【19】中華民國　　【12】專利公報　（B）

【11】證書號數：I940551
【45】公告日： 中華民國 115 (2026) 年 10 月 01 日
【51】Int. Cl.：　*C07K16/28　(2006.01)*　*A61K39/395　(2006.01)*
A61P35/00　(2006.01)

發明　　全 78 頁

【54】名　稱：三特異性抗體及包含彼之醫藥組成物及套組、表現彼之細胞、編碼彼之合成性多核苷酸、及其產生方法及用途

【21】申請案號：111105376　　【22】申請日： 中華民國 111 (2022) 年 02 月 15 日
【11】公開編號：202302636　　【43】公開日期： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 16 日
【30】優 先 權： 2021/02/16　美國　63/149,921

【72】發 明 人： 阿塔爾　里卡多 (US) ATTAR, RICARDO MARCOS；布魯德　斯科特 (US) BRODEUR, SCOTT RONALD；甘尼桑　拉傑庫馬爾 (US) GANESAN, RAJKUMAR；路易斯裘　里歐波多 (US) LUISTRO, LEOPOLDO；菲莉帕　烏爾里 (DE) PHILIPPAR, ULRIKE；皮拉瑞斯堤　寇丹達拉姆 (US) PILLARISETTI, KODANDARAM；辛格　桑賈亞 (US) JINGH, SANJAYA；楊　丹青 (CA) YANG, DANLIN DAN QING
【71】申 請 人： 比利時商健生藥品公司　JANSSEN PHARMACEUTICA NV
比利時
【74】代 理 人： 何愛文；王仁君

【56】參考文獻：
CN　112028996B
網路文獻 Janssen Research & Development, LLC, “A Study of the Combination of Talquetamab and Teclistamab in Participants With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (RedirecTT-1)”, /clinicaltrials.gov, 2021-01-28 https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04586426?tab=history&a=4#version-content-panel

審查人員：王顗棣

【57】申請專利範圍

1. 一種三特異性抗體或其三特異性結合片段，其包含：
(a)第一抗原結合臂，其包含第一重鏈可變域(VH1)及第一輕鏈可變域(VL1)，其中該第一抗原結合臂包含含有 GDSVFNNNAAWS (SEQ ID NO: 4)之胺基酸序列之重鏈互補決定區(HCDR) 1、含有 RTYYRSKWLYD (SEQ ID NO: 5)之胺基酸序列之 HCDR2、及含有 GYSSSFDY (SEQ ID NO: 6)之胺基酸序列之 HCDR3 以及含有 TGTSSNIGTYKFVS (SEQ ID NO: 1)之胺基酸序列之輕鏈互補決定區(LCDR) 1、含有 EVSKRPS (SEQ ID NO: 2)之胺基酸序列之 LCDR2、及含有 VSYAGSGTLL (SEQ ID NO: 3)之胺基酸序列之 LCDR3；
(b)第二抗原結合臂，其包含第二重鏈可變域(VH2)及第二輕鏈可變域(VL2)，其中該第二抗原結合臂包含含有 GFSLTNIRMSVS (SEQ ID NO: 12)之胺基酸序列之 HCDR1、含有 HIFSNDEKS (SEQ ID NO: 13)之胺基酸序列之 HCDR2、及含有 MRLPYGMDV (SEQ ID NO: 14)之胺基酸序列之 HCDR3 以及含有 RSSQSLVHSDGNTYLS (SEQ ID NO: 9)之胺基酸序列之 LCDR1、含有 KISNRFF (SEQ ID NO: 10)之胺基酸序列之 LCDR2、及含有 MQATQFPHT (SEQ ID NO: 11)之胺基酸序列之 LCDR3；

(c)第三抗原結合臂，其包含第三重鏈可變域(VH3)及第三輕鏈可變域(VL3)，其中該第三抗原結合臂包含含有 GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 20)之胺基酸序列之 HCDR1、含有 AISGSGGSTY (SEQ ID NO: 21)之胺基酸序列之 HCDR2、及含有 DEGYSSGHYYGMDV (SEQ ID NO: 22)之胺基酸序列之 HCDR3 以及含有 RASQSISSSFLT (SEQ ID NO: 17)之胺基酸序列之 LCDR1、含有 GASSRAT (SEQ ID NO: 18)之胺基酸序列之 LCDR2、及含有 QHYGSSPMYT (SEQ ID NO: 19)之胺基酸序列之 LCDR3，
其中該第一抗原結合臂結合至分化簇 3 (CD3)上之表位，該第二抗原結合臂結合至 G 蛋白偶聯受體家族 C 第 5 組成員 D (GPRC5D)上之表位，且該第三抗原結合臂結合至 B 細胞成熟抗原(BCMA)上之表位。

2. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中：
(a) 第一抗原結合臂之該 VH1 及 VL1 存在於 Fab、雙價抗體、Fab’、F(ab’)2、Fv、scFv、Fd、雙硫鍵穩定性 Fv 片段(dsFv)、或雙硫鍵穩定性雙價抗體（ds 雙價抗體）中；
(b) 該第二抗原結合臂之該 VH2 及 VL2 存在於 scFv、雙價抗體、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、Fd、雙硫鍵穩定性 Fv 片段(dsFv)、或雙硫鍵穩定性雙價抗體（ds 雙價抗體）中；及/或
(c) 該第三抗原結合臂之該 VH3 及 VL3 存在於 scFv、抗體片段、雙價抗體、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、Fd、雙硫鍵穩定性 Fv 片段(dsFv)、或雙硫鍵穩定性雙價抗體（ds 雙價抗體）中。
3. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中結合 CD3 之該第一抗原結合臂包含 SEQ ID NO: 8 之該 VH1 及 SEQ ID NO: 7 之該 VL1。
4. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中結合 GPRC5D 之該第二抗原結合臂包含 SEQ ID NO: 16 之該 VH2 及 SEQ ID NO: 15 之該 VL2。
5. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中結合 BCMA 之該第三抗原結合臂包含 SEQ ID NO: 24 之該 VH3 及 SEQ ID NO: 23 之該 VL3。
6. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中
結合 CD3 之該第一抗原結合臂包含 SEQ ID NO: 8 之該 VH1 及 SEQ ID NO: 7 之該 VL1；
結合 GPRC5D 之該第二抗原結合臂包含 SEQ ID NO:16 之該 VH2 及 SEQ ID NO:15 之該 VL2；且
結合 BCMA 之該第三抗原結合臂包含 SEQ ID NO: 24 之該 VH3 及 SEQ ID NO: 23 之該 VL3。
7. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第一抗原結合臂包含可結晶片段(Fc)域，且該第二抗原結合臂或該第三抗原結合臂包含 Fc 域。
8. 如請求項 7 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中
該第一抗原結合臂之該 Fc 域包含 SEQ ID NO: 158 之胺基酸序列。
9. 如請求項 7 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該等 Fc 域包含促進該等 Fc 域之異二聚化之一或多種突變，其中根據 EU 編號，該等突變係選自 T366S、L368A、T366W、及 Y407V。
10. 如請求項 7 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該等 Fc 域進一步包含減少 Fc 與 Fcγ 受體結合之一或多個突變，其中根據 EU 編號，該等 Fc 域包含選自 L234A、L235A、及 D265S 之一或多個突變。

11. 如請求項 7 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該等 Fc 域進一步包含減少 Fc 與蛋白質 A 結合之一或多個突變，其中根據 EU 編號，該 Fc 域包含突變 H435R 及/或 Y436F。
12. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第一抗原結合臂特異性結合至該 CD3ε 鏈之 QDGNEEMGGITQTP (SEQ ID NO: 161)。
13. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第一抗原結合臂以約 2 x10^{-8} 至 4 x 10^{-8} M 之親和力特異性結合至 CD3。
14. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第三抗原結合臂特異性結合該 BCMA BCMW37 鏈之 LLHACIPCQL (SEQ ID NO: 162)。
15. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第三抗原結合臂以約 2 x10^{-10} 至 9 x10^{-10} M 之親和力特異性結合至 BCMA。
16. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或其三特異性結合片段，其包含結合至分化簇 3 (CD3)上之表位之第一抗原結合臂、結合至 G 蛋白偶聯受體家族 C 第 5 組成員 D (GPRC5D)上之表位之第二抗原結合臂、及結合至 B 細胞成熟抗原(BCMA)上之表位之第三抗原結合臂，其中該第一抗原結合臂包含重鏈(HC1)多肽及輕鏈(LC)多肽，其中該重鏈(HC1)多肽進一步包含該第二抗原結合臂，
其中該三特異性抗體或其三特異性結合片段進一步包含單一多肽，該單一多肽包含該第三抗原結合臂。
17. 如請求項 16 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第一抗原結合臂包含：包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列之 HC1、及包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列之 LC，且包含該第三抗原結合臂之該單一多肽包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列。
18. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其包含
一包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列之多肽，其包含該第二抗原結合臂及該第一抗原結合臂之 HC，
一包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列之多肽，其包含該第一抗原結合臂之 LC，及
一包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列之多肽，其包含該第三抗原結合臂。
19. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或其三特異性結合片段，其包含
結合至分化簇 3 (CD3)上之表位之第一抗原結合臂、結合至 G 蛋白偶聯受體家族 C 第 5 組成員 D (GPRC5D)上之表位之第二抗原結合臂、及結合至 B 細胞成熟抗原(BCMA)上之表位之第三抗原結合臂，
其中該第一抗原結合臂包含重鏈(HC1)多肽及輕鏈(LC)多肽；且
其中該三特異性抗體或其三特異性結合片段包含單一多肽，該單一多肽包含該第二抗原結合臂及該第三抗原結合臂。
20. 如請求項 19 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該第一抗原結合臂包含：包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列之 HC1、及包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列之 LC，且包含該第二抗原結合臂及該第三抗原結合臂之該多肽包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列。
21. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其包含：
一包含 SEQ ID NO: 26 之胺基酸序列之多肽，其包含該第一抗原結合臂之 HC，
一包含 SEQ ID NO: 27 之胺基酸序列之多肽，其包含該第一抗原結合臂之 LC，及
一包含 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列之多肽，其包含該第二抗原結合臂及該第三抗原結合臂。
22. 如請求項 1 所述之三特異性抗體或三特異性結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係人類 IgG1 同型。

23. 一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段及醫藥上可接受之載劑。
24. 如請求項 23 所述之醫藥組成物，其中該醫藥組成物進一步包含第二治療劑。
25. 如請求項 24 所述之醫藥組成物，其中該第二治療劑包含抗 CD38 劑、免疫調節醯亞胺藥物(IMiD)、免疫檢查點抑制劑、免疫共刺激劑、γ 分泌酶抑制劑、T 細胞強化子、或其任何組合。
26. 一種細胞，其表現如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段。
27. 如請求項 26 所述之細胞，其中：
    (a) 該細胞係融合瘤；或
    (b) 該三特異性抗體係經重組生產。
28. 一種如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段、或如請求項 23 至 25 中任一項所述之醫藥組成物用於製備治療癌症的藥物之用途，其中治療有效量之該三特異性抗體或三特異性結合片段、或該醫藥組成物係投予至一對象。
29. 如請求項 28 所述之用途，其中該三特異性抗體或三特異性結合片段或該醫藥組成物係投予達足以治療該癌症的時間。
30. 一種如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段、或如請求項 23 至 25 中任一項所述之醫藥組成物用於製備抑制癌細胞生長或增生的藥物之用途，其中有效量之該三特異性抗體或三特異性結合片段、或該醫藥組成物係投予至該細胞，其中該有效量足以抑制該癌細胞之生長或增生。
31. 如請求項 30 所述之用途，其中該癌細胞係在對象中並且該三特異性抗體或三特異性結合片段、或該醫藥組成物係投予至該對象。
32. 一種如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段、或如請求項 23 至 25 中任一項所述之醫藥組成物用於製備藥物之用途，該藥物用於將有需要之對象中之 T 細胞重新導向 BCMA 及/或 GPRC5D 表現性癌細胞，其中治療有效量之該三特異性抗體或三特異性結合片段或該醫藥組成物係投予該對象。
33. 如請求項 32 所述之用途，其中該治療有效量足以將該 T 細胞反應導向該等癌細胞。
34. 如請求項 28 至 33 中任一項所述之用途，其中
該癌症係多發性骨髓瘤。
35. 如請求項 28 至 33 中任一項所述之用途，其中該癌症係燜燃型多發性骨髓瘤(SMM)。
36. 如請求項 28 至 33 中任一項所述之用途，其中該癌症係復發性、難治性、或惡性癌症、或其任何組合。
37. 如請求項 28 至 33 中任一項所述之用途，其中該對象已接受先前治療。
38. 如請求項 37 所述之用途，其中該先前治療包含蛋白酶體抑制劑、免疫調節藥物、CD38 抗體、雙特異性劑、CAR-T 療法、或其組合。
39. 如請求項 28 至 33 中任一項所述之用途，其中第二治療劑係被投予。
40. 如請求項 39 所述之用途，其中該第二治療劑係化學治療劑，其中該化學治療劑係阿糖胞苷、蒽環素、組織胺二鹽酸鹽、或介白素 2 (IL-2)。
41. 如請求項 39 所述之用途，其中該第二治療劑係抗 CD38 劑、免疫調節醯亞胺藥物(IMiD)、免疫檢查點抑制劑、免疫共刺激劑、γ 分泌酶抑制劑、T 細胞強化子、或其任何組合。
42. 如請求項 28 至 33 中任一項所述之用途，其中該三特異性抗體或三特異性結合片段、或該醫藥組成物係經靜脈內、肌肉內、腹膜內、及/或皮下投予至該對象。

43. 如請求項 42 所述之用途，其中該三特異性抗體或三特異性結合片段、或該醫藥組成物係經皮下投予至該對象。
44. 一種用於產生如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段之方法，其中該方法包含培養如請求項 26 或請求項 27 所述之細胞並單離該三特異性抗體或三特異性結合片段。
45. 一種合成性多核苷酸，其編碼如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段。
46. 一種套組，其包含(i)如請求項 1 至 22 中任一項所述之三特異性抗體或三特異性結合片段及/或如請求項 45 所述之多核苷酸及(ii)其包裝。
47. 一種三特異性抗體，其包含：
    (a) 第一重鏈(HC1)；
    (b) 輕鏈(LC)；
    (c) 第二重鏈(HC2),
    其中該 HC1 包含 SEQ ID NO: 29 之胺基酸序列，該 LC 包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列，及該 HC2 包含 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列。

圖式簡單說明

〔圖 1A〕至〔圖 1B〕描繪 BGCB463 三特異性抗體（圖 1A）及建議作用模式（圖 1B）。

〔圖 2A〕至〔圖 2D〕將 BGCB463（圓形）或陰性對照 B23B251（三角形）全部用 H929 野生型(WT)（圖 2A）、H929-GPRC5D 剔除(KO)（圖 2B）、H929-BCMA KO（圖 2C）、及 H929-GPRC5D/BCMA KO（圖 2D）細胞在 2 μM 之起始濃度下在 37℃下培養 1 小時。在用經 AF647 標記之材料進行二次偵測後，分析該 MFI 信號以產生 EC_{50} 及 EC_{90}。曲線代表五個獨立實驗。EC_{50} 或 EC_{90} 值係此等的平均值。

〔圖 3A〕至〔圖 3D〕將 BGCB463（圓形）或陰性對照 B23B251（三角形）全部用 MM.1R WT（圖 3A）、MM.1R -GPRC5D KO（圖 3B）、MM.1R -BCMA KO（圖 3C）、及 MM.1R -GPRC5D/BCMA KO（圖 3D）細胞在 2 μM 之起始濃度下在 37℃下培養 1 小時。在用經 AF647 標記之材料進行二次偵測後，分析該 MFI 信號以產生 EC_{50} 及 EC_{90}。曲線代表五個獨立實驗。

〔圖 4A〕至〔圖 4C〕將 BGCB463（圓形）或陰性對照 B23B251（三角形）全部用泛 T 細胞（3 個隨機供體，圖 4A 至圖 4C）在 2 μM 之起始濃度下在 37℃下培養 1 小時。在用經 AF647 標記之材料進行二次偵測後，分析該 MFI 信號以產生 EC_{50} 及 EC_{90}。數據代表兩個個別運行，兩者皆具有三個供體。

〔圖 5A〕至〔圖 5C〕將 BGCB463 用泛 T 細胞（3 個隨機供體，圖 5A、圖 5B、及圖 5C）在 2 μM 之起始濃度下在 4℃（圓形）或 37℃（三角形）下培養 1 小時。在用經 AF647 標記之材料進行二次偵測後，分析該 MFI 信號以產生 EC_{50}。

〔圖 6A〕至〔圖 6C〕將 BGCB463.003（圓形）、BGCB463.004（正方形）、及陰性對照 B23B251（三角形）用來自 3 個供體之 H929（圖 6A）、MM.1R（圖 6B）、及 Pan T（圖 6C）細胞進行測試。將分子在 2 μM 的起始濃度下在 37℃下培養 1 小時。在用經 AF647 標記之材料進行二次偵測後，分析該 MFI 信號。

〔圖 7A〕至〔圖 7D〕將 H929（圖 7A）、H929-GPRC5D KO（圖 7B）、H929-BCMA KO（圖 7C）、及 H929-GPRC5D/BCMA KO（圖 7D）細胞全部在 BGCB463 的三個最佳化濃度下在 37℃下培養 1 小時、3 小時、5 小時、及 24 小時。然後將細胞洗滌並在冰上用 AF647 抗人類 IgG 培養 30 分鐘。所讀出者係 AF647 信號之 MFI。

〔**圖 8A**〕至〔**圖 8D**〕將 MM.1R WT（圖 8A）、MM.1R -GPRC5D KO（圖 8B）、MM.1R -BCMA KO（圖 8C）、及 MM.1R -GPRC5D/BCMA KO（圖 8D）細胞全部在 BGCB463 的三個最佳化濃度下在 37℃下培養 1 小時、3 小時、5 小時、及 24 小時。
然後將細胞洗滌並在冰上用 AF647 抗人類 IgG 培養 30 分鐘。所讀出者係 AF647 信號之 MFI。
〔**圖 9A**〕至〔**圖 9E**〕將 BGCB463（圓形）或陰性對照 B23B251（三角形）全部用表現人類 GPRC5D（圖 9A）、人類 BCMA（圖 9B）、食蟹獼猴 GPRC5D（圖 9C）或食蟹獼猴 BCMA（圖 9D）之 K562 細胞在 2 μM 之起始濃度下在 37℃下培養 1 小時。在用 AF647 抗人類 IgG 進行二次偵測後，分析該 MFI 信號以產生 EC_{50} 及 EC_{90}（圖 9E）。數據代表兩個獨立實驗。
〔**圖 10A**〕至〔**圖 10B**〕將 BGCB463（圓形）或陰性對照 B23B251（三角形）在 10nM 之起始濃度下用表現人類或食蟹獼猴 GPRC5D 之 K562 細胞或 100 nM 對於作為目標細胞之表現人類/食蟹獼猴 BCMA 之 K562 培養。圖 10A 中之人類活化及細胞毒性。圖 10B 中之食蟹獼猴活化及細胞毒性。以 3:1 之效應與目標(E:T)比添加人類泛 T 細胞（1 個供體），並在 37℃下培養 72 小時。使用活/死可固定染料判定細胞毒性，並使用 BV421 偶聯的抗 CD25 測量 CD25。
〔**圖 11**〕在培養基（含有 10%FBS 之 RPMI）或含有 90%人類血清之 RPMI 存在下，將 H929 細胞與濃度漸增之 BGCB463 或陰性對照 B23B251 用 AF647 抗人類 IgG 在 37℃下培養 1 小時。BGCB463 結合不受血清存在影響。
〔**圖 12**〕在培養基（含有 10%FBS 之 RPMI）或含有 90%人類血清之 RPMI 存在下，將 T 細胞與濃度漸增之 BGCB463 或陰性對照 B23B251 用 AF647 抗人類 IgG 在 37℃下培養 1 小時。數據代表兩個實驗中所測試之三個供體。BGCB463 結合不受血清存在影響。
〔**圖 13A**〕至〔**圖 13B**〕將 H929-GFP 細胞與來自 3 個供體之 BGCB463 及人類泛 T 細胞以 3:1 之 E:T 比培養，添加抗 CD25-AF647 以追蹤 T 細胞活化（圖 13A）。基於經處理相對於未經處理的孔中之 GFP 信號計算細胞溶解百分比（圖 13B）。持續培養約 140 小時，每三小時獲取一次影像。
〔**圖 14A**〕至〔**圖 14F**〕將 H929-GFP 細胞與來自四個供體之 BGCB463、或 B23B251（同型對照）分子及人類泛 T 細胞以 1:1 及 5:1 之 E:T 比培養，添加抗 CD25-AF647 以追蹤 T 細胞活化。基於經處理相對於未經處理的孔中之 GFP 信號計算細胞溶解百分比。持續培養約 140 小時，每三小時獲取一次影像。BGCB463，1:1 之比，細胞溶解（圖 14A）。BGCB463，1:1 之比，總積分強度（圖 14B）。BGCB463，5:1 之比，細胞溶解（圖 14C）。BGCB463，5:1 之比，總積分強度（圖 14D）。B23B251，5:1 之比，細胞溶解（圖 14E）。B23B251，5:1 之比，總積分強度（圖 14F）。
〔**圖 15A**〕至〔**圖 15D**〕使用患者血清判定可溶性 BCMA 干擾。供體 1（圖 15A）；供體 2（圖 15B）；供體 3（圖 15C）；及正常血清（圖 15D）。將具有已知水平之 sBCMA 的患者血清與經直接標記之 BGCB463-AF647 及 B23B251-AF647 同型對照在 37℃下在 H929 細胞上培養（90%血清至 10%培養基）1 小時。將 50%及 10%患者血清用正常血清分別稀釋至 50%及 10%之最終濃度。
〔**圖 16**〕描繪 BGCB491 三特異性抗體。
〔**圖 17A**〕至〔**圖 17B**〕針對 $BCMA^+$ $GPRC5D^+$細胞（圖 17A）及 $BCMA^-$ $GPRC5D^-$細胞（圖 17B）測試 BGCB463、BGCB491 及三個對照組（BGCB482（CD3x 空 x 空））、BGCB483（CD3x 空 xBCMA）、BGCB484（CD3xGPRC5Dx 空））。效應物與目標(E:T)比為 3:1；n =1 個 T 細胞供體，培養 72 小時，最高濃度 53 nM，1 至 5 稀釋度。對於細胞毒性及 T 細胞活化兩者進行測試。

〔**圖 18A**〕至〔**圖 18B**〕在初次培養後 72 及 96 小時，BGCB463 及 BGCB491 消耗 H929 WT、GPRC5D KO、及 BCMA KO 細胞系（圖 18A）。該 E:T 比係 3:1，n =5 個 T 細胞供體；培養 72(5)及 96(4)小時；最高濃度 532 mM，1 至 5 稀釋度梯度。兩種抗體在如上相同的 H929 WT、GPRC5D KO、及 BCMA KO 細胞中皆顯示 72 及 96 小時之 T 細胞活化增加（圖 18B）。

〔**圖 19**〕用 H929、RAMOS、及 GRANTA-519 細胞系在細胞毒性及 T 細胞活化檢定中測試 BGCB463 及 BGCB491。E:T 係 5:1，n=1 個 T 細胞供體；僅培養 72 小時；最高濃度為 53 nM；及 1 至 5 稀釋度。

〔**圖 20**〕用 H292 細胞在細胞毒性及 T 細胞活化全血檢定中測試 GBCB463 及 BGCB491。E:T 係 5:1，n=2 個全血供體；培養 48 小時；最高濃度為 532 nM；及 1 至 5 稀釋度。

〔**圖 21A**〕至〔**圖 21B**〕若給予足夠高的劑量，則顯示 BGCB463 在 MM.1S 及 RPMI 8226 異種移植小鼠模型中抑制腫瘤生長：在該 MM.1S 模型中 2ug 或 10ug（圖 21A）或在該 RPMI 8226 模型中 5ug 或 10 ug（圖 21B）。

〔**圖 22**〕在 H929 預防性異種移植小鼠模型中，BGCB463 及 BGCB491 顯示抑制腫瘤生長。相較於 PBS 對照組，0.5ug 及 5ug 劑量兩者均減緩了在 H929-BCMA KO 及 H929-GPRC5D KO 模型中的腫瘤生長，較高的 5ug 濃度顯示出更大的效果。

〔**圖 23**〕在 1 小時、37℃DRC 泛 T 結合檢定中，對 BGCB463 及 BGCB491 進行測試。使用兩個人類泛 T 細胞供體，且測試分子具有 2uM 起始濃度、1:3 稀釋度及 11 點 DRC。

〔**圖 24A**〕至〔**圖 24D**〕在 1 小時、37℃DRC 套件結合檢定中，針對 H929 WT（圖 24A）、H929-BCMA KO（圖 24B）、H929-GPRC5D KO（圖 24C）、及 H929-BCMA/GPRC5D 雙 KO（圖 24D）細胞對 BGCB463、BGCB491、及空對照組進行測試。

〔**圖 25**〕BGCB491 在 H929 WT、H929-BCMA KO 細胞、H929-GPRC5D KO 細胞、及/或 H929-BCMA/GPRC5D 雙 KO 細胞上在 37℃下培養 1 小時之後之代表性結合概況。以●指示 BGCB491，且以■指示陰性對照 CD3x 空 x 空 BGCB510。曲線代表 5 個獨立實驗。H929-GPRC5D-KO 殖株 H15 係異型的 KO 系，具有 2 個 30%及 61%分佈的基因拷貝。H929-BCMA-KO 殖株 J8 係異型的 KO 系，具有 2 個相等 50%分佈的基因拷貝。

〔**圖 26**〕BGCB491 在 7 個供體細胞製劑上在 37℃下培養 1 小時之後之初級 T 細胞結合概況。MFI，平均螢光強度。

〔**圖 27**〕用 CD3B376x 空對照抗體(GCDB381)外推代表性生物資訊結合曲線。

〔**圖 28A**〕至〔**圖 28B**〕BCMA-GPRC5D 雙陽性及 BCMA-GPRC5D 雙陰性細胞系之 BGCB491 媒介之（圖 28A）細胞毒性及（圖 28B）T 細胞活化。在來自 6 個健康供體（供體 ID：20063323、20063309、20062062、20063310、20062105、及 20061963）之泛 T 細胞及 Fc 阻斷劑(2 mg/mL)存在下，以各種濃度（0.00005 至 533.33 nM，X 軸）添加 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空，且培養 72 小時。在此等研究中測試 3:1 之最佳 E:T 比（對於 E:T 比評估，請參見圖 33A 至圖 33B）。使用 Prism 8 藉由將單獨的 4PL 模型擬合至觀察到的數據而產生圖。數據點沿著所產生之擬合曲線緊密對準，並且在 T 細胞供體（繪製 6 個供體平均值）之間幾乎沒有觀察到變異性。在圖 28A 中，測量目標細胞死亡並在 Y 軸上表示為細胞毒性百分比。在圖 28B 中，將 T 細胞活化測量為 CD25+CD3+ T 細胞百分比。

〔**圖 29**〕BGCB491 媒介之 H929 CRISPR KO 殖株細胞細胞毒性及 T 細胞活化。在來自 4 個健康供體（供體 ID：20063323、20063309、20062062、及 20063310）之泛 T 細胞及 Fc 阻斷劑(2 mg/mL)存在下，以各種濃度（0.00005 至 533.33 nM，X 軸）添加 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空，且培養 72 小時。在此等研究中測試 3:1 之 E:T 比。使用 Prism 8 藉由將單獨的 4PL 模型擬合至觀察到的數據而產生圖。數據點沿著所產生之擬合曲線緊密對準，並且在 T 細胞供體（繪製 4 個供體平均值）之間幾乎沒有觀察到變異性。

上排為測量目標細胞死亡且表示為細胞毒性百分比，以及將 T 細胞活化測量為表現 CD3+陽性細胞之 CD25 百分比（Y 軸）顯示在下排中。

〔**圖 30**〕在摻有(spiked with) H929 MM 細胞的全血中之 BGCB491 媒介之目標細胞細胞毒性（MABEL 檢定）。MABEL，最小預期生物效應水平。將 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空以各種濃度（0.00005 至 533.33 nM，X 軸）添加至來自 7 個健康供體（供體 ID：10145、10403、10420、10083、10463、10493、及 10145；T 細胞源）的全血中，其係在以 5:1 之經調整的 E:T 比之 H929 目標骨髓瘤細胞存在下達 48 小時。使用 Prism 8 藉由將單獨的 4PL 模型擬合至觀察到的數據而產生圖。數據點沿著所產生之擬合曲線緊密對準，並且在 T 細胞供體（繪製 7 個供體平均值）之間幾乎沒有觀察到變異性。測量目標細胞死亡且表示為細胞毒性百分比，並將 T 細胞活化測量為 CD25+CD3+細胞百分比。在此實驗中，測試泰克利單抗、或塔奎達單抗作為陽性對照。

〔**圖 31**〕來自 MABEL 檢定之 BGCB491 之細胞介素概況。MSD，Meso Scale Discovery。將 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空以各種濃度（0.00005 至 533.33 nM，X 軸）添加至來自 3 個健康供體之全血中。收集來自上述細胞毒性實驗之 H929 細胞上清液（圖 7；3 個 T 細胞供體；供體 ID：10083、10463、及 10493）且使用基於 MSD 之多重檢定（目錄號：K15049D）分析細胞介素水平。將細胞介素水平測量為 pg/mL。使用 Prism 8 藉由將單獨的 4PL 模型擬合至觀察到的數據而產生圖。數據點沿著所產生之擬合曲線緊密對準，並且在 T 細胞供體（繪製 3 個供體平均值）之間幾乎沒有觀察到變異性。在此實驗中，測試泰克利單抗、或塔奎達單抗作為陽性對照。

〔**圖 32**〕BGCB491 對人類初級 MM CD138+細胞的細胞毒性潛力。MNC，單核細胞。來自 4 種不同骨髓瘤患者之冷凍骨髓衍生之單核細胞（MM BM MNC-626、649、652、及 653）用於評估 BGCB491 血漿細胞消耗（上排）及 T 細胞活化（下排）潛力。將來自正常健康供體（供體 ID: 20063309）之 T 細胞外源添加至患者 BM MNC 樣本（1:1 之 E:T 比），並用 BGCB491、CD3x 空 x 空、泰克利單抗、或塔奎達單抗（0.00005 至 533.33 nM，X 軸）培養 48 小時。觀察到回應於 BGCB491 處理的活漿細胞(CD138+)損失及伴隨之 T 細胞上之 CD25 上調。在供體之間觀察到總初始血漿細胞計數之可變性。列出個別目標受體密度值及百分比目標陽性群體。

