。这些表型可能是由于给定亚克隆的固有性质或由于突变造成的。突变可通过使用化学品、UV波长光、辐射、病毒、插入诱变剂、DNA错配修复的抑制或这些方法的组合来实现。

[0153] 使用GPCR5D特异性抗体进行治疗的方法

[0154] 本文提供了在治疗中使用的GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段。具体地讲,这些抗体或抗原结合片段可用于治疗癌症,诸如GPCR5D表达型癌症。因此,本发明提供了治疗癌症的方法,该方法包括施用如本文所述的抗体,诸如GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段。例如,该用途可通过干扰GPCR5D-受体相互作用或其中抗体缀合到毒素,从而将毒素靶向GPCR5D表达型癌症。在一些实施方案中,GPCR5D表达型癌症包括淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤(MM)。用于这些方法的抗体包括上文所述的那些抗体,例如,具有表1所述特征的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段,例如在这些抗体的进一步论述中的CDR或可变域序列。

[0155] 在本文所述的一些实施方案中,GPCR5D特异性抗体的免疫效应子特性可通过本领域技术人员已知的技术经由Fc修饰得到增强或沉默。例如,Fc效应子功能诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等,可通过修饰促成这些活性的Fc中的残基来提供和/或控制。

[0156] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,在这个反应过程中,表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并随后致使靶细胞裂解。

[0157] 单克隆抗体诱导ADCC的能力可通过改造其寡糖组分来增强。人IgG1或IgG3在Asn297处被熟知的双分枝G0、G0F、G1、G1F、G2或G2F形式的大多数聚糖N-糖基化。未工程化的CHO细胞所产生的抗体通常具有约至少85%的聚糖岩藻糖含量。从连接到Fc区的双分枝复合物型低聚糖去除核心岩藻糖,可经由改善的Fc. γ . RIIIa结合来增强抗体的ADCC,而不会改变抗原结合或CDC活性。此类mAb可使用所报告的能引起具有双分枝复合物型Fc低聚糖的相对高去岩藻糖基化抗体的成功表达的不同方法实现,诸如控制培养物渗透压(Konno等人,Cytotechnology,64:249-65,2012),应用变体CHO细胞系Lec13作为宿主细胞系(Shields等人,JBiol Chem,277:26733-26740,2002),应用变体CHO细胞系EB66作为宿主细胞系(Olivier等人,MAbs,2(4),2010;Epub ahead of print;PMID:20562582),应用大鼠杂交瘤细胞系YB2/0作为宿主细胞系(Shinkawa等人,J Biol Chem,278:3466-3473;2003),引入特异性针对 α 1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的小干扰RNA(Mori等人,Biotechnol

Bioeng,88:901-908,2004),或共表达 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III和高尔基体 α -甘露糖苷酶II或强效 α -甘露糖苷酶I抑制剂,几夫碱(Ferrara等人,J Biol Chem,281:5032-5036,2006;Ferrara等人,Biotechnol Bioeng,93:851-861,2006;Xhou等人,Biotechnol Bioeng,99:652-65,2008)。

[0158] 在本文所述的一些实施方案中,也可通过抗体Fc中的某些置换来增强由GPCR5D抗体引发的ADCC。示例性置换为例如在氨基酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378或430(根据EU索引对残基进行编号)处的置换,如美国专利6,737,056中有所描述。

[0159] 检测GPCR5D的方法

[0160] 本文提供了用于通过使样本与本文所述的抗体或其抗原结合片段接触来检测生物样本中的GPCR5D的方法。如本文所述,样本可来源于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。在一些实施方案中,所述方法包括通过使样本与本文所述的任何GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段接触来检测生物样本中的GPCR5D。

[0161] 在一些实施方案中,样本可与本文所述的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段中的多于一种接触。例如,样本可与第一GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段接触,然后与第二GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段接触,其中第一抗体或抗原结合片段和第二抗体或抗原结合片段不是相同的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段在接触样本之前可附连至表面,诸如多孔板、芯片或类似的底物上。在其它实施方案中,第一抗体或其抗原结合片段在接触样本之前完全可不附连或连接至任何物体。

[0162] 可对所述GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段进行可检测地标记。在一些实施方案中,通过本文所述的方法,标记的抗体和抗原结合片段可有利于检测GPCR5D。许多这样的标记是本领域技术人员容易知晓的。例如,合适的标记包括但不应当认为其限于放射标记、荧光标记、表位标签、生物素、发色团标记、ECL标记或酶。更具体地,所述标记包括钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶、聚组氨酸(HIS标签)、吖啶染料、花青染料、荧光酮染料、噁嗪染料、菲啶染料、罗丹明染料、Alexafluor[®]染料等。

[0163] 所述GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段可用于多种测定中,以检测生物样本中的GPCR5D。一些合适的测定包括但不应当认为其限于蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、表面等离子共振、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定。

[0164] 在本文所述的一些实施方案中,受治疗者中GPCR5D表达型癌细胞的检测可用于确定受治疗者是否可用针对GPCR5D的治疗剂进行治疗。

[0165] GPCR5D以可检测的水平存在于血液和血清样品中。因此,本文提供了用于通过使样品与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段接触来检测来源于血液的样品(诸如血清样品)中的GPCR5D的方法。血液样品或其衍生物可被稀释、分馏或以其它方式处理以得到可对其执行所述方法的样品。在一些实施方案中,可通过本领域已知的任意数量的测定检测血液样品或其衍生物中的GPCR5D,这些测定诸如但不限于蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、表面等离子共振、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光

(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定。

[0166] 诊断癌症的方法

[0167] 本文提供了用于诊断受治疗者中GPCR5D表达型癌症的方法。在一些实施方案中, GPCR5D表达型癌症包括淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中, 如上文所述, 检测生物样品诸如血液样品或血清样品中的GPCR5D提供了诊断从其取得样品的受治疗者中癌症的能力。或者, 在一些实施方案中, 其它样品诸如组织学样品、细针抽吸样品、切除的肿瘤组织、循环细胞、循环肿瘤细胞等也可用于评估从其取得样品的受治疗者是否患有癌症。在一些实施方案中, 可能已经知道从其取得样品的受治疗者患有癌症, 但是可能尚未诊断出受治疗者所患癌症的类型或者初步诊断结果可能不清楚, 因此检测获自受治疗者的生物样品中的GPCR5D可实现或明确癌症的诊断。例如, 可能已知受治疗者患有癌症, 但是可能不知道或可能不清楚受治疗者所患癌症是否是GPCR5D表达型的。

[0168] 在一些实施方案中, 所述方法涉及通过测定来源于受治疗者的生物样品中存在的GPCR5D的量来评估受治疗者是否患有GPCR5D表达型癌症; 并且将所观测到的GPCR5D的量与对照或参照样样品中的GPCR5D的量进行比较, 其中来源于受治疗者的样品中GPCR5D的量与对照或参照样样品中GPCR5D的量之间的差值指示受治疗者患有GPCR5D表达型癌症。在另一个实施方案中, 可将所观测到的获自受治疗者的生物样品中GPCR5D的量与已知与癌症的某些形式或阶段相关的GPCR5D水平进行比较, 从而确定受治疗者所患癌症的形式或阶段。在一些实施方案中, 通过使样品与免疫特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所述的GPCR5D特异性抗体)接触来评估来源于受治疗者的样品中GPCR5D的量。评估其中GPCR5D的存在的样品可来源于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片, 包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。在一些实施方案中, GPCR5D表达型癌症包括血液学癌症诸如多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中, 受治疗者是人。

[0169] 在一些实施方案中, 诊断GPCR5D表达型癌症的方法将涉及: 使受治疗者的生物样品与GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段(诸如可来源于表1中提供的抗体和片段的那些)接触; 定量分析由抗体或其抗原结合片段结合的样品中存在的GPCR5D的量; 将样品中存在的GPCR5D的量与已知标准品或参照样样品进行比较; 并确定受治疗者的GPCR5D水平是否落入与癌症相关的GPCR5D水平内。在另外的实施方案中, 诊断方法之后可为施用或给出癌症特异性治疗的附加步骤。在另一个实施方案中, 诊断方法之后可为传送测定结果以便于治疗癌症的附加步骤。在一些实施方案中, 癌症特异性治疗可针对GPCR5D表达型癌症, 诸如本文所述的GPCR5D×CD3多特异性抗体。

[0170] 在一些实施方案中, 所述方法涉及通过测定获自受治疗者的血液或血清样品中存在的GPCR5D的量来评估受治疗者是否患有GPCR5D表达型癌症; 并且将所观测到的GPCR5D的量与对照或参照样样品中的GPCR5D的量进行比较, 其中来源于受治疗者的样品中GPCR5D的量与对照或参照样样品中GPCR5D的量之间的差值指示受治疗者患有GPCR5D表达型癌症。

[0171] 在一些实施方案中, 对照或参照样样品可来源于不患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者。在一些实施方案中, 对照或参照样样品可来源于患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者。在其中对照或参照样样品来源于不患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者的一些实施方案中, 观察到的测试样品中存在的GPCR5D的量相对于观察到的对照或参照样样品中GPCR5D的量有所增加,

指示所评估的受治疗者患有GPCR5D表达型癌症。在其中对照样品来源于不患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的GPCR5D的量相对于观察到的对照或参照样样品中GPCR5D的量有所减少或近似,指示所评估的受治疗者不患有GPCR5D表达型癌症。在其中对照或参照样样品来源于患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的GPCR5D的量相对于观察到的对照或参照样样品中GPCR5D的量近似,指示所评估的受治疗者患有GPCR5D表达型癌症。在其中对照样品或参照样样品来源于患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者的一些实施方案中,观察到的测试样品中存在的GPCR5D的量相对于观察到的对照或参照样样品中GPCR5D的量有所减少,指示所评估的受治疗者不患有GPCR5D表达型癌症。

[0172] 在一些实施方案中,通过使样品与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段(诸如本文所述的抗体)接触来评估来源于受治疗者的样品中GPCR5D的量。评估其中GPCR5D的存在的样品可来源于血液样品、血清样品、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。

[0173] 在各个方面,通过使样品与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段接触来测定GPCR5D的量。在一些实施方案中,样品可与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段中的多于一种类型的接触。在一些实施方案中,样品可与特异性地结合GPCR5D的第一抗体或其抗原结合片段接触,然后与特异性地结合GPCR5D的第二抗体或其抗原结合片段接触。GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段,诸如本文所述的那些可用于该功能中。

[0174] 能够使用GPCR5D特异性抗体和抗原结合片段的各种组合来提供“第一”和“第二”抗体或抗原结合片段以实施所述诊断方法。在一些实施方案中,GPCR5D表达型癌症包括淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤(MM)。

[0175] 在某些实施方案中,通过蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定来测定GPCR5D的量。

[0176] 在所述诊断方法的各种实施方案中,使用了对照样品或参照样样品。该样品可为确保所用测定正常工作的阳性或阴性测定对照样;例如,该性质的测定对照样通常可用于免疫组织化学测定中。或者,该样品可为来自健康受治疗者的生物样品中GPCR5D量的标准化参照样样品。在一些实施方案中,可将测试受治疗者的所观测到的GPCR5D水平与在来自已知患有GPCR5D表达型癌症的受治疗者的样品中所观测到的GPCR5D水平进行比较。在一些实施方案中,对照受治疗者可能患有感兴趣的特定癌症。在一些实施方案中,已知对照受治疗者患有早期癌症,其可能是或可能不是GPCR5D表达型癌症。在一些实施方案中,已知对照受治疗者患有中期癌症,其可能是或可能不是GPCR5D表达型癌症。在一些实施方案中,已知对照受治疗者患有晚期癌症,其可能是或可能不是GPCR5D表达型癌症。

[0177] 用于监测癌症的方法

[0178] 本文提供了用于监测受治疗者中GPCR5D表达型癌症的方法。在一些实施方案中,GPCR5D表达型癌症包括淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,所述方法涉及通过测定来源于受治疗者的测试样品中存在的GPCR5D的量来评估GPCR5D表达型癌症是否正在进展、消退或保持稳定;并且将所观测到的GPCR5D的量与在较早时间点以类似方式获

自受治疗者的生物样品中GPCR5D的量进行比较,其中测试样品与较早样品中GPCR5D的量之间的差值提供了癌症是否正在进展、消退或保持稳定的指示。就这一点而言,测试样品中GPCR5D的量相对于所观测到的较早样品中的量有所增加可指示GPCR5D表达型癌症的进展。相反,测试样品中GPCR5D的量相对于所观测到的较早样品中的量有所减少可指示GPCR5D表达型癌症的消退。

[0179] 因此,测试样品中GPCR5D的量相对于所观测到的较早样品中的量差别不明显可指示GPCR5D表达型癌症处于稳定疾病状态。在一些实施方案中,通过使样品与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗体片段(诸如本文所述的抗体)接触来评估来源于受治疗者的生物样品中GPCR5D的量。评估其中GPCR5D的存在的样品可来源于尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片,包括细针抽吸组织)、组织学制备物等。在一些实施方案中,受治疗者是人。

[0180] 在一些实施方案中,监测GPCR5D表达型癌症的方法将涉及:使受治疗者的生物样品与GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段(诸如可来源于表1中所提供的抗体和片段的那些)接触;定量分析样品中存在的GPCR5D的量;将样品中存在的GPCR5D的量与在较早时间点以类似方式获自相同受治疗者的生物样品中所测定的GPCR5D的量进行比较;并确定受治疗者的GPCR5D水平是否随时间变化。测试样品中GPCR5D的量相对于所观测到的较早样品中的量有所增加可指示癌症的进展。相反,测试样品中GPCR5D的量相对于所观测到的较早样品中的量有所减少可指示GPCR5D表达型癌症的消退。因此,测试样品中GPCR5D的量相对于所观测到的较早样品中的量差别不明显可指示GPCR5D表达型癌症处于稳定疾病状态。在一些实施方案中,样品的GPCR5D水平可单独与已知标准品或参照样品进行比较,或者样品的GPCR5D水平除与所观测到的在较早时间点评估的样品中的GPCR5D水平进行比较之外,也可与已知标准品或参照样品进行比较。在另外的实施方案中,诊断方法之后可为施用癌症特异性治疗的附加步骤。在一些实施方案中,癌症特异性治疗可针对GPCR5D表达型癌症。

[0181] 在各个方面,通过使样品与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段接触来测定GPCR5D的量。在一些实施方案中,样品可与特异性地结合GPCR5D的抗体或其抗原结合片段中的多于一种类型的接触。在一些实施方案中,样品可与特异性地结合GPCR5D的第一抗体或其抗原结合片段接触,然后与特异性地结合GPCR5D的第二抗体或其抗原结合片段接触。抗体诸如本文所述的那些可用于该功能中。

[0182] 能够使用表1中所述的抗体和抗原结合片段的各种组合来提供“第一”和“第二”抗体或抗原结合片段以实施所述的监测方法。在一些实施方案中,GPCR5D表达型癌症包括血液学癌症诸如多发性骨髓瘤(MM)。

[0183] 在某些实施方案中,通过蛋白质印迹分析、放射性免疫测定、免疫荧光测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、电化学发光(ECL)免疫测定、免疫组织化学、荧光激活细胞分选(FACS)或ELISA测定来测定GPCR5D的量。

[0184] 用于检测GPCR5D的试剂盒

[0185] 本文提供了用于检测生物样本中的GPCR5D的试剂盒。这些试剂盒包括本文所述的GPCR5D特异性抗体或其抗原结合片段中的一种或多种,以及试剂盒的使用说明。

[0186] 所提供的GPCR5D特异性抗体或抗原结合片段可为溶液;被冻干;附连到底物、载体

或板;或被可检测地标记。

[0187] 所述试剂盒还可包括用于实施本文所述方法的附加组分。举例来说,试剂盒可包括用于从受治疗者获得样本的装置、对照或参照样本(例如来自患有进展缓慢的癌症的受治疗者和/或不患癌症的受治疗者的样本)、一个或多个样本室和/或描述本发明方法的性能的材料、以及组织特异性对照或标准品。

[0188] 用于确定GPCR5D的水平水平的装置还可包括例如在用于确定GPCR5D水平的测定中使用的缓冲液或其它试剂。说明书可为例如用于执行测定的印刷说明书和/或用于评价GPCR5D的表达水平的说明书。

[0189] 所述试剂盒还可包括用于从受治疗者分离出样本的装置。这些装置可包括可用于从受治疗者中获得流体或组织的设备或试剂中的一项或多项。用于从受治疗者中获得样本的装置还可包括用于从血液样本中分离出血液组分诸如血清的装置。优选的是,将试剂盒设计成与人类受治疗者一起使用。

[0190] 多特异性抗体

[0191] 本文所述的抗-GPCR5D抗体的结合结构域识别在其表面上表达GPCR5D的细胞。如上文所述,GPCR5D表达可指示癌细胞。更特异性地靶向特定细胞亚群可通过制备结合至GPCR5D和另一个靶(诸如CD3和BCMA)的双特异性分子(诸如抗体或抗体片段)来实现。这通过制备包含结合至GPCR5D的第一区和结合至另一个靶抗原的第二结合区的分子来实现。抗原结合区可采取允许靶的特异性识别的任何形式,例如结合区可为或可包含重链可变结构域、Fv(重链可变结构域和轻链可变结构域的组合)、基于III型纤连蛋白结构域的结合结构域(诸如来自纤连蛋白或基于来自纤连蛋白的III型结构域的共有序列,或来自腱生蛋白或基于来自腱生蛋白的III型结构域的共有序列,诸如来自Janssen Biotech有限公司的Centyrin分子,参见例如W02010/051274和W02010/093627)。因此,提供了包含分别结合GPCR5D和另一抗原的两个不同抗原结合区的双特异性分子。

[0192] 本文所述的一些多特异性抗体包含分别结合GPCR5D和CD3的两个不同的抗原结合区。在优选的实施方案中,提供了结合GPCR5D和CD3的多特异性抗体(GPCR5D×CD3多特异性抗体)及其多特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,GPCR5D×CD3多特异性抗体包含配对形成特异性地结合GPCR5D的第一抗原结合位点的第一重链(HC1)和第一轻链(LC1),以及配对形成特异性地结合CD3的第二抗原结合位点的第二重链(HC2)和第二轻链(LC2)。在优选的实施方案中,GPCR5D×CD3多特异性抗体是包含GPCR5D特异性臂和CD3特异性臂的双特异性抗体,GPCR5D特异性臂包含配对形成特异性地结合CD3的第一抗原结合位点的第一重链(HC1)和第一轻链(LC1),CD3特异性臂包含配对形成特异性地结合GPCR5D的第二抗原结合位点的第二重链(HC2)和第二轻链(LC2)。在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体包括具有全长抗体结构的抗体。如本文所用,“全长抗体”是指具有两条全长抗体重链和两条全长抗体轻链的抗体。全长抗体重链(HC)包含重链可变结构域VH和重链恒定结构域CH1、CH2和CH3。全长抗体轻链(LC)包含轻链可变结构域VL和轻链恒定结构域CL。全长抗体可在一条或两条重链中缺少C-端赖氨酸(K)。术语“Fab臂”或“半分子”是指特异性地结合抗原的一个重链-轻链对。在一些实施方案中,抗原结合结构域之一是基于非抗体的结合结构域,例如基于3型纤连蛋白结构域的结合结构域,如Centyrin。

[0193] 本文提供的多特异性抗体的GPCR5D结合臂可来源于上述GPCR5D特异性抗体中的

任一种。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含来源于如表1中所述的抗体克隆的重链CDR1、CDR2和CDR3。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含来源于如表1中所述的抗体克隆的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链CDR1、CDR2和CDR3。

[0194] 在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483或GC5B596的重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含来源于如表1中所述的抗体克隆的重链可变结构域。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含来源于如表1中所述的抗体克隆的重链可变结构域和轻链可变结构域。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483或GC5B596的重链可变结构域。在这类GPRC5D结合臂的一些示例性实施方案中,结合GPRC5D的第一抗原结合区包含克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598、或GC5B597的重链可变结构域和轻链可变结构域……

[0195] 表3提供了GPRC5D×CD3双特异性抗体的列表,该双特异性抗体具有特异于GPRC5D的一个重链和轻链对和特异于CD3的另一个重链和轻链对,其中列出了特定抗体ID以描述用于产生所述实施方案的抗原特异性抗体臂。

[0196] 表3:

[0197]

GPRC5D特异性臂=AbID	CD3特异性臂=AbID
GC5B81	CD3B219
GC5B465	CD3B219
GC5B483	CD3B219
GC5B596	CD3B219
GC5B382	CD3B219
GC5B379	CD3B219
GC5B373	CD3B219
GC5B376	CD3B219
GC5B385	CD3B219
GC5B370	CD3B219
GC5B602	CD3B219
GC5B603	CD3B219
GC5B599	CD3B219
GC5B601	CD3B219
GC5B598	CD3B219
GC5B597	CD3B219

[0198] 在双特异性抗体的一些实施方案中,GPRC5D结合臂也结合食蟹猴GPRC5D,优选其细胞外结构域。

[0199] 在一些实施方案中,多特异性抗体的GPRC5D结合臂为IgG或其衍生物,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型。在其中GPRC5D结合臂具有IgG4同种型的一些实施方案中,所述结合臂在其Fc区中包含S228P、L234A和L235A置换。

[0200] 在双特异性抗体的一些实施方案中,第二抗原结合臂结合人CD3。在一些优选的实施方案中,GPRC5D×CD3双特异性抗体的CD3特异性臂来源于结合并激活人原代T细胞和/或食蟹猴原代T细胞的CD3特异性抗体。在一些实施方案中,CD3结合臂结合至CD3 ϵ 的N端处的表位。在一些实施方案中,CD3结合臂接触包含CD3 ϵ 的六个N端氨基酸的表位。在一些实施方案中,双特异性抗体的CD3特异性结合臂来源于小鼠单克隆抗体SP34,一种小鼠IgG3/ λ 同种型。在一些实施方案中,CD3结合臂包含抗体SP34的CDR。此类CD3结合臂可以 5×10^{-7} M或更低,诸如 1×10^{-7} M或更低、 5×10^{-8} M或更低、 1×10^{-8} M或更低、 5×10^{-9} M或更低、或者 1×10^{-9} M或更低的亲和力结合至CD3。CD3特异性结合臂可为小鼠单克隆抗体SP34的臂的人源化型式。人框架适应(HFA)可用于人源化从其衍生CD3特异性臂的抗-CD3抗体。在双特异性抗体的一些实施方案中,CD3结合臂包含选自表2的重链和轻链对。

[0201] 在一些实施方案中,CD3结合臂为IgG或其衍生物。在一些实施方案中,CD3结合臂为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在其中CD3结合臂具有IgG4同种型的一些实施方案中,所述结合臂在其Fc区中含有S228P、L234A、L235A、F405L和R409K置换。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合原代人T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合原代食蟹猴T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段结合原代人和食蟹猴T细胞上的CD3 ϵ 。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段激活原代人CD3+T细胞。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段激活原代食蟹猴CD4+T细胞。

[0202] 在一些实施方案中,提供了具有GPRC5D结合臂的GPRC5D×CD3双特异性抗体,所述GPRC5D结合臂包含抗体克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链。……在一些实施方案中,提供了具有GPRC5D结合臂的GPRC5D×CD3双特异性抗体,所述GPRC5D结合臂包含抗体克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链和轻链。在一些实施方案中,提供了具有包含抗体克隆CD3B219的重链的CD3结合臂的GPRC5D×CD3双特异性抗体。在一些实施方案中,提供了具有包含抗体克隆CD3B219的重链和轻链的CD3结合臂的GPRC5D×CD3双特异性抗体。在一些实施方案中,提供了具有GPRC5D结合臂和CD3结合臂的GPRC5D×CD3双特异性抗体,所述GPRC5D结合臂包含抗体克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链,所述CD3结合臂包含抗体克隆CD3B219的重链。在一些实施方案中,提供了具有GPRC5D结合臂和CD3结合臂的GPRC5D×CD3双特异性抗体,所述GPRC5D结合臂包含抗体克隆GC5B81、GC5B465、GS5B483、GC5B596、GC5B382、GC5B379、GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B370、GC5B602、GC5B603、GC5B599、GC5B601、GC5B598或GC5B597的重链和轻链,所述CD3结合臂包含抗体克隆CD3B219的重链和轻链。

[0203] 表23中提供了示例性的GPCR5D×CD3双特异性抗体。

[0204] 不同形式的双特异性抗体已有所描述,并且最近由Chames和Baty在Curr Opin Drug Disc Dev,2009年,第12卷,第276页中进行了综述。

[0205] 在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体是通过受控Fab臂交换得到的双体抗体、交叉体或双特异性抗体,如本发明所述的那些。

[0206] 在一些实施方案中,双特异性抗体包括具有互补CH3结构域以强制发生异源二聚体化的IgG样分子;重组IgG样双靶向分子,其中该分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的Fab片段的一部分或Fab片段;IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的部分融合;Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定的双体抗体与重链恒定域、Fc区或其部分融合;Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起;基于ScFv和双体抗体的重链抗体(例如域抗体、纳米抗体),其中不同的单链Fv分子或不同的双体抗体或不同的重链抗体(例如域抗体、纳米抗体)彼此融合或与另一蛋白或载体分子融合。

[0207] 在一些实施方案中,具有互补CH3结构域分子的IgG样分子包括Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech)、纽扣结构(Knobs-into-Holes) (Genentech)、CrossMAbs (Roche) 和静电配对体(electrostatically-matched) (Amgen)、LUZ-Y (Genentech)、链交换工程结构域体(Strand Exchange Engineered Domain body) (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonic (Merus) 和DuoBody (Genmab A/S)。

[0208] 在一些实施方案中,重组IgG样双靶向分子包括双重靶向(DT)-Ig (GSK/Domantis)、二合一抗体(Genentech)、交联MAbs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star) 和CovX体(CovX/Pfizer)。

[0209] 在一些实施方案中,IgG融合分子包括双重可变结构域(DVD)-Ig (Abbott)、IgG样双特异性抗体(InnClone/Eli Lilly)、Ts2Ab (MedImmune/AZ) 和BsAb (Zymogenetics)、HERCULES (Biogen Idec) 以及TvAb (Roche)。

[0210] 在一些实施方案中,Fc融合分子包括ScFv/Fc融合体(Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS)、双亲和性再靶向技术(Fc-DART) (MacroGenics) 以及Dual (ScFv).sub.2-Fab (中国国家抗体医药研究中心(National Research Center for Antibody Medicine--China))。

[0211] 在一些实施方案中,Fab融合双特异性抗体包括F(ab)2 (Medarex/AMGEN)、Dual-Action或Bis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics)、二价双特异性抗体(Biotecnol) 和Fab-Fv (UCB-Celltech)。基于ScFv的、基于双体抗体的结构域抗体包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE) (Micromet)、串联双体抗体(Tandab) (Affimed)、双亲和性再靶向分子(DART) (MacroGenics)、单链双体抗体(Academic)、TCR样抗体(AIT, ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合体(Merrimack) 和COMBODY (Epigen Biotech)、双靶向纳米抗体(Ablynx)、仅双重靶向重链结构域抗体。

[0212] 本发明的全长双特异性抗体可例如使用两个单特异性二价抗体之间的Fab臂交换(或半分子交换)通过下列方式产生:在每个半分子中的重链CH3交界处引入置换以促成两个在体外无细胞环境中或使用共表达而具有不同特异性的抗体半分子的异源二聚体形成。Fab臂交换反应是二硫键异构化反应和CH3域解离-缔合的结果。亲本单特异性抗体的铰链区中的重链二硫键减少。亲本单特异性抗体之一的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性

抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3结构域通过解离-缔合而释放和重新形成。可将Fab臂的CH3域改造成促成异源二聚化而非同源二聚化。所得产物是具有两个Fab臂或半分子的双特异性抗体,这两个Fab臂或半分子各自结合不同的表位,即GPCR5D上的表位和CD3上的表位。

[0213] 如本文所用,“同源二聚化”是指具有相同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“同源二聚体”是指具有含有相同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0214] 如本文所用,“异源二聚化”是指具有不同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“异源二聚体”是指具有含有不同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0215] “纽扣”技术(参见,例如PCT国际二聚抗体W0 2006/028936)可用于产生全长双特异性抗体。简而言之,在人IgG中形成CH3域的交界的选定氨基酸可在影响CH3域相互作用的位置处突变,从而促进异源二聚体形成。将具有小侧链(扣)的氨基酸引入特异性地结合第一抗原的抗体的重链中,并将具有大侧链(钮)的氨基酸引入特异性地结合第二抗原的抗体的重链中。在两种抗体共表达后,由于具有“扣”的重链与具有“钮”的重链的优先相互作用而形成异源二聚体。形成钮和扣的示例性CH3置换对(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置)是:T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S_L368A_Y407V。

[0216] 还可使用其它技术,诸如通过在一个CH3表面置换带正电荷的残基并在另一CH3表面置换带负电荷的残基使用静电相互作用促进重链异源二聚化,如美国专利公布号US2010/0015133;美国专利公布号US2009/0182127;美国专利公布号US2010/028637或美国专利公布号US2011/0123532中所述。在其它技术中,可通过下面的置换(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置)促进异源二聚化:L351Y_F405AY407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366VK409FY407A/T366A_K409F或T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布号US2012/0149876或美国专利公布号US2013/0195849中所述。

[0217] 除上述方法之外,本发明的双特异性抗体还可在体外无细胞环境中通过下列方式产生:在两种单特异性同源二聚抗体的CH3区中引入不对称突变,并且在还原条件下由两种亲本单特异性同源二聚抗体形成双特异性异源二聚抗体,从而根据国际专利公布号W02011/131746所述的方法使得二硫键异构化。在所述方法中,将第一单特异性二价抗体(例如,抗-GPCR5D抗体)和第二单特异性二价抗体(例如,抗-CD3抗体)改造为在CH3结构域处具有促进异源二聚体稳定性的某些置换;将这些抗体在足以使铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下一起温育;从而通过Fab臂交换产生双特异性抗体。温育条件最佳可恢复到非还原条件。可使用的示例性还原剂为2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇,优选为选自2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦的还原剂。例如,可使用如下条件:在至少25mM 2-MEA的存在下或至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下,在5-8的pH例如pH7.0或pH7.4,至少20°C的温度下,温育至少90分钟。

[0218] 除所述GPCR5D×CD3多特异性抗体之外,还提供了能够编码所述GPCR5D×CD3多特

异性抗体的多核苷酸序列。还提供了包含所述多核苷酸的载体,以及表达本文提供的GPRC5D×CD3多特异性抗体的细胞。还描述了能够表达所公开的载体的细胞。这些细胞可为哺乳动物细胞(诸如293F细胞、CHO细胞)、昆虫细胞(诸如Sf7细胞)、酵母细胞、植物细胞或细菌细胞(诸如大肠杆菌)。所述抗体也可由杂交瘤细胞产生。

[0219] 治疗组合物和使用多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段进行治疗的方法

[0220] 上文所述的GPRC5D双特异性抗体,例如上文所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体可用于治疗中。具体地讲,GPRC5D双特异性抗体可用于治疗癌症。本文还提供了用于治疗哺乳动物中过度增殖性障碍的治疗组合物,该组合物包含治疗有效量的本文所述的多特异性抗体或多特异性抗原结合片段和药学上可接受的载体。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPRC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或其GPRC5D×CD3双特异性抗原结合片段。在一个实施方案中,所述药物组合物用于治疗GPRC5D表达型癌症,包括(但不限于)以下癌症:GPRC5D表达型B细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM);以及其中表达GPRC5D的其它尚待确定的癌症。可用于治疗癌症(诸如血液学癌症,包括上文所述的特定癌症)的特定双特异性抗体包括抗体GC5B81、GC5B465、GS5B483或GC5B596。

