

结合 BCMA 的抗体以及包含其的多特异性抗体

技术领域

本发明提供了一种特异性结合 BCMA 的单克隆抗体以及基于该 BCMA 单克隆抗体构建的 BCMA 和 CD3 的双特异性抗体，及 BCMA/GPRC5D/CD3 的三特异性抗体。还提供了编码所述抗体的核酸分子、用于表达所述抗体的表达载体、宿主细胞和方法。本发明还提供了包含所述抗体的免疫缀合物、双特异性分子、三特异性分子和药物组合物，以及使用本发明的抗 BCMA 抗体以及 BCMA/CD3 双特异性抗体，BCMA/GPRC5D/CD3 的三特异性抗体的诊断和治疗方法。

背景技术

B 细胞成熟抗原(BCMA, CD269)是 TNF 受体超家族的成员。BCMA 的表达局限于 B 细胞谱系，在此其主要在生发中心的滤泡间区中以及分化的浆细胞和成浆细胞上表达。BCMA 结合至两个截然不同的配体，增殖诱导配体(APRIL)和 B 细胞活化因子(BAFF, 也称为 BlyS、TALL-1 以及 THANK)。BCMA 的配体结合两个额外的 TNF 受体，跨膜激活物-钙调节物-亲环蛋白配体相互作用物(TACI)和 BAFF 受体(BAFF-R, 也称为 BR3)。TACI 结合 APRIL 和 BAFF，而 BAFF-R 显示对 BAFF 受限但高亲和力的结合。合起来说，BCMA、TACI、BAFF-R 以及其对应的配体调控体液免疫、B 细胞发育以及体内平衡的不同方面。BCMA 在原初和记忆 B 细胞上几乎不存在(Novak 等, Blood, 103,689-94(2004))，但在浆细胞分化期间选择性地诱导，在此期间其可以通过促进正常浆细胞和成浆细胞的存活而支持体液免疫(O'Conner 等, J.Exp Med., 199,91-98(2004))。已经报导了 BCMA 在原发性多发性骨髓瘤(MM)样品中表达。

G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D (GPRC5D) 作为一个孤儿受体，被发现在多发性骨髓瘤病人的浆细胞中高表达，且与病人的生存率相关 (Atamaniuk, J., et al. (2012). "Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma." Eur J Clin Invest 42(9): 953-960.)。通过进一步的研究显示在正常人的血细胞中 GPRC5D 表达于浆细胞表面，其他的血细胞表面 GPRC5D 表达都是阴性，从多发性骨髓瘤患者体内分离出的 CD38+CD138+的浆细胞表面 GPRC5D 高表达 (Kodama, T., et al. (2019). "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." Mol Cancer Ther 18(9): 1555-1564.)，对患者多发性骨髓瘤细胞的分析发现 GPRC5D 与 BCMA 的表达不具有相关性 (Smith, E. L., et al. (2019). "GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells." Sci Transl Med 11(485).) (Pillarisetti, K., et al. (2020). "A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma." Blood 135(15): 1232-1243.)，因此 GPRC5D 可以作为多发性骨髓瘤的一个肿瘤特异性靶点。此外，GPRC5D 还可以作为其他肿瘤的肿瘤特异性靶点。

CD3 是与 T 细胞受体复合物 (TCR) 结合的在 T 细胞上表达的同型二聚体或异二聚体抗原，并且是 T 细胞活化所需要的。功能性 CD3 由以下四种不同链中的两种的二聚体形成： ϵ 、 ζ 、 δ 和 γ 。CD3 二聚体排列包含 γ/ϵ 、 δ/ϵ 和 ζ/ζ 。已显示针对 CD3 的抗体在 T 细胞上聚集 CD3，从而以类似于通过肽负载的 MHC 分子参与 TCR 的方式引起 T 细胞活化。因此，已提出抗 CD3 抗体用于涉及 T 细胞活化的治疗目的。此外，已提出能够结合 CD3 和靶向肿瘤表

面抗原的双特异性抗体能够将肿瘤细胞和 T 细胞衔接，从而直接活化 T 细胞，释放颗粒酶、穿孔素及细胞因子杀伤肿瘤，从而达到抑制肿瘤的治疗目的。

T 细胞为基础的抗体疗法在对抗包括多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 在内的多种癌症方面发挥了重要作用。双特异性抗体(BsAbs)是基于一种双靶向抗体的设计，该抗体设计通过一只手臂结合肿瘤细胞上的相关抗原，另一只手臂与 T 细胞上的 CD3 共受体复合物结合，将细胞毒性 T 细胞重新导向，聚集到肿瘤细胞附近以达到对肿瘤细胞的溶解。BsAbs 对肿瘤的溶解能力依赖于肿瘤相关抗原在肿瘤细胞上的表达分布及丰度。这就导致 BsAbs 治疗对患者的选择性和治疗的局限性。也因此可能由于肿瘤相关抗原的表达下调，免疫选择压下降，导致免疫逃逸，从而疾病复发。

由于 BCMA 和 GPRC5D 都是多发性骨髓瘤(MM)肿瘤细胞表面上特异的肿瘤相关抗原，MM 患者中肿瘤细胞异质性程度较高，且 BCMA 和 GPRC5D 在 MM 细胞上的表达相对独立，患者体内存在 BCMA 阳性或 GPRC5D 阳性的 MM 细胞，若用 BCMAxCD3 BsAb 或 GPRC5DxCD3 BsAb 进行治疗，不能完全杀死 BCMA 阴性或 GPRC5D 阴性的 MM 细胞，最终导致病情复发。

虽然现有技术存在针对 BCMA 的抗体以及基于 BCMA 抗体或片段构建的双特异性抗体或多特异性抗体，如 Teclistamab (US2017/0051068A1)，安全性高并给多线治疗失败的 MM 患者带来深度、持久的缓解，已进入 III 期临床试验。其他 BCMA/CD3 双抗 AMG420、REGN5458 等也在临床研究中，但是，已知的抗体仍具有需要改进的方面，例如这些抗体对于诱导 T 细胞的杀伤较弱，且细胞因子释放水平较高，或对表达人 BCMA 的细胞亲和力较低，或者对低表达人 BCMA 的肿瘤细胞系不能有效清除，或者特异性诱导 T 细胞对 BCMA 阴性细胞有非特异性杀伤效应，或者由于治疗后导致的 BCMA 表达突变及下调等。

因此，需要一种新的 BCMA 的抗体，以及基于此构建的抗 GPRC5D/BCMA/CD3 三特异性抗体，其能够克服上述缺点，诱导 T 细胞杀伤最优及因子释放水平较低。

发明内容

本发明首先提供了一种新型的抗 BCMA 抗体，例如 VHH 抗体或包含 VHH 的抗体如 VHH-Fc，以及应用其构建的与 CD3 抗体的双特异性抗体。

在一些实施方案中，抗 BCMA 抗体以高亲和力特异性结合 BCMA（例如人 BCMA）。在一些实施方案中，抗 BCMA 抗体与表达 BCMA 的细胞例如内源性表达 BCMA 的肿瘤细胞结合。

本发明的抗 CD3/BCMA 双特异性抗体具有以下一种或多种特性：

(1) 与人 BCMA 结合，例如与细胞上表达的人 BCMA 结合，例如以高亲和力与 BCMA 结合；

(2) 特异性诱导 T 细胞杀伤 BCMA 阳性肿瘤细胞和/或对 BCMA 阴性细胞没有（例如显著的）非特异性杀伤效应；

(3) 具有较好的细胞因子诱导特异性；例如仅在表达 BCMA 的细胞（例如 BCMA 阳性肿瘤细胞）中诱导细胞（例如 T 细胞）释放细胞因子，例如干扰素，如 IFN γ ；肿瘤坏死因子如 TNF α 和/或白细胞介素如 IL-6；

(4) 诱导细胞因子释放的趋势与其对 BCMA 阳性细胞的杀伤结果一致，例如，杀伤效应越强，因子释放越高；

(5) 有效治疗 BCMA 相关的适应症。

本发明还提供了一种新型的抗 GPRC5D 抗体，例如 VHH 抗体或包含 VHH 的抗体如 VHH-Fc，以及应用其构建的与 BCMA 抗体、CD3 抗体的多特异性抗体。

本发明还提供了一种同时靶向 BCMA 和 GPRC5D 的多特异性抗体，其既可以覆盖 BCMA 阳性患者，又可以覆盖 GPRC5D 阳性的患者，同时还能避免因单一靶点表达下调或者不表达导致的免疫逃逸而病情复发，从而提高治疗效果，带来临床收益。

因此，本发明构建了 BCMA/GPRC5D/CD3 的三特异性抗体，通过调整 CD3 抗体的位置和 BCMA/GPRC5D 抗体的位置，进行多种组合，筛选得到诱导 T 细胞杀伤最优及因子释放水平较低的三特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA/GPRC5D/CD3 三特异性抗体具有以下一种或多种特性：

(1) 与人 BCMA、人 GPRC5D 和人 CD3 特异性结合，例如与表达人 BCMA 和人 GPRC5D 蛋白的细胞（例如内源性表达人 BCMA 和人 GPRC5D 的肿瘤细胞）表面的蛋白结合，例如其不结合 GPRC5D 之外的其他 GPRC 家族成员，例如不结合 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C，或与其结合很弱；

(2) 特异性诱导 T 细胞杀伤 BCMA 和/或 GPRC5D 阳性肿瘤细胞；

(3) 特异性激活 T 细胞（例如如 CD25 和/或 CD69 表达提高所显示的），例如优于已知对照抗体，且促进 T 细胞凋亡（例如如 PD1 和/或 TIM3 表达提高所显示的）；

(4) 具有较好的细胞因子诱导特异性；例如仅在表达人 BCMA 和/或人 GPRC5D 的细胞（例如 BCMA 和/或 GPRC5D 阳性肿瘤细胞）中诱导细胞（例如 T 细胞）释放细胞因子，例如干扰素，如 IFN γ ；肿瘤坏死因子如 TNF α 和/或白细胞介素如 IL-6；

(4) 诱导细胞因子释放的趋势与其对表达人 BCMA 和/或 GPRC5D（BCMA 阳性和/或 GPRC5D 阳性）的细胞的杀伤结果一致，例如，杀伤效应越强，因子释放越高；

(5) 特异性诱导 T 细胞杀伤表达人 BCMA 和/或 GPRC5D（BCMA 阳性和/或 GPRC5D 阳性）的肿瘤细胞（例如杀伤活性强于对照），且对 BCMA 和 GPRC5D 阴性的细胞无非特异性杀伤；

(6) 在 BCMA 和 GPRC5D 阴性的细胞中没有（例如显著的）促进 T 细胞因子释放作用；

(7) 特异性结合表达人 BCMA 和/或 GPRC5D（BCMA 阳性和/或 GPRC5D 阳性）的肿瘤细胞，且结合活性比对照强；

(8) 体内治疗肿瘤，例如抑制肿瘤生长和/或不影响动物体重。

附图说明

图 1 显示双特异性抗体结构图。

- 图 2 显示抗人 BCMA 嵌合抗体对表达人 BCMA 蛋白细胞系的结合。
- 图 3 显示抗人 BCMA 人源化抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的结合。
- 图 4 显示双特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白细胞系的结合。
- 图 5 显示双特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的特异性杀伤。
- 图 6 显示双特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的杀伤体系中因子的释放。
- 图 7 显示三特异性抗体结构图。
- 图 8 显示三特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的结合。
- 图 9 显示三特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的杀伤。
- 图 10 显示三特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的杀伤体系中 T 细胞激活和衰竭标志物检测结果。
- 图 11 显示三特异性抗体对表达人 BCMA 蛋白肿瘤细胞系的杀伤体系中因子的释放。
- 图 12 显示三特异性抗体与对照双抗单用及联用对多发性骨髓瘤肿瘤细胞系 MOLP8 的杀伤结果。
- 图 13 显示三特异性抗体与对照双抗单用及联用对多发性骨髓瘤细胞系 MOLP8 的杀伤体系中 $\text{TNF}\alpha$ 的释放。
- 图 14 显示三特异性抗体与对照双抗及三抗对多发性骨髓瘤肿瘤细胞系 ARD 和 AMO-1 的结合。
- 图 15 显示三特异性抗体与对照双抗及三抗对多发性骨髓瘤肿瘤细胞系 ARD 的杀伤结果。
- 图 16 显示三特异性抗体与对照双抗及三抗对多发性骨髓瘤肿瘤细胞系 AMO-1 的杀伤结果。
- 图 17 显示三特异性抗体与对照双抗及三抗对多发性骨髓瘤肿瘤细胞系 ARD 的杀伤体系中 $\text{TNF}\alpha$ 的释放。
- 图 18 显示三特异性抗体与对照双抗及三抗对多发性骨髓瘤肿瘤细胞系 AMO-1 的杀伤体系中 $\text{TNF}\alpha$ 的释放。
- 图 19 显示三特异性抗体在 NCI-H929 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤作用。
- 图 20 显示三特异性抗体在 MOLP8 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤作用。
- 图 21 显示了对驼源抗 GPRC5D VHH 抗体结合人 GPRC5D 蛋白的检测。
- 图 22 显示了对驼源抗 GPRC5D VHH 抗体结合食蟹猴 GPRC5D 蛋白的检测。
- 图 23 显示了对人源化抗 GPRC5D VHH-Fc 抗体结合 GPRC5D 的检测。
- 图 24 显示了对人源化抗 GPRC5D VHH 抗体结合 GPRC5A 的检测。
- 图 25 显示了对人源化抗 GPRC5D VHH 抗体结合 GPRC5B 的检测。
- 图 26 显示了对人源化抗 GPRC5D VHH 抗体结合 GPRC5C 的检测。

发明详述

应理解本发明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，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。

I. 定义

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任何其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中当提及“第一”“第二”时，仅为了区分两个结构域或两条链，而不以任何方式表明两个结构域的位置。

本文所使用的术语“BCMA”指肿瘤相关抗原 B 细胞成熟抗原，也称为 BCMA，TR17_人，TNFRSF17(例如，登录号 UniProt Q02223 下的人 BCMA 蛋白)。在一个实施方案中，本发明的人 BCMA 蛋白包含 SEQ ID NO:77 所示的氨基酸序列(或其不含人 Fc 标签的序列)，或具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一个实施方案中，本发明的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段或三特异性抗体中的结合 BCMA 的抗原结合区对表达人 BCMA 的细胞具有高亲和力结合活性，例如具有比对照抗体(例如 269B094)更高的结合亲和力。在一个实施方案中，通过流式细胞术测定。

本文所使用的术语“CD3”指表达在 T 细胞上作为多分子 T 细胞受体(TCR)的部分的抗原，即 T 细胞衔接抗原 T 细胞表面糖蛋白 CD3，其是由下列四条受体链中的二条链所形成的同源二聚体或异源二聚体所组成：CD3-ε、CD3-δ、CD3-ζ 和 CD3-γ。人类 CD3-ε(hCD3ε)包含 UniProtKB/Swiss-Prot: P07766 中所述的氨基酸序列。人类 CD3-δ(hCD3δ)包含 UniProtKB/Swiss-Prot: P04234 中所述的氨基酸序列。在一些实施方案中，本发明所述的 CD3 是指来自人或猴(例如食蟹猴)的 CD3。

本文所使用的术语“结合 CD3 的抗体”或“抗 CD3 抗体”包含特异性识别单一 CD3 亚单元(例如 ε、δ、γ 或 ζ)或与其结合的抗体和其抗原结合片段，以及特异性识别两个 CD3 亚单元的二聚复合物(例如，γ/ε、δ/ε 和 ζ/ζCD3 二聚体)以及与其连结的抗体和其抗原结合片段。本发明的抗体和抗原结合片段可与可溶性 CD3、结合 CD3 和/或细胞表面表达的 CD3 结合。可溶性 CD3 包含天然的 CD3 蛋白以及重组的 CD3 蛋白变体，例如，缺乏跨膜区或另外不与细胞膜结合的单体和二聚体 CD3 结构。在一个实施方案中，本发明的多特异性抗体中的结合 CD3 中的抗原结合区可以对 CD3 或表达 CD3 的细胞(例如 T 细胞)具有较低的结合活性。可以通过流式细胞术检测或生物膜层光学干涉技术检测，检测抗体对 CD3 的结合亲和力。优选地，