〔**圖 33A**〕至〔**圖 33B**〕在各種 E:T 比及培養時間（H929 細胞系）下之 BGCB491 細胞毒性潛力。（圖 33A）將 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空在來自 1 個健康供體（供體 ID：20063323）之泛 T 細胞存在下，以 4 種不同 E:T 比（5:1、3:1、1:1、及 0.5:1）測試 72 小時。（圖 33B）將 BGCB491 以 3:1 及 1:1 之 E:T 比，在各種時間點（24 小時-圓形、48 小時-向上三角形、72 小時-向下三角、96 小時-六邊形、120 小時-菱形、144 小時-星形、及 168 小時-方形），使用 4 種不同 T 細胞供體（供體 ID：20062105、20063309、20061963、及 20063310）進行測試。測量目標細胞死亡及 T 細胞活化並表示為細胞毒性百分比及 CD25+CD3+ T 細胞百分比。使用 Prism 8 藉由將單獨的 4PL 模型擬合至觀察到的數據而產生圖。數據點沿著所產生之擬合曲線緊密對準，並且在 T 細胞供體之間幾乎沒有觀察到變異性：繪製 1 個（圖 33A）及 4 個（圖 33B）供體平均值。

〔**圖 34A**〕至〔**圖 34C**〕於目標細胞不存在下，BGCB491 對 T 細胞活化的影響。使用（圖 34A）6 個正常健康供體 T 細胞（供體 ID：20063323、20063309、20062062、20063310、20062105、及 20061963）或（圖 34B）6 個正常供體全血樣本（供體 ID：10274、10402、10427、10470、10500、及 10509）執行 T 細胞活化檢定。（圖 34C）針對各種子集測量非特異性細胞毒性。以各種濃度（0.00005 至 533.33 nM，X 軸）添加 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空達 72 小時（圖 34A）及 48 小時（圖 34B，圖 34C）。

〔**圖 35**〕BGCB491、泰克利單抗、及塔奎達單抗在 T 細胞人化 NSG 小鼠皮下(SC) RPMI 8226 異種移植物中之抗腫瘤功效（研究 A）。KO，剔除；NSG，非肥胖糖尿病(NOD)嚴重組合免疫缺乏(scid)γ 或 NOD.Cg *Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ；PBS，磷酸鹽緩衝鹽水；SEM，平均值的標準誤差。以 0.1、0.4、1、及 2.5 mg/kg 之 BGCB491 對攜帶已確立 SC RPMI 8226 腫瘤之 T 細胞人化 NSG小鼠進行腹膜內(IP)給藥。泰克利單抗係以 0.4、1、及 2.5 mg/kg IP 給藥。塔奎達單抗係以 2.5 mg/kg IP 給藥。在第 19、21、25、28、31、34、38、及 41 天投予治療（由 X 軸下方之黑線指示）。每週測量腫瘤體積兩次，並將結果呈現為各組之平均腫瘤體積±SEM。以圖形方式表示每組之數據，其中至少 70%的動物留在研究中。

〔**圖 36**〕BGCB491、泰克利單抗、及塔奎達單抗在 T 細胞人化 NSG 小鼠皮下(SC) H929-BCMA-KO 及 H929-GPRC5D-KO 異種移植物中之抗腫瘤功效（研究 B）。KO，剔除；NSG，非肥胖糖尿病(NOD)嚴重組合免疫缺乏(scid)γ 或 NOD.Cg *Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ；PBS，磷酸鹽緩衝鹽水；SEM，平均值的標準誤差。以 0.025、0.1、0.25、及 0.5 mg/kg 之 BGCB491 對攜帶 H929-BCMA-KO（左側腹）及 H929-GPRC5D-KO（右側腹）腫瘤之 T 細胞人化 NSG 小鼠進行腹膜內(IP)給藥。泰克利單抗及塔奎達單抗係以 0.1 及 0.25 mg/kg IP 給藥。在第 1、5、9、13、16、19、及 22 天投予治療（由 X 軸下方之黑線指示）。每週測量腫瘤體積兩次，並將結果呈現為各組之平均腫瘤體積± SEM。以圖形方式表示每組之數據，其中至少 70%的動物留在研究中。

〔**圖 37**〕**至**〔**圖 38**〕雌性食蟹獼猴（圖 37）及預測模型（圖 38）中單次靜脈內(IV) 0.5 mg/kg 劑量之後的個別 BGCB491 血清濃度-時間曲線。BQL，低於定量界限。圖中未顯示濃度低於最低可量化濃度之數據點。

〔**圖 39A**〕**至**〔**圖 39B**〕平均值(SD) BGCB491 濃度-在雄性迷你豬及模型預測中單次劑量的 BGCB491 之後的時間曲線。BQL，低於定量界限；SD，標準偏差。圖中未顯示濃度低於最低可量化濃度之數據點。第 1 組：劑量= 0.01 mg/kg，皮下(SC)投予。第 2 組：劑量= 0.1 mg/kg，SC。第 3 組：劑量= 0.1 mg/kg，IV。

〔**圖 40**〕在 24 小時、37℃培養之 BGCB463 在 H929 WT 及 MM.1R WT 細胞系上之動力學結合概況。MFI：平均螢光強度。

〔**圖 41**〕與內源性 BCMA-GPRC5D 表現性細胞係之 BGCB491 結合。Geo，幾何。以各種濃度（0.096 至 1,000 nM，X 軸）添加 BGCB491、BCMAxGPRC5Dx 空、及 CD3x 空 x 空，且在 37℃下培養 1 小時。使用 Prism 8 藉由將單獨的 4PL 模型擬合至觀察到的數據而產生圖。結合強度表示為幾何平均值（Y 軸）。

〔**圖 42**〕使用來自 3 個 T 細胞供體之 T 細胞以（圖 42A）1:1 及（圖 42B）1:3 E:T 比之 BGCB491 及 CD3B2271（空對照）之動力學細胞毒性及 T 細胞活化。Incucyte 上之 CD25 測量係 T 細胞計數及 CD25 表現（總積分強度）之量度。CD25 係 T 細胞活化之後期標記物，一般在活化後 24 小時可偵測到並在約 96 小時達到峰值。就時間而言，其不一定與細胞毒性一致。\基於經處理相對於未經處理的孔中之綠螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)信號計算細胞溶解百分比。

〔**圖 43**〕BGCB491 及 CD3B2271（空對照）以 1:1 之效應對目標(E:T)比，在 72 小時、93 小時、及 120 小時時間點之細胞溶解及 T 細胞活化百分比。

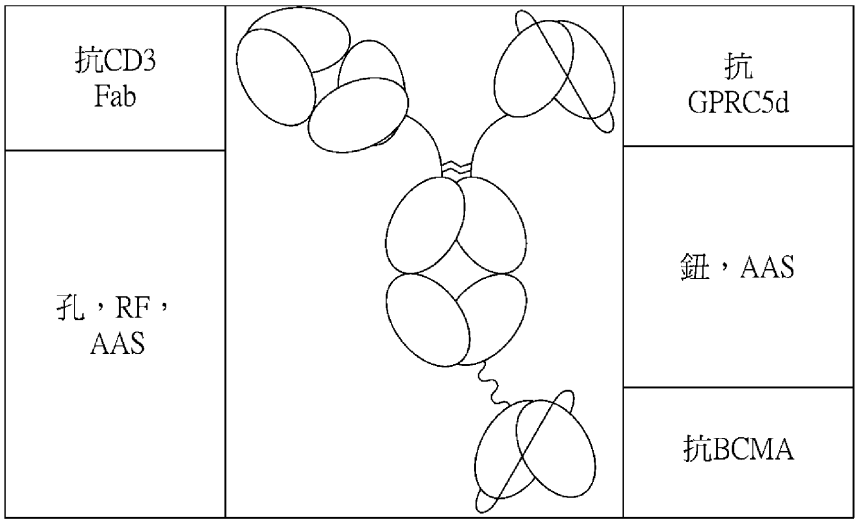
〔**圖 44**〕BGCB491 及 CD3B2271（空對照）以 1:3 之 E:T 比，在 72 小時、93 小時、及 120 小時時間點之細胞溶解及 T 細胞活化百分比。

〔**圖 45**〕JNJ-79635322、泰克利單抗、及塔奎達單抗在 T 細胞人化 NSG 小鼠皮下 MM.1S 異種移植物中之抗腫瘤功效（研究 C）。NSG，非肥胖糖尿病(NOD)嚴重組合免疫缺乏(*scid*)γ 或 NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ；PBS，磷酸鹽緩衝鹽水；SEM，平均值的標準誤差。以 0.025、0.1、0.5、及 1 mg/kg 之 BGCB491 對攜帶已確立 SC MM.1S 腫瘤之 T-細胞人化 NSG

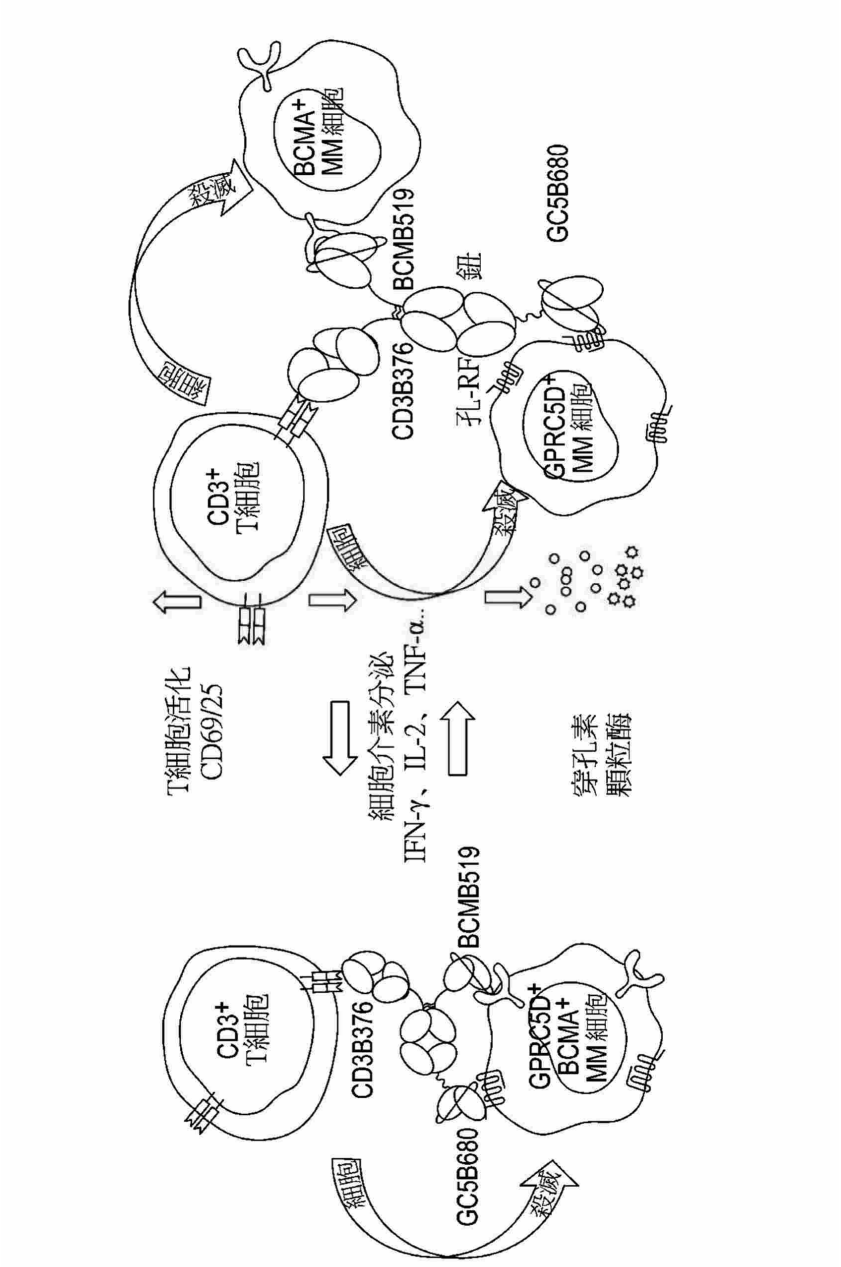
小鼠進行 IP 給藥。塔奎達單抗係以 0.025 及 0.1 mg/kg IP 給藥。泰克利單抗係以 0.1 及 0.5 mg/kg 之 IP 給藥，在第 15、19、22、26、30、34、及 37 天投予治療（由 X 軸下方之黑線指示）。每週測量腫瘤體積兩次，並將結果呈現為各組之平均腫瘤體積± SEM。以圖形方式表示每組之數據，其中至少 70%的動物留在研究中。在治療後監測動物直至表現出移植物抗宿主疾病(GvHD)相關的發病跡象，此時將動物安樂死並在第 51 天結束研究。

〔**圖 46A**〕**至**〔**圖 46B**〕BCMA 先導(BCMB519)顯示出與具有理想 scFv 生物物理性質之泰克利單抗相當的結合及細胞毒性。

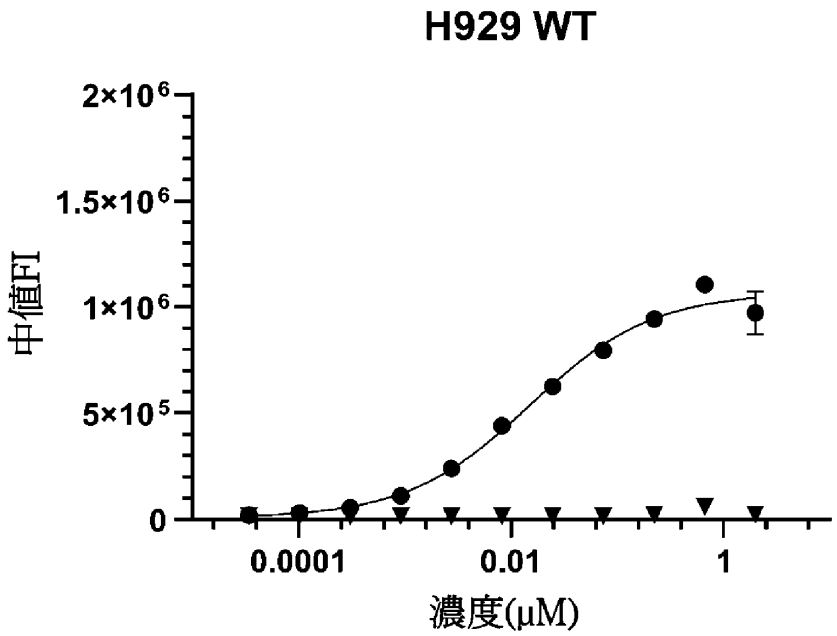
〔**圖 47**〕相較於具有理想 scFv 生物物理性質的塔奎達單抗，GPRC5d 先導(GC5B680)顯示出特異性的及改良的結合。



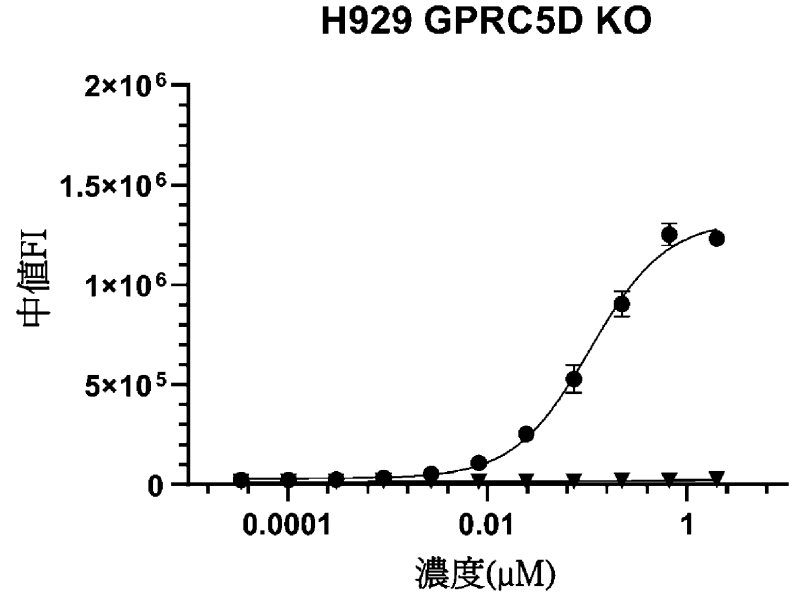
【圖1A】


BCMA+
MM細胞
殺滅
BCMB519
鈕
GC5B680
CD3B376
孔-RF
GPRC5D+
MM細胞
CD3+
T細胞
細胞
殺滅
T細胞活化
CD69/25
細胞介素分泌
IFN-γ、IL-2、TNF-α...
穿孔素
顆粒酶
BCMB519
CD3+
T細胞
CD3B376
GPRC5D+
BCMA+
MM細胞
GC5B680
細胞
殺滅

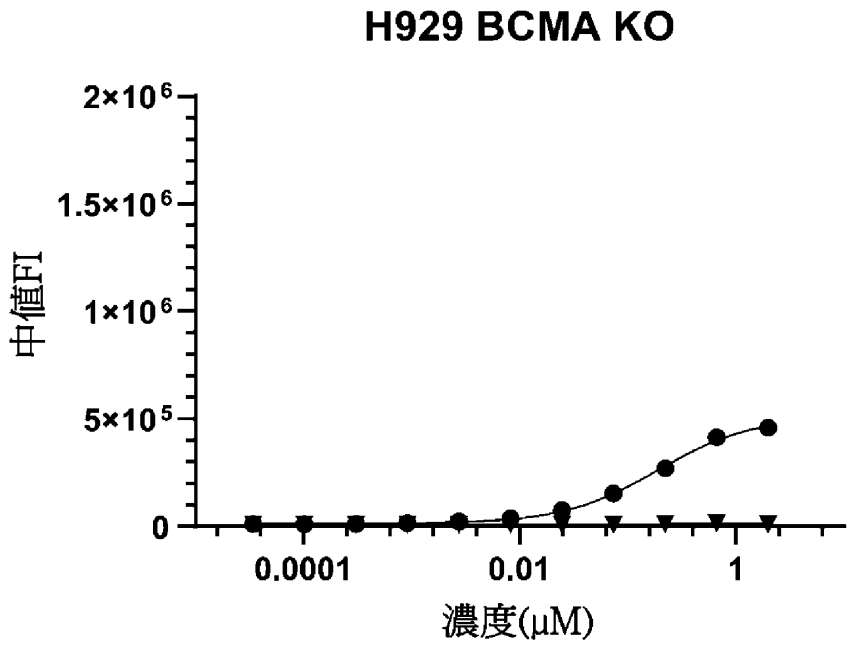
【圖1B】


H929 WT
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

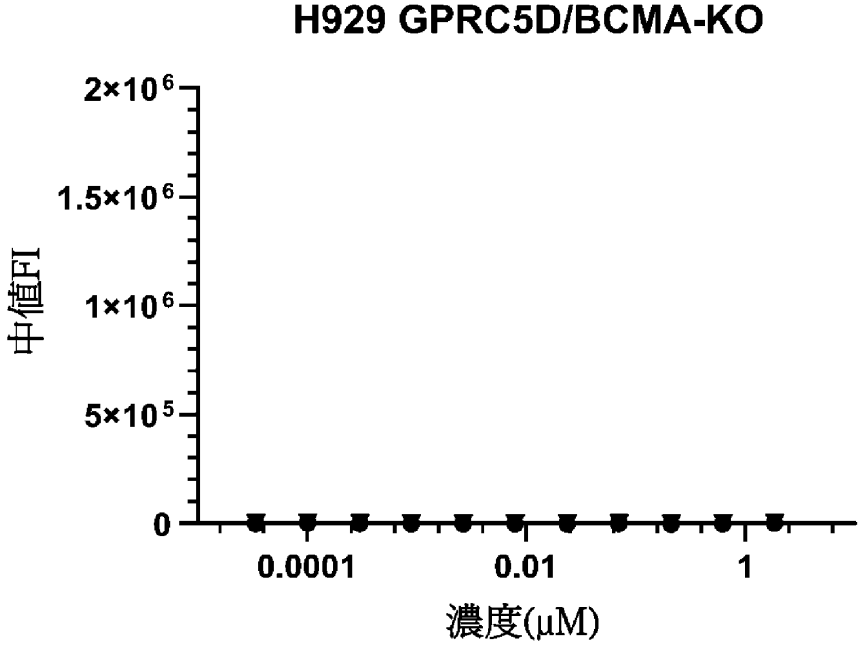
【圖2A】


H929 GPRC5D KO
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

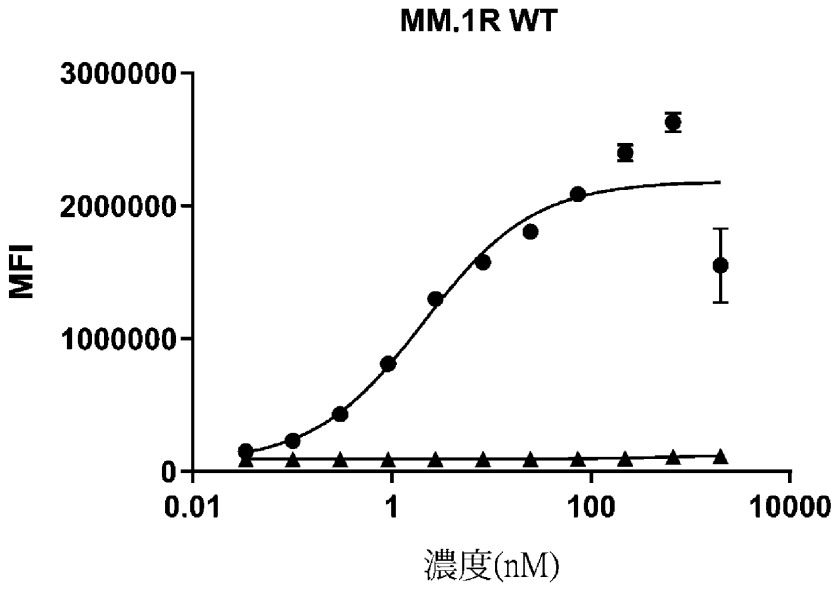
【圖2B】


H929 BCMA KO
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

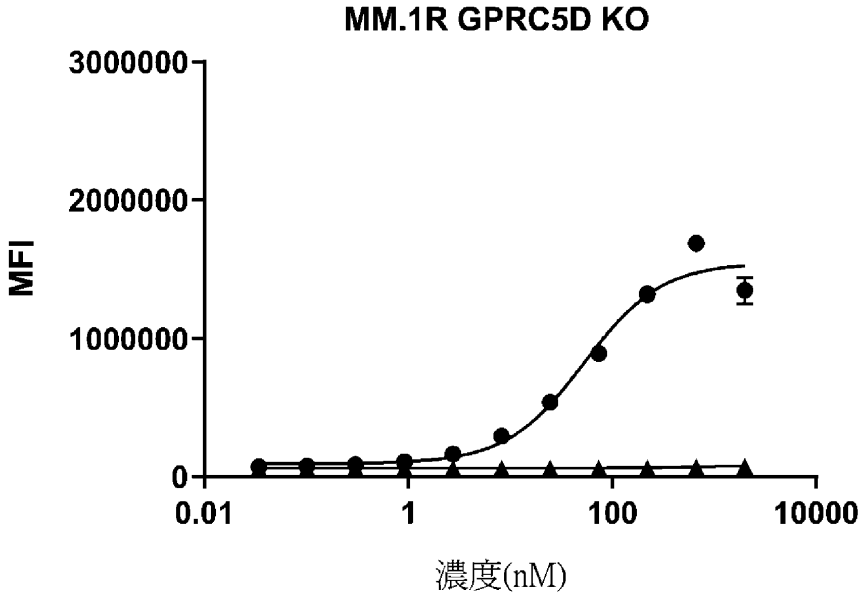
【圖2C】


H929 GPRC5D/BCMA-KO
2×10^6
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

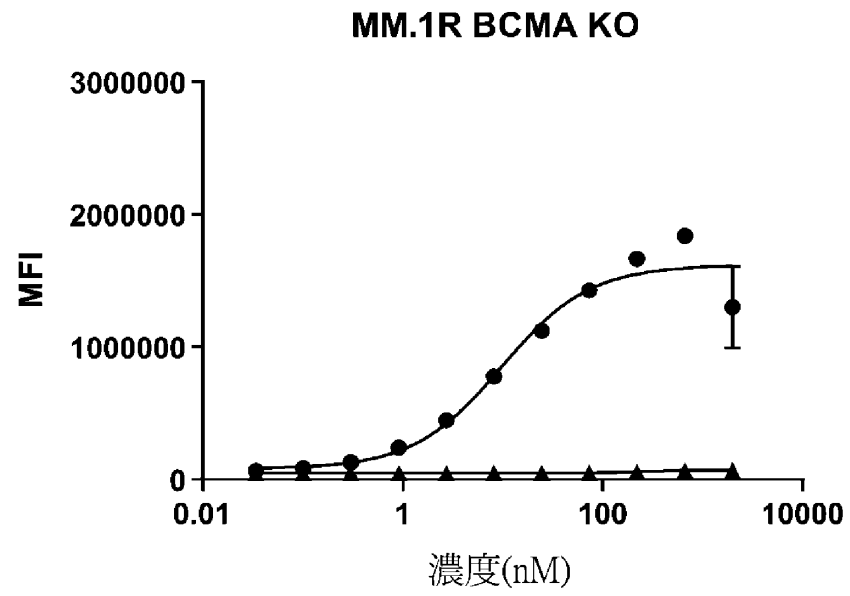
【圖2D】


MM.1R WT
3000000
2000000
1000000
0
MFI
0.01
1
100
10000
濃度(nM)

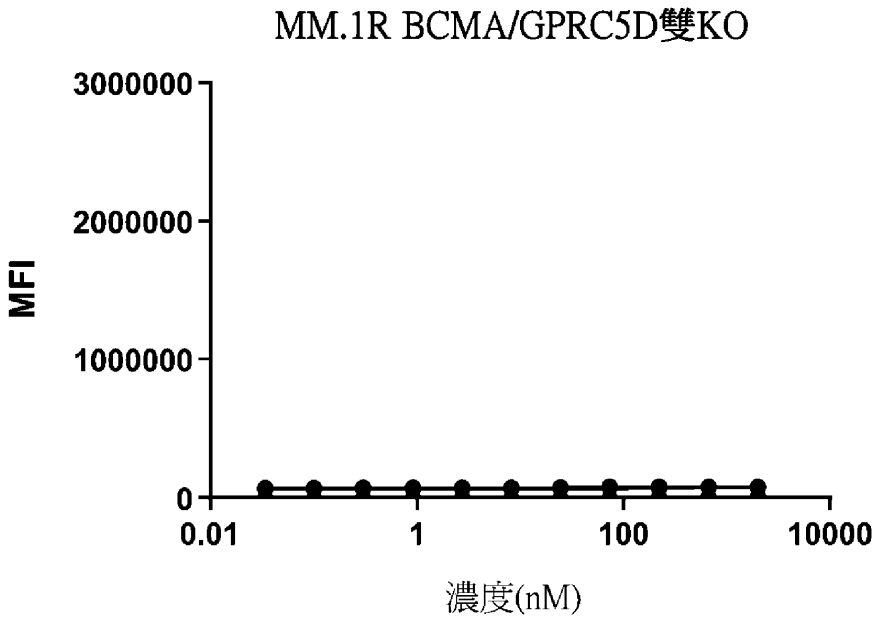
【圖3A】


MM.1R GPRC5D KO
3000000
2000000
1000000
0
MFI
0.01
1
100
10000
濃度(nM)

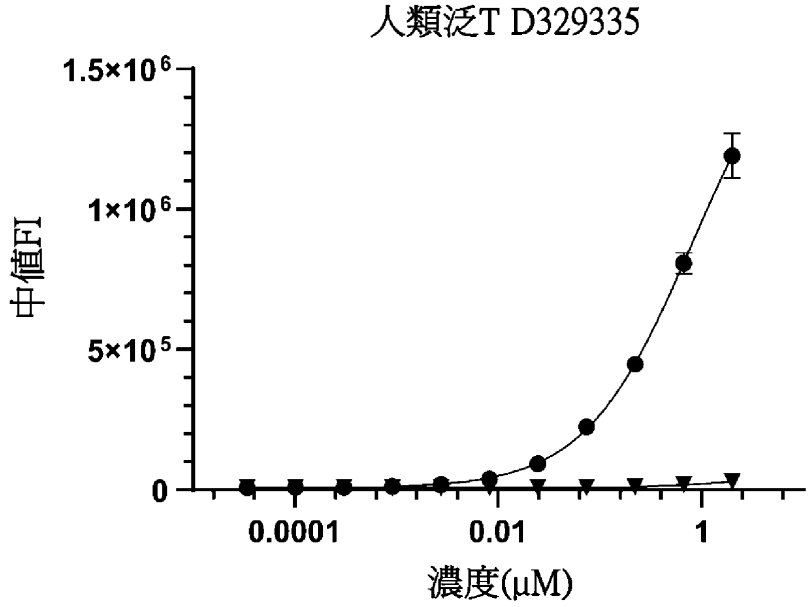
【圖3B】


MM.1R BCMA KO
3000000
2000000
1000000
0
MFI
0.01
1
100
10000
濃度(nM)

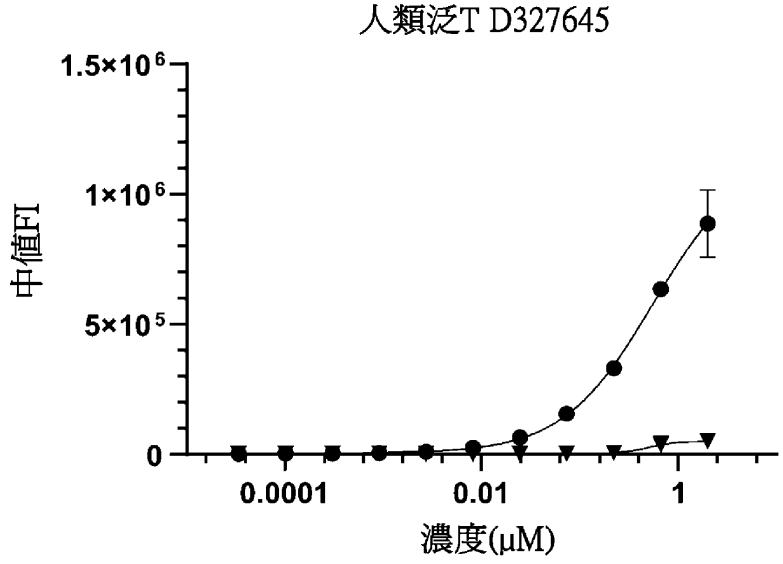
【圖3C】


MM.1R BCMA/GPRC5D雙KO
3000000
2000000
1000000
0
MFI
0.01
1
100
10000
濃度(nM)