[0221] 本文提供的药物组合物包含:a)有效量的本发明的多特异性抗体或抗体片段,以及b)药学上可接受的载体,其可为惰性或生理活性载体。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPRC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或其GPRC5D×CD3双特异性抗原结合片段。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂等。合适的载体、稀释剂和/或赋形剂的示例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的任意组合中的一者或多者。在许多情况下,优选的是组合物中包含等渗剂,诸如糖、多元醇或氯化钠。具体地,合适的载体的相关示例包括:(1) pH为约7.4、含或不含约1mg/mL至25mg/mL人血清白蛋白的杜氏磷酸盐缓冲盐水,(2) 0.9%盐水(0.9%w/v氯化钠(NaCl)),以及(3) 5% (w/v)右旋糖;并且还还可含有抗氧化剂诸如色胺和稳定剂诸如Tween20[®]。

[0222] 本文的组合物还可含有对所治疗的特定障碍必需的另外治疗剂。优选的是,多特异性抗体或抗体片段和补充活性化合物将具有不会对彼此产生不利影响的互补活性。在一个优选的实施方案中,另外的治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐、或白介素2。在一个优选的实施方案中,另外的治疗剂为化学治疗剂。

[0223] 本发明的组合物可具有多种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,但优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。典型的优选组合物为可注射或可输注溶液的形式。优选的施用方式为肠胃外施用(例如静脉内施用、肌内施用、腹膜内施用、皮下施用)。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物通过推注静脉内施用或通过在规定时间内连续输注施用。在另一个优选的实施方案中,这些组合物通过肌内、皮下、关节内、滑膜内、肿瘤内、肿瘤周围、病灶内或病灶周围途径注射,以发挥局部以及全身治疗效果。

[0224] 用于肠胃外施用的无菌组合物可通过下列方式制备:将所需量的本发明的抗体、抗体片段或抗体缀合物掺入合适的溶剂中,然后通过微滤技术进行灭菌。可使用水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合作为溶剂或媒介物。在许多情况下,

优选的是组合物中包含等渗剂,诸如糖、多元醇或氯化钠。这些组合物还可含有辅助剂,尤其是润湿剂、等渗剂、乳化剂、分散剂和稳定剂。用于肠胃外施用的无菌组合物也可制备成无菌固体组合物的形式,其在使用时可溶解于无菌水或任何其它可注射的无菌介质中。

[0225] 多特异性抗体或抗体片段也可口服施用。作为用于口服施用的固体组合物,可使用片剂、丸剂、粉剂(明胶胶囊、小药囊)或颗粒剂。在这些组合物中,根据本发明的活性成分与一种或多种惰性稀释剂(诸如淀粉、纤维素、蔗糖、乳糖或二氧化硅)在氩气流下混合。这些组合物还可包含除稀释剂之外的物质,例如一种或多种润滑剂(诸如硬脂酸镁或滑石)、着色剂、包衣(糖衣片)或釉料。

[0226] 作为用于口服施用的液体组合物,可使用含有惰性稀释剂(诸如水、乙醇、甘油、植物油或石蜡油)的药学上可接受的溶液、混悬剂、乳剂、糖浆剂和酞剂。这些组合物可包含除稀释剂之外的物质,例如润湿、增甜、增稠、矫味或稳定产品。

[0227] 这些物质的剂量取决于期望的效应、治疗持续时间和所用的施用途径;对于成人来说,通常每日口服5mg和1000mg之间的这些物质,单位剂量在1mg至250mg活性物质范围内。一般来讲,医生将根据年龄、体重和待治疗的受治疗者特有的任何其它因素来确定合适的剂量。

[0228] 本文还提供了通过向对此需要的患者施用结合所述GPRC5D并能够募集T细胞来杀伤所述GPRC5D+细胞(即T细胞重定向)的多特异性抗体来杀伤GPRC5D+细胞的方法。本发明的多特异性抗体或抗体片段中的任一种可以治疗方式使用。例如,在一个实施方案中,GPRC5D×CD3多特异性抗体可以治疗方式用于治疗受治疗者的癌症。

[0229] 在一个优选的实施方案中,本发明的多特异性抗体或抗体片段用于治疗哺乳动物中的过度增殖性障碍。在一个更优选的实施方案中,含有本发明的多特异性抗体或抗体片段的上文所公开的药物组合物之一用于治疗哺乳动物中的过度增殖性障碍。在一个实施方案中,该障碍是癌症。具体地讲,所述癌症为GPRC5D表达型癌症,包括(但不限于)以下癌症:GPRC5D表达型B细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM);以及其中表达GPRC5D的其它尚待确定的癌症。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPRC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或其GPRC5D×CD3双特异性抗原结合片段。

[0230] 因此,本发明的药物组合物可用于治疗或预防多种癌症,这些癌症包括(但不限于)以下:GPRC5D表达型癌症,包括(但不限于)以下癌症:GPRC5D表达型B细胞/浆细胞癌症,诸如急性多发性骨髓瘤(MM)或癌变前骨髓瘤如MGUS(意义不明的单克隆丙球蛋白)和SMM(郁积型多发性骨髓瘤)以及浆细胞瘤;以及其中表达GPRC5D的其它尚待确定的癌症。

[0231] 类似地,本文还提供了用于抑制所选细胞群的生长方法,该方法包括在外周血单核细胞(PBMC)的存在下使GPRC5D表达型靶细胞或含有此类靶细胞的组织与有效量的本发明的多特异性抗体或抗体片段单独接触,或使GPRC5D表达型靶细胞或含有此类靶细胞的组织接触有效量的本发明的多特异性抗体或抗体片段与其它细胞毒性剂或治疗剂的组合。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPRC5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或其GPRC5D×CD3双特异性抗原结合片段。在一个优选的实施方案中,另外的治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐、或白介素2。在一个优选的实施方案中,另外的治疗剂为化学治疗剂。用于抑制

所选细胞群的生长的方法能够在体外、体内或离体执行。

[0232] 体外使用的示例包括在移植到同一患者中之前处理自体骨髓以杀伤患病细胞或恶性细胞;在移植之前处理骨髓以杀伤感受态T细胞并预防移植物抗宿主病(GVHD);处理细胞培养物以杀伤除不表达靶抗原的所需变体之外的所有细胞;或杀伤表达不期望抗原的变体。本领域的普通技术人员易于确定非临床体外使用的条件。

[0233] 临床离体使用的示例是在癌症治疗中在自体移植之前除去骨髓中的肿瘤细胞。处理可按照下列步骤进行。从患者或其它个体中采集骨髓,然后在含有向其中加入本发明的细胞毒性剂的血清的培养基中温育。浓度范围为约10 μ M至1 μ M,在约37 $^{\circ}$ C下温育约30分钟至约48小时。本领域的普通技术人员易于确定浓度和温育时间的确切条件,即剂量。温育后,用含有血清的培养基洗涤骨髓细胞,并且将这些骨髓细胞根据已知方法通过静脉内输注返回患者身上。在患者接受其它治疗(诸如在骨髓采集时间和处理过的细胞再输注时间之间的消融化疗或全身放疗的过程)的情况下,使用标准医疗设备将处理过的骨髓细胞冷冻保存在液氮中。

[0234] 对于临床体内使用,将治疗有效量的多特异性抗体或抗原结合片段施用于对其有需要的受治疗者。例如,GPRC5D \times CD3多特异性抗体及其多特异性抗原结合片段可用于治疗对其有需要的受治疗者中的GPRC5D表达型癌症。在一些实施方案中,GPRC5D表达型癌症为B细胞癌症,诸如多发性骨髓瘤(MM)。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPRC5D \times CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPRC5D \times CD3双特异性抗体或其GPRC5D \times CD3双特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,受治疗者是哺乳动物,优选是人。在一些实施方案中,多特异性抗体或抗原结合片段将以经测试其无菌性的溶液形式施用。

[0235] 调节上述治疗方法和用途中的剂量方案以提供最佳的期望响应(例如治疗响应)。例如,可施用单次推注,可随着时间推移施用若干分份剂量,或如由治疗情况的紧急指示可按比例减少或增加剂量。肠胃外组合物可配制成为易于施用且剂量一致的剂量单位形式。

[0236] 多特异性抗体和片段的有效剂量和剂量方案取决于待治疗的疾病或病症,并且可由本领域技术人员确定。本发明的化合物的治疗有效量的示例性、非限制性范围为约0.001-10mg/kg,诸如约0.001-5mg/kg(如约0.001-2mg/kg),诸如约0.001-1mg/kg(例如约0.001mg/kg、约0.01mg/kg、约0.1mg/kg、约1mg/kg或约10mg/kg)。

[0237] 本领域中具有普通技能的医师或兽医可容易地确定和开出所需药物组合物的有效量。例如,医师或兽医开始在药物组合物中采用的多特异性抗体或片段的剂量的水平可以低于为了达到期望的治疗效果所需的水平,然后逐渐增加剂量直至达到所需的效果。通常,本发明的双特异性抗体的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。施用方式可为例如肠胃外施用,诸如静脉内、肌内或皮下。在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可通过以mg/m²计算的每周剂量输注来施用。根据下式:剂量(mg/kg) \times 70:1.8,这样的剂量可例如基于以上提供的mg/kg剂量。这样的施用可重复如1至8次,诸如3至5次。可通过在2至24小时(诸如2至12小时)的时间段内连续输注进行施用。在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可通过长时间(诸如多于24小时)的缓慢连续输注来施用,以便减少毒副作用。

[0238] 在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可以作为固定剂量计算的每周剂量方式

施用多达八次,诸如当每周施用一次时为四至六次。这样的方案可根据需要例如在六个月或十二个月后重复一次或多次。这样的固定剂量可例如基于以上提供的mg/kg剂量,其中体重估计为70kg。可通过测量本发明的双特异性抗体在通过例如取出生物样品施用时在血液中的量并且使用靶向本发明的多特异性抗体的GPCR5D抗原结合区的抗独特型抗体来测定或调节剂量。

[0239] 在一个实施方案中,多特异性抗体或片段可通过维持疗法施用,诸如例如每周一次,持续六个月或更长时间。

[0240] 还可预防性地施用多特异性抗体或片段,以便降低罹患癌症的风险、延迟癌症进展中事件的发作和/或在癌症缓解后降低复发的风险。

[0241] 如本文所述的多特异性抗体及其片段还可以组合疗法施用,即与待治疗的疾病或病症相关的其它治疗剂组合。因此,在一个实施方案中,含抗体的药物用于与一种或多种另外的治疗剂(诸如化学治疗剂)组合。在一些实施方案中,其它治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐、或白介素2。此类组合施用可以任何顺序同时、分开或顺序进行。对于同时施用,这些治疗剂可作为一种组合物施用或作为单独的组合物施用,视情况而定。

[0242] 在一个实施方案中,提供了一种用于治疗受治疗者中涉及表达GPCR5D的细胞的障碍的方法,该方法包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的多特异性抗体或片段(诸如本文所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体)以及放射疗法。在一个实施方案中,提供了一种用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括向对其有需要的受治疗者施用治疗有效量的多特异性抗体或片段(诸如本文所述的GPCR5D×CD3抗体)以及放射疗法。放射疗法可包括辐射或向患者施用相关放射性药物。辐射源可在被治疗患者的外部或内部(辐射治疗可为例如体外放射治疗(EBRT)或短距离放射治疗(BT)的形式)。可用于实施此类方法的放射性元素包括例如镭、铯-137、铪-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-67、碘-123、碘-131和铟-111。

[0243] 试剂盒

[0244] 本文还提供了试剂盒,该试剂盒包括例如所述的多特异性抗体或其抗原结合片段以及使用所述抗体或片段杀伤特定类型细胞的说明书。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或其GPCR5D×CD3双特异性抗原结合片段。说明书可包括在体外、体内或离体使用多特异性抗体或其抗原结合片段的说明。

[0245] 通常,试剂盒将具有包含多特异性抗体或其抗原结合片段的隔室。多特异性抗体或其抗原结合片段可为冻干形式、液体形式或适于包括在试剂盒中的其它形式。试剂盒也可包括实施试剂盒中说明书上所述方法所需的其它元件,例如用于复原冻干粉末的无菌溶液、用于在施用于患者之前与多特异性抗体或其抗原结合片段组合的其它试剂以及有助于向患者施用多特异性抗体或其抗原结合片段的工具。

[0246] 诊断用途

[0247] 本文所述的多特异性抗体和片段也可用于诊断目的。因此,还提供了包含如本文定义的多特异性抗体或片段的诊断组合物及其用途。在优选的实施方案中,多特异性抗体为如本文所述的GPCR5D×CD3多特异性抗体或其多特异性抗原结合片段,更优选为如本文所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或其GPCR5D×CD3双特异性抗原结合片段。在一个实施方

案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,该试剂盒包括容纳双特异性GPCR5D×CD3抗体和用于检测抗体与GPCR5D的结合的一种或多种试剂的容器。试剂可包括例如荧光标签、酶标签或其它可检测标签。试剂还可包括用于酶反应的二级或三级抗体或试剂,其中酶反应生成能够可视化的产物。例如,本文所述的多特异性抗体或其抗原结合片段可用放射标记物、荧光标记物、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物、酶、钆、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和β-半乳糖苷酶,或者聚组氨酸或本领域已知的类似此类标记物进行标记。

[0248] 实施方案

[0249] 本文所提供的公开还提供了以下非限制性实施方案。

[0250] 1.一种特异性地结合至GPCR5D的分离抗体或其抗原结合片段,所述分离抗体或其抗原结合片段包含:

[0251] a.具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR1)、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链CDR3;

[0252] b.具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链CDR3;

[0253] c.具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链CDR3;

[0254] d.具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链CDR3;

[0255] e.具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的重链CDR3;

[0256] f.具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的重链CDR3;

[0257] g.具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的重链CDR3;

[0258] h.具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链CDR3;

[0259] i.具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的重链CDR3;

[0260] j.具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的重链CDR3;

[0261] k.具有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链CDR3;

[0262] 1.具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的重链CDR3;或

[0263] m.具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链CDR1、具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的重链CDR3。

[0264] 2.根据实施方案1所述的分离抗体或抗原结合片段,其中

[0265] a.包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:5的氨基

酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0266] b. 包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0267] c. 包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0268] d. 包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0269] e. 包含具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0270] f. 包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0271] g. 包含具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0272] h. 包含具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0273] i. 包含具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0274] j. 包含具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的轻链CDR3；

[0275] k. 包含具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的轻链CDR3;

[0276] 1. 包含具有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链CDR3;或

[0277] m. 包含具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的所述重链CDR1、具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的所述重链CDR2、以及具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的所述重链CDR3的所述抗体还包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链CDR2、以及具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0278] 3. 一种分离抗体或其抗原结合片段,所述分离抗体或其抗原结合片段特异性地结合至GPCR5D并且包含选自SEQ ID NO:52、53、54、55、82、83、84、85、86、87、88、89、或91的可变重(VH)链区。

[0279] 4. 根据实施方案3所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:56、57、58、92、93、或94的可变轻(VL)链区。

[0280] 5. 根据实施方案3所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:52、53、54、55、82、83、84、85、86、87、88、89、或91的VH区以及选自SEQ ID NO:56、57、58、92、93、或94的VL区。

[0281] 6. 根据实施方案5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO:56的VL链区配对的SEQ ID NO:52、53、或83。

[0282] 7. 根据实施方案5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO:57的VL链区配对的SEQ ID NO:54、84、85、86、或90。

[0283] 8. 根据实施方案5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO:58的VL链区配对的SEQ ID NO:55或88。

[0284] 9. 根据实施方案5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO:92的VL链区配对的SEQ ID NO:82或87。

[0285] 10. 根据实施方案5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO:93的VL链区配对的SEQ ID NO:89。

[0286] 11. 根据实施方案5所述的抗体,其中所述VH链区包含与包含SEQ ID NO:94的VL链区配对的SEQ ID NO:91。

[0287] 12. 根据实施方案1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合至具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的多肽。

[0288] 13. 根据实施方案1至12中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人抗体或抗原结合片段。

[0289] 14. 根据实施方案1至13中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是重组的。

[0290] 15. 根据实施方案1至14中任一项所述的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是

Fab片段、Fab2片段或单链抗体。

[0291] 16. 根据实施方案1至15中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0292] 17. 根据实施方案1至9中任一项所述的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段为IgG1或IgG4同种型。

[0293] 18. 根据实施方案17所述的抗体,其中所述IgG1在其Fc区中具有K409R置换。

[0294] 19. 根据实施方案17所述的抗体,其中所述IgG1在其Fc区中具有F405L置换。

[0295] 20. 根据实施方案20所述的抗体,其中所述IgG4在其Fc区中具有F405L置换和R409K置换。

[0296] 21. 根据实施方案16所述的抗体,所述抗体还在其Fc区中包含S228P置换、L234A置换和L235A置换。

[0297] 22. 根据实施方案1至14中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合人GPCR5D并与食蟹猴GPCR5D交叉反应。

[0298] 23. 根据实施方案17中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以小于约28nM的EC₅₀体外诱导ADCC。

[0299] 24. 一种分离细胞,所述细胞表达根据实施方案1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

[0300] 25. 根据实施方案24所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。

[0301] 26. 根据实施方案24所述的细胞,其中所述抗体是重组产生的。

[0302] 27. 一种分离GPCR5D×CD3双特异性抗体或其GPCR5D×CD3双特异性结合片段,所述分离GPCR5D×CD3双特异性抗体或其GPCR5D×CD3双特异性结合片段包含:

[0303] a) 第一重链(HC1);

[0304] b) 第二重链(HC2);

[0305] c) 第一轻链(LC1);以及

[0306] d) 第二轻链(LC2),

[0307] 其中所述HC1和所述LC1配对形成特异性地结合CD3的第一抗原结合位点,并且所述HC2和所述LC2配对形成特异性地结合GPCR5D的第二抗原结合位点。

[0308] 28. 根据实施方案27所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC1包含SEQ ID NO:25并且LC1包含SEQ ID NO:26。

[0309] 29. 根据实施方案28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:52并且LC2包含SEQ ID NO:56。

[0310] 30. 根据实施方案28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:53并且LC2包含SEQ ID NO:56。

[0311] 31. 根据实施方案28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:54并且LC2包含SEQ ID NO:57。

[0312] 32. 根据实施方案28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:55并且LC2包含SEQ ID NO:58。

[0313] 33. 根据实施方案28所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:82并且LC2包含SEQ ID NO:92。

- [0314] 34. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:83并且LC2包含SEQ ID NO:56。
- [0315] 35. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:84并且LC2包含SEQ ID NO:57。
- [0316] 36. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:85并且LC2包含SEQ ID NO:57。
- [0317] 37. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:86并且LC2包含SEQ ID NO:57。
- [0318] 38. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:87并且LC2包含SEQ ID NO:92。
- [0319] 39. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:88并且LC2包含SEQ ID NO:58。
- [0320] 40. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:89并且LC2包含SEQ ID NO:93。
- [0321] 41. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:91并且LC2包含SEQ ID NO:94。
- [0322] 42. 根据实施方案28所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中HC2包含SEQ ID NO:85并且LC2包含SEQ ID NO:57。
- [0323] 43. 根据实施方案27至42中任一项所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段为IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4同种型。
- [0324] 44. 根据实施方案43所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段为IgG4同种型。
- [0325] 45. 根据实施方案27至42所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或其双特异性结合片段结合人骨髓瘤细胞的表面上的GPRC5D。
- [0326] 46. 根据实施方案27至42所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或其双特异性结合片段结合人多发性骨髓瘤细胞的表面上的GPRC5D。
- [0327] 47. 根据实施方案27至42所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段以小于约0.22nM的 EC_{50} 诱导人T细胞体外活化。
- [0328] 48. 根据实施方案27至42所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段,其中所述抗体或双特异性结合片段以小于约0.89nM的 EC_{50} 诱导GPRC5D表达型细胞在体外的T细胞依赖性细胞毒性。
- [0329] 49. 一种分离细胞,所述分离细胞表达根据实施方案27至42中任一项所述的抗体或双特异性结合片段。
- [0330] 50. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述细胞是杂交瘤。
- [0331] 51. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述抗体或双特异性结合片段是重组产生的。
- [0332] 52. 一种用于治疗患有癌症的受治疗者的方法,所述方法包括:
- [0333] 向其有需要的患者施用治疗有效量的根据实施方案27至42中任一项所述的GPRC5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段足以治疗所述癌症的时间。

- [0334] 53.一种用于抑制癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括:
- [0335] 施用治疗有效量的根据实施方案27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以抑制癌细胞的生长或增殖。
- [0336] 54.一种使T细胞重定向GPCR5D表达型癌细胞的方法,所述方法包括:
- [0337] 施用治疗有效量的根据实施方案27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以使T细胞重定向癌症。
- [0338] 55.根据实施方案52、53或54所述的方法,其中所述癌症为血液学癌症。
- [0339] 56.根据实施方案55所述的方法,其中所述血液学癌症为GPCR5D表达型B细胞癌症。
- [0340] 57.根据实施方案56所述的方法,其中所述GPCR5D表达型B细胞癌症为多发性骨髓瘤。
- [0341] 58.根据实施方案52所述的方法,所述方法包括施用第二治疗剂。
- [0342] 59.根据实施方案58所述的方法,其中所述第二治疗剂为化学治疗剂或靶向抗癌疗法。
- [0343] 60.根据实施方案59所述的方法,其中所述化学治疗剂为阿糖胞苷、蒽环霉素、组胺二盐酸盐、或白介素2。
- [0344] 61.根据实施方案59所述的方法,其中所述第二治疗剂与所述双特异性抗体同时、顺序或分开施用于所述受治疗者。
- [0345] 62.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据实施方案27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段以及药学上可接受的载体。
- [0346] 63.一种方法,所述方法用于通过培养根据实施方案49至51中任一项所述的细胞来生成根据实施方案27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段。
- [0347] 64.一种分离合成多核苷酸,所述分离多核苷酸编码根据实施方案27至42中任一项所述的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段的HC1、HC2、LC1或LC2。
- [0348] 65.一种试剂盒,所述试剂盒包括如根据实施方案27至42中任一项所定义的GPCR5D×CD3双特异性抗体或双特异性结合片段和/或如根据实施方案63所定义的多核苷酸及其包装。

[0349] 实施例

[0350] 提供了以下实施例以补充现有公开并提供对本文所述主题的更好理解。不应将这些实施例视为限制所描述的主题。而应当理解,本文所述的实施例和实施方案只是为了进行示意性的说明,根据其的各种变型或改变对于本领域技术人员将是显而易见的并且包括在本发明真实范围内,并可在不脱离本发明真实范围的情况下进行各种变型或改变。

[0351] 实施例1:抗原

[0352] 由于难以产生重组的GPCR5D抗原,使用标准方法产生显示GPCR5D[人(SEQ ID NO:22)、cyno(SEQ ID NO:23)和小鼠(SEQ ID NO:24)]的转染细胞系,以用作全细胞抗原用于抗体产生和表征研究(表4)。

[0353] 表4:GPCR5D表达型细胞系

[0354]	蛋白质	细胞系	启动子	抗性
--------	-----	-----	-----	----

人GPRC5D	HEK293T	CMV	新霉素
Cyno GPRC5D	HEK293F	CMV	杀稻瘟菌素

[0355] 实施例2:利用噬菌体展示产生GPRC5D抗体

[0356] 采取两种不同的方法,通过噬菌体产生GPRC5D抗体:标准细胞淘选(负选择)和FACS细胞噬菌体淘选(竞争选择)。

[0357] 标准细胞噬菌体淘选(负选择):

[0358] 内部新创噬菌体库(In-house de novo)详述于(Shi等人(2010)J.Mol.Biol.397:385-396;国际专利公布W009/085462中所述。这些库以三个人VH胚系基因(IGHV1-69、3-23、5-51)和四个人VL胚系基因(A27、B3、L6、O12)为基础构建,被设计成具有较高的CDR-H3多样性。使噬菌体外壳蛋白pIX上显示Fab变体的三种新创噬菌体库(DNP00004-169HC/LC混合物,DNP00005-323HC/LC混合物和DNP00006-551HC/LC混合物)针对GPRC5D-表达型HEK293G5稳定细胞(靶细胞)淘选第1、3、5轮,并且对于第2和4轮,将前一轮扩增的Fab-pIX噬菌体施加于HEK293背景细胞(负选择)(参见表5)。将结合靶细胞的第1轮新创Fab-pIX噬菌体回收以扩增过夜。对于第2轮,将所选的第1轮噬菌体施加于背景细胞,此处回收未结合的Fab-pIX噬菌体以使负选择的噬菌体扩增过夜。实施另一组阳性和阴性轮次淘选——第3轮和第4轮。实施最终一轮,将上一轮负选择的扩增噬菌体分成两个淘选样本,一个用于靶细胞且一个用于背景细胞淘选。

[0359] 表5:标准细胞噬菌体淘选流程图-负选择

淘选轮次	用作抗原的细胞
1	人 GPRC5D HEK293
2	HEK293
3	人 GPRC5D HEK293
4	HEK293
5 (分离)	人 GPRC5D HEK293 HEK293

[0362] 标准细胞噬菌体淘选(背景选择):

[0363] 依据如此前所提及的标准细胞淘选过程所实施的类似环境和温育时间,将Fab-pIX噬菌体展示文库加入HEK293细胞(表6)。在三轮之后,对应于HEK293结合的Fab-pIX噬菌体的DNA用于产生PCR扩增子以进行NGS。这些NGS结果将用于NGS2.0软件内的附加动态消减分析,以助于辨别可能的靶特异性Fab候选。

[0364] 表6:标准细胞噬菌体淘选流程图-背景选择

淘选轮次	用作抗原的细胞
1	HEK293
2	HEK293
3	HEK293

[0366] FACS细胞噬菌体淘选(竞争选择)

[0367] 通过将Fab-pIX噬菌体同时施加于靶细胞和背景细胞的混合物进行三轮淘选(表7)。对于第1和第2轮,通过使用GFP信号来分选Fab-pIX噬菌体结合的靶细胞。为了从分选的细胞捕获结合的Fab-pIX噬菌体,应用酸性细胞裂解,之后进行大肠杆菌感染。在最终轮中,

将第2轮扩增的Fab-pIX噬菌体和细胞混合物分选成GFP靶细胞门化和非GFP背景细胞门化的两个群体。通过酸裂解和大肠杆菌感染来捕集两种细胞群结合的Fab-pIX噬菌体。

[0368] 表7:FACS细胞噬菌体淘选流程表-竞争选择

[0369]	淘选轮	用作抗原的细胞
	1	人GPCR5D_GFP&HEK293
	2	人GPCR5D_GFP&HEK293
	3	人GPCR5D_GFP&HEK293

[0370] 噬菌体淘选的新一代测序(NGS)

[0371] 使最后一轮淘选的两个样品在葡萄糖抑制下生长过夜。这些培养物用于制备小量制备的DNA (Qiagen QIAspin DNA试剂盒)。将两个DNA样品用作PCR模板,生成从HCDR1到HCDR3测量的扩增子。对六种扩增子进行凝胶纯化,并且通过保持2.1、3.0型式分开而对于标准细胞淘选汇集并对于FACS细胞淘选完全汇集。将这些汇集的经凝胶纯化扩增子提供给Genewiz NGS服务以通过MiSeq 1x300技术处理。文件经Genewiz传送并上传到本地服务器(nas2.0)。在该服务器内,使用NGS2.0软件应用程序加载、读取和分析序列文件。根据拷贝数(>50)以及靶细胞(+)与背景细胞(-)序列的比率(比率>5:1)的排名前88个序列被选择用于IgG转化。因为仅可变重链序列由NGS测定,全重链构建体必须以电子方式构建成适当的框架。此外,因为仅重链序列是已知的,使各候选与四种亲本轻链(A27,B3,L6,012)配对。候选最终转化为人IgG4PAA。

[0372] ELISA筛选和标准测序

[0373] 由用于NGS的相同DNA制备物进行限制性酶消化和自身连接,以切除基因pIX使得可溶性Fab表达。通过ELISA对三个淘选样品各自挑选的九十二个克隆评估Fab表达,并且通过桑格方法测序来测定重链和轻链。将LCDR内具有多样化序列的最终候选克隆进哺乳动物表达质粒中。

[0374] 实施例4:通过噬菌体展示技术获得的GPCR5D抗体的初始表征

[0375] GPCR5D结合:

[0376] 如上所述,使用人GPCR5D细胞作为抗原完成全细胞噬菌体淘选。根据NGS分析,仅各个候选的重链序列是已知的。因此,各重链必须与4种亲本轻链(A27,B3,L6,012)配对,从而由用NGS鉴定的87个Hc序列产生348种mAb。使用FACS,初始评价这些mAb与cyno GPCR5D的结合。cyno GPCR5D细胞系被选择用于初始筛选以使潜在结合信号最大化,原因是cyno GPCR5D细胞系具有比人GPCR5D细胞系更高的表达水平。简而言之,FACS筛选通过使蛋白质浓度归一化为1ug/mL来进行,并且将100ul的蛋白质与每孔200,000个细胞混合。使mAb与细胞在4℃温育下1小时。然后用PBS和0.2%FBS将细胞洗涤三次。随后,加入缀合有PE的抗人第二mAb(Jackson目录号709-116-149)作为检测剂。使细胞与第二抗体在4℃温育下1小时。然后用PBS和0.2%FBS将细胞洗涤三次。将细胞用PBS和0.2%FBS再次洗涤并随后在FACSSarry上进行分析。

[0377] 观察到大量结合cyno GPCR5D的命中,包括MFI大于100,000的15种mAb,MFI小于100,000但大于10,000的23种mAb,以及MFI小于10,000但大于1000的63种mAb(表8)。

[0378] 表8:源于NGS的mAb与cyno GPCR5D的FACS结合数据使由NGS分析所鉴定的重链序列与如所示的各亲本Lc进行配对。将GC5M29用作对照(PH9L3轻链)。突出显示的mAb的MFI>