在本发明的三特异性抗体分子中，结合 CD3 的抗原结合区对人或猴（食蟹猴）CD3 的结合亲和力在 1-1000nM 之间。在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中的结合 CD3 中的抗原结合区以较低的结合亲和力结合人类和/或猴（例如食蟹猴）CD3 从而能够激活人类和/或猴（例如食蟹猴）的 T 细胞。

效应细胞包含效应 T 细胞(T 淋巴细胞)，例如 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、Th1、Th2 和调节 T 细胞(Tregs)。效应细胞还可以包含自然杀伤细胞、巨噬细胞、粒细胞、浆细胞或 B 细胞(淋巴细胞)。

术语“GPCR5D”指肿瘤相关抗原 G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D (例如，登录号 NP_061124.1 下的人 GPCR5D 蛋白或 XP_005570249.2 下的食蟹猴 GPCR5D 蛋白)。在一个实施方案中，本发明的人 GPCR5D 蛋白包含 SEQ ID NO:108 所示的氨基酸序列，或具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一个实施方案中，本发明的三特异性抗体中的结合 GPCR5D 的抗原结合区对表达人 GPCR5D 的细胞具有高亲和力结合活性，例如具有比对照抗体(例如 GC5B596)更高的结合亲和力。在一个实施方案中，通过流式细胞术测定。在一个实施方案中，本发明的三特异性抗体中的结合 GPCR5D 中的抗原结合区对人和猴（例如食蟹猴）GPCR5D 具有交叉反应性，即能结合人和猴（例如食蟹猴）GPCR5D。

术语“全抗体”、“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指天然存在的包含由二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 区和 VL 区可以进一步再划分为超变区（为互补决定区(CDR)，其间插有较保守的区域（为构架区(FR)）。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是显示出多种效应子功能。在一些实施方案中，本发明的抗体重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的 IgG1 的重链恒定区。在一些实施方案中，重链恒定区包含 LALA 突变。在一些实施方案中，重链恒定区包含 D265A 和 P329A 突变。在一些实施方案中，重链恒定区包含 LALA 突变和 D265A 和 P329A 突变。在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体分子的重链恒定区包含“knob into hole 突变”。在一些优选的实施方案中，本发明的抗体重链恒定区 HC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:89 或 92 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:89 或 92 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 89 或 92 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区 LC 为 Lambda 或 Kappa 轻链恒定区。在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区 LC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:91 或 93 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 91 或 93 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 91 或 93 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

术语“抗原结合片段”是比完整或完全抗体的氨基酸残基数要少的完整或完全抗体的一部分或一段，其能结合抗原或与完整抗体(即与抗原结合片段所来源的完整抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链 Fv、双体抗体(diabody)、单结构域抗体(sdAb)。所述 Fab 片段是一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段，例如，通过木瓜蛋白酶消化完全抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 F(ab')₂，其为 Fab' 的二聚体，是二价的抗体片段。F(ab')₂ 可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原，由此将 F(ab')₂ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有铰链区的 Fab 片段(其它抗体片段的更详细的描述请参见：基础免疫学(Fundamental Immunology), W. E. Paul 编辑, Raven Press, N.Y. (1993))。所述 Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。另外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由独立的基因编码，但是使用重组方法，可以将它们通过能够使这两个结构域作为单条蛋白链产生的合成性连接肽连接，在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv(scFv)。可以通过化学方法、重组 DNA 方法或蛋白酶消化法获得所述抗体片段。

“Fab 片段”或“Fab”在本文中可互换使用，用于指，由两条多肽链组成的、包含免疫球蛋白重链可变结构域 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变结构域 VL 和轻链恒定结构域 CL 的免疫球蛋白片段，其中，一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VH 和选自 CH1 和 CL 的一个恒定区，另一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VL 和选自 CL 和 CH1 的另一恒定区，其中所述 VH 结构域和 VL 结构域配对形成抗原结合位点。在本文中，包含重链恒定区 CH1 的 Fab 链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 链也称作“Fab 轻链”。

术语“VHH”或“VHH 抗体”在本文中可互换使用，通常指这样的抗体，其仅包含一个重链可变区或由其组成，具有与抗原结合的活性。VHH 通常包含三个 CDR 与高度保守的 4 个构架区中，并且通常具有下式的结构：FR1-CDR-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，其中 FR1 至 FR4 指构架区 1 至 4；CDR1 至 CDR3 指互补决定区 1-3。VHH 可变区中的 CDR 序列可以按照“定义”部分描述的任何 CDR 定义方案进行确定，优选可以通过 IMGT 来定义可变区序列中的三个 CDR 的边界。VHH 通常仅包括从缺乏轻链的重链抗体衍生的重链可变结构域，也称作纳米抗体。本发明中使用的 VHH 优选来自骆驼科动物，例如羊驼，或是其人源化形式或序列优化形式(例如，以增加结合亲和力的亲和力成熟形式)。在一些实施方案中，本发明的 VHH 为由或基本上由单个重链可变区(例如重链抗体的重链可变区)组成的单价单特异性多肽分子。

本发明的单域抗体或 VHH 也可以包含在更大的多肽/蛋白中。包含本发明 VHH 的多肽/蛋白例子包括但不限于，重链抗体(HcAb)或多特异性抗体或融合蛋白。

本发明所述的“重链抗体”是指不具有轻链的抗体，例如其从 N 端到 C 端可以包含 VH-Fc 或 VH-CH2-CH3 或 VH-铰链区-CH2-CH3，或可以包含 VH-CH1-CH2-CH3。本发明的重链抗体还可以涵盖同型二聚体，例如不具有轻链的重链二聚体抗体。重链抗体中可以包含来自标准抗体的 VH 或者来自单域抗体的 VH。例如，重链抗体中的 VH 可以就是 VHH。在一些实施方案中，本发明的重链抗体可以是具有源自骆驼科动物(美洲驼、骆驼，尤其是羊驼)的

构架区和/或重链恒定区的重链抗体，其人源化形式或其序列优化形式(亲和力成熟形式)、或其片段(例如包含至少部分恒定区的片段)。本发明的重链抗体还涵盖将重链可变区或 VHH 与 Fc 区(例如人 IgG Fc 区，例如人 IgG1 或 IgG4Fc 区)融合后形成的抗体。当在重链抗体或多特异性抗体或融合蛋白的背景下提及“VHH”时，应当理解，其为多特异性抗体中的一部分，而不作为一个单独的分子。

术语“靶标”是指结合分子所针对的被结合物。靶标可以是抗原，也可以是配体或受体。

术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。如本文所用，术语“表位”指抗原中与抗体分子特异性相互作用的部分。

如本文所用的术语“靶标结合区”是指多特异性结合分子，例如双特异性结合分子的结合特定靶标或抗原的部分。靶标结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种靶标结合区可以具有或不具有独立于多特异性抗体分子的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。靶标结合区还可以是受体或配体，或受体的能够结合配体的结构域。在多特异性抗体时，也将“靶标结合区”称为“抗原结合区”。在一个实施方案中，用于本发明多特异性抗体分子的抗原结合区包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)组成的 VH/VL 对，所述 VH/VL 对可以包含在单一多肽链(例如在 scFv)中或包含在分离的两条多肽链(例如分别在 Fab 重链和 Fab 轻链)中。在一个实施方案中，用于本发明的多特异性抗体分子的抗原结合区可以是 Fab。在一个实施方案中，用于本发明的多特异性抗体分子的抗原结合区可以仅包含 VH，例如来自 VHH，例如是 VHH。

如本文所用，术语“单特异性”抗体指具有一个或多个结合区的抗体，所述位点中的每一个结合区与相同抗原的相同表位结合。例如，本发明提供了针对 BCMA 的单特异性抗体。

如本文所用，术语“多特异性”抗体指具有至少两个抗原结合区的抗体，所述至少两个抗原结合区中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。多特异性抗体是对至少两个不同抗原表位具有结合特异性的抗体。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性抗体，其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性。例如，本发明提供了针对 BCMA 和 CD3 的双特异性抗体。在一个实施方案中，本文提供了这样的三特异性抗体，其具有针对第一抗原、第二抗原和第三抗原的结合特异性。例如，本发明提供了针对 BCMA、GPC5D 和 CD3 的三特异性抗体。

术语“多特异性结合分子”是指至少是双特异性的多特异性结合分子，例如双特异性结合分子，即所述分子包含至少第一靶标结合区和第二靶标结合区，其中所述第一靶标结合区结合一种靶标且所述第二靶标结合区结合另一靶标。因此，根据本发明的多特异性结合分子包含对于至少两种不同的靶标的特异性。根据本发明的分子也涵盖包含多个靶标结合区的多特异性分子，诸如三特异性结合分子。在一些实施方案中，在结合分子是抗体的情况下，靶标是抗原。在一些实施方案中，本发明的多特异性结合分子是双特异性抗体或三特异性抗体。

当在双特异性抗体或三特异性抗体中提及“第一抗原结合区”时，是指结合第一抗原的结合区，而不意图限制抗体中所含的该抗原结合区的个数，例如多特异性抗体中可以包含 1 个或 1 个以上的第一抗原结合区。例如，三特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区和第三抗原结合区，但是可以包含 1 个或 1 个以上的第一抗原结合区和 1 个或 1 个以上的第二抗原结合区和 1 个或 1 个以上的第三抗原结合区。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体分子包含至少一个特异性结合 CD3 的抗原结合区和至少一个特异性结合 BCMA 的抗原

结合区。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体分子包含一个特异性结合 CD3 的抗原结合区和一个或两个特异性结合 BCMA 的抗原结合区。在一些实施方案，本发明的三特异性抗体分子包含至少一个特异结合 GPRC5D 的抗原结合区、至少一个特异结合 BCMA 的抗原结合区，以及至少一个特异结合 CD3 的抗原结合区。在一些实施方案，本发明的三特异性抗体分子包含一个特异结合 GPRC5D 的抗原结合区、一个特异结合 BCMA 的抗原结合区，以及一个特异结合 CD3 的抗原结合区。

当提及“抗原结合区来源于抗体”时，是指构成该抗原结合区的结合结构域为或衍生自该抗体的特异性结合抗原的结合结构域，例如，抗原结合区的特异性结合抗原的片段例如 Fab 为或衍生自该抗体的相应片段例如 Fab，或抗原结合区的重链可变区和/或轻链可变区为或衍生自该抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者该抗原结合区的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个 CDR 为该抗体的 CDR。术语“衍生自”是指在抗原结合区中的片段与其所来源的抗体的片段基本相同，但是在一个或多个位点处具有突变，例如取代、缺失或添加。在一个具体的实施方案中，所述突变不在抗体的 CDR 中。在一个具体的实施方案中，所述突变不在抗体的可变区中。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变区通常具有相似的结构，其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派方案的任一种或其组合确定，所述指派方案包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。

以下为采用 kabat、AbM、Chothia、Contact 和 IMGT 方案定义的 CDR 的区域范围。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案	IMGT 方案
LCDR1 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	L27-L32
LCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	L50-L51
LCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	L89-L97

Chothia 编号系统)					
HCDR1 (Kabat 编号系统)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34	H30-H35B	H26-H35B
HCDR1 (Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	H26-H33
HCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58	H51-H56
HCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	H93-H102

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置(包括重链可变区残基和轻链可变区残基)时，是指根据 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中的 Kabat 编号系统的编号位置。

在一本实施方案中，本发明 VHH 抗体中的 HCDR 按照 IMGT 方案确定。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”或“Fc 片段”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5257969/>)中所述的 EU 编号体系(也称作 EU 索引)进行编号，还参见 http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html。在本文中，术语“Fc 结构域”或“Fc 区”或“Fc 片段”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的部分铰链区，例如 EPKSS 或 EPKSC。在一些实施方案中，适用于本发明的重链恒定区 Fc 来自抗体重链恒定区，例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区，优选来自 IgG1 的恒定区。在一些实施方案中，Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如 LALA 突变、D265A 突变和/或 P329A 突变，优选地包含 LALA 突变和 D265A 和 P329A 突变。在一些实施方案中，Fc 包含 SEQ ID NO:80、90、97 或 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列，或包含与其具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。在本发明的一些实施方案中，Fc 片段二聚化构成 Fc 二聚体。在一些实施方案中，Fc 片段异二聚化为 Fc 异二聚体。在 Fc 片段异二聚化为异二聚体的情况下，Fc 片段可以包含用于异二聚化的突变，例如 knob into hole 突变。

免疫球蛋白的“效应子功能”的例子包括：C1q 结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、Fc 受体结合作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细

胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、下调细胞表面受体(例如 B 细胞受体)和 B 细胞活化。

术语“嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中(a)将恒定区或其部分改变、替换或交换,从而抗原结合位点与不同的或改变的类别、效应子功能和/或物种的恒定区或赋予嵌合抗体新性能的完全不同的分子(例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物)等连接;或(b)将可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。例如,小鼠抗体可以通过将其恒定区更换为来自人免疫球蛋白的恒定区进行修饰。由于更换为人类恒定区,该嵌合抗体可以保留其在识别抗原方面的特异性,同时如与原始小鼠抗体相比,具有在人类中降低的免疫原性。

“人源化抗体”是一种保留非人类抗体(例如驼源 VHH 抗体)的抗原特异性反应性,同时作为治疗药对人施用时免疫原性较低的抗体。这可以例如通过保留非人类抗原结合位点并将抗体的剩余部分替换成它们的人类相应部分(即,将可变区中不参与结合的部分替换为人类抗体的相应部分)来实现。

如本文所用,术语“抗”、“结合”或“特异性结合”意指结合作用对靶标或抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。结合位点与特定靶标或抗原结合的能力可以通过流式细胞术或酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法(SPR)测定。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由解离常数(K_D)表示,解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是 K_{dis} 和 K_{on})的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后,并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时,候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。在一些实施方案中,本发明考虑本发明抗体分子的变体,所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子及其序列而言具有相当程度的同一性,例如同一性为至少 80%,85%,90%,95%,97%,98%或 99%或更高。所述变体可以包含保守性改变,或为保守性修饰变体。

对于多肽序列,“保守性改变”包括对多肽序列的置换、缺失或添加,但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。例如,保守性置换常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下列出了 8 组含有互为保守替换的氨基酸:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中,术语“保守序列改变”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的本发明抗体分子或结合蛋白分子的目的抗原结合特征的氨基酸修饰。例如保守修改变体相对于亲本抗体或结合蛋白保持对目的抗原至少 80%,85%,90%,95%,98%,99%或更高,例如 100-110%或更高的结合亲和力。

“knob-in-hole”突变或“结入扣”突变在本文中用于指,利用“结入扣”技术,在第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽中分别引入突变,以在第一 Fc 多肽的界面上与在第二 Fc 多肽的界面上形成凸起(“结(knob)”)和互补的空穴(“扣(hole)”)。本领域已知,“knob-in-hole”技术可在抗体分子的

不同链之间改造界面，以促进抗体分子的各链正确缔合。通常，该技术涉及在一条链的界面引入“凸起/结”，在欲与之配对的另一条链的界面引入相应的“空穴/扣”，使得凸起可置于空穴中。一个优选的界面包含一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域和欲与之配对的另一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域。可通过将来自一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域的界面的小氨基酸侧链替换为较大的侧链（例如酪氨酸或色氨酸）来构建凸起。通过将大氨基酸侧链替换为较小的侧链（例如丙氨酸或苏氨酸），在欲配对的另一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域的界面构建与凸起相同或相似大小的补偿性空穴。另一可选的界面是上文所述 Fab 片段的包含轻链的 CL 结构域和重链的 CH1 结构域，通过构建凸起-空穴相互作用促进 Fab 片段的两条链之间发生正确的异二聚化。

在本文中，抗体恒定区或抗体恒定结构域，包括 CH1, CL 和 Fc 结构域以及构成 Fc 结构域的 CH2, CH3 和可选的 CH4 结构域，可以根据抗体分子的预期功能进行选择。例如，恒定区可以是 IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM 区，尤其是人 IgG 的免疫球蛋白恒定结构域，例如，人 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 的恒定结构域，优选人 IgG1 的恒定结构域。免疫球蛋白恒定区可以具有天然序列或变体序列。