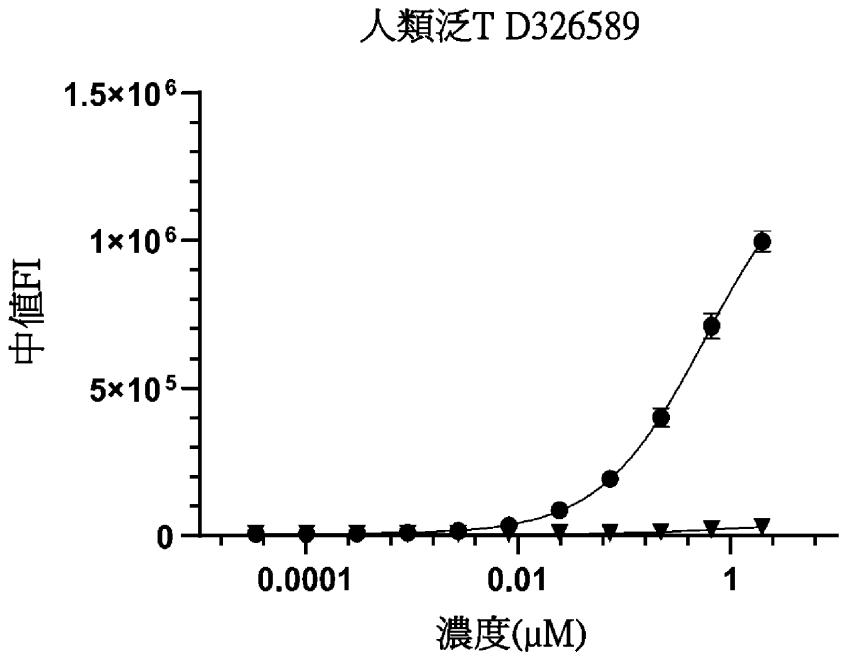
【圖3D】


人類泛T D329335
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

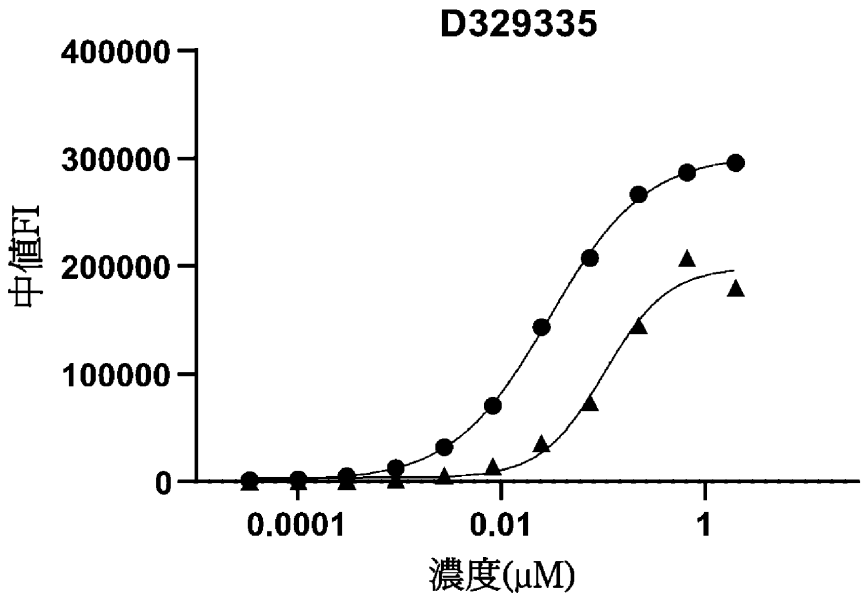
【圖4A】


人類泛T D327645
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

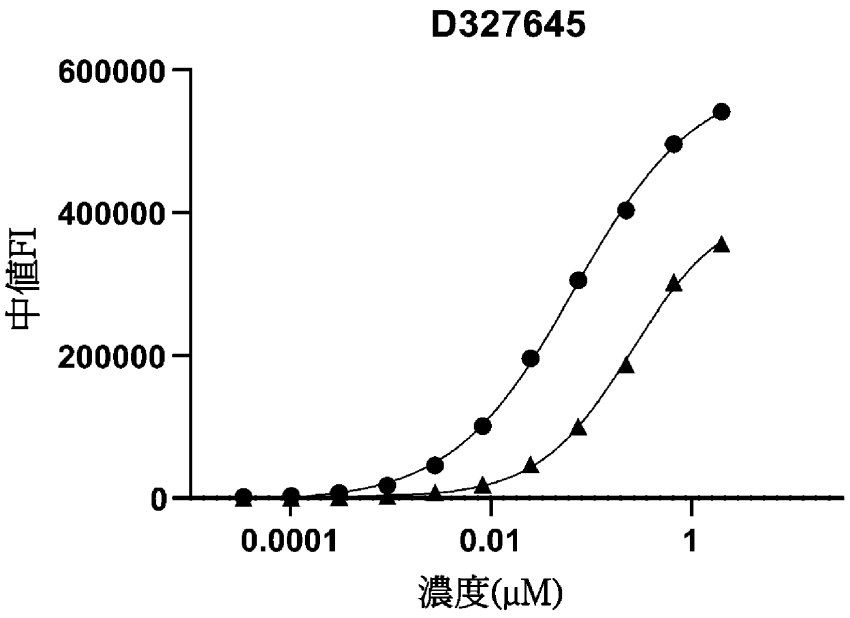
【圖4B】


人類泛T D326589
1.5×10^6
1×10^6
5×10^5
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

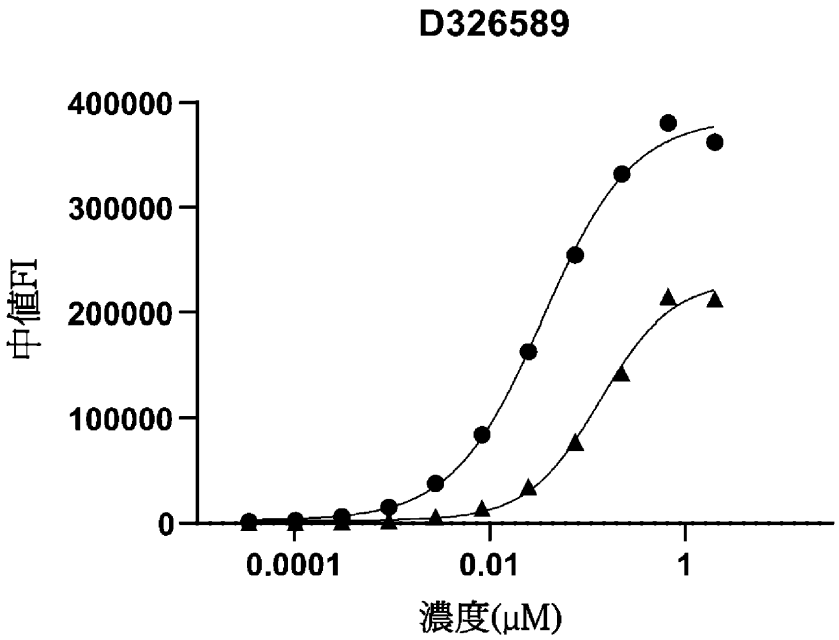
【圖4C】


D329335
400000
300000
200000
100000
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

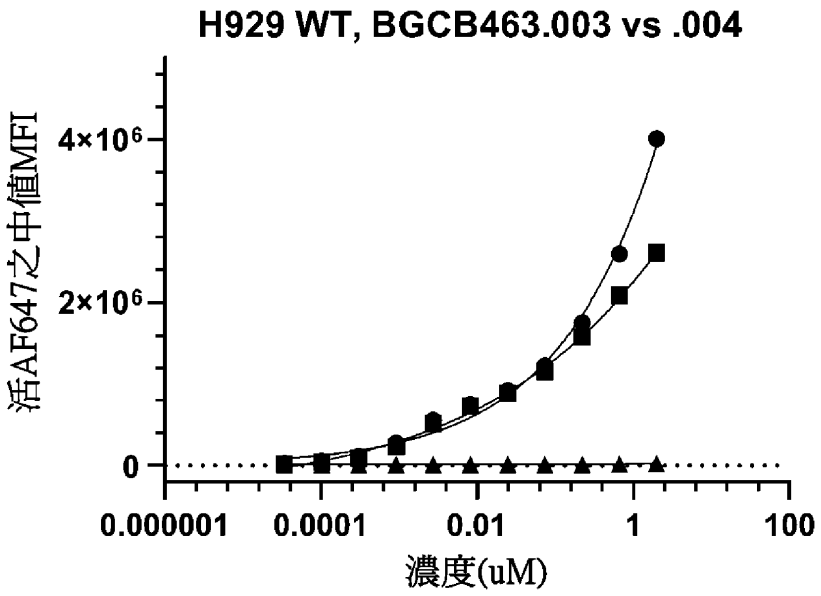
【圖5A】


D327645
600000
400000
200000
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

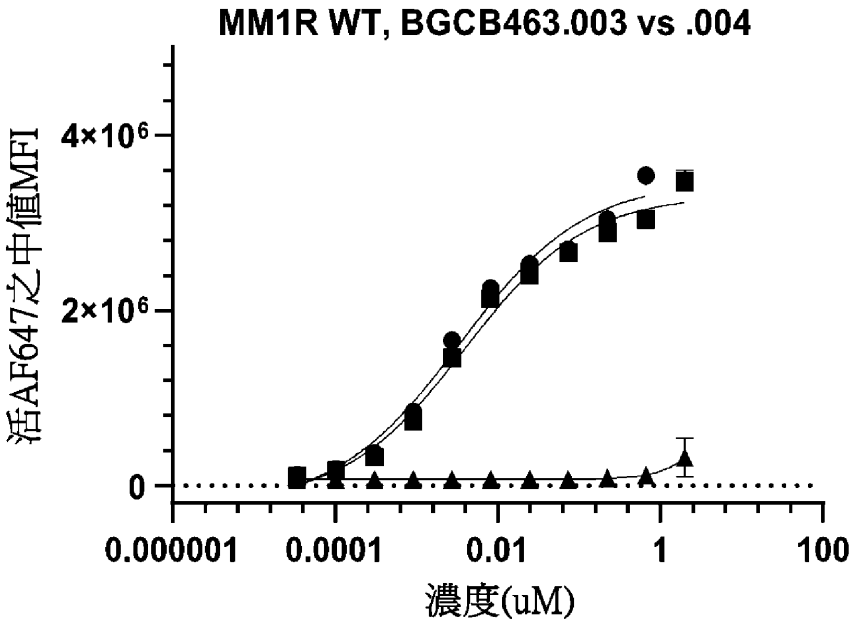
【圖5B】


D326589
400000
300000
200000
100000
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

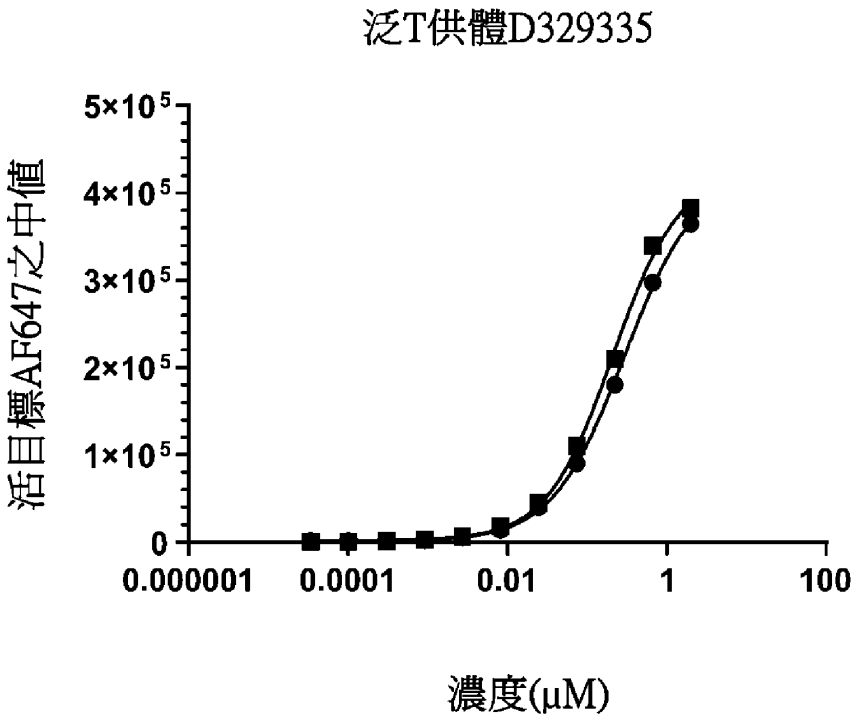
【圖5C】


H929 WT, BGCB463.003 vs .004
活AF647之中值MFI
4×10⁶
2×10⁶
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(uM)

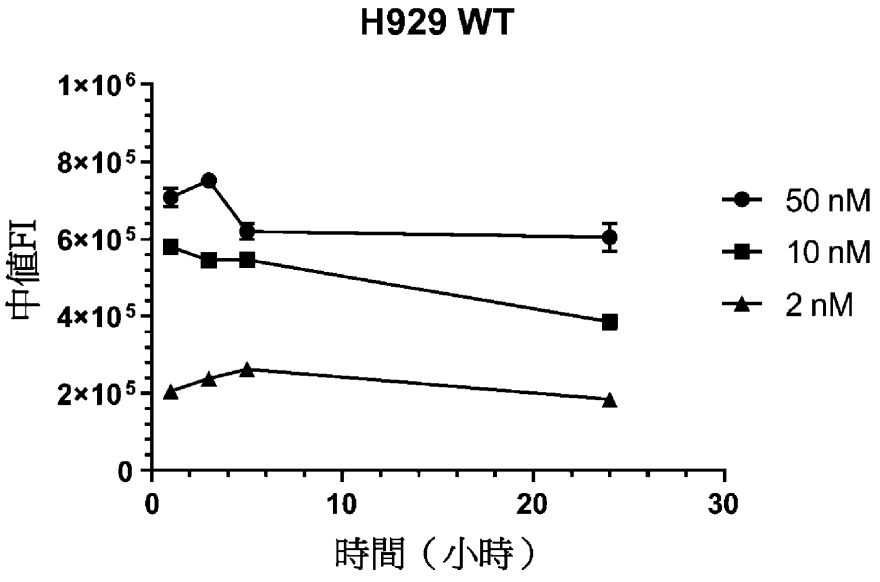
【圖6A】


MM1R WT, BGCB463.003 vs .004
活AF647之中值MFI
4×10⁶
2×10⁶
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(uM)

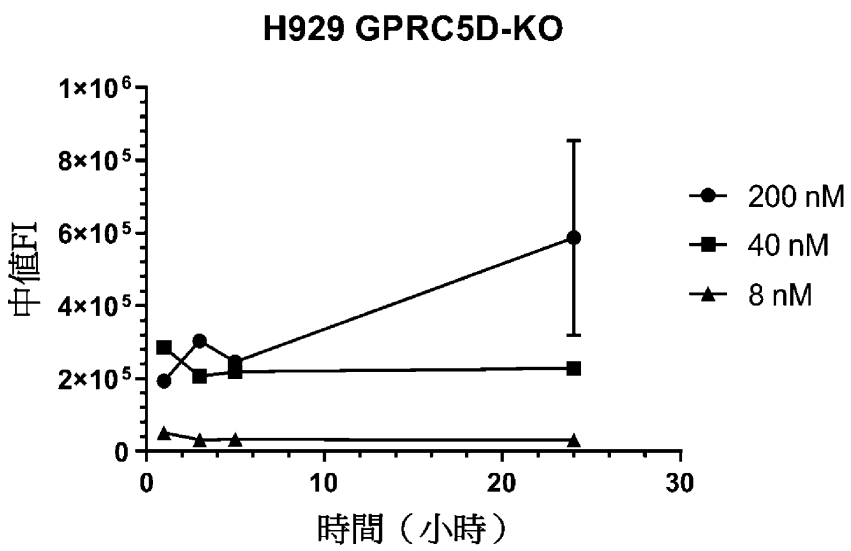
【圖6B】


泛T供體D329335
活目標AF647之中值
5×10^5
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

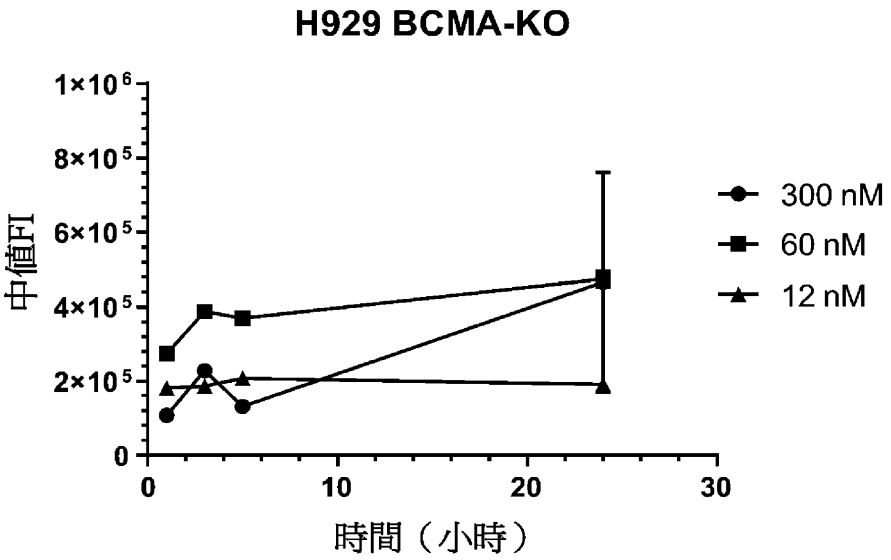
【圖6C】


H929 WT
中值FI
1×10^6
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
0
10
20
30
時間（小時）
50 nM
10 nM
2 nM

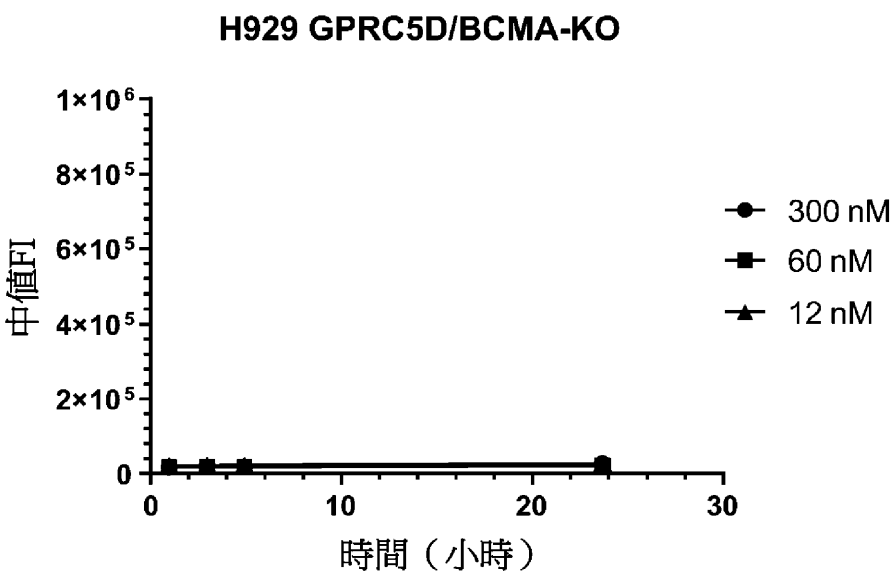
【圖7A】


H929 GPRC5D-KO
1×10⁶
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
200 nM
40 nM
8 nM

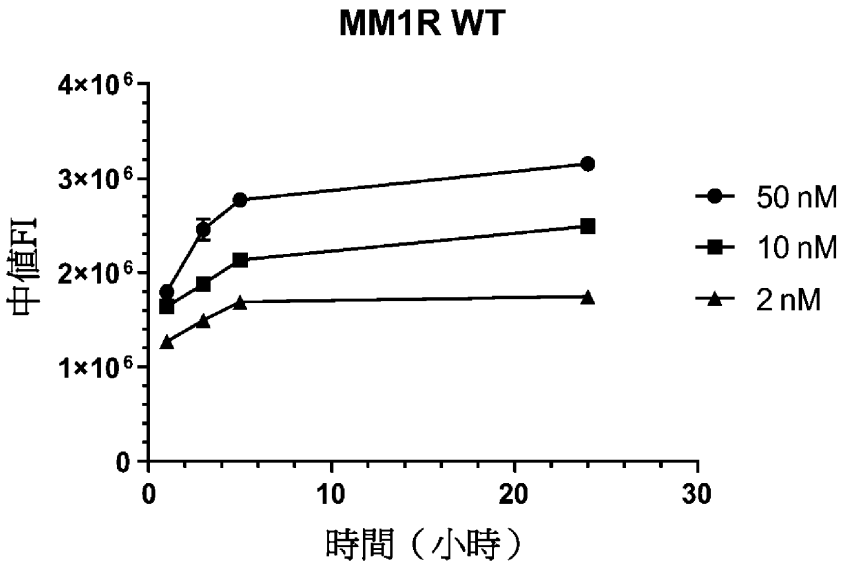
【圖7B】


H929 BCMA-KO
1×10⁶
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
300 nM
60 nM
12 nM

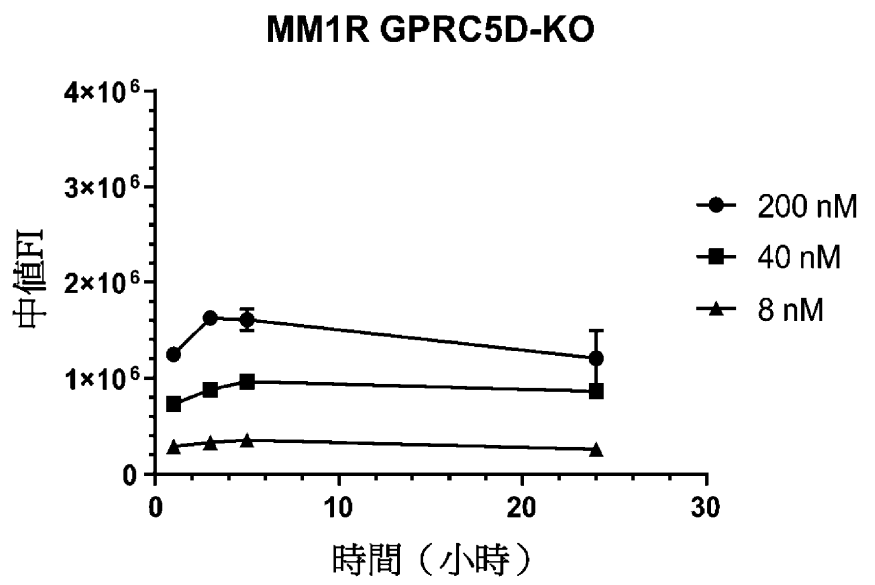
【圖7C】


H929 GPRC5D/BCMA-KO
1×10⁶
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
300 nM
60 nM
12 nM

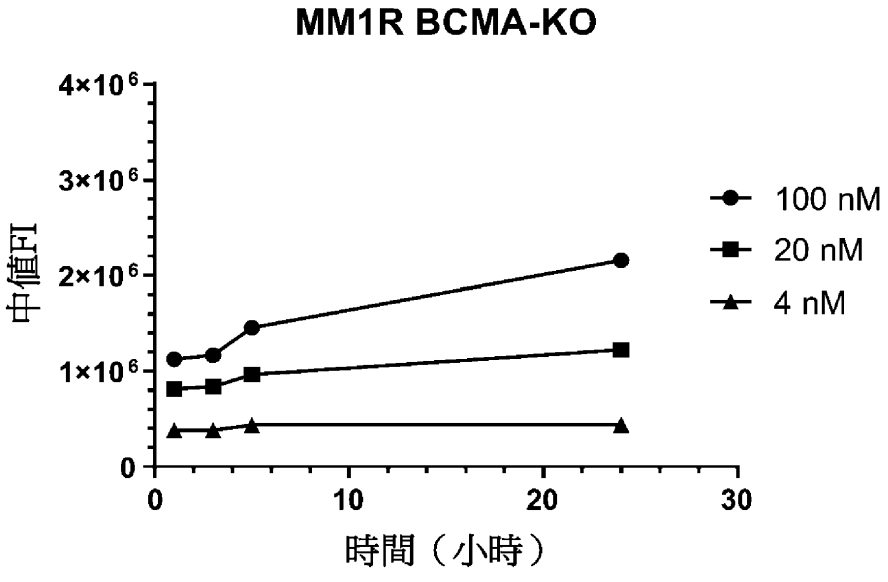
【圖7D】


MM1R WT
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
50 nM
10 nM
2 nM

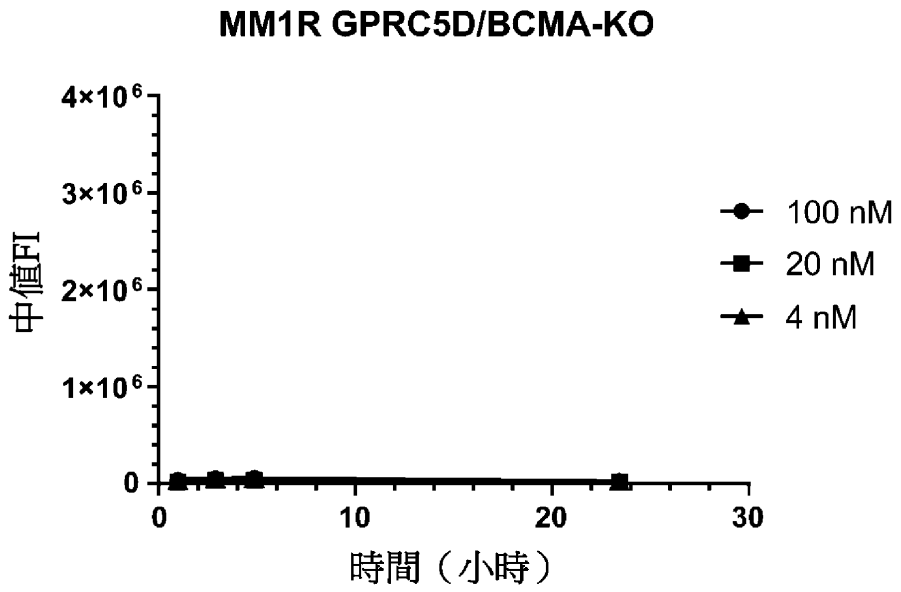
【圖8A】


MM1R GPRC5D-KO
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
200 nM
40 nM
8 nM

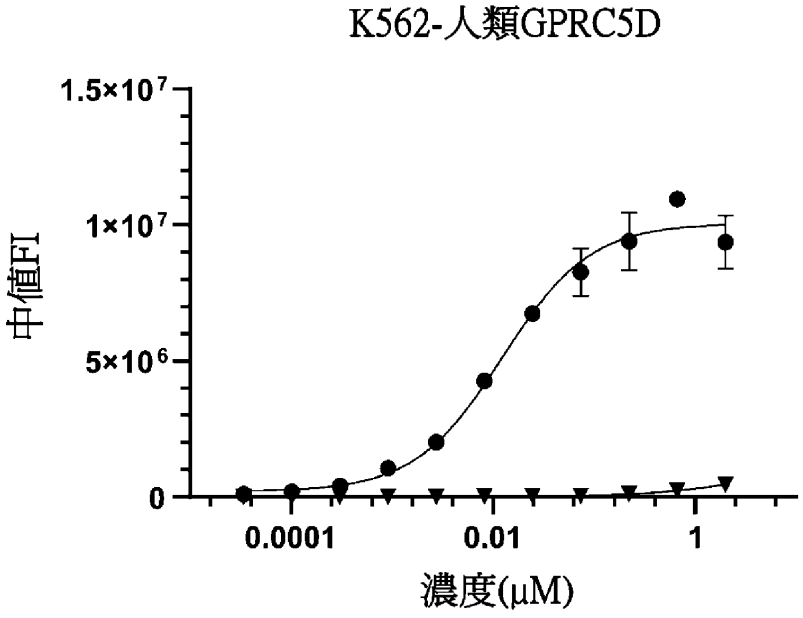
【圖8B】


MM1R BCMA-KO
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
100 nM
20 nM
4 nM

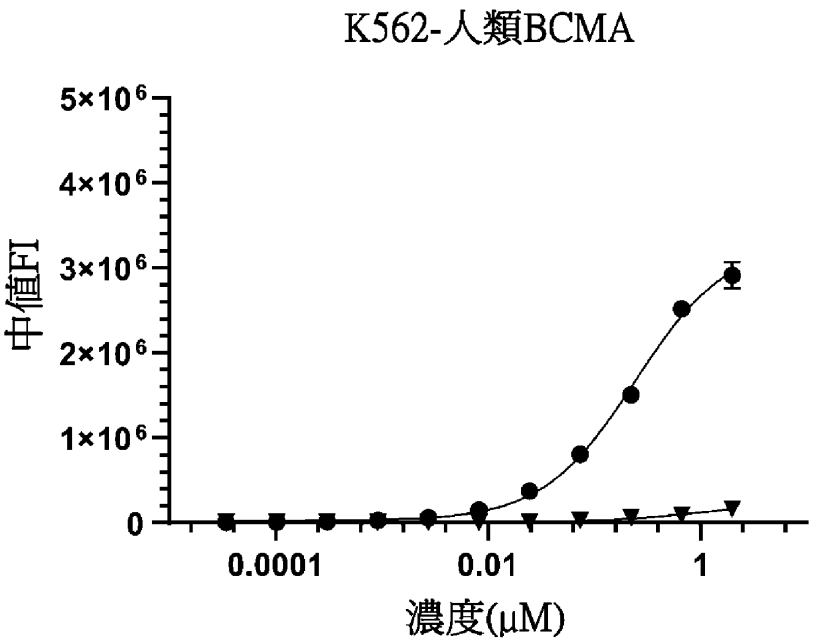
【圖8C】


MM1R GPRC5D/BCMA-KO
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
中值FI
0
10
20
30
時間（小時）
100 nM
20 nM
4 nM