1000。

Hc ID	GPRC5D mAb [PH9L1 (A27)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L2 (B3)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L3 (L6)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L4 (O12)]	MFI
GC5H18	GC5B22	198	GC5B23	230	GC5B24	246	GC5B25	31324
GC5H17	GC5B66	242	GC5B67	272	GC5B68	2682	GC5B69	17416
GC5H20	GC5B114	199	GC5B115	266	GC5B116	253	GC5B117	5037
GC5H15	GC5B158	14407	GC5B159	139766	GC5B160	84111	GC5B161	7856
GC5H13	GC5B202	89948	GC5B203	9173	GC5B204	15203	GC5MB205	52663
GC5H23	GC5B242	242	GC5B243	116641	GC5B244	249	GC5B245	469
GC5H14	GC5B282	487	GC5B283	341	GC5B284	249	GC5B285	87116
GC5H22	GC5B326	195	GC5B237	265	GC5B328	248	GC5B329	292
GC5H24	GC5B26	194	GC5B27	265	GC5B28	229	GC5B29	590
GC5H19	GC5B70	214	GC5B71	229	GC5B72	2013	GC5B73	3827
GC5H33	GC5B118	178	GC5B119	222	GC5B120	880	GC5B121	43924
GC5H36	GC5B162	86773	GC5B163	21970	GC5B164	122043	GC5B165	1870
GC5H31	GC5B206	467	GC5B207	3636	GC5B208	481	GC5B209	1409
GC5H29	GC5B246	202	GC5B247	3037	GC5B248	2835	GC5B249	1373
GC5H34	GC5B286	239	GC5B287	163990	GC5B288	259	GC5B289	271
GC5H35	GC5B330	202	GC5B331	552	GC5B332	191978	GC5B333	1591
GC5H26	GC5B30	204	GC5B31	230	GC5B32	16553	GC5B33	270
[0379] GC5H27	GC5B74	238	GC5B75	365	GC5B76	829	GC5B77	317
GC5H25	GC5B122	153	GC5B123	237	GC5B124	6026	GC5B125	6197
GC5H30	GC5B166	1510	GC5B167	6266	GC5B168	32482	GC5B169	327
GC5H47	GC5B210	1730	GC5B211	284	GC5B212	278	GC5B213	727
GC5H42	GC5B250	3969	GC5B251	213233	GC5B252	63295	GC5B253	574
GC5H37	GC5B290	8839	GC5B291	201024	GC5B292	110940	GC5B293	305
GC5H45	GC5B334	160	GC5B335	1434	GC5B336	3228	GC5B337	309
GC5H38	GC5B34	157	GC5B35	283	GC5B36	14936	GC5B37	297
GC5H40	GC5B78	162	GC5B79	309	GC5B80	428	GC5B81	74140
GC5H43	GC5B126	157	GC5B127	265	GC5B128	268	GC5B129	1283
GC5H49	GC5B170	1014	GC5B171	51995	GC5B172	1434	GC5B173	332
GC5H62	GC5B214	2565	GC5B215	274	GC5B216	263	GC5B217	1589
GC5H60	GC5B254	161	GC5B255	5788	GC5B256	460	GC5B257	308
GC5H94	GC5B294	190	GC5B295	2312	GC5B296	745	GC5B298	261
GC5H69	GC5B338	188	GC5B339	260	GC5B340	1798	GC5B341	290
GC5H85	GC5B38	10809	GC5B39	1112	GC5B40	110654	GC5B41	4379
GC5H96	GC5B82	165	GC5B83	272	GC5B84	1547	GC5B85	3563
GC5H97	GC5B130	174	GC5B131	293	GC5B132	306	GC5B133	343
GC5H76	GC5B174	219	GC5B175	3631	GC5B176	244	GC5B177	324
GC5H68	GC5B218	21420	GC5B219	310	GC5B220	777	GC5B221	762
GC5H79	GC5B256	714	GC5B257	1146	GC5B258	456	GC5B259	1129
GC5H71	GC5B298	185	GC5B299	1370	GC5B300	260	GC5B301	292

GC5H93	GC5B342	164	GC5B343	247	GC5B344	401	GC5B345	283
GC5H21	GC5B42	219	GC5B43	307	GC5B44	2694	GC5B45	1022
GC5H39	GC5B86	192	GC5B87	344	GC5B88	470	GC5B89	41027
GC5H50	GC5B134	764	GC5B135	340	GC5B136	600	GC5B137	2087
GC5H28	GC5B178	750	GC5B179	6708	GC5B180	1005	GC5B181	535
GC5H53	GC5B222	284	GC5B223	264	GC5B224	228	GC5B225	605
GC5H51	GC5B262	159	GC5B263	1013	GC5B267	238	GC5B268	309
GC5H64	GC5B302	184	GC5B303	329	GC5B304	240	GC5B305	1571
GC5H16	GC5B346	182	GC5B347	259	GC5B348	332	GC5B349	552
GC5H65	GC5B46	204	GC5B47	327	GC5B48	1320	GC5B49	392
GC5H32	GC5B90	335	GC5B91	340	GC5B92	1848	GC5B93	1780
GC5H54	GC5B138	193	GC5B139	354	GC5B140	323	GC5B141	292
GC5H99	GC5B182	196	GC5B183	6421	GC5B184	309	GC5B185	280
GC5H52	GC5B226	204	GC5B227	298	GC5B228	247	GC5B229	263
GC5H48	GC5B266	268	GC5B267	2160	GC5B268	235	GC5B269	281
GC5H44	GC5B306	204	GC5B307	313	GC5B308	302	GC5B309	621
GC5H46	GC5B350	198	GC5B351	287	GC5B352	4300	GC5B353	1708
GC5H56	GC5B50	229	GC5B51	36679	GC5B52	386	GC5B53	446
GC5H55	GC5B94	255	GC5B95	609	GC5B96	411	GC5B97	350
GC5H98	GC5B142	194	GC5B143	407	GC5B144	284	GC5B145	483
GC5H61	GC5B186	543	GC5B187	1132	GC5B188	376	GC5B189	333
GC5H92	GC5B320	297	GC5B321	294	GC5B322	280	GC5B323	386
GC5H5	GC5B17	243	GC5B18	301	GC5B19	1048	GC5B20	384
GC5H59	GC5B98	272	GC5B99	388	GC5B100	661	GC5B101	528
[0380] GC5H66	GC5B354	223	GC5B355	852	GC5B356	374	GC5B357	500
GC5H80	GC5B54	299	GC5B55	415	GC5B56	422	GC5B57	487
GC5H87	GC5B102	383	GC5B103	460	GC5B104	3130	GC5B105	456
GC5H67	GC5B146	325	GC5B147	370	GC5B148	383	GC5B149	487
GC5H73	GC5B190	236	GC5B191	2556	GC5B192	409	GC5B193	387
GC5H86	GC5B230	17885	GC5B231	543	GC5B232	494	GC5B233	620
GC5H70	GC5B270	390	GC5B271	660	GC5B272	389	GC5B273	450
GC5H90	GC5B314	219	GC5B315	334	GC5B316	363	GC5B317	403
GC5H95	GC5B358	211	GC5B359	344	GC5B360	414	GC5B361	449
GC5H74	GC5B58	294	GC5B59	448	GC5B60	477	GC5B61	548
GC5H78	GC5B106	267	GC5B107	440	GC5B108	474	GC5B109	497
GC5H77	GC5B150	312	GC5B151	452	GC5B152	412	GC5B153	709
GC5H91	GC5B194	296	GC5B195	448	GC5B196	491	GC5B197	483
GC5H57	GC5B234	128355	GC5B235	195348	GC5B236	134008	GC5B237	11255
GC5H41	GC5B274	313	GC5B275	7431	GC5B278	435	GC5B279	542
GC5H58	GC5B318	2608	GC5B319	5791	GC5B320	49616	GC5B321	4823
GC5H63	GC5B362	313	GC5B363	392	GC5B364	461	GC5B365	3613
GC5H72	GC5B62	326	GC5B63	463	GC5B64	485	GC5B65	694
GC5H75	GC5B110	208487	GC5B111	692	GC5B112	140269	GC5B113	104136
GC5H81	GC5B154	351	GC5B155	412	GC5B156	440	GC5B157	555
GC5H82	GC5B198	285	GC5B199	593	GC5B200	499	GC5B201	485
GC5H83	GC5B238	3698	GC5B239	4370	GC5B240	4676	GC5B241	825
GC5H88	GC5B278	3659	GC5B279	481	GC5B280	425	GC5B281	633
GC5H89	GC5B332	299	GC5B333	561	GC5B334	4467	GC5B335	494
GC5H84	GC5B366	544	GC5B367	474	GC5B368	6313	GC5B369	26116

[0381] 选择结合亲和力最高的40种mAb进行附加表征,所述表征包括:重复进行对cyno GPCR5D细胞的结合研究,以及使用FACS评估与人GPCR5D表达型细胞的结合(表9)。分析这些数据,选择出17种mAb进行纯化和产生GPCR5D×CD3双特异性抗体(突出显示)。用于选择mAb进行纯化和产生GPCR5D×CD3双特异性抗体的因素包括结合人GPCR5D的特异性、对cyno GPCR5D的交叉反应性以及Hc序列多样性。例如,使GC5H36与三种不同的轻链配对并分析结合(GC5B162、GC5B163、GC5B164)。仅GC5B164较为先进,原因是观察到相比于GC5B162或GC5B163,该mAb对人GPCR5D的MFI更高。

[0382] 表9:源于NGS的mAb与cyno GPCR5D和人GPCR5D表达型HEK293F细胞的FACS结合数

据未转染的HEK293F细胞用于评价对GPCRC5D的结合特异性。TF7M1636用作同种型对照。突出显示的mAb被选择用于进一步分析。

蛋白 ID	HC 肽 ID	cyno GPRC5D MFI	人 GPRC5D MFI	293F MFI
GC5B38	GC5H85	6,864	280	215
GC5B110	GC5H75	142,277	2,543	235
GC5B158	GC5H15	4,923	285	235
GC5B162	GC5H36	75,139	2,981	230
GC5B202	GC5H13	30,470	2,152	256
GC5B218	GC5H68	10,451	277	263
GC5B230	GC5H86	19,103	364	290
GC5B234	GC5H57	134,258	1,657	261
GC5B51	GC5H56	22,661	667	480
GC5B159	GC5H15	129,370	1,987	258
GC5B163	GC5H36	7,605	840	310
GC5B171	GC5H49	24,133	1,144	1,321
[0383] GC5B235	GC5H57	158,011	2,643	254
GC5B243	GC5H23	67,848	20,458	221
GC5B251	GC5H42	74,510	11,418	235
GC5B281	GC5H34	109,418	5,317	570
GC5B291	GC5H37	77,798	10,427	880
GC5B32	GC5H26	3,597	14,656	358
GC5B36	GC5H38	5,353	2,002	352
GC5B40	GC5H85	67,279	4,510	310
GC5B112	GC5H75	104,875	470	433
GC5B160	GC5H15	40,881	635	276
GC5B164	GC5H36	78,672	12,664	343
GC5B168	GC5H30	41,779	28,885	1,238
GC5B204	GC5H13	5,090	390	212
GC5B236	GC5H57	78,546	1,442	192
GC5B252	GC5H42	22,010	1,498	204
GC5B292	GC5H37	63,366	1,872	480
GC5B320	GC5H58	63,345	22,891	231
GC5B332	GC5H35	106,515	13,348	253
GC5B25	GC5H18	22,079	705	431
GC5B69	GC5H17	1,593	851	284
GC5B81	GC5H40	62,756	9,986	288
GC5B89	GC5H39	31,613	1,068	251
GC5B113	GC5H75	66,475	550	323
[0384] GC5B121	GC5H33	35,493	3,061	299
GC5B205	GC5H13	63,610	25,199	260
GC5B237	GC5H57	2,579	267	248
GC5B285	GC5H14	81,405	19,870	225
GC5B369	GC5H84	16,241	559	252
	TF7M1636	956	2,621	1,538
	人第二	209	316	228
	抗 hGPCRC5D	9,001	379	70
	小鼠抗同种型	60	82	65
	未染色	44	50	33

[0385] 各个所选的mAb对人GPCRC5D表达型HEK293细胞和未转染的HEK293细胞的浓度依赖

性结合特征使用FACS进行测定(图1)。观察到所有mAb以剂量依赖性方式结合人GPCR5D。三种mAb即GC5B36、GC5B168和GC5B205也被观察到结合未转染的(GPCR5D空白)HEK293细胞,并且由于与细胞的该非特异性相互作用而不优先考虑。

[0386] 剩余的14种mAb被选择用于产生具有抗CD3臂CD3B219和抗RSV空白臂B23M46的双特异性抗体(表10)。

[0387] 表10:GPCR5D mAb ID与双特异性ID之间的关系

	GPCR5D mAb 蛋白 ID	×CD3 双特异性 ID	×B23 空白 双特异性 ID
	GC5B320	GCDB44	GCDB30
	GC5B243	GCDB40	GCDB26
	GC5B285	GCDB43	GCDB29
[0388]	GC5B332	GCDB45	GCDB31
	GC5B164	GCDB35	GCDB21
	GC5B251	GCDB41	GCDB27
	GC5B81	GCDB32	GCDB18
	GC5B235	GCDB38	GCDB24
	GC5B110	GCDB34	GCDB20
	GC5B202	GCDB36	GCDB22
	GC5B234	GCDB37	GCDB23
[0389]	GC5B252	GCDB42	GCDB28
	GC5B236	GCDB39	GCDB25
	GC5B89	GCDB33	GCDB19

[0390] 一种双特异性抗体GCDB38在重组期间沉淀,并且另一种GCDB36包含>10%的聚集体。所有其它双特异性抗体均通过标准释放判据,并且分析空白臂双特异性抗体对人GPCR5D表达型HEK293细胞的浓度依赖性结合(图2)。

[0391] 观察到所有双特异性抗体均以剂量依赖性方式结合。为了理解二价mAb与单价双特异性抗体之间的结合差异,GC5B320作为结合比较物包括在内。为了理解抗CD3双特异性抗体与抗RSV空白臂mAb之间的结合差异,GCDB44作为结合比较物包括在内。当比较mAb GC5B320与双特异性抗体GCDB30和GCDB44时,观察到表观结合亲和力预期的减小。此外,观察到相比于GCDB30(抗RSV空白臂双特异性Ab),GCDB44(抗CD3双特异性Ab)对抗人GPCR5D细胞的结合亲和力稍微较高,这表明抗CD3臂积极地影响与该细胞系的结合。

[0392] 还概要分析了双特异性抗体组针对内源性表达GPCR5D的MM1R和H929细胞的结合(图3)。利用FACS,将双特异性抗体对MM1R和H929细胞的结合特征与过表达的人GPCR5D HEK293细胞和未转染的HEK293细胞进行比较。观察到双特异性抗体以一定范围的亲和力结合内源地表达于MM1R和H929细胞的GPCR5D。观察到对人GPCR5D HEK细胞的结合最高,该细胞作为过表达的稳定细胞系具有比MM1R或H929细胞高得多的受体密度。GCDB37、GCDB38、GCDB39和GCDB41不太有利,因为观察到对H929和MM1R细胞的结合亲和力较低。

[0393] 体外T-细胞依赖性细胞毒性

[0394] 然后使用H929和MM1R靶细胞,概要分析双特异性抗体组在T-细胞介导的细胞毒性测定中的效力(图4A和B,表11)。简而言之,对靶细胞(H929,MM1.R,OPM2,LP-1和Daudi或HEK

亲本和HEK+GPRC5D细胞)进行计数,将1千万个细胞以1350rpm离心3分钟并使细胞沉淀重悬于1mL的经稀释CFSE溶液(CellTrace CFSE增殖染色剂重构于18 μ L的无菌DMSO中,并将1 μ L的溶液用10mL的无菌PBS稀释)中并且在室温下于暗处温育8分钟。温育后,将1mL的HIFBS加入细胞悬浮液中以淬灭多余的CFSE。将细胞在含有10%FBS的RPMI-1640中洗涤两次。在10mL的RPMI中复原后,对细胞进行计数并将细胞活力记录在电子表格中。将细胞稀释至 2.2×10^5 /mL并在37 $^{\circ}$ C下温育直至使用。

[0395] 使得自正常供体的泛T细胞在37 $^{\circ}$ C水浴中解冻,然后将细胞以1350rpm于4 $^{\circ}$ C离心3分钟。弃去上清液并以 1.1×10^6 /mL浓度重构于培养基中。将 2×10^5 个靶细胞加入96孔U形底板的孔中,然后加入Fc阻断剂(至最终浓度为2mg/mL)。将所有细胞系在室温下温育10分钟以阻断Fc受体活性。向孔中加入 1×10^5 个T细胞(5:1的效应子:靶比率)。在混合靶细胞和T细胞后,将20 μ L的GPRC5D \times CD3双特异性抗体稀释液加入每个孔中。将GPRC5D \times CD3双特异性抗体用PBS稀释至800 μ g/mL(10 \times)。在96孔U形底板中用PBS中的4倍系列稀释度制备滴定液。最后一列留为单独的PBS(载体对照)。将平板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育48小时。

[0396] 两天之后(48小时),使平板离心并将100 μ L的上清液于-80 $^{\circ}$ C储存以供细胞因子释放测定。将细胞在200 μ L的PBS中洗涤并在室温下在50 μ L的近红外Live/Dead染色剂(1:200稀释度)和抗-CD25 PE抗体(1:50稀释度)中温育20分钟。然后,将细胞在200 μ L的FACS缓冲液中洗涤一次,最后在150 μ L的FACS缓冲液中复原。使用FACSCanto II和FlowJo 7.6分析细胞的靶细胞毒性(靶%) and T细胞活化CD25+(活T细胞%)。使用具有可变斜率(四个参数)函数的非线性回归并使用最小二乘法在GraphPad Prism 6中完成数据的作图和拟合。

[0397] 表11:使用H929和MM1R靶细胞对GPRC5D \times CD3双特异性抗体的T-细胞介导的细胞毒性评估所计算的平均EC₅₀。

GPRC5D \times CD3 EC ₅₀ (nM)			
双特异性 ID	H929 (n= 5)	MM1R (n= 3)	等级 (平均值) H929/MM1R
[0398] GCDB32	0.39 \pm 0.3	0.12 \pm 0.1	2/1
GCDB33	4.29 \pm 1.28	0.8 \pm 0.18	7/6
GCDB34	2.13 \pm 0.93	0.77 \pm 0.24	5/5
GCDB35	1.39 \pm 0.84	0.74 \pm 0.32	4/4
GCDB36	5.2 \pm 0.93	4.22 \pm 0.55	8/9
GCDB40	1.2 \pm 0.92	0.52 \pm 0.38	3/3
[0399] GCDB41	NA	2.58 \pm 0.15	10/8
GCDB43	0.36 \pm 0.41	0.21 \pm 0.29	1/2
GCDB44	10.29 \pm 2.65	4.41 \pm 0.29	9/10
GCDB45	2.25 \pm 1	0.91 \pm 0.93	6/7

[0400] 所有双特异性抗体在T-细胞介导的H929细胞杀伤中呈活性,并且观察到一定范围的效力(表11)。对于两种细胞系观察到类似的等级次序。然而,在MM1R细胞中观察到较低的EC₅₀。令人感兴趣地,结合亲和力不一定与T-细胞介导的细胞毒性测定中的效力相关。例如,GCDB44以最高亲和力结合双特异性抗体,但在细胞毒性测定中效力却最低。而具有类似(尽管略微较低)结合亲和力的GCDB43在细胞毒性测定中的效力最强。

[0401] 为了评估与cyno GPRC5D的功能交叉反应性,然后使用cyno GPRC5D HEK293细胞

概要分析双特异性抗体组的T-细胞介导的细胞毒性和T细胞活化(图5A和B)。所有双特异性抗体在该测定中均呈活性,但观察到针对cyno GPRC5D+表达型细胞的一定范围的效力。

[0402] 体内功效

[0403] 为了解这些GPRC5D×CD3双特异性抗体的体内效力,然后完成体内研究的基准化分析。选择GCDB32和GCDB35(图5A&B)在H929预防肿瘤模型中进行测试。在注射人PBMC后一周,将H929细胞植入NSG小鼠中。在植入H929细胞的同时开始双特异性抗体处理,并且每隔2天或3天(q2d或q3d)以10ug、1ug和0.1ug/动物剂量持续处理,共五次处理。每组中使用十只小鼠,并且PBS作为载体对照包括在内。在第11天停止处理,并且在第25天(图6A和B)或第26天(图12A-D)终止研究。除GCDB35示出在1ug/动物剂量下约80%的抑制肿瘤生长之外,该预防模型中测试的所有GPRC5D×CD3抗体均示出在10ug和1ug/动物剂量下100%的抑制肿瘤生长。在低十倍的剂量(0.1ug/动物)下,这些双特异性抗体示出10%至80%肿瘤生长抑制范围内的不同程度的功效。

[0404] Fc阻断剂存在下体外T-细胞依赖性细胞毒性

[0405] 为了获得对GPRC5D靶向臂特异性的理解,然后在Fc阻断剂存在下,在T-细胞重定向细胞毒性测定中评估GPRC5D×CD3双特异性抗体组。该实验对理解如双特异性抗体对靶细胞的特异性是体外测定中表达Fc γ 受体的B-细胞与双特异性抗体的Fc部分相互作用的能力很关键。在T-细胞介导的细胞毒性测定中观察到多个双特异性抗体的效力偏移,并且观察到GCDB40和GCDB34的偏移最大(图7A-7B)。

[0406] 然后,完成四种最有效的双特异性抗体(GCDB32、GCDB35、GCDB40和GCDB43)与Fc γ 受体之间的结合相互作用的直接测量(图8A-8D)。对各Fc γ 受体和以上所列双特异性抗体进行一轮Alpha Screen分析。将所有样本一式两份进行分析。在Fc γ RI上,四种双特异性抗体表现得类似于B21M hIgG4 PAA。也就是说,它们的竞争性不超过匹配的同种型对照。还在Fc γ RIIIa上观察到hIgG1 WT对照与四种双特异性抗体之间的差异类似,并且GCD43最类似于IgG4PAA同种对照,其它双特异性抗体对Fc γ RIIIa具有稍微较高的亲和力。在Fc γ RIIa和Fc γ RIIb上,四种双特异性抗体按以下次序竞争:GCDB40>GCDB32>GCDB43>GCDB35。GCDB40最具竞争性或以最高亲和力结合Fc γ RIIa和Fc γ RIIb。事实上,GCDB40以与hIgG1 WT相同的程度在Fc γ RIIa和Fc γ RIIb上竞争,证实了当包括Fc阻断剂时在T-细胞介导的细胞毒性测定中所观察到的效力偏移。由于与Fc γ RIIa和Fc γ RIIb意料不到的交互作用,GCDB40不太有利。

[0407] 竞争结合测定

[0408] 评估抗GPRC5D mAb彼此对人GPRC5D细胞的竞争性结合。简而言之,将细胞以50,000个细胞/孔平板接种于50uL培养基中并允许在37C下沉降90分钟。然后将孔用3%BSA在室温下封闭1小时。根据标准程序,用钌(II)三-联吡啶、N-羟基琥珀酰亚胺(Ru-标签)标记mAb。在独立的96孔板中,将5uM的竞争者mAb与50nM的Ru-标记的mAb一起温育。从细胞平板移除阻断溶液并添加25uL的mAb溶液。将平板在振荡下于室温温育1小时。在用PBS洗涤平板三次之后,添加150uL的MSD读取缓冲液(不含表面活性剂)并用MSD读板机检测Ru-标记的抗体的结合。

[0409] 所有的mAb属于同一个竞争组,仅GC5B420和GC5B421未完全受到GC5B81、GC5B285和/或GC5B332竞争(阻断<70%)(表12)。假设两种mAb与GPRC5D的结合可能在空间上不能给

出相比于mAb的尺寸而言较小尺寸的GPC5D细胞外结构域。

[0410] 表12:抗GPC5D mAb的竞争性结合表位分箱评估抗GPC5D mAb彼此对人GPC5D细胞的竞争性结合(+/- = 阻断<70%)。

[0411]

mAb ID	GC5B81	GC5B164	GC5B285	GC5B332	GC5B420	GC5B421
GC5B81	+	+	+	+	+/-	+/-
GC5B164	+	+	+	+	+	+
GC5B285	+	+	+	+	+	+/-
GC5B332	+	+	+	+	+/-	+
GC5B420	+	+	+	+	+	+
GC5B421	+	+	+	+	+	+
GC5B243	+	+	+	+	+	+

[0412] 实施例4:用杂交瘤技术产生GPC5D抗体

[0413] 在第0、10和20天,三只Ba1b/c小鼠用表达全长人GPC5D的pCMV6-neo(CMV启动子)质粒DNA在尾根部经皮内注射进行免疫。在第59天,小鼠接受最终腹膜内注射和静脉注射过表达全长人GPC5D的大鼠嗜碱性白血病(RBL)细胞进行免疫。在第63天,收获得到淋巴结和脾,进行B细胞富集,并使用细胞产生约3500种mAb分泌性杂交瘤。

[0414] 实施例5:通过杂交瘤技术获得的GPC5D抗体的初始表征

[0415] GPC5D结合

[0416] 用FACS筛选同时结合RBL和人GPC5D表达型RBL细胞的杂交瘤。计算结合GPC5D_RBL细胞的每种mAb相对于未转染RBL细胞的经背景调节的MFI比率,并且结合比率大于3的任何样品均被视为潜在阳性。九十九种杂交瘤具有大于3的比率并且对于V区克隆有利。对三十一一种mAb序列进行鉴定,合成,表达和纯化。31种mAb中有两种表现出结合RBL_GPC5D细胞超出背景(图9A和8B)。GCDB390和GCDB396被选择用于表达、纯化和产生具有抗CD3臂CD3B219的双特异性抗体,以分别产生双特异性抗体GCDB46和GCDB47。

[0417] T-细胞依赖性细胞毒性

[0418] 将GCDB46和GCDB47在T-细胞介导的细胞毒性测定中进行评估(图10A和10B)。观察到这两种双特异性抗体是有效的,所报告的EC₅₀分别为0.67nM和0.1nM。在这些数据的基础上,对这两种mAb连同三种源于噬菌体的mAb进一步先导最优化。

[0419] 实施例6:命中评价、选择和优化

[0420] 基于表13所汇总的结合、功能、交叉反应性和选择性数据,选择五种GPC5D双特异性抗体进行先导最优化(GCDB32、GCDB43、GCDB35、GCDB46、GCDB47)。

[0421] 表13:GPC5D×CD3双特异性抗体的先导最优化数据:评估双特异性抗体的结合、功能、交叉反应性和选择性。

GPRC5D×CD3 ID	选择性	T 细胞介导的靶细胞杀伤			
	结合 GPRC5A, B, C	H929 EC50 ± SD (nM)	MM1R EC50 ± SD (nM)	H929 无 Fc vs Fc 阻断	Cyno GPRC5D EC50 (nM)
GCDB32	未结合	0.43 ± 0.29	0.12 ± 0.01	2.4	0.19
GCDB43	未结合	0.39 ± 0.07	0.54	2.8	0.95
GCDB40	未结合	1.2 ± 0.83	0.52 ± 0.31	5.1	10.61
[0422] GCDB35	低	1.39 ± 0.75	0.74 ± 0.26	2.7	4.65
GCDB34	未结合	2.01 ± 0.74	0.77 ± 0.09	6.3	1.14
GCDB45	未结合	2.36 ± 0.84	0.91 ± 0.76	2.2	2.82
GCDB33	未结合	5.21 ± 1.21	0.8 ± 0.15	1.5	0.2
GCDB36	低	5.57 ± 0.47	4.22 ± 0.29		3.35
GCDB46	未结合	0.67			
GCDB47	未结合	0.1			
GCDB48	未结合	0.17			无活性

[0423] 先导最优化旨在解决如表14所概述的GCDB32 (GC5B81亲本mAb)、GCDB43 (GC5B285亲本mAb) 和GCDB35 (GC5B164亲本mAb) 的潜在翻译后修饰 (PTM) 序列的风险。

[0424] 表14: 对源于噬菌体的命中消除PTM序列的潜在可能性示出Hc CDR序列, 并且潜在PTM序列可能性标有下划线。

[0425] (每个列出的序列的SEQ ID NO在括号中提供)

GPRC5D ID	GPRC5D Hc ID	Hc CDR1	Hc CDR2	HcCDR3
GC5B81	GC5H40	SYAIS (1)	GIPIFGTANYAQKF QG (5)	ESRW <u>RGYK</u> LD (9)
[0426] GC5B285	GC5H14	NYWMS (2)	GISYSGGSKYY <u>ADS</u> VKG (28)	AAWDFGRRAVRLDY (30)
GC5B164	GC5H36	SYW <u>IG</u> (27)	IIPGD <u>S</u> DTRYSPSF QG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)

[0427] 对GC5B81分析的所有PTM变体具有显著减小的结合亲和力, 表明了该残基 (HCW102) 对于互补位的关键性 (表15)。

[0428] 表15: GC5B81 PTM文库的CDR序列和结合数据: 突变位点标有下划线。结合分类为 MFI > 10,000 = ++; MFI > 1,000 = +; MFI < 1,000

[0429] (每个列出的序列的SEQ ID NO在括号中提供)

GPRC5D ID	重链 ID	突变	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	人 GPRC5D (FACS)
GC5B427	GC5H199	W102Y	SYAIS (1)	GIPIFGTANYAQ KFQG (5)	ESR <u>Y</u> RGYK LDY (31)	-
GC5B428	GC5H198	W102V	SYAIS (1)	GIPIFGTANYAQ KFQG (5)	ESR <u>V</u> RGYK LDY (32)	-
[0430] GC5B430	GC5H196	W102G	SYAIS (1)	GIPIFGTANYAQ KFQG (5)	ESR <u>G</u> RGYK LDY (33)	-
GC5B431	GC5H195	W102A	SYAIS (1)	GIPIFGTANYAQ KFQG (5)	ESR <u>A</u> RGYK LDY (34)	-
GC5B429	GC5H197	W102F	SYAIS (1)	GIPIFGTANYAQ KFQG (5)	ESR <u>F</u> RGYK LDY (35)	-

[0431] 结合研究鉴定了GC5B285和GC5B164两者的突变数, 它们保持对人GPRC5D结合 (表16和17)。

[0432] 表16:GC5B164 PTM文库的CDR序列和结合数据:突变位点标有下划线。结合分类为 MFI>10,000=++;MFI>1,000=+;MFI<1,000.

