# 三特异性抗原结合分子及其应用

## 相关申请的交叉引用

本申请要求于 2023 年 2 月 7 日提交的中国专利申请 2023101003684 号的优先权，本申请引用上述中国专利申请的全文。

## 技术领域

本公开属于免疫学领域，主要涉及一种三特异性抗原结合分子。更具体地，涉及特异性结合 GPRC5D 和 BCMA 两种肿瘤抗原和 T 细胞表面抗原 CD3 的三特异性抗原结合分子，以及包含所述分子的药物组合物、制备方法和用途。

## 背景技术

多发性骨髓瘤（multiple myeloma，MM）是一种血液系统的恶性肿瘤，是仅次于非霍奇金淋巴瘤的第二大常见血液学恶性肿瘤。多发性骨髓瘤可破坏骨骼、免疫系统、肾脏及红细胞数量，通常导致广泛的骨骼破坏，并伴有溶骨性病变、骨质减少及病理性骨折。该病常见于中老年人，随着老龄化的加速以及随着诊疗手段的进步，患者人群呈现快速增长的趋势。

与绝大多数的癌症治疗方式一样，多发性骨髓瘤的标准治疗为化疗，普遍用药是马法兰 (melphalan)等，通常服用这类药后会导致骨髓抑制，而且疗效不甚理想，治疗后完全缓解率只有约 5%。近几年随着医学的进步，靶向药物，例如蛋白酶体抑制剂，免疫调节剂及抗体类的药物开发为多发性骨髓瘤的治疗带来了变革，与原有治疗方案相比，大大提高了存活率，显著改善了患者的预后，但多发性骨髓瘤仍然无法治愈，而且大多数患者会在多线治疗后复发，我国患者的中位生存期为 24-36 个月，五年生存率仅约 24%，因此，亟需新的治疗方式。

B 细胞成熟抗原（B cell maturation antigen，BCMA）是一种跨膜的糖蛋白受体（非酪氨酸激酶受体），是肿瘤坏死因子家族的成员。其主要在成熟的 B 细胞表面表达，少量的在造血干细胞或其他组织细胞中表达。BCMA 的配体分子为 BAFF（B cell activating factor）和 APRIL（a proliferation-inducing ligand）。BCMA 的信号通路在正常的生理状态下可以促进 B 细胞分化成浆细胞，维持长生命周期骨髓浆细胞的稳态。BCMA 在 MM 患者的骨髓浆细胞中过量表达，过量表达的 BCMA 可以通过细胞内的 AKT、MAPK 以及(NF)-κB 信号通路，刺激恶性浆细胞的增殖，维持其活性，从而促进疾病的进展。阻断 BCMA 信号通路后，可以抑制恶性浆细胞的增殖，抑制/缓解病情的进展，因此 BCMA 是 MM 临床治疗的一个很好的靶点。另外，细胞膜上的 BCMA 蛋白还可以被体内的 γ-分泌酶切割，切割后的 BCMA 蛋白在血清中处于游离状态，被称为可溶的 BCMA 蛋白（sBCMA）。sBCMA 可以和配体形成复合物，从而降低血清中配体的浓度、阻断配体和膜结合型 BCMA 的结合，阻止 BCMA 信号通路。

GPRC5D 是 G 蛋白偶联受体 C5 家族亚型 D（G protein coupled receptor C5 family subtype D），属于一种孤儿

受体，为7次跨膜蛋白。GPRC5D特异性地在多发性骨髓瘤的浆细胞高表达，在正常组织中只有毛囊有。针对GPRC5D的抗体及CAR-T细胞疗法，临床前均显示了乐观的效果，而在实验中动物并没有出现脱毛的现象。而且GPRC5D的表达不受限于BCMA的表达，在BCMA抗原丢失导致的肿瘤复发模型中，GPRC5D靶向的CAR-T疗法可以克服肿瘤逃逸。这些研究结果均表明GPRC5D在临床上是一个理想靶标。

靶向肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)和CD3抗原的双特异性抗体能够将T细胞与肿瘤细胞在空间上拉近，形成突触，利用T细胞对肿瘤细胞实现特异性的杀伤作用，这类抗体被称为T细胞衔接器（T cell-engager, TCE双抗）。基于TCE的治疗策略依赖于TAA在待治疗的肿瘤细胞上的分布。此外，研究也显示，靶向单个TAA位点的治疗形式可能会因肿瘤的逃逸机制而引起疾病的复发，从而限制治疗的有效性。

由于GPRC5D和BCMA在肿瘤中的表达呈非相关性，设计组合靶向GPRC5D和BCMA的三特异性抗体将既可以覆盖GPRC5D阳性肿瘤患者，也可以覆盖BCMA阳性肿瘤患者，同时可以避免由于单一抗原丢失带来的复发，从而达到提高患者覆盖率和改善治疗功效的目的。

## 发明概述

为了实现上述目的，本公开提供了靶向GPRC5D/BCMA/CD3的三特异性抗原结合分子，并对多种分子构型进行了深入研究，成功实现了多靶点组合，避免了多药联用的不便。

本公开的第一个方面是提供一种三特异性抗原结合分子。该三特异性抗原结合分子种构型包含以下多肽：

第一多肽，包含：(i)能够特异性结合第一抗原的抗原结合片段Fab的重链结构域，(ii)能够特异性结合第二抗原的单链抗体（scFv）结构域，和(iii)第一Fc结构域；

第二多肽，包含：能够特异性结合第一抗原的抗原结合片段Fab的轻链结构域；

第三多肽，包含：（i）能够特异性结合第三抗原的重链单域抗体（VHH）结构域和（ii）第二Fc结构域。

所述第一多肽的抗原结合片段Fab的重链结构域与所述第二多肽的抗原结合片段Fab的轻链结构域形成针对第一抗原的第一结合位点；所述单链抗体(scFv)结构域形成针对第二抗原的第二结合位点；所述重链单域抗体(VHH)结构域形成针对第三抗原的第三结合位点；所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域相互缔合。

任选地，所述三特异性抗原结合分子还包含第四多肽，其包含特异性结合第一抗原的抗原结合片段Fab的轻链结构域，所述抗原结合片段Fab的轻链结构域与第二多肽的抗原结合片段Fab的轻链结构域相同，且所述第三多肽还包含特异性结合第一抗原的抗原结合片段Fab的重链结构域，所述第三多肽的抗原结合片段Fab的重链结构域与第一多肽的抗原结合片段Fab的重链结构域相同，其C端与VHH结构域的N端相连，所述第三多肽的Fab的重链结构域与第四多肽的Fab的轻链结构域形成针对第一抗原的第四结合位点。

在一个实施方案中，所述scFv结构域包含重链可变区和轻链可变区；优选地，所述scFv结构域的重链可变区

与轻链可变区通过第一接头连接，其中重链可变区的 C 端与第一接头的 N 端融合，第一接头的 C 端与轻链可变区的 N 端融合。

更优选地，所述第一接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$，n 为 1-10 中的任意整数。

在一个实施方案中，所述第一 Fc 结构域包含免疫球蛋白的第一 CH2 结构域和第一 CH3 结构域，所述第一 CH2 结构域的 C 端与第一 CH3 结构域的 N 端融合；所述第二 Fc 结构域包含免疫球蛋白的第二 CH2 结构域和第二 CH3 结构域，所述第二 CH2 结构域的 C 端与第二 CH3 结构域的 N 端融合。

优选地，所述第一 CH3 结构域包含“节”（knob）结构，所述第二 CH3 结构域包含“穴”（hole）结构；更优选地，所述“节”（knob）结构包含氨基酸取代 S354C 和 T366W，所述“穴”（hole）结构包含氨基酸取代 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V。

优选地，为降低抗体的 ADCC 活性，第一和/或第二 Fc 结构域包含 L234A、L235A 和/或 G237A 的氨基酸取代。

优选地，所述第三多肽的第二 Fc 结构域包含 H435R 的氨基酸取代。

优选地，所述 Fc 结构域来源于 IgG1。

在一个实施方案中，所述第一 Fc 结构域的 N 端与所述 scFv 结构域的 C 端融合，优选地，所述第一 Fc 结构域的 N 端通过第二接头与所述 scFv 结构域的 C 端融合，更优选地，所述第二接头包含氨基酸序列 EPKSS。

在一个实施方案中，所述抗原结合片段 Fab 的重链结构域包含免疫球蛋白的重链可变区和 CH1 结构域，所述重链可变区的 C 端与 CH1 结构域的 N 端融合；抗原结合片段 Fab 的轻链结构域包含免疫球蛋白的轻链可变区和轻链恒定区，所述轻链可变区的 C 端与轻链恒定区的 N 端融合。

在一个实施方案中，所述第一多肽的抗原结合片段 Fab 的重链结构域与所述 scFv 结构域通过第三接头连接，其中抗原结合片段 Fab 的重链结构域的 C 端与第三接头的 N 端融合，第三接头的 C 端与 scFv 结构域的 N 端融合。

优选地，所述第三接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$，n 为 1-10 中的任意整数。

任选地，所述第三多肽的抗原结合片段 Fab 的重链结构域的 C 端通过第五接头与 VHH 结构域的 N 端相连。优选地，所述第五接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$，n 为 1-10 中的任意整数。

优选地，所述重链单域抗体（VHH）结构域的 C 端与第二 Fc 结构域的 N 端融合，优选地，所述 VHH 结构域的 C 端通过第四接头与第二 Fc 结构域的 N 端融合，更优选地，所述第四接头包含氨基酸序列 EPKSS。

在一个实施方案中，第一多肽包含如下结构： Fab 重链结构域-第三接头-scFv 结构域-第二接头-第一 Fc 结构域。

优选地，所述第一多肽包含如下结构：Fab 重链可变区-Fab CH1-第三接头-scFv 的重链可变区-第一接头-scFv 的

轻链可变区-第二接头-第一 CH2-第一 CH3。

在一个实施方案中，第二多肽包含如下结构：Fab 轻链可变区-轻链恒定区。

在一个实施方案中，第三多肽包含如下结构：VHH 结构域-第四接头-第二 Fc 结构域。优选地，所述第三多肽包含如下结构：VHH-第四接头-第二 CH2-第二 CH3。

任选地，第四多肽包含如下结构：Fab 轻链可变区-轻链恒定区，且第三多肽包含如下结构：Fab 重链结构域-第五接头-VHH-第四接头-第二 Fc 结构域，优选地所述第三多肽包含如下结构：Fab 重链可变区-Fab CH1-第五接头-VHH-第四接头-第二 CH2-第二 CH3。

在一个实施方案中，所述第二抗原为 CD3，优选为 CD3ε；优选地，所述 scFv 结构域包含序列如 SEQ ID NO：27 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO：28 所示的 HCDR2、序列如 SEQ ID NO：29 所示的 HCDR3、序列如 SEQ ID NO：30 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO：31 所示的 LCDR2 和序列如 SEQ ID NO：32 所示的 LCDR3。

更优选地，所述 scFv 结构域包含序列如 SEQ ID NO：25 所示的重链可变区和序列如 SEQ ID NO：26 所示的轻链可变区。

更优选地，所述 scFv 结构域包含 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。

在一个实施方案中，所述第一 Fc 结构域包含 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，所述第二 Fc 结构域包含 SEQ ID NO：34 所示的氨基酸序列。

在一个实施方式中，所述第一抗原为 BCMA；优选地，所述抗原结合片段 Fab 包含序列如 SEQ ID NO：16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO：17 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO：18 所示的 HCDR3，和/或，序列如 SEQ ID NO:19 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO:20 所示的 LCDR2 和序列如 SEQ ID NO:21 所示的 LCDR3。

更优选地，所述抗原结合片段 Fab 的重链结构域包含序列如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区，和/或，所述抗原结合片段 Fab 的轻链结构域包含序列如 SEQ ID NO：15 所示的轻链可变区。

更优选地，所述抗原结合片段 Fab 的重链结构域包含如 SEQ ID NO：35 所示的氨基酸序列，和/或，所述抗原结合片段 Fab 的轻链结构域包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

在一个实施方式中，所述第三抗原为 GPRC5D；优选地，所述能够特异性结合第三抗原的重链单域抗体（VHH）结构域包含序列如 SEQ ID NO:22 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO:24 所示的 HCDR3；更优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO:10 所示的序列。

在一个实施方案中，所述三特异性抗原结合分子的第一多肽包含 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列，所述第二多肽包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，所述第三多肽包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列；或者任选地，所述三特异性抗原结合分子的第一多肽包含 SEQ ID NO:5 所示的序列，所述第二多肽和/或第四多肽包含 SEQ ID NO:7 所示的序列，所述第三多肽包含 SEQ ID NO:8 所示的序列。

本公开还提供了核酸分子，其编码本公开所述的三特异性抗原结合分子。

本公开还提供了载体，其包含所述的核酸分子。

本公开还提供了宿主细胞，其包含所述的核酸分子或者载体；优选地，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞；所述原核细胞优选大肠杆菌；所述真核细胞优选哺乳动物细胞或酵母；更优选地，所述哺乳动物细胞为 CHO 细胞、Expi293 或 HEK293 细胞。

本公开还提供了制备三特异性抗原结合分子的方法，所述方法包括：在适合的条件下培养所述宿主细胞。

本公开还提供了抗体药物偶联物，其是将前述双特异性抗原结合分子与其他生物活性分子偶联形成；优选地，所述其他生物活性分子为小分子药物；优选地，所述双特异性抗原结合分子与所述其他生物活性分子通过接头连接。

本公开还提供了药物组合物，其包含前述三特异性抗原结合分子、核酸分子、表达载体、宿主细胞和/或抗体药物偶联物。

在一个实施方案中，所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

在一个实施方案中，所述药物组合物还包含一种或多种额外的治疗剂。

本公开还提供了所述三特异性抗原结合分子、核酸分子、载体、宿主细胞和/或抗体药物偶联物在制备治疗、缓解和/或预防肿瘤的药物中的用途。优选地，所述肿瘤是 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性的肿瘤。

本公开还提供一种诱导表达 GPRC5D 和/或 BCMA 的细胞死亡的方法，所述方法包括使所述细胞与所述三特异性抗原结合分子、核酸分子、载体、宿主细胞、和/或药物组合物接触，所述表达 GPRC5D3 和/或 BCMA 的细胞是肿瘤细胞。

本公开还提供一种治疗受试者中与表达 GPRC5D 和/或 BCMA 相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用所述三特异性抗原结合分子、核酸分子、载体、宿主细胞、和/或药物组合物。优选地，所述疾病是肿瘤。优选地，其中受试者对于用先前的抗癌治疗剂进行的治疗具有复发性或难治性。在一个实施方案中，所述方法还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。

优选地，本公开所述肿瘤或肿瘤细胞选自：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

本公开的另一个方面是提供一种特异性结合 GPRC5D 的抗原结合分子或其抗原结合片段，所述抗原结合分子或其抗原结合片段能够特异性地结合 GPRC5D，而对同家族蛋白 GPRC5A 没有非特异结合。

优选地，所述特异性结合 GPRC5D 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含重链单域抗体（VHH）结构域；优选地，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区的 HCDR 序列；优选地，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段包含序列如 SEQ ID NO:22 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO:24 所示的 HCDR3；更优选地，所述重链单域抗体（VHH）包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列。

优选地，所述所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段还包含免疫球蛋白的 Fc 结构域，所述免疫球蛋白选自 lgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 形式，优选地，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段还包含 IgG1 的 Fc

结构域，进一步优选地，所述 IgG1 的 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列。

在一个实施方案中，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段包含重链单域抗体（VHH）结构域和 IgG1 的 Fc 结构域，优选地，所述重链单域抗体（VHH）结构域的 C 端融合到 IgG1 的 Fc 结构域的 N 端，更优选地，所述重链单域抗体（VHH）结构域的 C 端通过接头融合到 IgG1 的 Fc 结构域的 N 端，优选地，所述接头包含氨基酸序列 EPKSS 或$(G_4S)_n$，n 为 1-10 中的任意整数。在一个优选的实施方案中，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段由 N 端至 C 端包含序列如 SEQ ID NO:10 的 VHH 结构域、$G_4S$ 接头和序列如 SEQ ID NO:38 所示的 IgG1 的 Fc 结构域。

本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段可以是单克隆抗体、双特异性结合分子、多特异性结合分子、鼠源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、改型抗体、全人源抗体、全长抗体、重链抗体、纳米抗体、Fab、Fv、scFv、$F(ab')_2$、线性抗体或重链单域抗体。

本公开还提供一种偶联物，是将本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段与捕获标记物或检测标记物偶联形成；优选地，所述检测标记物包括放射性核素、发光物质、有色物质或酶。

本公开还提供一种抗体药物偶联物（ADC），是将本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段与其他生物活性分子偶联形成；优选地，所述其他生物活性分子为小分子药物；优选地，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段与所述其他生物活性分子通过接头连接。

本公开还提供一种融合蛋白，其中的一个被融合的部分包含本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段。

本公开还提供一种嵌合抗原受体（CAR）或包含所述嵌合抗原受体的细胞（例如 CAR-T 细胞），其包含本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段。

本公开还提供编码 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段的核酸，以及包含该核酸的重组载体，以及包含上述核酸或载体的宿主细胞。优选地，所述宿主细胞为原核细胞（优选大肠杆菌），或者真核细胞（优选哺乳动物细胞或酵母；进一步优选地，所述哺乳动物细胞为 CHO 细胞或 HEK293 细胞）。

本公开还提供制备 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段的方法，所述方法包括：在适合的条件下培养上述宿主细胞，并从所述细胞中纯化获得表达产物。

本公开还提供 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段在制备治疗或缓解肿瘤的药物中的用途。

在一个实施方案中，所述药物靶向 GPRC5D 异常表达的肿瘤细胞。

在一个实施方案中，所述肿瘤选自：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

本公开还提供一种治疗受试者中与表达 GPRC5D 相关的疾病的方法，包括向有此需要的受试者施用所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段。