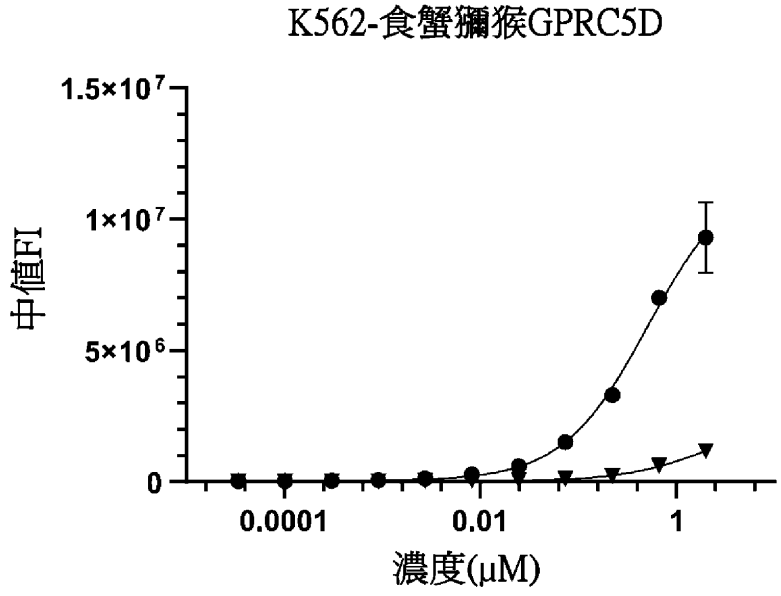
【圖8D】


K562-人類GPRC5D
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

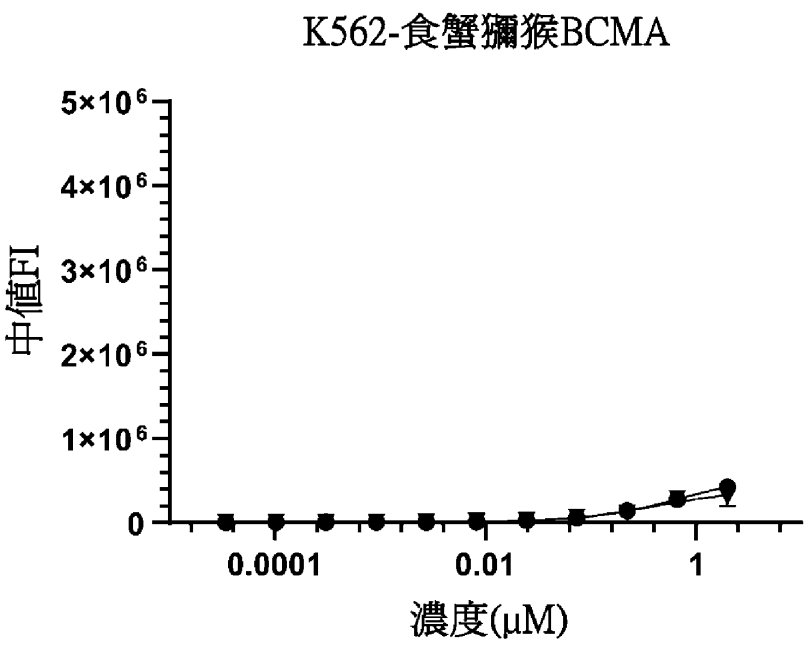
【圖9A】


K562-人類BCMA
5×10⁶
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

【圖9B】


K562-食蟹獼猴GPRC5D
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

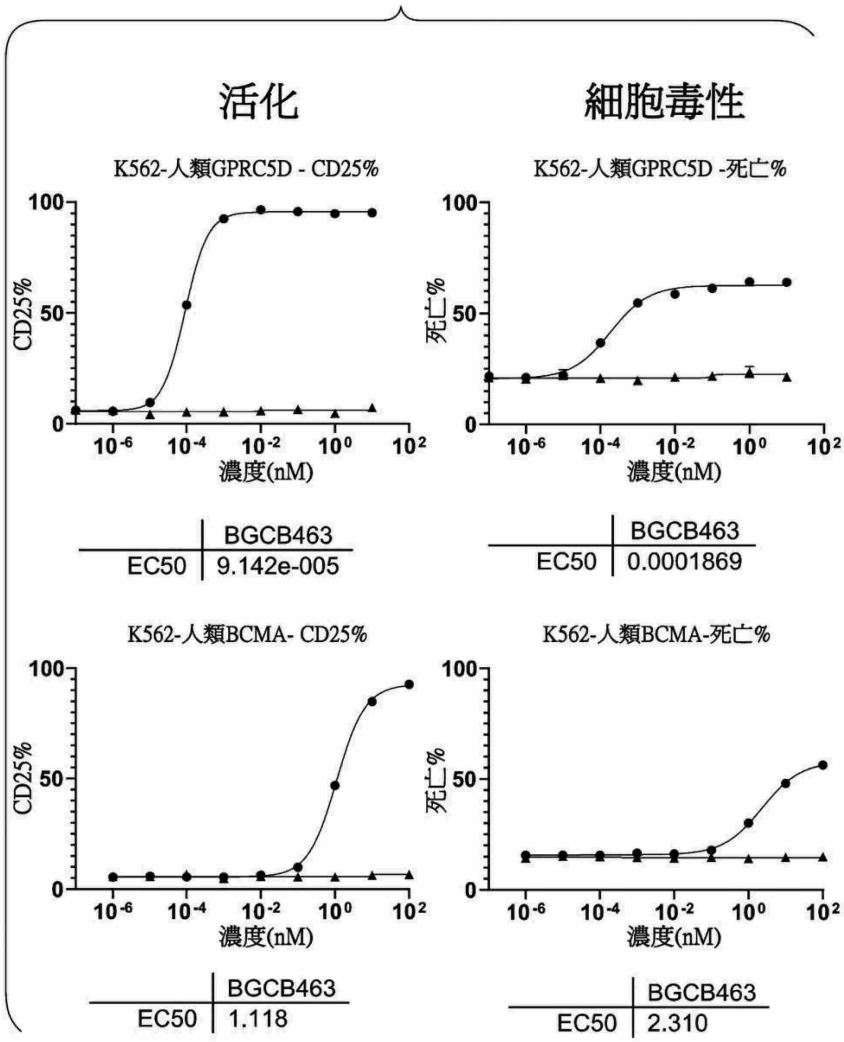
【圖9C】


K562-食蟹獼猴BCMA
5×10^6
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(μM)

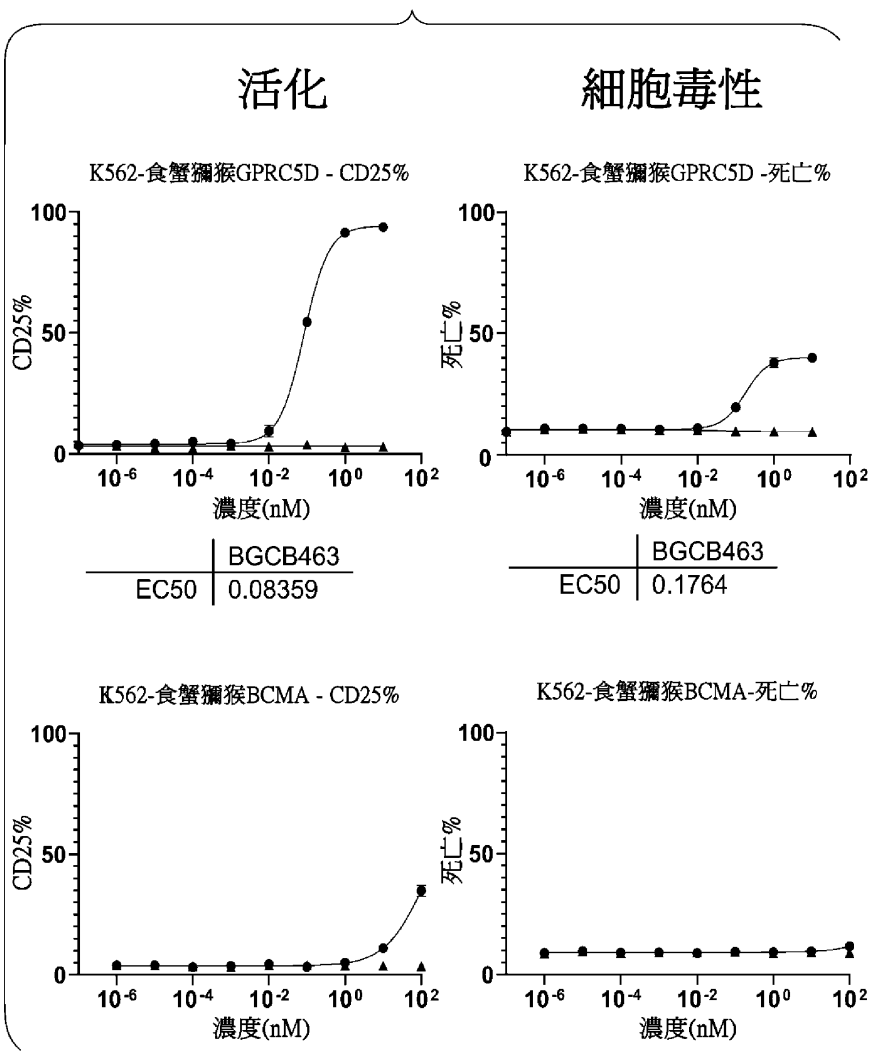
【圖9D】

	BGCB463 EC50 (nM) 運行1	BGCB463 EC50 (nM) 運行2	EC50 AVE	BGCB463 EC90 (nM) 運行1	BGCB463 EC90 (nM) 運行2	EC90 AVE
人類 GPRC5D	12.5	49.7	31.1	142.6	208.7	175.7
食蟹獼猴 GPRC5D	435.1	309.7	372.4	2989.8	2058.6	2524.2
人類 BCMA	248.0	45.8	146.9	2333.8	192.5	1263.2
食蟹獼猴 BCMA	無擬合	無擬合	無擬合	無擬合	無擬合	無擬合

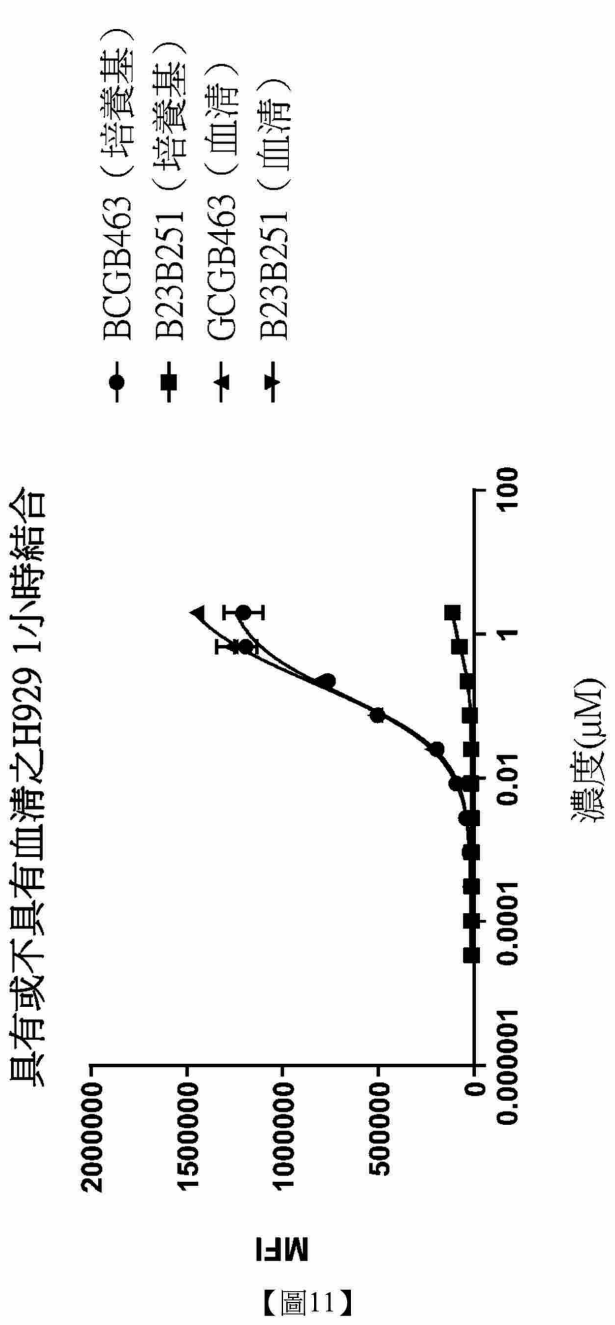
【圖9E】


活化
細胞毒性
K562-人類GPRC5D - CD25%
K562-人類GPRC5D -死亡%
CD25%
死亡%
100
50
0
10-6
10-4
10-2
100
102
濃度(nM)
BGCB463
EC50
9.142e-005
BGCB463
EC50
0.0001869
K562-人類BCMA- CD25%
K562-人類BCMA-死亡%
BGCB463
EC50
1.118
BGCB463
EC50
2.310

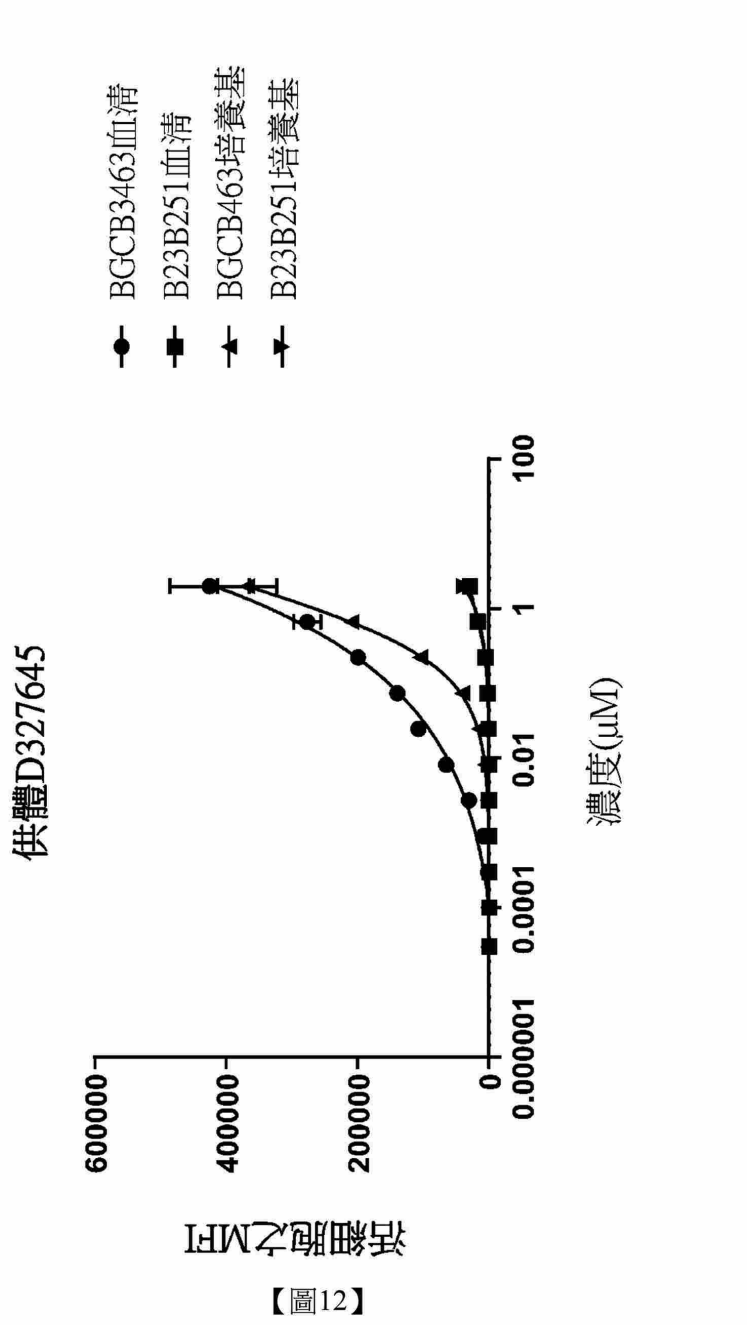
【圖10A】


活化
細胞毒性
K562-食蟹獼猴GPRC5D - CD25%
K562-食蟹獼猴GPRC5D -死亡%
CD25%
死亡%
100
50
0
10^{-6} 10^{-4} 10^{-2} 10^{0} 10^{2}
濃度(nM)
BGCB463
EC50 0.08359
BGCB463
EC50 0.1764
K562-食蟹獼猴BCMA - CD25%
K562-食蟹獼猴BCMA-死亡%

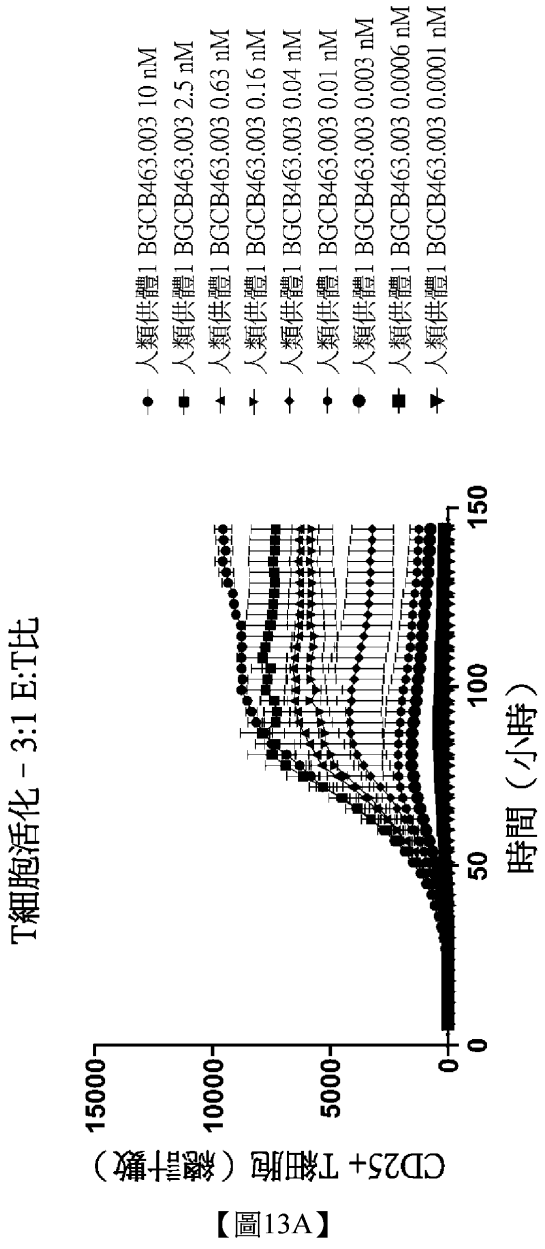
【圖10B】


具有或不具有血清之H929 1小時結合
BCGB463（培養基）
B23B251（培養基）
GCGB463（血清）
B23B251（血清）
MFI
2000000
1500000
1000000
500000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

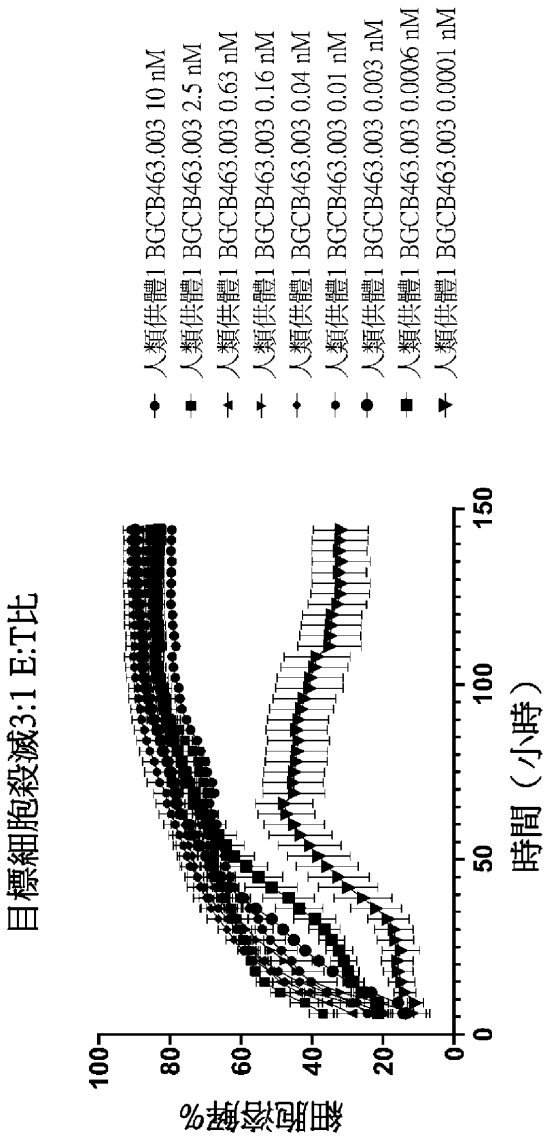
【圖11】


BGCB3463血清
B23B251血清
BGCB463培養基
B23B251培養基
供體D327645
活細胞之MFI
600000
400000
200000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

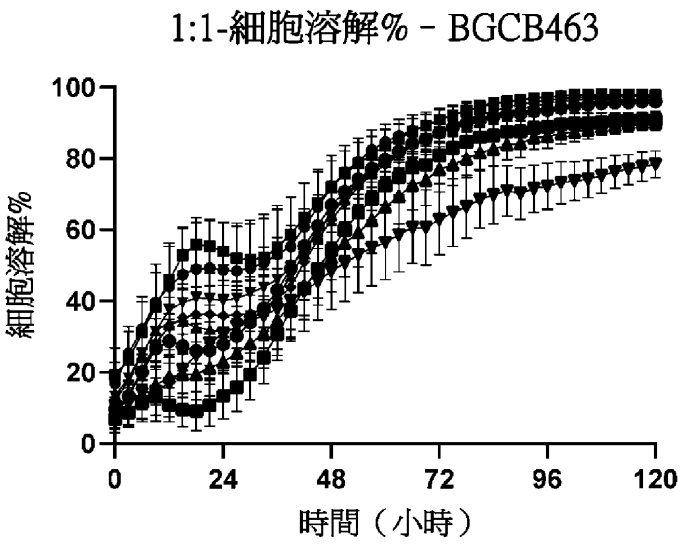
【圖12】


T細胞活化 – 3:1 E:T比
CD25+ T細胞（總計數）
15000
10000
5000
0
0
50
100
150
時間（小時）
人類供體1 BGCB463.003 10 nM
人類供體1 BGCB463.003 2.5 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.63 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.16 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.04 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.01 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.003 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.0006 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.0001 nM

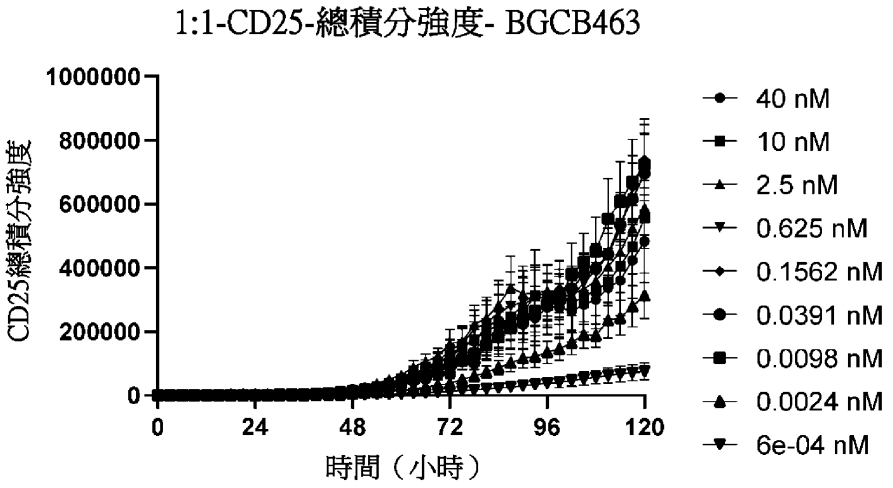
【圖13A】


目標細胞殺滅3:1 E:T比
細胞溶解%
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
時間（小時）
人類供體1 BGCB463.003 10 nM
人類供體1 BGCB463.003 2.5 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.63 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.16 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.04 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.01 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.003 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.0006 nM
人類供體1 BGCB463.003 0.0001 nM

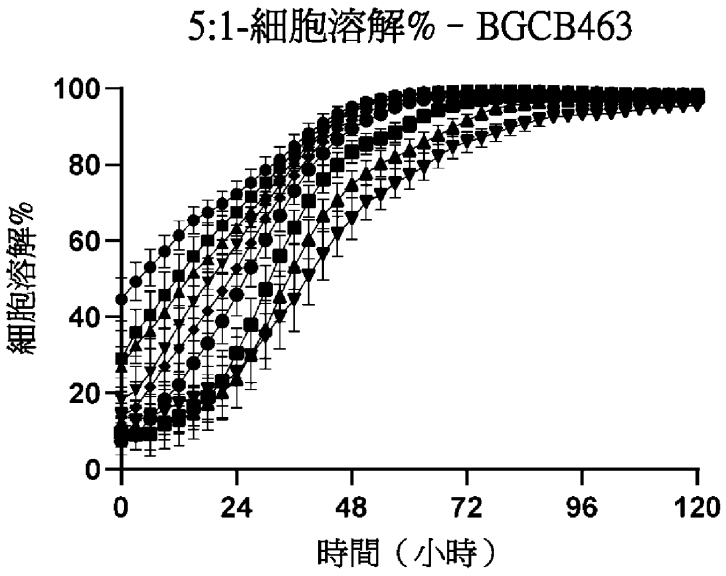
【圖13B】


1:1-細胞溶解% - BGCB463
細胞溶解%
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
時間（小時）

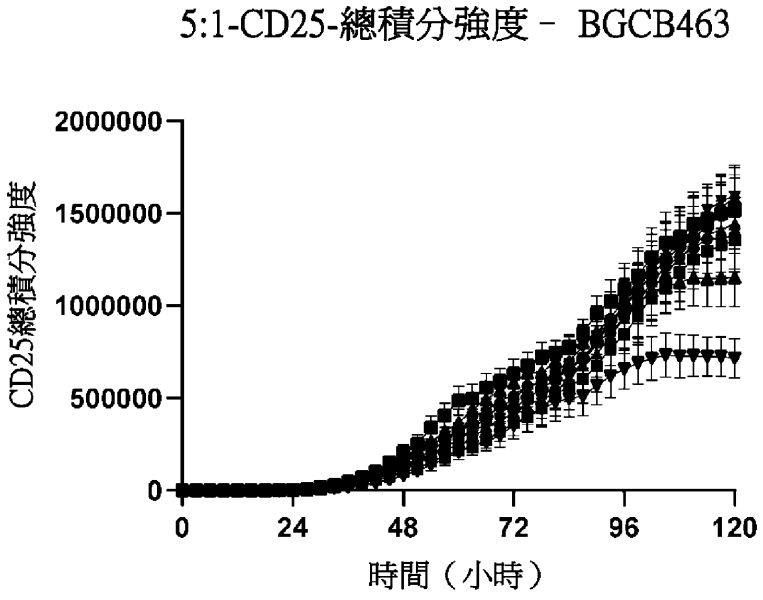
【圖14A】


1:1-CD25-總積分強度- BGCB463
CD25總積分強度
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0
24
48
72
96
120
時間（小時）
40 nM
10 nM
2.5 nM
0.625 nM
0.1562 nM
0.0391 nM
0.0098 nM
0.0024 nM
6e-04 nM

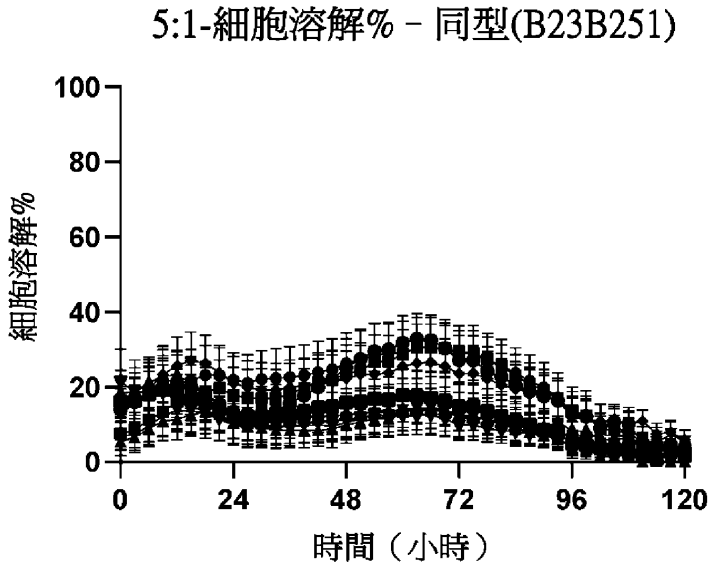
【圖14B】


5:1-細胞溶解% - BGCB463
細胞溶解%
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
時間（小時）

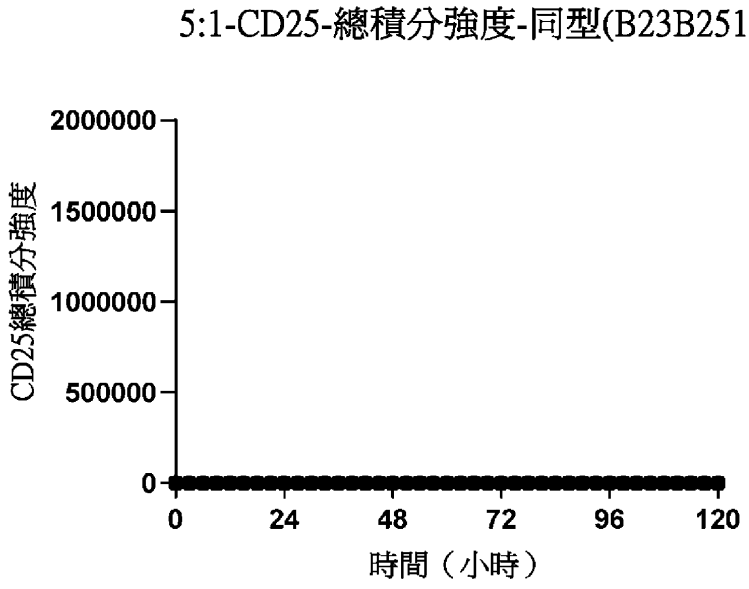
【圖14C】


5:1-CD25-總積分強度 - BGCB463
CD25總積分強度
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
24
48
72
96
120
時間（小時）