如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接双特异性结合分子的不同部分的任何分子。在不同分子部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中，接头是肽接头（又称为“连接肽”），其是指是指由氨基酸组成的短氨基酸序列，例如单独或组合使用的甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)，或来自免疫球蛋白的铰链区，用于将结合分子的第一部分的氨基酸序列连接至结合分子的第二部分。例如，肽接头可以将结合分子的第一靶标结合区连接至第二靶标结合区。例如，肽接头也可以将抗体的一部分连接至抗体的另一部分，诸如将轻链可变区连接至重链可变区。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。在一个实施方案中，连接肽具有 5-50 个氨基酸长度，例如，10,15,20,25,30 个氨基酸长度。在一个实施方案中，连接肽包含氨基酸序列(GS)_n、(GG)_n、(GGSG)_n、(GSGG)_n、(GGGG)_n、(GGGS)_n 和 (GGGGG)_nG，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、4、5、6、7、8、9、10 的整数。有用的接头还包括甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。在一些实施方案中，所述肽接头是 (GGGGG)_n，其中 n=1、2、3 或 4，例如 SEQ ID NO:95、99 或 100 所示的序列。在一些实施方案中，所述肽接头是 SEQ ID NO:101 所示的序列。

在再一实施方案中，连接肽为来自免疫球蛋白的铰链区或铰链区部分，包括天然的铰链区或其部分，或者突变的铰链区或其部分。在一个实施方案中，连接肽例如是免疫球蛋白（例如 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的铰链区或其部分（例如 EPKSC）或是突变的铰链区或其部分，例如 EPKSS。或者，可以使用计算机程序模拟蛋白和肽的三维结构，或通过噬菌体展示方法，来合理地设计合适的柔性连接肽。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的组织，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。术

语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体，其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体是人。

术语“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转疾病的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤，例如癌症中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂)。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

“化疗剂”包括在治疗癌症或免疫系统疾病中有用的化学化合物。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程的有机化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更不易于引发免疫应答。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包含免疫抑制剂。在一些实施方案中，本发明的免疫调节剂包括免疫检查点抑制剂或免疫检查点激动剂。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数或改善可度量参数至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 甚至 100%。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有

癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。术语“肿瘤”涵盖实体瘤和血液肿瘤。

术语“抗肿瘤作用”或“抑瘤作用”或“肿瘤抑制作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于例如,肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药物组合或组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品,包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分(例如,(i)本发明的抗体或多特异性抗体、以及(ii)其他治疗剂)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者,其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择,从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式,其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式(例如放射疗法或手术)以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者,这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外,这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下,治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品;血液或任何血液组分;体液,诸如泪液、玻璃体液、脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液;来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。在一些实施方案中,组织样品是肿瘤组织。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

II. 抗 BCMA 抗体

本发明一方面提供一种 BCMA 抗体,其具有与 BCMA 的更高的结合亲和力。在一些实施方案中,本发明的 BCMA 抗体适用于构建多特异性抗体分子中的抗原结合区。

在一些实施方案中,本发明的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段以更高的亲和力结合 BCMA(例如人 BCMA)。在一些实施方案中,本发明的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段能够以高亲和力结合人 BCMA,例如其 K_D 值小于或等于约 0.5nM,例如小于或等于约 5、4、3、2 或 1pM。

在一些实施方案中,本发明的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段与细胞表达的 BCMA 结

合。在一些实施方案中，通过流式细胞术测定抗 BCMA 抗体与细胞表达的 BCMA 的亲和力。

单域抗体

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 抗体是单域抗体，特别是 VHH 抗体。

单域抗体或 VHH 抗体具有人 IgG 分子大约十分之一的分子量，以及仅几纳米的物理直径。由于小的分子尺寸，单域抗体相比常规的四链抗体具有如下优势：高稳定性和溶解性，以及能够识别隐藏抗原性位点。此外，单域抗体在制备上也比常规的四链抗体更为便宜。除了作为单独分子应用外，单域抗体也是构建多特异性分子的适宜组件。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 单域抗体是包含重链可变区或由所述重链可变区组成的 VHH 抗体，所述重链可变区通常具有以下结构：FR1-VHH CDR1-FR2-VHH CDR2-FR3-VHH CDR3-FR4，其中 FR1 至 FR4 指构架区 1 至 4；VHH CDR1 至 VHH CDR3 指互补决定区 1-3。VHH 可变区中的 CDR 序列可以按照“定义”部分描述的任何 CDR 定义方案进行确定，优选可以通过 IMGT 来定义 VHH 序列中的三个 CDR 的边界。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 抗体包含

(i) SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22 或 23 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR)，或

(ii) 相对于 (i) 的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的序列；

优选地，所述 CDR 序列根据 IMGT 定义。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 抗体包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区包含

(i) SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22 或 23 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR)，或

(ii) 相对于 (i) 的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的序列；

优选地，所述 CDR 序列根据 IMGT 定义。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 抗体包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3。在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3。

在一些实施方案中，VHH CDR1 包含选自 SEQ ID NO: 1、5、或 19 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 VHH CDR1 包含与选自 SEQ ID NO: 1、5、或 19 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO: 2、6、9、13 或 17 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 VHH CDR2 包含与 SEQ ID NO: 2、6、9、13 或 17 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，VHH CDR3 包含选自 SEQ ID NO: 3、7 或 20 的氨基酸序列或由所述

氨基酸序列组成，或者 VHH CDR3 包含与选自 SEQ ID NO: 3、7 或 20 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在一个实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 抗体包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3，其中

(i) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 9 或 13 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由其组成；

(ii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；

(iii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；或

(iv) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个实施方案中，本发明的抗 BCMA VHH 抗体包含重链可变区或由其组成，其中所述重链可变区包含互补决定区域 (CDR) VHHCDR1、VHHCDR2 和 VHHCDR3，其中

(i) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 9 或 13 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由其组成；

(ii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；

(iii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；或

(iv) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 抗体包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22 或 23 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22 或 23 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22 或 23 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 的 VHH 抗体包含选自 SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22 或 23 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的 VHH 抗体包含源自通过免疫骆驼科动物(例如羊驼)产生的骆驼重链抗体的 CDR 氨基酸序列和/或构架(FR)氨基酸序列。在一些实施方案中，源自骆驼重链抗体的本发明 VHH 单抗可以进行工程化，例如，以包含源自人氨基酸序列(即，人抗体)或其他非骆驼科哺乳动物物种的构架区序列。在一个实施方案中，为进一步改善工程化抗体的性质（例如亲和力），可以在工程化抗体中，在一个或多个位置（例如构架区），通过回复突变，引入在亲本骆驼源抗体中位于相应位置的骆驼源氨基酸残基。

在一个实施方案中，本发明的 VHH 抗体是人源化抗体。人源化可以通过如下方式实现：将非人源的天然 VHH 序列(例如来自骆驼科动物或羊驼免疫的 VHH 序列)中的一个或多个氨基酸残基，尤其是构架区序列，置换成来自人的常规抗体的重链 VH 相应位置的残基。人源化 VHH 的方法在本领域中是熟知的，例如实施例 3 中所述的方法。通常，人源化置换以保持单域抗体的有利结合性质的方式进行。本领域熟知用于确定人源化单域抗体的生物学性质，例如结合亲和力等的试验，以确定和选择适宜的人源化残基突变或突变组合。

在一些实施方案中，可以通过包括如下步骤的方法，获得本发明人源化的单域抗体：

确定亲本单域抗体(例如来自噬菌体展示文库筛选的骆驼源 VHH 抗体)的 CDR 环结构；

在人种序列数据库为每个 V / J 区域找到最接近的同源序列作为模板，例如通过比对 IMGT 人类抗体重链可变区种系基因数据库（<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>），挑选与 VHH 抗体源性高的重链可变区种系基因作为模板；

将 VHH 抗体的 CDR 分别移植到挑选的相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列，优选，用于替代的构架序列，与待人源化抗体的构架序列，具有结构相似性，例如，具有的序列同一性至少为 80%，85%，90%，或 95%、96%、97%、98%、99%以上；

根据需要，将 FR 区中关键氨基酸回复突变为 VHH 抗体对应的氨基酸，以保证原有的亲和力，即得到人源化抗 BCMA VHH 抗体，任选地测序 VHH 抗体。

在一些实施方案中，回复突变位点选自构架（FR）中的一个或多个。

在一些实施方案中，适用于本发明 VHH 抗体人源化的重链可变区种系基因选自 IGHV3-53*02 或 IGHV3-53*03。

在一些实施方案中，本发明也提供本发明单域抗体（特别是 VHH 抗体）的功能性变体。所述功能性变体可以采用本发明熟知的方法，例如通过随机或定点诱变，将突变引入本发明的示例性单域抗体的编码核酸序列中，例如引入 CDR 序列和/或 FR 序列中，并随后筛选（例如通过噬菌体展示文库筛选）保持期望性质的变体，来获得功能性变体。通常，功能性变体保持与亲本单域抗体(或 VHH)显著的序列的同一性。优选地，功能性变体保持亲本单域抗体

(或 VHH)的期望生物学性质,例如,相对于亲本的生物活性,变体具有相当(例如,至少 50%, 60%, 70%, 80%, 优选地 90%以上)的生物活性,或改善的生物活性(例如 110-150%或更高)。所述的期望生物学性质包括例如,但不限于,目的抗原(例如 BCMA)结合亲和力(如通过 KD 值量度),阻断目的抗原与受体结合的活性(例如通过 IC50 值量度),在体外或体内实验中激活 T 细胞的活性(例如通过释放的细胞因子量度),在体外或体内实验中抑制肿瘤生长/存活。

在一些实施方案中,本发明提供本发明 VHH 多肽的亲和力变体。优选地,所述亲和力变体表现出相对于其来源亲本单域抗体在氨基酸序列上的一个或多个氨基酸变化,其中亲和力变体相比亲本抗体具有改变的对目的抗原的结合亲和力。

重链抗体

在本发明的另一方面中,本发明也提供了包含本发明的 VHH 抗体重链可变区的重链抗体。

在一些实施方案中,可以将本发明的单域抗体或 VHH(例如驼源 VHH 或其人源化形式),与人抗体的恒定区或其一部分例如 Fc 区连接,以产生包含 VHH-恒定区或 VHH-CH1-Fc 或 VHH-Fc 的重链抗体。在一个实施方案中,所述重链抗体包含本发明的 VHH 抗体和位于其 C 端的 Fc 区。在一些实施方案中,通过铰链区或其一部分,例如来自 IgG 的铰链区(例如 IgG1、2、3 或 4 的铰链区)或其部分连接 VHH 与 Fc。

在一些实施方案中,本发明的抗 BCMA 重链抗体包含如本文定义的 VHH 或其中的重链可变区,以及重链恒定区或重链恒定区的 Fc 区。在一些实施方案中,在 VHH 或其重链可变区与重链恒定区或 Fc 区之间包含连接肽,例如抗体铰链区或其部分,例如来自 IgG 的铰链区或其部分(包括天然或突变的 IgG 铰链区或其部分)。

在一些实施方案中,所述连接肽是来自人 IgG1、2、3 或 4 的铰链区或其部分,包括天然或突变的铰链区或其部分,例如来自人 IgG1 铰链区,例如所述连接肽是 EPKSS (SEQ ID NO:94) 或 EPKSC (SEQ ID NO:96)。

在一个实施方案中,所述重链抗体包含来自驼科动物(例如羊驼)的 Fc 区或其部分。在一个实施方案中,通过免疫所述驼科动物例如羊驼产生并分离所述的重链抗体。本领域已知多种方式可用于免疫驼科动物和分离产生的针对目的抗原的 VHH 抗体或重链抗体。

在一些实施方案中,所述重链抗体包含来自人或非人灵长类动物(例如食蟹猴)抗体的恒定区,例如来自人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 的恒定区。

在一些实施方案中,所述重链抗体包含来自人或非人灵长类动物(例如食蟹猴)的 Fc 部分。在再一实施方案中,所述重链抗体包含人 IgG Fc 区,例如人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 Fc 区,优选地人 IgG1 或人 IgG4Fc 区,如人 IgG1 Fc 区。

在一个实施方案中,根据本发明的重链抗体可以通过 Fc 区,与包含 Fc 区的另一多肽链(例如相同或不同的另一重链抗体)二聚化。因此,在一个实施方案中,本发明也提供了包含本发明重链抗体的同源或异源多聚体蛋白质。在一个优选的实施方案中,优选所述蛋白包括两条相同重链抗体链配对形成的重链抗体。

可以将本发明的 Fc 区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对 Fc 区的突变,如下文所定义的。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段包含重链，所述重链包含重链可变区、Fc 区，以及连接重链可变区和 Fc 区的连接肽。优选地，连接肽包含 SEQ ID NO:94 或 96 所示的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段包含重链或由其组成，所述重链包含本发明 VHH 的重链可变区、连接肽和 Fc 区或由其组成，其中所述重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:44-46 和 48-55 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 44-46 和 48-55 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO:44-46 和 48-55 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

III. 抗 GPRC5D 抗体

本发明还提供一种 GPRC5D 抗体，其具有与 GPRC5D 的更高的结合亲和力。在一些实施方案中，本发明的 GPRC5D 抗体适用于构建多特异性抗体分子中的抗原结合区。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体是单域抗体，特别是 VHH 抗体。

单域抗体或 VHH 抗体具有人 IgG 分子大约十分之一的分子量，以及仅几纳米的物理直径。由于小的分子尺寸，单域抗体相比常规的四链抗体具有如下优势：高稳定性和溶解性，以及能够识别隐藏抗原性位点。此外，单域抗体在制备上也比常规的四链抗体更为便宜。除了作为单独分子应用外，单域抗体也是构建多特异性分子的适宜组件。

单域抗体或 VHH 抗体具有人 IgG 分子大约十分之一的分子量，以及仅几纳米的物理直径。由于小的分子尺寸，单域单抗相比常规的四链抗体具有如下优势：高稳定性和溶解性，以及能够识别隐藏抗原性位点。此外，单域抗体在制备上也比常规的四链抗体更为便宜。除了作为单独分子应用外，单域抗体也是构建多特异性分子的适宜组件。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 单域抗体是包含重链可变区或由所述重链可变区组成的 VHH 抗体，所述重链可变区通常具有以下结构：FR1-VHH CDR1-FR2-VHH CDR2-FR3-VHH CDR3-FR4，其中 FR1 至 FR4 指构架区 1 至 4；VHH CDR1 至 VHH CDR3 指互补决定区 1-3。VHH 可变区中的 CDR 序列可以按照“定义”部分描述的任何 CDR 定义方案进行确定，优选可以通过 IMGT 来定义 VHH 序列中的三个 CDR 的边界。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 抗体包含

(i) SEQ ID NO: 27 或 106 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域（CDR），或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列；

优选地，所述 CDR 序列根据 IMGT 定义。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 抗体包含重链可变区或由其组成，所

述重链可变区包含

(i) SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR)，或

(ii) 相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列；

优选地，所述 CDR 序列根据 IMGT 定义。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 抗体包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3。在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3。

在一些实施方案中，VHH CDR1 包含选自 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 VHH CDR1 包含与选自 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 VHH CDR2 包含与 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，VHH CDR3 包含选自 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 VHH CDR3 包含与选自 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在一个实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 抗体包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3，其中 VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一个实施方案中，本发明的抗 GPRC5D VHH 抗体包含重链可变区或由其组成，其中所述重链可变区包含互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3，其中 VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 抗体包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 的 VHH 抗体包含选自 SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的 VHH 抗体包含源自通过免疫骆驼科动物(例如羊驼)产生的驼

科重链抗体的 CDR 氨基酸序列和/或构架(FR)氨基酸序列。在一些实施方案中,源自驼科重链抗体的本发明 VHH 单抗可以进行工程化,例如,以包含源自人氨基酸序列(即,人抗体)或其他非驼科哺乳动物物种的构架区序列。在一个实施方案中,为进一步改善工程化抗体的性质(例如亲和力),可以在工程化抗体中,在一个或多个位置(例如构架区),通过回复突变,引入在亲本驼源抗体中位于相应位置的驼源氨基酸残基。