优选地，所述疾病是肿瘤；优选地，所述肿瘤疾病选自淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌；

更优选地，还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。

本公开还提供所述的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段在制备检测试剂或诊断试剂中的用途。

在一个实施方案中，所述检测试剂用于检测 GPRC5D 的表达；所述诊断试剂用于诊断肿瘤；优选地，所述肿瘤选自：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤、以及上述肿瘤的转移癌。

本公开还提供检测样品中 GPRC5D 表达的方法，所述方法包括：

（1）将样品与本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段接触；

（2）检测所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段与 GPRC5D 的复合物的形成；任选地，所述 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段是被可检测地标记的。

本公开还提供了监测受试者中 GPRC5D 表达型癌症的方法，所述方法包括将从受试者中获得或来源于受试者的样品暴露于本文所述的特异性结合 GPRC5D 的抗原结合分子或抗原结合片段中的一种或多种；测定存在于由抗体或其抗原结合片段结合的样品中的 GPRC5D 的量；将存在于样品中的 GPRC5D 的量与已知标准品或参照样品或先前从受试者中获得的类似样品中的 GPRC5D 的量进行比较；以及基于所比较的样品中 GPRC5D 的量的差异，确定受试者的 GPRC5D 水平是否指示癌症进展、消退或稳定疾病。

从受试者中获得或来源于受试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。

本公开还提供一种药物组合物，其包含有效量的本公开的 GPRC5D 抗原结合分子或其抗原结合片段、或者包含有效量的本公开的抗体药物偶联物、融合蛋白、CAR-T 细胞、或者包含有效量的本公开的核酸、或者包含有效量的本公开的重组载体、或者包含有效量的本公开的宿主细胞。

在一个实施方案中，所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

优选地，所述药物组合物还包含一种或多种额外的其他治疗剂。

本公开的另一个方面是提供一种特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段，所述抗原结合分子或其抗原结合片段包含序列如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区的 HCDR 序列，和/或，序列如 SEQ ID NO:15 所示的轻链可变区的 LCDR 序列；优选地，所述抗原结合分子或其抗原结合片段包含：序列如 SEQ ID NO：16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO：17 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO：18 所示的 HCDR3，和/或序列如 SEQ ID NO:19 所示的 LCHDR1、序列如 SEQ ID NO:20 所示的 LCDR2 和序列如 SEQ ID NO:21 所示的 LCDR3。

优选地，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含序列如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区，和/或所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含序列如 SEQ ID NO：15 所示的轻链可变区。

更优选地，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO：9 所示的重链氨基酸序列，和/或，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:7 所示的轻链氨基酸序列。

本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区包含 Fc；更优选地，Fc 来源于鼠或人；更优选地，Fc 的序列是天然的或经过修饰的。

本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段可以是单克隆抗体、双特异性结合分子、多特异性结合分子、

鼠源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、改型抗体、全人源抗体、全长抗体、重链抗体、纳米抗体、Fab、Fv、scFv、F(ab')2、线性抗体或重链单域抗体。

本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段可以是全长抗体。

本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 形式。

本公开还提供一种偶联物，是将本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段与捕获标记物或检测标记物偶联形成；优选地，所述检测标记物包括放射性核素、发光物质、有色物质或酶。

本公开还提供一种抗体药物偶联物（ADC），是将本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段与其他生物活性分子偶联形成；优选地，所述其他生物活性分子为小分子药物；优选地，所述 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段与所述其他生物活性分子通过接头连接。

本公开还提供一种融合蛋白，其中的一个被融合的部分包含本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段。

本公开还提供一种嵌合抗原受体（CAR）以及包含所述嵌合抗原受体的细胞（如 CAR-T 细胞），其包含本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段。

本公开还提供编码 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段的核酸，以及包含该核酸的重组载体，以及包含上述核酸或载体的宿主细胞。优选地，所述宿主细胞为原核细胞（优选大肠杆菌），或者真核细胞（优选哺乳动物细胞或酵母；进一步优选地，所述哺乳动物细胞为 CHO 细胞或 HEK293 细胞）。

本公开还提供制备本公开 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段的方法，所述方法包括：在适合的条件下培养上述宿主细胞，并从所述细胞中纯化获得表达产物。

本公开还提供了 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段在制备治疗或缓解肿瘤的药物中的用途。

在一个实施方案中，所述药物靶向 BCMA 异常表达的肿瘤细胞。

在一个实施方案中，所述肿瘤选自：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

本公开还提供一种治疗受试者中与表达 BCMA 相关的疾病的方法，包括向有此需要的受试者施用所述 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段。

优选地，所述疾病是肿瘤；优选地，所述肿瘤疾病选自淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌；

更优选地，还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。

本公开还提供了 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段在制备检测试剂或诊断试剂中的用途。

在一个实施方案中，所述检测试剂用于检测 BCMA 的表达；所述诊断试剂用于诊断肿瘤；优选地，所述肿瘤选自：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤、以及上述肿瘤的转移癌。

本公开还提供检测样品中 BCMA 表达的方法，所述方法包括：

（1）将样品与本公开的 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段接触；

（2）检测所述 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段与 BCMA 的复合物的形成；任选地，所述 BCMA 抗原

结合分子或其抗原结合片段是被可检测地标记的。

本公开还提供了监测受试者中 BCMA 表达型癌症的方法，所述方法包括将从受试者中获得或来源于受试者的样品暴露于本文所述的 BCMA 特异性抗体或抗原结合片段中的一种或多种；测定存在于由抗体或其抗原结合片段结合的样品中的 BCMA 的量；将存在于样品中的 BCMA 的量与已知标准品或参照样品或先前从受试者中获得的类似样品中的 BCMA 的量进行比较；以及基于所比较的样品中 BCMA 的量的差异，确定受试者的 BCMA 水平是否指示癌症进展、消退或稳定疾病。

从受试者中获得或来源于受试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。

本公开还提供一种药物组合物，其包含有效量的本公开 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段、或者包含有效量的本公开的抗体药物偶联物、融合蛋白、CAR-T 细胞、或者包含有效量的本公开的核酸、或者包含有效量的本公开的重组载体、或者包含有效量的本公开的宿主细胞。

在一个实施方案中，所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

优选地，所述药物组合物还包含一种或多种额外的其他治疗剂。

本公开所称的取代中的氨基酸位置优选采用 EU 编号系统表示。

## 附图说明

附图更进一步说明了本说明书所公开的新特性。参照这些附图将能更好地理解本说明书中所公开的特性和优点，但应当理解，这些附图仅用于说明本文所公开原理的具体的实施方案，而非意欲对所附权利要求的范围加以限制。

图 1A 显示了流式细胞术检测的抗 GPRC5D 阳性对照抗体验证 CHOK1 细胞上人 GPRC5D 的表达情况；图中虚线所示为未转任何质粒的 CHOK1 母本细胞上人 GPRC5D 的表达情况，图中实线所示为 CHOK1 母本细胞转染人 GPRC5D 质粒后，人 GPRC5D 蛋白过表达情况。

图 1B 显示了流式细胞术检测的抗 GPRC5D 阳性对照抗体验证 CHOK1 细胞上食蟹猴 GPRC5D 的表达情况；图中虚线所示为未转任何质粒的 CHOK1 母本细胞上食蟹猴 GPRC5D 的表达情况，图中实线所示为 CHOK1 母本细胞转染食蟹猴 GPRC5D 质粒后，食蟹猴 GPRC5D 蛋白过表达情况。

图 1C 显示了流式细胞术检测的抗 GPRC5A 阳性对照抗体验证 CHOK1 细胞上人 GPRC5A 的表达情况；图中虚线所示为未转任何质粒的 CHOK1 母本细胞上人 GPRC5A 的表达情况，图中实线所示为 CHOK1 母本细胞转染人 GPRC5A 质粒后，人 GPRC5A 蛋白过表达情况。

图 2A 显示了流式细胞术检测的抗 BCMA 阳性对照抗体验证 CHOK1 细胞上人 BCMA 的表达情况；图中虚线所示为未转任何质粒的 CHOK1 母本细胞上人 BCMA 的表达情况，图中实线所示为 CHOK1 母本细胞转染人 BCMA 质粒后，人 BCMA 蛋白过表达情况。

图 2B 显示了流式细胞术检测的抗 BCMA 阳性对照抗体验证 CHOK1 细胞上食蟹猴 BCMA 的表达情况；图中虚线所示为未转任何质粒的 CHOK1 母本细胞上食蟹猴 BCMA 的表达情况，图中实线所示为 CHOK1 母本细胞转染食蟹猴 BCMA 质粒后，食蟹猴 BCMA 蛋白过表达情况。

图 3 显示了实施例中构建的 2 个三特异性抗体的结构，分别为三抗 1 和三抗 2。

图 4A 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达双靶点 BCMA 和 GPRC5D 的肿瘤细胞 NCI-H929 的结合情况。

图 4B 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达双靶点 BCMA 和 GPRC5D 的肿瘤细胞 RPMI8226 的结合情况。

图 4C 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达人 GPRC5D 的稳转细胞系人 GPRC5D CHOK1 细胞的结合情况。

图 4D 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达人 BCMA 的稳转细胞系人 BCMA CHOK1 细胞的结合情况。

图 4E 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 与表达双靶点 BCMA 和 GPRC5D 的肿瘤细胞 NCI-H929 的结合情况。

图 4F 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 与表达双靶点 BCMA 和 GPRC5D 的肿瘤细胞 RPMI8226 的结合情况。

图 4G 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 与表达人 GPRC5D 的稳转细胞系人 GPRC5D CHOK1 细胞的结合情况。

图 4H 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 与表达人 BCMA 的稳转细胞系人 BCMA CHOK1 细胞的结合情况。

图 5A 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达 human CD3 细胞（Jurkat 细胞）的结合情况。

图 5B 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与 human PBMC 细胞的结合情况。

图 5C 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 与表达 hCD3 细胞（Jurkat 细胞）的结合情况。

图 6A 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达食蟹猴 GPRC5D 的稳转细胞系食蟹猴 GPRC5D CHOK1 细胞的结合情况。

图 6B 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与表达食蟹猴 BCMA 的稳转细胞系食蟹猴 BCMA CHOK1 细胞的结合情况。

图 7 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 与 cyno PBMC 细胞的结合情况。

图 8A 显示了 T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 NCI-H929。

图 8B 显示了 T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 RPMI8226。

图 8C 显示了 T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为人 BCMA CHOK1。

图 8D 显示了 T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为人 GPRC5D CHOK1。

图 8E 显示了 T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为人 BCMA CHOK1 与人 GPRC5D CHOK1 混合细胞体系。

图 9 显示了在 2500ng/ml 的 soluble BCMA 存在下，T 细胞介导的细胞毒性实验（虚线表示 2500ng/ml 的 soluble BCMA 条件）。

图 10A 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 在 PBMC 及肿瘤细胞 NCI-H929 共孵育条件下 IL6 释放（PBMC 捐献者号 P122080606F）。

图 10B 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab 在 PBMC 及肿瘤细胞 NCI-H929 共孵育条件下 IL6 释放（PBMC 捐献者号 XC11210）。

图 11 显示了三抗 1、三抗 2 及 Teclistamab、Teclistamab 与 Talquetamb 联合在人源免疫细胞重建小鼠模型上的药效实验结果-肿瘤体积变化（肿瘤细胞为 NCI-H929）。

图 12 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 在人源免疫细胞重建小鼠模型上的药效实验结果-肿瘤体积变化（肿瘤细胞为 NCI-H929）。

图 13 显示了三抗 1 及 BGCB491, TS-F2-5 在人源免疫细胞重建小鼠模型上的药效实验结果-肿瘤重量变化（肿瘤细胞为 NCI-H929）。

图 14A 显示了本公开的羊驼来源的抗 GPRC5D 嵌合抗体与表达 GPRC5D 细胞（人 GPRC5D-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 14B 显示了本公开的羊驼来源的抗 GPRC5D 嵌合抗体与表达 GPRC5D 细胞（食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 15A 显示了本公开的羊驼来源的抗 GPRC5D 人源化抗体与表达 GPRC5D 细胞（NCI-H929 肿瘤细胞）的结合情况。

图 15B 显示了本公开的羊驼来源的抗 GPRC5D 人源化抗体与表达 GPRC5D 细胞（食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 16 显示了本公开的羊驼来源的抗 GPRC5D 人源化抗体与同家族成员 GPRC5A 无非特异结合。

图 17A 显示了本公开的小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 嵌合抗体与表达人 BCMA 细胞（人 BCMA-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 17B 显示了本公开的小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 嵌合抗体与表达食蟹猴 BCMA 细胞（食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 18A 显示了本公开的小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体与表达人 BCMA 细胞（人 BCMA-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 18B 显示了本公开的小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体与表达食蟹猴 BCMA 细胞（食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 19A 显示来本公开的小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体变体 19CH-16H2L2-NA 和 19CH-16H2L2-QT 与表达人 BCMA 细胞（人 BCMA-CHOK1 细胞系）的结合情况。

图 19B 显示本公开的小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体变体 19CH-16H2L2-NA 和 19CH-16H2L2-QT 表达食蟹猴 BCMA 细胞（食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞系）的结合情况。

## 发明详述

### 术语

本说明书中提及的所有公布、专利和专利申请都以引用的方式并入本文，所述引用的程度就如同已特定地和个别地指示将各个别公布、专利或专利申请以引用的方式并入本文。

在下文详细描述本公开前，应理解本公开不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本公开的范围。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本公开所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

本文所公开的某些实施方案包含了数值范围，并且本公开的某些方面可采用范围的方式描述。除非另有说明，应当理解数值范围或者以范围描述的方式仅是出于简洁、便利的目的，并不应当认为是对本公开的范围的严格限定。因此，采用范围方式的描述应当被认为具体地公开了所有可能的子范围以及在该范围内的所有可能的具体数值点，正如这些子范围和数值点在本文中已经明确写出。不论所述数值的宽窄，上述原则均同等适用。当采用范围描述时，该范围包括范围的端点。

当涉及可测量值比如量、暂时持续时间等时，术语“约”是指包括指定值的±20%、或在某些情况下±10%、或在某些情况下±5%、或在某些情况下±1%、或在某些情况下±0.1%的变化。

本文中的术语“抗体”可以包含完整抗体（例如全长单克隆抗体）及其任何抗原结合片段(即抗原结合部分)或其单链，还可以包含在完整抗体或其抗原结合片段或其单链的基础上进行改造（例如连接其他肽段、功能单位重排等）而形成的具有抗原特异性结合能力的产物。

在一个实施方案中，抗体典型是指包含通过共价二硫键和非共价相互作用保持在一起的两条重（H）多肽链和两条轻（L）多肽链的 Y 型四聚蛋白。天然 IgG 抗体即具有这样的结构。每条轻链由一个可变结构域（VL）和一个恒定结构域（CL）组成。每条重链包含一个可变结构域（VH）和恒定区。

本领域已知五个主要类别的抗体：IgA，IgD，IgE，IgG 和 IgM，对应的重链恒定结构域分别被称为α，δ，ε，γ和μ，IgG 和 IgA 可以进一步分为不同的亚类，例如 IgG 可分为 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA 可分为 IgA1 和 IgA2。来自任何脊椎动物物种的抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列可以被分配到两种明显相异的类型之一，

称为κ和λ。

在IgG、IgA和IgD抗体的情形中，该恒定区包含称为CH1、CH2和CH3的三个结构域（IgM和IgE具有第四结构域CH4）。在IgG、IgA和IgD类别中，CH1和CH2结构域被柔性铰链区分离，该铰链区是可变长度的富含脯氨酸和半胱氨酸的区段。每类抗体进一步包含由配对半胱氨酸残基形成的链间和链内二硫键。

术语“可变区”或“可变结构域”显示出从一种抗体到另一种抗体的氨基酸组成的显著变化，并且主要负责抗原识别和结合。每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点，使得完整的IgG抗体具有两个结合位点（即它是二价的）。重链的可变区（VH）和轻链的可变区（VL）结构域各包含具有极端变异性的三个区域，被称为高变区（HVR），或更通常地，被称为互补决定区（CDR），VH和VL各有4个骨架区FR，分别用FR1，FR2，FR3，FR4表示。因此，CDR和FR序列通常出现在重链可变结构域（或轻链可变结构域）的以下序列中：FR1-HCDR1（LCDR1）-FR2-HCDR2（LCDR2）-FR3-HCDR3（LCDR3）-FR4。

术语“抗体片段”包含完整抗体的至少一部分。如在此所使用，抗体分子的“片段”包括抗体的“抗原结合片段”，并且术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体中与所选抗原或其免疫原性决定部分特异性结合或反应的多肽片段，或由此片段进一步衍生的融合蛋白产物，例如单链抗体，嵌合抗原受体中的胞外结合区等。示例性的抗体片段或其抗原结合片段包括但不限于：可变轻链片段、可变重链片段、Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fd片段、Fv片段、单结构域抗体、线性抗体、单链抗体（scFv）及由抗体片段形成的双特异性抗体或多特异性抗体等。

术语“Fab”或“Fab片段”是指由重链的VH和CH1结构域以及轻链的VL和CL结构域组成的单价的抗体片段。术语“$F(ab')_2$”或“$F(ab')_2$片段”包含2个Fab片段以及铰链区，其为二价的抗体片段。

术语“单链抗体”或“scFv”是指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区的抗体片段的融合蛋白，其中所述轻链和重链可变区是邻接的（例如经由合成接头例如短的柔性多肽接头），并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述scFv保留其所来源的完整抗体的特异性。除非指定，scFv可以以任何顺序（例如相对于多肽的N-末端和C-末端）具有所述的VL和VH可变区，scFv可以包括VL-接头-VH或可以包括VH-接头-VL。

“VHH结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、VHH抗体片段、VHH抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域(其在本公开中称为“VH 结构域”)以及轻链可变结构域(其在本公开中称为“VL结构域”)进行区分。VHH结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规四肽链结构抗体中的VH或VL结构域相反，在该情况下表位由VL结构域与VH结构域一起识别)。VHH结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH结构域”、“VHH”、“VHH结构域”、“VHH抗体片段”、“VHH抗体”以及“重链抗体可变区”可互换使用。“VHH结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体，也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的，也可以是经噬菌体体展示技术筛选获得的。