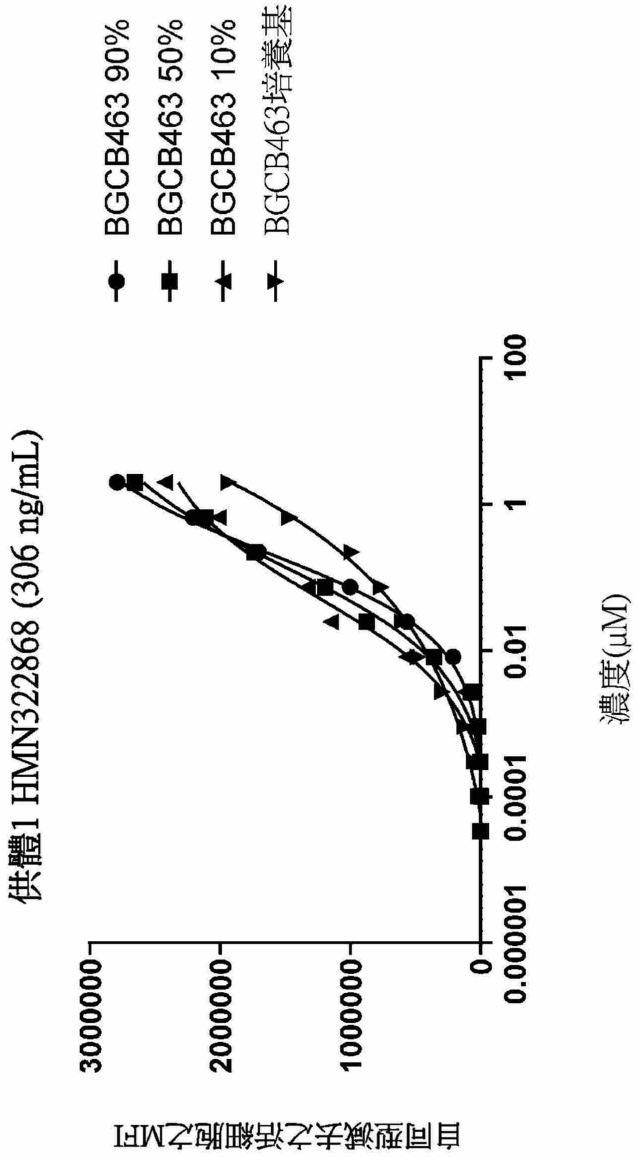
【圖14D】


5:1-細胞溶解% - 同型(B23B251)
細胞溶解%
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
時間（小時）

【圖14E】


5:1-CD25-總積分強度-同型(B23B251)
CD25總積分強度
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
24
48
72
96
120
時間（小時）

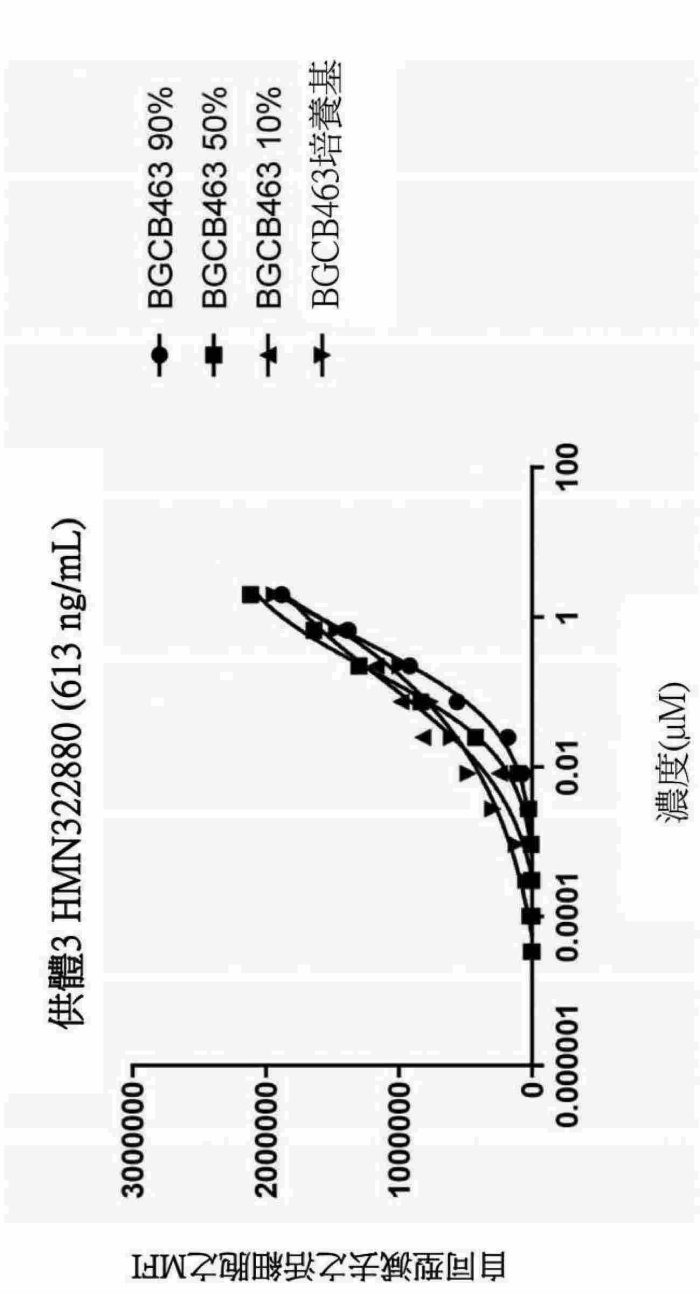
【圖14F】


BGCB463 90%
BGCB463 50%
BGCB463 10%
BGCB463培養基
供體1 HMN322868 (306 ng/mL)
自同型減去之活細胞之MFI
3000000
2000000
1000000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

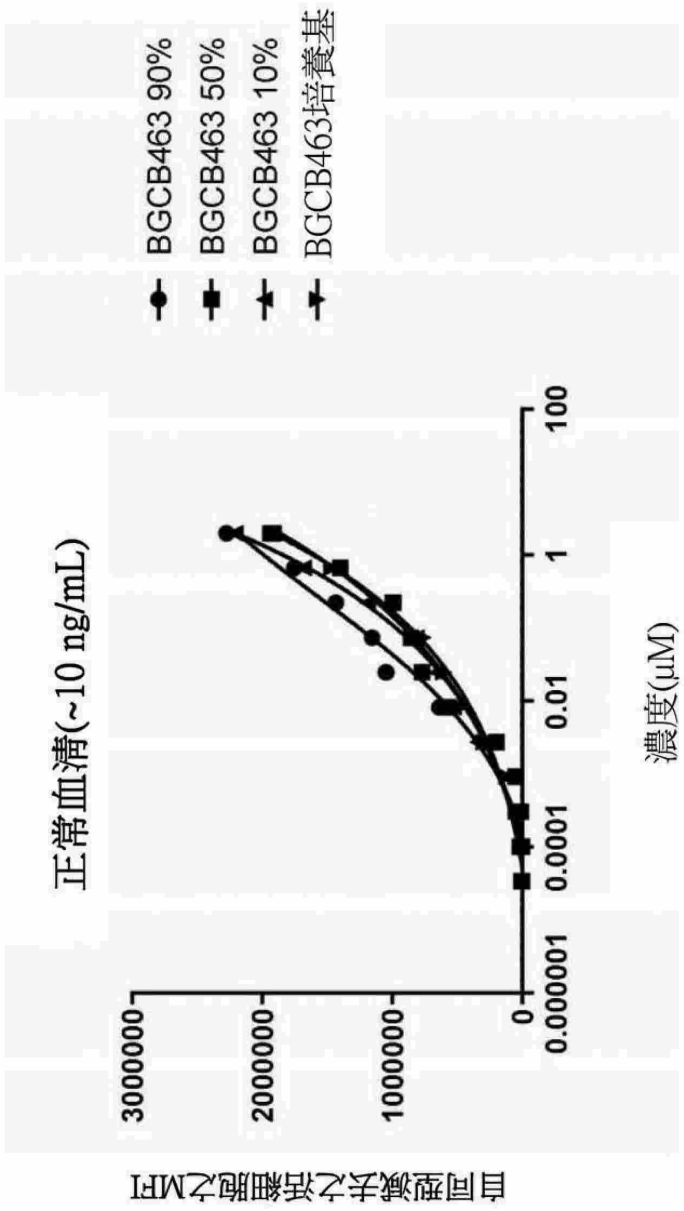
【圖15A】

供體2 HMN322875 (66 ng/mL)
BGCB463 90%
BGCB463 50%
BGCB463 10%
BGCB463培養基
3000000
2000000
1000000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)
自同型減去之活細胞之MFI

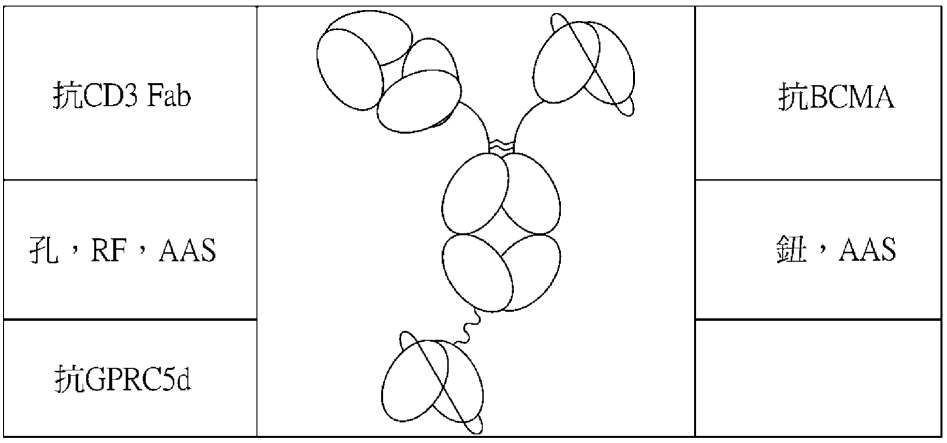
【圖15B】


BGCB463 90%
BGCB463 50%
BGCB463 10%
BGCB463培養基
供體3 HMN322880 (613 ng/mL)
自同型滅去之活細胞之MFI
3000000
2000000
1000000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

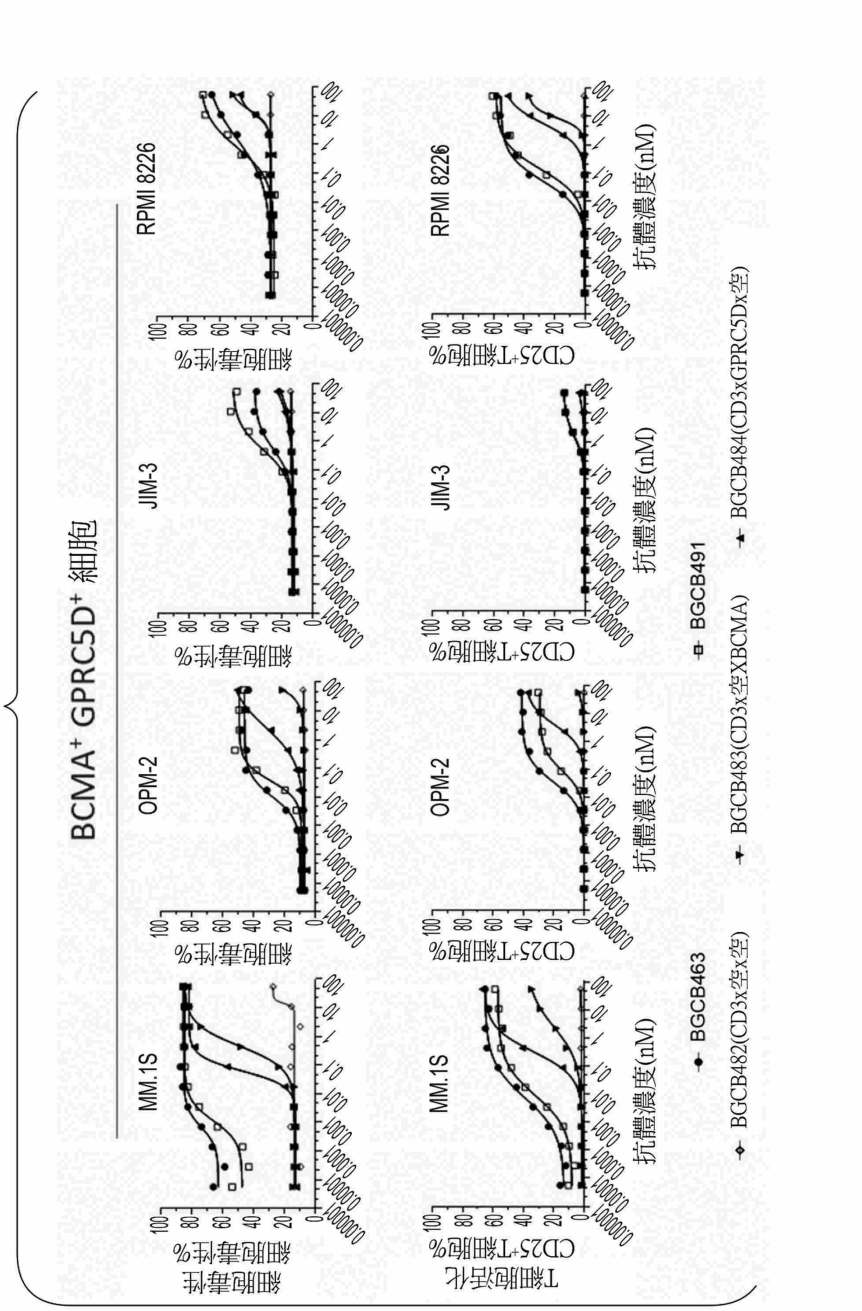
【圖15C】


BGCB463 90%
BGCB463 50%
BGCB463 10%
BGCB463培養基
正常血清(~10 ng/mL)
3000000
2000000
1000000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)
自同型減去之活細胞之MFI

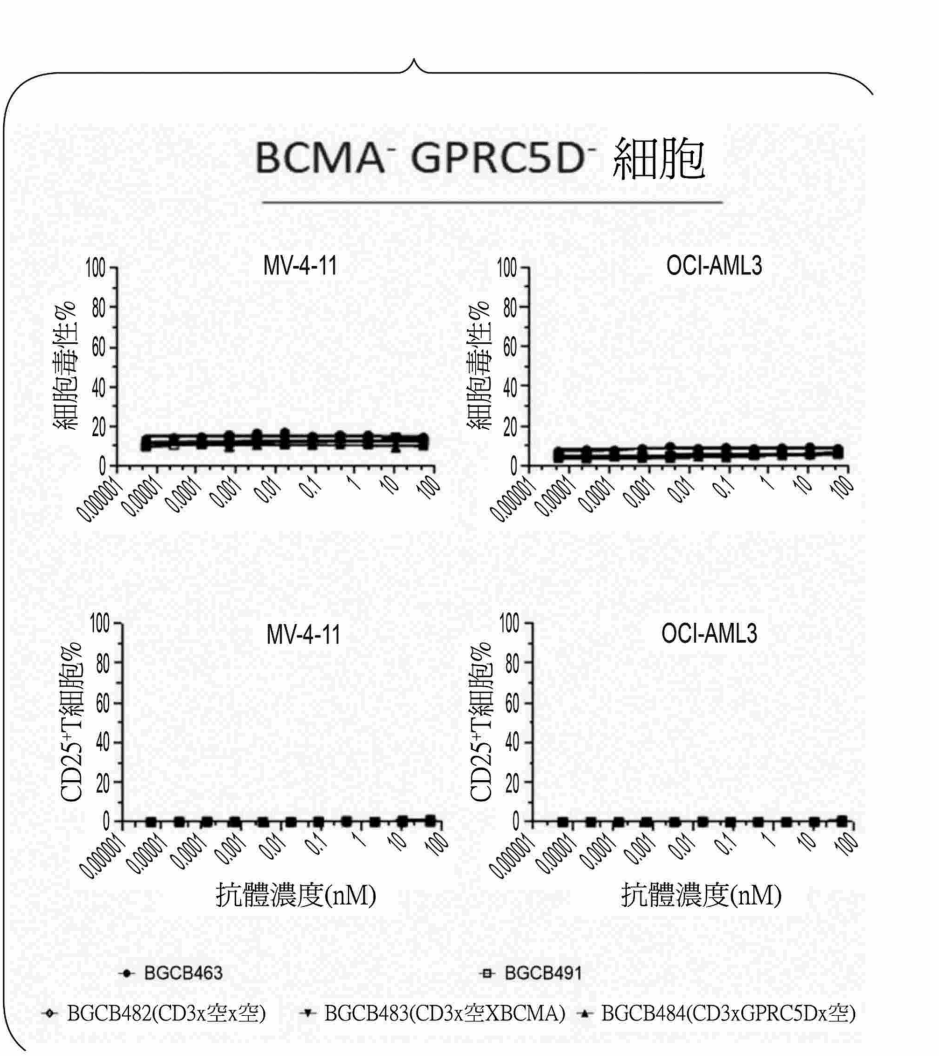
【圖15D】



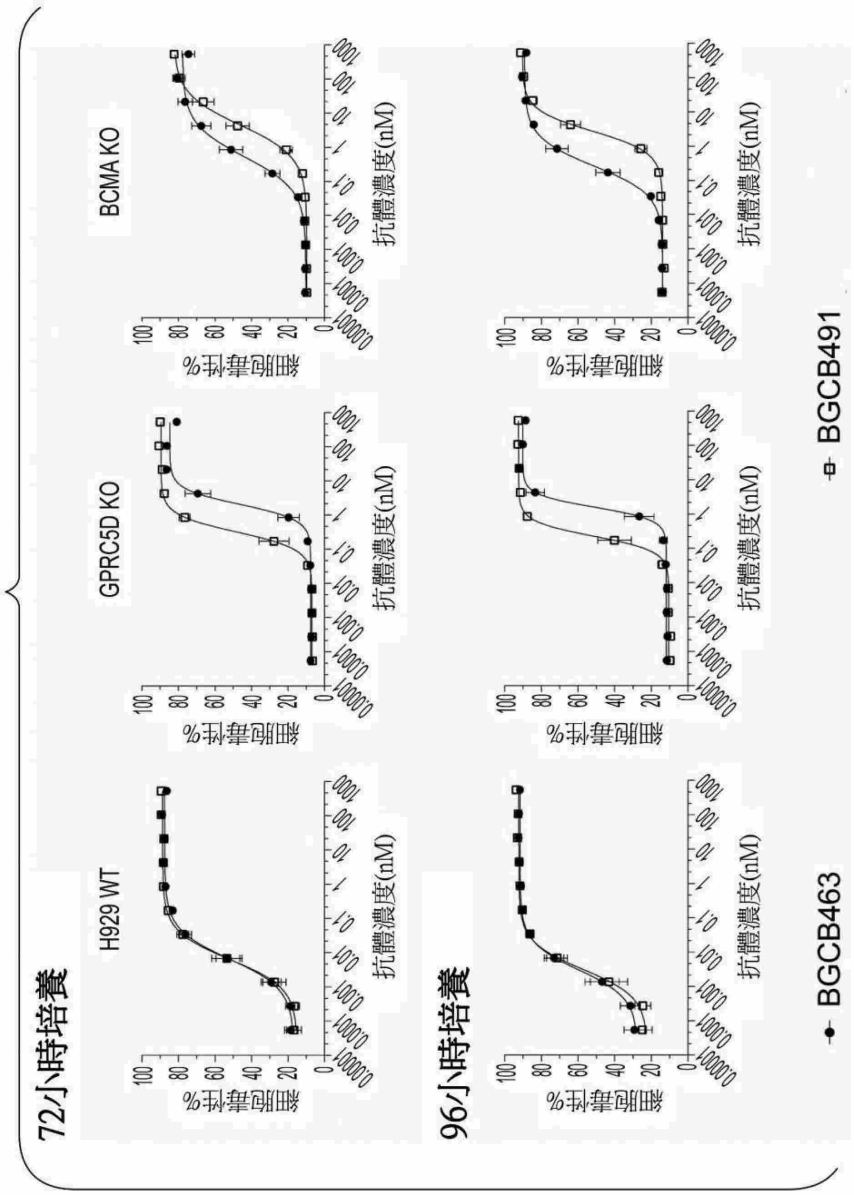
【圖16】


BCMA+ GPRC5D+ 細胞
MM.1S
OPM-2
JIM-3
RPMI 8226
細胞毒性%
CD25+T細胞%
T細胞活化
抗體濃度(nM)
BGCB463
BGCB491
BGCB482(CD3x空x空)
BGCB483(CD3x空XBCMA)
BGCB484(CD3xGPRC5Dx空)

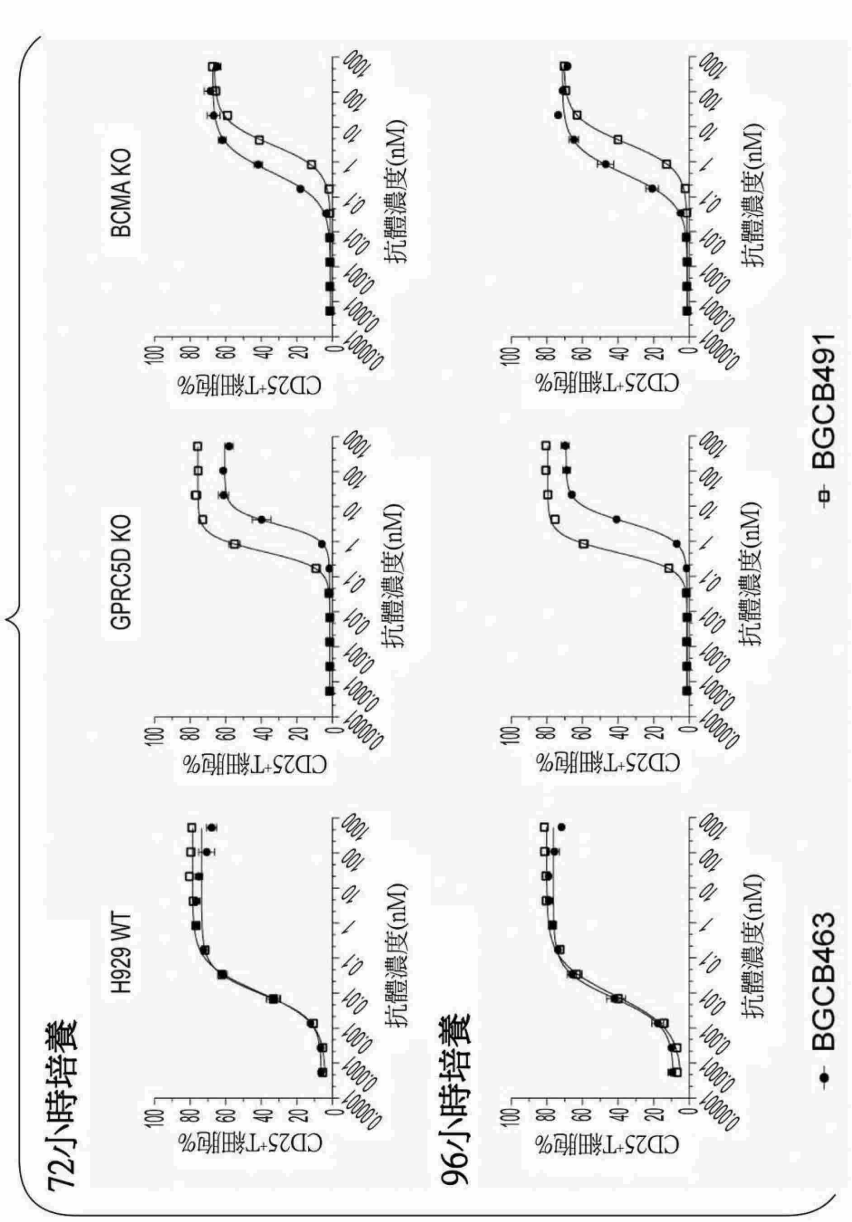
【圖17A】


BCMA- GPRC5D- 細胞
MV-4-11
OCI-AML3
細胞毒性%
CD25+T細胞%
抗體濃度(nM)
BGCB463
BGCB491
BGCB482(CD3x空x空)
BGCB483(CD3x空XBCMA)
BGCB484(CD3xGPRC5Dx空)