[0433] (每个列出的序列的SEQ ID NO在括号中提供)

[0434]

GPRC5 D ID	重链 ID	突变	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	人 GPR5D 结 合 (FACS)
GC5B47 1	GC5H27 8	D55A, W33Y	S <u>Y</u> <u>Y</u> I G (36)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>A</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (40)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	++
GC5B47 2	GC5H27 7	D55A, W33V	S <u>Y</u> <u>V</u> I G (37)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>A</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (40)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	+
GC5B47 3	GC5H27 6	D55A, W33F	S <u>Y</u> <u>F</u> I <u>G</u> (3)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>A</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (40)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	++
GC5B47 4	GC5H27 5	D55A, W33G	S <u>Y</u> <u>G</u> I G (38)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>A</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (40)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	+
GC5B47 5	GC5H27 4	D55A, W33A	S <u>Y</u> <u>A</u> I G (39)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>A</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (40)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	+
GC5B47 6	GC5H27 3	D55S, W33Y	S <u>Y</u> <u>Y</u> I G (36)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>S</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (41)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	++
GC5B47 7	GC5H27 2	D55S, W33V	S <u>Y</u> <u>V</u> I G (37)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>S</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (41)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	+
GC5B47 8	GC5H27 1	D55S, W33F	S <u>Y</u> <u>F</u> I <u>G</u> (3)	I <u>I</u> Y <u>P</u> G <u>S</u> S <u>D</u> TR <u>Y</u> SP SFQG (41)	V <u>Y</u> S <u>F</u> G <u>G</u> R <u>H</u> K ALFDY (11)	++

	GC5B47 9	GC5H27 0	D55S, W33G	<u>SYGI</u> G (38)	IYPG <u>SSD</u> TRYSP SFQG (41)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B48 0	GC5H26 9	D55S, W33A	<u>SYAI</u> G (39)	IYPG <u>SSD</u> TRYSP SFQG (41)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B48 1	GC5H26 8	D55K, W33Y	<u>SYI</u> G (36)	IYPG <u>KSD</u> TRYSP SFQG (7)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B48 2	GC5H26 7	D55K, W33V	<u>SYVI</u> G (37)	IYPG <u>KSD</u> TRYSP SFQG (7)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B48 3	GC5H26 6	D55K, W33F	<u>SYFIG</u> (3)	IYPG <u>KSD</u> TRYSP SFQG (7)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B48 4	GC5H26 5	D55K, W33G	<u>SYGI</u> G (38)	IYPG <u>KSD</u> TRYSP SFQG (7)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B48 5	GC5H26 4	D55K, W33A	<u>SYAI</u> G (39)	IYPG <u>KSD</u> TRYSP SFQG (7)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B48 6	GC5H26 3	D55E, W33Y	<u>SYI</u> G (36)	IYPG <u>ESD</u> TRYSP SFQG (42)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B48 7	GC5H26 2	D55E, W33V	<u>SYVI</u> G (37)	IYPG <u>ESD</u> TRYSP SFQG (42)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B48 8	GC5H26 1	D55E, W33F	<u>SYFIG</u> (3)	IYPG <u>ESD</u> TRYSP SFQG (42)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B48 9	GC5H26 0	D55E, W33G	<u>SYGI</u> G (38)	IYPG <u>ESD</u> TRYSP SFQG (42)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	-
	GC5B49 0	GC5H25 9	D55E, W33A	<u>SYAI</u> G (39)	IYPG <u>ESD</u> TRYSP SFQG (42)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B49 1	GC5H25 8	D55Y, W33Y	<u>SYI</u> G (36)	IYPG <u>YSD</u> TRYSP SFQG (43)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
[0435]	GC5B49 2	GC5H25 7	D55Y, W33V	<u>SYVI</u> G (37)	IYPG <u>YSD</u> TRYSP SFQG (43)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B49 3	GC5H25 6	D55Y, W33F	<u>SYFIG</u> (3)	IYPG <u>YSD</u> TRYSP SFQG (43)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B49 4	GC5H25 5	D55Y, W33G	<u>SYGI</u> G (38)	IYPG <u>YSD</u> TRYSP SFQG (43)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B49 5	GC5H25 4	D55Y, W33A	<u>SYAI</u> G (39)	IYPG <u>YSD</u> TRYSP SFQG (43)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	+
	GC5B49 6	GC5H25 3	W33Y	<u>SYI</u> G (36)	IYPG <u>SD</u> TRYSP SFQG (29)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B49 7	GC5H25 2	W33V	<u>SYVI</u> G (37)	IYPG <u>SD</u> TRYSP SFQG (29)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B49 8	GC5H25 1	W33F	<u>SYFIG</u> (3)	IYPG <u>SD</u> TRYSP SFQG (29)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B49 9	GC5H25 0	W33G	<u>SYGI</u> G (38)	IYPG <u>SD</u> TRYSP SFQG (29)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	-
	GC5B50 0	GC5H24 9	W33A	<u>SYAI</u> G (39)	IYPG <u>SD</u> TRYSP SFQG (29)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	-
	GC5B50 1	GC5H24 8	D55A	<u>SYWI</u> G (27)	IYPG <u>ASD</u> TRYSP SFQG (40)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B50 2	GC5H24 7	D55S	<u>SYWI</u> G (27)	IYPG <u>SSD</u> TRYSP SFQG (41)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B50 3	GC5H24 6	D55K	<u>SYWI</u> G (27)	IYPG <u>KSD</u> TRYSP SFQG (7)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B50 4	GC5H24 5	D55E	<u>SYWI</u> G (27)	IYPG <u>ESD</u> TRYSP SFQG (42)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
	GC5B50 5	GC5H24 4	D55Y	<u>SYWI</u> G (27)	IYPG <u>YSD</u> TRYSP SFQG (43)	VYSFGGRHK ALFDY (11)	++
[0436]	5	4		G (27)	SFQG (43)	ALFDY (11)	

[0437] 表17:GC5B285 PTM文库的CDR序列和结合数据:突变位点标有下划线。结合分类为MFI>10,000=++;MFI>1,000=+;MFI<1,000。

[0438] (每个列出的序列的SEQ ID NO在括号中提供)

GPRC5D ID	重链 ID	突变	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	人 GPRC5D (FACS)
GC5B463	GC5H234	D62A,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (44)	AA <u>Y</u> DFGRRAV RLDY (48)	++
GC5B432	GC5H228	D62S,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVKG (6)	AA <u>V</u> DFGRRAV RLDY (49)	++
GC5B465	GC5H227	D62S,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVKG (6)	AA <u>F</u> DFGRRAV RLDY (97)	++
GC5B433	GC5H223	D62K,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (45)	AA <u>V</u> DFGRRAV RLDY (49)	++
GC5B434	GC5H222	D62K,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (45)	AA <u>F</u> DFGRRAV RLDY (97)	++
GC5B435	GC5H219	D62E,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>Y</u> DFGRRAV RLDY (48)	+
GC5B436	GC5H217	D62E,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>F</u> DFGRRAV RLDY (97)	+
GC5B461	GC5H216	D62E,W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>G</u> DFGRRAV RLDY (50)	-
GC5B462	GC5H215	D62E,W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG (46)	AA <u>A</u> DFGRRAV RLDY (51)	++
GC5B437	GC5H214	D62Y,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>Y</u> DFGRRAV RLDY (48)	+
GC5B438	GC5H213	D62Y,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>V</u> DFGRRAV RLDY (49)	+
GC5B439	GC5H212	D62Y,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>F</u> DFGRRAV RLDY (97)	+
GC5B440	GC5H211	D62Y,W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>G</u> DFGRRAV RLDY (50)	-
GC5B441	GC5H210	D62Y,W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>A</u> DFGRRAV RLDY (51)	+
GC5B442	GC5H209	W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>Y</u> DFGRRAV RLDY (48)	+
GC5B443	GC5H208	W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>V</u> DFGRRAV RLDY (49)	+
GC5B444	GC5H207	W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>F</u> DFGRRAV RLDY (97)	+
GC5B464	GC5H206	W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>G</u> DFGRRAV RLDY (50)	+
GC5B445	GC5H205	W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>D</u> SVKG (28)	AA <u>A</u> DFGRRAV RLDY (51)	+
GC5B446	GC5H204	D62A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG (44)	AA <u>W</u> DFGRRAV RLDY (30)	+
GC5B447	GC5H203	D62S	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>S</u> SVKG (6)	AA <u>W</u> DFGRRAV RLDY (30)	+
GC5B448	GC5H202	D62K	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG (45)	AA <u>W</u> DFGRRAV RLDY (30)	+
GC5B449	GC5H201	D62E	NYWMS	GISYSGGSKYYA	AA <u>W</u> DFGRRAV	+
			(2)	<u>E</u> SVKG (46)	RLDY (30)	
[0440]	GC5B450	GC5H200	D62Y NYWMS (2)	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG (47)	AA <u>W</u> DFGRRAV RLDY (30)	+

[0441] 在该结合数据的基础上,所选的mAb作为GPRC5D×CD3双特异性抗体产生,并且评估H929细胞的T-细胞介导的细胞毒性(表18)。

[0442] 表18:GCDB164和GCDB285的所选GPRC5D PTM变体的功能活性

亲本 GPCR5D mAb ID	GPCR5D 蛋 白质 AA ID	GPCR5D×CD3 ID	H929 EC ₅₀ (nM)	选择为先导
[0443] GC5B285	GC5B432	GCDB50	1.3	
	GC5B433	GCDB51	0.81	
	GC5B434	GCDB52	2.81	
	GC5B465	GCDB53	0.24	XX
	GC5B463	GCDB54	3.09	
GC5B164	GC5B471	GCDB57	3.87	
	GC5B476	GCDB58	1.24	
	GC5B478	GCDB59	1.54	
	GC5B481	GCDB60	2.94	
	GC5B483	GCDB61	1.51	XX
	GC5B493	GCDB62	3.1	

[0444] 观察到一定范围的效力, T-细胞介导的细胞毒性测定不一定由所观察的结合亲和力预测。例如, GC5B465和GC5B463以类似的亲和力结合人GPCR5D, 差别仅在于序列的2个氨基酸(表17), 并且观察到它们作为GPCR5D×CD3双特异性Ab的效力有12.5倍的差异(表18)。在功能数据的基础上, GC5B465和GC5B483被选择为GC5B285 (GCDB43作为CD3双特异性) 和GC5B164 (GCDB35作为CD3双特异性) 的最优化序列。

[0445] 对小鼠杂交瘤衍生的GPCR5D mAb (GC5B390和GC5B396、或GCDB46和47分别作为CD3双特异性) 完成人框架适应。结合研究鉴定了保持结合人GPCR5D的GC5B396的多个框架和GC5B390的一个框架(表19)。

[0446] 表19: 杂交瘤衍生的抗GPCR5D mAb文库的人框架适应的结合和功能数据: 结合分类为MFI>10,000=+++; MFI>5,000=++; MFI>1,000=+; MFI<1,000。

GPRC5D 亲本 mAb ID	GPRC5D mAb AA ID	重链 ID	轻链 ID	人 GPRC5D (FACS)	GPRC5D×CD3 ID	H929 EC50 (nM)
[0447] GPRC5D B396	GC5B541	GC5H241	GC5L58	+		
	GC5B540	GC5H240	GC5L58	+++	GCDB69	0.58
	GC5B539	GC5H242	GC5L58	++		
	GC5B538	GC5H243	GC5L58	++		
	GC5B537	GC5H241	GC5L57	+		
	GC5B536	GC5H240	GC5L57	+++	GCDB68	2.51
	GC5B535	GC5H242	GC5L57	+		
	GC5B534	GC5H243	GC5L57	++		
	GC5B533	GC5H241	GC5L56	+		
	GC5B532	GC5H240	GC5L56	+++	GCDB67	0.61
	GC5B531	GC5H242	GC5L56	++		
	GC5B530	GC5H243	GC5L56	+++	GCDB66	1.41
	GC5B529	GC5H241	GC5L55	++		
	GC5B528	GC5H240	GC5L55	+++	GCDB65	1.01
	GC5B527	GC5H242	GC5L55	-		
GC5B526	GC5H243	GC5L55	++	GCDB64	1.5	
GPRC5D B390	GC5B525	GC5H279	GC5L53	-		
	GC5B524	GC5H237	GC5L53	-		
	GC5B523	GC5H238	GC5L53	-		
	GC5B522	GC5H236	GC5L53	-		
	GC5B521	GC5H279	GC5L52	-		
	GC5B520	GC5H237	GC5L52	-		
	GC5B519	GC5H238	GC5L52	-		
	GC5B518	GC5H236	GC5L52	-		
	GC5B517	GC5H279	GC5L51	+		
	GC5B516	GC5H237	GC5L51	+		
	GC5B515	GC5H238	GC5L51	++	GCDB63	0.52
	GC5B514	GC5H236	GC5L51	+		
	GC5B513	GC5H279	GC5L50	-		
	GC5B512	GC5H237	GC5L50	+		
	GC5B511	GC5H238	GC5L50	+		
	GC5B510	GC5H236	GC5L50	+		
	GC5B509	GC5H279	GC5L49	-		
	GC5B508	GC5H237	GC5L49	+		
GC5B507	GC5H238	GC5L49	+			
GC5B506	GC5H236	GC5L49	+			

[0448] 在结合数据的基础上,几种抗GPRC5D mAb作为CD3双特异性抗体产生,并且评估H929细胞的T-细胞介导的细胞毒性(表18)。功能分析将GCDB63、GCDB67和GCDB69鉴定为有效的完全人源化GPRC5D×CD3双特异性抗体。在这些数据的基础上,对应的抗GPRC5D mAb即GC5B515、GC5B532和GC5B540被选择为GC5B390和GC5B391的完全人源化序列。

[0449] 然后,完成完全人源化序列的附加先导最优化,目的在于解决GC5B515、GC5B532和GCDB540的潜在翻译后修饰序列的风险。G56S突变产生在重链序列中,以除去GC5B515的潜在脱酰胺风险(表20)。

[0450] 表20:GC5B532、GC5B540和GCDB515的所选GPRC5D PTM变体的结合和功能活性:

GPRC5D 亲本 mAb ID	GPRC5D mAb AA ID	突变	人 GPRC5D (FACS)	GPRC5D×CD3 ID	H929 EC50 (nM)
[0451] GC5B540	GC5B590	M64K	+++		
	GC5B592	G99A	+		
	GC5B594	M64K, G99A	+		
GC5 B532	GC5B591	M64K	+++		
	GC5B593	G99A	+		
	GC5B595	M64K, G99A	+		
GC5 B515	GC5B596	G56S	++	GCDB72	0.15

[0452] GC5B532和GC5B540的重链包含潜在异构化和氧化风险。产生M64K和G99A突变以改善该风险(表20)。具有G99A突变的被测试所有变体具有结合亲和力的显著下降,而M64K和G56A变体不受影响。基于结合数据,仅GC5B596继续进行功能评估,并在T-细胞介导的细胞毒性测定中展示作为CD3双特异性分子(GCDB72)的效力。

[0453] 因此,四种GPRC5D双特异性mAb被选择用于附加表征:GCDB32、GCDB53、GCDB61和GCDB72。下表21和22示出用于产生双特异性分子的GPRC5D mAb的CDR以及重链和轻链序列。

[0454] 表21:示出针对人和cyno GPRC5D结合且作为CD3双特异性分子产生时具功能性的4种GPRC5D mAb候选的CDR序列:

ID	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
[0455] GC5B81	SYAIS (SEQ	GIPIFGTAN YAQKFQG	ESRWRGYK LD (SEQ ID	RASQSISS YLN	AASSLQ S (SEQ	QQSYSTPL T

ID	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
	ID NO 1)	(SEQ ID NO 5)	NO 9)	(SEQ ID NO 13)	ID NO 16)	(SEQ ID NO 19)
[0456] GC5B465	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGSK YYASSVKG (SEQ ID NO 6)	AAFDGRRRA VRLD (SEQ ID NO 10)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO 13)	AASSLQ S (SEQ ID NO 16)	QQSYSTPL T (SEQ ID NO 19)
GC5B483	SYFIG (SEQ ID NO 3)	IYPGKSDTR YSPSFQG (SEQ ID NO 7)	VYSFGGRH KALFDY (SEQ ID NO 11)	RASQSVS SYLA (SEQ ID NO 14)	DASNRA T (SEQ ID NO 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID NO 20)
GC5B596	GYTMN (SEQ ID NO 4)	LINPYNSDT NYAQLQG (SEQ ID NO 8)	VALRVALD Y (SEQ ID NO 12)	KASQNV ATHVG (SEQ ID NO 15)	SASYRY S (SEQ ID NO 18)	QQYNRYP YT (SEQ ID NO 21)

[0457] 表22:示出针对人和cyno GPRC5D结合且作为CD3双特异性分子产生时具功能性的4种GPRC5D mAb候选的重链和轻链可变区序列:

mAb AA ID	VH 氨基酸序列	SEQ ID NO:	VL 氨基酸序列	SEQ ID NO
[0458] GC5B81	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFG TANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARESRWRGYKLDYWG QGTLVTVSS	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQQSYSTPLTFG QGTKVEIK	56
GC5B465	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYWMSWV RQAPGKGLEWVSGISYSG GSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKAAFDFGRRAVRL DYWGQGTLVTVSS	53	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQQSYSTPLTFG QGTKVEIK	56
GC5B483	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYFIGWV RQMPGKGLEWMGHIYPGK SDTRYSPSFQGGVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARVYSFGGRHKALFD YWGQGTLVTVSS	54	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLIYDASNRAATGIP ARFSGSGSGTDFLTISLLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTF GQGTKVEIK	57
GC5B596	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSKASGYSFTGYTMNW VRQAPGQGLEWMGLINPY NSDTNYAQKLQGRVTMTT DTSTSTAYMELRSLRSDDT	55	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQNVATHVGWYQ QKPGKAPKRLIYSASYRYS GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS NLQPEDFATYYCQQYNRYP	58
[0459]	AVYYCARVALRVALDYW QGTLVTVSS		YTFGQGTKLEIK	

[0460] 实施例7:在IgG4S228P、L234A、L235A中以双特异性形式制备GPC5D和CD3抗体

[0461] 四种单特异性GPC5D抗体(参见表21)表示为IgG4,具有Fc置换S228P、L234A和L235A或S228P、L234A、L235A、F405L和R409K(CD3臂)(根据EU索引进行编号)。还产生了单特异性抗CD3抗体CD3B219,其包含具有SEQ ID NO:25的重链和SEQ ID NO:26的轻链的VH和VL区,以及具有S228P、L234A、L235A、F405L和R409K置换的IgG4恒定区。

[0462] 使用蛋白A柱(HiTrap MabSelect SuRe柱)使用标准方法纯化单特异性抗体。洗脱后,将收集物透析至D-PBS(pH7.2)。

[0463] 通过在体外Fab臂交换中组合单特异性CD3mAb和单特异性GPC5D mAb来生成双特异性GPC5D×CD3抗体(如W02011/131746中所述)。简而言之,将约1-20mg/mL的抗GPC5D/抗CD3抗体的PBS溶液(pH7-7.4)和75mM2-巯基乙醇胺(2-MEA)以摩尔比1.08:1混合在一起并在25-37°C下温育2-6小时,然后采用标准方法通过透析、渗滤、切向流过滤和/或旋转细胞过滤除去2-MEA。

[0464] GPC5D×CD3双特异性抗体的重链和轻链示于下表23中。

[0465] 表23:双特异性Ab IgG4-PAA的重链和轻链序列

[0466]

Ab		氨基酸序列
GCDB32	重链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSY VSWFAYWGQGTLVTVSS
	轻链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重链 2 GC5B81 (SEQ ID NO:52)	QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARESRWRGYKLDY WGQGTLVTVSS
	轻链 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQ

[0467]

	GC5B81 (SEQ ID NO:56)	KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB53	重链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSY VSWFAYWGQGLTVTVSS
	轻链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重链 2 GC5B465 (SEQ ID NO:53)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSW VRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDGRRRAV RLDYWGQGLTVTVSS
	轻链 2 GC5B465 (SEQ ID NO:56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
	重链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSY VSWFAYWGQGLTVTVSS
GCDB61	轻链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重链 2 GC5B483 (SEQ ID NO:54)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWV RQMPGKGLEWMGHIYPGKSDTRYSPSFQGGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYCARVYVSGGRHKALF DYWGQGLTVTVSS
	轻链 2 GC5B483 (SEQ ID NO:57)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK
	重链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSY VSWFAYWGQGLTVTVSS
GCDB72	轻链 1 CD3B219 (SEQ ID NO:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重链 2 GC5B596 (SEQ ID NO:55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALD

[0468]		YWGQGLVTVSS
	轻链 2 GC5B596 (SEQ ID NO:58)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWY QQKPGKAPKRLIYSASYRYSYSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISNLQPEDFATYYCQQYNRYPTYFGQGTKLEIK

[0469] 实施例8:GCDB32、GCDB53、GCDB61和GCDB72的功能表征

[0470] 评估GCDB32、GCDB53、GCDB61和GCDB72对小鼠GPCR5D的结合(表24)。所有四种双特异性抗体以所观察的一定范围的结合亲和力结合小鼠GPCR5D。

[0471] 表24:抗GPCR5D×CD3抗体与小鼠GPCR5D的结合:

GPCR5D×CD3 ID	小鼠 GPCR5D FACS 结合 (MFI)
[0472] GCDB32	1151
GCDB53	2658
GCDB61	3552
GCDB72	481

[0473] 另外使用过表达的人和cyno GPCR5D细胞系的T-细胞重定向细胞毒性测定,评估与cyno GPCR5D的交叉反应性(表25)。一种GPCR5D×CD3双特异性抗体针对人和cyno GPCR5D等效(GCDB32),而测试的其它双特异性分子诱导cyno GPCR5D的细胞毒性的效力低于人GPCR5D。

[0474] 表25:先导GPCR5D×CD3抗体针对人和cyno GPCR5D-表达型HEK细胞的功能活性:

GPCR5D×CD3 ID	人 GPCR5D HEK 细胞 (EC ₅₀ nM)	Cyno GPCR5D HEK 细胞 (EC ₅₀ nM)
[0475] GCDB32	0.04	0.07
GCDB53	0.08	0.36
GCDB61	0.03	1.22
GCDB72	0.03	3.41

[0476] 附加的表征旨在理解体外结合(图11A-11E)和效力(表26)。

[0477] 表26:先导GPCR5D×CD3抗体对几种人GPCR5D-表达型B细胞系的T-细胞介导的细胞毒性:

GPCR5D×CD3 ID	H929 细胞 EC ₅₀ nM (等级次序)	MM1R EC ₅₀ nM (等级次序)	OPM2 EC ₅₀ nM (等级次序)	LP-1 EC ₅₀ nM (等级次序)
[0478] GCDB32	0.45 (3)	0.04 (1)	0.98 (2)	1.02 (2)
GCDB53	0.69 (4)	0.28 (4)	2.83 (4)	1.58 (3)
GCDB61	0.39 (2)	0.06 (3)	1.46 (3)	1.67 (4)
GCDB72	0.22 (1)	0.04 (1)	0.77 (1)	0.7 (1)

[0479] 虽然观察到一定范围的结合亲和力,GCDB61为最强的结合物且GCDB72&GCDB32为最弱的结合物,在体外的效力极类似于双特异性抗体组。然而,根据等级次序分析,GCDB72在所分析的各种B细胞系中最有效。使用源于患者的MNC的体外结合和效力实验得到与体外测定更类似的结果(表27以及图15A和15B)。

[0480] 表27:源于MM患者的MNC的GPCR5D×CD3双特异性抗体结合、T-细胞介导的细胞毒性和T-细胞活化:

患者	GPCR5D×CD3 AA ID	结合 EC ₅₀ nM	细胞毒性 EC ₅₀ nM	T 细胞活化 EC ₅₀ nM
[0481] MM303BM	GCDB32	16.1	0.36	0.18
	GCDB53	3.98	0.42	0.17
	GCDB61	5.53	0.89	0.22
	GCDB72	27.5	0.30	0.12
MM305BM	GCDB32	70.4	0.26	0.16
	GCDB53	10.2	0.26	0.19
	GCDB61	6.93	0.6	0.22
	GCDB72	65.9	0.28	0.12

[0482] GCDB61与患者MNC具有最高的结合亲和力,而GCDB72&GCDB32为最弱的结合物。同样,即使观察到结合亲和力差异,所有双特异性抗体在T-细胞重定向的细胞毒性测定中展示出亚纳摩尔功效。分子实际上在体内和体外效力的基础上不可区分,然而,体内数据提供了分化(图12A-12D)。

[0483] 在注射人PBMC后一周,将H929细胞植入NSG小鼠中。在植入H929细胞的同时开始双特异性抗体处理,并且每隔2天或3天(q2d或q3d)以10ug、1ug和0.1ug/动物剂量持续处理,共五次处理。每组中使用十只小鼠,并且PBS作为载体对照包括在内。在第11天停止处理,并且在第26天(图12A-D)终止研究。该预防模型中测试的所有GPCR5D×CD3双特异性抗体示出在10ug和1ug/动物剂量下100%的抑制肿瘤生长。在0.1ug/动物的最低剂量下观察到分化,并且GCDB72展示出优于所测的其它双特异性抗体,观察到80%的抑制肿瘤生长。

[0484] 实施例9:GPCR5D抗体对GPCR5D⁺ MM1.R细胞系的结合特征

[0485] 使用FACS测量GPCR5D抗体对GPCR5D⁺人MM细胞系(MM1.R,购自ATCC(美国典型培养物保藏中心))的结合亲和力。图13示出所有先导抗体以剂量依赖性方式结合GPCR5D表达型MM.1R细胞,EC₅₀值范围为0.10nM至135nm,除GC5B602之外全部都显著低于获得121.7nM的EC₅₀值的商业抗体FAB6300(R&D Systems,目录号FAB6300A,克隆号571961)的值。

[0486] 将GPCR5D⁺ MM1.R细胞系用各种浓度前导抗体染色60分钟,以测量表面结合特征(n=3)。藻红蛋白标记的人IgG4Fc用作第二抗体来捕获信号(Southern Biotech,克隆HP6025,目录号9200-09)。结合表示为归一化几何平均荧光强度,如由FACS所测。使用具有可变斜率(四个参数)的非线性回归和最小二乘拟合法在GraphPad Prism6中完成数据的作图和拟合。

[0487] 此外,相比于商业抗体,使用三种GPCR5D⁺(JIM3、OPM-2和MM.1R;细胞系,购自ATCC)多发性骨髓瘤细胞系评估GPCR5D mAb GC5M481的结合特征(图14A)。另外,使用cyno-GPCR5D表达型Daudi细胞概要分析GPCR5D mAb(GC5M481)的cyno交叉反应性,其相比于亲本细胞示出较强结合(图14A)。另外,五种GPCR5D×CD3双特异性抗体(GCDB32、GCDB48、GCDB53、GCDB61和GCDB72)在用GPCR5D⁺(JIM3、OPM-2和MM1.R)细胞系评价结合潜能时(图14B)示出显著的结合,如由相比于同种型对照(灰色填充的虚线)的柱状图偏移(黑色实线)所证实。

[0488] 实施例10:GCDB72在PBMC-人源化NSG小鼠中针对皮下MM.1S人多发性骨髓瘤异种移植物的抗肿瘤功效

[0489] 该体内研究实施成在PBMC人源化NSG小鼠中测定GCDB72针对所建立的MM.1S人多发性骨髓瘤(MM)异种移植物的功效。在研究第0天,将类似体重和年龄的雌性NSG小鼠于右背后肋侧经皮下(sc)植入MM.1S人MM细胞(每小鼠200 μ L PBS中 1×10^7 个细胞)。肿瘤细胞移植后第7天,经由侧尾静脉经静脉内注射 1×10^7 个人PBMC(溶于200 μ LPBS)。处理起始于第15天,当平均肿瘤体积为约72-78mm³时,使每只小鼠以0.1 μ g(0.005mg/kg)、1 μ g(0.05mg/kg)、10 μ g(0.5mg/kg)和50 μ g(2.5mg/kg)接受静脉内(iv)施用的PBS或GCDB72 DuoBody抗体。空白DuoBody对照、CD3 \times 空白和空白 \times GPRC5D各自以每小鼠10 μ g给予。处理约每隔三天(q3d)施用,共七次剂量。观察到两种高剂量(10 μ g和50 μ g)GCDB72强健的抗肿瘤功效,其中在研究结束时MM.1Ssc肿瘤在100%(每组10只中有10只)动物中完全消退(图16)。此外,相比于PBS处理的肿瘤,每小鼠1 μ g剂量显著抑制65%($p \leq 0.0001$)肿瘤生长,而0.1 μ g剂量具有较小的效应(TGI=19.3%, $p=0.0023$)。CD3 \times 空白的效应不被视为有效(TGI=28%, $p \leq 0.0001$),并且空白 \times GPRC5D具有3.1%TGI($p=0.9971$)的可忽略影响。在第36天测定TGI,此时每组有至少80%的存活动物。由于GVHD,显著的体重减轻和/或死亡率在第36天后开始显现(图17)。在第43天终止研究,此时有60%或更少的动物留存在组中。

[0490] 实施例11:GPRC5D抗体的抗体-依赖性细胞-介导的细胞毒性(ADCC)

[0491] 抗人GPRC5D mAb组作为IgG1 mAb生成。此外,新的抗人GPRC5DmAb组如实施例2所述生成。下表28和29示出新GPRC5D mAb的CDR以及重链和轻链可变区序列。这些新抗体用于如实施例7所述产生双特异性CD3分子,并且还作为IgG1 mAb引入以供ADCC活性评估。

[0492] 表28:新GPRC5D抗体组的CDR序列

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
[0493] GC5B382	DYGMH (SEQ ID	AIKYSGGST YYADSVKG	RAESGPGL DY	KSSQSVLY SSNNKNYL	WASTRE S (SEQ	QQYYSTP LT

[0494]

ID	HC-CDR1 NO 61)	HC-CDR2 (SEQ ID NO 67)	HC-CDR3 (SEQ ID NO 72)	LC-CDR1 A (SEQ ID 98)	LC-CDR2 ID NO 78)	LC-CDR3 (SEQ ID NO 80)
GC5B379	NYWMS (SEQ ID NO 2)	GISYSGGSK YYADSVKG (SEQ ID 28)	AAWDFGRR AVRLDY (SEQ ID 30)	RASQSISSY LN (SEQ ID NO 13)	AASSLQ S (SEQ ID 16)	QQSYSTP LT (SEQ ID 19)
GC5B373	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIYPGSDT RYSPSFQG (SEQ ID 29)	IGFYGRSFR IFDY (SEQ ID 73)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 14)	DASNRA T (SEQ ID 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID 20)
GC5B376	SYWIG (SEQ ID NO 27)	IIYPGSDT RYSPSFQG (SEQ ID 29)	VYSFGGRH KALFDY (SEQ ID 11)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 14)	DASNRA T (SEQ ID 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID 20)
GC5B385	GYAMS (SEQ ID NO 62)	AISGSGGST YYADSVKG (SEQ ID NO 68)	VDRSFGRS RYTLDY (SEQ ID NO 74)	RASQSVSS YLA (SEQ ID NO 14)	DASNRA T (SEQ ID NO 17)	QQRSNWP LT (SEQ ID NO 20)
GC5B370 GC5B597	SYGIS (SEQ ID NO 63)	GIPIFGNIN YAQKFQG (SEQ ID NO 69)	VSRRFKRF AIFYFDY (SEQ ID NO 75)	KSSQSVLY SSNNKNYL A (SEQ ID 98)	WASTRE S (SEQ ID NO 78)	QQYYSTP LT (SEQ ID 80)
GC5B602	GYSFTGY TMN (SEQ ID NO 64)	LINPYNGD TN (SEQ ID NO 70)	VALRVALD Y (SEQ ID NO 12)	KASQNVAT HVG (SEQ ID NO 15)	SASYRY S (SEQ ID 18)	QQYNRYP YT (SEQ ID NO 21)
GC5B603	SYAMS (SEQ ID NO 65)	AISGSGGST YYADSVKG (SEQ ID NO 68)	SNFLPVVF DY (SEQ ID NO 76)	RASQSVRK SLA (SEQ ID NO 95)	TASNRA T (SEQ ID 79)	QQYFRAPI T (SEQ ID 81)
GC5B601	GFSLTSY NVH (SEQ ID NO 66)	VIWAGGST NYNSALMS (SEQ ID NO 71)	DGIRLRFAY (SEQ ID NO 77)	KASQNVAT HVG (SEQ ID NO 15)	SASYRY S (SEQ ID NO 18)	QQYNRYP YT (SEQ ID NO 21)

[0495] 表29:新GPCR5D抗体组的重链和轻链可变区序列

[0496]

mAb AA ID	VH 氨基酸序列	SEQ ID NO:	VL 氨基酸序列	SEQ ID NO
GC5B382	EVQLLES GGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFS DYGMH WVRQAPGKGLEWVSAIK YSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRAESGPGL DYWGQGT LVTVSS	82	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCKSSQSVLYSS NNKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFLTIS SLQAEDVAVYYCQQY YSTPLTFGQGTKVEIK	92

[0497]

GC5B379	EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSNYWMS WVRQAPGKGLEWVSGIS YSGGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKAAWDFGR RAVRLDYWGQGLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGQ GTKVEIK	56
GC5B373	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIYYP GDS DTRYSPSFQGV TISA DKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARIGFYGRSFRIF DYWGQGLVTVSS	84	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPLTFG QGTKVEIK	57
GC5B376	EVQLVQSGAEVKKPGESL KISCKGSGYSFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIYYP GDS DTRYSPSFQGV TISA DKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARVYSGGRHK ALFDYWGQGLVTVSS	85	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPLTFG QGTKVEIK	57
GC5B385	EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSGYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVDRSFRGRS RYTLDYWGQGLVTVSS	86	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPLTFG QGTKVEIK	57
GC5B370 GC5B597	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYGISW VRQAPGQGLEWMGGIPI FGNINYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARVSRFRKFAY YFDYWGQGLVTVSS	87	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCKSSQSVLYSS NNKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQY YSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B602	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYSFTGYTM NWVRQAPGQGLEWMGLI NPYNGDTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARVALRV ALDYWGQGLVTVSS	88	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVATHV GWYQQKPGKAPKRLI YSASYRYSVPSRFSGS GSGTEFTLTISNLQPED FATYYCQQYNRYPYTF QGTKLEIK	58