术语“氨基酸修饰”（或“修饰的氨基酸”）包括在多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。本文中的“氨基酸取代”或“取代”或“替代”意指用另一种氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。例如，取代 S32A 指第 32 位的丝氨酸被丙氨酸替换。

本公开的多特异性抗原结合分子还可以包括恒定区（例如 Fc）的取代或修饰，包括但不限于氨基酸残基取代、突变和/或修饰，它们产生具有以下优选的特征的化合物，这些优选的特征包括但不限于：改变的药物代谢动力学、增加的血清半衰期、增加的结合亲和力、降低的免疫原性、增加的产量、与 Fc 受体（FcR）的改变的 Fc 配体结合、增强或减弱的 ADCC 或 CDC、改变的糖基化和/或二硫键以及修饰的结合特异性。在某些方面，抗体变体包含具有一处或多处削弱 FcγR 结合的氨基酸替代(例如 Fc 区的位置 234 和 235 处的替代)的 Fc 区。在一个方面，该替代是 L234A 和 L235A。

术语“Fc”用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域，所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然 IgG 重链的 Fc 区的边界可以略微变化，但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端，例如，IgG Fc 域包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定域。除非本文中另外指定，Fc 区或恒定区中氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统，也称作 EU 索引。

术语“节-入-穴”（Knob-into-Hole）是指一种用于促进 Fc 的两条多肽链缔合的修饰，其包含在 Fc 的两个多肽链之一中的“节”（knob）修饰和在 Fc 的两个多肽链之另一中的“穴”（hole）修饰。一般地，该方法牵涉在第一多肽链的界面处引入隆起(“节”)并在第二多肽链的界面中引入相应的空腔(“穴”)，使得隆起可以置于空腔中从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽链界面的小氨基酸侧链用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来构建隆起。在第二多肽链的界面中创建具有与隆起相同或相似大小的互补性空腔，其通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换进行。

因而，在一个具体的实施方案中，在本公开的三特异性抗原结合分子的 Fc 域的第一多肽链的 CH3 域中，一个氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换，由此在第一多肽链的 CH3 域内生成隆起，其可安置于第二多肽链的 CH3 域内的空腔中，而且在 Fc 域的第二多肽链的 CH3 域中，一个氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换，由此在第二多肽链的 CH3 域内生成空腔，其中可安置第一多肽链的 CH3 域内的隆起。优选地，所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自下组：精氨酸(R)，苯丙氨酸(F)，酪氨酸(Y)，和色氨酸(W)。优选地，所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自下组：丙氨酸(A)，丝氨酸(S)，苏氨酸(T)，和缬氨酸(V)。

术语“接头”是指用于连接两个不同功能单元（例如抗原结合片段）的任何工具。接头的类型包括但不限于化学接头和多肽接头。多肽接头的序列不受限制。多肽接头优选是非免疫原性和柔性的，例如包含丝氨酸和甘氨酸序列的那些。取决于具体的构建体，接头可以长或短。

根据本公开，连接不同功能单元的接头优选包含柔性肽接头，例如甘氨酸-丝氨酸肽接头。在一个实施方案中，接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$或$(G_4S)_nA$，其中 n 是 1-10 中的任意整数选择，优选包含氨基酸序列$(G_4S)_3$或$(G_4S)_3A$。

连接 VH 和 VL 结构域以形成 VH-VL 或 VL-VH 的 scFv 结构域的接头优选包含柔性肽接头，例如甘氨酸-丝氨酸肽接头。在一个实施方案中，接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$ 或$(G_4S)_nA$，其中 n 是 1-10 中的任意整数选择，优选包含氨基酸序列$(G_4S)_3$ 或$(G_4S)$。

本文中“抗体”可在最广的意义上使用，可包括如多克隆抗体（polyclonal antibodies）、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体及灵长类化抗体、CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody）、人类抗体（包括重组产生的人类抗体）、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、抗个体基因型抗体、合成抗体（包括突变蛋白及其变体）等等。

术语“单克隆抗体”（或称“单抗”）指由单一细胞克隆产生的基本均质、仅针对某一特定抗原表位的抗体。单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种技术制备，包括杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、转基因动物、合成技术或上述技术的组合等。

需说明的是，本公开的抗体和三特异性抗原结合分子的可变区的 CDR 和 FR 的划分是根据 Kabat 定义确定的。而其他命名和编号系统，例如 Chothia、IMGT 或 AHo 等，也是本领域技术人员已知的。因此，以本公开的抗体序列为基础，包含任何命名系统衍生的一种或多种 CDR 的人源化抗体均明确地保持在本公开的范围内。

术语“人源化抗体”是指其中非人抗体(如小鼠抗体)CDR 以外的所有或部分氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应氨基酸置换的抗体。氨基酸的少量添加、缺失、插入、取代或修饰是容许的，只要它们不消除抗体结合特定抗原的能力。“人源化”抗体保持与原抗体类似的抗原特异性。

术语“嵌合抗体”是指其中可变区源自一个物种而恒定区源自另一物种的抗体，例如其中可变区源自小鼠抗体而恒定区源自人抗体的抗体。

本文所使用的“同源”和“异源”是一组相对的概念，既可以指构建体中不同要素的来源相同或不同，也可以指构建体构建完成以后，原本来源相同即“同源”的多个要素之间，有的要素进行了改造，与未进行改造的其他原要素相比发生了改变，从而变成“异源”。

术语“抗原”是指被抗体或抗体结合片段识别并特异性结合的物质，广义上，抗原可以包括所选靶标的任何免疫原性片段或决定簇，包括单表位、多表位、单结构域、多结构域、完整的胞外结构域（ECD）或蛋白质。肽、蛋白质、糖蛋白、多糖和脂质，其部分及其组合均可构成抗原。非限制性示例性抗原包括肿瘤抗原或病原体抗原等。“抗原”也可以指引发免疫反应的分子。任何形式的抗原或含有该抗原的细胞或制剂都可以用于生成对抗原决定簇具有特异性的抗体。

术语“表位”、“抗原决定簇”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象存在并且包括至少 3-15 个氨基酸。

术语“多特异性的”是指抗原结合分子能够特异性结合多个不同的抗原决定簇。术语“抗原结合分子”在其最广泛的含义上指特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合分子的实例是免疫球蛋白及其衍生物，例如片段。术语“三特异性抗原结合分子”或“三特异性结合分子”指对三种不同抗原（或表位）具有特异性的结合分子（例如抗体或包含抗体片段的分子），特别是三特异性抗体。

术语“特异性结合”是指该结合对抗原具有选择性，且可以与不想要或非特异的相互作用区分开。可以通过酶联免疫吸附测定（ELISA）或本领域技术人员熟悉的其他技术来测定抗体结合特异性抗原决定簇的能力，

以本公开中的可变区制作抗体、结合分子、双特异性结合分子或多特异性结合分子时，恒定区没有特别限定，可以使用本领域技术人员公知的恒定区或者自行获得的恒定区，还可以在恒定区部分导入氨基酸突变（例如提高或降低与 Fc 与受体或 FcRn 的结合的突变）。

获得本公开的结合分子、抗原结合片段、抗体、双特异性结合分子或多特异性结合分子的方法没有特别限制，可通过任意方法获得。发明的结合分子、抗原结合片段、抗体、双特异性结合分子或多特异性结合分子可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。

本文所用的术语“转染”是指将外源核酸引入真核细胞。转染可以通过本领域已知的各种手段来实现，包括磷酸钙-DNA 共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂质转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和生物弹道技术（biolistics）。

术语“稳定转染”或“稳转”是指将外源核酸、DNA 或 RNA 引入和整合到转染细胞的基因组中。术语“稳定转染体”（stable transfectant）是指将外来 DNA 稳定地整合到基因组 DNA 中的细胞。

术语“抗体药物偶联物”（ADC）是指已共价偶联治疗活性物质或活性药物成分（API）的抗体，从而治疗活性物质或活性药物成分（API）可以靶向至抗体的结合靶标以表现出其药理学功能。治疗活性物质或活性药物成分可以是能够杀死 ADC 靶向的细胞的细胞毒素，优选恶性或癌细胞。治疗活性物质、活性药物成分或细胞毒素的共价连接可以以非位点特异性方式利用偶联有效载荷至赖氨酸或半胱氨酸残基的标准化学接头进行，或者优选地，缀合以位点特异性方式进行，其允许完全控制缀合位点以及产生的 ADC 的药物比抗体比例。

术语“氨基酸取代”或“取代”或“替代”意指用另一种氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。

术语“亲和力”或“结合亲和力”指分子（例如抗体）的单一结合位点与其结合配偶体（例如抗原）之间全部非共价相互作用总和的强度。术语“$K_d$”是指特定的抗体-抗原相互作用的解离常数。可以使用本领域已知的各种技术来确定结合亲和力，例如表面等离子体共振、生物层干涉法、双极化干涉法、静态光散射、动态光散射、等温滴

定量热法、ELISA、分析超速离心和流式细胞术等。

术语“生物学活性”指抗体结合抗原并导致可测量的生物学反应的能力，所述生物学反应可以在体外或体内进行测量。

术语“药物组合物”是指包含一种、两种或多种活性成分的制剂或制剂的组合形式，其允许包含在其中的活性成分以生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。当“药物组合物”以含有不同的、两种以上活性成分的单独制剂的组合形式存在时，可以同时、依次、分别或间隔给药，其目的是发挥多种活性成分的生物活性，共同用于治疗疾病。

本公开的结合分子或抗原结合片段可与其他药物联合使用，活性成分可以混合在一起形成单一的给药单元，也可分别独立成为给药单元，分别使用。

术语“有效量”指本公开的抗体或片段的药物制剂的剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在治疗的患者中产生预期效果。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定：诸如人种差异；体重、年龄和健康状况；涉及的具体疾病；疾病的严重程度；个体患者的应答；施用的具体抗体；施用模式；施用制剂的生物利用率特征；选择的给药方案；和任何伴随疗法的使用。

本文所用的术语“个体”或“受试者”是指任何动物，例如哺乳动物或有袋动物。本公开的个体包括但不限于人类、非人类灵长类动物（例如食蟹猴或恒河猴或其他类型的猕猴）、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠和任何种类的家禽。

本文所用的术语“疾病”或“病症”或“紊乱”等是指任何损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的改变或失调。例如，所述的“疾病”包括但不限于：肿瘤、病原体感染、自身免疫性疾病、T 细胞功能障碍性疾病、或免疫耐受能力缺陷（如移植排斥）。

本文所用的术语“肿瘤”指的是一种以细胞或组织的病理性增生为特征的疾病，及其随后的迁移或侵袭其他组织或器官。肿瘤生长通常是不受控制的和进行性的，不诱导或抑制正常细胞增殖。

本文所用的术语“治疗”是指在试图改变个人或处理细胞引起的的疾病过程中的临床干预，既可以进行预防也可以在临床病理过程干预。治疗效果包括但不限于，防止疾病的发生或复发、减轻症状、减少任何疾病直接或间接的病理后果、防止转移、减慢疾病的进展速度、改善或缓解病情、缓解或改善预后等。

术语“G 蛋白偶联受体 C5 家族亚型 D”和“GPRC5D”特别包括人 GPRC5D 蛋白，并且包括人 GPRC5D 的变体、亚型、同源种类和与 GPRC5D (例如人 GPRC5D)具有至少一个共同表位的类似物，示例性的人 GPRC5D 序列可见，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)。

术语“BCMA”指肿瘤相关抗原 B 细胞成熟抗原，也称为 TNFRSF17，示例性的人 BCMA 序列包括登录号 UniProt Q02223 下的人 BCMA 蛋白。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本公开。应理解，这些实施例仅用于说明本公开而不用于限制本公开的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照本领域公知的常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

## 实施例 1. 人 GPRC5D、GPRC5A 及食蟹猴 GPRC5D 抗原信息

实施例中使用的人 GPRC5D（human-GPRC5D）的全长氨基酸序列（SEQ ID NO：1）(Uniprot ID：Q9NZD1)如下所示：

MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILE*SLAILGIVVTILLLLAFLFLM*RKIQDCSQWNVLPTQ*LLFLLSVLGLFGLA*
*FAFIIEL*NQQTAPVRY*FLFGVLFALCFSCLLAHASNL*VKLVRGCVS*FSWTTILCIAIGCSLLQIIIA*TEYVTLIMTRGMMF
VNMTPCQLN*VDFVVLLVYVLFLMALTFFVS*KATFCGPCENWKQHGR*LIFITVLFSIIIWVVWISMLL*RGNPQFQRQPQW
DD*PVVCIALVTNAWVFLLLYIVP*ELCILYRSCRQECPLQGNACPVTAYQHSFQVENQELSRARDSDGAEEDVALTSYG
TPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGGV

注释：该蛋白为七次跨膜蛋白，双横线部分为胞外区（1-27；85-93；145-167；226-239）；划横线部分为胞内区（49-63；115-123；189-204；261-345）；斜体部分为跨膜区（28-48；64-84；94-114；124-144；168-188；205-225；240-260）。

实施例中使用的食蟹猴 GPRC5D（cyno-GPRC5D）的全长氨基酸序列（SEQ ID NO：2）(Uniprot ID：A0A2K5W6I2)如下所示：

MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGIVLE*SLAILGIVVTILLLLAFLFLM*RKIQDCSQWNVLPTQ*LLFLLSVLGLFGLA*
*FAFIIQL*NQQTAPVRY*FLFGVLFALCFSCLLAHASNL*VKLVRGRVS*FSWTTILCIAIGCSLLQVIIA*IEYVTLIMTRGMMF
VHMTPYQLN*VDFVVLLVYVLFLMALTFFVS*KATFCGPCENWKQHGR*LIFITVLFSIIIWVVWISMLL*RGNPQFQRQPQW
DD*PVVCIALVTNAWVFLLLYIVP*ELCILYRSCRQECPSQGHACPVTAYQRSFQVENQELSRARDSDGAEEDVALTSFG
TPIQPQTVDPTQECFIPRAKLSPQQDAGV

注释：该蛋白为七次跨膜蛋白，双横线部分为胞外区（1-27；85-93；145-167；226-239）；划横线部分为胞内区（49-63；115-123；189-204；261-344）；斜体部分为跨膜区（28-48；64-84；94-114；124-144；168-188；205-225；240-260）。

实施例中使用的人 GPRC5A 的全长氨基酸序列（SEQ ID NO：36）(Uniprot ID：Q8NFJ5)如下所示：

MATTVPDGCRNGLKSKYYRLCDKAEAWGIVLET*VATAGVVTSVAFMLTLPILVC*KVQDSNRRKMLPTQ*FLFLL*
*GVLGIFGLTFAFIIGL*DGSTGPTR*FFLFGILFSICFSCLLAHAVS*LTKLVRGRKPL*SLLVILGLAVGFSLVQDVIAI*EYIVLT
MNRTNVNVFSFLSAPRRNED*FVLLLTYVLFLMALTFLMSSF*TFCGSFTGWKRHGAH*IYLTMLLSIAIWVAWITLLML*PD
FDRRWDDTILSS*ALAANGWVFLLAYVSPEFWLL*TKQRNPMDYPVEDAFCKPQLVKKSYGVENRAYSQEEITQGFEET
GDTLYAPYSTHFQLQNQPPQKEFSIPRAHAWPSPYKDYEVKKEGS

注释：该蛋白为七次跨膜蛋白，双横线部分为胞外区（1-33；90-97；151-176；234-247）；划横线部分为胞内

区（55-68；119-129；198-212；269-357）；斜体部分为跨膜区（34-54；69-89；98-118；130-150；177-197；213-233；248-268）。

## 实施例 2. 表达人 GPRC5D、人 GPRC5A 及食蟹猴 GPRC5D 细胞系的制备

将编码 SEQ ID NO.1 所示的人 GPRC5D 氨基酸的核苷酸序列，克隆至 pCMV3（SinoBiological，货号 CV011）载体中，从而获得用于人 GPRC5D 细胞系构建的质粒。将所获得的质粒转染至 CHOK1 细胞（ATCC，货号 CCL-61）中，获得表达人 GPRC5D 的 CHOK1 细胞系（简称：人 GPRC5D-CHOK1 细胞系）。

将编码 SEQ ID NO.2 所示的食蟹猴 GPRC5D 氨基酸的核苷酸序列，克隆至 pCMV3 载体中，获得用于食蟹猴 GPRC5D 细胞系构建的质粒。将所获得的质粒转染至 CHOK1 细胞中，获得表达食蟹猴 GPRC5D 的 CHOK1 细胞系（简称：食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞系）。

将编码 SEQ ID NO.36 所示的人 GPRC5A 氨基酸的核苷酸序列，克隆至 pCMV3 载体中，获得用于人 GPRC5A 细胞系构建的载体。将所获得的载体转染至 CHOK1 细胞中，获得表达人 GPRC5A 的 CHOK1 细胞系（简称：人 GPRC5A-CHOK1 细胞系）。

使用 FACS 测定方法，检测上述获得的人 GPRC5D-CHOK1 细胞系中人 GPRC5D 的表达情况，并在实验中设立阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802）。

使用 FACS 测定方法，检测上述获得的食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞系中食蟹猴 GPRC5D 的表达情况，并在实验中设立阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802）。

使用 FACS 测定方法，检测上述获得的人 GPRC5A-CHOK1 细胞系中人 GPRC5A 的表达情况，并在实验中设立阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802）。

结果显示：

人 GPRC5D-CHOK1 细胞系中人 GPRC5D 的表达情况如图 1A 所示，结果表明人 GPRC5D 在 CHOK1 细胞中有很好的过表达现象，可以用于后续实验验证 GPRC5D 单抗与人 GPRC5D 在细胞水平的结合情况。