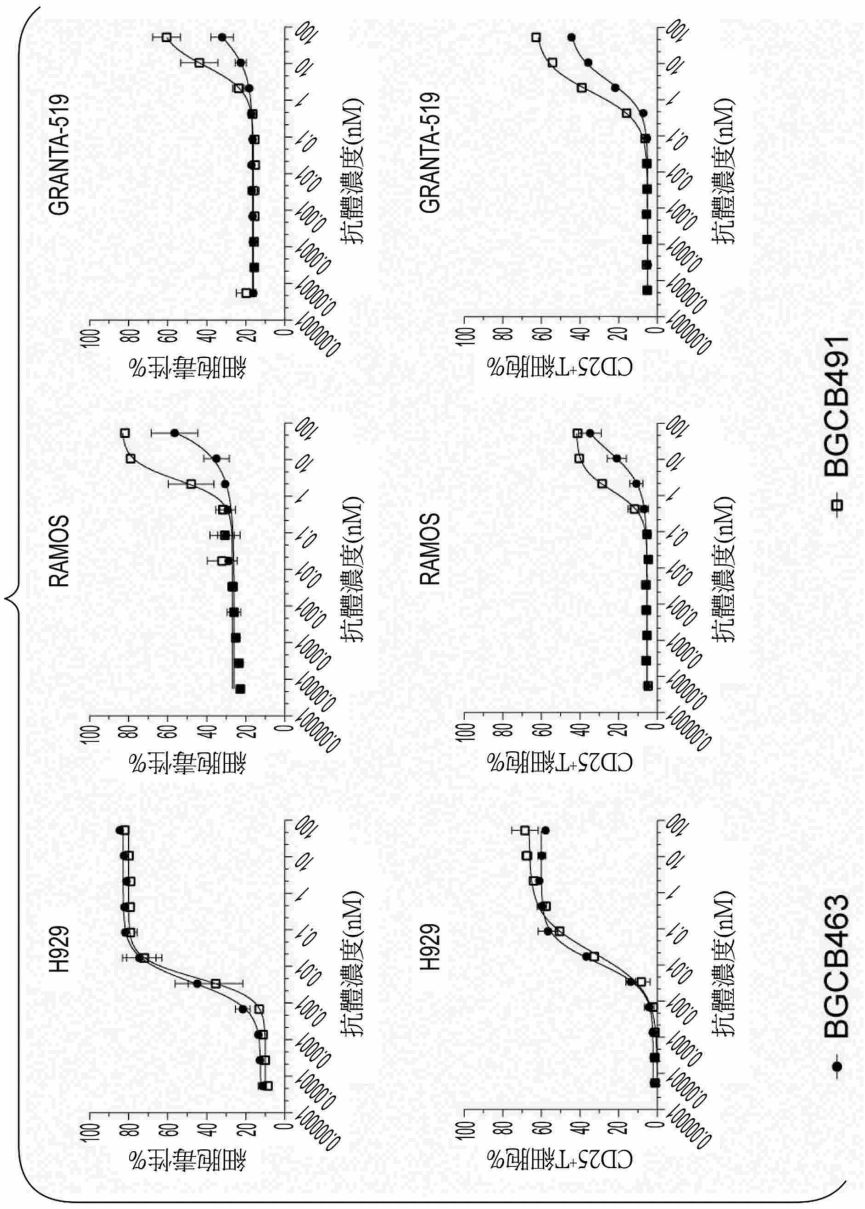
【圖17B】


72小時培養
96小時培養
H929 WT
GPRC5D KO
BCMA KO
細胞毒性%
抗體濃度(nM)
BGCB463
BGCB491

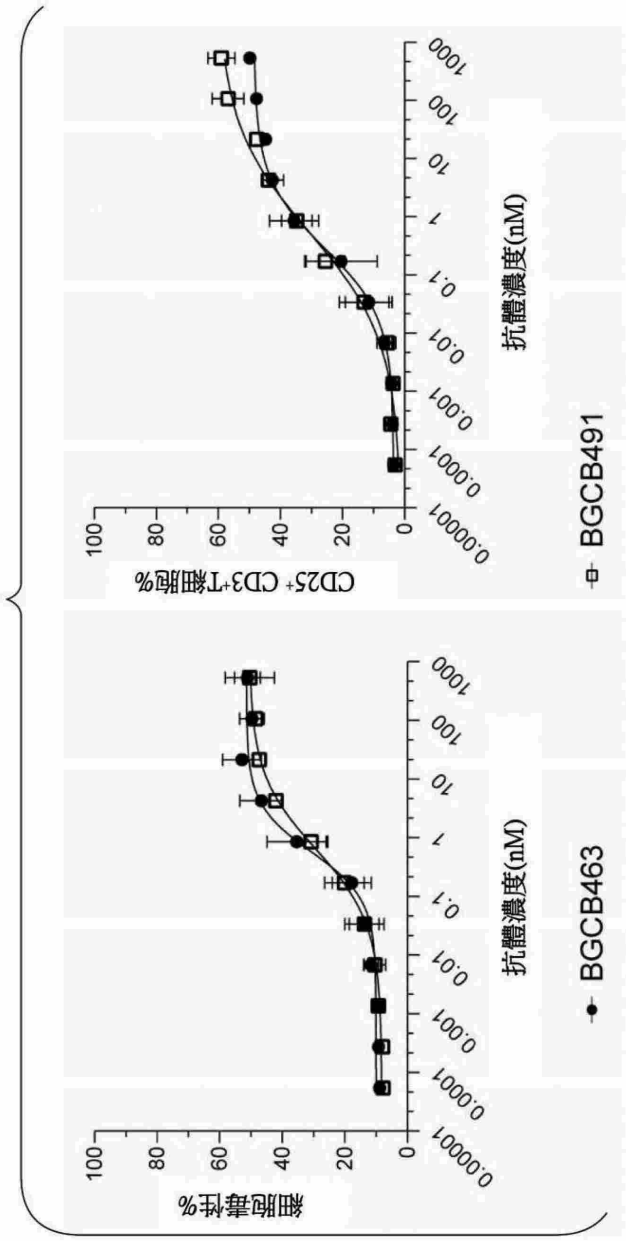
【圖18A】


72小時培養
96小時培養
H929 WT
GPRC5D KO
BCMA KO
CD25+T細胞%
抗體濃度(nM)
BGCB463
BGCB491

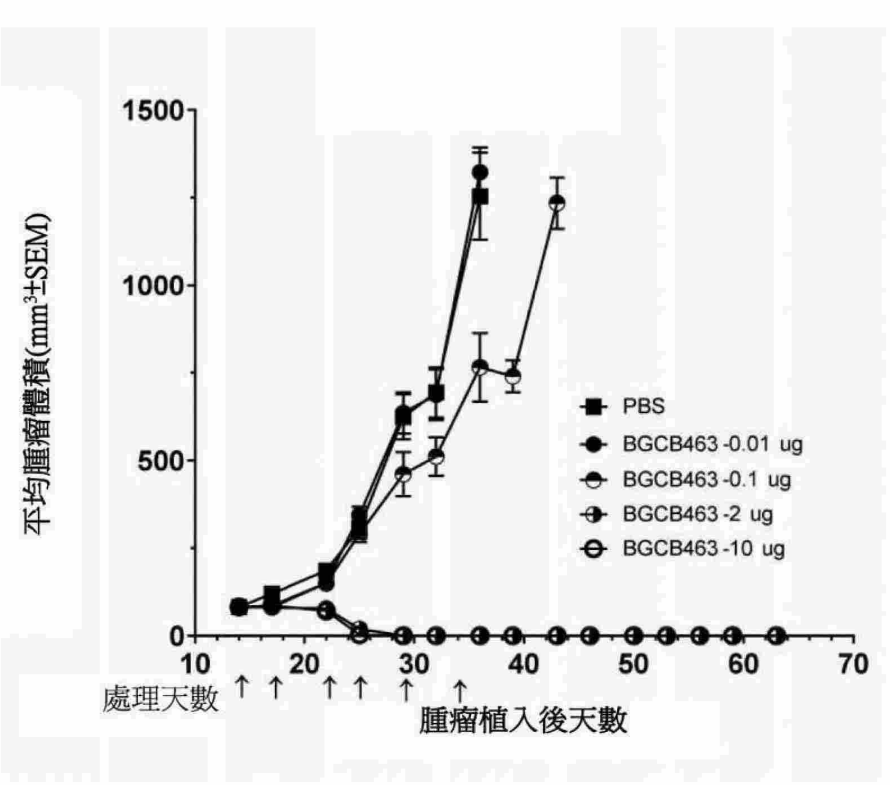
【圖18B】



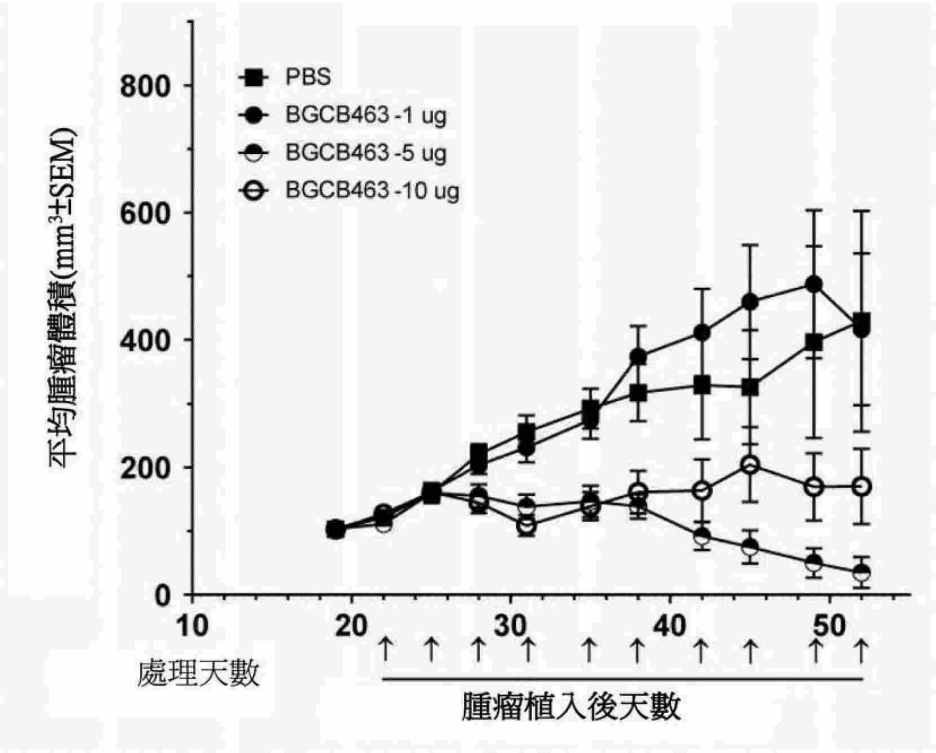
【圖19】



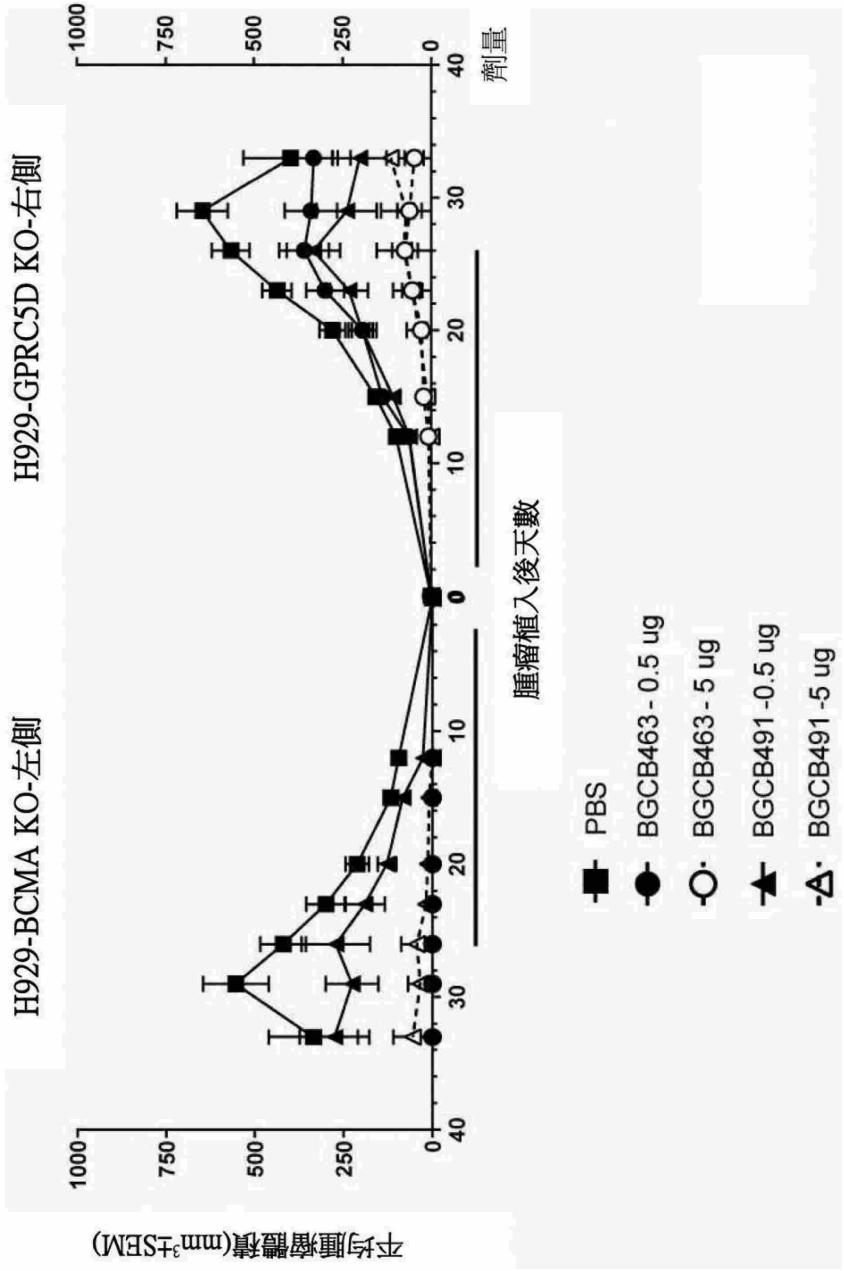
【圖20】


1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
60
70
平均腫瘤體積(mm³±SEM)
PBS
BGCB463 -0.01 ug
BGCB463 -0.1 ug
BGCB463 -2 ug
BGCB463 -10 ug
處理天數
腫瘤植入後天數

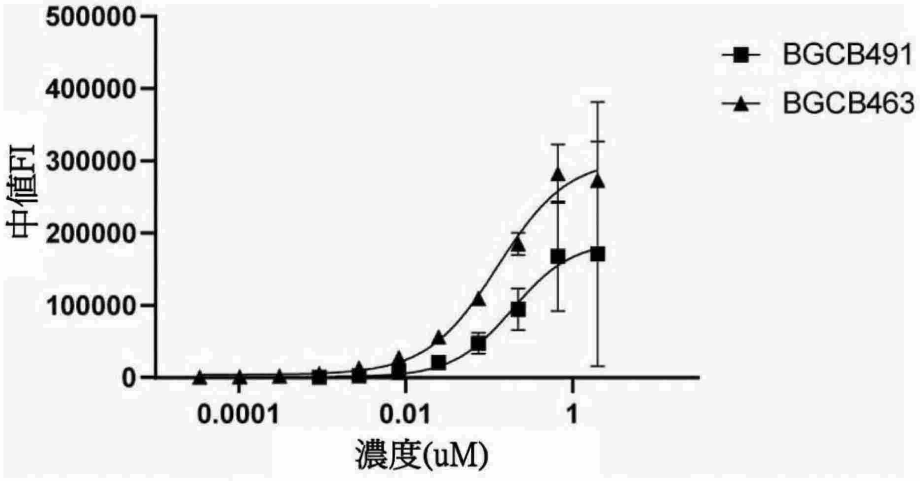
【圖21A】


800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
平均腫瘤體積(mm³±SEM)
PBS
BGCB463 -1 ug
BGCB463 -5 ug
BGCB463 -10 ug
處理天數
腫瘤植入後天數

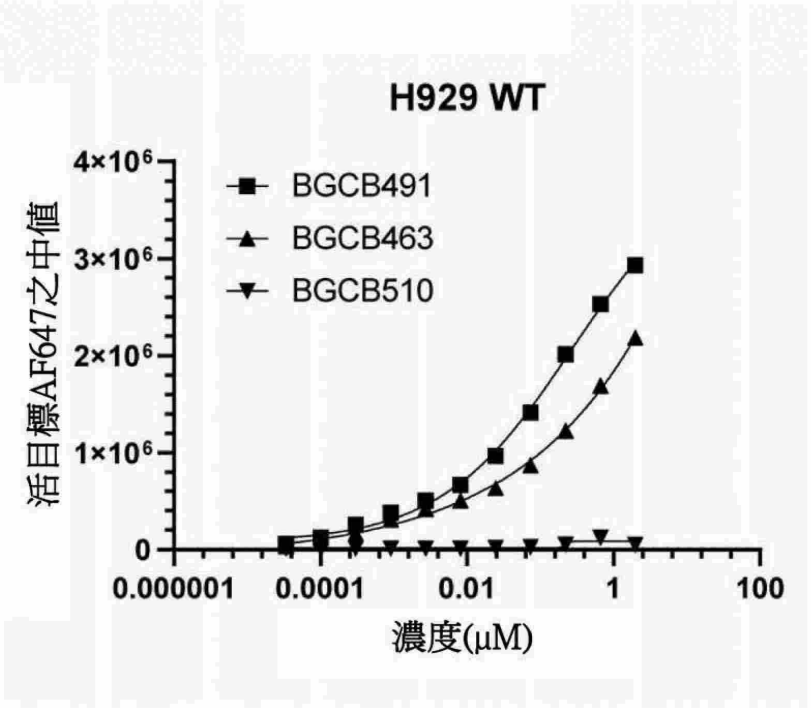
【圖21B】


H929-BCMA KO-左側
H929-GPRC5D KO-右側
平均腫瘤體積(mm³±SEM)
腫瘤植入後天數
劑量
PBS
BGCB463 - 0.5 ug
BGCB463 - 5 ug
BGCB491 -0.5 ug
BGCB491 -5 ug

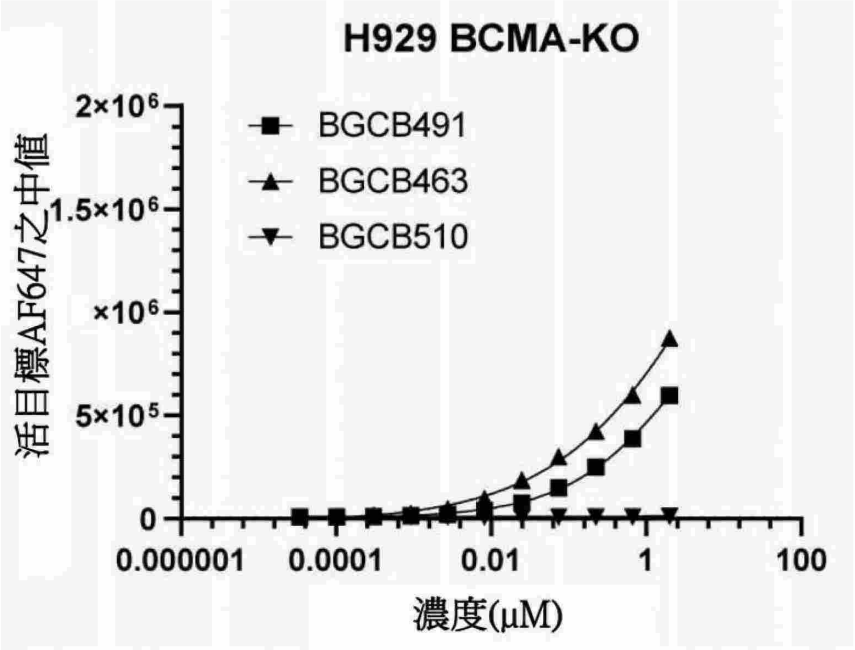
【圖22】


500000
400000
300000
200000
100000
0
中值FI
0.0001
0.01
1
濃度(uM)
BGCB491
BGCB463

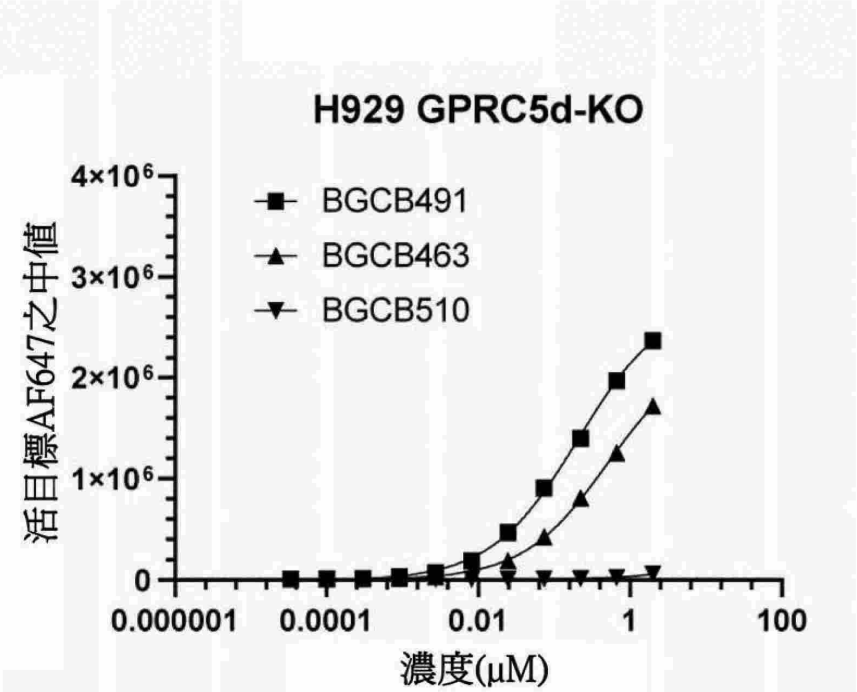
【圖23】


H929 WT
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
活目標AF647之中值
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)
BGCB491
BGCB463
BGCB510

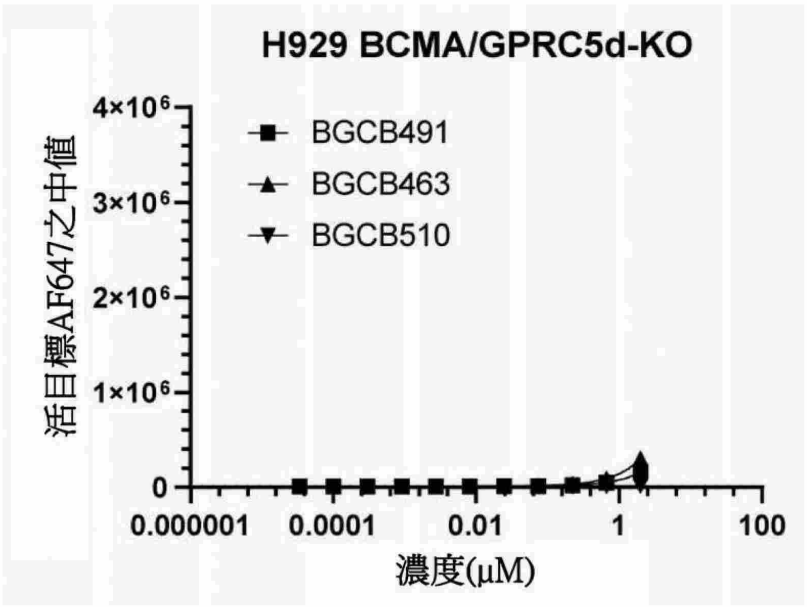
【圖24A】


H929 BCMA-KO
BGCB491
BGCB463
BGCB510
活目標AF647之中值
2×10⁶
1.5×10⁶
×10⁶
5×10⁵
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

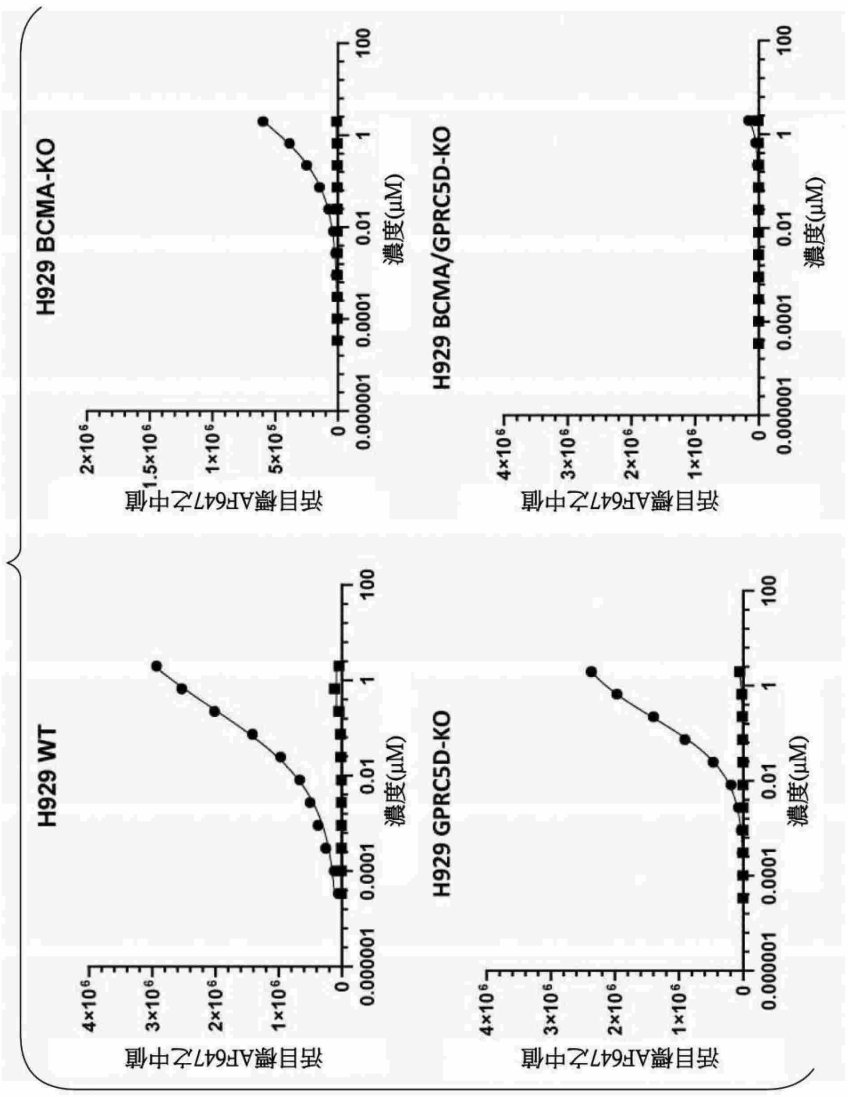
【圖24B】


H929 GPRC5d-KO
BGCB491
BGCB463
BGCB510
活目標AF647之中值
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

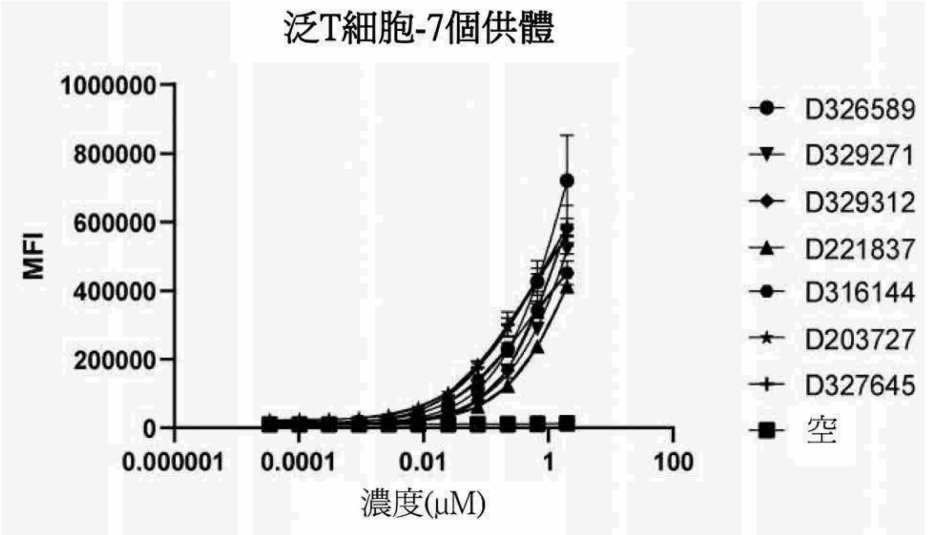
【圖24C】


H929 BCMA/GPRC5d-KO
BGCB491
BGCB463
BGCB510
活目標AF647之中值
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)

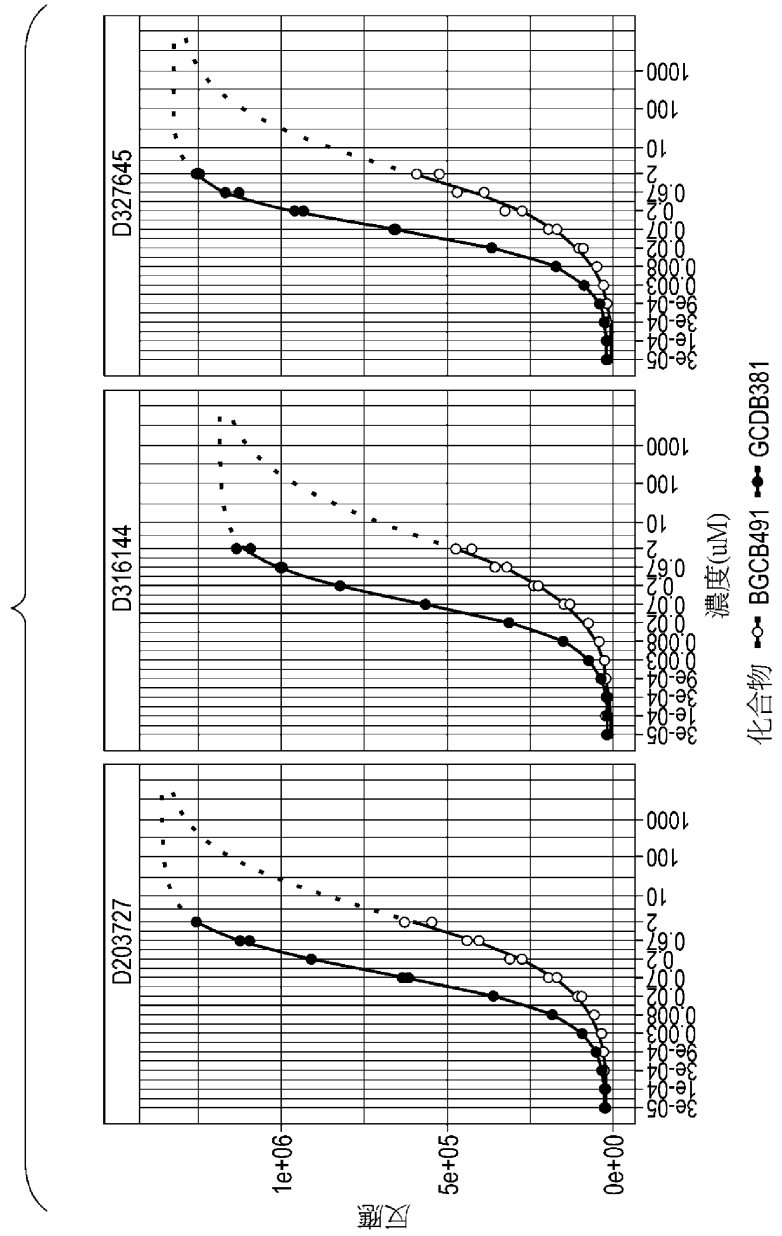
【圖24D】


H929 WT
H929 GPRC5D-KO
H929 BCMA-KO
H929 BCMA/GPRC5D-KO
活目標AF647之中值
濃度(μM)
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
1×10⁶
2×10⁶
3×10⁶
4×10⁶
5×10⁵
1.5×10⁶
2×10⁶

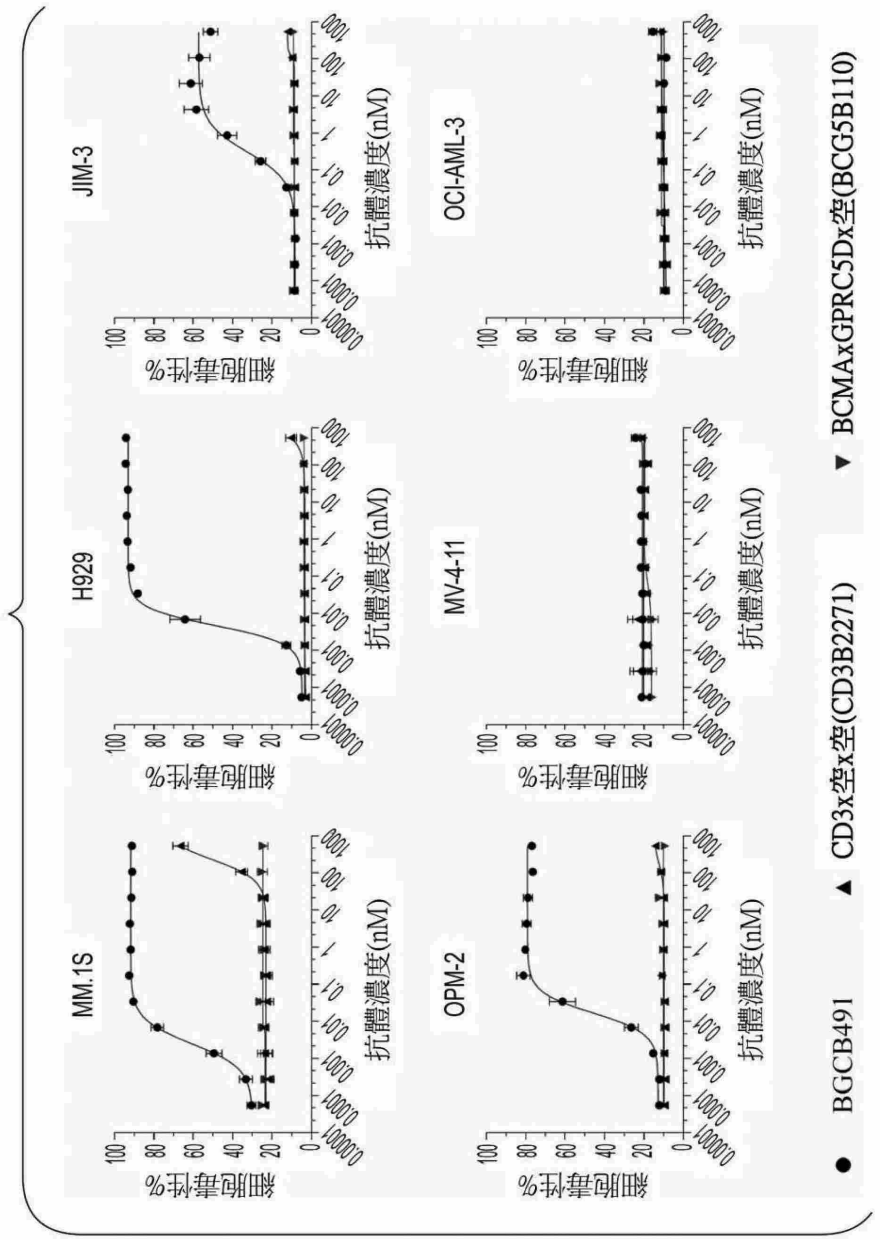
【圖25】


泛T細胞-7個供體
MFI
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.000001
0.0001
0.01
1
100
濃度(μM)
D326589
D329271
D329312
D221837
D316144
D203727
D327645
空