在一个实施方案中,本发明的 VHH 抗体是人源化抗体。

在一些实施方案中,本发明也提供本发明单域抗体(特别是 VHH 抗体)的功能性变体。所述功能性变体可以采用本发明熟知的方法,例如通过随机或定点诱变,将突变引入本发明的示例性单域抗体的编码核酸序列中,例如引入 CDR 序列和/或 FR 序列中,并随后筛选(例如通过噬菌体展示文库筛选)保持期望性质的变体,来获得功能性变体。通常,功能性变体保持与亲本单域抗体(或 VHH)显著的序列的同一性。优选地,功能性变体保持亲本单域抗体(或 VHH)的期望生物学性质,例如,相对于亲本的生物活性,变体具有相当(例如,至少 50%, 60%, 70%, 80%, 优选地 90%以上)的生物活性,或改善的生物活性(例如 110-150%或更高)。所述的期望生物学性质包括例如,但不限于,目的抗原(例如 GPRC5D)结合亲和力(如通过 KD 值量度),阻断目的抗原与受体结合的活性(例如通过 IC50 值量度),在体外或体内实验中激活 T 细胞的活性(例如通过释放的细胞因子量度),在体外或体内实验中抑制肿瘤生长/存活。

在一些实施方案中,本发明提供本发明 VHH 多肽的亲和力变体。优选地,所述亲和力变体表现出相对于其来源亲本单域抗体在氨基酸序列上的一个或多个氨基酸变化,其中亲和力变体相比亲本抗体具有改变的对目的抗原的结合亲和力。

在本发明的另一方面中,本发明也提供了包含本发明的抗 GPRC5D VHH 抗体重链可变区的重链抗体。

在一些实施方案中,可以将本发明的抗 GPRC5D 单域抗体或 VHH (例如驼源 VHH 或其人源化形式),与人抗体的恒定区或其一部分例如 Fc 区连接,以产生包含 VHH-恒定区或 VHH-CH1-Fc 或 VHH-Fc 的重链抗体。在一个实施方案中,所述重链抗体包含本发明的 VHH 抗体和位于其 C 端的 Fc 区。在一些实施方案中,通过铰链区或其一部分,例如来自 IgG 的铰链区(例如 IgG1、2、3 或 4 的铰链区)或其部分连接 VHH 与 Fc。

在一些实施方案中,本发明的抗 GPRC5D 重链抗体包含如本文定义的抗 GPRC5D VHH 或其中的重链可变区,以及重链恒定区或重链恒定区的 Fc 区。在一些实施方案中,在抗 GPRC5D VHH 或其重链可变区与重链恒定区或 Fc 区之间包含连接肽,例如抗体铰链区或其部分,例如来自 IgG 的铰链区或其部分(包括天然或突变的 IgG 铰链区或其部分)。

在一些实施方案中,所述连接肽是来自人 IgG1、2、3 或 4 的铰链区或其部分,包括天然或突变的铰链区或其部分,例如来自人 IgG1 铰链区,例如所述连接肽是 EPKSS (SEQ ID NO:94) 或 EPKSC (SEQ ID NO:96)。

在一个实施方案中,所述重链抗体包含来自驼科动物(例如羊驼)的 Fc 区或其部分。在一个实施方案中,通过免疫所述驼科动物例如羊驼产生并分离所述的重链抗体。本领域已知多种方式可用于免疫驼科动物和分离产生的针对目的抗原的 VHH 抗体或重链抗体。

在一些实施方案中,所述重链抗体包含来自人或非人灵长类动物(例如食蟹猴)抗体的恒定区,例如来自人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 的恒定区。

在一些实施方案中，所述重链抗体包含来自人或非人灵长类动物（例如食蟹猴）的 Fc 部分。在另一实施方案中，所述重链抗体包含人 IgG Fc 区，例如人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 Fc 区，优选地人 IgG1 或人 IgG4Fc 区，如人 IgG1 Fc 区。

在一个实施方案中，根据本发明的重链抗体可以通过 Fc 区，与包含 Fc 区的另一多肽链（例如相同或不同的另一重链抗体）二聚化。因此，在一个实施方案中，本发明也提供了包含本发明重链抗体的同源或异源多聚体蛋白质。在一个优选的实施方案中，优选所述蛋白包括两条相同重链抗体链配对形成的重链抗体。

可以将本发明的 Fc 区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对 Fc 区的突变，如下文所定义的。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体包含重链，所述重链包含重链可变区、Fc 区，以及连接重链可变区和 Fc 区的连接肽。优选地，连接肽包含 SEQ ID NO:94 或 96 所示的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

V. 多特异性抗体

在一些实施方案中，本发明的抗 BCMA 抗体是多特异性抗体，例如双特异性抗体或三特异性抗体，其例如包含针对 BCMA 的一种结合特异性和针对一种或多种的分子（例如 CD3，或例如 CD3 和 GPRC5D）的其他结合特异性。

因此，本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合 CD3，和/或第二抗原结合区特异性结合 BCMA。

因此，本发明的另一个方面涉及一种三特异性抗体，其包含

第一抗原结合区、第二抗原结合区和第三抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合 CD3，第二抗原结合区特异性结合 BCMA，且第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

在一些实施方案中，第一抗原结合区来自抗 CD3 抗体，例如 SP34 抗体或其人源化抗体，例如 PCT/CN2023/071314 所公开的抗 CD3 人源化抗体，例如是抗 CD3 抗体的 Fab 片段或例如是抗 CD3 抗体的 scFv 片段。

在一些实施方案中，第二抗原结合区来自本文所述的抗 BCMA 抗体，例如是抗 BCMA 的 VHH。

在一些实施方案中，第三抗原结合区来自抗 GPRC5D 抗体，例如 PCT/CN2023/071314 所公开的抗 GPRC5D 抗体，例如是抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段。在一些实施方案中，第三抗原结合区来自抗 GPRC5D 的 VHH 抗体，例如本文如上所述的 VHH 抗体。

适用于本发明的多特异性抗体的第一抗原结合区可以包含抗 CD3 全长抗体或其抗原结合片段（例如 PCT/CN2023/071314 所公开的抗 CD3 人源化抗体或其抗原结合片段），或由其组成，只要其能够特异性结合 CD3 即可，包括但不限于，例如特异性结合 CD3 的全长抗体、单链 Fv、Fab、Fab'、(Fab)₂、单域抗体、VHH 或重链抗体等。

适用于本发明的多特异性抗体的第二抗原结合区可以包含本发明的抗 BCMA VHH，或由其组成，只要其能够特异性结合 BCMA 即可，包括但不限于，例如特异性结合 BCMA 的全

长抗体、单链 Fv、Fab、Fab'、(Fab)₂、单域抗体、VHH 或重链抗体等。

适用于本发明的多特异性抗体的第三抗原结合区可以包含例如本发明的抗 GPRC5D VHH，或由其组成，或者包含抗 GPRC5D 全长抗体或其抗原结合片段（例如 PCT/CN2023/071314 所公开的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段），或由其组成，只要其能够特异性结合 GPRC5D 即可，包括但不限于，例如特异性结合 GPRC5D 的全长抗体、单链 Fv、Fab、Fab'、(Fab)₂、单域抗体、VHH 或重链抗体等。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体或三特异性抗体是 IgG 样双特异性抗体。本文所述的“IgG 样双特异性抗体”是指包含 Fc 二聚体的双特异性抗体或三特异性抗体。因此，在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体或三特异性抗体包含 Fc 二聚体。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体是 IgG 样双特异性抗体，其包含 scFv 片段作为特异性结合一个抗原的抗原结合区和 VHH 作为特异性结合另一抗原的抗原结合区。在一些实施方案中，所述 IgG 样双特异性抗体包含特异性结合 CD3 的 scFv 作为第一抗原结合区，且包含特异性结合 BCMA 的 VHH 片段作为第二抗原结合区。

在一个实施方案中，所述双特异性抗体可以包含一个或多个第一抗原结合区。在一个实施方案中，所述双特异性抗体可以包含一个或多个第二抗原结合区。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含一个第一抗原结合区，以及一个或两个（例如串联的）第二抗原结合区。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体是 IgG 样三特异性抗体，其包含 Fab 片段作为特异性结合一个抗原的抗原结合区、VHH 分别作为特异性结合另外两个抗原的抗原结合区。在一些实施方案中，所述 IgG 样三特异性抗体包含含有或由特异性结合 CD3 的 Fab 片段组成的第一抗原结合区，含有或由特异性结合 BCMA 的 VHH 片段组成的第二抗原结合区，以及含有或由特异性结合 GPRC5D 的 VHH 片段组成的第三抗原结合区。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体是 IgG 样三特异性抗体，其包含 scFv 片段作为特异性结合一个抗原的抗原结合区、VHH 分别作为特异性结合另一个抗原的抗原结合区，以及 Fab 片段作为特异性结合第三个抗原的抗原结合区。在一些实施方案中，所述 IgG 样三特异性抗体包含含有或由特异性结合 CD3 的 scFv 片段组成的第一抗原结合区，含有或由特异性结合 BCMA 的 VHH 片段组成的第二抗原结合区，以及含有或由特异性结合 GPRC5D 的 Fab 片段组成的第三抗原结合区。

在一个实施方案中，所述三特异性抗体可以包含一个或多个第一抗原结合区。在一个实施方案中，所述三特异性抗体可以包含一个或多个第二抗原结合区。在一个实施方案中，所述三特异性抗体可以包含一个或多个第三抗原结合区。在一个实施方案中，所述三特异性抗体包含一个第一抗原结合区，一个第二抗原结合区和一个第三抗原结合区。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的第一抗原结合区选自 scFv 或 Fab，特异性结合 BCMA 的第二抗原结合区为 VHH，和/或特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区选自 VHH 或 Fab。

➤ 适用于本发明的多特异性抗体的 Fab 片段

在一些实施方案中，作为多特异性抗体抗原结合区之一的 Fab 片段由包含抗体 VH、CH1（任选地还包含铰链区）、VL 和 CL 结构域的两条多肽链组成，其中所述 VH 与 VL 配对且所述 CH1 与 CL 配对以形成抗原结合区。在一些实施方案中，在 Fab 中，一条链从 N 端到 C

端包含 VH 和 CH1 (即, VH-CH1), 另一条链从 N 端到 C 端包含 VL 和 CL (即, VL-CL)。

在一些实施方案中, 在所述多特异性抗体中, Fab 可以通过包含 VH 的链的 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端, 其中 Fc 结构域可以包含或不包含铰链区 (例如 EPKSS 或 EPKSC)。优选地, 所述 Fab 包含 VH-CH1 链和 VL-CL 链, 并通过 VH-CH1 链的 CH1 的 C 末端与抗体 Fc 结构域融合, 其中 Fc 结构域可以包含或不包含铰链区 (例如 EPKSS 或 EPKSC)。在本文中, 与 Fc 二聚体连接的 Fab 链也称作 Fab 重链, 而未与 Fc 二聚体连接的 Fab 链也称作 Fab 轻链。在一些实施方案中, 所述融合是直接融合, 或通过接头融合。

在一些实施方案中, Fab 中的 CH1 还可以包含部分铰链区, 例如 EPKSS 或 EPKSC, 以便于形成稳定结构, 例如利于制备多特异性抗体。在与 Fab 的重链融合的 Fc 不包含该部分铰链区时, 或者在 Fab 重链与非 Fc 结构域融合时, 可以在 CH1 的 C 末端包含所述部分铰链区, 以便于形成稳定结构。在与 Fab 的重链融合的 Fc 包含该部分铰链区时, 所述 Fab 重链的 CH1 的 C 末端可以不包含所述部分铰链区。

在一些实施方案中, 本发明的多特异性抗体中包含的 Fab 特异性结合 CD3 或特异性结合 GPRC5D。

在一些实施方案中, 所述 Fab 重链包含 VH 和 CH1 (以及任选地在 CH1 的 C 末端包含部分铰链区 EPKSS 或 EPKSC)。在一些实施方案中, 所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1, 优选地来自 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中, 所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述 Fab 轻链包含 VL-CL。在一些实施方案中, 所述 CL 是来自抗体 kappa 或 lambda 轻链的轻链恒定区, 优选地来自 Kappa 轻链的轻链恒定区。

► 适用于本发明的多特异性抗体的 scFv

在一些实施方案中, 作为多特异性抗体结合区之一的 scFv 片段由包含抗体 VH 和 VL 结构域的一条多肽链组成, 其中所述 VH 和 VL 连接 (例如通过接头) 以配对形成抗原结合位点。在一些实施方案中, 所述 scFv 为反式构型, 从 N 端到 C 端包含: VH、接头、和 VL (VH-接头-VL)。在另一些实施方案中, 所述 scFv 为顺式构型, 从 N 端到 C 端包含: VL、接头、和 VH (VL-接头-VH)。在一些实施方案中, 接头为由氨基酸残基组成的肽接头。适宜的肽接头是本领域技术人员已知的。在一个实施方案中, 接头为 5-50 个氨基酸长度, 例如 5-30 个氨基酸长, 例如 15 个氨基酸或 20 个氨基酸长度。在一个实施方案中, 接头包含氨基酸序列 (G4S)_n, 其中 n=1,2,3,4 或 5, 优选地, n=3 或 4, 更优选地, n=3。

在一些优选的实施方案中, 包含在本发明抗体分子中的 scFv 抗原结合位点为二硫键稳定的 scFv。

在一些实施方案中, 在所述多特异性抗体中, scFv 可以通过链 C 端融合在抗体的 Fc 结

构域的 N 端。在一些实施方案中，在所述多特异性抗体中，scFv 在链的 N 端融合在另一抗原结合区(例如 Fab 重链)的 C 端，且在链的 C 端融合在抗体 Fc 结构域的 N 端。

在一些实施方案中，在所述多特异性抗体中，scFv 可以通过包含 VL 的链 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端。在一些实施方案中，在所述多特异性抗体中，scFv 在 VH 链的 N 端融合在另一抗原结合区(例如 Fab 重链)的 C 端，且在 VL 链的 C 端融合在抗体 Fc 结构域的 N 端。

在一些实施方案中，在所述多特异性抗体中，scFv 可以通过包含 VH 的链 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端。在一些实施方案中，在所述多特异性抗体中，scFv 在 VL 链的 N 端融合在另一抗原结合区(例如 Fab 重链)的 C 端，且在 VH 链的 C 端融合在抗体 Fc 结构域的 N 端。

在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体中包含的 scFv 特异性结合 CD3。

➤ 适用于本发明多特异性抗体的 Fc 二聚体

在一个实施方案中，本发明多特异性抗体中的两个 Fc 区二聚化形成二聚 Fc。优选地，两个 Fc 区异二聚化形成异二聚 Fc。

在一些实施方案中，第一和第二 Fc 区相同。在另一些实施方案中，第一 Fc 区和第二 Fc 区不同，两者配对并异二聚化。

适用于本发明抗体分子的 Fc 区片段可以是任何抗体 Fc 区。Fc 区可以包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然序列 Fc 结构域涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。例如，本发明抗体的 Fc 区可以包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。在一些实施方案中，抗体 Fc 区还可以在 N 端带有 IgG 铰链区或部分 IgG 铰链区，例如，IgG1 铰链区或部分 IgG1 铰链区。在所述铰链区中可以含有突变。在一些实施方案中，部分铰链区可以是 EPKSS 或 EPKSC。

优选地，本发明抗体的 Fc 区从 N 端到 C 端包含:CH2-CH3，或从 N 端到 C 端包含：铰链区-CH2-CH3。在一些实施方案中，适用于本发明抗体或多特异性抗体的 Fc 区为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，人 IgG3 或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc 区来自人 IgG1Fc，例如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80 或 98 或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

可以将本发明的抗体或多特异性抗体中的 Fc 区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对 Fc 区的突变。

在一个实施方案中，在 Fc 区的效应子功能（例如 Fc 区的补体激活功能）的特性上修饰 Fc 区。在一个实施方案中，所述效应子功能相对于野生同种型 Fc 区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：使用天然具有降低或消除的效应子功能的 Fc 同种型、和 Fc 区修饰。

在一个优选的实施方案中，Fc 区具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 或 ADCP 或 CDC 效应子功能，例如包含实现上述功能的突变。