食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞系中食蟹猴 GPRC5D 的表达情况如图 1B 所示，结果表明食蟹猴 GPRC5D 在 CHOK1 细胞中有很好的过表达现象，可以用于后续实验验证 GPRC5D 单抗与食蟹猴 GPRC5D 在细胞水平的结合情况。

人 GPRC5A-CHOK1 细胞系中人 GPRC5A 的表达情况如图 1C 所示，结果表明人 GPRC5A 在 CHOK1 细胞中有很好的过表达现象，可以用于后续实验验证 GPRC5D 单抗与人 GPRC5A 在细胞水平没有非特异结合现象。

## 实施例 3. 人 BCMA 及食蟹猴 BCMA 抗原信息

实施例中使用的人 BCMA（human-BCMA）的全长氨基酸序列（SEQ ID NO：3）(Uniprot ID：Q02223)如下所示。

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLM
FLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEG
ATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR

注释：该蛋白为单次跨膜蛋白，双横线部分为胞外区（1-54）；波浪线部分为跨膜区（55-77）；划横线部分为胞内区（78-184）。

实施例中使用的食蟹猴 BCMA（cyno-BCMA）的全长氨基酸序列（SEQ ID NO：4）(Uniprot ID：G7Q0I4)如下所示。

MLQMARQCSQNEYFDSLLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNAILWTCLGLSLIISLAVFVLT
FLLRKMSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKGRTGDEIVLPRGLEYTVEECTCEDCIKNKPKVDSDHCFPLPAME
EGATILVTTKTNDYCNSLSAALSVTEIEKSISAR

注释：该蛋白为单次跨膜蛋白，双横线部分为胞外区（1-53）；波浪线部分为跨膜区（54-76）；划横线部分为胞内区（77-183）。

## 实施例 4. 人 BCMA 及食蟹猴 BCMA 细胞系的制备

将编码 SEQ ID NO：3 所示的人 BCMA 氨基酸的核苷酸序列，克隆至 pCMV3（SinoBiological，货号 CV011）载体中，从而获得用于人 BCMA 细胞系构建的载体。将所获得的载体转染至 CHOK1 细胞（ATCC，货号 CCL-61）中，获得表达人 BCMA 的 CHOK1 细胞系（简称：人 BCMA-CHOK1 细胞系）。

将编码 SEQ ID NO：4 所示的食蟹猴 BCMA 氨基酸的核苷酸序列，克隆至 pCDH-CMV-MCS-EF1-Hygro（Honorgene，货号 CD515B-1）载体中，获得用于食蟹猴 BCMA 细胞系构建的载体。将所获得的载体构建成病毒后转染至 CHOK1 细胞中，获得表达食蟹猴 BCMA 的 CHOK1 细胞系（简称：食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞系）。

使用 FACS 测定方法，检测上述获得的人 BCMA-CHOK1 细胞系中人 BCMA 的表达情况，并在实验中设立阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802）。

使用 FACS 测定方法，检测上述获得的食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞系中食蟹猴 BCMA 的表达情况，并在实验中设立阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802）。

结果显示：

人 BCMA-CHOK1 细胞系中人 BCMA 的表达情况如图 2A 所示，结果表明人 BCMA 在 CHOK1 细胞中有很好的过表达现象，可以用于后续实验验证 BCMA 单抗与人 BCMA 在细胞水平的结合情况。

食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞系中食蟹猴 BCMA 的表达情况如图 2B 所示，结果表明食蟹猴 BCMA 在 CHOK1 细胞中有很好的过表达现象，可以用于后续实验验证 BCMA 单抗与食蟹猴 BCMA 在细胞水平的结合情况。

## 实施例 5. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的设计及序列

通过杂交瘤筛选获得抗 BCMA 全长抗体（BCMA mAb），其重链序列如 SEQ ID NO:9 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:7 所示。

通过羊驼免疫，筛选获得抗 GPRC5D 纳米抗体，（GPRC5D VHH），其可变区序列如 SEQ ID NO:10 所示。

CD3ε 结合结构域来自于全长抗体 CD3 mAb，其重链序列如 SEQ ID NO:11 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:12 所示。将 CD3 mAb 的重链可变区和轻链可变区经由柔性接头连接形成单链抗体 scFv，其结构为：VH-（$G_4S$）$_3$-VL，序列如 SEQ ID NO:13 所示。所述 scFv 再通过柔性连接头融合到 BCMA 全长抗体 Fab 段重链的 C 末端。

将 CD3 scFv 融合至 BCMA 的 Fab 重链 CH1 的 C 末端形成三特异性抗体的一条臂，同时引入包含另一完整的 GPRC5D 纳米抗体结合结构域以及带有“节”“穴”结构的 Fc 部分，所形成的三特异性抗体被命名为三抗 1，融合后的三条异源的肽链的序列如 SEQ ID NO:5，SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:7 所示，示意图见图 3。

将 CD3 scFv 融合至 BCMA 全长抗体 Fab 段重链的 C 末端形成抗体的一条臂，且 GPRC5D 纳米抗体融合至 BCMA 全长抗体另一 Fab 段重链的 C 末端形成抗体的另一条臂，同时包含带有“节”“穴”结构的 Fc 部分，所形成的三特异性抗体被命名为三抗 2，融合后的链的序列如 SEQ ID NO:5，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8 所示，示意图见图 3。

为降低抗体的 ADCC 活性，最终构建的三特异性抗体的 Fc 段均已进行了 L234A、L235A 和 G237A 的氨基酸取代。含有 scFv 的肽链中的 Fc 结构域被设计为“节”（knob）结构，包括 S354C 和 T366W 两个位点的氨基酸取代。不含有 scFv 的肽链中的 Fc 结构域被设计为“穴”（hole）结构，包括 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V 四个位点的氨基酸取代。以及，为便于三特异性抗体的纯化，“穴”结构的重链还要进行 H435R 的取代。

三抗 1 和三抗 2 的结构以及相关的分子序列分别总结于表 1 和表 2。

表 1 三特异性抗体的结构描述

| 名称 | 分子结构描述 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| 三抗 1 | BCMA VH - BCMA CH1 - $G_4S$ - CD3VH - $(G_4S)_3$ - CD3VL –EPKSS- IgG1 Fc(knob) | 5 |
| | GPRC5D VHH –EPKSS- IgG1 Fc (hole) | 6 |
| | BCMA VL - BCMA CL（即 BCMA LC） | 7 |
| 三抗 2 | BCMA VH - BCMA CH1 - $G_4S$ - CD3VH - $(G_4S)_3$ - CD3VL - IgG1 Fc(knob) | 5 |
| | BCMA VH - BCMA CH1 - $G_4S$ - GPRC5D VHH-EPKSS - IgG1 Fc (hole) | 8 |
| | BCMA VL - BCMA CL（即 BCMA LC）×2 | 7 |
| BCMA mAb | BCMA HC | 9 |
| | BCMA LC | 7 |
| GPRC5D | GPRC5D VHH | 10 |

| | | |
|---|---|---|
| VHH | | |
| CD3 mAb | CD3 HC | 11 |
| | CD3 LC | 12 |
| CD3 scFv | CD3VH - $(G_4S)_3$ - CD3VL | 13 |

表 2 三特异性抗体的氨基酸序列

| 名称 | SEQ ID NO: | 氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 三抗 1 的“节”结构重链 | 5 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGL<br>EWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSE<br>DTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGG<br>GGSEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP<br>GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQM<br>NNLRTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGG<br>GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSN<br>YANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL<br>SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCP<br>PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ<br>VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 三抗 1 的“穴”结构重链 | 6 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGLFFASSDMSWFRQAPGKG<br>RELVAEITSVGNNIKYADSVEGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAED<br>TAVYYCSARRRVRYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 三抗 1 的轻链 | 7 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGVSHMHWYQQKPGKAPKR<br>WIYDTSKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWS<br>RNPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN<br>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK<br>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 三抗 2 的“节”结构重链 | 5 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGL<br>EWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSE<br>DTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGG<br>GGSEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP<br>GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQM<br>NNLRTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | GSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSN<br>YANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL<br>SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCP<br>PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ<br>VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 三抗 2 的“穴”结构重链 | 8 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGL<br>EWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSE<br>DTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGG<br>GGSQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGLFFASSDMSWFRQAP<br>GKGRELVAEITSVGNNIKYADSVEGRFTISRDNSKNTVYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCSARRRVRYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPA<br>PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL<br>SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT<br>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK |
| 三抗 2 的轻链 | 7 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGVSHMHWYQQKPGKAPKR<br>WIYDTSKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWS<br>RNPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN<br>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK<br>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| BCMA 重链 | 9 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGL<br>EWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSE<br>DTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS<br>FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| BCMA 轻链 | 7 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGVSHMHWYQQKPGKAPKR<br>WIYDTSKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWS<br>RNPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN<br>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK<br>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| BCMA 重链可变区 VH | 14 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGL<br>EWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSE<br>DTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSS |
| BCMA 轻链可变区 VL | 15 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGVSHMHWYQQKPGKAPKR |

| | | |
|---|---|---|
| | | WIYDTSKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWS RNPWTFGQGTKVEIK |
| BCMA 重链 HCDR1 | 16 | SSYIS |
| BCMA 重链 HCDR2 | 17 | WIYAGSGNADYNQKFTG |
| BCMA 重链 HCDR3 | 18 | HYDPPHYFDY |
| BCMA 轻链 LCDR1 | 19 | SASSGVSHMH |
| BCMA 轻链 LCDR2 | 20 | DTSKLTS |
| BCMA 轻链 LCDR3 | 21 | QQWSRNPWT |
| GPRC5D 重链可变区 VHH | 10 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGLFFASSDMSWFRQAPGKG RELVAEITSVGNNIKYADSVEGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCSARRRVRYWGQGTLVTVSS |
| GPRC5D 重链 HCDR1 | 22 | SSDMS |
| GPRC5D 重链 HCDR2 | 23 | EITSVGNNIKYADSVEG |
| GPRC5D 重链 HCDR3 | 24 | RRRVRY |
| CD3 重链 | 11 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMNNL RTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| CD3 轻链 | 12 | QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQ APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC |
| CD3 重链可变区 VH | 25 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMNNL RTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS |
| CD3 轻链可变区 VL | 26 | QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQ APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVL |
| CD3 的 scFv | 13 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMNNL RTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL |
| CD3 重链 HCDR1 | 27 | TYAMN |
| CD3 重链 HCDR1 | 28 | RIRSKYNNYATYYADSVKD |

| | | |
|---|---|---|
| CD3 重链 HCDR1 | 29 | HGNFGNSYVSWFAY |
| CD3 轻链 LCDR1 | 30 | RSSTGAVTTSNYAN |
| CD3 轻链 LCDR2 | 31 | GTNKRAP |
| CD3 轻链 LCDR3 | 32 | ALWYSNLWV |
| 第一 Fc 结构域序列 | 33 | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| 第二 Fc 结构域序列 | 34 | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP GK |
| BCMA Fab 段重链 | 35 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGL EWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV |

**实施例 6. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的构建及其在真核细胞中的瞬时转染表达**

将前述三特异性抗体的编码基因片段分别克隆到PTT5表达载体中，制备转染级别的表达质粒。

在无血清培养基中培养Expi293F™细胞（Thermo Fisher Scientific），将细胞接种在摇瓶（Corning Inc.）中，并在37℃，8% $CO_2$的环境中置于摇床上培养。调整细胞密度，将含有目的基因片段的重组表达载体和PEI转染试剂按照合适的比例混合，并添加进细胞培养摇瓶中，细胞培养6天后收集表达上清，高速离心去除细胞碎片，用Protein A柱进行亲和纯化。用PBS冲洗柱子，至A280读数降至基线。用pH3.0-pH3.5的酸性洗脱液洗脱目的蛋白，用1M Tris-HCl，pH8.0-9.0中和。洗脱样品适当浓缩后，利用PBS平衡好的凝胶层析Superdex200（GE）进一步纯化，以去除聚体，收集单体峰，换液到PBS分装备用。对最终纯化的抗体进行SDS-PAGE及HPLC纯度分析和A280浓度测定。

同时，还表达纯化了Janssen的GPRC5DxCD3双特异性抗体Talquetamab（来源于专利WO2018017786A2，由序列SEQ ID NO: 25, 26, 55,58组成，包含一个GPRC5D结合位点和一个CD3结合位点）。

同时，还表达纯化了Janssen的BCMAxCD3双特异性抗体Teclistamab（来源于专利WO2019220368A1，由序列SEQ ID NO: 31, 32, 41,42组成，包含一个BCMA结合位点和一个CD3结合位点）。

同时，还表达纯化了Janssen的BGCB491三特异性抗体（来源于专利WO2022175255A2，由序列SEQ ID NO: 29, 30, 31组成，包含一个GPRC5D结合位点，一个BCMA结合位点和一个CD3结合位点）。

同时，还表达纯化了信达的TS-F2-5三特异性抗体（来源于专利WO2022174813A1，由序列SEQ ID NO: 68，75，

76，78组成，包含一个GPRC5D结合位点，一个BCMA结合位点和一个CD3结合位点）。

**实施例 7. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的细胞水平亲和力测试**

使用 FACS 检测抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体与表达 human GPRC5D 和 human BCMA 双靶点的 NCI-H929 细胞和 RPMI8226 细胞、表达 human GPRC5D 的人 GPRC5D-CHOK1 细胞，表达 human BCMA 的人 BCMA-CHOK1 细胞，天然表达 hCD3 的 T 淋巴细胞（Jurkat）和 Human PBMC 的结合情况。

培养 NCI-H929 细胞（ATCC，货号 CRL-9068），RPMI8226 细胞（ATCC，货号 CCL-155），Human GPRC5D-CHOK1 细胞（实施例 2），Human BCMA-CHOK1 细胞（实施例 4）和 Jurkat 细胞（ATCC，货号 TIB-152）。NCI-H929 细胞的培养基为 RPMI1640+10%FBS+0.05mM mercaptoethanol，RPMI8226 和 Jurkat 细胞的培养基为 RPMI1640+10%FBS，Human GPRC5D-CHOK1 和 Human BCMA-CHOK1 细胞的培养基为 F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，将 NCI-H929 细胞、RPMI8226 细胞和 Jurkat 细胞分别直接放入 50mL 离心管中，无需消化。将 Human GPRC5D-CHOK1 和 Human BCMA-CHOK1 用 0.25% Trpsin-EDTA 的胰酶消化，F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B 终止消化。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 1%BSA（in PBS）重悬细胞。将购买的 Human PBMC 以 1500rpm 转速常温离心 10 分钟，弃上清，用 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning，货号 3799）中，100μL/孔。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，4℃放置备用。用 1% BSA（in PBS）稀释待测抗体及阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802），起始浓度为 100nM，5 倍往下稀释 8 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 1 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。160μL 1% BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。用 1% BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1% BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。100μL 1% BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI）。

待测分子与肿瘤抗原细胞结合的结果如图 4A-4H 以及表 3 和表 4 所示。在双靶点表达的肿瘤细胞系 NCI-H929 和 RPMI8226 上，三抗的结合强于单一靶点双抗，且与肿瘤抗原的表达量正相关（NCI-H929 细胞双靶点表达均高于 RPMI8226 细胞）。在单靶点表达的细胞系上，三抗的结合弱于或略强于相应双抗。推测该结果可

能由双靶点的协同结合引起。另在双靶点表达的肿瘤细胞系上，三抗 1 的结合强于强生 BGCB491 和信达 TS-F2-5 分子。

待测分子与 Jurkat 细胞及 human PBMC 细胞结合的结果如图 5A-5C，表 5 和表 6 所示。在 Jurkat 细胞上的结合，三抗弱于 Teclistamab，与强生 BGCB491 和信达 TS-F2-5 分子相当。

表 3 三特异性抗体与表达肿瘤抗原细胞结合的结果

| | NCI-H929 | | RPMI8226 | | Human BCMA CHOK1 | | Human GPRC5D CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 分子 | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | 2.43 | 669 | 1.17 | 169 | 2.63 | 2277 | / | 160 |
| 三抗 1 | 3.53 | 1011 | 53.51 | 334 | 4.25 | 2191 | 2.32 | 10900 |
| 三抗 2 | 2.47 | 1233 | 199.9 | 332 | 1.14 | 2231 | 1.33 | 5670 |
| hIgG1 LALA isotype | / | 104 | / | 112 | / | 119 | / | 100 |

表 4 三特异性抗体与表达肿瘤抗原细胞结合的结果

| | NCI-H929 | | RPMI8226 | | Human GPRC5D CHOK1 | | Human BCMA CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 分子 | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI |
| 三抗 1 | 3.27 | 1314 | 1.34 | 959 | 0.26 | 19800 | 52.56 | 1855 |
| BGCB491 | 1.79 | 473 | 1.12 | 608 | 2.09 | 16200 | 2.84 | 2559 |
| TS-F2-5 | 44.95 | 737 | 8.29 | 896 | 2.08 | 24400 | 12.61 | 3592 |

表 5 三特异性抗体与 Jurkat 细胞及 human PBMC 细胞结合的结果

| | Jurkat | | Huamn PBMC | |
|---|---|---|---|---|
| 分子 | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | 3.216 | 825 | 6.056 | 672 |
| 三抗 1 | 11.44 | 1238 | 10.07 | 449 |
| 三抗 2 | 21.18 | 862 | / | 231 |
| hIgG1 LALA isotype | / | 77.6 | / | 96.1 |

表 6 三特异性抗体与 Jurkat 细胞结合的结果

| | Jurkat | |
|---|---|---|
| 分子 | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI |

| | | |
|---|---|---|
| 三抗 1 | / | 13300 |
| BGCB491 | / | 9516 |
| TS-F2-5 | / | 7438 |
| hIgG1 LALA isotype | / | / |

**实施例 8. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的种属交叉活性测试**

使用 FACS 检测抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体与表达 Cyno GPRC5D 的食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞，表达 Cyno BCMA 的食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞，天然表达 Cyno CD3 的 Cyno PBMC 的结合情况。