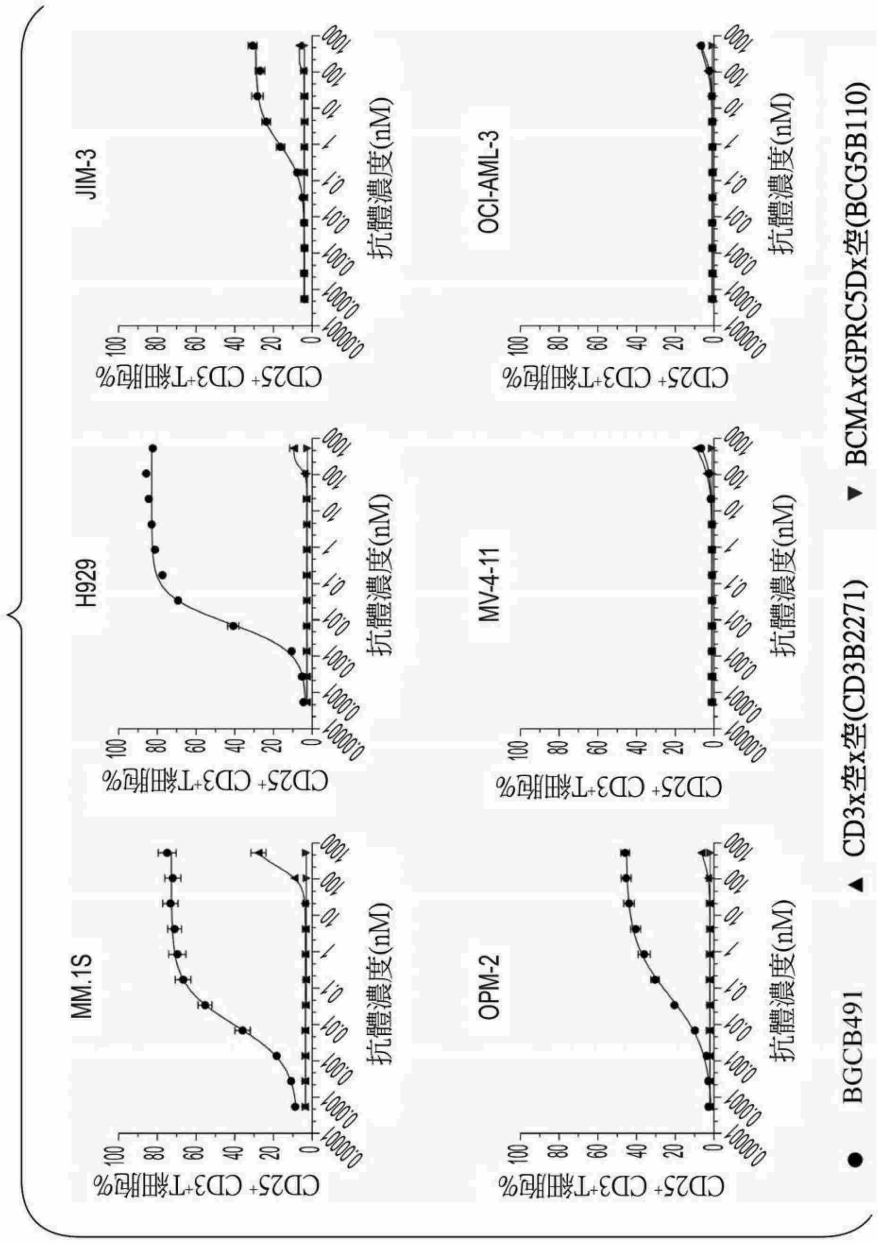
【圖26】


D327645
D316144
D203727
1000
100
10
2
0.67
0.2
0.07
0.02
0.008
0.003
9e-04
3e-04
1e-04
3e-05
濃度(uM)
化合物 BGCB491 GCDB381
1e+06
5e+05
0e+00
反應

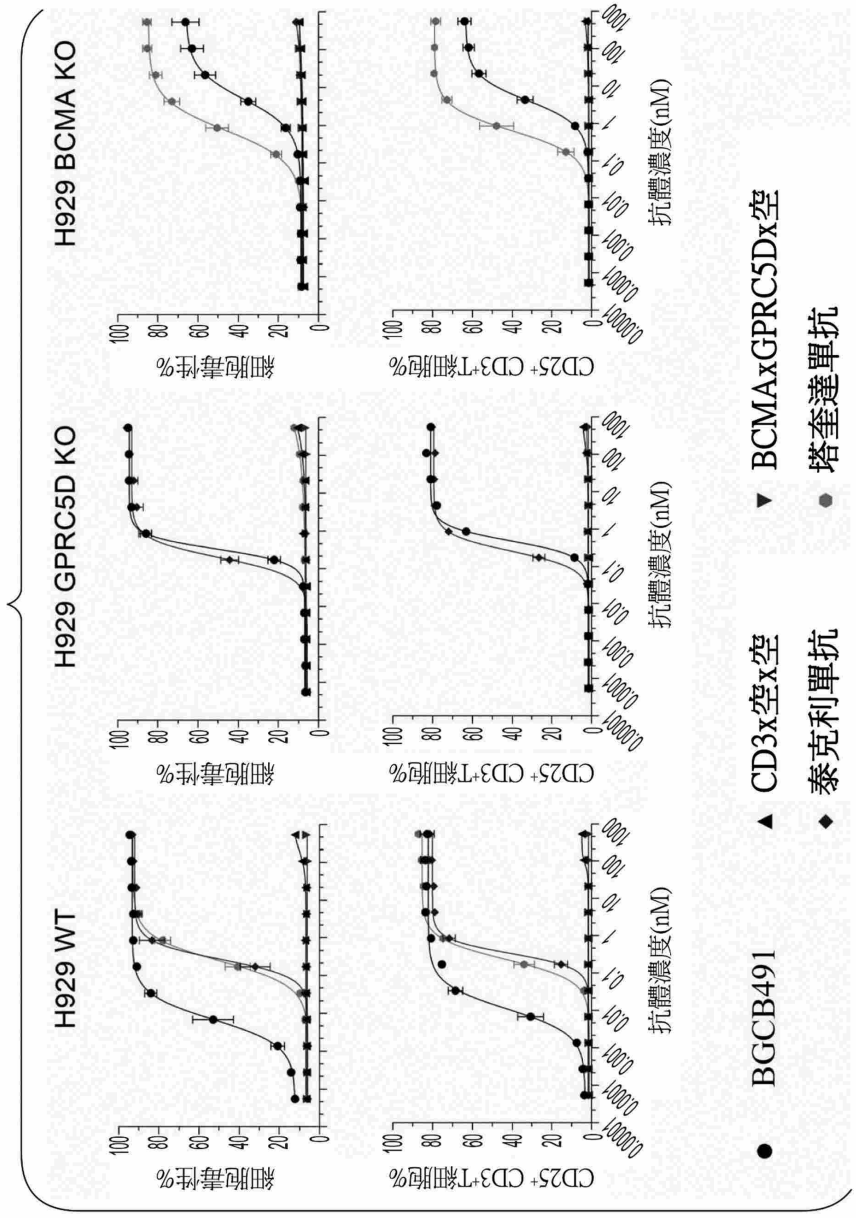
【圖27】


MM.1S
H929
JIM-3
OPM-2
MV-4-11
OCI-AML-3
細胞毒性%
抗體濃度(nM)
● BGCB491
▲ CD3x空x空(CD3B2271)
▼ BCMAxGPRC5Dx空(BCG5B110)

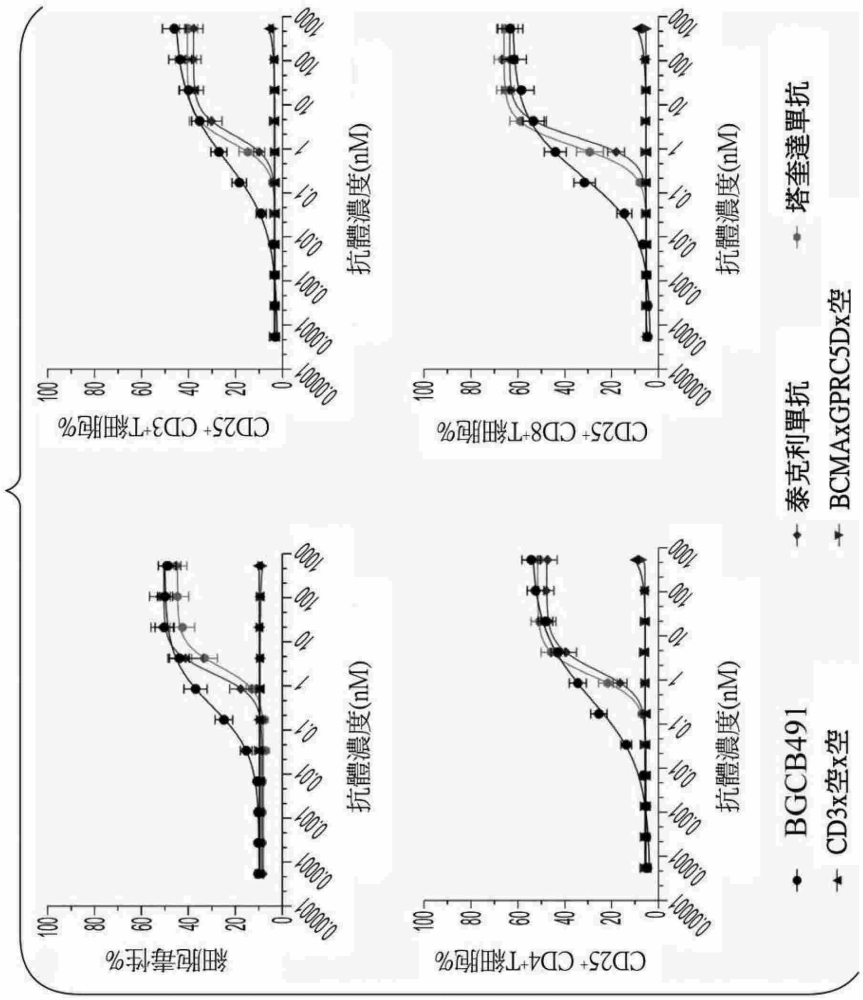
【圖28A】


JIM-3
OCI-AML-3
H929
MV-4-11
MM.1S
OPM-2
CD25+ CD3+T細胞%
抗體濃度(nM)
BGCB491
CD3xGPRC5Dx(CD3B2271)
BCMAxGPRC5Dx(BCG5B110)

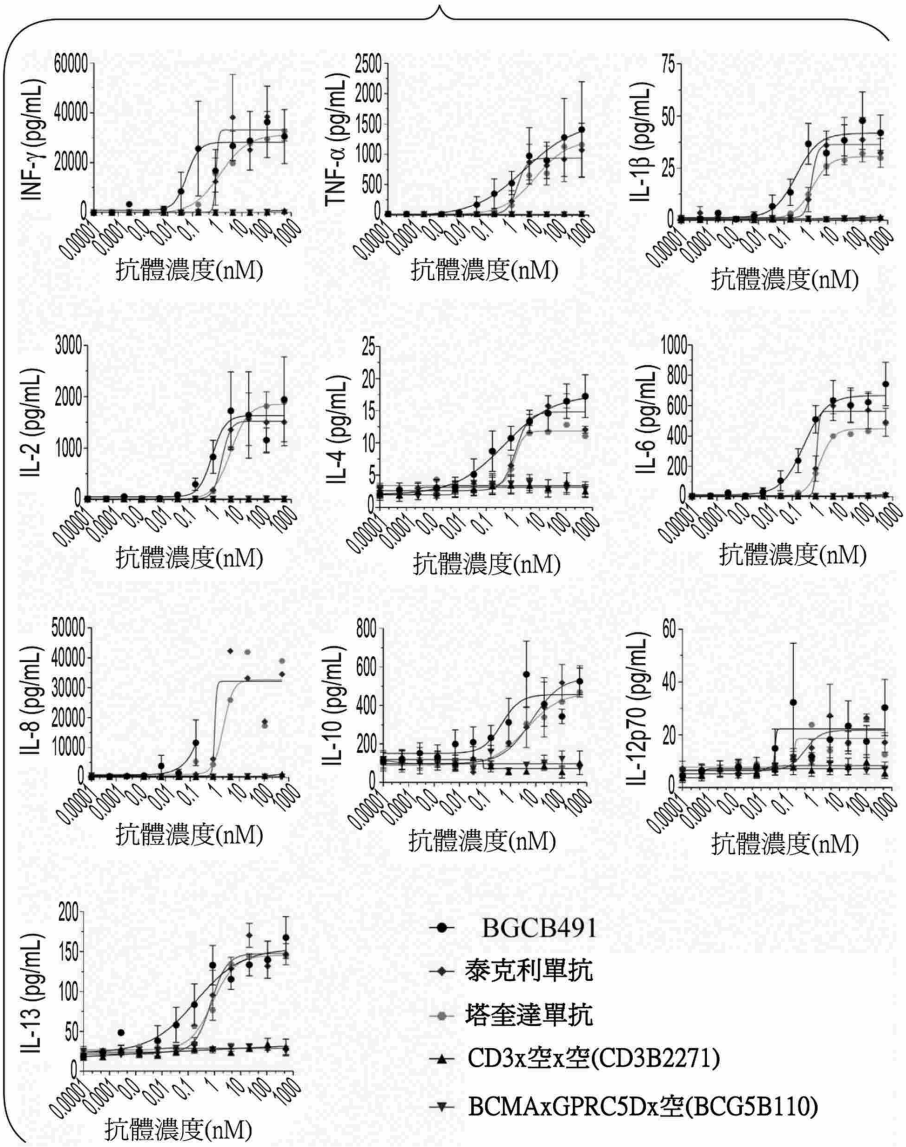
【圖28B】


H929 WT
H929 GPRC5D KO
H929 BCMA KO
細胞毒性%
CD25+ CD3+T細胞%
抗體濃度(nM)
BGCB491
CD3x空x空
BCMAxGPRC5Dx空
泰克利單抗
塔奎達單抗

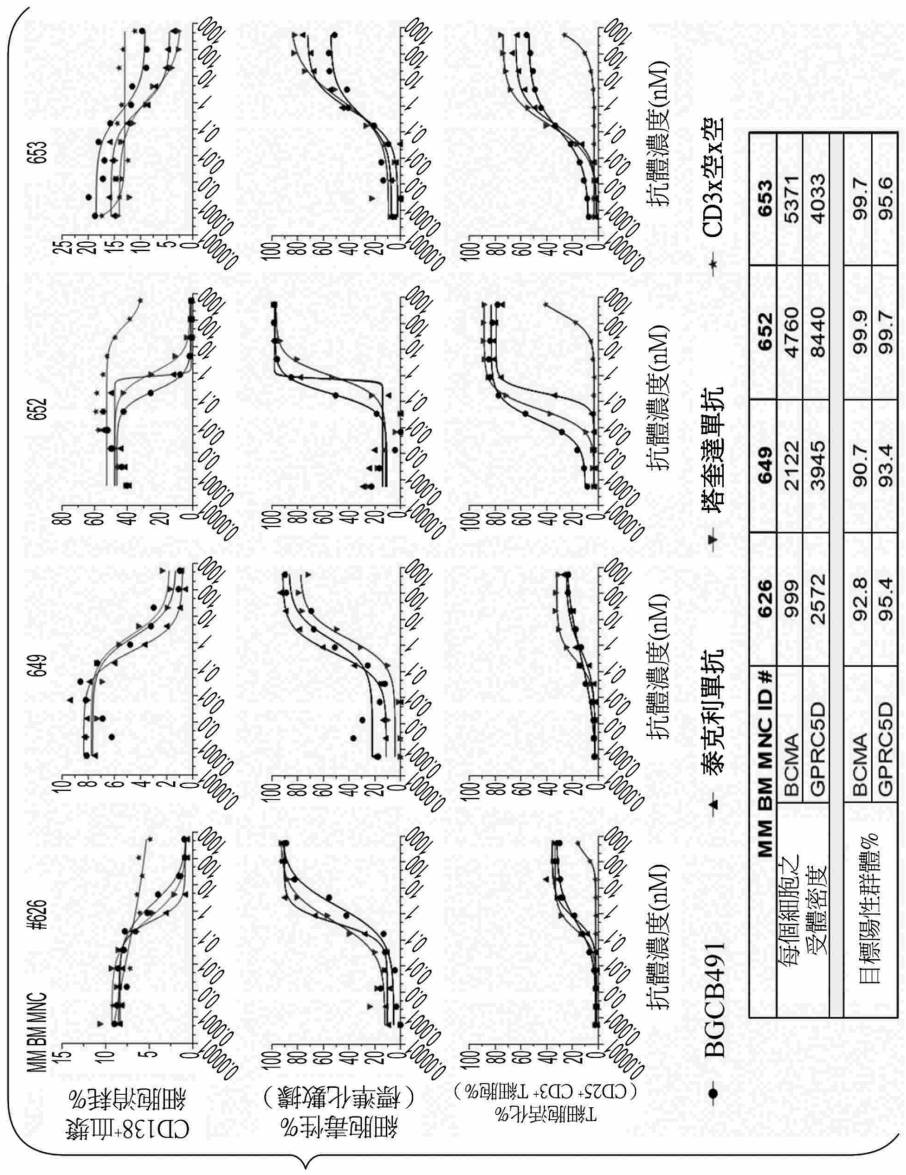
【圖29】


細胞毒性%
抗體濃度(nM)
CD25+ CD4+T細胞%
抗體濃度(nM)
CD25+ CD3+T細胞%
抗體濃度(nM)
CD25+ CD8+T細胞%
抗體濃度(nM)
BGCB491
泰克利單抗
塔奎達單抗
CD3x空x空
BCMAxGPRC5Dx空

【圖30】

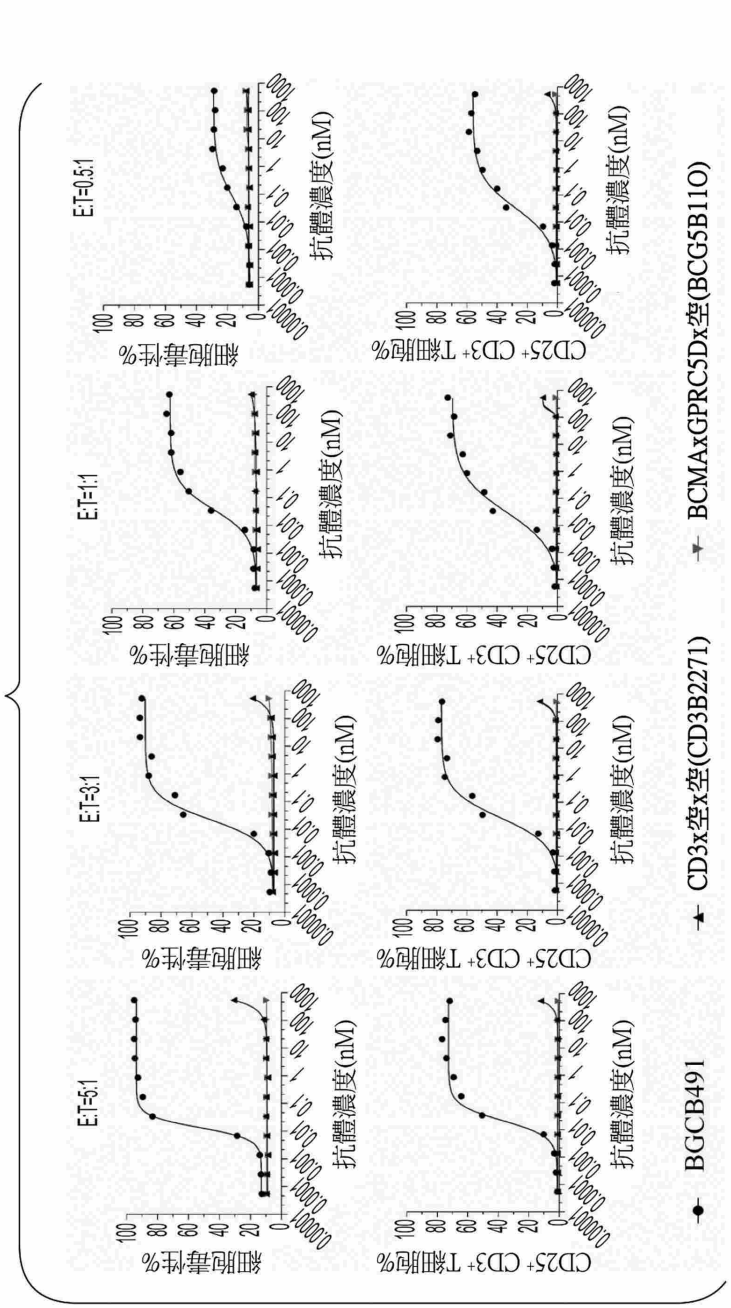

INF-γ (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
IL-1β (pg/mL)
IL-2 (pg/mL)
IL-4 (pg/mL)
IL-6 (pg/mL)
IL-8 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
IL-12p70 (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
抗體濃度(nM)
BGCB491
泰克利單抗
塔奎達單抗
CD3x空x空(CD3B2271)
BCMAxGPRC5Dx空(BCG5B110)

【圖31】

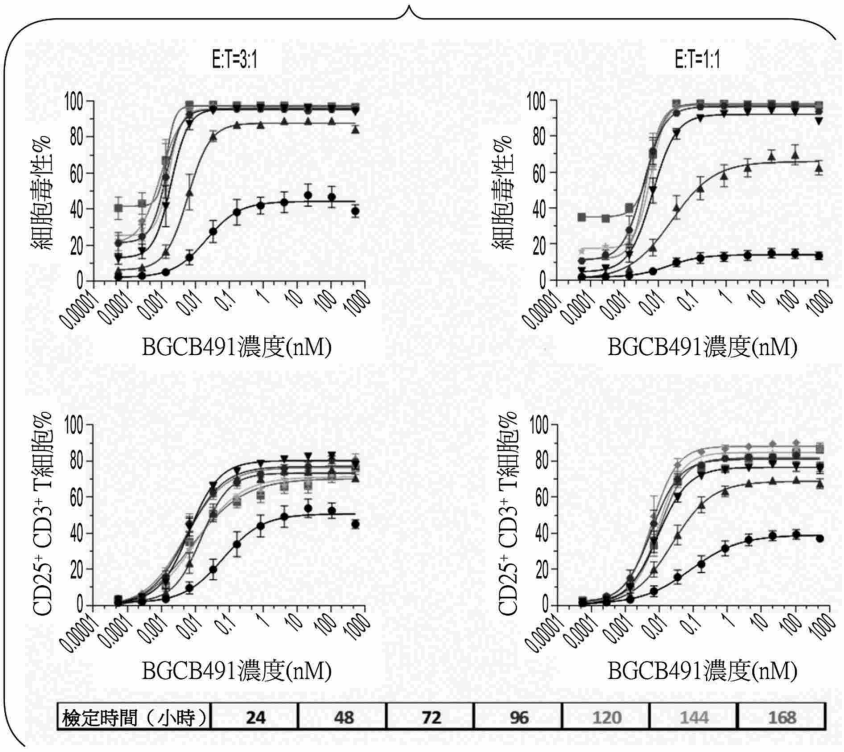


MM BM MNC ID #		626	649	652	653
每個細胞之受體密度	BCMA	999	2122	4760	5371
	GPRC5D	2572	3945	8440	4033
目標陽性群體%	BCMA	92.8	90.7	99.9	99.7
	GPRC5D	95.4	93.4	99.7	95.6

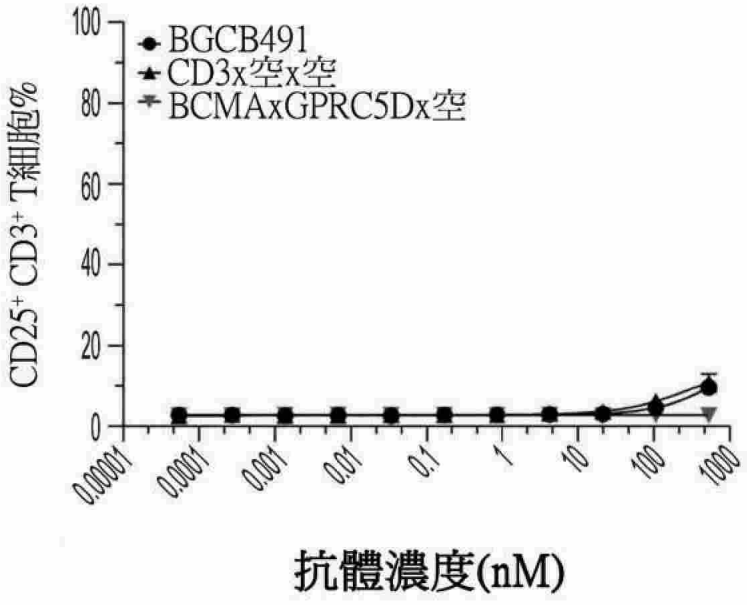
【圖32】


E:T=5:1
E:T=3:1
E:T=1:1
E:T=0.5:1
細胞毒性%
抗體濃度(nM)
CD25+ CD3+ T細胞%
BGCB491
CD3x空x空(CD3B2271)
BCMAxGPRC5Dx空(BCG5B11O)

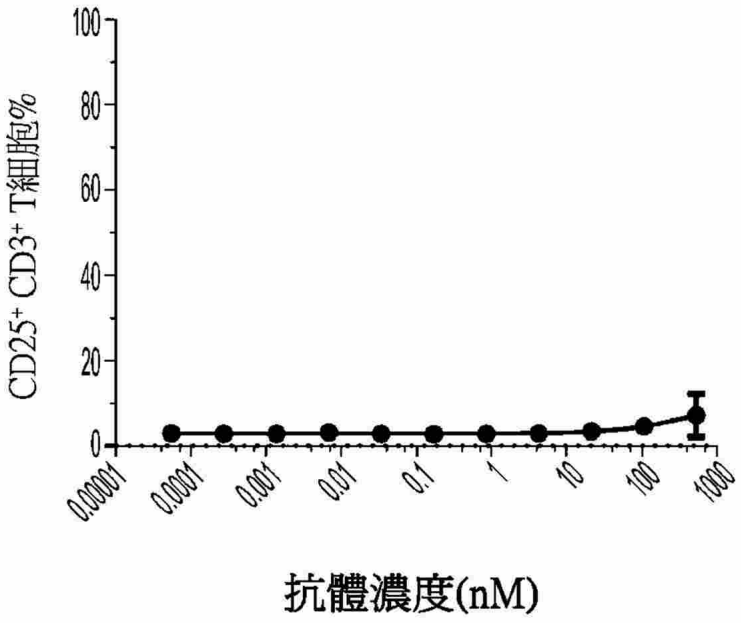
【圖33A】


E:T=3:1
E:T=1:1
細胞毒性%
CD25+ CD3+ T細胞%
BGCB491濃度(nM)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
20
40
60
80
100
檢定時間（小時）
24
48
72
96
120
144
168

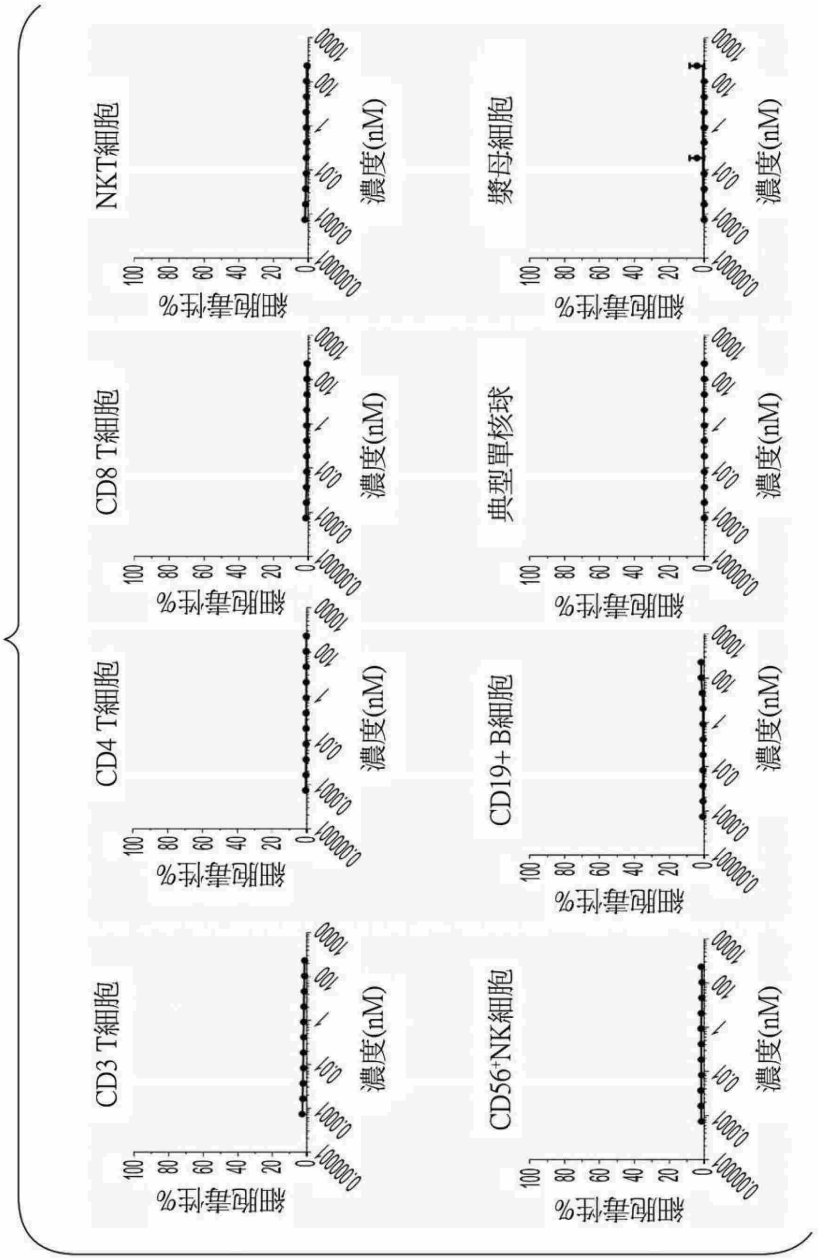
【圖33B】


BGCB491
CD3x空x空
BCMAxGPRC5Dx空
CD25+ CD3+ T細胞%
抗體濃度(nM)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
20
40
60
80
100