如本领域技术人员理解的,根据本发明抗体分子的预期用途,本发明抗体分子也可以在Fc结构域中包含改变对一种或多种Fc受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中,所述Fc受体是Fc γ 受体,特别地是人Fc γ 受体。在一些实施方案中,所述Fc区包含降低与Fc γ 受体结合的突变。例如,在一些实施方案中,用于本发明的Fc区具有降低与Fc γ 受体结合的L234A/L235A突变、D265A突变或P329A突变中的一个或多个。在一些实施方案中,用于本发明的Fc区具有降低与Fc γ 受体结合的L234A/L235A突变、D265A突变和P329A突变。在再一优选的实施方案中,Fc片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变,例如改善Fc片段与FcRn结合的突变。在一些实施方案中,包含降低与Fc γ 受体结合的突变的Fc区包含氨基酸序列SEQ ID NO: 90或97或与其具有至少90%同一性,例如95%,96%,97%,99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,所述Fc区包含与SEQ ID NO:90或97具有至少90%同一性,例如95%,96%,97%,99%或更高的同一性的氨基酸序列且包含L234A/L235A突变、D265A突变和P329A突变。

如本领域技术人员理解的,为了促进本发明的多特异性抗体作为异二聚体的形成,本发明多特异性抗体所包含的Fc区可以包含利于异二聚化的突变。在一个实施方案中,在两个Fc区的CH3区中引入突变。

本领域已知促进Fc区异二聚化的方法。例如,第一Fc区的CH3区和第二Fc区的CH3区以互补方式进行工程化改造使得每个CH3区(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它CH3区异二聚化(使得第一和第二CH3区异二聚化且两个第一CH3区或两个第二CH3区之间不形成同二聚体)。

优选地,基于Knob-in-Hole技术,在第一单体Fc区和第二单体Fc区中分别引入相应的knob突变和Hole突变。此技术参见例如Merchant, A. M., et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." *Nat Biotechnol* 16(7): 677-681。

在一个特定的实施方案中,在一个Fc区的CH3区中,第366位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W) (knob突变);而在另一个Fc区的CH3区中,第407位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V) (hole突变),任选地366位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第368位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A) (编号方式依照EU索引)。

在又一个实施方案中,在一个Fc区的CH3区中, knob突变包括或由下述组成:第366位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W)且第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第356位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C) (特别是,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换);而在另一个Fc区的CH3区中, hole突变包括或由下述组成:第407位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V),任选地366位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第368位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A) (编号方式依照EU索引),任选地第349位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C) (编号方式依照EU索引)。

在一个具体的实施方案中,一个Fc区包含氨基酸替代S354C和T366W (knob突变),且另一个Fc区包含氨基酸替代Y349C, T366S, L368A和Y407V (hole突变) (编号方式依照EU索引)。

因此,在一个具体的实施方案中,本发明的多特异性抗体包含的两个Fc区异二聚化,其中

a) 一个Fc-区多肽包含突变T366W,而另一个Fc-区多肽包含突变T366S、L368A

和 Y407V, 或

b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C, 而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C, 或

c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C, 而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C;

任选地, 所述 Fc 区还包含降低与 Fc γ 受体结合的突变, 例如, L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个; 例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

在一些实施方案中, Fc 区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。

在一个具体的实施方案中, 本发明的多特异性抗体的两个 Fc 区异二聚化, 其中

第一 Fc 区包含 knob 突变, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 47、86 或 87 或与其具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成; 在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO: 47、86 或 87 具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列且包含 knob 突变 (例如 S354C 和 T366W); 在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含或不包含铰链区 EPKSS 或 EPKSC;

第二 Fc 区包含 hole 突变, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 84、85 或 111 或与其具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO: 84、85 或 111 具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列且包含 hole 突变 (例如 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C); 在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含或不包含铰链区 EPKSS 或 EPKSC。

➤ 特异性结合 CD3 的抗原结合区

在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体以所需的亲和力结合 CD3 (例如人 CD3 或猴 CD3 例如食蟹猴 CD3)。在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体能够既结合人 CD3, 又结合猴 CD3 例如食蟹猴 CD3。在一些实施方案中, 通过生物膜薄层干涉测定技术或表面等离子共振法测定抗体的亲和力。

在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体, 以下平衡解离常数(K_D)与人 CD3 或猴 CD3 例如食蟹猴 CD3 结合, 所述 K_D 在大约 1nM-1000nM 之间。在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体, 以大约 10nM-100nM, 或 20nM-100nM 或 50nM-100nM 之间的 K_D 与猴 CD3 例如食蟹猴 CD3 结合。在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体大约 100-1000nM 之间 (例如大约 200、300、400 或 500-1000nM 之间) 的 K_D 与人 CD3 结合。

在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体与效应细胞表面的 CD3 结合。在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体能够激活效应细胞。在一些实施方案中, 效应细胞为 T 细胞。在一些实施方案中, 利用流式细胞术检测所述结合。在一些实施方案中, 利用报告基因检测系统 (例如 Jurkat/NFAT-luc 报告基因系统) 检测抗体的激活作用。

在一些实施方案中, 本发明的包含特异性结合 CD3 的抗原结合区的多特异性抗体能够激

活效应细胞诱导对肿瘤细胞的杀伤。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些方面中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含重链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含轻链可变区（VL）。在一些方面中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（CDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（CDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中，本发明特异性结合 CD3 的抗原结合区还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中，本发明特异性结合 CD3 的抗原结合区还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区的重链可变区 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区轻链可变区 VL

(i) 包含与 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明特异性结合 CD3 的抗原结合区的 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为

(i) 如 SEQ ID NO:34 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii)相对于(i)的序列,在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的序列,

优选地,所述 HCDR 是根据 Kabat 确定的。

在一些实施方案中,本发明特异性结合 CD3 的抗原结合区的 3 个来自轻链可变区的互补决定区(LCDR),LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为

(i) 如 SEQ ID NO:35 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,或

(ii)相对于(i)的序列,在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的序列;

优选地,所述 LCDR 是根据 Kabat 确定的。

在一些实施方案中,本发明特异性结合 CD3 的抗原结合区中,

HCDR1 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;HCDR2 包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;HCDR3 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;LCDR1 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;LCDR2 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含 VH 和 VL,其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成,和所述 VL 含有 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO:34 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,和如 SEQ ID NO:35 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在本发明的一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含:如 SEQ ID NO:28 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:29 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:30 示的 HCDR3;如 SEQ ID NO:31 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:32 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:33 的 LCDR3。

在本发明的一个实施方案中,本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中,本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域(例如在 FR 中)。更优选地,本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的,本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换,优选地保守置换。

在一些实施方案中,本发明特异性结合 CD3 的抗原结合区包含重链恒定区或其片段(例如 CH1)为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区或其片段。在一些实施方案中,本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区包含轻链恒定区或其片段为 kappa 或 lambda 轻链恒定区或其片段,例如 lambda 轻链恒定区或其片段。

在一个实施方案中,本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区是抗 CD3 抗体的片段(例

如抗原结合片段), 优选地选自以下的抗体片段: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体例如 VHH、dAb(domain antibody)或线性抗体。

在一个实施方案中, 本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区是 Fab, 其包含本节所述的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中, 所述 Fab 重链包含 VH 和 CH1 (以及任选地在 CH1 的 C 末端包含部分铰链区 EPKSS 或 EPKSC), 其中 VH 为抗 CD3 抗体的 VH。

在一些实施方案中, 所述 Fab 轻链包含 VL-CL, 其中 VL 为抗 CD3 抗体的 VL。在一些实施方案中, 所述 CL 是来自抗体 kappa 或 lambda 轻链的轻链恒定区, 优选地来自 Kappa 轻链的轻链恒定区。

在一些实施方案中, 所述 Fab 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述 Fab 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一个具体实施方案中, 本发明的特异性结合 CD3 的抗原结合区是 scFv, 其包含如上所述的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在一些实施方案中, 所述 scFv 从 N 末端到 C 末端包含本节所述的重链可变区 VH, 接头和本节所述的轻链可变区。在一些实施方案, 所述 scFv 包含如 SEQ ID NO:109 所示的序列或与 SEQ ID NO:109 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。

➤ 特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区

特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区来自抗 GPRC5D 的单域抗体

在一些实施方案中, 奔放买那个的抗原结合区来源于特异性结合 GPRC5D 的 VHH 抗体, 例如如本文所述的抗 GPRC5D VHH。

抗原结合区来自抗 GPRC5D 全长抗体或其抗原结合片段

在一些实施方案中, 抗原结合区来源于特异性结合 GPRC5D 的抗体, 例如

PCT/CN2023/071314 公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 抗体包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR)，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为如 SEQ ID NO:42 所示重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 抗体包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR)，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO:43 所示轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗体的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由其组成，和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR)，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR)，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成。

在一些方面中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含重链可变区 (VH)，其中所述 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些方面中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含轻链可变区 (VL)，其中所述 VL

(i) 包含与 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含 VH 和 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:42 所示的序列或由所述序列组成；和/或 VL 包含 SEQ ID NO:43 所示的序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的(例如 PCT/CN2023/071314 公开的特异性结

合 GPRC5D 的抗体)或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中, 抗原结合区包含已知的(例如 PCT/CN2023/071314 公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体)或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR, 即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中, 抗原结合区包含已知的(例如 PCT/CN2023/071314 公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体)或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR, 即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 抗原结合区包含已知的(例如 PCT/CN2023/071314 公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体)或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中, 抗原结合区包含已知的(例如 PCT/CN2023/071314 公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体)或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的重链可变区和轻链可变区, 以及本发明所述的突变。

在一些抗原结合区包含已知的(例如 PCT/CN2023/071314 公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体)或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 Fab。

在一个实施方案中, 本发明的特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区是 Fab, 其包含本节所述的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中, 所述 Fab 重链包含 VH 和 CH1 (以及任选地在 CH1 的 C 末端包含部分铰链区 EPKSS 或 EPKSC), 其中 VH 为抗 GPRC5D 抗体的 VH。

在一些实施方案中, 所述 Fab 轻链包含 VL-CL, 其中 VL 为抗 GPRC5D 抗体的 VL。在一些实施方案中, 所述 CL 是来自抗体 kappa 或 lambda 轻链的轻链恒定区, 优选地来自 Kappa 轻链的轻链恒定区。

在一些实施方案中, 所述 Fab 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述 Fab 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

➤ 示例性的双特异性抗体分子

在一些优选的实施方案中，本发明提供了一种双特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的 VHH 片段以及特异性结合 CD3 的抗原结合区，以及任选地 Fc 区。

在一些实施方案中，本发明提供了一种双特异性抗体，其包含第一抗原结合区、第二抗原结合区和 Fc 二聚体，其中第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 Fab 片段或 scFv 片段，第二抗原结合区为特异性结合 BCMA 的 VHH。

因此，在一些实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个或两个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 scFv 包含 VH-VL（任选地所述 VH 和 VL 通过接头融合），所述 VHH 包含重链可变区或由其组成，

其中所述 scFv 的 VL 的 C 末端融合至第一 Fc 区（例如包含 knob 突变或包含 hole 突变）的 CH2 或铰链区，构成第一重链；

所述一个抗 BCMA 的 VHH 或两个串联的抗 BCMA 的 VHH 的 C 末端与第二 Fc 区（例如包含 hole 突变或包含 knob 突变）融合构成第二重链（例如所述 VHH 的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区）。

在一些具体的实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个或两个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 scFv 包含 VH-VL（任选地所述 VH 和 VL 通过接头融合），所述 VHH 包含重链可变区或由其组成，

其中所述 scFv 的 VL 的 C 末端融合至包含 knob 突变的第一 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第一重链；

所述一个抗 BCMA 的 VHH 或两个串联的抗 BCMA 的 VHH 的 C 末端与包含 hole 突变的第二 Fc 区融合构成第二重链，其中例如所述 VHH 的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区）。

在一些实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个抗 BCMA 的 VHH 或两个串联的抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 抗体的 Fab 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，

其中所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至第一 Fc 区（例如包含 knob 突变或包含 hole 突变）的 CH2 或铰链区，构成第一重链；

所述一个抗 BCMA 的 VHH 或两个串联的抗 BCMA 的 VHH 的 C 末端与第二 Fc 区（例如包含 hole 突变或包含 knob 突变）融合构成第二重链（例如所述 VHH 的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区）。

在一些实施方案中，Fc 区包含或不包含铰链区。在一些实施方案中，所述铰链区选自 EPKSS 或 EPKSC。在一些实施方案中，所述融合是直接融合或通过接头或连接肽融合。在一

些实施方案中，所述连接肽选自(GGGGS)_n，其中 n=1、2、3 或 4。

在一些实施方案中，第一重链包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

第二重链包含 SEQ ID NO: 56、102、103 或 104 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，所述双特异性抗体包含本文所述的第一重链和第二重链，或由其组成。

➤ 示例性的三特异性抗体

在一些实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含特异性结合 CD3 的第一抗原结合区、特异性结合 BCMA 的第二抗原结合区，以及特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区，以及 Fc 二聚体，例如 Fc 异二聚体。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的第一抗原结合区包含抗 CD3 抗体的 Fab 片段或 scFv 片段或由其组成。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 的第二抗原结合区包含抗 BCMA VHH 抗体或由其组成。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 GPRC5D VHH 抗体或由其组成，或包含抗 GPRC5D 的 Fab 片段或由其组成。

在一些实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 的 VHH、一个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 的 Fab 片段，以及 Fc 二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1（任选地含有部分铰链区 EPKSS 或 EPKSC）和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 GPRC5D VHH、抗 BCMA VHH 和第一 Fc 区（例如包含 hole 或 knob 突变）；或者经由或不经由接头融合的抗 BCMA VHH、抗 GPRC5D VHH 和第一 Fc 区（例如包含 hole 或 knob 突变）；

第二重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 CD3 的 Fab 片段重链和第二 Fc 区（例如包含 knob 或 hole 突变）；

轻链：抗 CD3 的 Fab 片段轻链；

例如如图 7A 所示的结构。

在一些实施方案中，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由

所述序列组成；

第二重链包含 SEQ ID NO: 59 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO: 60 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 的 Fab 片段、一个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 的 scFv，以及 Fc 二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1（任选地含有部分铰链区 EPKSS 或 EPKSC）和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，所述 scFv 包含 VH-VL，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 BCMA VHH 和第一 Fc 区（例如包含 hole 或 knob 突变）；

第二重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 GPRC5D 的 Fab 片段重链、抗 CD3 的 scFv 和第二 Fc 区（例如包含 knob 或 hole 突变）；

轻链：抗 GPRC5D 的 Fab 片段轻链；

例如如图 7B 所示的结构。

在一些实施方案中，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二重链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，Fc 区包含或不包含铰链区。在一些实施方案中，所述铰链区选自 EPKSS 或 EPKSC。在一些实施方案中，所述融合是直接融合或通过接头或连接肽融合。在 CH1 包含部分铰链区 EPKSS 或 EPKSC 且与 Fc 区连接的情况下，Fc 区无需包含该部分铰链区。

在一些实施方案中，所述连接肽选自 (GGGGS)_n 或 (GGSGG)_n，其中 n=1、2、3 或 4。

在一些实施方案中，第一 Fc 区包含 knob 突变，且第二 Fc 区包含 hole 突变。在一些实

施方案中，第一 Fc 区包含 hole 突变，且第二 Fc 区包含 knob 突变。

在一些实施方案中，第一和第二 Fc 区之一或二者包含 L234A 和 L235A 突变和/或 D265A 和/或 P329A。在一些实施方案中，第一 Fc 区包含 knob 突变和 L234A 和 L235A 突变和 D265A 和 P329A，且第二 Fc 区包含 hole 突变和 L234A 和 L235A 突变和 D265A 和 P329A。在一些实施方案中，第一 Fc 区包含 hole 突变和 L234A 和 L235A 突变和 D265A 和 P329A，且第二 Fc 区包含 knob 突变和 L234A 和 L235A 突变和 D265A 和 P329A。

VI. 编码抗体的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面，本发明提供了编码以上任何抗 BCMA 抗体或多特异性抗体或其任一条链的核酸。

例如，本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22、23、44-46、48-55、56、58、59、61、102-104 中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22、23、44-46、48-55、56、58、59、61、102-104 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列的核酸。

如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法，例如通过从头固相 DNA 合成，或通过 PCR 扩增而产生。