培养食蟹猴 GPRC5D-CHOK1（实施例 2）和食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞（实施例 4），培养基为 F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，将食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 和食蟹猴 BCMA-CHOK1 用 0.25% Trpsin-EDTA 的胰酶消化，F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B 终止消化。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 1%BSA（in PBS）重悬细胞。将购买的 Cyno PBMC 以 1500rpm 转速常温离心 10 分钟，弃上清，用 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning，货号 3799）中，100μL/孔。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，4℃放置备用。用 1% BSA（in PBS）稀释待测抗体及阴性对照 hIgG1 LALA isotype（百英生物，货号 B109802），起始浓度为 100nM，5 倍往下稀释 8 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 1 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。160μL 1% BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。用 1% BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1% BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。100μL 1% BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI）。

待测分子与食蟹猴相应肿瘤抗原细胞结合的结果如图 6A-6B 和表 7 所示。三抗分子与食蟹猴相应肿瘤抗原有很好的的结合。

待测分子与食蟹猴 PBMC 细胞结合的结果如图 7 和表 8 所示。三抗分子与食蟹猴 PBMC 有很好的的结合。

表 7 三特异性抗体与表达食蟹猴肿瘤抗原细胞结合的结果

| | cyno BCMA CHOK1 | | cyno GPRC5D CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|
| 分子 | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | 15.34 | 1767 | / | / |
| 三抗 1 | 12.49 | 8413 | 4.59 | 13400 |
| 三抗 2 | 4.13 | 9160 | / | 11100 |
| hIgG1 LALA isotype | / | / | / | / |

表 8 三特异性抗体与 cyno PBMC 细胞结合的结果

| | cyno PBMC | |
|---|---|---|
| 分子 | $EC_{50}$ (nM) | Top MFI |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | 55.82 | 2059 |
| 三抗 1 | 117.8 | 1352 |
| 三抗 2 | 184.5 | 568 |
| hIgG1 LALA isotype | / | 93.3 |

**实施例 9. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的体外重组蛋白结合亲和力和动力学**

为测定与人源 CD3（购自 Acro，货号 CDD-H52W1）/食蟹猴源 CD3（购自 Acro，货号 CDD-C52W4）的亲和力与动力学性质，采用 CM5 芯片直接固化人源/食蟹猴源 CD3 分子的方法。CM5 芯片先用 EDC 和 NHS 活化，人源/食蟹猴源 CD3 分子用 pH=5 的醋酸盐溶液稀释至 1μg/mL，以 10μL/min 的流速固化 60s，再用乙醇胺封闭抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体分子用 HBS-EP+（10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20）缓冲液两倍比稀释至系列浓度（100nM-0.39nM），以 50μL/min 的流速结合 90s，解离 360s。

每一轮实验结束后，使用 3M $MgCl_2$ 溶液冲洗，以 30μL/min 的流速冲洗 30s，将抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体分子去除，完成芯片的再生。原始数据使用 Biacore Insight Evaluation Software（3.0.12.15655）软件进行分析，以(1∶1) Langmuir 模型进行拟合，得到的三特异性抗体亲和力和动力学实验数据如表 9 所示。

表 9 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体与人/食蟹猴 CD3 蛋白的结合亲和力和动力学

| 分子 | 抗原 | 结合速率 $k_a$(1/M*s) | 解离速率 $k_d$ (1/s) | 亲和力 $K_D$(M) |
|---|---|---|---|---|
| Talquetamab analogue (GPRC5D/CD3) | 人源 CD3 | 1.12E+05 | 2.01E-03 | 1.80E-08 |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | | 2.48E+05 | 5.22E-03 | 2.10E-08 |
| 三抗 1 | | 1.81E+05 | 3.95E-03 | 2.18E-08 |
| 三抗 2 | | 2.12E+05 | 4.28E-03 | 2.02E-08 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Talquetamab analogue (GPRC5D/CD3) | 食蟹猴源 CD3 | 1.70E+05 | 3.79E-03 | 2.22E-08 |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | | 1.59E+05 | 3.36E-03 | 2.11E-08 |
| 三抗 1 | | 1.57E+05 | 3.29E-03 | 2.10E-08 |
| 三抗 2 | | 1.49E+05 | 2.90E-03 | 1.95E-08 |

实验结果显示，两个三抗分子对人源/食蟹猴源 CD3 均有结合，且亲和力相当。

为测定与人源 BCMA（购自 Acro，货号 BCA-H522y）/食蟹猴源 BCMA（购自 Acro，货号 BCA-C52H7）的亲和力与动力学性质，采用 CM5 芯片，使用间接捕获法检测抗体分子和人源/食蟹猴源 BCMA 的亲和力和动力学性质。CM5 芯片先用 EDC 和 NHS 活化，Anti-human IgG(Fc)抗体(购自 cytiva，货号 10325009)用 pH=5 的 10mM 醋酸钠溶液稀释至 10μg/mL，以 5μL/min 的流速固化 420 s，再用乙醇胺封闭。抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体分子用 HBS-EP+（10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20）缓冲液稀释至 4μg/mL，以 10μL/min 的流速捕获 60 s。人源/食蟹猴源 BCMA 用 HBS-EP+（10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20）缓冲液两倍比稀释至系列浓度（50nM-0.195nM），以 30μL/min 的流速结合 90s，解离 180s。

每一轮实验结束后，使用 3M $MgCl_2$ 溶液冲洗，以 30μL/min 的流速冲洗 30s，将抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体分子去除，完成芯片的再生。原始数据使用 Biacore Insight Evaluation Software（3.0.12.15655）软件进行分析，以(1：1) Langmuir 模型进行拟合，得到的三特异性抗体亲和力和动力学实验数据如表 10 所示。

表 10 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体与人/食蟹猴 BCMA 蛋白的结合亲和力和动力学

| 分子 | 抗原 | 结合速率 $k_a$(1/M*s) | 解离速率 $k_d$ (1/s) | 亲和力 $K_D$(M) |
|---|---|---|---|---|
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | 人源 BCMA | 3.55E+06 | 1.35E-03 | 3.79E-10 |
| 三抗 1 | | 2.17E+06 | 5.01E-03 | 2.31E-09 |
| 三抗 2 | | 2.08E+06 | 5.17E-03 | 2.48E-09 |
| Teclistamab analogue (BCMA/CD3) | 食蟹猴源 BCMA | 2.77E+06 | 2.35E-02 | 8.49E-09 |
| 三抗 1 | | 1.23E+06 | 5.08E-03 | 4.14E-09 |
| 三抗 2 | | 1.26E+06 | 5.43E-03 | 4.30E-09 |

实验结果显示，两个三抗分子对人源/食蟹猴源 BCMA 均有结合，且亲和力相当。

**实施例 10. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的体外功能实验**

A. T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 NCI-H929

培养 NCI-H929 细胞（ATCC，货号 CRL-9068），培养基为 RPMI1640+10%FBS+0.05mM mercaptoethanol，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5% $CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，将 NCI-H929 细胞直接放入 50mL 离心管中，无

需消化。1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将细胞密度调整到 1E5/mL。

将靶细胞铺到平底 96 孔板（corning，货号 3599）中，100μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养过夜。用 T 细胞阴选试剂盒（StemCell，货号 17951）从新鲜 PBMC 中分选 CD3+T 细胞，计数细胞并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 2E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 100nM，14 倍往下稀释 10 个浓度。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养 24 小时。将培养板 1000rpm 转速离心 5 分钟，吸取上清 50μL 置另一平底 96 孔板中，每孔加入 LDH 检测试剂（Romos，货号 4744934001）50μL 混匀，1000rpm 转速离心 5 分钟后避光孵育 10 分钟，Envision 上读取 OD492 值。

TDCC 效应引起的细胞杀伤百分比采用以下公式进行计算：

细胞杀伤%= [样品孔-T 细胞自发释放-靶细胞自发释放）/(靶细胞最大裂解-靶细胞自发释放)]*100%。

将细胞杀伤数据导入 GraphPad Prism，绘制细胞杀伤/浓度曲线，计算 EC50 值。结果如表 11 及图 8A 所示。三抗 1 分子对 NCI-H929 细胞杀伤能力强于 BGCB491 及 TS-F2-5。

B. T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 RPMI8226

培养 RPMI8226 细胞（ATCC，货号 CCL-155），培养基为 RPMI1640+10%FBS，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，将 RPMI8226 细胞直接放入 50mL 离心管中，无需消化。1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将细胞密度调整到 1E5/mL。

将靶细胞铺到平底 96 孔板（corning，货号 3599）中，100μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养过夜。用 T 细胞阴选试剂盒（StemCell，货号 17951）从新鲜 PBMC 中分选 CD3+T 细胞，计数细胞并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 2E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 100nM，14 倍往下稀释 10 个浓度。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养 24 小时。将培养板 1000rpm 转速离心 5 分钟，吸取上清 50μL 置另一平底 96 孔板中，每孔加入 LDH 检测试剂（Romos，货号 4744934001）50μL 混匀，1000rpm 转速离心 5 分钟后避光孵育 10 分钟，Envision 上读取 OD492 值。

TDCC 效应引起的细胞杀伤百分比采用以下公式进行计算：

细胞杀伤%= [样品孔-T 细胞自发释放-靶细胞自发释放）/(靶细胞最大裂解-靶细胞自发释放)]*100%。

将细胞杀伤数据导入 GraphPad Prism，绘制细胞杀伤/浓度曲线，计算 EC50 值。结果如表 11 及图 8B 所示。三抗 1 分子对 RPMI8226 细胞杀伤能力强于 BGCB491 及 TS-F2-5。

C. T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 human BCMA-CHOK1

培养 Human BCMA-CHOK1（实施例 4），培养基为 F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，用 0.25% Trpsin-EDTA 的胰酶消化 Human BCMA-CHOK1，F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B 培养基终止消化。1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将细胞密度调整到 1E5/mL。

将靶细胞铺到平底 96 孔板（corning，货号 3599）中，100μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养过夜。用 T 细胞阴选试剂盒（StemCell，货号 17951）从新鲜 PBMC 中分选 CD3+T 细胞，计数细胞并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 2E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 400nM，10 倍往下稀释。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，故起始终浓度为 100 nM。37℃ 5%$CO_2$ 培养 24 小时。将培养板 1000rpm 转速离心 5 分钟，吸取上清 50μL 置另一平底 96 孔板中，每孔加入 LDH 检测试剂（Romos，货号 4744934001）50μL 混匀，1000rpm 转速离心 5 分钟后避光孵育 10 分钟，Envision 上读取 OD492 值。

TDCC 效应引起的细胞杀伤百分比采用以下公式进行计算：

细胞杀伤%= [样品孔-T 细胞自发释放-靶细胞自发释放）/(靶细胞最大裂解-靶细胞自发释放)]*100%。

将细胞杀伤数据导入 GraphPad Prism，绘制细胞杀伤/浓度曲线，计算 EC50 值。结果如表 11 及图 8C 所示。三抗 1 分子对 Human BCMA-CHOK1 细胞杀伤能力与 BGCB491 相当，强于 TS-F2-5。

D. T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 human GPRC5D-CHOK1

培养 Human GPRC5D-CHOK1（实施例 2），培养基为 F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，用 0.25% Trpsin-EDTA 的胰酶消化 Human BCMA-CHOK1，F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B 培养基终止消化。1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将细胞密度调整到 1E5/mL。

将靶细胞铺到平底 96 孔板（corning，货号 3599）中，100μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养过夜。用 T 细胞阴选试剂盒（StemCell，货号 17951）从新鲜 PBMC 中分选 CD3+T 细胞，计数细胞并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 2E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 100nM，5 倍往下稀释 8 个浓度。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养 24 小时。将培养板 1000rpm 转速离心 5 分钟，吸取上清 50μL 置另一平底 96 孔板中，每孔加入 LDH 检测试剂（Romos，货号 4744934001）50μL 混匀，1000rpm 转速离心 5 分钟后避光孵育 10 分钟，Envision 上读取 OD492 值。

TDCC 效应引起的细胞杀伤百分比采用以下公式进行计算：

细胞杀伤%= [样品孔-T 细胞自发释放-靶细胞自发释放）/(靶细胞最大裂解-靶细胞自发释放)]*100%。

将细胞杀伤数据导入 GraphPad Prism，绘制细胞杀伤/浓度曲线，计算 EC50 值。结果如表 11 及图 8D 所示。三抗 1 分子对 Human GPRC5D-CHOK1 细胞杀伤能力与 TS-F2-5 相当，强于 BGCB491。

E. T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 human BCMA-CHOK1 和 human GPRC5D-CHOK1 混合体系

培养 Human GPRC5D-CHOK1 和 Human BCMA-CHOK1 细胞，培养基为 F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B，使用 T75 细胞培养瓶置于 37°C 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，用 0.25% Trpsin-EDTA 的胰酶消化 Human GPRC5D-CHOK1 和 Human BCMA-CHOK1，F12K+10%FBS+400 μg/ml Hygromycin B 培养基终止消化。1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将两种细胞密度调整到 1E5/mL，将两种细胞等比混合。

将靶细胞混合物铺到平底 96 孔板（corning，货号 3599）中，100μL/孔，37°C 5%$CO_2$ 培养过夜。用 T 细胞阴选试剂盒（StemCell，货号 17951）从新鲜 PBMC 中分选 CD3+T 细胞，计数细胞并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 1.6E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37°C 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 100nM，14 倍往下稀释 10 个浓度。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，37°C 5%$CO_2$ 培养 24 小时。将培养板 1000rpm 转速离心 5 分钟，吸取上清 50μL 置另一平底 96 孔板中，每孔加入 LDH 检测试剂（Romos，货号 4744934001）50μL 混匀，1000rpm 转速离心 5 分钟后避光孵育 10 分钟，Envision 上读取 OD492 值。

TDCC 效应引起的细胞杀伤百分比采用以下公式进行计算：

细胞杀伤%= [样品孔-T 细胞自发释放-靶细胞自发释放）/(靶细胞最大裂解-靶细胞自发释放)]*100%。

将细胞杀伤数据导入 GraphPad Prism，绘制细胞杀伤/浓度曲线，计算 EC50 值。结果如表 11 及图 8E 所示。三抗 1 分子对混合细胞体系的杀伤能力强于 BGCB491 和 TS-F2-5。

表 11 T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 NCI-H929，RPMI8226，人 BCMA-CHOK1，人 GPRC5D-CHOK1，人 BCMA-CHOK1 与人 GPRC5D-CHOK1 混合细胞体系

| 分子 | NCI-H929 | | RPMI8226 | | BCMA-CHOK1 | | GPRC5D-CHOK1 | | BCMA-CHOK1 + GPRC5D-CHOK1 混合体系 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) |
| 三抗 1 | 0.0002 | 49.321 | 0.010 | 42.720 | 0.316 | 22.348 | 0.003 | 40.369 | 0.005 | 18.800 |
| BGCB491 | 0.005 | 45.098 | 0.101 | 34.961 | 0.192 | 24.621 | 0.015 | 30.905 | 0.163 | 10.759 |
| TS-F2-5 | 0.035 | 43.137 | 0.017 | 34.089 | 2.267 | 13.384 | 0.005 | 37.605 | 0.091 | 14.270 |

F. T 细胞介导的细胞毒性实验（TDCC），靶细胞为 NCI-H929，2500ng/ml soluble BCMA 存在情况下

培养 NCI-H929 细胞（ATCC，货号 CRL-9068），培养基为 RPMI1640+10%FBS+0.05mM mercaptoethanol，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5% $CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，将 NCI-H929 细胞直接放入 50mL 离心管中，无需消化。1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将细胞密度调整到 1E5/mL。往细胞悬液中加入 soluble BCMA，使其浓度为 2500 ng/ml。

将含 soluble BCMA 的靶细胞铺到平底 96 孔板（corning，货号 3599）中，100μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养过夜。用 T 细胞阴选试剂盒（StemCell，货号 17951）从新鲜 PBMC 中分选 CD3+T 细胞，计数细胞并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 2E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 100nM，14 倍往下稀释。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，故起始终浓度为 100 nM。37℃ 5%$CO_2$ 培养 24 小时。将培养板 1000rpm 转速离心 5 分钟，吸取上清 50μL 置另一平底 96 孔板中，每孔加入 LDH 检测试剂（Romos，货号 4744934001）50μL 混匀，1000rpm 转速离心 5 分钟后避光孵育 10 分钟，Envision 上读取 OD492 值。

TDCC 效应引起的细胞杀伤百分比采用以下公式进行计算：

细胞杀伤%= [样品孔-T 细胞自发释放-靶细胞自发释放）/(靶细胞最大裂解-靶细胞自发释放)]*100%。

将细胞杀伤数据导入 GraphPad Prism，绘制细胞杀伤/浓度曲线，计算 EC50 值。结果如图 9（虚线表示 2500ng/ml 的 soluble BCMA 条件）和表 12 所示。在 2500ng/ml 的 soluble BCMA 存在下，BGCB491 杀伤 EC50 值减弱约 23 倍，TS-F2-5 杀伤 EC50 值基本维持，三抗 1 杀伤 EC50 值减弱约 3 倍。（BCMA 双抗 Teclistamab 杀伤 EC50 值减弱约 25 倍）

表 12 在 2500ng/ml 的 soluble BCMA 存在下，T 细胞介导的细胞毒性实验

| 分子 | 0 ug/ml BCMA | | 2.5 ug/ml BCMA | | Ratio (EC50) |
|---|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) | $EC_{50}$ (nM) | Cytotoxicity (max) | |
| 三抗 1 | 0.0002 | 49.95 | 0.0007 | 58.61 | ~3 |
| BGCB491 | 0.007 | 44.25 | 0.16 | 50.05 | ~23 |
| TS-F2-5 | 0.031 | 41.62 | 0.03 | 50.75 | ~1 |
| Teclistamab (BCMA/CD3) | 0.115 | 40.86 | 2.36 | 53.85 | ~21 |
| hIgG1 LALA isotype | / | / | / | / | / |