[0498]	GC5B603	EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKSNFLPVVFD YWGQGLTVTVSS	89	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVRKS AWYQQKPGQAPRLLIY TASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQYFRAPITFGQ GTKVEIKK	93
	GC5B601	QVTLKESGPVLVKPTETL TLTCTVSGFSLTSYNVHW IRQPPGKALEWLAVIWAG GSTNYNSALMSRLTISKD TSKSQVVLMTNMRAED TATYYCARDGIRLRFAYW QGGLTVTVSS	91	EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSCKASQNVATHV GWYQQKPGQAPRLLIY SASYRYSGIPARFSGSG SGTEFTLTISSLQSEDFA VYYCQQYNRYPTFG QGTKLEIK	94

[0499] 针对H929细胞的ADCC活性(表30和31)。简而言之,将多发性骨髓瘤细胞用钙黄绿素-AM在室温下标记30分钟并在两次PBS洗涤后以 0.2×10^6 /mL重悬于RPMI+10%HI FBS中。将PBMC解冻并在PBS洗涤后以每mL 3×10^6 个细胞重悬于RPMI生长培养基中。使10000或50000个靶细胞与100000或2500000个PBMC在抗体存在下混合,并在CO₂培养箱中于37°C温育3小时。在温育之后,将平板以200g离心4分钟,将100u1的上清液转移到新96孔板中,在485/535nm处测量荧光强度。对RFU值作图以计算裂解百分比。

[0500] 表30:具有IgG1 Fc的抗GPC5D mAb对H929细胞的抗体依赖性细胞毒性:

GPC5D IgG4 蛋白质 ID	GPC5D IgG1 蛋白质 ID	H929 细胞毒性 EC ₅₀ (pM)	%裂解	
GC5B243	GC5B382	1346.5	29.14	
GC5B285	GC5B379	87.4	17.3	
GC5B332	GC5B373	244.2	32.94	
GC5B164	GC5B376	22.0	32.21	
[0501] GC5B320	GC5B385	944.0	29.73	
GC5B251	GC5B370	24.2	8	
GC5B515	GC5B602	27721.7	20	
GC5B420	GC5B603	3.4	16	
GC5B483	GC5B599	7.4	14	
GC5B540	GC5B601	169.6	14	
GC5B465	GC5B598	2.0	12	
[0502]	GC5B251	GC5B597	705.1	10

[0503] 表31:H929细胞的抗体依赖性细胞毒性和T-细胞介导的细胞毒性的比较

		ADCC	CD3 重定向
GPRC5D IgG1 蛋白质 ID	GPRC5D×CD3 DuoBody ID	H929 细胞毒性 EC50 (pM)	T 细胞介导的 H929 细胞毒性 EC50 (nM)
[0504] GC5B382	GCDB40	1346.5	1.2 ± 0.83
GC5B379	GCDB43	87.4	0.39 ± 0.07
GC5B373	GCDB45	244.2	2.36 ± 0.84
GC5B376	GCDB35	22.0	1.39 ± 0.75
GC5B385	GCDB44	944.0	>10
GC5B370	GCDB41	24.2	>10
GC5B602	GCDB72	27721.7	0.15
GC5B603	GCDB48	3.4	0.17
GC5B599	GCDB61	7.4	1.51
GC5B601	GCDB69	169.6	0.58
GC5B598	GCDB53	2.0	0.24

[0505] 观察到一定范围的效力,该范围在2pM至27.7nM内。结合亲和力不一定能预测ADCC测定中的功效。例如,GC5B382和GC5B379具有与人GPRC5D细胞类似的结合亲和力,但在ADCC测定中针对H929细胞的细胞毒性有15×差异。相似地,如GPRC5D×CD3双特异性分子的细胞毒性诱导不能预测ADCC测定中的效能,如由GC5B370和GC5B602所例示。当格式化为CD3双特异性分子时,GC5B602 (GCDB63) 具有针对H929细胞的亚纳摩尔效力,而GC5B370作为CD3双特异性分子 (GCDB41) 基本上失活。相同的v区在格式化为IgG1 mAb时导致ADCC测定中的相反观察,GC5B370观察为相比于GC5B602更有效(约1100×倍)。

[0506] 序列表简述

SEQ ID NO:	类型	物种	说明	序列
[0507] 1	PRT	人	GC5B81、 GC5B427、 GC5B428、 GC5B430、 GC5B431 和	SYAIS

[0508]

			GC5B429-HCDR1	
2	PRT	人	GC5B379、 GC5B598、 GC5B465、 GC5B285、 GC5B463、 GC5B432、 GC5B433、 GC5B434、 GC5B435、 GC5B436、 GC5B461、 GC5B462、 GC5B437、 GC5B438、 GC5B439、 GC5B440、 GC5B441、 GC5B442、 GC5B443、 GC5B444、 GC5B464、 GC5B445、 GC5B446、 GC5B447、 GC5B448、 GC5B449 和 GC5B450 -HCDR1	NYWMS
3	PRT	人	GC5B483、 GC5B473、 GC5B478、 GC5B488、 GC5B493 和 GC5B498 -HCDR1	SYFIG
4	PRT	人	GC5B596-HCDR1	GYTMN
5	PRT	人	GC5B81、 GC5B427、 GC5B428、 GC5B430、 GC5B431 和 GC5B429-HCDR2	GIPIFGTANYAQKFQG
6	PRT	人	GC5B598、 GC5B465、 GC5B432 和	GISYSGGSKYYASSVKG

			GC5B447-HCDR2	
7	PRT	人	GC5B599、 GC5B483、 GC5B481、 GC5B482、 GC5B484、 GC5B485 和 GC5B503- HCDR2	IIYPGKSDTRYSPSFQG
8	PRT	人	GC5B596-HCDR2	LINPYNSDTNYAQLQGG
9	PRT	人	GCB581-HCDR3	ESRWGRGYKLD
10	PRT	人	GC5B598、 GCB5465-HCDR3	AAFDGRRRAVRLD
11	PRT	人	GC5B376、 GC5B599、 GC5B483、 GC5B164、 GC5B471、 GC5B472、 GC5B473、 GC5B474、 GC5B475、 GC5B476、 GC5B477、 GC5B478、 GC5B479、 GC5B480、 GC5B481、 GC5B482、 GC5B484、 GC5B485、 GC5B486、 GC5B487、 GC5B488、 GC5B489、 GC5B490、 GC5B491、 GC5B492、 GC5B493、 GC5B494、 GC5B495、 GC5B496、 GC5B497、 GC5B498、 GC5B499、	VYSFGGRHKALFDY

[0509]

[0510]

			GC5B500、 GC5B501、 GC5B502、 GC5B503、 GC5B504 和 GC5B505 -HCDR3	
12	PRT	人	GC5B602、 GCB596-HCDR3	vALRVALDY
13	PRT	人	GC5B382、 GC5B379、 GC5B370、 GC5B598、 GC5B597、 GC5B81、 GC5B465-LCDR1	rasqsissyln
14	PRT	人	GC5B373、 GC5B376、 GC5B385、 GC5B599、 GC5B483-LCDR1	rasqsvssyla
15	PRT	人	GC5B605、 GC5B601、 GC5B596-LCDR1	KASQNVATHVG
16	PRT	人	GC5B81、 GC5B465、 GC5B379、 GC5B598-LCDR2	aasslqs
17	PRT	人	GC5B373、 GC5B376、 GC5B385、 GC5B599、 GC5B483-LCDR2	dasnrat
18	PRT	人	GC5B602、 GC5B601、 GC5B596-LCDR2	SASYRYS
19	PRT	人	GC5B379、 GC5B598、 GC5B81、 GC5B465-LCDR3	qqstpl
20	PRT	人	GC5B373、 GC5B376、 GC5B385、 GC5B599、 GC5B483-LCDR3	qqrsnwpl

21	PRT	人	GC5B602、 GC5B601、 GC5B596-LCDR3	QQYNRYPYT
22	PRT	人	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGII LESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQ DCSQWNVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLF GVLFALCFSCLLAHASNLVKLVRGC VSFSWTTILCIAIGCSLLQ IIIA TEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQL NVDFVLLVYVLFMLALFFVSKAT FCGPCENWKQHGRLLIFITV LFSIIIWVWVISMILLRGNPQFQRQPQ WDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPE LCILYRSCRQECPLQGNAC PVTAYQHSFQVENQELSRARDSGA EEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFI PQAKLSPQQDAGGV
23	PRT	食蟹 猴	GPRC5D	mykdciestgdyflpcdsegpwgivleslailgivvti lllafllmrkiqdcsqwnvlptqllflflsv lglfglafafiiqlnqqtapvryflfgvlfalcfscllahas nlvklvrgrvsfswttilciaigcsllqviiayvlimtr gmmfvhmtpyqlnvdfvllvyvlfmlaltffvskat fcgpcenwkqhgrlifitvlsiiiwvwwismllrgnp qfqrppqwddpvvcialvtna wvfllyivpelcilyrscrqecpsqghacpvtayqrsf qvenqelsrardsdgaeedvaltsfgtpiqpqtvdptqe cfipraklspqqdagv
24	PRT	小鼠	GPRC5D	MYEDCVKSTEDY YLFCDNEGPAI VLESLAVIGIVVTILLLLAFLFLMRK VQDCSQWNVLPTQFLLLAV LGLFGLTFAFIIQLNHQTAPVRYFLF GVLFAICFSCLLAHASNLVKLVRGR VSFCWTTILFIAIGVSLQ TIIAIEYVTLIMTRGLMFEHMTPYQL NVDFVCLLIYVLFMLALFFVSKAT FCGPCENWKQHGRLLIFATV LVSIWVWVWVISMILLRGNPQLQRQPH WDDAVICIGLVTNAWVFLLIYIPEL SILYRSCRQECPTQGNVC QVPVYQRSFRMDTQEPTRARDSG AQEDVALTAYGTPIQLQSADPSREY LIPSATLSPQQDAGL
25	PRT	人	CD3B219-重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGL VTVSS

[0511]

[0512]

26	PRT	人	CD3B219-轻链	QTVVTQEP ^S LTVSPGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVL
27	PRT	人	GC5B373、 GC5B376、 GC5B164、 GC5B501、 GC5B502、 GC5B503、 GC5B504 和 GC5B505 -HCDR1	SYWIG
28	PRT	人	GC5B379、 GC5B285、 GC5B442、 GC5B443、 GC5B444、 GC5B464 和 GC5B445-HCDR2	GISYSGGSKYYAD ^S VK ^G
29	PRT	人	GC5B373、 GC5B376、 GC5B164、 GC5B496、 GC5B497、 GC5B498、 GC5B499 和 GC5B500-HCDR2	IIYPG ^D _S DTRYSPSFQ ^G
30	PRT	人	GC5B379、 GC5B285、 GC5B446、 GC5B447、 GC5B448、 GC5B449 和 GC5B450-HCDR3	AAWDFGRR ^A VRLDY
31	PRT	人	GC5B427-HCDR3	ESRYR ^G YKLDY
32	PRT	人	GC5B428-HCDR3	ESRV ^R YKLDY
33	PRT	人	GC5B430-HCDR3	ESRGR ^G YKLDY
34	PRT	人	GC5B431-HCDR3	ESR ^A RGYKLDY
35	PRT	人	GC5B429HCDR3- VH	ESRFR ^G YKLDY
36	PRT	人	GC5B471、 GC5B476、	SY ^Y IG

[0513]

			GC5B486、 GC5B481、 GC5B491 和 GC5B496、 - HCDR1	
37	PRT	人	GC5B497、 GC5B472、 GC5B477、 GC5B482、 GC5B487 和 GC5B492-HCDR1	SYVIG
38	PRT	人	GC5B474、 GC5B479、 GC5B484、 GC5B489、 GC5B494 和 GC5B499-HCDR1	SYGIG
39	PRT	人	GC5B475、 GC5B480、 GC5B485、 GC5B490、 GC5B495 和 GC5B500-HCDR1	SYAIG
40	PRT	人	GC5B471、 GC5B472、 GC5B473、 GC5B474、 GC5B475 和 GC5B501-HCDR2	IYPGASDTRYSPSFQG
41	PRT	人	GC5B476、 GC5B477、 GC5B478、 GC5B479、 GC5B480 和 GC5B502 -HCDR2	IYPGSSDTRYSPSFQG
42	PRT	人	GC5B486、 GC5B487、 GC5B488、 GC5B489、 GC5B490 和 GC5B504-HCDR2	IYPGESDTRYSPSFQG
43	PRT	人	GC5B491、 GC5B492、 GC5B493、	IYPGYSDTRYSPSFQG

[0514]

			GC5B494、 GC5B495 和 GC5B505-HCDR2	
44	PRT	人	GC5B463 和 GC5B446-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>A</u> SVKG
45	PRT	人	GC5B433、 GC5B434 和 GC5B448-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>K</u> SVKG
46	PRT	人	GC5B435、 GC5B436、 GC5B461、 GC5B462 和 GC5B449-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>E</u> SVKG
47	PRT	人	GC5B437、 GC5B438、 GC5B439、 GC5B440、 GC5B441 和 GC5B450-HCDR2	GISYSGGSKYYA <u>Y</u> SVKG
48	PRT	人	GC5B463、 GC5B435、 GC5B437 和 GC5B442-HCDR3	AA <u>Y</u> DFGRRAVRLDY
49	PRT	人	GC5B432、 GC5B433、 GC5B438 和 GC5B443-HCDR3	AA <u>V</u> DFGRRAVRLDY
50	PRT	人	GC5B461、 GC5B440 和 GC5B464-HCDR3	AA <u>G</u> DFGRRAVRLDY
51	PRT	人	GC5B462、 GC5B441 和 GC5B445-HCDR3	AA <u>A</u> DFGRRAVRLDY
52	PRT	人	GC5B81-VH	qvqlvqsgaevkpkpgssvkvscKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGT ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARESRRWGYKL DYWGQGTlvtvss
53	PRT	人	GC5B598、 GC5B465-VH	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWV SGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK AAFDGRRAVRLDYWGQGTlVTVS S
54	PRT	人	GC5B599、 GC5B483-VH	evqlvqsgaevkpkpgeslkiscKGS GYSFTSY FIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGKS

[0515]

				DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYVCARVYSFGGRH KALFDYWGQGTLvtvss
55	PRT	人	GC5B596-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW MGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARVALRVALDYWGQGLTLVTVSS
56	PRT	人	GC5B379、 GC5B598、 GC5B81 and GC5465-VL	diqmtqspsslsasvgrvtitcrasqsissylnwyqq kpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdfltlisslq pedfatyycqqsysptlftgqgkveik
57	PRT	人	GC5B373、 GC5B376、 GC5B385、 GC5B599、 GC5B483-VL	eivltqspatlspsgeratlscrasqsvssylawyqqkp gqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdfltlisslepe dfavyycqqrnwpplftgqgkveik
58	PRT	人	GC5B596、 GC5B602-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVATHVGVYQQKPGKAPKRLIYS ASYRYSQVPSRFSQSGSGTEFTLTIS NLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQ GTKLEIK
59	PRT	人	IgG4PAA	astkgpsvfplapcsrstsastaalgcclvkdyppevtv swngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgt ktytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcpapea aggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedp evqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvsvltv lhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqpre pqvytlppsqeemtknqvsltlclvkgfypsdiavewe sngqpennyktpvldsdsqfflysrldkrsrwqeg nvfscsvmhealhnhytqkslslslgk
60	PRT	人	IgG1	Astkgpsvfplapsskstsggtaalgcclvkdyppevt vswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslg tqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpa pellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe dpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvs vltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakg qprepqvytlppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiav ewesngqpennyktpvldsdsqfflyskltdksr wqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslslgk
61	PRT	人	GC5B382-HCDR1	DYGMH
62	PRT	人	GC5B385-HCDR1	GYAMS
63	PRT	人	GC5B370、 GC5B597-HCDR1	SYGIS
64	PRT	人	GC5B602-HCDR1	GYSFTGYTMN

[0516]

65	PRT	人	GC5B603-HCDR1	SYAMS
66	PRT	人	GC5B601-HCDR1	GFSLTSYNVH
67	PRT	人	GC5B382-HCDR2	AIKYSGGSTYYADSVKG
68	PRT	人	GC5B603, GC5B385-HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
69	PRT	人	GC5B370, GC5B597-HCDR2	GIIPIFGNINYAQKFQG
70	PRT	人	GC5B602-HCDR2	LINPYNGDTN
71	PRT	人	GC5B601-HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS
72	PRT	人	GC5B382-HCDR3	RAESGPGLDY
73	PRT	人	GC5B373-HCDR3	IGFYGRSFRIFDY
74	PRT	人	GC5B385-HCDR3	VDRSFGRSRYTLDY
75	PRT	人	GC5B370, GC5B597-HCDR3	VSRRFKRFAYYFDY
76	PRT	人	GC5B603-HCDR3	SNFLPVVFDY
77	PRT	人	GC5B601-HCDR3	DGIRLRFAY
78	PRT	人	GC5B382、 GC5B370、 GC5B597-LCDR2	wastres
79	PRT	人	GC5B603-LCDR2	TASNRAT
80	PRT	人	GC5B382、 GC5B370、 GC5B597-LCDR3	qqyystplt
81	PRT	人	GC5B603-LCDR3	QQYFRAPIT
82	PRT	人	GC5B382-VH	evqllesggglvqpggsrlscaASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLDYWGQGTLvtvss
83	PRT	人	GC5B379-VH	evqllesggglvqpggsrlscaASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRRAVRLDYWGQGTLvtvss
84	PRT	人	GC5B376-VH	evqlvqsgaevkpkgeslkiscKSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARIGFYGRSFRIFDYWGQGTLvtvss

[0517]

85	PRT	人	GC5B376-VH	evqlvqsgaevkpkgeslkiscKGSFGYSFTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTA YLQ WSSLKASDTAMY YCARVYSFGGRH KALFDYWGQGT Lvtvss
86	PRT	人	GC5B385-VH	evqllesggglvqpggsrlscaASGFTFSGYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGRS RYTLDYWGQGT Lvtvss
87	PRT	人	GC5B370, GC5B597-VH	qvqlvqsgaevkpkgs svkvsckASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGNI NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCARVSRRFKRFAY YFDYWGQGT Lvtvss
88	PRT	人	GC5B602-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW MGLINPYNGDTNYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARVALRVALDYWGQGT LVTVSS
89	PRT	人	GC5B603-VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKS NFLPVVFDYWGQGT LVTVSS
90	DNA	人	GC5B596-轻链	Atgcggggtgctggcccagctgctgggactgctgctgct gtgcttccctggcgccagatgcgacatccagatgacc agagccccagcagcctgagcgccagcgtgggcgacc gggtgaccatcacctgcaaggccagccagaacgtggc caccacgtgggctgtaccagcagaagccccggcaag gccccaaaggctgatctacagcgccagctaccgta cagcggcgtgccagccggtcagcggcagcggcag cggcaccgagttcacctgaccatcagcaacctgcagc ccgaggacttcgccactactactgccagcagtacaac cggtagccctacaccttcggccagggcaccagctgga gatcaagcgtacgggtgctgcaccatctgtctcatctc ccgcatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctg ttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggcaa agtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggta actcccaggagagtgacagagcaggacagcaagga cagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagca aagcagactacgagaacacaaagtctacgcctcggaa gtcaccatcagggcctgagctcggcgtcacaagag cttcaacaggggagagtggtga
91	PRT	人	GC5B601-VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVS

[0518]

				GFSLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAV IWAGGSTNYNSALMSRLTISKDTSK SQVVLMTNMRAEDTATYYCARDG IRLRFAYWGQGLTVTVSS
92	PRT	人	GC5B382、 GC5B597、 GC5B370 -VL	divmtqspdslavslgeratinckssqsvlyssnnkny lawyqqkpgppklliywastresgvpdrfsgsgsgt dfltlisslqaedvavyycqqyystpltfqgqtkveik
93	PRT	人	GC5B603-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTA SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQGTK VEIKK
94	PRT	人	GC5B601-VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLCKAS QNVATHVGWYQQKPGQAPRLLIYS ASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLISS LQSEDFAVYYCQQYNRYPTYTFGQG TKLEIK
95	PRT	人	GC5B603-LCDR1	RASQSVRKSLA

[0519]

96	DNA	人	GC5B596-重链	atggcctgggtctggaccctgctgttctctgatggccgct gcccagagcatccaggcccaggtgcagctggtgcaga gcggcgccgaggtgaagaagcccggcgcagcgtga aggtgagctgcaaggccagcggctacagcttcaccgg ctacacatgaactgggtgaggcaggccccggccag ggcctggagtggatggcctgatcaaccctacaacag cgacaccaactaccccagaagctgcagggccgggtg accatgaccaccgacaccagcaccagcaccgcctcat ggagctgcggagcctgcggagcgcgacaccgccgt gtactactgcgccgggtggccctgcgggtggcctgg actactggggccaggccacctggtgaccgtgagcag cgctccaccaagggccatccgtcttccccctggcgc cctgtccaggagcactccgagagcacagccgcct gggctgctggtcaaggactactccccgaaccggtga cgggtgctggaactcaggccctgaccagcggcgt gcacacctccccgctgtctacagtctcaggactctac tcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctg ggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagcc cagcaacaccaaggtggacaagagatgagtcctaat atggtcccccatgccaccatgccagcactgaggcc gccgggggaccatcagcttctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacg tgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccagg tccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacag cacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcacca ggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggct ccaacaaaggcctcccgtctcctcagagaaaacctct ccaaagccaaaggcagccccgagagccacagggtgt acaccctgccccatcccaggaggagatgaccaagaa ccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctacc cagcgacatcggcgtggagtgggagagcaatgggcag ccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgg actccgagcgtctcttctctctacagcaggctaacct ggacaagagcaggtggcagggagggaatgtcttctcat gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacac agaagagcctctcctgtctctgggtaaatga
----	-----	---	------------	---

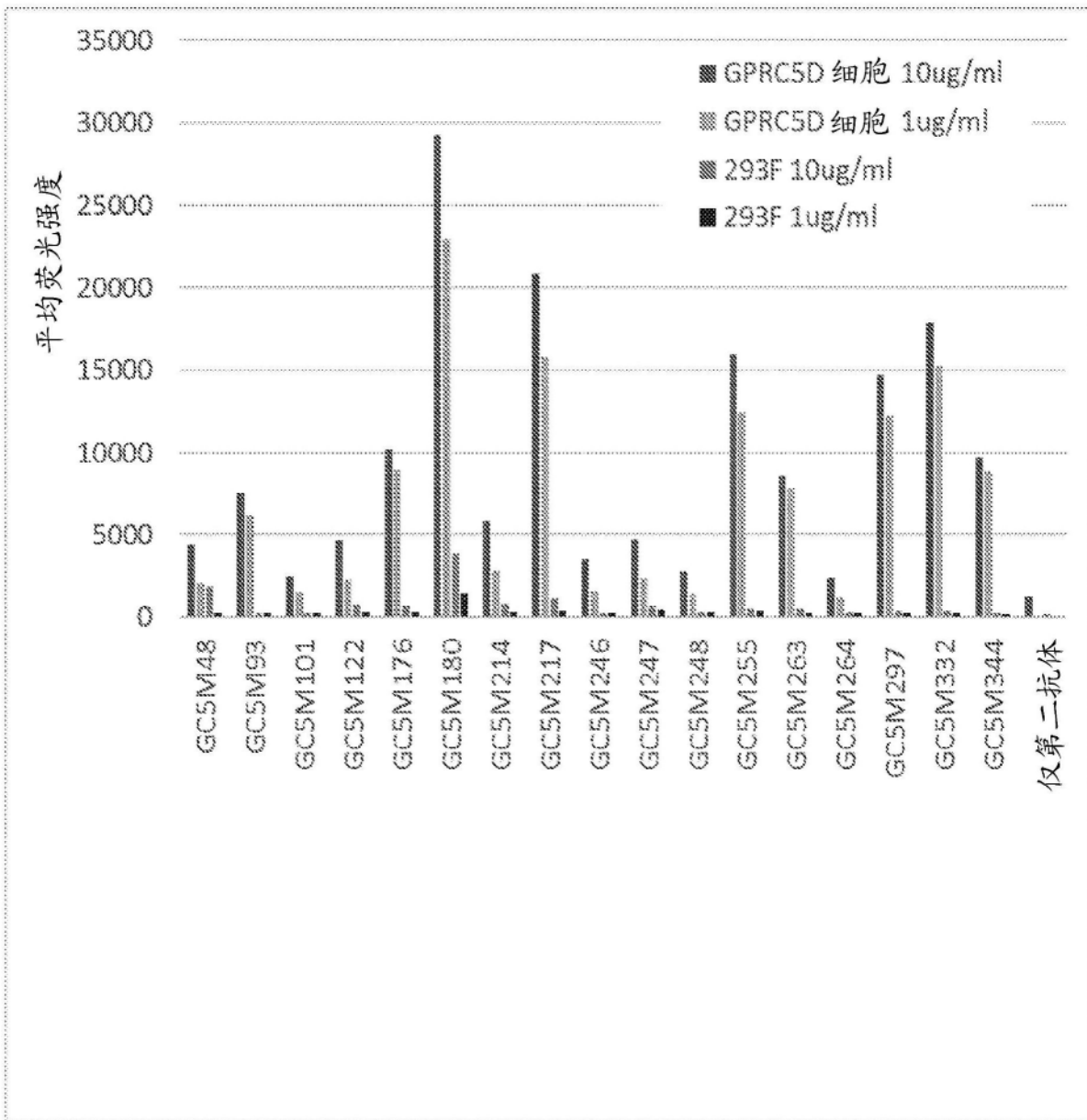


图1

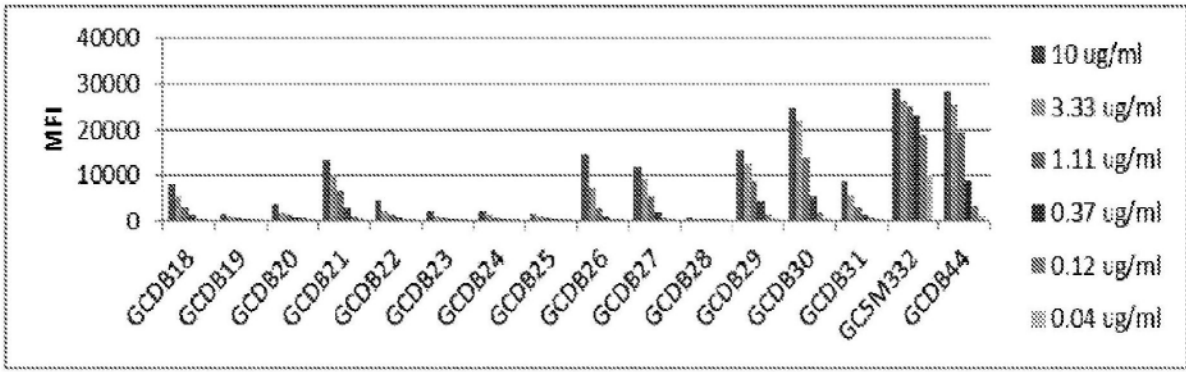


图2

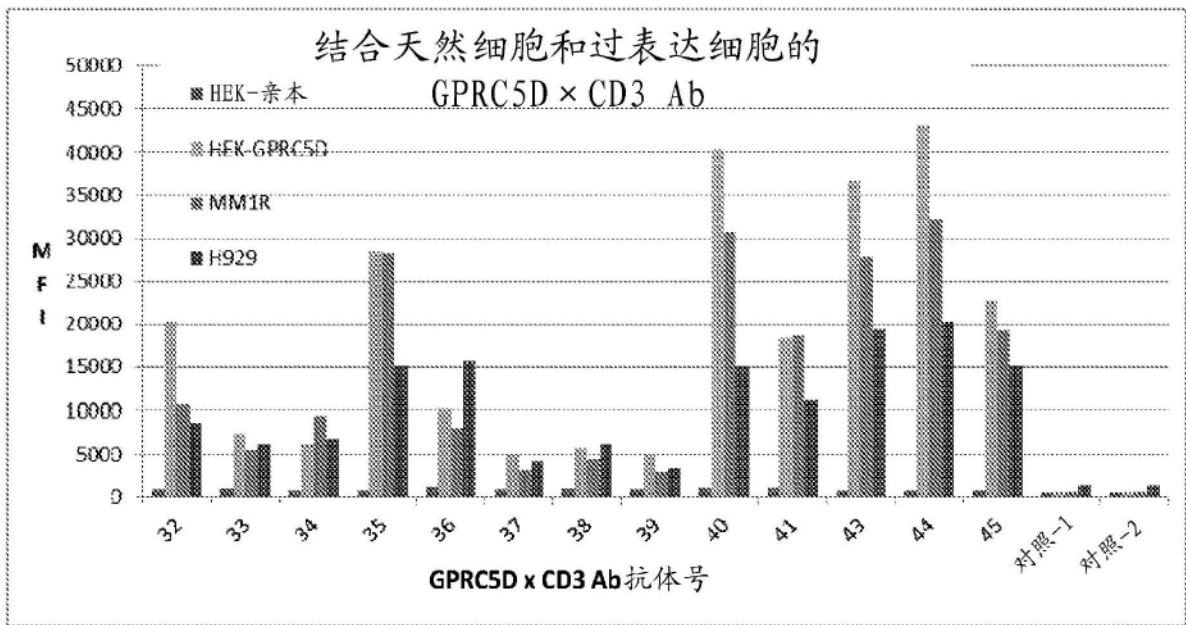


图3

H929细胞, 无Fc阻断剂 (48小时)
T细胞供体: M6521 (n=5)

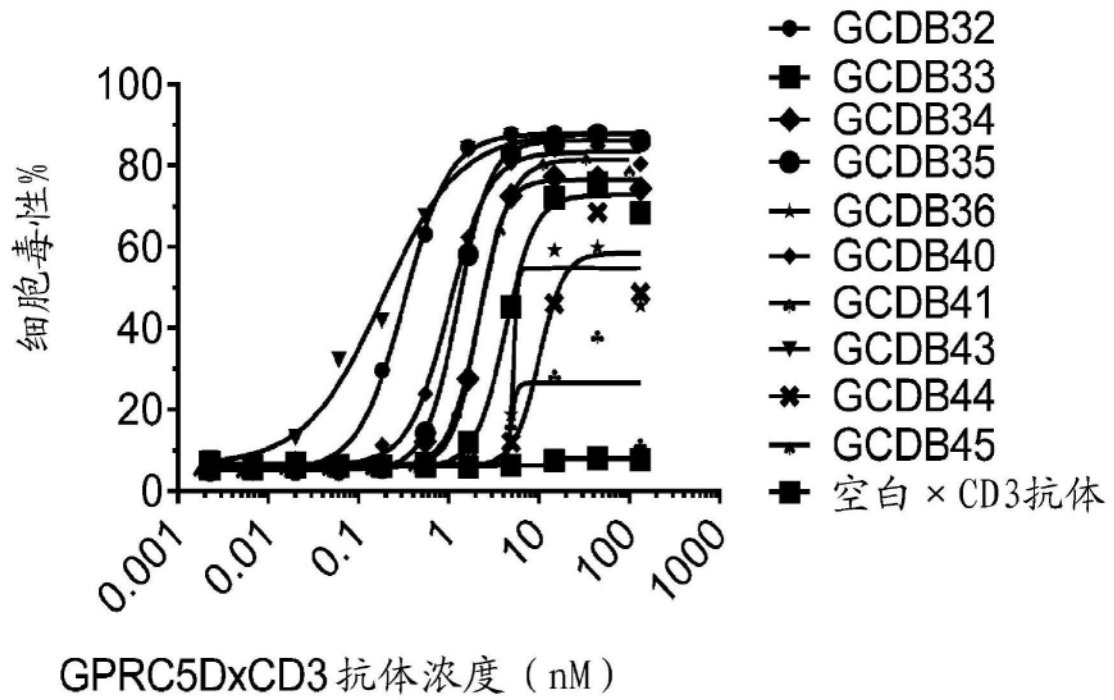


图4A

MMIR细胞, 无Fc阻断剂 (48小时)
T细胞供体: M6521 (n=3)