在一方面，本发明提供编码以上任何抗体或任何抗体链的核酸。当从适宜的表达载体表达时，由所述核酸编码的多肽能够显示人 BCMA 抗原结合能力。

在再一方面，本发明提供编码多特异性抗体的核酸。当从适宜的表达载体表达时，由所述核酸编码的多肽能够显示人或猴（例如食蟹猴）CD3 和人 BCMA 抗原，以及任选地人或猴（例如食蟹猴）GPCR5D 抗原以及的结合能力。在一个实施方案中，编码多特异性抗体的各条链的核酸可以在相同的载体中或在不同的载体中。在再一实施方案中，编码多特异性抗体的各条链的核酸可以引入相同或不同的宿主细胞以表达。因此，在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体的生产方法包括步骤：在适于表达所述分子各条链的条件下，培养包含编码所述各条链的核酸的宿主细胞，产生本发明多特异性抗体。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体 (YAC)。在一个实施方案中，载体是例如 pcDNA 载体，例如 pcDNA3.1。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞，例如用于克隆或表达编码抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的载体。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞例如 CHO 细胞（例如 CHO-S，如 ExpiCHO-S）或 293 细胞（例如 293F 或 HEK293 细胞）或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是原核的，例如是细菌，例如大肠杆菌。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”

的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如,可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(HEK293、293F或293T细胞)等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞、CHO-S细胞、ExpiCHO等;以及骨髓瘤细胞系如Y0, NS0和Sp2/0。本领域已知适合产生抗体的哺乳动物宿主细胞系。

VII、本发明的抗BCMA抗体或多特异性抗体的生产和纯化

在一个实施方案中,提供了制备本发明抗BCMA抗体或多特异性抗体的方法,其中所述方法包括,在适合抗BCMA抗体或多特异性抗体或其链表达的条件下,培养包含编码所述抗BCMA抗体或多特异性抗体(例如任意一条多肽链和/或多条多肽链)的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,如上文所提供的,和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗BCMA抗体或多特异性抗体。

可以将编码本发明抗BCMA抗体或多特异性抗体的多肽链的多核苷酸插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种核酸分子的表达载体,则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的,例如,原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

如本文所述制备的抗BCMA抗体或多特异性抗体可以通过已有的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、尺寸排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体分子的纯度,所述熟知分析方法包括尺寸排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

VIII、对抗BCMA抗体或多特异性抗体的测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗BCMA抗体或多特异性抗体进行鉴定,筛选,或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

一方面,对本发明的抗BCMA抗体或多特异性抗体测试其靶标(例如抗原,例如游离的抗原或在细胞上表达的抗原)结合活性,例如通过已知的方法诸如生物膜薄层干涉技术、ELISA、流式细胞术等来进行。可使用本领域已知方法来测定对CD3和/或BCMA和/或GPCR5D(或细胞上表达的CD3和/或BCMA和/或GPCR5D)的结合,本文中公开了示例性方法。在一些实施方案中,使用放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法(BLI)或电化学发光(ECL)或表面等离子体共振法(SPR)或流式细胞术(FACS)测量。

本发明还提供了用于鉴定抗BCMA抗体或多特异性抗体的生物学活性的测定法。生物学活性选自本发明的抗BCMA抗体或多特异性抗体的性质。

例如，对于本发明的抗体分子对表达 BCMA 和/或 GPRC5D 的细胞的结合活性，可以通过本领域已知的方法，例如荧光报道分子和流式细胞术，或本文实施例公开的示例性方法测定，例如测定本发明的抗体分子与细胞上表达的和/或 BCMA 和/或 GPRC5D 的结合。

例如，对于本发明的抗体分子对 T 细胞的激活活性，可以通过本领域已知的方法，例如 T 细胞激活试验系统，例如 NFAT-luc 报告基因系统如 Jurkat/NFAT-luc 报告基因系统测定，例如通过实施例所示的方法，通过检测 T 细胞中的 CD3 信号通路或通过检测激活 T 细胞后细胞因子(例如干扰素，如 IFN γ ；肿瘤坏死因子如 TNF α 和/或白细胞介素如 IL-6)的释放来测定。

例如，对于本发明抗体分子对肿瘤的抑制活性或结构安全性，可以通过本领域已知的方法，例如针对小鼠肿瘤模型进行肿瘤抑制实验来测定。

供任何上述体外测定法使用的细胞为原代细胞或细胞系，包括天然表达或过表达 BCMA (例如人或猴(例如食蟹猴))或 GPRC5D (例如人或猴(例如食蟹猴) GPRC5D) 的细胞，例如过表达 BCMA 或 GPRC5D 的细胞，例如 BCMA 和 GPRC5D 阳性细胞，例如 NCI-H929 或 MM.1R 或 MOLP-8。

可以理解的是，能够使用本发明的抗体和别的活性剂的组合来进行任何上述测定法。

IX、本发明抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的免疫缀合物、药物组合物、药物组合产品和药盒

在一些实施方案，本发明提供了包含本文所述的任何抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的免疫缀合物。优选地，所述免疫缀合物包含一种或多种其他治疗剂(例如细胞毒素或小分子化合物)或标记物。

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的组合物或药物或制剂，优选地组合物为药物组合物。

在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，组合物，例如，药物组合物，包含本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明的所述组合物或药物或制剂还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。

对于药用辅料的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 第八版, R.C.Rowe, P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

本发明的组合物或药物或制剂可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，注射液或滴眼液)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的药物或制剂，例如以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明的组合物或药物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它治疗剂。

本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体，以及一种或多种其它治疗剂。

本发明还提供了包含所述药物组合的成套药盒，例如所述成套药盒在同一包装内包含：

- 含有包含本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的药物组合物的第一容器；
- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

在一些实施方案中，所述其他治疗剂例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

X、抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的用途和应用其的方法

本发明一方面提供了在受试者中预防或治疗疾病的方法，包括向受试者施用本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体，或包含其的免疫缀合物、组合物或药物或制剂。在一些实施方案中，本发明提供了在受试者中特异性激活 T 细胞的方法，包括向受试者施用本发明的抗体或多特异性抗体，或包含其的免疫缀合物、组合物或药物或制剂。

在一些实施方案中，所述疾病例如肿瘤，例如癌症。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，肿瘤可以是实体肿瘤或血液肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤是骨髓瘤例如多发性骨髓瘤如转移性多发性骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

在一些实施方案中，所述疾病治疗将受益于激活 CD3 信号通路和/或激活 T 细胞。

在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症为 BCMA 阳性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述 BCMA 阳性肿瘤或癌症表征为在患者中（例如在患者肿瘤或癌症组织或细胞中）具有或具有升高的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如与健康个体的相同组织中的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平相比，或与所述患者的临近健康组织中的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平相比）的肿瘤或癌症，例如，所述肿瘤或癌症的肿瘤细胞中具有或具有升高的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如与健康个体的相同组织的细胞中的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平相比，或与所述患者的相同组织的健康细胞或临近健康组织的细胞中的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平相比）。

在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症为 GPRC5D 阳性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述 GPRC5D 阳性肿瘤或癌症是表征为在患者中（例如在患者肿瘤或癌症组织或细胞中）具有或具有升高的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如与健康个体的相同组织中的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平相比，或与所述患者的临近健康组织中的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平相比）的肿瘤或癌症，例如，所述肿瘤或癌症的肿瘤细胞中具有或具有升高的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如与健康个体的相同组织的细胞中的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平相比，或与所述患者的相同组织的健康细胞或临近健康组织的细胞中的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平相比）。

在一些实施方案中，所述肿瘤或癌症是 BCMA 阳性和 GPRC5D 阳性的肿瘤或癌症。

本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂、组合产品等)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外注射或输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下注射或输注。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂、组合产品等)的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。在其他方面，本发明提供本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体或包含其的免疫缀合物或组合物或组合产品在生产或制备药物中的用途，所述药物用于本文所述的用途，例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，抗 BCMA 抗体或多特异性抗体(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂等)还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用，用于本文所述的用途，例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，所述治疗方式例如手术或放疗。

在一些实施方案中，所述其他治疗剂例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂)。

XI、诊断和检测

在一个方面，本发明还涉及对抗 BCMA 抗体或多特异性抗体的用于诊断和检测(例如用于诊断或非诊断目的)的方法和包含其的用于诊断和检测的组合物。

在某些实施方案中，本文中提供的抗 BCMA 抗体可以用于检测 BCMA 在生物样品中的存在。在某些实施方案中，本文中提供的双特异性抗体可以用于检测 CD3 和/或 BCMA 在生物样品中的存在。在某些实施方案中，本文中提供的三特异性抗体可以用于检测 CD3 和/或 BCMA 和/或 GPRC5D 在生物样品中的存在。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是体液，例如血液、血清或血浆。

在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体在允许其与 BCMA 结合的条件下接触，并检测在该抗 BCMA 抗体或多特异性抗体和 BCMA 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 BCMA。该方法可以是体外或体内方法

在某些实施方案中，提供标记的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射

性标记), 以及被间接检测的部分, 如酶或配体, 例如, 通过酶促反应或分子相互作用。在一些实施方案中, 所述标记例如生物素或 hFc 等标记物。

在本文中提供的一些实施方案中, 样品是在用本发明的抗 BCMA 抗体或多特异性抗体治疗之前获得的。在一些实施方案中, 样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中, 样品是在用其他疗法治疗过程中, 或者用其他疗法治疗后获得的。

在一些实施方案中, 在治疗之前, 例如, 在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 BCMA 和/或 GPRC5D。

XII. 具体实施方案

在一些方面, 本发明涉及以下具体的实施方案:

1、特异性结合BCMA的VHH抗体, 其包含

SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的VHH中所含的三个互补决定区域(CDR),

优选地, 所述CDR序列根据IMGT定义。

2、实施方案1的VHH抗体, 其包含互补决定区域(CDR) VHH CDR1、VHH CDR2和VHH CDR3, 其中

(i) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 9 或 13 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由其组成; 或

(ii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成; 或

(iii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成。

3、实施方案1的VHH抗体, 其包含重链可变区或由其组成, 所述重链可变区

(i)包含与选自SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成;或者

(ii) 包含选自SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii)包含与选自SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过10个, 更优选不超过5、4、3、2、1个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在CDR区中。

4、特异性结合BCMA的重链抗体, 其包含实施方案1-3中任一项所述的VHH抗体。

5、实施方案4的重链抗体，其包含与抗体恒定区或Fc区连接的实施方案1-3中任一项所述的VHH抗体，优选地，所述抗体恒定区或Fc区来自人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4，任选地，所述VHH抗体与所述Fc区通过铰链区或其部分连接，任选地，所述铰链区部分的氨基酸序列为EPKSS (SEQ ID NO:94) 或EPKSC (SEQ ID NO:96)。

6、实施方案4的重链抗体，其包含与抗体Fc区连接的实施方案1-3中任一项所述的VHH抗体，其中所述Fc区为来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区，任选地，所述Fc区包含L234A/L235A突变、D265A突变和P329A突变，优选地，所述Fc区

(i)包含与SEQ ID NO:80、90、97或98中所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含SEQ ID NO: 80、90、97或98所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii)包含与SEQ ID NO: 80、90、97或98所示的氨基酸序列相比具有1个或多个（优选不超过10个，更优选不超过5、4、3、2、1个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

7、实施方案4的重链抗体，其

(i)包含与选自SEQ ID NO:44-46和48-55中任一项所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含选自SEQ ID NO: 44-46和48-55中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii)包含与选自SEQ ID NO:44-46和48-55中任一项所示的氨基酸序列相比具有1个或多个（优选不超过10个，更优选不超过5、4、3、2、1个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在CDR区中。

8、实施方案1-3中任一项的VHH抗体，或实施方案4-7中任一项的重链抗体，其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

9、多特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，以及任选地第三抗原结合区，其中所述第二抗原结合区特异性结合BCMA，且包含实施方案1-3和8中任一项的VHH抗体，或实施方案4-8中任一项的重链抗体，优选地，所述多特异性抗体为双特异性抗体或三特异性抗体。

10、实施方案9的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合区特异性结合CD3。

11、实施方案10所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合区包含VH和VL，所述VH包含3个来自重链可变区的互补决定区(HCDR)，HCDR1、HCDR2和HCDR3，且所述VL包含3个来自轻链可变区的互补决定区(LCDR)，LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中

(i) HCDR1、HCDR2和HCDR3为SEQ ID NO:34所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，且LCDR1、LCDR2和LCDR3为SEQ ID NO:35所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3；或

(ii) HCDR1由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成，HCDR2由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成，HCDR3由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成，LCDR1由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成，LCDR2由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成，且LCDR3由SEQ

ID NO:33 所示的氨基酸序列组成。

12、实施方案 11 所述的多特异性抗体，其中第一抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 含有 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或所述 VL 含有 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

13、实施方案 10-12 中任一项的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 Fab 或 scFv。

14、实施方案 13 所述的多特异性抗体，所述 Fab 包含第一抗原结合区的 VH 和 CH1，以及任选地部分铰链区（例如 EPKSS 和 EPKSC），其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。

15、实施方案 14 所述的多特异性抗体，其中所述 CH1

- (i)包含与选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

16、实施方案 15 所述的多特异性抗体，其中第一抗原结合区的 Fab 重链

- (i)包含与选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者
- (iii) 包含与选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或第一抗原结合区的 Fab 轻链

- (i)包含与选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者
- (iii) 包含与选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

17、实施方案 13 所述的多特异性抗体，其中所述 scFv 包含从 N 末端到 C 末端包含第一抗原结合区的重链可变区 VH，接头和第一抗原结合区的轻链可变区。

18、实施方案 17 所述的多特异性抗体，其中所述 scFv 包含如 SEQ ID NO:109 所示的序列或与 SEQ ID NO:109 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。

19、实施方案 9-18 中任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合区为实施方案

1-3 和 8 中任一项的 VHH。

20、实施方案 9-19 中任一项所述的多特异性抗体，其中所述多特异性抗体为三特异性抗体且其包含第三抗原结合区，所述第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

21、实施方案 20 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合区包含抗 GPRC5D 的 VHH 或由其组成。

22、实施方案 21 所述的多特异性抗体，其中所述抗 GPRC5D 的 VHH 包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区包含

(i) SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR)，或

(ii) 互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3，其中 VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由其组成。

23、实施方案 22 所述的多特异性抗体，其中所述重链可变区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

24、实施方案 20 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合区包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR)，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 VL 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR)，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为 SEQ ID NO:42 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:43 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(ii) HCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成。

25、实施方案 24 所述的多特异性抗体，其中第三抗原结合区包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或

所述 VL 含有 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

26、实施方案 24 或 25 的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合区为特异性结合 GPRC5D 的 Fab。

27、实施方案 26 所述的多特异性抗体，所述 Fab 包含第三抗原结合区的 VH 和 CH1，以

及任选地所述 CH1 包含部分铰链区（例如 EPKSS 和 EPKSC），其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。

28、实施方案 27 所述的多特异性抗体，其中所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

29、实施方案 28 所述的多特异性抗体，其中第三抗原结合区的 Fab 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或第三抗原结合区的 Fab 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

30、实施方案 9-29 中任一项所述的多特异性抗体，其中所述多特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体，其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同。

31、实施方案 30 所述的多特异性抗体，其中所述两个 Fc 区不同，优选地，在两个 Fc 区中分别引入相应的 knob 突变和 Hole 突变。

32、实施方案 31 所述的多特异性抗体，其中

a) 一个 Fc-区多肽包含 knob 突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含 hole 突变 T366S、L368A 和 Y407V，或

b) 一个 Fc-区多肽包含 knob 突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含 hole 突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或

c) 一个 Fc-区多肽包含 knob 突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含 hole 突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C；

任选地，所述 Fc 区还包含降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如，L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个；例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

33、实施方案 30-32 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含铰链区，例如 EPKSS（SEQ ID NO:94）或 EPKSC（SEQ ID NO:96）。

34、实施方案 32 所述的多特异性抗体，其中

(i) 包含 knob 突变的 Fc 区

- a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47、86 或 87 或由其组成；或
- b) 包含与 SEQ ID NO:47、86 或 87 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性且包含 knob 突变（例如 S354C 和 T366W）的氨基酸序列或由其组成；和/或