G. 三特异性抗体与 PBMC 及肿瘤细胞 NCI-H929 细胞共孵育条件下，IL6 释放水平

培养 NCI-H929 细胞（ATCC，货号 CRL-9068），培养基为 RPMI1640+10%FBS+0.05mM mercaptoethanol，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待细胞使用时，将 NCI-H929 细胞直接放入 50mL 离心管中，无

需消化，1000rpm 转速离心 5 分钟，弃上清，使用 RPMI1640+2%FBS 培养基重悬并计数细胞，将细胞密度调整到 1E5/mL。将 NCI-H929 细胞铺到 96 孔板(corning，货号 3799)中，100μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

购买新鲜 PBMC，细胞计数，并用 RPMI1640+2%FBS 将细胞密度调整到 4E6/mL。将效应细胞铺到 96 孔板中，50μL/孔，37℃ 5%$CO_2$ 培养。

用 RPMI1640+2%FBS 培养基稀释抗体，起始浓度为 100nM，13 倍往下稀释。将稀释好的抗体加入到细胞培养板中，50μL/孔，故起始终浓度为 100nM。37℃ 5% $CO_2$ 培养 24 小时。

将培养板 400g 转速离心 10 分钟，取 100μL 上清冻存在-80℃备用。

按照细胞因子检测试剂盒(Biolegend，430504（ELISA MAX Deluxe Set Human IL-6））说明书稀释标准品，两倍稀释，最高浓度为 8000pg/mL，最低点浓度为 0 pg/mL，一共 12 个浓度点。将配置好的标准品或者解冻后的样品加到 96 孔板中，100μL/孔（其中样品均需要另外稀释），按照试剂盒方法操作，于 Envision 上读取 0D450 值。

结果如图 10A-10B 所示。在 PBMC 与肿瘤细胞共孵育的情况下，三抗 1 分子诱导 IL6 细胞因子释放的水平均弱于三抗 2 分子。

**实施例 11. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的稳定性测试**

利用差示荧光扫描技术检测三抗在 pH7.4 PBS 缓冲液中的热稳定性。样品浓度在 1mg/mL 左右，利用 Prometheus NT.Plex(nano DSF)进行检测。检测前，将各个样品 10000g 离心 10 分钟。样品板每个孔加入 40μL 样品(仪器上样量为 10μL，每个样品均有一个复孔)。扫描温度从 30℃开始到 95℃结束，扫描速率 0.5℃/min。实验结果如表 13 所示。两个三抗分子均表现出良好的热稳定性。

表 13 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的 NanoDSF 检测结果

| 分子 | Tm Onset | Tm1 | Tagg |
|---|---|---|---|
| 三抗 1 | 57.8℃ | 61.4℃ | 65.2℃ |
| 三抗 2 | 57.3℃ | 61.9℃ | 65.6℃ |

**实施例 12. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的药代动力学**

实验用 naive 食蟹猴两只，自由饮水。三特异性抗体给药剂量为 1mg/kg，后肢静脉注射。采血时间点为 Pre-dose，5min，2 hr，6 hr，24hr，72hr，168hr，264hr，336hr，504hr，672hr，840hr。将全血样品收集在无抗凝剂的聚乙烯管中，室温放置约 1 小时，6000 g，25℃离心，立即置于干冰上，转移至-80 ℃冰箱长期保存。

采用 ELISA 法检测血清中的 GPRC5D-BCMA-CD3 三抗完整分子的浓度。使用人源 GPRC5D 蛋白按 2μg/mL 浓度包被 96 孔板，每孔 100μL，4℃放置过夜；每孔 300μL PBST 洗板 3 次，加入 300μL 封闭试剂 5%奶粉，37℃孵育 1h；每孔 300μL PBST 洗板 3 次，加入 100μL 待测样品，37℃孵育 1h；每孔 300μL PBST 洗板 6 次，加入 100μL

Biotin-BCMA 试剂，37℃孵育 1h；每孔 300μL PBST 洗板 6 次，加入 100μL SA-HRP 试剂，37℃孵育 1h；每孔 300μL PBST 洗板 6 次，再加入 100μL TMB，避光放置 10min 后，加入 50μL 终止液停止显色反应。根据颜色反应定量检测 GPRC5D-BCMA-CD3 三抗完整分子的浓度。

使用 PE 公司的 Envision 读板仪检测 450nm 波长的吸光度值，并使用 softmax 软件处理数据。

采用 Phoenix Winnolin 8.2 软件对三特异性抗体的猴血清浓度进行计算。

结果显示三抗 1 在猴体内的药代性质良好，符合大分子常规代谢特征。

## 实施例 13. 抗 GPRC5D-BCMA-CD3 三特异性抗体的体内药效实验

A. 人源免疫细胞重建小鼠模型，肿瘤细胞为 NCI-H929

实验动物均饲养于恒温恒湿的独立通风盒内，饲养室温度 20.0-26.0 ℃，湿度 40-70%，昼夜明暗交替时间 12h/12h。

NCI-H929 细胞（ATCC，货号 CRL-9068）培养在含 10% 胎牛血清和 0.05mM β-ME 的 RPMI 1640 培养液中。收集指数生长期的 NCI-H929 细胞，细胞重悬在 0.1mL(1:1) PBS 与基质胶的混悬液中，于实验小鼠右侧背部前方接种 $5\times10^6$ NCI-H929 细胞，定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 83 $mm^3$ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。

捐赠者 PBMC 购于 AllCells, LLC。$1\times10^7$ PBMC/0.1mL PBS 于 NCI-H929 细胞接种当天腹腔注射接种每只小鼠，建立人源免疫细胞重建小鼠模型。

在给药开始前，称量所有动物的体重，并用游标卡尺测量肿瘤体积。鉴于肿瘤体积会影响治疗的有效性，所以用随机分组设计的方法，根据鼠的肿瘤体积对其分组，以保证不同组别间的肿瘤体积相似。使用 StudyDirectorTM（版本号 3.1.399.19，供应商 Studylog System, Inc., S. San Francisco, CA, USA）选择 Matched distribution 方法进行分组。小鼠分组当天定义为第 0 天，并于 D0 天开始腹腔注射给药，每三天一次，给药 5 次。实验分组及给药方案见表 14。

表 14 实验分组及给药方案

| 组号 | 每组小鼠数量 | 分子 | 剂量(mg/kg) | 给药途径 | 实际给药频率周期 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | hIgG1 LALA isotype | 0.004 | 腹腔给药 | 每 3 天一次，共给药 5 次 |
| 2 | 6 | Teclistamab | 0.004 | 腹腔给药 | 每 3 天一次，共给药 5 次 |
| 3 | 6 | 三抗 1 | 0.004 | 腹腔给药 | 每 3 天一次，共给药 5 次 |
| 4 | 6 | 三抗 2 | 0.005 | 腹腔给药 | 每 3 天一次，共给药 5 次 |
| 5 | 6 | Talquetamab 与 Teclistamab 联合 | 0.004 + 0.004 | 腹腔给药 | 每 3 天一次，共给药 5 次 |

给药后每天监测动物日常行为表现，共进行 14 天。整个实验过程中，用游标卡尺每周测量 2 次肿瘤长径和宽径，肿瘤体积（$mm^3$）= 0.5 ×（肿瘤长径×肿瘤短径 $^2$）计算。相对肿瘤抑制率 TGI（%）：TGI%=（1-T/C）× 100%。

T/C % 为相对肿瘤增值率，即在某一时间点，治疗组和 hIgG1 LALA isotype 对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。T 和 C 分别为治疗组和 hIgG1 LALA isotype 对照组在某一特定时间点的肿瘤体积（TV）或瘤重（TW）。各组动物的肿瘤体积、小鼠体重、肿瘤重量等实验结果以平均值±标准误差（Mean±SEM）表示。采用独立样本 T 检验比较不同治疗组与对照组相比有无显著性差异。数据使用 SPSS 进行分析。$P<0.05$ 为具有显著性差异。实验结果见表 15 及图 11。

三抗 1 分子 0.004mg/kg 处理组在人源骨髓瘤 NCI-H929 皮下移植 NPG 雌性小鼠 Xenograft 模型中显现出了非常显著的抑制肿瘤效果（p 值小于 0.001），且显著优于等摩尔剂量的双抗分子 Teclistamab 和 Teclistamab 与 Talquetamab 联用。小鼠对测试药三抗分子的耐受良好，未出现明显的小鼠体重下降或毒性。

表 15 各给药组肿瘤体积大小及抑瘤率

| 组号 | 分子 | 剂量 (mg/kg) | 平均肿瘤体积 ($mm^3$) | | T/C (%) | 抑瘤率 TGI (%) | P 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 第 0 天 | 第 14 天 | | | |
| 1 | hIgG1 LALA isotype | 0.004 | 83.80 | 2256.68 | / | / | / |
| 2 | Teclistamab | 0.004 | 83.70 | 2262.02 | 102 | -2 | 1 |
| 3 | 三抗 1 | 0.004 | 83.62 | 727.54 | 30 | 70 | <0.001*** |
| 4 | 三抗 2 | 0.005 | 83.71 | 1387.11 | 60 | 40 | <0.001*** |
| 5 | Talquetamab 与 Teclistamab 联合 | 0.004 | 83.75 | 2277.89 | 104 | -4 | 1 |

B. 人源免疫细胞重建小鼠模型，肿瘤细胞为 NCI-H929

实验动物均饲养于恒温恒湿的独立通风盒内，饲养室温度 20.0-26.0 ℃，湿度 40-70%，昼夜明暗交替时间 12h/12h。

NCI-H929 细胞（ATCC，货号 CRL-9068）培养在含 10% 胎牛血清和 0.05mM β-ME 的 RPMI 1640 培养液中。收集指数生长期的 NCI-H929 细胞，细胞重悬在 0.1mL(1:1) PBS 与基质胶的混悬液中，于实验小鼠右侧背部前方接种 $5\times10^6$ NCI-H929 细胞，定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 100 $mm^3$ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。

捐赠者 PBMC 购于 AllCells, LLC。$1\times10^7$ PBMC/0.2mL PBS 于 NCI-H929 细胞接种当天腹腔注射接种每只小鼠，建立人源免疫细胞重建小鼠模型。

在给药开始前，称量所有动物的体重，并用游标卡尺测量肿瘤体积。鉴于肿瘤体积会影响治疗的有效性，所以用随机分组设计的方法，根据鼠的肿瘤体积对其分组，以保证不同组别间的肿瘤体积相似。小鼠分组当天定义为第 1 天，并于 D1 天开始腹腔注射给药，每周两次，给药 4 次。实验分组及给药方案见表 16。

表 16 实验分组及给药方案

| 组号 | 每组小鼠数量 | 分子 | 剂量(mg/kg) | 给药途径 | 实际给药频率周期 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 7 | hIgG1 LALA isotype | 0.03 | 腹腔给药 | 每周两次，共给药 4 次 |
| 2 | 7 | 三抗 1 | 0.001 | 腹腔给药 | 每周两次，共给药 4 次 |
| 3 | 7 | 三抗 1 | 0.006 | 腹腔给药 | 每周两次，共给药 4 次 |
| 4 | 7 | 三抗 1 | 0.03 | 腹腔给药 | 每周两次，共给药 4 次 |
| 5 | 7 | BCGB491 | 0.006 | 腹腔给药 | 每周两次，共给药 4 次 |
| 6 | 7 | TS-F2-5 | 0.007 | 腹腔给药 | 每周两次，共给药 4 次 |

给药后每天监测动物日常行为表现，共进行 15 天。整个实验过程中，用游标卡尺每周测量 2 次肿瘤长径和宽径，肿瘤体积（$mm^3$）=0.5×（肿瘤长径×肿瘤短径 $^2$）计算。相对肿瘤抑制率 TGI（%）：TGI(%)=[1-(Vti-Vt0)/(Vci-Vc0)] 100%。T/C % 为相对肿瘤增值率，即在某一时间点，治疗组和 hIgG1 LALA isotype 对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。T 和 C 分别为治疗组和 hIgG1 LALA isotype 对照组在某一特定时间点的肿瘤体积（TV）或瘤重（TW）。各组动物的肿瘤体积、小鼠体重、肿瘤重量等实验结果以平均值+标准误差（Mean+SEM）表示。采用独立样本 T 检验比较不同治疗组与对照组相比有无显著性差异。数据使用 GraphPad prism 8.0.2 进行分析。$P < 0.05$ 为具有显著性差异。实验结果见表 17 及图 12 和 13。

三抗 1 的不同剂量处理组在人源骨髓瘤 NCI-H929 皮下移植 NCG 雌性小鼠 Xenograft 模型中均显现出了非常显著的抑制肿瘤效果（p 值均小于 0.05），其中三抗 1 分子 0.006mg/kg 显著优于等摩尔剂量的 BCGB491 和 TS-F2-5。小鼠对测试药三抗分子的耐受良好，未出现明显的小鼠体重下降或毒性。

表 17 各给药组肿瘤体积大小及抑瘤率

| 组号 | 分子 | 剂量 (mg/kg) | 平均肿瘤体积($mm^3$) | | T/C (%) | 抑瘤率 TGI (%) | P 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 第 1 天 | 第 15 天 | | | |
| 1 | hIgG1 LALA isotype | 0.03 | 100 | 3623 | / | / | / |
| 2 | 三抗 1 | 0.001 | 100 | 1348 | 37 | 65 | 0.003** |
| 3 | 三抗 1 | 0.006 | 100 | 400 | 11 | 91 | <0.0001*** |
| 4 | 三抗 1 | 0.03 | 100 | 5 | 0 | 103 | <0.0001*** |
| 5 | BCGB491 | 0.006 | 100 | 2146 | 59 | 42 | 0.054 |
| 6 | TS-F2-5 | 0.007 | 100 | 2438 | 67 | 34 | 0.114 |

## 实施例 14. 羊驼免疫，仅重链的抗体免疫文库的构建

用高表达人 GPRC5D 的 CHO-K1 细胞对羊驼进行免疫。免疫的日期分别为第 0 天、第 21 天、第 35 天、第 49 天，第 70 天，共免疫 5 次。分别在第 28 天、第 42 天、第 63 天抽取血样分离出血清，利用细胞水平 FACS 检测血清中免疫应答反应情况。检测血清效价趋于平台期时结束免疫，对免疫的羊驼重新抽取血样 50mL，按制造商说明书使用 Solarbio 公司淋巴细胞分离液分别分离羊驼 PBMC，提取总 RNA（OMEGA 细胞总 RNA 提取试剂盒）后用 Takara PrimeScript™ II 反转录试剂盒合成 cDNA 做模板，用设计的特异性引物进行巢式 PCR 扩增出 VHH 基因片

段，回收 VHH 片段后通过 Sfi I 酶切连接到 pADL-23c 噬菌粒载体上，电转化 TG1 电转化感受态细胞建成 GPRC5D 羊驼免疫文库（库容为 4.07E9）。

**实施例 15. 羊驼来源的抗 GPRC5D 的阳性克隆的筛选**

为了获得可与人 GPRC5D 和食蟹猴 GPRC5D 交叉结合的阳性抗体，将上述文库扩增加入 M13K07 helper phage 组装成噬菌体。培养人 GPRC5D-CHOK1 细胞系、食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞系、CHOK1 细胞至铺满整版，PBS 洗涤 2 次后加入 100μL 4%多聚甲醛固定细胞，25℃作用 20-30min。PBS 洗涤 2 次，每孔加入 300μL 5%脱脂牛奶，37℃封闭 1h，PBST 洗涤 3 次，每孔加入 50μL 5%脱脂牛奶和 50μL 噬菌体上清，37℃孵育 1h。0.1%PBST 洗涤 5 次，加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体（用 PBS 按 1:10000 稀释），100μL/孔，37℃作用 1 h。0.1%PBST 洗板 6 次。加入 TMB 显色液显色，100 μL/孔，37℃，7min，加入终止液终止反应，50 μL/孔，于 450 nm 下测光密度。将阳性克隆进行测序，获得 5 个重链抗体可变区（VHH）的氨基酸序列，克隆号分别为 HHC7、HHC11、HHC22、HHC53 和 HHC78，其中 HHC78 的氨基酸序列如下所示：

QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGLFFASSDMSWFRQPPGKERELVAEITSVGNNIKYADSVEGRFTISRDNAKS TVYLQMNSLKPEDTAVYYCSARRRVRYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO:37）

在上述 HHC78 的氨基酸序列的基础上，利用 Kabat 编号规则划分抗体可变区的 CDR 和 FR，该抗体的 3 个 CDR 序列组成如下表所示：

表 18

| SEQ ID NO | 22 | 23 | 24 |
|---|---|---|---|
| 氨基酸序列 | SSDMS | EITSVGNNIKYADSVEG | RRRVRY |

**实施例 16.羊驼来源的抗 GPRC5D 嵌合抗体的构建及其在真核细胞中的瞬时转染表达**

将测序完成的本公开的重链抗体可变区与人 IgG1 恒定区拼接后生成的目的基因片段克隆到 pTT5 表达载体中，制备转染级别的表达质粒。重链抗体可变区可以通过连接短肽与人 IgG1 恒定区连接，即形成：重链抗体可变区-连接短肽-人 IgG1 恒定区。本实施中采用的连接短肽序列为 GGGGS。

引入的人 IgG1 恒定区序列（SEQ ID NO：38）如下：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G

在无血清培养基中培养 Expi293F™ 细胞（Thermo Fisher Scientific），将细胞接种在摇瓶（Corning Inc.）中，并在 37℃，8% $CO_2$ 的环境中置于摇床上培养。调整细胞密度，将含有目的基因片段的重组表达载体和 PEI 转染试剂按照合适的比例混合，并添加进细胞培养摇瓶中，细胞培养 6 天后收集表达上清，高速离心去除细胞碎片，用 Protein A 柱进行亲和纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。用 pH3.0-pH3.5 的酸性洗脱液洗脱目的蛋白，用 1M Tris-HCl，pH8.0-9.0 中和。洗脱样品适当浓缩后，换液到 PBS 分装备用。对最终纯化的嵌合抗体进行 SDS-PAGE 及 HPLC 纯度分析和 A280 浓度测定。