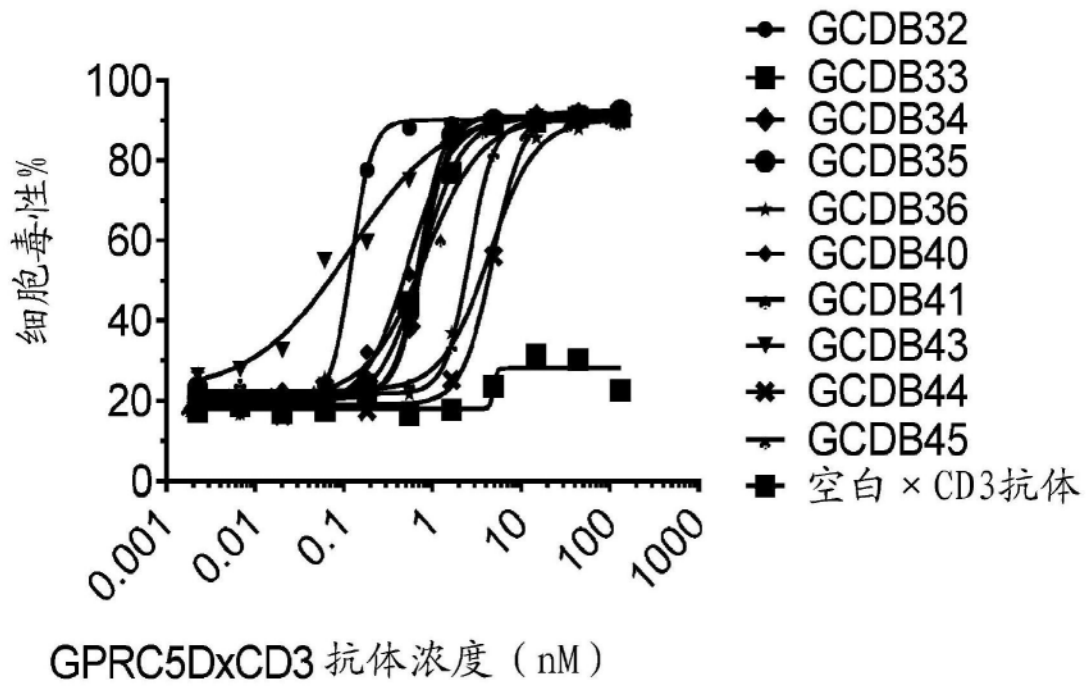


图4B

293F-GPRC5D (Cyno) 细胞, 无Fc阻断剂
(48小时) T细胞供体: M6521 (n=1)

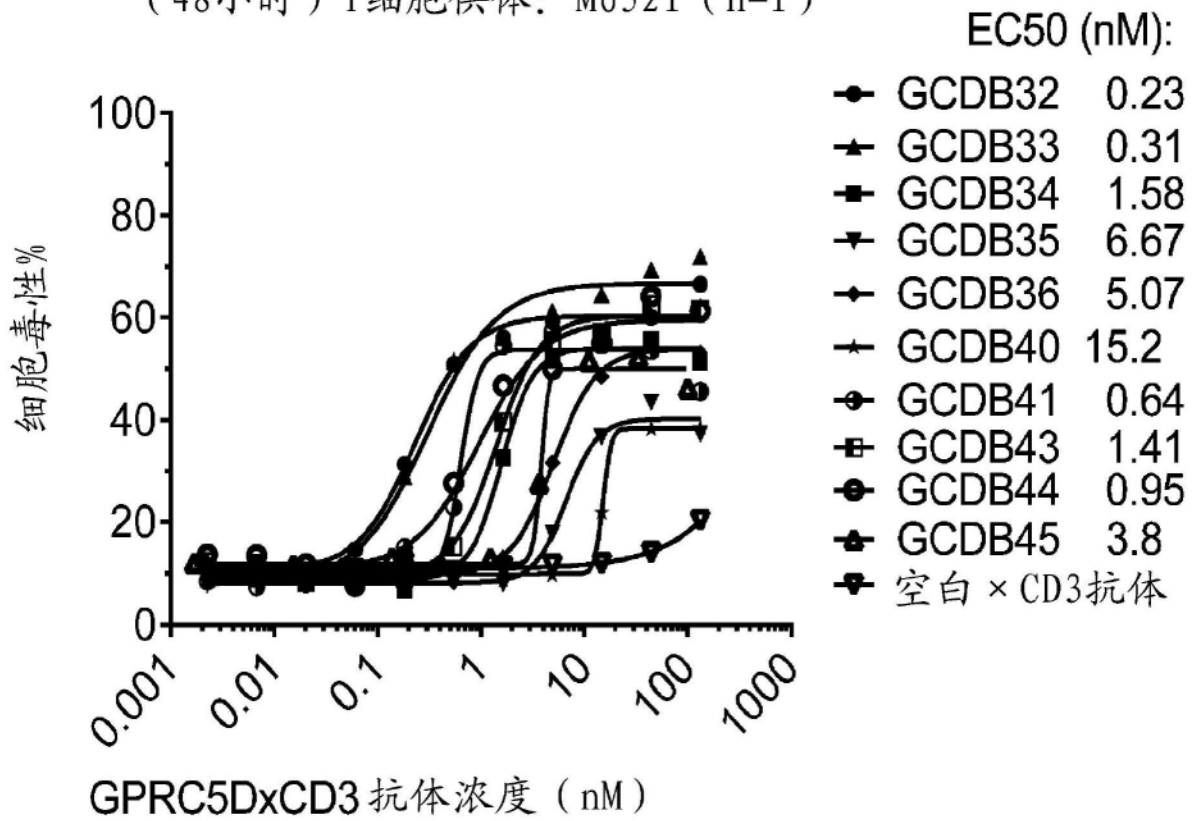


图5A

293F-GPRC5D (Cyno) 细胞, 无Fc阻断剂
 (48小时) T细胞供体: M6521 (n=1)

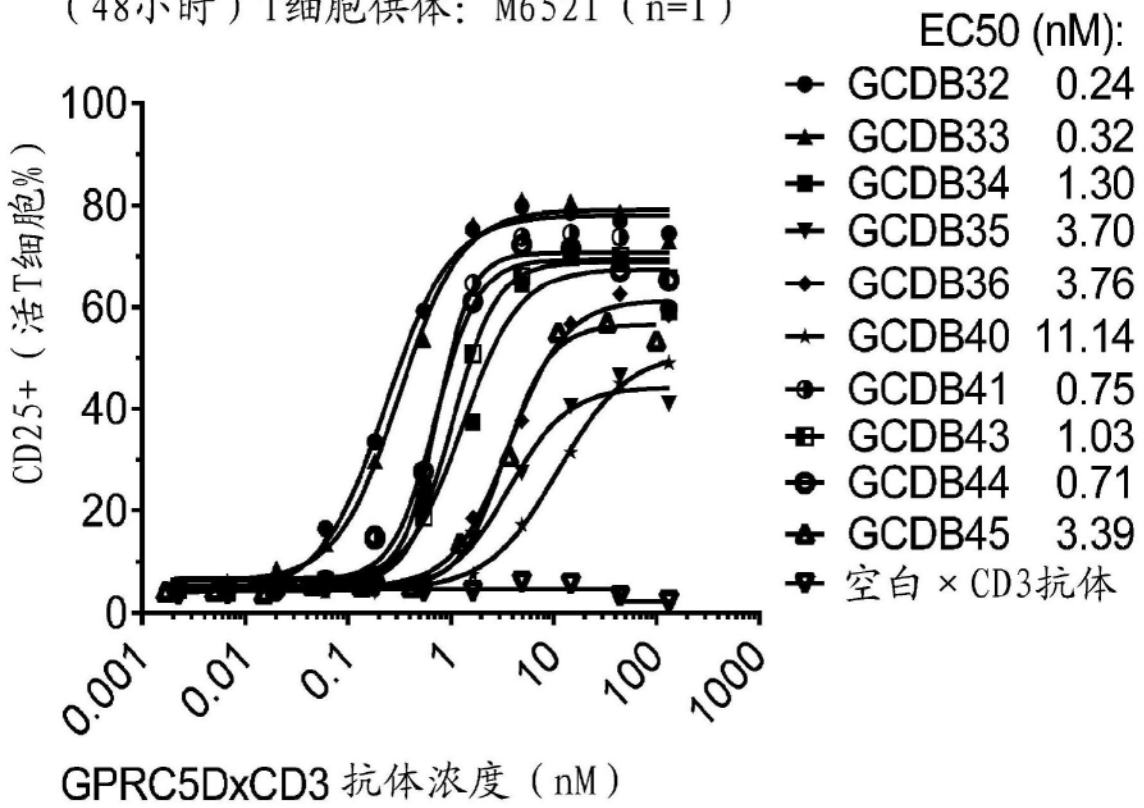
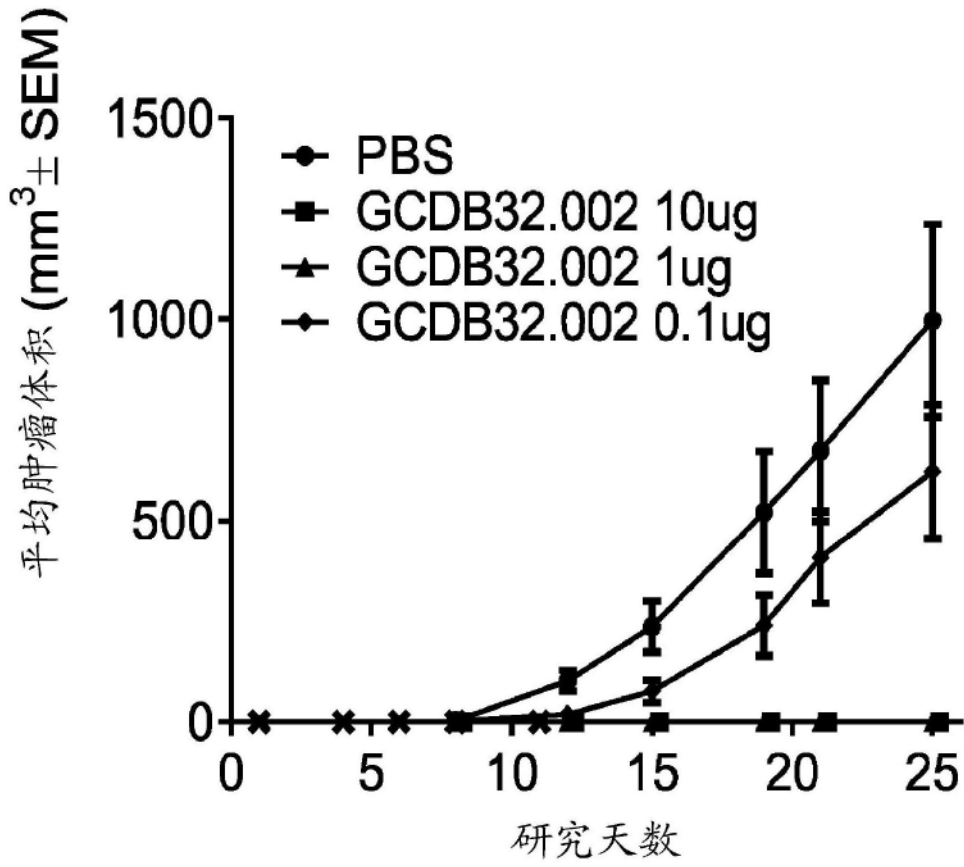
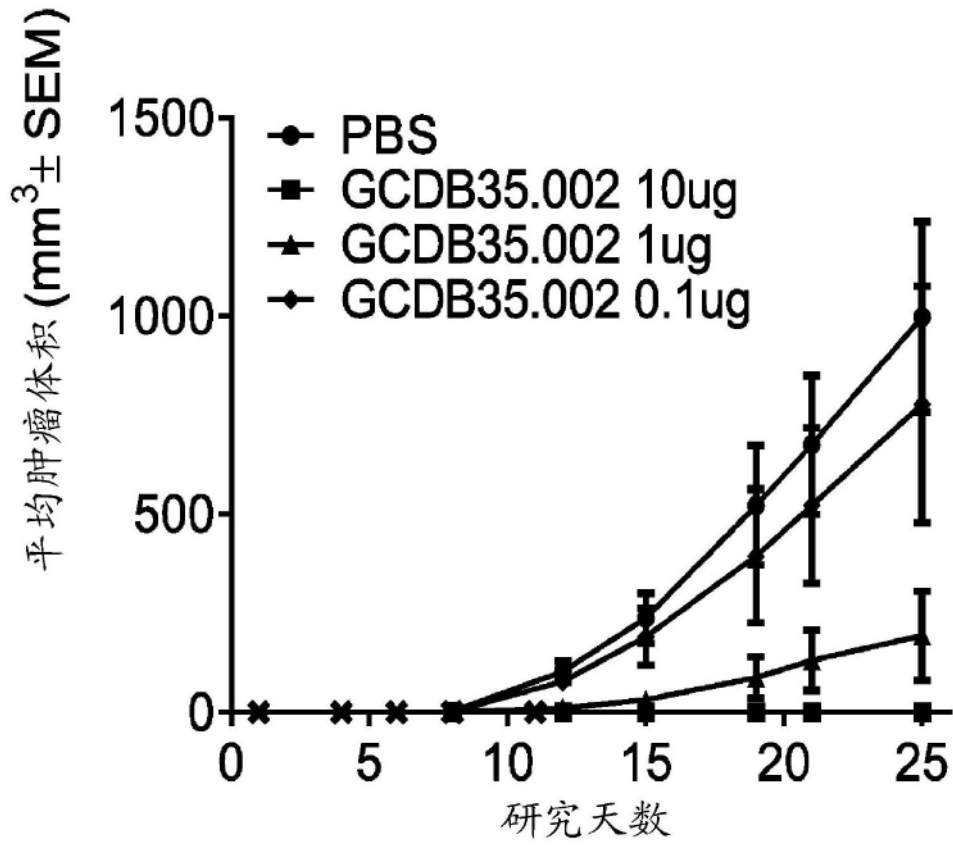


图5B



× GPRC5DxCD3 抗体施用

图6A



× GPRC5DxCD3 抗体施用

图6B

H929细胞; 无Fc阻断剂 (48小时)
T细胞供体: M7077

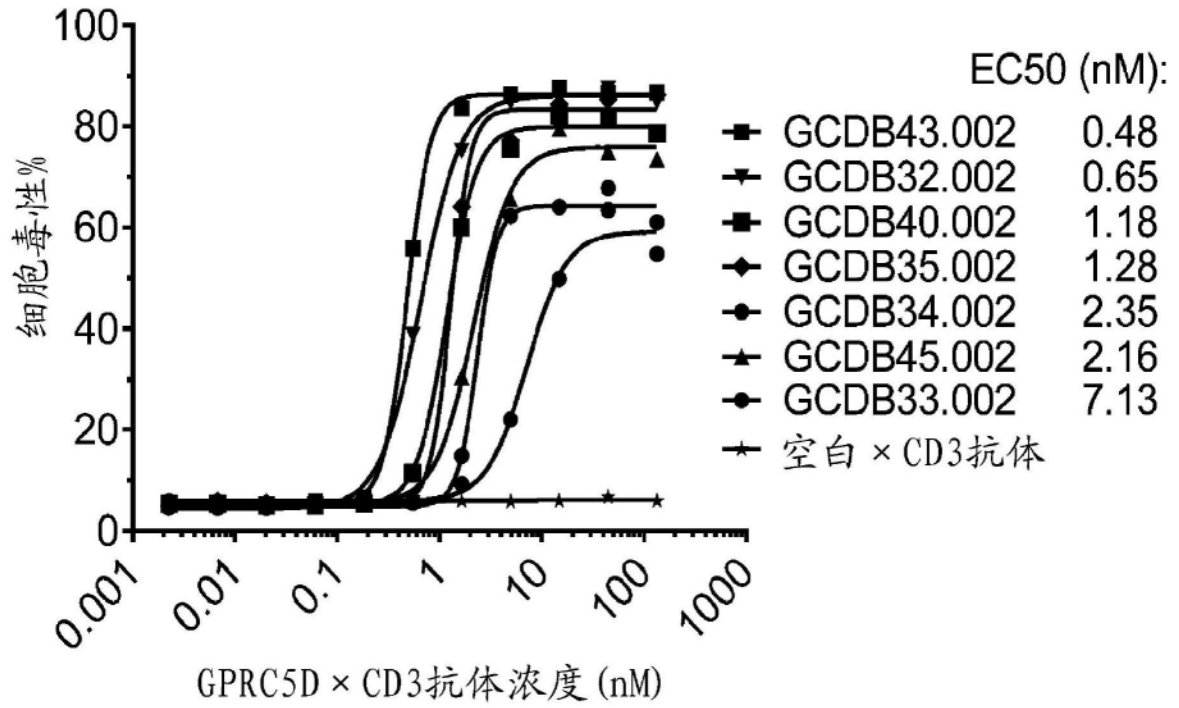


图7A

H929细胞; 含有Fc阻断剂 (48小时)
T细胞供体: M7077

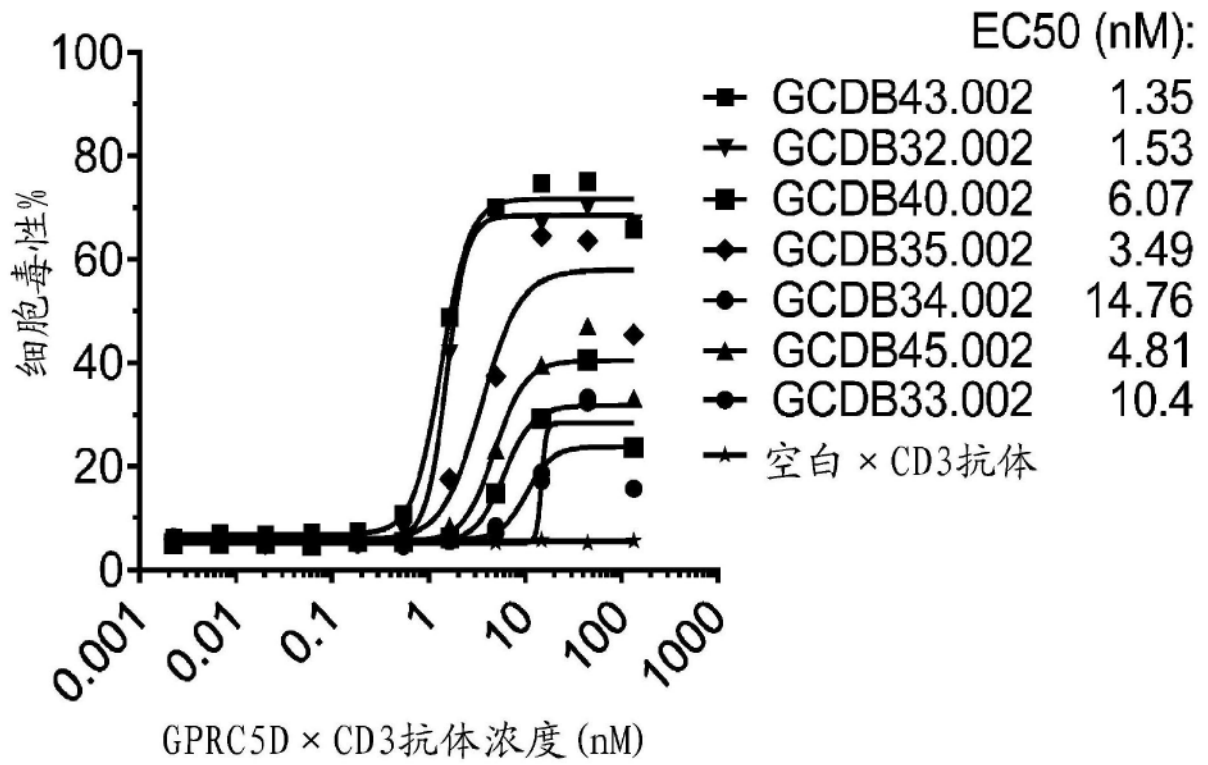


图7B

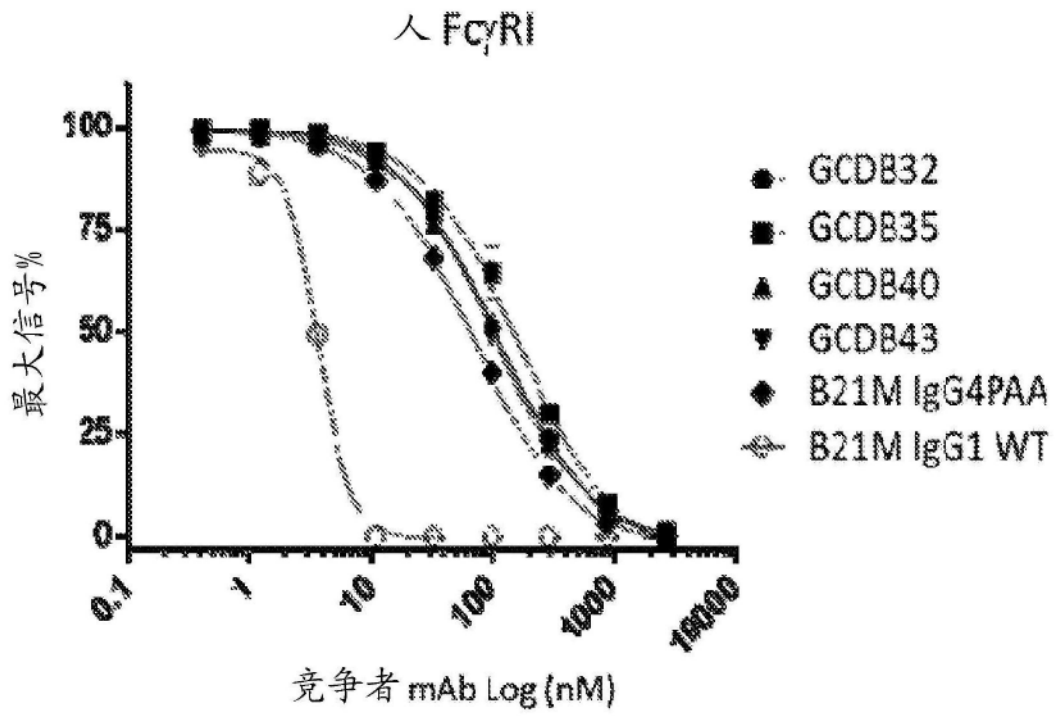


图8A

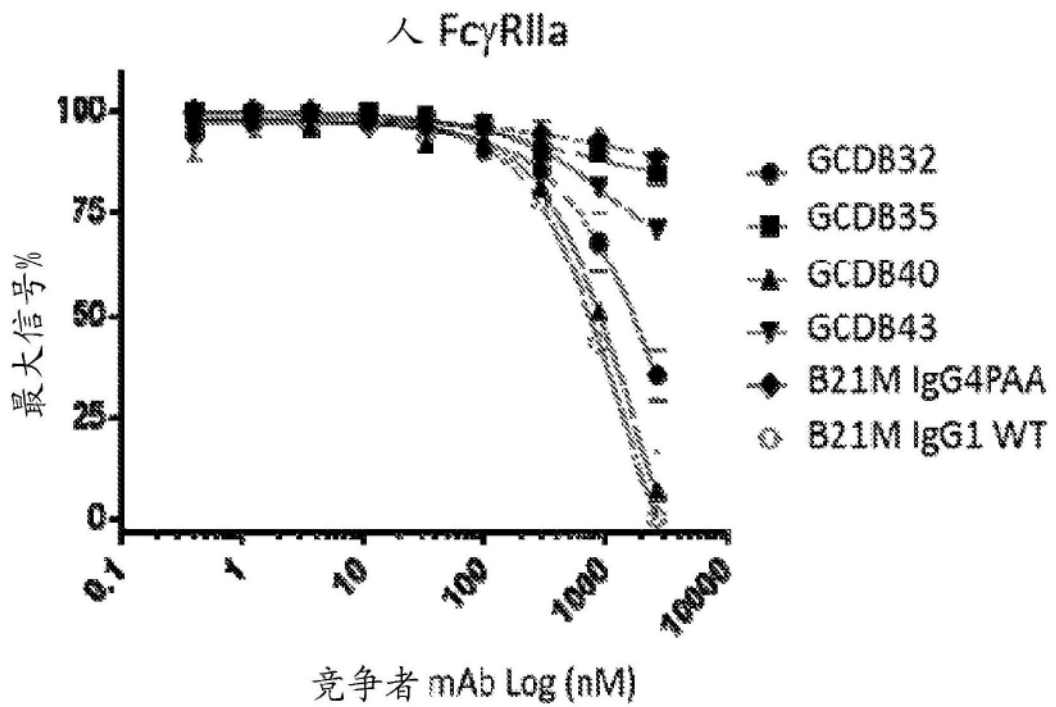


图8B

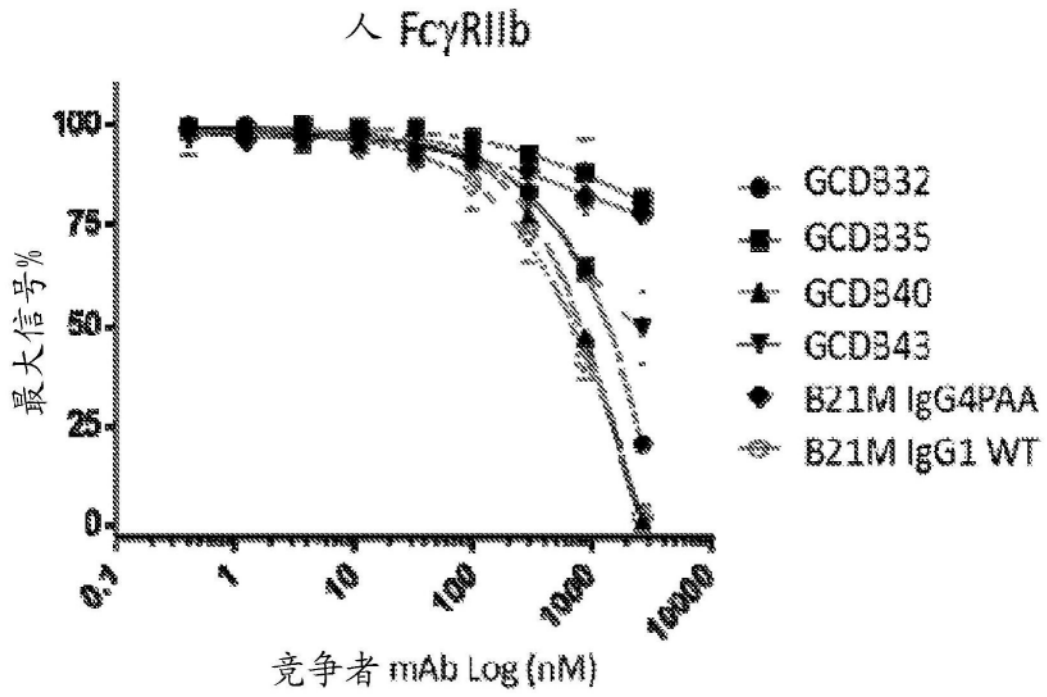


图8C

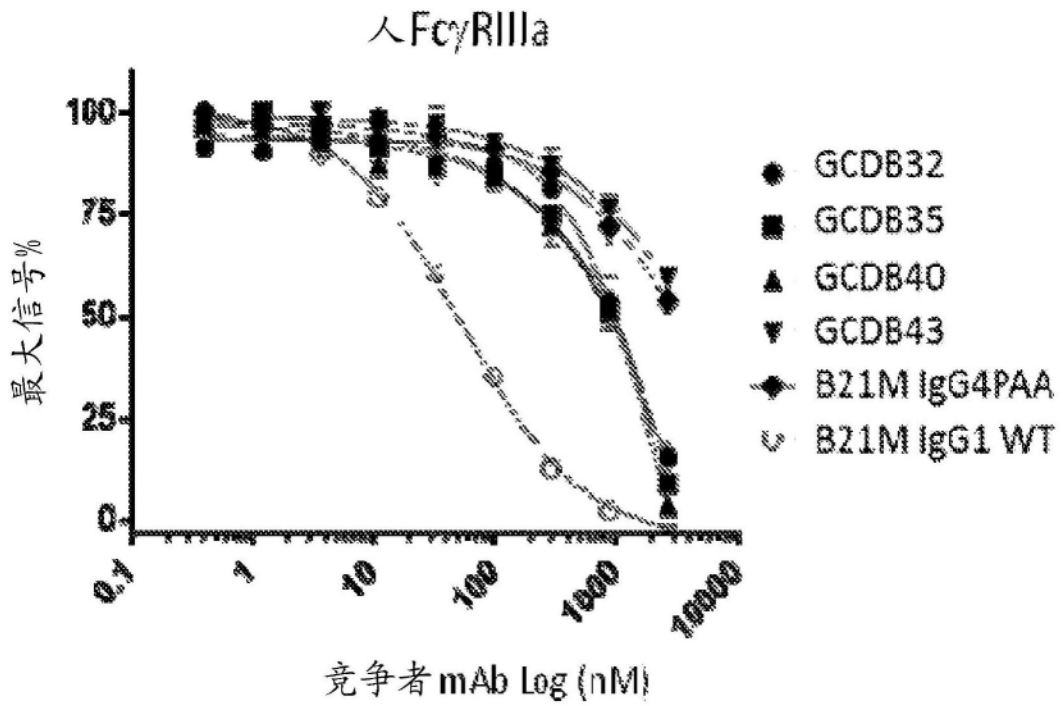


图8D

图9A

GPRC5d RBL细胞的转化

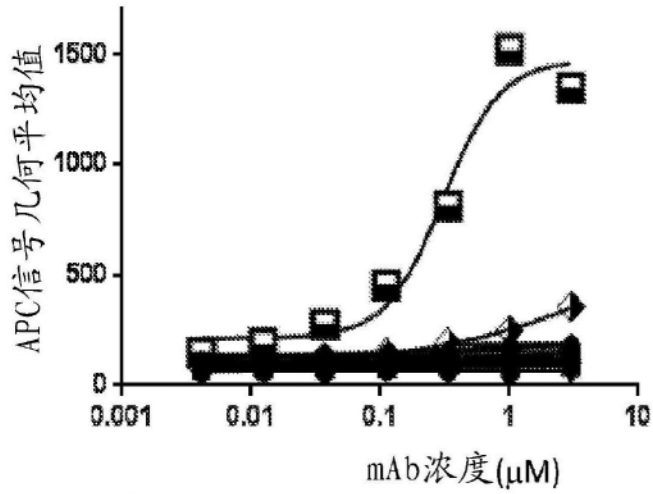
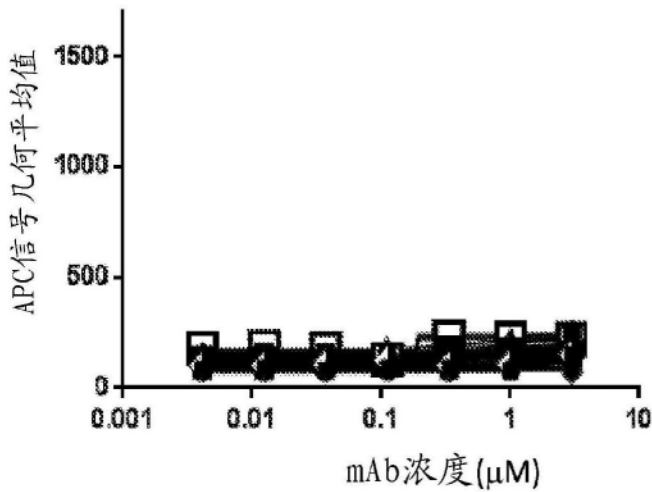