(ii) 包含 hole 突变的 Fc 区

- a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84、85 或 111 或由其组成；或
- b) 包含与 SEQ ID NO:84、85 或 111 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性且包含 hole 突变（例如 Y349C、T366S、L368A 和 Y407V）的氨基酸序列或由其组成。

35、实施方案 9-34 中任一项的多特异性抗体，其为双特异性抗体，且包含第一抗原结合区、第二抗原结合区和 Fc 二聚体，其中第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 scFv 片段，且第二抗原结合区为特异性结合 BCMA 的 VHH，例如实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH。

36、实施方案 35 的多特异性抗体，其包含一个或两个特异性结合 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 scFv 包含 VH-VL（任选地所述 VH 和 VL 通过接头融合），所述 VHH 包含重链可变区或由其组成，

其中所述 scFv 的 VL 的 C 末端融合至第一 Fc 区（例如包含 knob 突变或包含 hole 突变）的 CH2 或铰链区，构成第一重链；

所述一个抗 BCMA 的 VHH 或两个串联的抗 BCMA 的 VHH 的 C 末端与第二 Fc 区（例如包含 hole 突变或包含 knob 突变）融合构成第二重链（例如所述 VHH 的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区）。

37、实施方案 36 所述的多特异性抗体，其中所述

第一重链包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

第二重链包含 SEQ ID NO: 56、102、103 或 104 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

38、实施方案 9-34 中任一项的多特异性抗体，其为三特异性抗体，且包含第一抗原结合区、第二抗原结合区、第三抗原结合区和 Fc 二聚体，其中第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 scFv 片段或 Fab 片段，第二抗原结合区为特异性结合 BCMA 的 VHH，例如实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH，且第三抗原结合区为特异性结合 GPRC5D 的 VHH 或 Fab 片段。

39、实施方案 38 的多特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 的 VHH、一个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 的 Fab 片段，以及 Fc 二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，所述三特异性抗体

包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 GPRC5D VHH、抗 BCMA VHH 和第一 Fc 区；或者经由或不经由接头融合的抗 BCMA VHH、抗 GPRC5D VHH 和第一 Fc 区

第二重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 CD3 的 Fab 片段重链和第二 Fc 区；

轻链：抗 CD3 的 Fab 片段轻链。

40、实施方案 39 的多特异性抗体，其中

第一重链包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二重链包含 SEQ ID NO: 59 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO: 60 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

41、实施方案 38 的多特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 的 Fab 片段、一个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 的 scFv，以及 Fc 二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，所述 scFv 包含 VH-VL，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 BCMA VHH 和第一 Fc 区；

第二重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 GPRC5D 的 Fab 片段重链、抗 CD3 的 scFv 和第二 Fc 区；

轻链：抗 GPRC5D 的 Fab 片段轻链。

42、实施方案 41 的多特异性抗体，其中

第一重链包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二重链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

43、核酸分子，其编码实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的多特异性抗体的任一条链，或由所述核酸序列组成。

44、表达载体，其包含实施方案 43 的核酸分子。

45、宿主细胞，其包含实施方案 43 所述的核酸分子或实施方案 44 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 293T 细胞或 CHO-S 细胞。

46、制备实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的多特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体的链表达的条件下，培养包含实施方案 43 所述的核酸分子或实施方案 44 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

47、免疫缀合物，其包含实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的多特异性抗体。

48、药物组合物或药物或制剂，其包含实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的多特异性抗体，或实施方案 47 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

49、药物组合产品，其包含实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的多特异性抗体，或实施方案 47 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）。

50、在受试者中预防或治疗癌症的方法，包括向受试者施用有效量的实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的双特异性抗体，或实施方案 47 的免疫缀合物，或实施方案 48 的药物组合物或药物或制剂；或实施方案 49 的药物组合产品。

51、实施方案 50 的方法，其中所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）。

52、实施方案 50 或 51 的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如骨髓瘤例如多发性骨髓瘤如转移性多发性骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

53、实施方案 50-52 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）组合施用。

54、检测 BCMA 在生物样品中的存在的方法，其包括

(i) 将生物样品与实施方案 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或实施方案 4-8 中任一项的重链抗体或实施方案 9-42 中任一项的多特异性抗体在允许其与 BCMA 结合的条件下接触，

(ii) 检测在该抗体或双特异性抗体和 BCMA 之间是否形成复合物，

其中复合物的形成表示存在 BCMA。

实施例

实施例 1：通过羊驼免疫产生 BCMA 抗体

1.1 羊驼免疫建库筛选

1.1.1 动物免疫

采用人 BCMA 重组蛋白（ACRO，货号：BCA-H522y）和食蟹猴 BCMA-人 IgG₁Fc 重组蛋白（ACRO，货号：BCA-C5253）按体积比 1:1（等浓度，各 0.5mg）混合免疫 2 只羊驼（成都阿帕克生物科技有限公司）。对羊驼进行每 21 天一次为期四次的免疫注射（表 1）。分别在第三次免疫后第 10 天和第四次免疫后第 10 天对羊驼进行静脉采血，采用人和食蟹猴 BCMA 重组蛋白对羊驼免疫血清进行 ELISA 测定，选择一只羊驼用于采血建库。

表 1. 羊驼免疫程序

步骤	给药方式	剂量
1 st Immunization	皮下注射	0.5mg 蛋白/只
2 nd Immunization	皮下注射	0.25mg 蛋白/只
3 rd Immunization	皮下注射	0.25mg 蛋白/只
4 th Immunization	皮下注射	0.25mg 蛋白/只

1.1.2 羊驼免疫文库构建和筛选

用 Trizol 法从羊驼外周血中提取总 RNA，使用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara，货号 6210A）进行反转录，获得 cDNA。将 cDNA 进行巢氏 PCR 扩增，回收 750bp 的含有纳米抗体的产物，再通过第二轮 PCR 扩增纯化 VHH。将 VHH 利用酶切连接技术连接到噬菌体载体，进行电击、转化、涂布平板，第二天测定库容，经检测构建的文库库容为 4.49×10⁹CFU，文库插入率为 100%。经 2 轮人 BCMA 重组蛋白固相筛选，获得的阳性克隆进行测序鉴定，获得的部分氨基酸序列见表 2。

表 2. 抗 BCMA 抗体驼源 VHH 的氨基酸序列

抗体名称	可变区序列	HCDR1	HCDR2	HCDR3
BH56	SEQ ID NO: 4	PSAMS (SEQ ID NO:1)	GIYGDGRTTYADSVKG (SEQ ID NO:2)	GIRLLSESWAQAL (SEQ ID NO:3)
HA68	SEQ ID NO: 8	PSAMN (SEQ ID NO:5)	GIYGDGKAEYADSVKG (SEQ ID NO:6)	GIRPTDAPWAASL (SEQ ID NO:7)

实施例 2：抗人 BCMA 嵌合抗体的表征

2.1 抗人 BCMA 嵌合抗体的合成与表达

将表 2 中驼源抗体 VHH 的氨基酸序列加入铰链区（EPKSS(SEQ ID NO:94))后插入含有编码人 Fc 恒定区(SEQ ID NO: 90)的表达载体 pcDNA3.1(+)中中获得编码各嵌合抗体的质粒。

获得的具体嵌合抗体序列如下：

抗体名称	重链序列	可变区序列	HCDR1	HCDR2	HCDR3
------	------	-------	-------	-------	-------

BH56-IgG	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
HA68-IgG	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7

将编码各抗 BCMA 抗体的质粒转染 ExpiCHO-S 细胞以表达驼源嵌合抗体。使用 269B094 (一种针对 BCMA 的全人单克隆抗体)(重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:76)作为对照抗体, 所述序列来自 CN2017/096938。类似地, 表达对照抗体。对抗体进行相应纯化。

具体而言, 依据制造商产品手册说明, 使用 ExpiCHO™表达系统(ThermoFisher, Cat#A29133)将编码抗人 BCMA 嵌合抗体的质粒转染 ExpiCHO-S 细胞, 以及类似地表达对照抗体 269B094 单抗。转染后培养细胞 10-12 天, 当细胞存活率下降到 60%至 70%时, 收集上清液, 使用 MabSelect Sure 蛋白 A 亲和层析系统(GE healthcare)纯化表达并分泌在上清液中的抗体。浓缩纯化的抗体, 无菌过滤, 通过 SDS-PAGE 和分子排阻检测抗体蛋白的纯度, 结果表明抗体的纯度>90%, 可以用于下一步实验。

2.2 抗人 BCMA 嵌合抗体与表达人 BCMA 蛋白工程化细胞结合

将编码人 BCMA 的序列(Accession#Q02223-1)克隆到 PiggyBac Dual promoter(SBI, 货号: PB513-B1)表达载体中, 采用电穿孔方式转染至 CHO-K1 细胞(ATCC, 货号: CCL-61™), 然后用 4μg/mL 嘌呤霉素(Gibco, 货号: A1113802)筛选, 得到了高表达人 BCMA 的 CHO-K1 细胞(下文中也称为: CHO-K1-huBCMA)。

通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 BCMA 人源化抗体能否与稳定表达在细胞表面的人 BCMA 蛋白结合。

酶解消化 CHOK1-huBCMA 细胞系后得到 CHOK1-huBCMA 细胞的单细胞悬液, 室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的抗人 BCMA 嵌合抗体和对照抗体 269B094 (初始浓度为 20μg/mL, 4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点)重悬, 4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098), 4℃避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞, 最后用 Beckman Cytotflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 2 所示的结果可知, 所有待测样品与表达人 BCMA 蛋白工程化细胞 CHOK1-huBCMA 的结合活性均比对照样品好。

实施例 3：羊驼来源抗人 BCMA 抗体的人源化及其表征

3.1 羊驼来源抗人 BCMA 抗体人源化

对实施例 2.1 获得的抗体进行人源化。具体而言, 将抗体 BH56 和 HA68 的序列在 IMGT 数据库中检索比对, 分别获得与抗体 BH56 可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGHV3-53*03 和与抗体 HA68 可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGHV3-53*02 作为重链可变区人源化框架, 将抗体 BH56 和 HA68 重链可变区中的 CDR 移植到相应的人源化框架中, 形成人源化的抗体。为了维持人源化抗体对人 BCMA 的亲合力, 需要对获得的人源化抗体框架区进行回复突变。

由此获得人源化重链可变区序列, 表 3 列出人源化可变区氨基酸序列。将可变区氨基酸序列送至上海百英生物科技股份有限公司 (Biointron Biological Inc) 进行密码子优化和基因合成。

表 3.人源化抗体的重链以及可变区序列

重链名称和序列	重链可变区	HCDR1	HCDR2	HCDR3
huBH56-1-IgG (SEQ ID NO:46)	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:3
huBH56-3 (SEQ ID NO: 48)	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
huBH56-4-IgG (SEQ ID NO: 49)	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:3
huBH56-5-IgG (SEQ ID NO:50)	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
huBH56-6-IgG (SEQ ID NO:51)	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:3
huHA68-1-IgG (SEQ ID NO:52)	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:7
huHA68-2-IgG (SEQ ID NO:53)	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:7
huHA68-3-IgG (SEQ ID NO:54)	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
huHA68-4-IgG (SEQ ID NO:55)	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7

3.2 抗人 BCMA 人源化抗体的表达及纯化

与实施例 2.1 所述类似地,将编码抗人 BCMA 人源化抗体全长的质粒转染 ExpiCHO-S 细胞以表达各抗人 BCMA 人源化抗体,并如实施例 2.1 所述进行相应纯化。浓缩纯化的抗人 BCMA 人源化抗体,无菌过滤,通过 SDS-PAGE 和分子排阻色谱(SEC)检测抗人 BCMA 人源化抗体纯度。

3.3 抗人 BCMA 人源化抗体的物理化学分析

对于获得的抗人 BCMA 人源化抗体,通过分子排阻色谱确认了各抗体的纯度。具体而言,使用 100 mM 磷酸钠+100 mM Na2SO4 (pH 7.0)作为运行缓冲液,将 20 μg 表 3 中各人源化抗人 BCMA 抗体样品注入到 TSK G3000SWXL 柱上。运行 30 分钟。收集的流出液采用 Agilent 1220 HPLC 进行测量,并使用 OpenLAB 软件分析数据。根据结果选取抗体纯度>90%的人源化抗体,用于下一步实验。

3.4 抗人 BCMA 人源化抗体的物理化学分析

在本实验中,根据厂商说明,利用 ForteBio Octet RED96e 检测了上述人源化抗体与人 BCMA-His 蛋白(ACRO,货号:BCA-H522y)的结合亲和力。简言之,将 AHC 传感器(ForteBio,货号:18-5060)置于运行缓冲液(1 X PBS, XiGene, 货号:XG3650, 包含 0.02% Tween20, 0.1% BSA, pH7.0)中,在室温条件下进行预平衡 10min。在 96 孔板中,BCMA 动力学实验方法按照以下步骤进行: a) 用运行缓冲液平衡基线 180 s; b) 加入用运行缓冲液稀释的抗体,终浓度 5 μg/mL, 固化 200 s; c) 用运行缓冲液平衡基线 180 s; d) 向各孔中加入如下浓度的用运行缓冲液稀释的人 BCMA 蛋白 100 nM。结合 200 s, 解离 180 s。e) 再生液(0.01 M Gly-HCl, pH 1.5)再生 30 s。实验数据使用 Fortebio Data Analysis 软件 1:1 结合模型进行拟合并计算,结果如下表所示。

表 4 抗人 BCMA 人源化抗体与人 BCMA 蛋白结合亲和力

抗体	抗原	KD (M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)
----	----	--------	-----------	-----------

BH56-IgG	人 BCMA 蛋白	<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
huBH56-3-IgG		<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
huBH56-4-IgG		<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
huBH56-5-IgG		<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
huBH56-6-IgG		<1.0E-12	978600	<1.0E-07
HA68-IgG		<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
huHA68-3-IgG		<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
huHA68-4-IgG		<1.0E-12	1E+06	<1.0E-07
269B094		1.51E-09	1E+06	0.001552

表 4 结果表明，与嵌合抗体相比，人源化抗体以高亲和力与人 BCMA 蛋白结合。

3.5 抗人 BCMA 人源化抗体与肿瘤细胞系结合

通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 BCMA 人源化特异性抗体能否与表达在肿瘤细胞表面的人 BCMA 蛋白结合；检测系统中的靶细胞为内源性表达人 BCMA 的 NCI-H929（南京科佰生物科技有限公司，CBP60243）肿瘤细胞。

收集 NCI-H929 细胞，室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的抗 BCMA 人源化抗体和 269B094 对照抗体（初始浓度为 20μg/mL，4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点）重悬，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098)，4℃避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞，最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 3 所示的结果可知，huHA68-3 与 NCI-H929 细胞的结合活性低于 HA68-IgG，与对照抗体相比，活性均比对照抗体好。

实施例 4 抗人 BCMA×CD3 双特异性抗体的制备及其表征

4.1 双特异性抗体构建

本发明构建了如图 1 所示的两种不同非对称结构的双特异性抗体，其中各个双特异性抗体的抗人 BCMA 部分来源于上述人源化抗体 huBH56-3 和 huHA68-4，抗人 CD3 部分来源于 CD3 抗体 sp34 人源化（PCT/CN2023/071314），双特异性抗体恒定区均包含铰链结构（knob-in-hole, KIH）(Merchant, A. M., et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." Nat Biotechnol 16(7): 677-681.)。这类双特异性抗体在本文中也称为“抗 CD3/BCMA 双特异性抗体”或“抗 CD3/抗 BCMA 双特异性抗体”，有时简称为“双特异性抗体分子、双抗”。抗 CD3/BCMA 双特异性抗体的抗 BCMA 部分靶向表达 BCMA 的细胞，而抗 CD3 部分活化 T 细胞。双抗同时结合肿瘤细胞上的 BCMA 和 T 细胞的 CD3 有助于通过经活化的 T 细胞定向杀伤肿瘤细胞。

本申请使用标准构建方法获得了如图 1 所示结构的 2 种抗 CD3/BCMA 双特异性抗体：

huBH56-3-hole：以抗 BCMA 人源化抗体 huBH56-3 可变区序列克隆到包含 Fc（hole）的 pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 huBH56-3-hole 分子。