**实施例 17. 羊驼来源的抗 GPRC5D 嵌合抗体与表达 GPRC5D 细胞的结合**

人 GPRC5D-CHOK1 细胞及食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞的培养基均为 F12K+10%FBS+400μg/mL Hygromycin，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待使用时用无菌 DPBS 洗细胞两遍，0.25%胰酶 EDTA 消化约 5 分钟后用完全培养基终止。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning 3799）中，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，4℃放置备用。用 1%BSA（in PBS）稀释待测抗体样品，起始浓度为 100nM，10 倍往下稀释 7 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 1 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。160μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。用 1%BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI），结果如表 19 及附图 14 所示。筛选到的抗 GPRC5D 重链抗体与人 GPRC5D 及食蟹猴 GPRC5D 在细胞水平均有较好的结合。

表 19 抗 GPRC5D 嵌合抗体与表达 GPRC5D 细胞的结合

| 克隆号 | 人 GPRC5D-CHOK1 | | 食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） |
| IgG1 AA | 无拟合 | 36 | 无拟合 | 85 |
| HHC78 IgG1 | 0.79 | 47396 | 0.98 | 45829 |

**实施例 18. 羊驼来源的抗 GPRC5D 嵌合抗体的人源化设计**

通过序列比对选择与候选重链抗体同源性较高的胚系基因序列作为 VHH 移植框架模板。将候选抗体 CDR 区嫁接至选定的人抗体可变区框架后，进行个别氨基酸的回复突变，得到人源化抗体 H1、H2、H3、H4 和 H5，其中 H4 序列如表 20 所示：

表 20 羊驼来源的抗 GPRC5D 的人源化抗体可变区的氨基酸序列

| | SEQ ID NO | 重链可变区（VHH） |
|---|---|---|
| H4 | 10 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGLFFASSDMSWFRQAPGKGRELV |

| | | |
|---|---|---|
| | | AEITSVGNNIKYADSVEGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCS ARRRVRYWGQGTLVTVSS |

**实施例 19. 羊驼来源的抗 GPRC5D 人源化抗体的制备**

参照实施例 16 所述，将人源化抗体的可变区与人 IgG1 恒定区拼接后生成的目的基因片段克隆到 pTT5 表达载体中，制备转染级别的表达质粒。

在无血清培养基中培养 Expi293F™ 细胞（Thermo Fisher Scientific），将细胞接种在摇瓶（Corning Inc.）中，并在 37°C，8% $CO_2$ 的环境中置于摇床上培养。调整细胞密度，将含有目的基因片段的重组表达载体和 PEI 转染试剂按照合适的比例混合，并添加进细胞培养摇瓶中，细胞培养 6 天后收集表达上清，高速离心去除细胞碎片，用 Protein A 柱进行亲和纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。用 pH3.0-pH3.5 的酸性洗脱液洗脱目的蛋白，用 1M Tris-HCl，pH8.0-9.0 中和。洗脱样品适当浓缩后，换液到 PBS 分装备用。对最终纯化的人源化抗体进行 SDS-PAGE 及 HPLC 纯度分析和 A280 浓度测定。

**实施例 20. 羊驼来源的抗 GPRC5D 人源化抗体与表达 GPRC5D 细胞的结合**

NCI-H929 细胞（ATCC, CRL-9068）的培养基为 RPMI 1640+10%FBS+0.05mM mercaptoethanol，食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞的培养基为 F12K+10%FBS+400μg/mL Hygromycin，使用 T75 细胞培养瓶置于 37°C 5%$CO_2$ 培养箱培养。

NCI-H929 细胞使用时用移液管直接转移到 50mL 离心管中。食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞待使用时使用无菌 DPBS 洗细胞两遍，0.25%胰酶 EDTA 消化约 5 分钟后用完全培养基终止。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning 3799）中，1500rpm 转速 4°C离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4°C离心 5 分钟，弃上清，4°C放置备用。用 1%BSA（in PBS）稀释待测抗体样品，起始浓度为 100nM，10 倍往下稀释 7 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4°C孵育 1 小时。1500rpm 转速 4°C离心 5 分钟，弃上清。160μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4°C离心 5 分钟，弃上清。用 1%BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4°C孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4°C离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4°C离心 5 分钟，弃上清。100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI），结果如表 21 及附图 15 所示。克隆 HHC78 人源化抗体和食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 细胞的结合与母本抗体相当，和 NCI-H929 肿瘤细胞的结合相比母本维持或减弱。

表 21 抗 GPRC5D 人源化抗体与表达 GPRC5D 细胞的结合

| | NCI-H929 | | 食蟹猴 GPRC5D-CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） |
| IgG1 AA | 无拟合 | 178 | 无拟合 | 1840 |
| HHC78 IgG1 | 2.53 | 494 | 9.22 | 37000 |
| HHC78-H4 IgG1 | 1.18 | 386 | 8.68 | 39700 |

**实施例 21. 羊驼来源的抗 GPRC5D 人源化抗体与同家族成员 GPRC5A 的结合**

人 GPRC5A-CHOK1 细胞的培养基为 F12K+10%FBS+400μg/mL Hygromycin，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养，待使用时用无菌 DPBS 洗细胞两遍，0.25%胰酶 EDTA 消化约 5 分钟后用完全培养基终止。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning 3799）中，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，4℃放置备用。用 1%BSA（in PBS）稀释待测抗体样品，起始浓度为 100nM，10 倍往下稀释 7 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 1 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。160μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。用 1%BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI），结果如附图 16 所示，显示所测抗体与同家族成员 GPRC5A 无非特异结合。

**实施例 22. 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 抗体的获得**

抗 BCMA 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 Balb/c 小鼠，雌性，6 周龄 (Charles River 公司)。饲养环境：SPF 级。小鼠购进后，实验室环境饲养 1 周，12/12 小时光/暗周期调节，温度 20-25℃；湿度 40-60 %。免疫原为人 BCMA ECD 蛋白（义翘神州，货号 10620-H08H），每次免疫 25μg 蛋白，时间为第 0、14、28、42 天，在进行脾细胞融合前 2 天进行加强免疫。期间用 ELISA 方法检测小鼠血清，确定小鼠血清中的抗体滴度。加强免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合，采用优化的电融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞

Sp2/0 细胞 (ATCC® CRL-8287™)进行融合得到杂交瘤细胞。

融合后的杂交瘤细胞培养 7-14 天后，取培养基上清，使用高表达人 BCMA 的 CHO-K1 细胞，FACS 实验对杂交瘤上清进行抗体筛选，得到的阳性抗体株进一步使用高表达食蟹猴 BCMA 的 CHO-K1 细胞，空白 CHO-K1 细胞以排除非特异性结合抗体杂交瘤株，从而选定特异性结合人/食蟹猴 BCMA 的杂交瘤。收集对数生长期杂交瘤细胞，用 Trizol（Invitrogen,15596-018）提取 RNA 并反转录（PrimeScript™ Reverse Transcriptase，Takara #2680A）。将反转录得到的 cDNA 采用 mouse Ig-Primer Set（Novagen, TB326 Rev.B 0503）进行 PCR 扩增后测序，获得本公开的 11 个单克隆抗体可变区的氨基酸序列：19CH-1、19CH-2、19CH-3、19CH-4、19CH-5、19CH-7、19CH-8、19CH-9、19CH-11、19CH-13 和 19CH-16，其中 19CH-16 如表 22 所示。

表 22 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 的 19CH-16 单克隆抗体可变区的氨基酸序列

| 克隆号 | | 重链可变区（VH） | 轻链可变区（VL） |
|---|---|---|---|
| 19CH-16 | SEQ ID NO | 39 | 40 |
| | 氨基酸序列 | QGQMQQSGAELVKPGTSVKLSCKT<br>SGFTFRSSYISWLQQKPGQSLEWIA<br>WIYAGSGNTDYNQKFTGKAQLTVD<br>TSSSTAYMQFSSLTTEDSAIYYCAR<br>HYDPPHYFDYWGQGTTLTVSS | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC<br>SASSGVSHMHWYQQKSGTSPKR<br>WIYDTSKLTSGVPTRFSGTGSGT<br>SYSLSISSMEAEDAATYYCQQW<br>SRNPWTFGGGTKLEIK |

在上述氨基酸序列的基础上，利用 Kabat 编号规则划分抗体可变区的 CDR 和 FR，19CH-16 的 6 个 CDR 序列组成如下表 23 所示。

表 23 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 的单克隆抗体的 CDR 序列

| 克隆号 | | CDR1 | | CDR2 | | CDR3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | SEQ ID NO | 氨基酸序列 | SEQ ID NO | 氨基酸序列 | SEQ ID NO | 氨基酸序列 |
| 19CH-16 | 重链 | 16 | SSYIS | 41 | WIYAGSGNTDYNQKFTG | 18 | HYDPPHYFDY |
| | 轻链 | 19 | SASSGVSHMH | 20 | DTSKLTS | 21 | QQWSRNPWT |

**实施例 23. 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 嵌合抗体的构建及其在真核细胞中的瞬时转染表达**

将测序完成的本公开的单抗重链可变区及轻链可变区分别与 IgG1（L234AL235A）重链恒定区以及 κ 轻链恒定区拼接后生成的目的基因片段克隆到 pTT5 表达载体中，制备转染级别的表达质粒。

在 Expi293 表达培养基（赛默飞，A1435101）中培养 Expi293F™细胞（赛默飞，A14527），将细胞接种在摇瓶中，并在 37℃，8% CO2 的环境中置于摇床上培养。调整细胞密度，将含有目的基因片段的重组表达载体和 PEI 转染试剂按照合适的比例混合，并添加进细胞培养摇瓶中，细胞培养 6 天后收集表达上清，高速离心去除细胞碎片，用 Mabselect Sure 柱进行亲和纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。用 pH3.0-pH3.5 的酸性洗脱液洗脱

目的蛋白，用 1M Tris-HCl，pH8.0-9.0 中和。洗脱样品适当浓缩后，换液到 PBS 分装备用。对最终纯化的嵌合抗体进行 SDS-PAGE 及 HPLC 纯度分析和 A280 浓度测定。

**实施例 24. 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 嵌合抗体与表达 BCMA 细胞的结合**

人 BCMA-CHOK1 细胞及食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞的培养基均为 F12K+10%FBS+400μg/mL Hygromycin，使用 T75 细胞培养瓶置于 37℃ 5%$CO_2$ 培养箱培养。待使用时用无菌 DPBS 洗细胞两遍，0.25%胰酶 EDTA 消化约 5 分钟后用完全培养基终止。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning 3799）中，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，4℃放置备用。用 1%BSA（in PBS）稀释待测抗体样品，起始浓度为 100nM，10 倍往下稀释 7 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 1 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。160μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。用 1%BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI），结果如表 24 及附图 17 所示。筛选到的 1 个抗 BCMA 嵌合抗体（19CH-16）与人 BCMA 及食蟹猴 BCMA 在细胞水平均有较好的结合。

表 24 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 嵌合抗体与表达 BCMA 细胞的结合

| 克隆号 | 人 BCMA CHOK1 | | 食蟹猴 BCMA CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） |
| IgG1 AA | N/A | 89.1 | N/A | 82.6 |
| 19CH-16 | 0.8852 | 11800 | 1.221 | 1194 |

**实施例 25. 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 抗体的人源化设计**

根据表达纯化测试及细胞水平结合测试的结果，选择克隆号为 19CH-16 的抗体进行人源化设计。

鼠源抗人 BCMA 单克隆抗体人源化如本领域许多文献公示的方法进行。简言之，使用人恒定结构域替代亲本（鼠源抗体）恒定结构域，根据鼠源抗体和人抗体的同源性选择人种抗体序列。在所获得的鼠源抗体 VH/VL CDR

典型结构的基础上，将重、轻链可变区序列与人源抗体种系数据库比较，获得同源性高的人种系模板。

将鼠源抗体的 CDR 区移植到选择好的相应人源化模板上，替换人源化可变区，再与 IgG 恒定区（优选重链为 IgG1，轻链为 κ）重组。然后，以鼠源抗体的三维结构为基础，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变，设计了由如下人源化轻重链可变区序列组合而成的抗体：19CH-16H1L1、19CH-16H1L2、19CH-16H1L3、19CH-16H2L1、19CH-16H2L2、19CH-16H2L3、19CH-16H3L1、19CH-16H3L2、19CH-16H3L3、19CH-16H4L1、19CH-16H4L2 和 19CH-16H4L3，其中 19CH-16H2L2 如表 25 所示。

表 25 小鼠杂交瘤来源的 1 个人源化抗体可变区的氨基酸序列

| 克隆号 | | 重链可变区（VH） | 轻链可变区（VL） |
|---|---|---|---|
| 19CH-16H2L2 | SEQ ID NO | 42 | 15 |
| | 氨基酸序列 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GFTFRSSYISWVRQAPGQGLEWIAWI YAGSGNTDYNQKFTGRVTMTVDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARHYDP PHYFDYWGQGTLVTVSS | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSA SSGVSHMHWYQQKPGKAPKRWI YDTSKLTSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQWSRNPW TFGQGTKVEIK |

**实施例 26. 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体的制备**

将人源化抗体的重链可变区及轻链可变区分别与 IgG1（L234AL235A）重链恒定区以及 κ 轻链恒定区拼接后生成的目的基因片段克隆到 pTT5 表达载体中，制备转染级别的表达质粒。

在 Expi293 表达培养基（赛默飞，A1435101）中培养 Expi293F™细胞（赛默飞，A14527），将细胞接种在摇瓶中，并在 37℃，8% CO2 的环境中置于摇床上培养。调整细胞密度，将含有目的基因片段的重组表达载体和 PEI 转染试剂按照合适的比例混合，并添加进细胞培养摇瓶中，细胞培养 6 天后收集表达上清，高速离心去除细胞碎片，用 Mabselect Sure 柱进行亲和纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。用 pH3.0-pH3.5 的酸性洗脱液洗脱目的蛋白，用 1M Tris-HCl，pH8.0-9.0 中和。洗脱样品适当浓缩后，换液到 PBS 分装备用。对最终纯化的嵌合抗体进行 SDS-PAGE 及 HPLC 纯度分析和 A280 浓度测定。

**实施例 27. 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体与表达 BCMA 细胞的结合**

人 BCMA-CHOK1 细胞及食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞的培养基为 F12K+10%FBS+400μg/mL Hygromycin，人 BCMA-CHOK1 细胞及食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞待使用时用无菌 DPBS 洗细胞两遍，0.25%胰酶 EDTA 消化约 5 分钟后用完全培养基终止。

将得到的细胞以 1000rpm 转速常温离心 5 分钟，弃上清，用 100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞。细胞计数，并将细胞密度调整到 1E6/mL，铺到 96 孔圆底培养板（corning 3799）中，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，用 200μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，再次 1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清，4℃放置备用。用 1%BSA（in PBS）稀释待测抗体样品，起始浓度为 100nM，10 倍往下稀释 7 个浓度。使用稀释好的抗体重悬细胞，100μL/孔，4℃孵

育 1 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。160μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。用 1%BSA（in PBS）按照说明书 1:400 稀释二抗（goat anti human IgG Fc PE），用稀释好的二抗重悬细胞，100μL/孔，4℃孵育 0.5 小时。1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。200 μL 1%BSA（in PBS）重悬洗涤，1500rpm 转速 4℃离心 5 分钟，弃上清。100μL 1%BSA（in PBS）重悬细胞，300 目纱布过滤细胞，流式细胞仪检测 PE 通道平均荧光强度。

从流式细胞仪导出 FCS 文件，用 flowjo 软件分析每个样本的 PE 通道平均荧光强度（以下简称 MFI），将分析得出的平均荧光强度导入 Graphpad 分析抗体与细胞的半数结合浓度（以下简称 $EC_{50}$）和最高平均荧光强度（Top MFI），结果如表 26 及附图 18 所示。实施例 26 中制备的、筛选到的 1 个抗 BCMA 人源化抗体（19CH-16H2L2）与人 BCMA 及食蟹猴 BCMA 在细胞水平均有较好的结合。

表 26 小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体与表达 BCMA 细胞的结合

| 克隆号 | 人 BCMA CHOK1 | | 食蟹猴 BCMA CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI） |
| IgG1 AA | N/A | 232 | N/A | 382 |
| 19CH-16H2L2 | 2.126 | 8632 | 4.821 | 14300 |

**实施例 28. 制备小鼠杂交瘤来源的抗 BCMA 人源化抗体的变体**

对上述的抗 BCMA 人源化抗体 19CH-16H2L2 的 CDR 区进行翻译后修饰（PTM）分析发现，重链可变区中存在 1 个脱酰胺位点，为了消除潜在的风险，对 19CH-16H2 氨基酸序列进行单个位点的定点突变，得到 19CH-16H2L2-NA 和 19CH-16H2L2-QT 两个变体。19CH-16H2L2-NA 变体的可变区氨基酸序列如表 27 所示。

表 27 19CH-16H2L2 人源化抗体变体的氨基酸序列

| 克隆号 | | 重链可变区（VH） | 轻链可变区（VL） |
|---|---|---|---|
| 19CH-16H2L2-NA | SEQ ID NO | 14 | 15 |
| | 氨基酸序列 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGSGNADYNQKFTGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHYDPPHYFDYWGQGTLVTVSS | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGVSHMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSRNPWTFGQGTKVEIK |

参照实施例 26 所述，通过 Expi293 细胞瞬转表达制备得到上述 2 个变体蛋白。参照实施例 27 所述，使用人 BCMA-CHOK1 细胞及食蟹猴 BCMA-CHOK1 细胞对两个变体的亲和力进行测定。结果如表 28 及附图 19 所示。19CH-16H2L2-NA 能够保持细胞结合水平上的亲和力同时去除翻译后修饰的风险。