图9B

亲本RBL细胞的转化



- G5CB388 ● G5CB406
- G5CB389 ▲ G5CB407
- ◊ G5CB390 ◆ G5CB408
- ▼ G5CB391 — G5CB409
- ◆ G5CB392 + G5CB410
- G5CB393 ● G5CB411
- G5CB394 ● G5CB412
- ▲ G5CB395 ● G5CB413
- G5CB396 ● G5CB414
- ◆ G5CB397 ● G5CB415
- G5CB398 ■ G5CB416
- ▲ G5CB399 ■ G5CB417
- + G5CB400 ■ G5CB418
- * G5CB401 ▼ 7AAD
- G5CB402 ◆ 表达对照
- G5CB403 ● 同种型对照
- G5CB404 * 模拟阴性对照
- G5CB405 + 第二对照

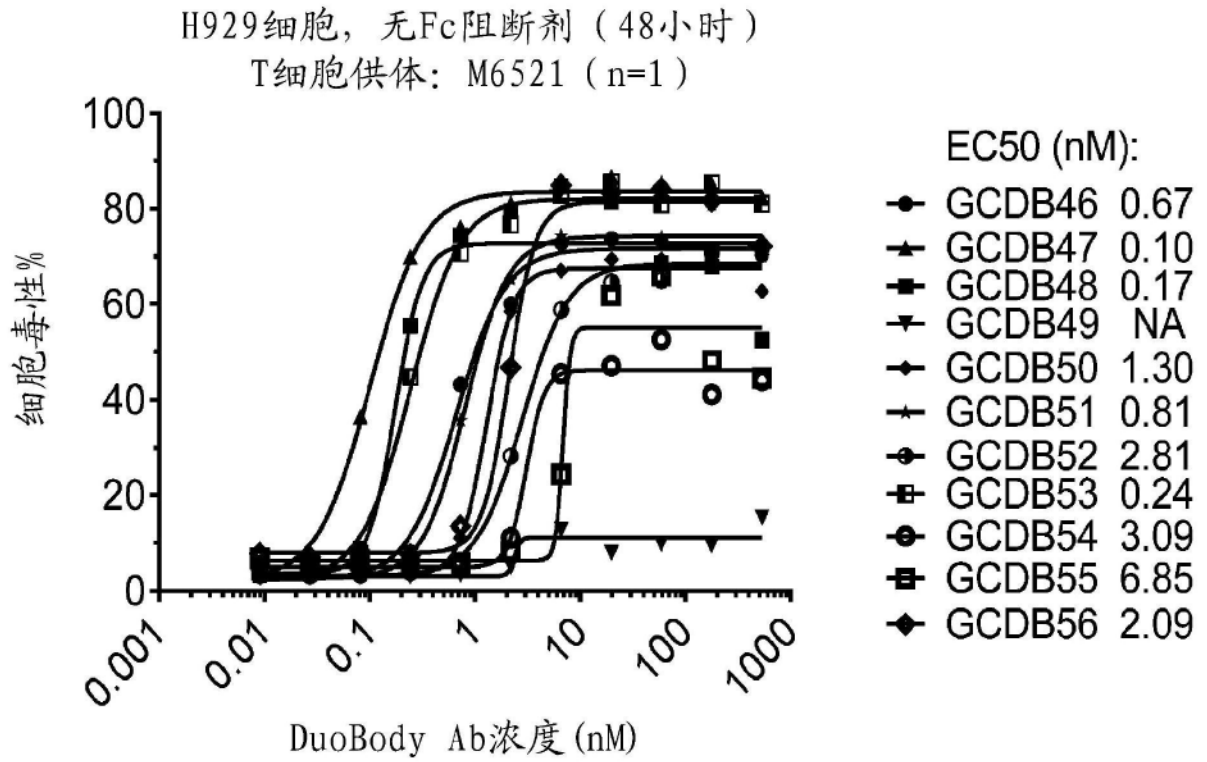


图10A

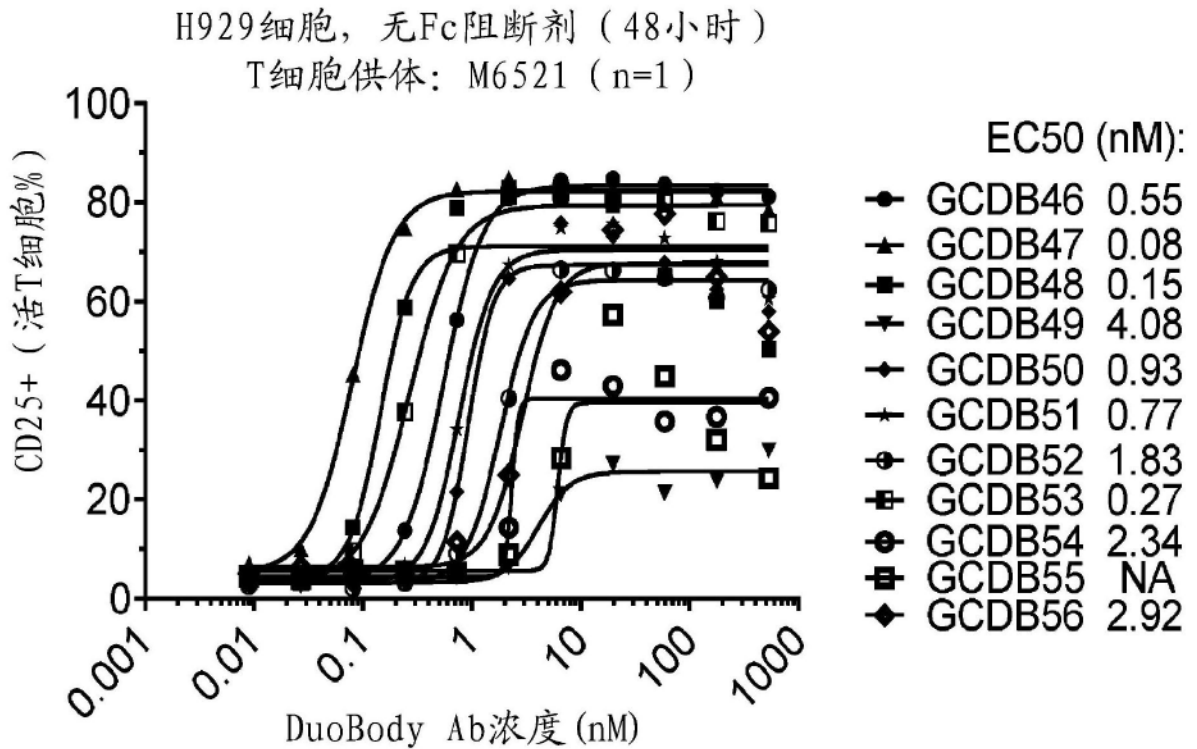


图10B

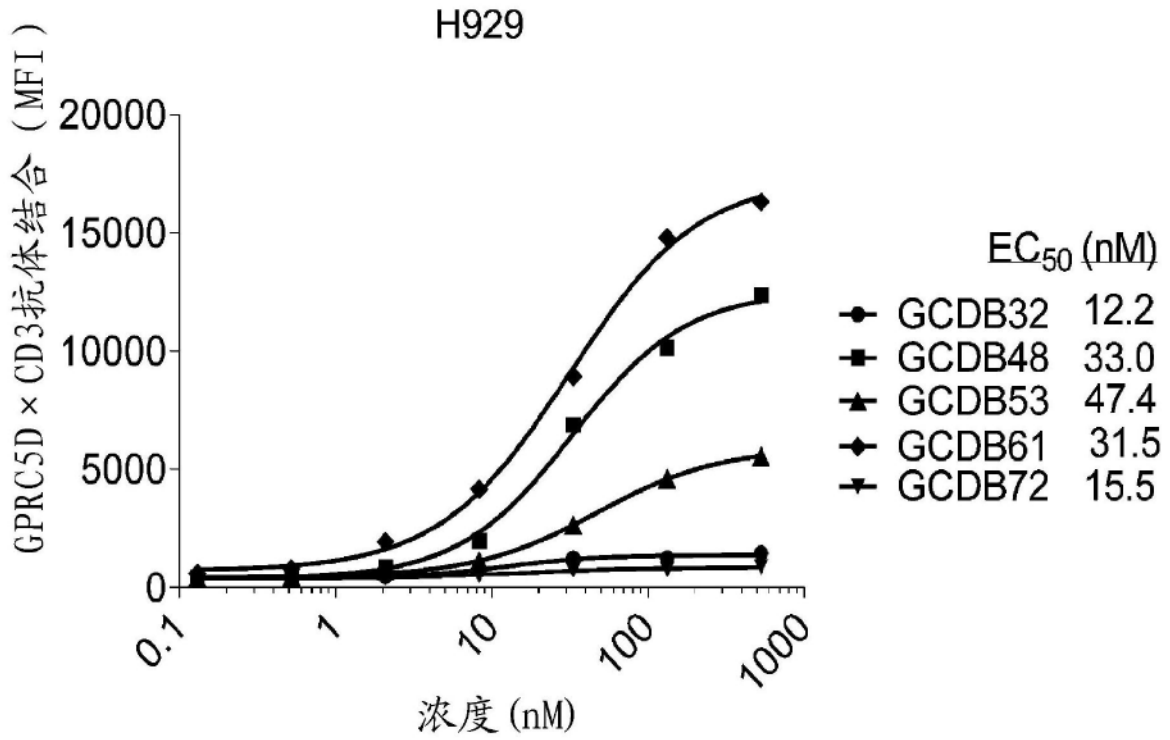


图11A

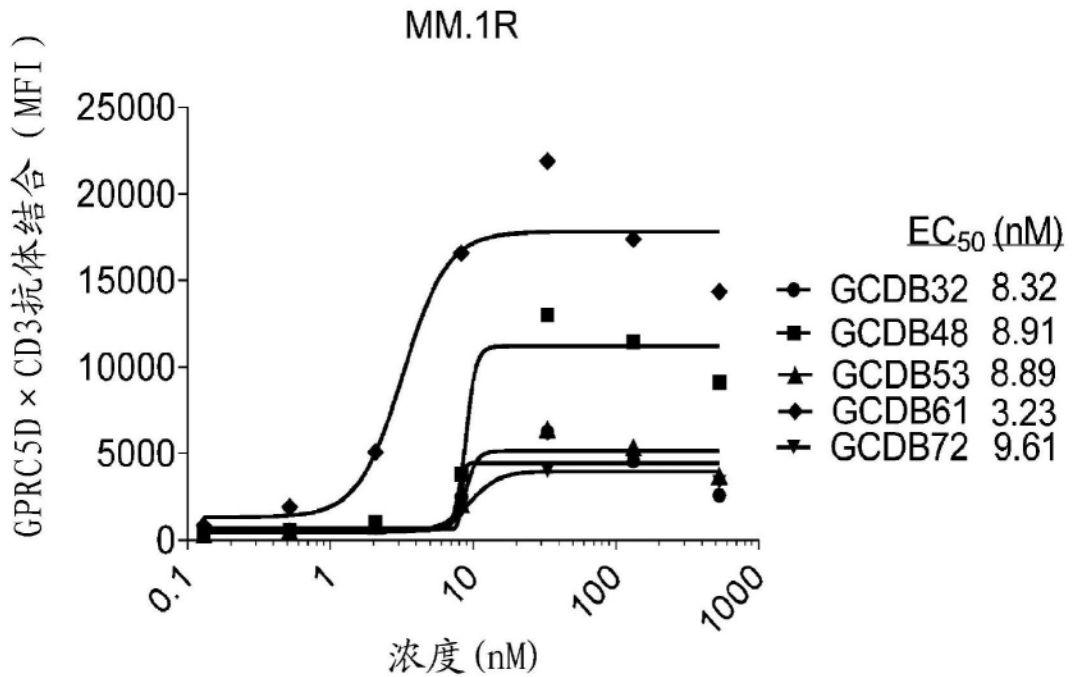


图11B

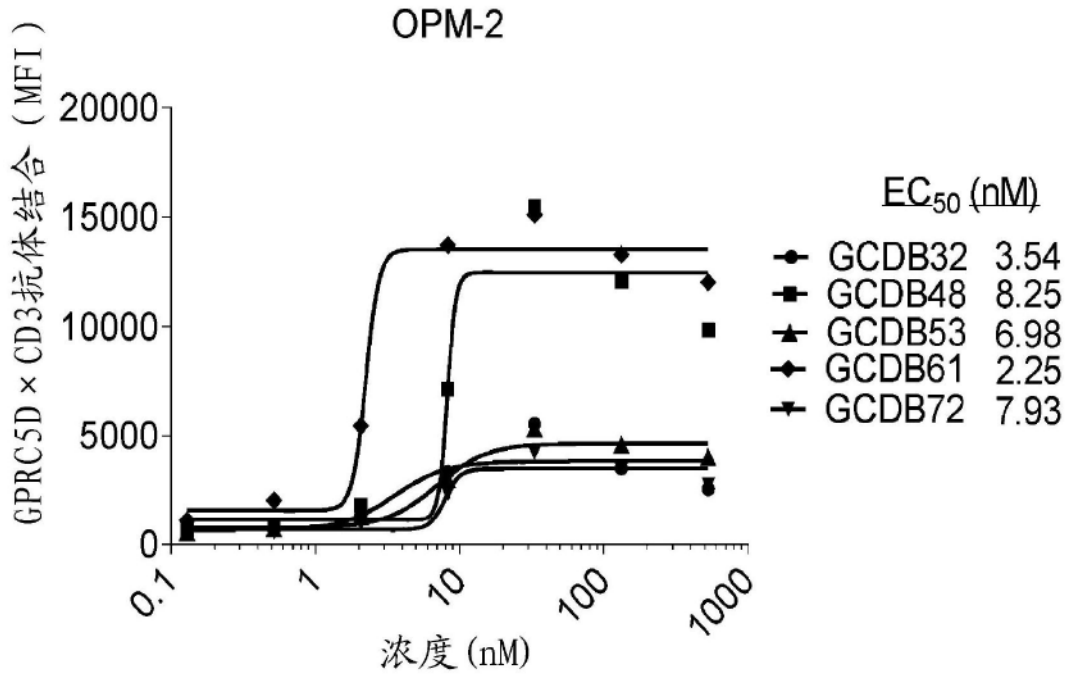


图11C

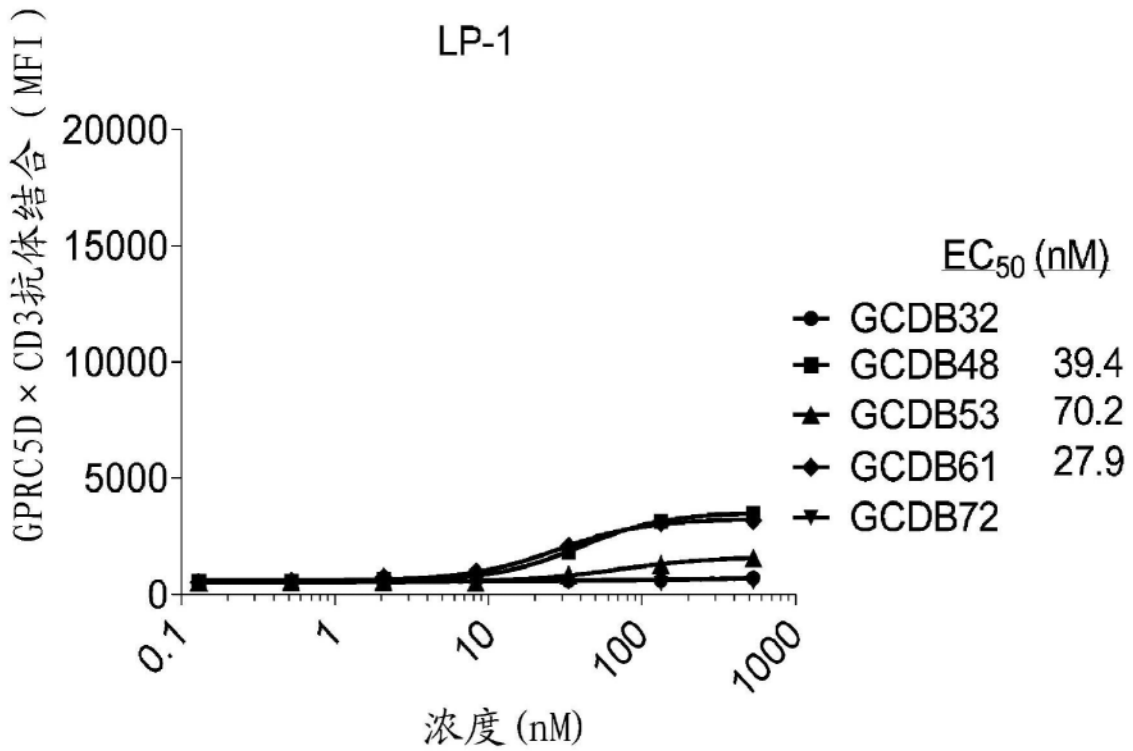


图11D

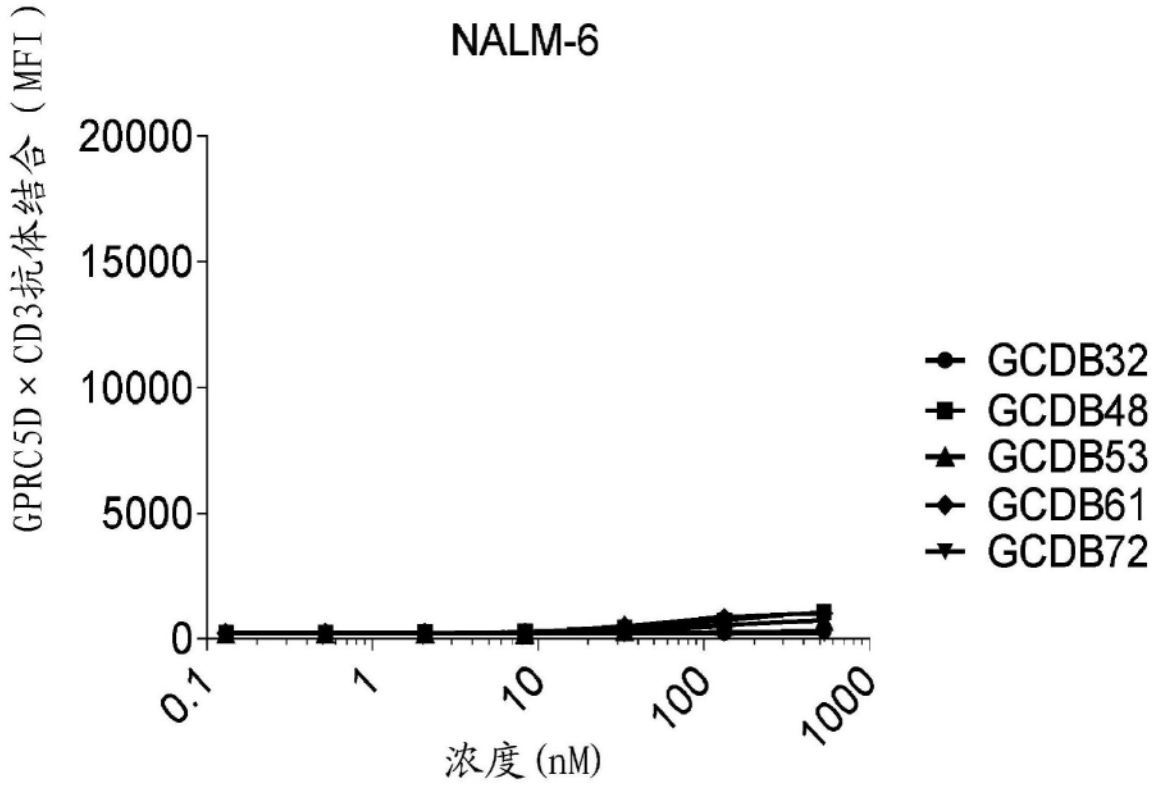


图11E

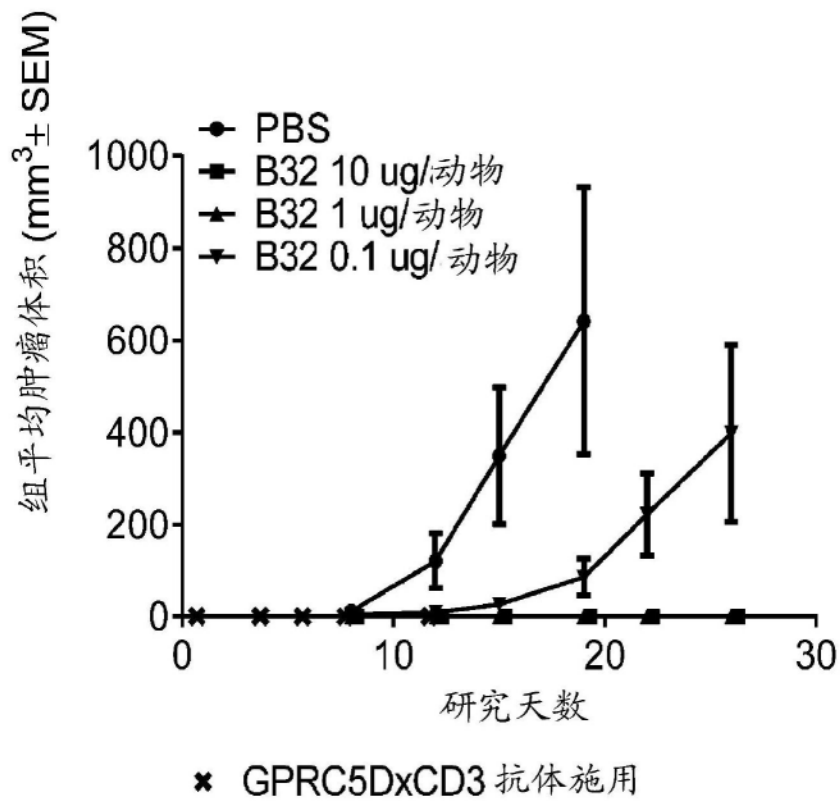


图12A

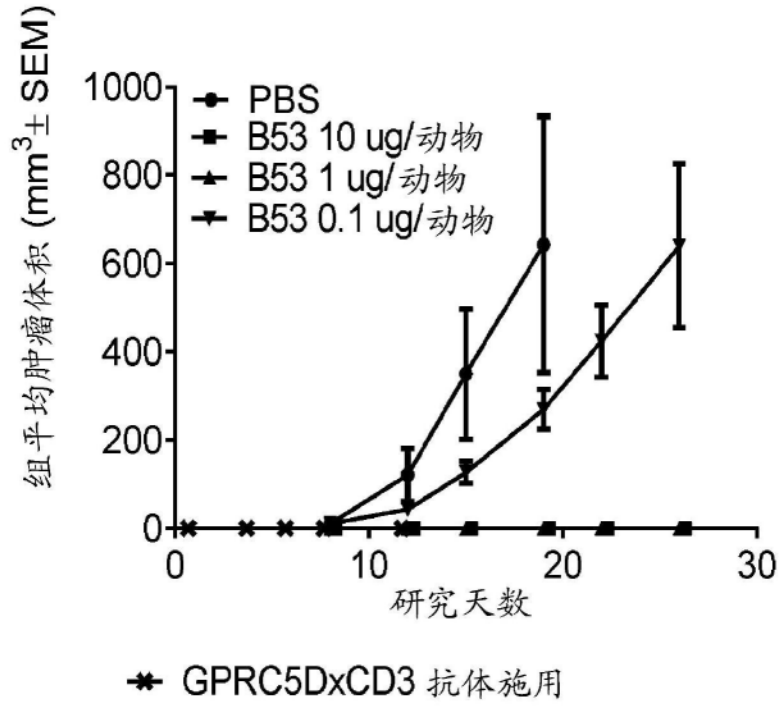


图12B

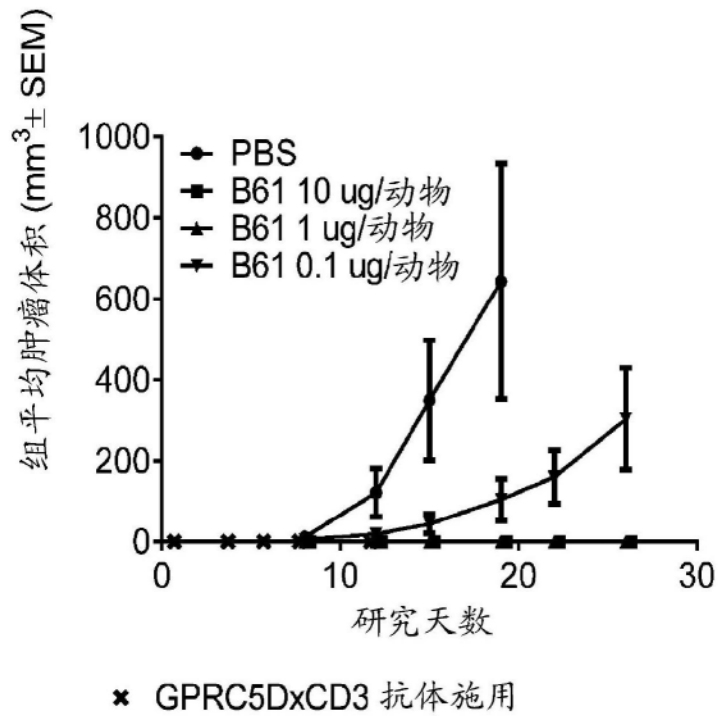


图12C

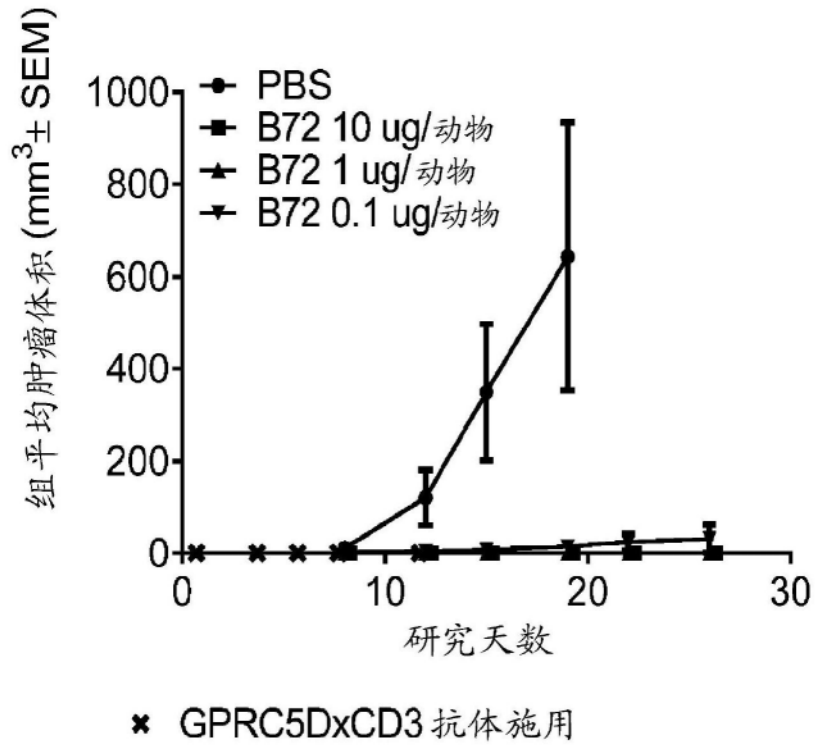
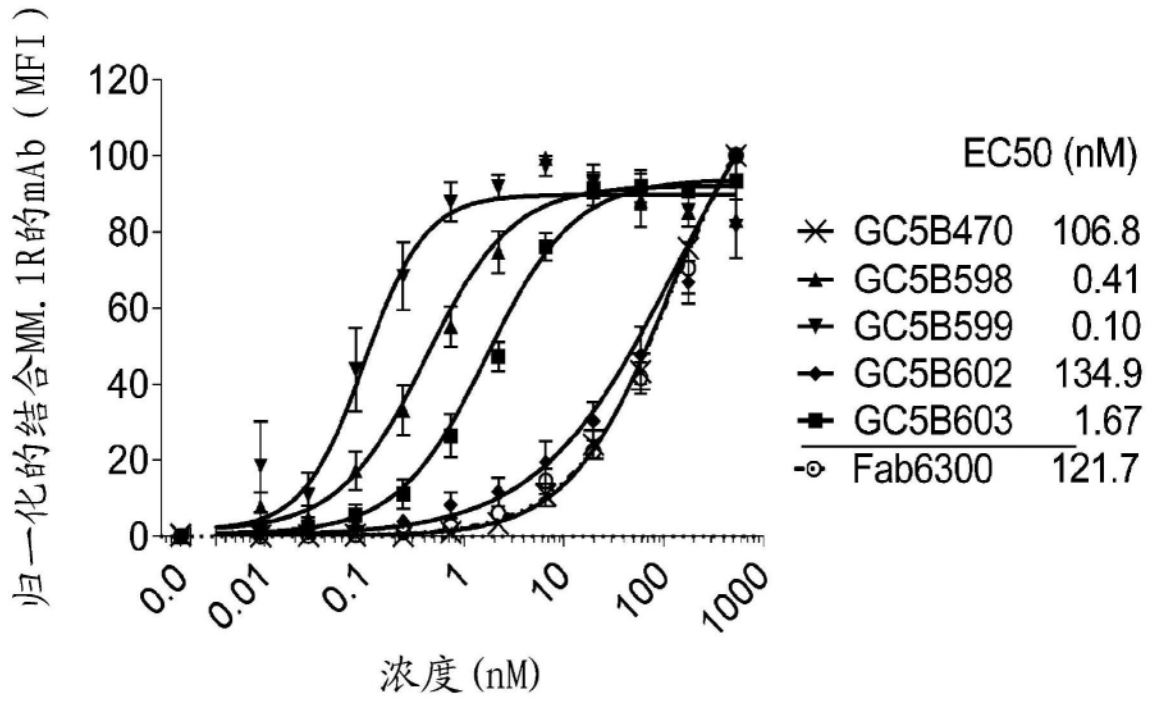


图12D



470 GC5M470.GC5B470.002
 610 GC5B598 (GC5M610)
 611 GC5B599 (GC5M611)
 614 GC5B602 (GC5M614)
 615 GC5B603 (GC5M615)

抗体浓度:

μg/mL	0	0.0003	0.001	0.005	0.020	0.078	0.313	1.250	5.000	20.000	80.000
nM	0	0.0020	0.008	0.032	0.130	0.520	2.078	8.313	33.250	133.000	532.000