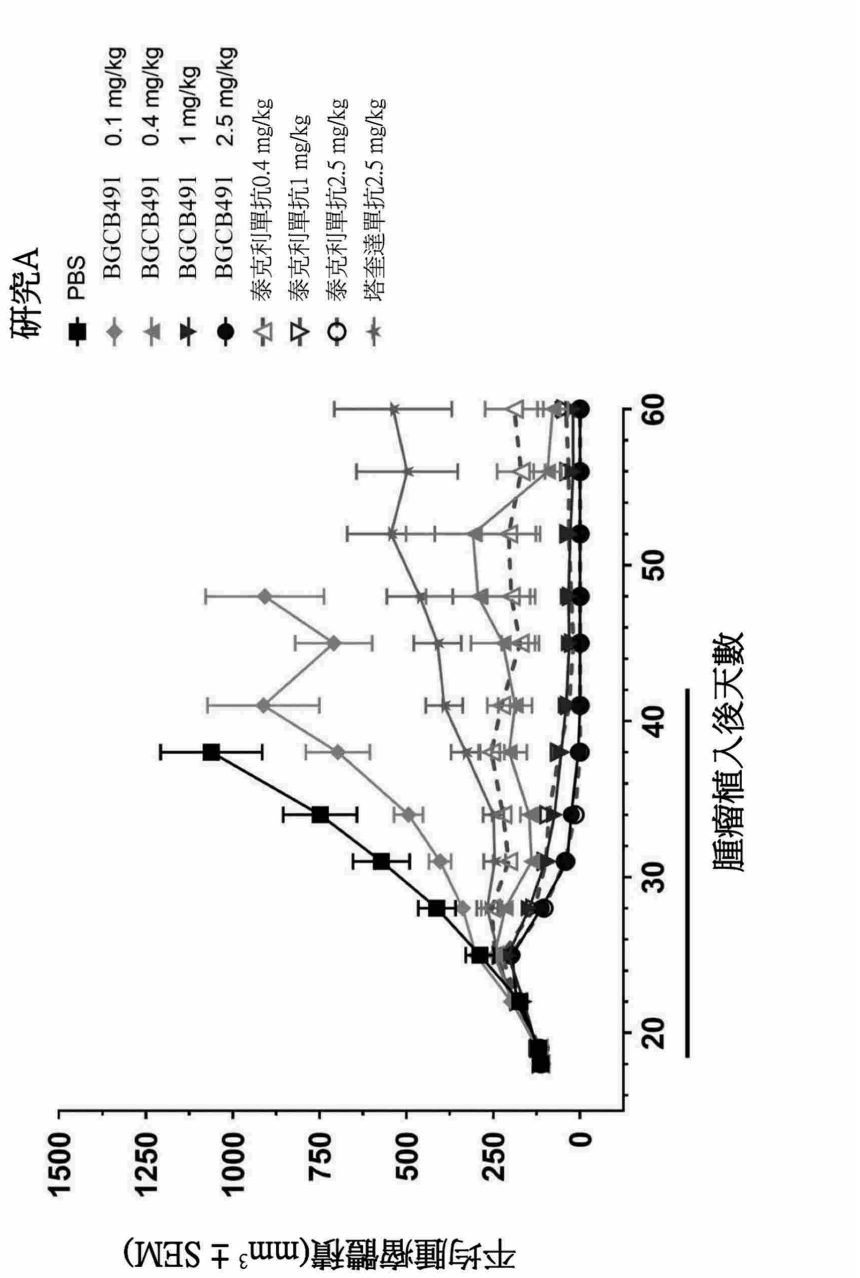
【圖34A】


CD25+ CD3+ T細胞%
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(nM)

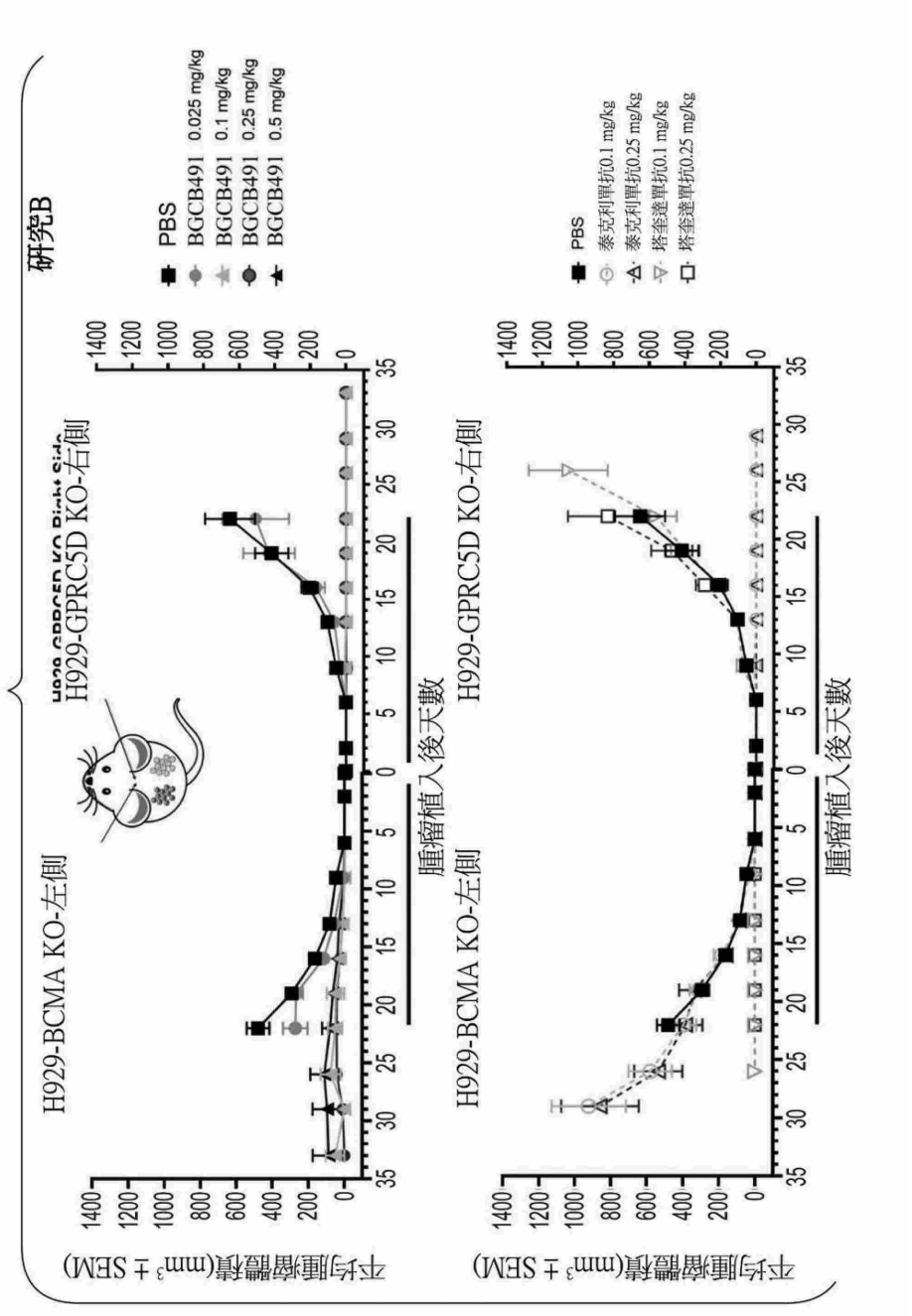
【圖34B】


CD3 T細胞
CD4 T細胞
CD8 T細胞
NKT細胞
CD56+NK細胞
CD19+ B細胞
典型單核球
漿母細胞
細胞毒性%
濃度(nM)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000

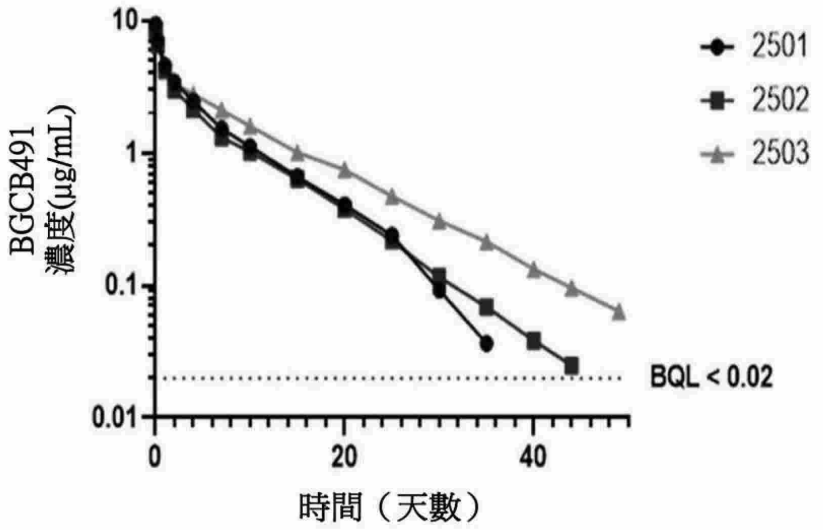
【圖34C】


研究A
PBS
BGCB491 0.1 mg/kg
BGCB491 0.4 mg/kg
BGCB491 1 mg/kg
BGCB491 2.5 mg/kg
泰克利單抗0.4 mg/kg
泰克利單抗1 mg/kg
泰克利單抗2.5 mg/kg
塔奎達單抗2.5 mg/kg
平均腫瘤體積(mm³ ± SEM)
腫瘤植入後天數
0
250
500
750
1000
1250
1500
20
30
40
50
60

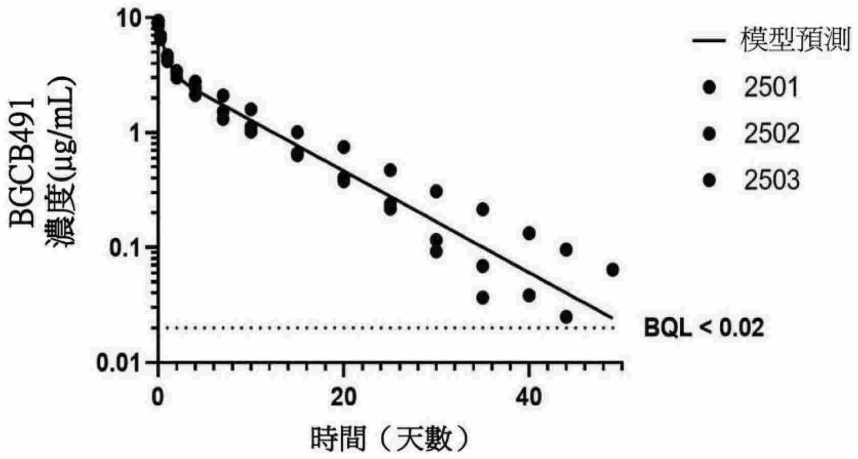
【圖35】


研究B
H929-BCMA KO-左側
H929-GPRC5D KO-右側
PBS
BGCB491 0.025 mg/kg
BGCB491 0.1 mg/kg
BGCB491 0.25 mg/kg
BGCB491 0.5 mg/kg
平均腫瘤體積(mm³ ± SEM)
腫瘤植入後天數
H929-BCMA KO-左側
H929-GPRC5D KO-右側
PBS
泰克利單抗0.1 mg/kg
泰克利單抗0.25 mg/kg
塔奎達單抗0.1 mg/kg
塔奎達單抗0.25 mg/kg
平均腫瘤體積(mm³ ± SEM)
腫瘤植入後天數

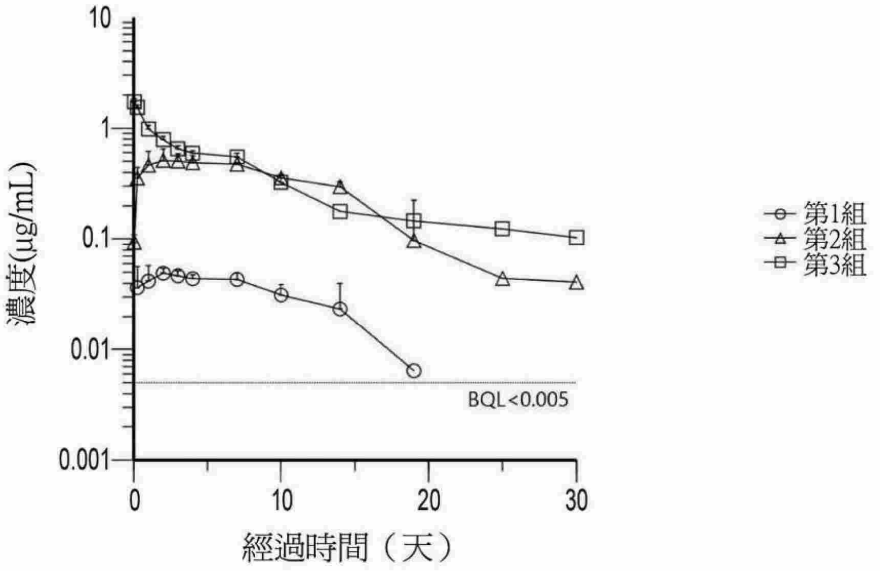
【圖36】


10
1
0.1
0.01
BGCB491
濃度(μg/mL)
0
20
40
時間（天數）
2501
2502
2503
BQL < 0.02

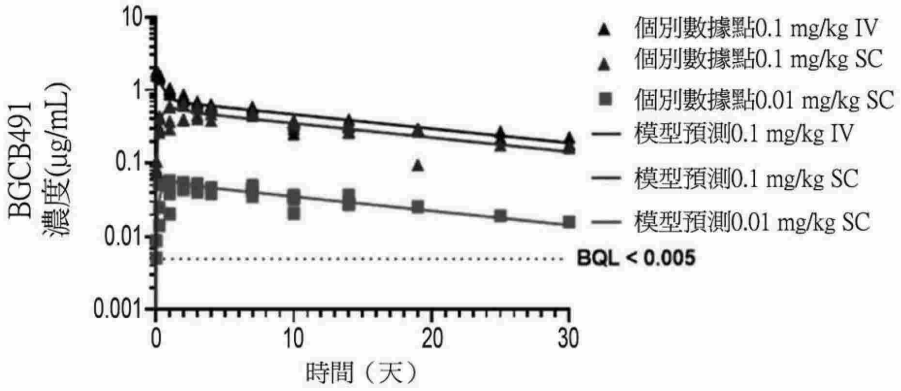
【圖37】


10
1
0.1
0.01
BGCB491
濃度(μg/mL)
0
20
40
時間（天數）
模型預測
2501
2502
2503
BQL < 0.02

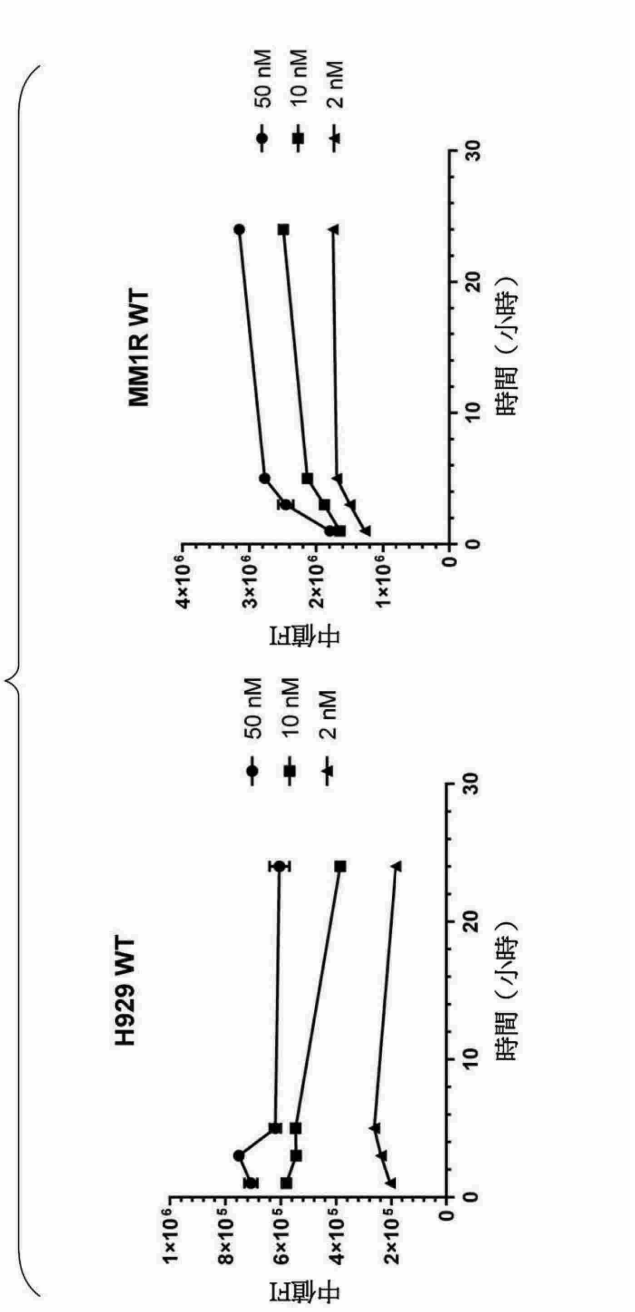
【圖38】


10
1
0.1
0.01
0.001
濃度(μg/mL)
BQL<0.005
0
10
20
30
經過時間（天）
第1組
第2組
第3組

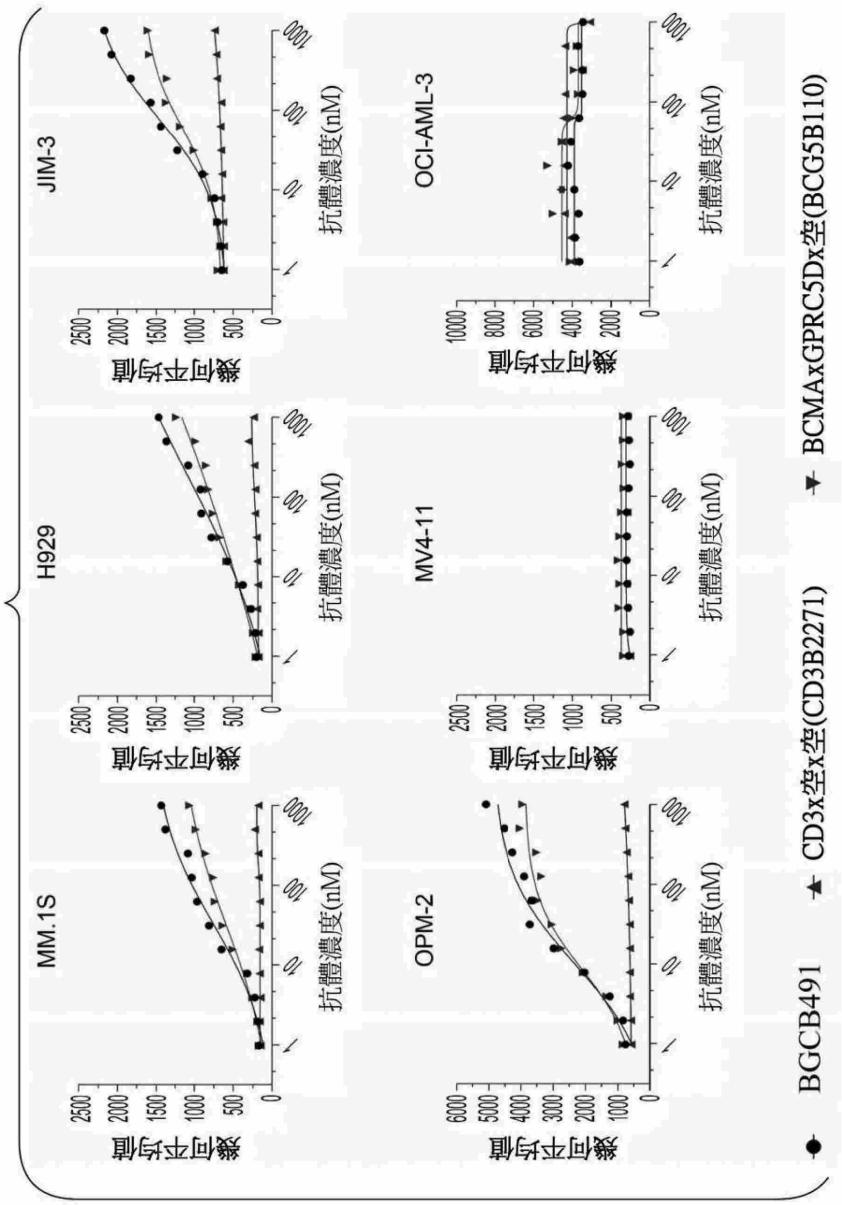
【圖39A】


10
1
0.1
0.01
0.001
BGCB491
濃度(μg/mL)
BQL < 0.005
0
10
20
30
時間（天）
個別數據點0.1 mg/kg IV
個別數據點0.1 mg/kg SC
個別數據點0.01 mg/kg SC
模型預測0.1 mg/kg IV
模型預測0.1 mg/kg SC
模型預測0.01 mg/kg SC

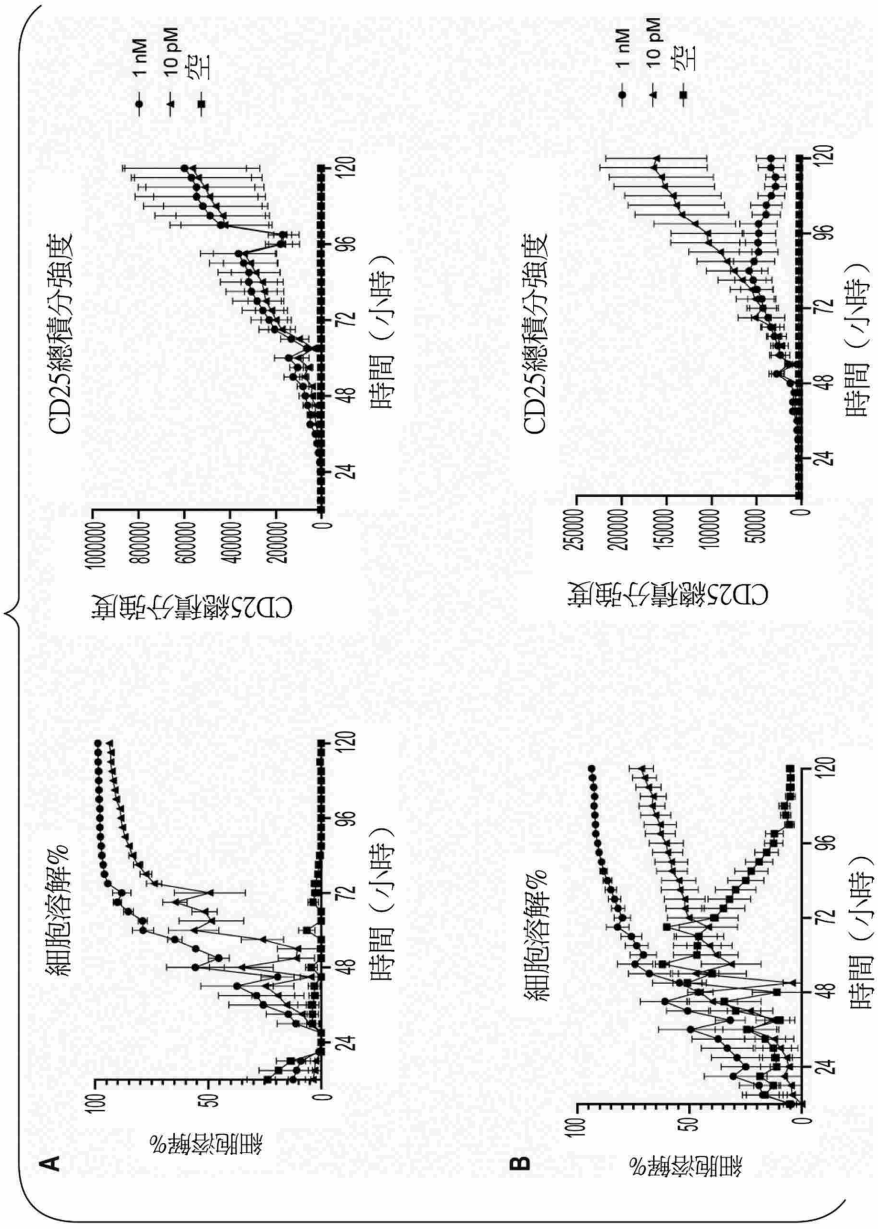
【圖39B】


MM1R WT
H929 WT
50 nM
10 nM
2 nM
中值FI
時間（小時）
0
10
20
30
1×10⁶
2×10⁶
3×10⁶
4×10⁶
2×10⁵
4×10⁵
6×10⁵
8×10⁵

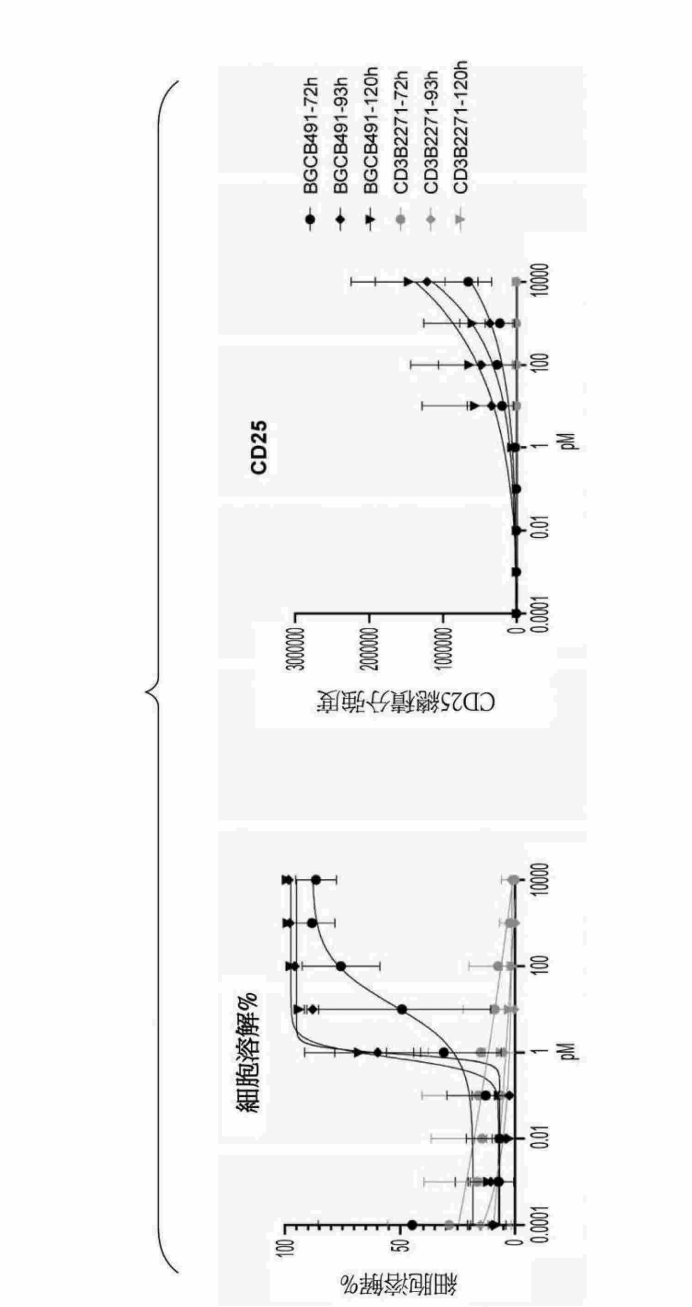
【圖40】


MM.1S
H929
JIM-3
OPM-2
MV4-11
OCI-AML-3
幾何平均值
抗體濃度(nM)
BGCB491
CD3x空x空(CD3B2271)
BCMAxGPRC5Dx空(BCG5B110)

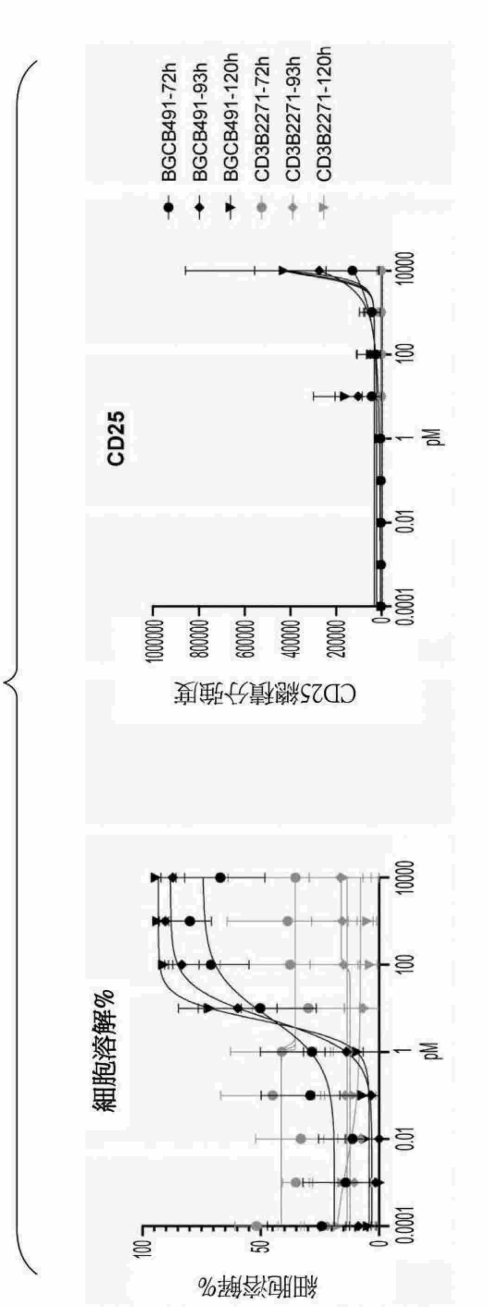
【圖41】


A
細胞溶解%
時間（小時）
CD25總積分強度
1 nM
10 pM
空
B
細胞溶解%
時間（小時）
CD25總積分強度
1 nM
10 pM
空

【圖42】


細胞溶解%
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
10000
pM
CD25
CD25總積分強度
3000000
2000000
1000000
BGCB491-72h
BGCB491-93h
BGCB491-120h
CD3B2271-72h
CD3B2271-93h
CD3B2271-120h

【圖43】


BGCB491-72h
BGCB491-93h
BGCB491-120h
CD3B2271-72h
CD3B2271-93h
CD3B2271-120h
CD25
CD25總積分強度
細胞溶解%
pM
細胞溶解%
pM

【圖44】

PBS
BGCB491 0.025 mg/kg
BGCB491 0.1 mg/kg
BGCB491 0.5 mg/kg
BGCB491 1 mg/kg
塔奎達單抗0.025 mg/kg
塔奎達單抗0.1 mg/kg
泰克利單抗0.1 mg/kg
泰克利單抗0.5 mg/kg
平均腫瘤體積(mm³ ± SEM)
腫瘤植入後天數
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50

【圖45】

ID	說明	ScFv擬合度	人類 BCMA	食蟹獼猴 BCMA	H929，1小時37C		MM.1R，1小時37C	scFv Tm		NSB
		65C 下之結合%	KD (M)	KD (M)	EC50 (nM)	EC90 (nM)	EC50 (nM)	EC90 (nM)	°C	多個表面
BCMB601	BCMB519_L-H scFv	116%	2.80E-10	N.B	3.2	19	2.3	19	69	無

【圖46A】

化合物ID	說明	CD3臂	BCMA臂			腫瘤細胞死亡%		
			殖株	來源	EC50 (nM)	pM EC50	最大殺滅%	pM EC90
GCDB147	BCMB519 scFv x CDB376 Fab	CD3B376	BCMB519	Ablexis	**3.4**	**115**	**92**	214

【圖46B】

結合物ID	細胞結合（1小時@37度）	動力學結合	細胞結合（1小時@37度）	食蟹獼猴交叉反應性	自交互作用	疏水性	NSBscFv Tm	Tm
	EC50(nM)	（37度）	Bmax	倍數偏移	(AC-SINS)	(aHIC)	多個表面	°C
GC5B680 N68S, S69T	6-24	漸增	++++	無差異	低	低	無	71 (scFv)
GC5B596（第1代DuoBody親本）	弱	穩定	弱	無交叉反應性	高	低	無	68 (Tm1)

【圖47】