表 28 19CH-16H2L2 人源化抗体变体与表达 BCMA 细胞的结合

| 克隆号 | 人 BCMA CHOK1 | | 食蟹猴 BCMA CHOK1 | |
|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI) | $EC_{50}$ (nM) | 最高平均荧光强度（Top MFI) |
| IgG1 AA | N/A | 232 | N/A | 382 |
| 19CH-16H2L2-NA | 2.154 | 10700 | 5.86 | 26900 |
| 19CH-16H2L2-QT | 7.761 | 9914 | 9.055 | 7555 |

上文所述的本公开的实施方案仅为示例性的，任何本领域技术人员都可以认识到或者可以确定无数的特定化合物、材料和操作的等价物，而不需要进行超出常规的试验。所有这些等价物都是在本公开范围之内的，并且被权利要求所包含。

# 权 利 要 求 书

1、 一种三特异性抗原结合分子，包含以下多肽：

第一多肽，包含：(i)能够特异性结合第一抗原的抗原结合片段 Fab 的重链结构域，(ii)能够特异性结合第二抗原的单链抗体（scFv）结构域，和(iii)第一 Fc 结构域，

第二多肽，包含：能够特异性结合第一抗原的抗原结合片段 Fab 的轻链结构域，和，

第三多肽，包含：（i）能够特异性结合第三抗原的重链单域抗体（VHH）结构域和（ii）第二 Fc 结构域，

其中所述第一多肽的抗原结合片段 Fab 的重链结构域与所述第二多肽的抗原结合片段 Fab 的轻链结构域形成针对第一抗原的第一结合位点；所述单链抗体（scFv）结构域形成针对第二抗原的第二结合位点；所述重链单域抗体（VHH）结构域形成针对第三抗原的第三结合位点；所述第一 Fc 结构域和所述第二 Fc 结构域相互缔合；

任选地，所述三特异性抗原结合分子还包含第四多肽，其包含特异性结合第一抗原的抗原结合片段 Fab 的轻链结构域，所述抗原结合片段 Fab 的轻链结构域与第二多肽的抗原结合片段 Fab 的轻链结构域相同，且所述第三多肽还包含特异性结合第一抗原的抗原结合片段 Fab 的重链结构域，所述第三多肽的抗原结合片段 Fab 的重链结构域与第一多肽的抗原结合片段 Fab 的重链结构域相同，其 C 端与 VHH 结构域的 N 端相连，所述第三多肽的抗原结合片段 Fab 的重链结构域与第四多肽的抗原结合片段 Fab 的轻链结构域形成针对第一抗原的第四结合位点。

2、如权利要求 1 所述的三特异性结合分子，其中所述单链抗体（scFv）结构域包含重链可变区和轻链可变区；优选地，所述单链抗体（scFv）结构域的重链可变区与所述单链抗体（scFv）结构域的轻链可变区通过第一接头连接，其中单链抗体（scFv）结构域的重链可变区的 C 端与第一接头的 N 端融合，第一接头的 C 端与单链抗体（scFv）结构域的轻链可变区的 N 端融合；更优选地，所述第一接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$，n 为 1-10 中的任意整数。

3、如权利要求 1 或 2 所述的三特异性抗原结合分子，其中所述第一 Fc 结构域包含免疫球蛋白的第一 CH2 结构域和第一 CH3 结构域，所述第一 CH2 结构域的 C 端与第一 CH3 结构域的 N 端融合；所述第二 Fc 结构域包含免疫球蛋白的第二 CH2 结构域和第二 CH3 结构域，所述第二 CH2 结构域的 C 端与第二 CH3 结构域的 N 端融合；

优选地，所述第一 CH3 结构域包含“节”（knob）结构，所述第二 CH3 结构域包含“穴”（hole）结构；更优选地，所述“节”（knob）结构包含氨基酸取代 S354C 和 T366W，所述“穴”（hole）结构包含氨基酸取代 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V；

优选地，第一和/或第二 Fc 结构域包含 L234A、L235A 和/或 G237A 的氨基酸取代；

优选地，所述第二 Fc 结构域包含 H435R 的氨基酸取代；

优选地，所述单链抗体（scFv）结构域与所述第一 Fc 结构域通过第二接头连接，其中单链抗体（scFv）结构域的 C 端与第二接头的 N 端融合，第二接头的 C 端与第一 Fc 结构域的 N 端融合；

更优选地，所述第二接头包含氨基酸序列 EPKSS；

优选地，其中所述 Fc 结构域来源于 IgG1。

4、如权利要求 1-3 任一项所述的三特异性抗原结合分子，其中所述抗原结合片段 Fab 重链结构域包含免疫球蛋白的重链可变区和 CH1 结构域，所述重链可变区的 C 端与 CH1 结构域的 N 端融合；所述抗原结合片段 Fab 轻链结构域包含免疫球蛋白的轻链可变区和轻链恒定区，所述轻链可变区的 C 端与轻链恒定区的 N 端融合；

优选地，所述第一多肽的抗原结合片段 Fab 重链结构域与所述单链抗体（scFv）结构域通过第三接头连接，其中抗原结合片段 Fab 重链结构域的 C 端与第三接头的 N 端融合，第三接头的 C 端与单链抗体（scFv）结构域的 N 端融合；

任选地，所述第三多肽的抗原结合片段 Fab 重链结构域与所述 VHH 结构域通过第五接头连接，其中抗原结合片段 Fab 重链结构域的 C 端与第五接头的 N 端融合，第五接头的 C 端与 VHH 结构域的 N 端融合。

优选地，所述第三接头和/或第五接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$，n 为 1-10 中的任意整数。

5、如权利要求 1-4 任一项所述的三特异性抗原结合分子，所述重链单域抗体（VHH）结构域的 C 端与第二 Fc 结构域的 N 端融合，优选地，所述重链单域抗体（VHH）结构域的 C 端通过第四接头与与第二 Fc 结构域的 N 端融合；更优选地，所述第四接头包含氨基酸序列 EPKSS。

6、如权利要求 1-5 任一项所述的三特异性抗原结合分子，其中所述第一多肽包含如下结构： Fab 重链结构域-scFv 结构域-第一 Fc 结构域，优选所述第一多肽包含如下结构：Fab 重链可变区-Fab CH1-第三接头-scFv 的重链可变区-第一接头-scFv 的轻链可变区-第二接头-第一 CH2-第一 CH3；

其中第二多肽包含如下结构：Fab 轻链可变区-轻链恒定区；

和/或，其中第三多肽包含如下结构：VHH 结构域-第二 Fc 结构域，优选所述第三多肽包含如下结构：VHH 结构域-第四接头-第二 CH2-第二 CH3；

任选地，所述第四多肽包含如下结构：Fab 轻链可变区-轻链恒定区，且所述第三多肽包含如下结构：Fab 重链结构域-第五接头-VHH-第四接头-第二 Fc 结构域，进一步优选地，所述第三多肽包含如下结构：Fab 重链可变区-Fab CH1-第五接头-VHH-第四接头-第二 CH2-第二 CH3。

7、如权利要求 1-6 任一项所述的三特异性抗原结合分子，其中所述第二抗原为 CD3，优选为 CD3ε；优选地，所述单链抗体（scFv）结构域包含序列如 SEQ ID NO：27 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO：28 所示的 HCDR2、序列如 SEQ ID NO：29 所示的 HCDR3、序列如 SEQ ID NO：30 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO：31 所示的 LCDR2 和序列如 SEQ ID NO：32 所示的 LCDR3。

更优选地，所述单链抗体（scFv）结构域包含序列如 SEQ ID NO：25 所示的重链可变区和序列如 SEQ ID NO：26 所示的轻链可变区；

更优选地，所述单链抗体（scFv）结构域包含 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。

8、如权利要求 1-7 任一项所述的三特异性抗原结合分子，其中所述第一 Fc 结构域包含 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，所述第二 Fc 结构域包含 SEQ ID NO：34 所示的氨基酸序列。

9、如权利要求 1-8 任一项所述的三特异性抗原结合分子，所述第一抗原为 BCMA；优选地，所述抗原结合片段 Fab 包含序列如 SEQ ID NO：16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO：17 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO：18 所示的 HCDR3；优选地，所述抗原结合片段 Fab 包含序列如 SEQ ID NO:19 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO:20 所示的 LCDR2 和序列如 SEQ ID NO:21 所示的 LCDR3；

更优选地，所述抗原结合片段 Fab 重链结构域包含序列如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区；所述抗原结合片段 Fab 轻链结构域包含序列如 SEQ ID NO：15 所示的轻链可变区；

更优选地，所述抗原结合片段 Fab 重链结构域包含 SEQ ID NO：35 所示的氨基酸序列；更优选地，所述抗原结合片段 Fab 轻链结构域包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

10、如权利要求 1-9 任一项所述的三特异性抗原结合分子，所述第三抗原为 GPRC5D；优选地，所述能够特异性结合第三抗原的重链单域抗体（VHH）结构域包含序列如 SEQ ID NO:22 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO:24 所示的 HCDR3；更优选地，所述重链单域抗体（VHH）结构域包含 SEQ ID

NO:10 所示的序列。

11、如权利要求 1-10 任一项所述的三特异性抗原结合分子，所述三特异性抗原结合分子的第一多肽包含 SEQ ID NO：5 所示的氨基酸序列，所述第二多肽包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，所述第三多肽包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列；或者任选地，所述三特异性抗原结合分子的第一多肽包含 SEQ ID NO:5 所示的序列，所述第二多肽和/或第四多肽包含 SEQ ID NO:7 所示的序列，所述第三多肽包含 SEQ ID NO:8 所示的序列。

12、一种三特异性抗原结合分子，其能够结合的表位：

与包含序列如 SEQ ID NO:22 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO:24 所示的 HCDR3 的抗体针对的表位相同或重叠。

13、如权利要求 12 所述的三特异性抗原结合分子，其能够结合的表位：

与包含序列如 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列的抗体针对的表位相同或重叠。

14、如权利要求 12 或 13 所述的三特异性抗原结合分子，其能与 CD3 和 BCMA 结合，其中优选能与 CD3ε 和 BCMA 结合。

15、一种三特异性抗原结合分子，其包含：

(A) 能够特异性结合 GPRC5D3 的第一结合部分；

(B) 第二接合部分；以及

(C) 第三结合部分，所述第一、第二和第三结合部分特异性结合的抗原或表位互不相同；

所述第一结合部分包含：

序列如 SEQ ID NO:22 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO:24 所示的 HCDR3。

16、如权利要求 15 所述的三特异性抗原结合分子，其中所述第一结合部分包含：

序列如 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列。

17、如权利要求 15 或 16 所述的双特异性抗原结合分子，所述第二结合部分能与 CD3 结合，优选能与 CD3ε 结合，和/或第三结合部分能与 BCMA 结合。

18、核酸分子，其编码前述任一项权利要求所述的三特异性抗原结合分子。

19、表达载体，其包含权利要求 18 所述的核酸分子。

20、宿主细胞，其包含权利要求 18 所述的核酸分子或者权利要求 19 所述的表达载体；优选地，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞；所述原核细胞优选大肠杆菌；所述真核细胞优选哺乳动物细胞或酵母；更优选地，所述哺乳动物细胞为 CHO 细胞、Expi293 或 HEK293 细胞。

21、制备权利要求 1-17 任一项所述的三特异性抗原结合分子的方法，所述方法包括：在适合的条件下培养权利要求 20 所述的宿主细胞。

22、药物组合物，其包含权利要求 1-17 任一项所述的三特异性抗原结合分子、权利要求 18 所述的核酸分子、权利要求 19 所述的表达载体和/或权利要求 20 所述的宿主细胞。

23、如权利要求 22 所述的药物组合物，其还包含药学上可接受的载体。

24、如权利要求 22 或 23 所述的药物组合物，其还包含一种或多种额外的治疗剂。

25、权利要求 1-17 任一项所述的三特异性抗原结合分子、权利要求 18 所述的核酸分子、权利要求 19 所述的表达载体和/或权利要求 20 所述的宿主细胞在制备治疗、缓解和/或预防肿瘤的药物中的用途。

26、如权利要求 25 所述的用途，其中所述肿瘤是 GPRC5D 和/或 BCMA 阳性的肿瘤。

27、如权利要求 25 或 26 所述的用途，其中所述肿瘤选自：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

28、一种诱导表达 GPRC5D 和/或 BCMA 的细胞死亡的方法，所述方法包括使所述细胞与权利要求 1-17 任一项所述的三特异性抗原结合分子、权利要求 18 所述的核酸分子、权利要求 19 所述的表达载体、权利要求 20 所述的宿主细胞物和/或权利要求 22-24 任一项所述的药物组合物接触，优选地，所述表达 GPRC5D 和/或 BCMA 的细胞是肿瘤细胞。

29、如权利要求 28 所述的方法，其中所述肿瘤细胞是选自以下肿瘤的细胞：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

30、一种治疗受试者中与表达 GPRC5D 和/或 BCMA 相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1-17 任一项所述的三特异性抗原结合分子、权利要求 18 所述的核酸分子、权利要求 19 所述的表达载体、权利要求 20 所述的宿主细胞和/或权利要求 22-24 任一项所述的药物组合物。

31、如权利要求 30 所述的方法，其中所述疾病是肿瘤；

优选地，淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

32、如权利要求 30 或 31 所述的方法，其还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。

33、一种特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段，其特征在于：所述抗原结合分子或其抗原结合片段包含序列如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区的 HCDR 序列和/或序列如 SEQ ID NO:15 所示的轻链可变区的 LCDR 序列；优选地，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述重链可变区包含序列如 SEQ ID NO：16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO：17 所示的 HCDR2 和序列如 SEQ ID NO：18 所示的 HCDR3，和/或，所述轻链可变区包含序列如 SEQ ID NO:19 所示的 LCHDR1、序列如 SEQ ID NO:20 所示的 LCDR2 和序列如 SEQ ID NO:21 所示的 LCDR3。

34、权利要求 33 所述的特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含序列如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区，和/或序列如 SEQ ID NO：15 所示的轻链可变区。

35、权利要求 33 或 34 所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段，其还具有以下特征的一种或多种：

i) 其还包含重链恒定区和/或轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区包含 Fc；更优选地，Fc 来源于鼠或人；更优选地，Fc 的序列是天然的或经过修饰的；进一步优选地，所述 IgG1 的 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列；

ii) 所述 BCMA 抗原结合分子或其抗原结合片段为单克隆抗体、双特异性结合分子、多特异性结合分子、鼠源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、改型抗体、全人源抗体、全长抗体、重链抗体、纳米抗体、Fab、Fv、scFv、F(ab')2、线性抗体和/或重链单域抗体；和/或

iii) 其为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 形式。

36、权利要求 33-35 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO：9 所示的重链氨基酸序列，和/或，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合分子或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO:7 所示的轻链氨基酸序列。

37、一种偶联物或融合蛋白，其特征在于：将权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段与捕获标记物或检测标记物偶联形成；优选地，所述检测标记物包括放射性核素、发光物质、有色物质或酶，或者，所述融合蛋白的一个被融合的部分包含权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段。

38、一种抗体药物偶联物，其特征在于：将权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段与其他生物活性分子偶联形成；优选地，所述其他生物活性分子为小分子药物；优选地，所述特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段与所述其他生物活性分子通过接头连接。

39、编码权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段的核酸，或者包含所述核酸的重组载体，或者包含所述核酸或所述重组载体的宿主细胞；优选地，所述宿主细胞为原核细胞（优选大肠杆菌），或者真核细胞（优选哺乳动物细胞或酵母；进一步优选地，所述哺乳动物细胞为 CHO 细胞或 HEK293 细胞）。

40、制备权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段的方法，所述方法包括：在适合的条件下培养权利要求 53 中所述的宿主细胞，并从所述细胞中纯化获得表达产物。

41、权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段、权利要求 37 所述的偶联物或融合蛋白、权利要求 38 所述的抗体偶联药物或权利要求 39 所述的核酸、重组载体或宿主细胞在制备治疗或缓解肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述药物靶向 BCMA 异常表达的肿瘤细胞；优选地所述肿瘤细胞是选自以下肿瘤的细胞：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

42、权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段、权利要求 37 所述的偶联物或融合蛋白、权利要求 38 所述的抗体偶联药物或权利要求 39 所述的核酸、重组载体或宿主细胞在制备检测试剂或诊断试剂中的用途；

优选地，所述检测试剂用于检测 BCMA 的表达；所述诊断试剂用于诊断肿瘤；优选地，所述肿瘤细胞是选自以下肿瘤的细胞：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

43、一种检测样品中 BCMA 表达的方法，所述方法包括：

（1）将样品与权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段接触；

（2）检测所述特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段与 BCMA 的复合物的形成；任选地，所述特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段是被可检测地标记的。

44、一种药物组合物，其包含有效量的权利要求 33-36 任一项所述的特异性结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段、权利要求 37 所述的偶联物或融合蛋白、权利要求 38 所述的抗体偶联药物或权利要求 39 所述的核酸、重组载体或宿主细胞；

优选地，其还包含药学上可接受的载体；优选地，其还包含一种或多种额外的其他治疗剂。

45、一种嵌合抗原受体（CAR）或包含所述嵌合抗原受体的细胞，其包含权利要求 33-36 任一项所述的特异性

结合 BMCA 的抗原结合分子或其抗原结合片段。

46、一种诱导表达 BCMA 的细胞死亡的方法，所述方法包括使所述细胞与权利要求 44 所述的药物组合物接触，所述表达 BCMA 的细胞是肿瘤细胞；

优选地，所述肿瘤细胞是选自以下肿瘤的细胞：淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌。

47、一种治疗受试者中与表达 BCMA 相关的疾病的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用如权利要求 44 所述的药物组合物；

优选地，所述疾病是肿瘤；优选地，所述肿瘤疾病选自淋巴瘤诸如多发性骨髓瘤，以及上述肿瘤的转移癌；

更优选地，还包括向所述受试者给予额外的治疗剂。