图13

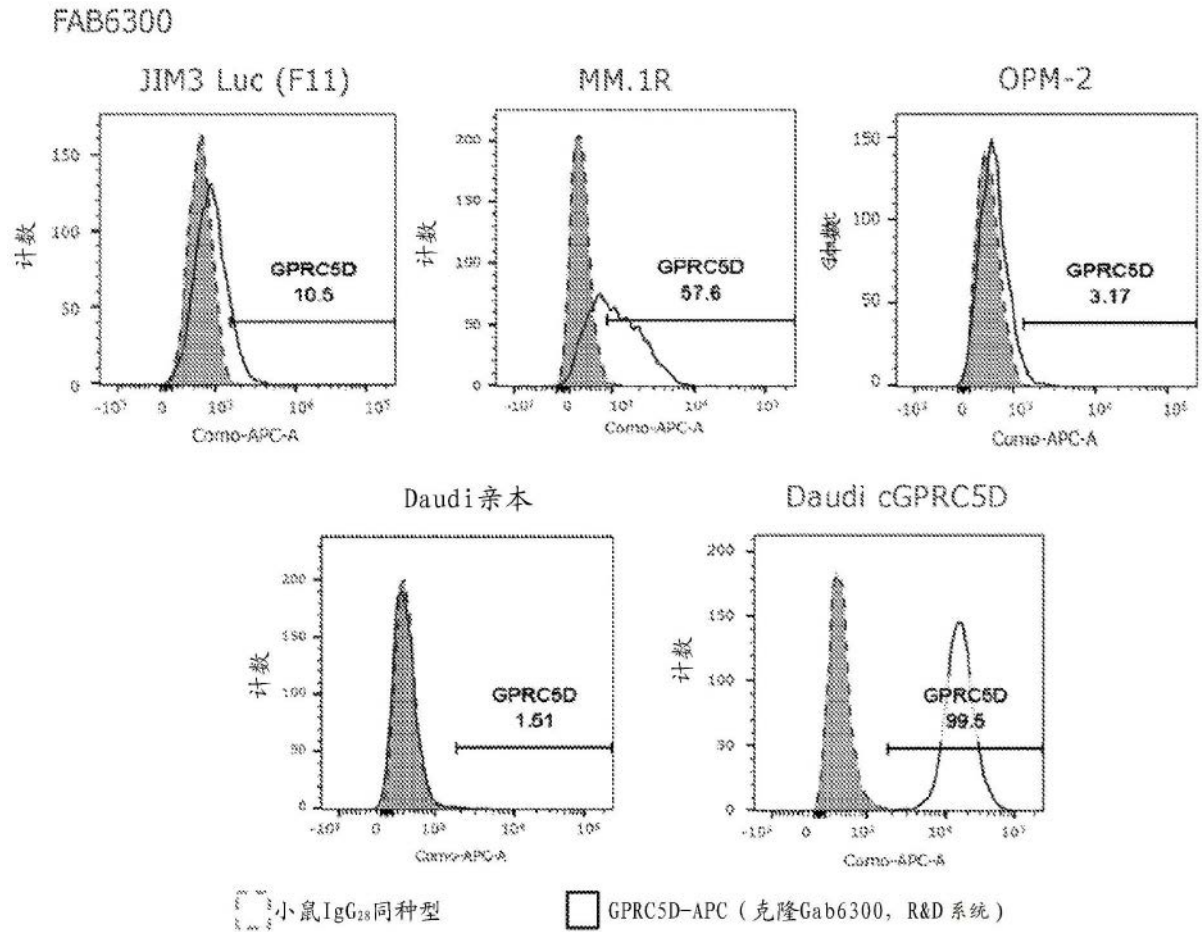


图14A

GC5M481

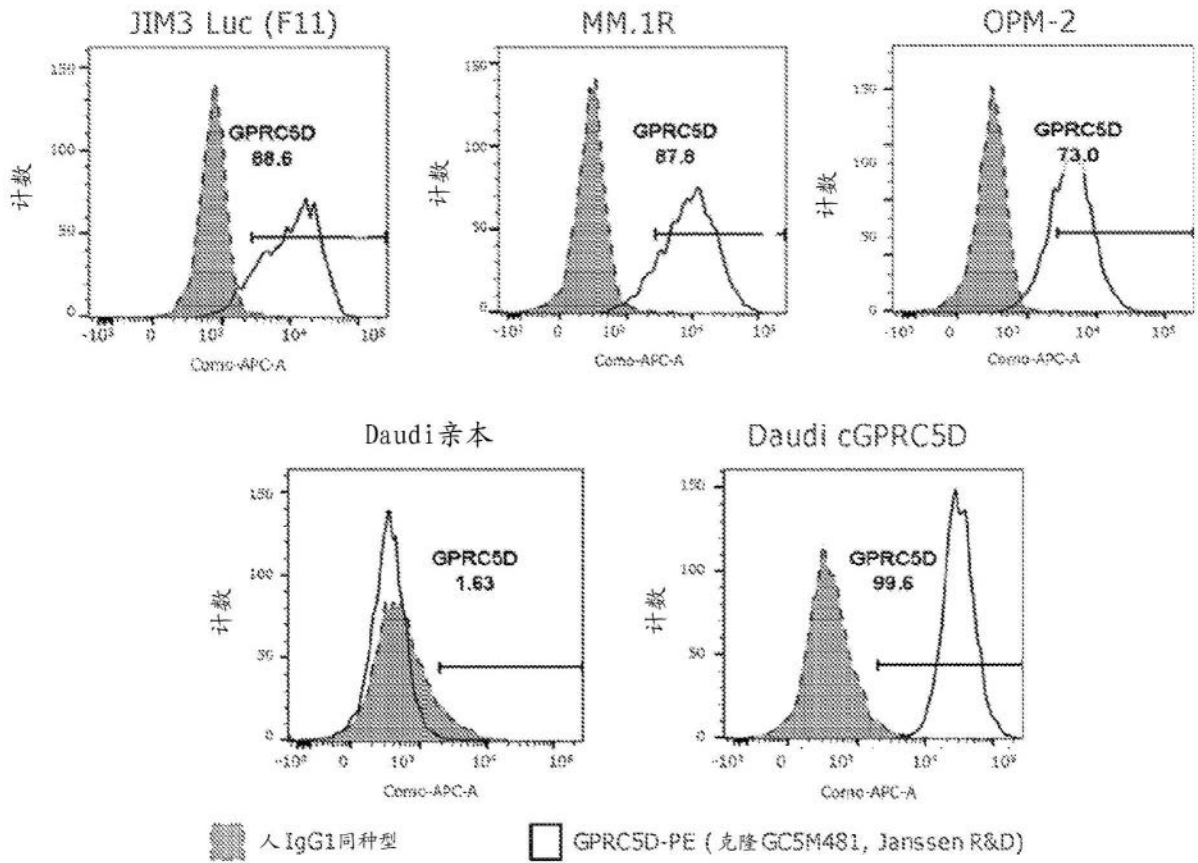


图14A (续)

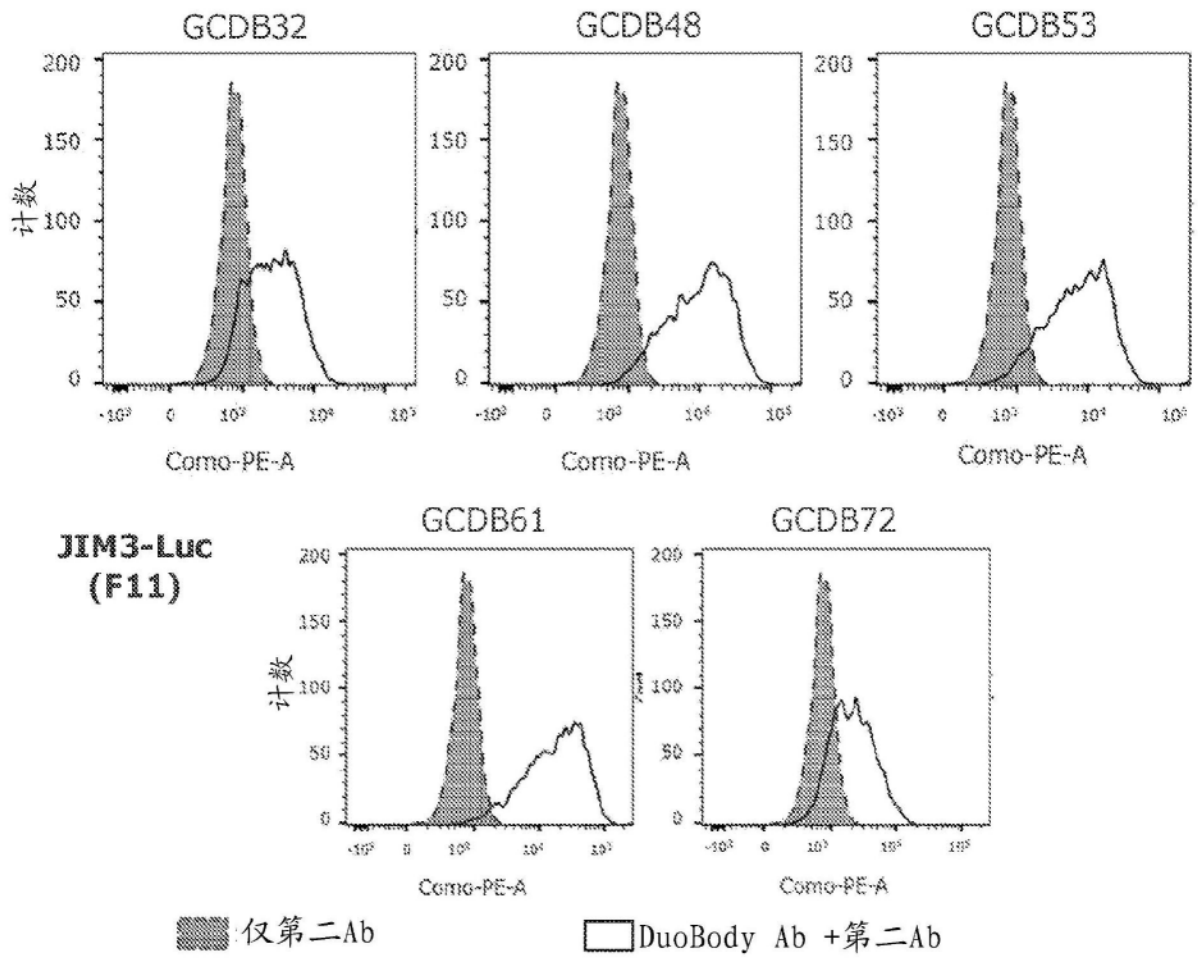


图14B

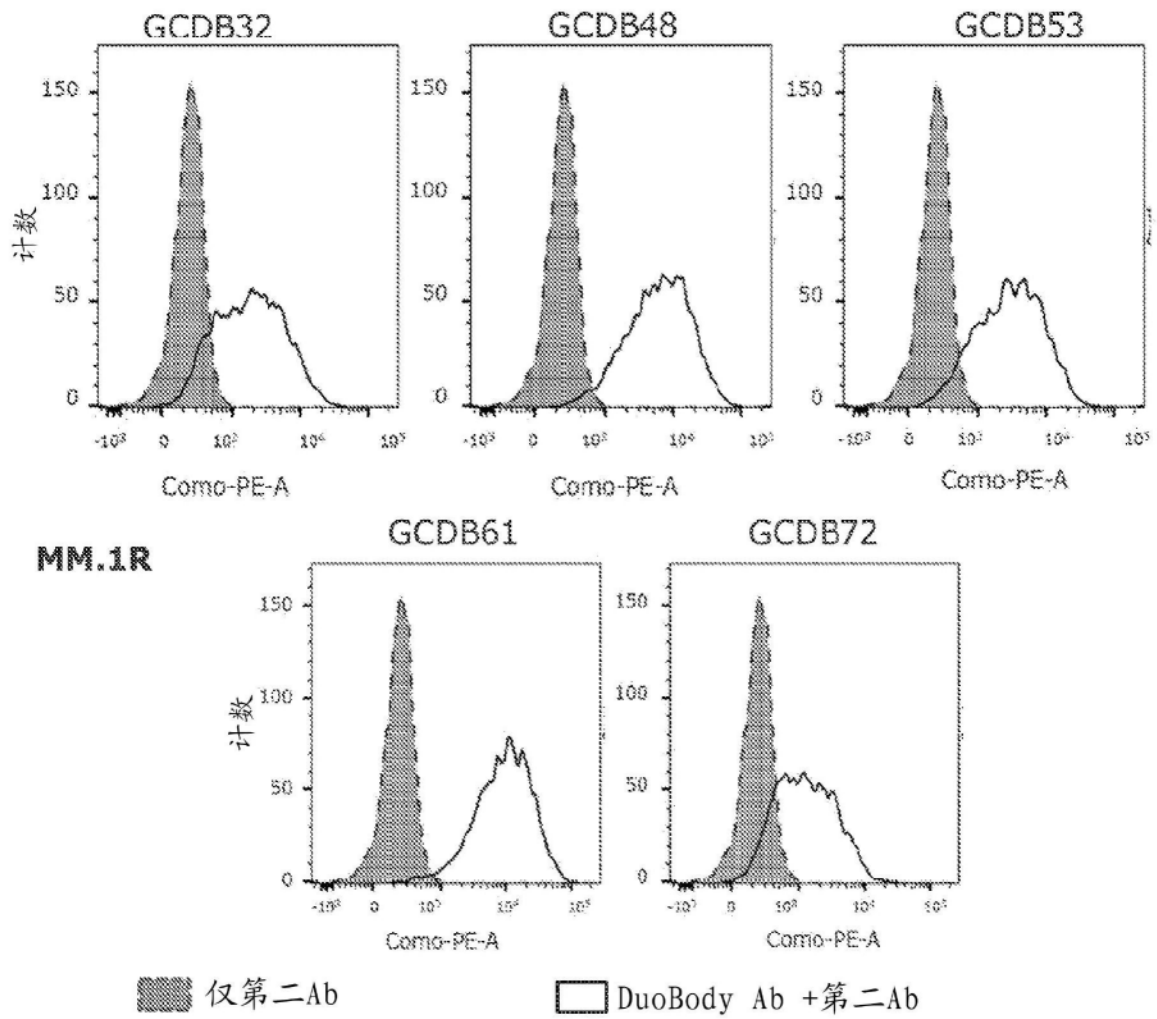


图14B(续)

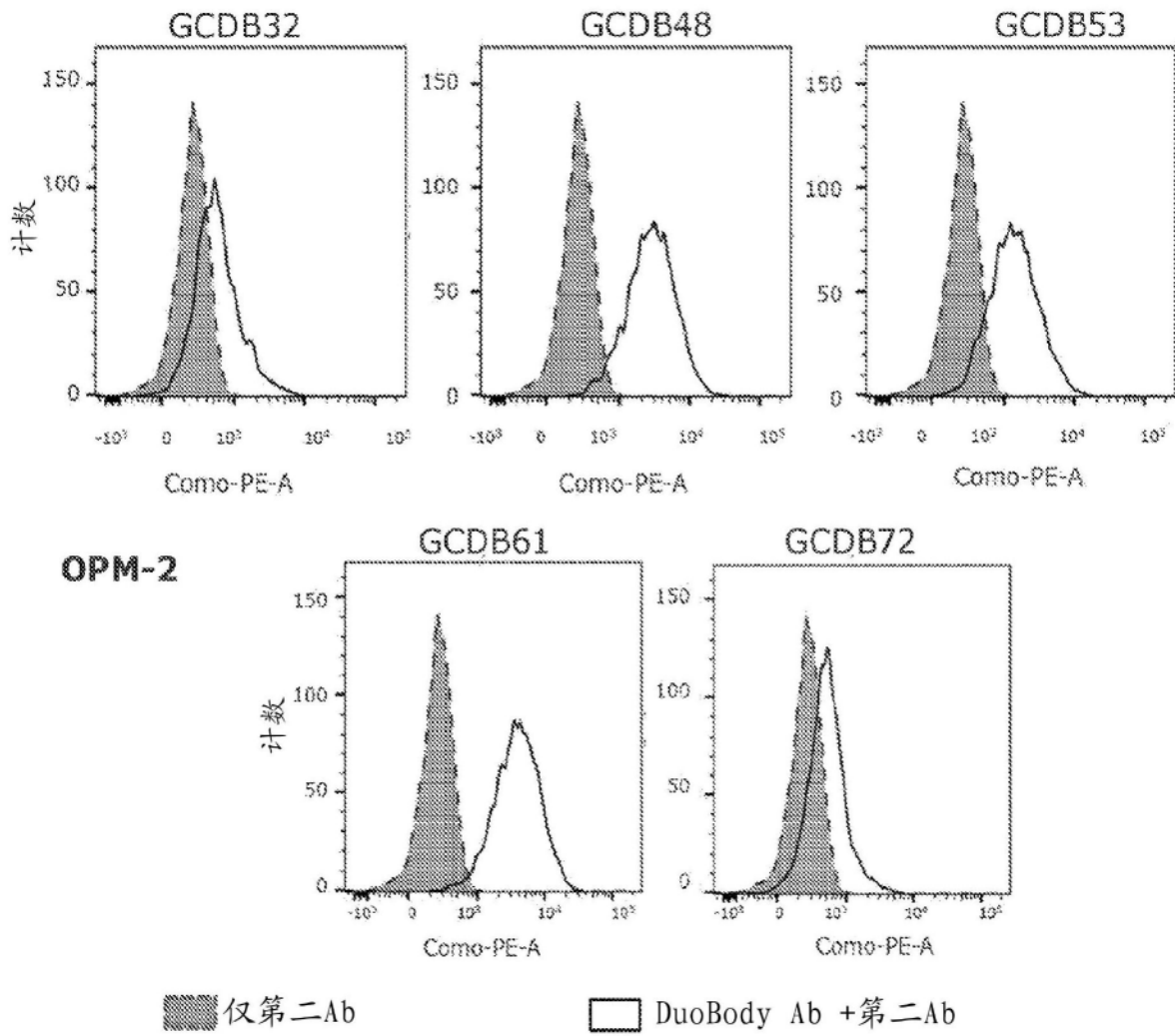


图14B(续)

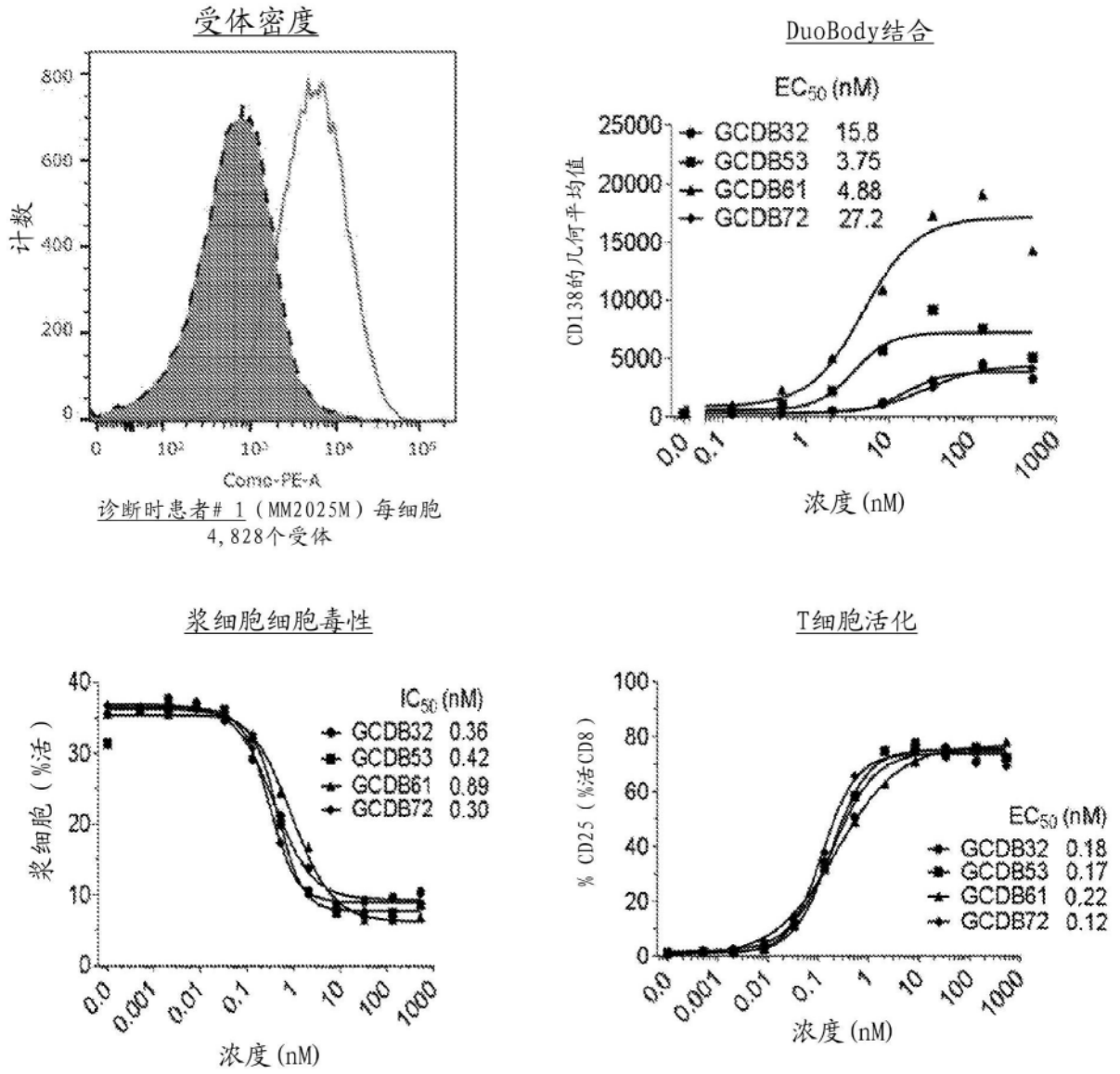


图15A

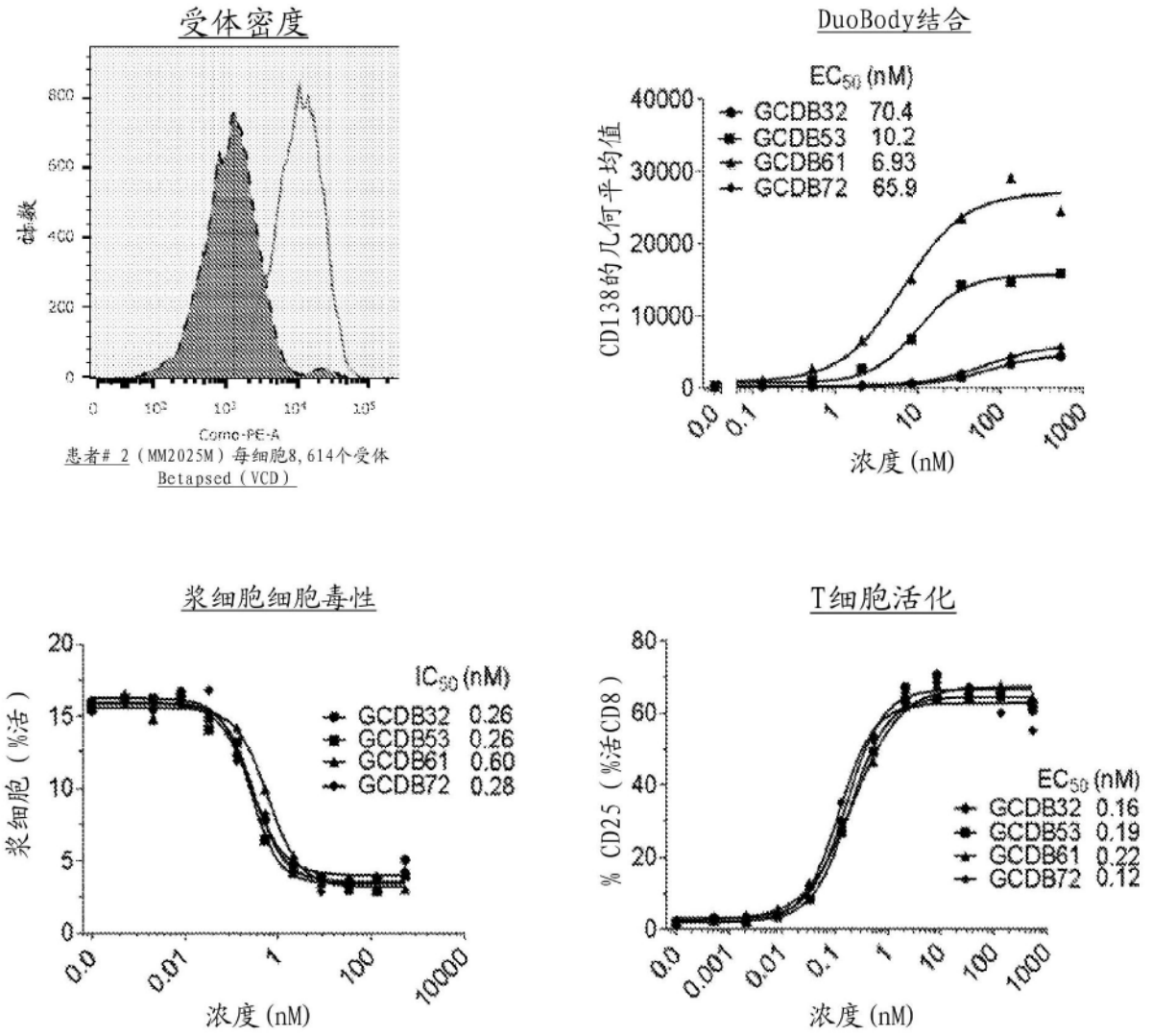


图15B

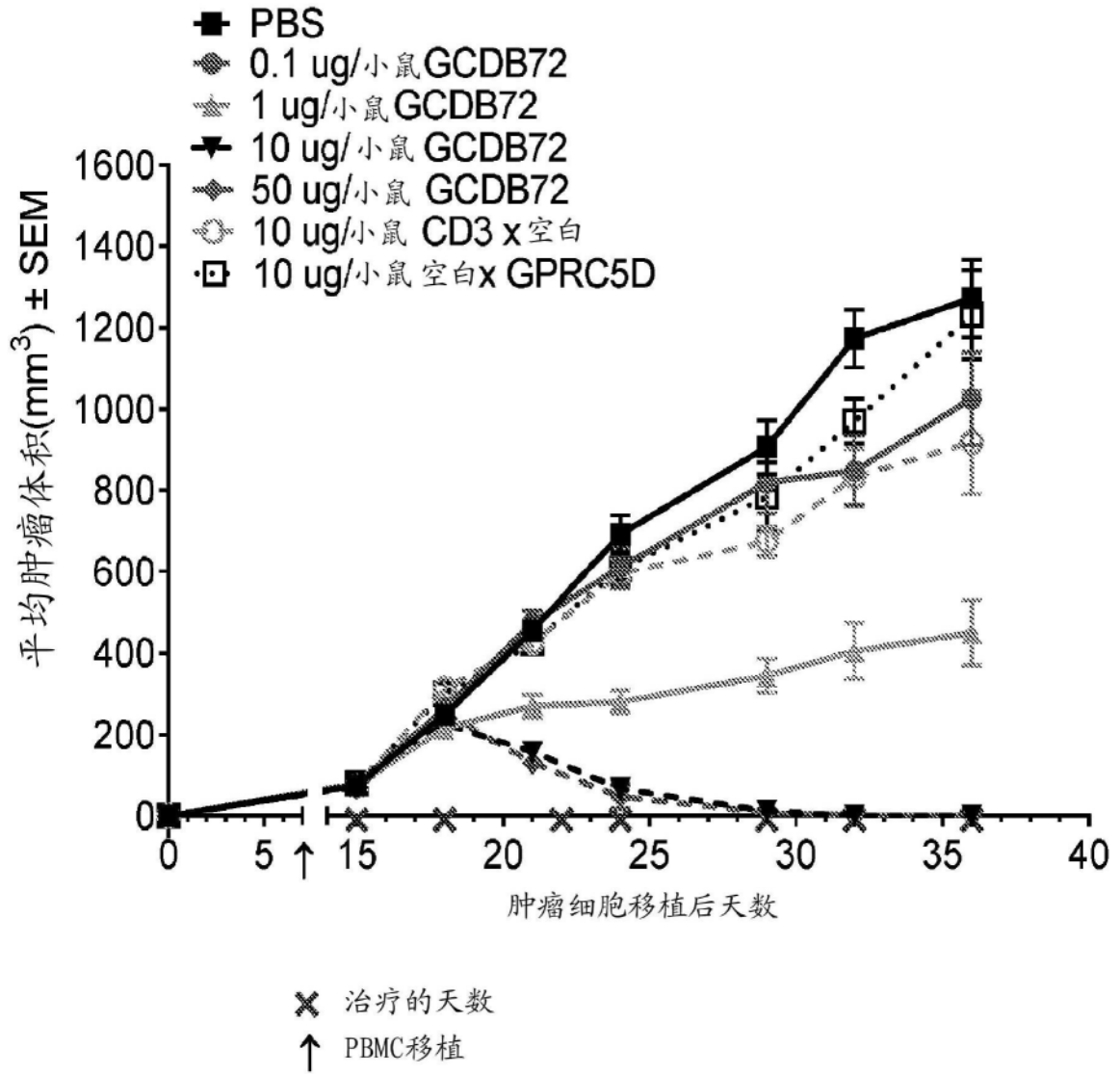


图16

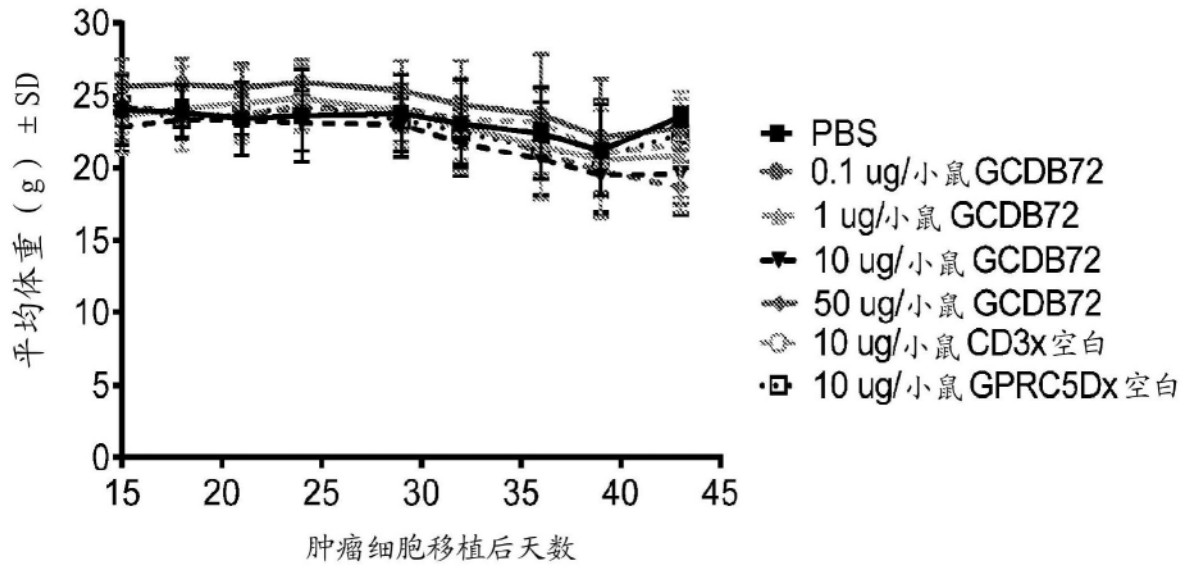


图17