2xhuBH56-3-hole：采用 PCR 技术扩增编码 huBH56-3 可变区序列，再采用重叠 PCR 技

术，将两个编码 huBH56-3 可变区序列顺序串联拼接（2 个编码片段之间含连接肽：GGGGS（SEQ ID NO:99）），再将拼接好的序列克隆到包含含有到包含 Fc（hole）的 pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 2x huBH56-3-hole 分子。

huHA68-4-hole：以抗 BCMA 人源化抗体 huHA68-4 可变区序列克隆到包含 Fc（hole）的 pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 huHA68-4-hole 分子。

2xhuHA68-4-hole：采用 PCR 技术扩增编码 huHA68-4 可变区序列，再采用重叠 PCR 技术，将两个编码 huHA68-4 可变区序列顺序串联拼接（2 个编码片段之间含连接子：GGGGS），再将拼接好的序列克隆到包含含有到包含 Fc（hole）的 pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 2xhuHA68-4-hole 分子。

CD3 ScFv-knob：将编码抗 CD3 单链抗体 23L2 的核苷酸序列克隆到带有 Fc（knob）的 pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 CD3 ScFv-knob 分子。

使用 Teclistamab（一种针对 BCMA/CD3 的全人双特异抗体）（重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:63 SEQ ID NO:65；轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 64；SEQ ID NO:66）作为对照抗体，所述序列来自 US2017/0051068A1。类似地，表达对照抗体。对抗体进行相应纯化。

根据表 5 所示的具体组成，将上述各个表达载体相应组合，在合适的条件下表达获得图 1 中的双特异性抗体。

双特异性抗体的构建、表达、纯化、初步分析步骤同实施例 2.1。

表 5. 人源化双特异性抗体

克隆	链	结构	氨基酸序列	
huBH56-3-CD3ScFv	HC1: huBH56-3-hole SEQ ID NO: 56	huBH56-3 VH	SEQ ID NO:12	
		连接肽(部分铰链区)	SEQ ID NO:94	
		Fc(hole)（CH2-CH3 hole）	SEQ ID NO:84	
	HC2:CD3ScFv-knob SEQ ID NO:57	CD3-VH	SEQ ID NO: 34	
		连接肽	SEQ ID NO:100	
		CD3-VL	SEQ ID NO:35	
		连接肽(部分铰链区)	SEQ ID NO: 94	
		Fc(knob)（CH2-CH3 knob）	SEQ ID NO:87	
	2xhuBH56-3-CD3ScFv	HC1: 2xhuBH56-3-hole SEQ ID NO:104	huBH56-3 VH	SEQ ID NO:12
			连接肽	SEQ ID NO:99
huBH56-3			SEQ ID NO:12	
连接肽(部分铰链区)			SEQ ID NO:94	
Fc(hole)（CH2-CH3 hole）			SEQ ID NO:84	
HC2:CD3ScFv-knob SEQ ID NO: 57		CD3-VH	SEQ ID NO:34	
		连接肽	SEQ ID NO:100	
		CD3-VL	SEQ ID NO:35	

		连接肽	SEQ ID NO:94
		Fc(knob) (CH2-CH3 knob)	SEQ ID NO:87
huHA68-4-CD3ScFv	HC1: huHA68-4-hole SEQ ID NO: 102	huHA68-4	SEQ ID NO: 23
		连接肽	SEQ ID NO:94
		Fc(hole) (CH2-CH3 hole)	SEQ ID NO:84
	HC2:CD3ScFv-knob SEQ ID NO:57	CD3-VH	SEQ ID NO:34
		连接肽	SEQ ID NO:100
		CD3-VL	SEQ ID NO:35
		连接肽	SEQ ID NO:94
		Fc(knob) (CH2-CH3 knob)	SEQ ID NO:87
2xhuHA68-4-CD3ScFv	HC1:2xhuHA68-4-hole SEQ ID NO: 103	huHA68-4	SEQ ID NO:23
		连接肽	SEQ ID NO:99
		huHA68-4	SEQ ID NO:23
		连接肽	SEQ ID NO:94
		Fc(hole) (CH2-CH3 hole)	SEQ ID NO:84
	HC2:CD3ScFv-knob SEQ ID NO:57	CD3-VH	SEQ ID NO:34
		连接肽	SEQ ID NO:100
		CD3-VL	SEQ ID NO:35
		连接肽	SEQ ID NO:94
		Fc(knob) (CH2-CH3 knob)	SEQ ID NO:87

将获得的重链和轻链表达载体(见表 5)共转染 ExpiCHO-S 细胞，在合适的条件下表达获得双特异性抗体蛋白，表达、纯化、初步分析步骤同实施例 2.1。

4.2 抗人 BCMA×CD3 双抗与表达人 BCMA 蛋白工程化细胞结合

通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 BCMA×CD3 人源化双抗能否与稳定表达在细胞表面的人 BCMA 蛋白结合。

酶解消化 CHOK1-huBCMA 细胞系后得到 CHOK1-huBCMA 细胞的单细胞悬液，室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的抗 BCMA 人源化双抗和 Teclistamab analog 对照抗体（初始浓度为 20μg/mL，4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点）重悬，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098)，4℃ 避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞，最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 4 所示的结果可知，所有待测样品与工程化细胞的结合活性均比对照样品好。

4.3 抗 BCMA×CD3 双特异性抗体对肿瘤细胞的杀伤活性

为了检测抗 CD3/BCMA 双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的活性，我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统，以内源性表达人 BCMA 的 RPMI-8226（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，TCHu234）、NCI-H929（南京科佰生物科技有限公司，CBP60243）和 293T（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，GNHu17）阴性细胞株作为靶细胞，人外周血单个核细胞 PBMC（取自健康人血）为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞，用 1640 完全培养基（添加 10% FBS）调整细胞密度至 $5 \sim 10 \times 10^6/\text{mL}$ ，加入终浓度为 100 IU/mL IL2（江苏金丝利药业有限公司）激活过夜。靶细胞 RPMI-8226、NCI-H929 以及 BCMA 阴性细胞 293T， $400 \times g$ 离心 5 min 收集细胞弃上清。用含 1% FBS（Gibco，Cat#10099-141）和 100 IU/mL IL2 的 MEM- α （Gibco，Cat#41061-029）测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$ ，按每孔 50 μL （即每孔 10,000 个细胞）铺到 96 孔板（Corning，Cat#3599）中。

准备等比梯度稀释的待测抗体稀释液（待测抗体最高检测浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，5 倍等比梯度稀释，共 9 个浓度点），每孔加入 50 μL 。实验同时设置靶细胞最大杀伤（靶细胞中加 2% Triton100 裂解液）、最小杀伤（靶细胞中加测试缓冲液）及自然杀伤（靶细胞中加效应细胞）对照，每孔加入 50 μL 。最终效应细胞 E 和靶细胞 T 的比例为 10:1，然后放置于细胞培养箱继续孵育 24 h。孵育结束后，取出实验板， $400 \times g$ 离心 3 min 使所有细胞沉到板底，小心吸取 50 μL 上清至新的 96 孔板，加入 50 μL LDH 检测液（Roche，Cat#11644793001）室温孵育，颜色变化时在 F50 酶标仪上读板，检测波长为 492nm，参比波长为 650nm，当最大杀伤孔的 OD492 值介于 0.4~1.0 之间时进行检测分析。

结果见图 5，表明抗 CD3/BCMA 双特异性抗体能够特异性诱导 T 细胞杀伤 RPMI-8226 和 NCI-H929 肿瘤细胞，且杀伤活性均强于对照抗体。而对 BCMA 阴性细胞 293T 完全没有杀伤效应。因此，本发明的双特异性抗体无显著可见的非特异性杀伤活性。

4.4 抗 BCMA $\times$ CD3 双特异性抗体激活 T 细胞后诱导细胞因子释放

为了检测抗 BCMA $\times$ CD3 双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞同时对细胞因子分泌诱导的情况，我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统，以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 的 NCI-H929 细胞为靶细胞，人外周血单核细胞 PBMCs 为效应细胞。如 4.3 所示进行杀伤孵育。在杀伤终点，取 NCI-H929 上清检测体系里的 IL-6 和 IFN- γ 。

杀伤孵育结束后，取出实验板， $500 \times g$ 离心 5 min 使所有细胞沉到板底，小心吸取 100 μL 上清至新的 96 孔板，分别检测上清中的人 IFN γ （检测试剂盒：Cisbio，Cat#62HIFNGPEH）、人 TNF α （检测试剂盒：R&D，Cat#DY210）以及人 IL-6（检测试剂盒：R&D，Cat#DY206）因子水平。

结果见图 6，表明抗 BCMA $\times$ CD3 双特异性抗体在 NCI-H929 体系中能够诱导 T 细胞释放人 IFN γ （图 6）以及人 IL-6 因子（图 6）。表明因子释放趋势同杀伤结果一致。杀伤效应越强，因子释放越高。

实施例 5：GPRC5D VHH 抗体的制备和验证

5.1 采用羊驼免疫的方法，并通过噬菌体文库展示，获得如下驼源 GPRC5D VHH 抗体 VHH8

人 GPRC5D 蛋白（NP_061124.1(NCBI)或 sp|Q9NZD1 (Uniprot)）基因序列由通用生物系统（安徽）有限公司进行密码子优化和基因合成，并克隆到稳转表达载体中。使用 Lipofectamine™ 2000（Invitrogen，Cat#11668019）转染试剂将编码人 GPRC5D 蛋白（SEQ ID

NO:108) 基因序列分别转染到 CHO-K1 (ATCC, Cat#CCL-61) 和 293T (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-502) 细胞中。转染后的细胞经过 0.3μg/mL 嘌呤霉素 (Gibco, Cat#A1113802) 筛选和单克隆铺板, 得到了高表达人 GPRC5D 的 CHO-K1 (CHO-K1-huGPRC5D) 和 293T 工程化单克隆细胞 (293T-huGPRC5D)。

细胞名称	蛋白质	细胞系	启动子	抗性
CHO-K1-HuGPRC5D	人 GPRC5D	CHO-K1	CMV	嘌呤霉素
293T-HuGPRC5D	人 GPRC5D	HEK293T	CMV	嘌呤霉素

表 6: 驼源抗 GPRC5D VHH 抗体的可变区氨基酸序列

名称	氨基酸序列
8-VHH	SEQ ID NO:106
8-HCDR1	SEQ ID NO:24
8-HCDR2	SEQ ID NO:25
8-HCDR3	SEQ ID NO:26

表 6 中 VHH 抗体的 DNA 序列由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成。将编码抗体的 VHH 基因插入含有编码人 IgG1 重链恒定区 Fc (SEQ ID NO:80) 基因的表 达载体 pcDNA3.1(+) 中, 获得含人 IgG1 重链恒定区 Fc 的编码驼源抗 GPRC5D VHH 抗体质粒。包含人 IgG1 重链恒定区 Fc 的抗体 VHH-Fc 的氨基酸序列参见 SEQ ID NO:107。

将表 6 中所述编码驼源抗 GPRC5D VHH-Fc 抗体 (含人 IgG1 重链恒定区 Fc) 的质粒转染 ExpiCHO-S 细胞以表达抗体, 并进行相应纯化 (具体方法参见实施例 2.1)。浓缩纯化的抗体, 无菌过滤, 通过 SDS-PAGE 和分子排阻检测抗体蛋白的纯度, 结果表明抗体的纯度>90%, 符合要求, 可以用于下一步实验。

5.2 驼源抗 GPRC5D VHH 抗体与表达细胞表面的人 GPRC5D 蛋白或恒河猴 GPRC5D 蛋白的结合

通过细胞结合实验来判断本发明中的驼源抗 GPRC5D VHH 抗体能否与稳定表达在 293T 细胞表面的人 GPRC5D 蛋白或食蟹猴 GPRC5D 蛋白结合。

酶解消化后得到两种细胞的单细胞悬液, 室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后离心弃上清, 用梯度稀释的本申请获得的驼源抗 GPRC5D VHH-Fc 抗体 (初始浓度为 25 μg/mL, 4 倍梯度向下稀释成 6.25 μg/mL、1.563 μg/mL、0.391 μg/mL、0.0977 μg/mL、0.0244 μg/mL、0.0061 μg/mL 和 0.00153 μg/mL 共 8 个点) 重悬细胞沉淀, 4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098), 4℃避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞, 最后用 Beckman CytoFlex (Beckman) 流式细胞仪检测 PE 通道荧光信号。

图 21 和图 22 所示的结果显示, 驼源抗 GPRC5D VHH-Fc 抗体可以与表达人 GPRC5D 蛋白或食蟹猴 GPRC5D 蛋白的细胞结合。

5.3 驼源抗 GPRC5D 抗体人源化

对驼源抗体 8 进行人源化，方法如实施例 3 所述。

由此获得人源化 VHH 抗体 8H5，其 VHH 序列为 SEQ ID NO:27, IMGT 编号方案下的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别为 SEQ ID NO: 24、25 和 26。将可变区氨基酸序列送至通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成。将编码抗体的 VHH 区的基因依次插入含有人 IgG1 重链恒定区 Fc 编码基因的表达载体 pcDNA3.1(+)中，以获得表达抗 GPRC5D 人源化抗体全长重链 VHH-Fc 的质粒。具体步骤参见 5.1，获得的 VHH-Fc 的氨基酸序列参见 SEQ ID NO:105。

将编码 GPRC5D 人源化抗体全长重链 VHH-Fc 的质粒组合转染 ExpiCHO-S 细胞以表达抗 GPRC5D 人源化抗体，并进行相应纯化（具体方法参见实施例 2.1）。浓缩纯化的抗体，无菌过滤，通过 SDS-PAGE 和分子排阻色谱（SEC）检测蛋白纯度。

5. 4 人源化抗 GPRC5D 抗体物理化学分析

对于获得的人源化抗 GPRC5DVHH-Fc 抗体，通过分子排阻色谱确认了抗体的纯度。具体而言，使用 100 mM 磷酸钠+100 mM Na2SO4 (pH 7.0)作为运行缓冲液，将 20 µg 样品注入到 TSK G3000SWXL 柱上。运行 30 分钟。收集的流出液采用 Agilent 1220 HPLC 进行测量，并使用 OpenLAB 软件分析数据。

表 7 人源化抗体纯度

mAb ID	Purity (%)
8H5	96.1

5.5 人源化抗 GPRC5D VHH-Fc 抗体与表达于细胞表面的人 GPRC5D 蛋白的结合

通过细胞结合实验来判断本发明的人源化抗 GPRC5D VHH-Fc 抗体能否与稳定表达在 293T 细胞表面的人 GPRC5D 蛋白结合。

酶解消化后得到 293T-huGPRC5D 细胞（如实施例 5.1 所述构建）的单细胞悬液，室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后离心弃上清，用梯度稀释的本申请获得的人源化 GPRC5D VHH-Fc 抗体（初始浓度为 25 µg/mL，4 倍梯度向下稀释成 6.25 µg/mL、1.563 µg/mL、0.391 µg/mL、0.0977 µg/mL、0.0244 µg/mL、0.0061 µg/mL 和 0.00153 µg/mL 共 8 个点）重悬细胞沉淀，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098)，4℃避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞，最后用 Beckman CytoFlex（Beckman）流式细胞仪检测 PE 通道荧光信号。

从图 23 所示的结果可知结果显示，人源化 GPRC5D VHH-Fc 抗体可以与表达人 GPRC5D 蛋白的细胞结合，有的克隆结合能力优于对照抗体和细胞的结合。

5.6 人源化抗 GPRC5D VHH 抗体与表达同家族蛋白的 293T 工程化细胞结合检测：

5.6.1 表达同家族蛋白的 293T 工程化细胞构建及鉴定：

使用标准方法产生 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 的转染细胞系，以用作表征研究（表 8）。

人 GPRC5A 蛋白（Q8NFIJ5，SEQ ID NO:81）基因载体由南京维立志博生物科技有限公司构建完成，采用 cDNA（sino，Cat#HG12833 UT）为模板扩增 GPRC5A 蛋白目的片段，并

克隆到稳转载体 PiggyBac 中。人 GPRC5B 蛋白 (Q9NZH0, SEQ ID NO:82) 基因序列和人 GPRC5C 蛋白 (Q9NQ84, SEQ ID NO:83) 均由通用生物系统 (安徽) 有限公司进行 CHO 细胞偏爱密码子优化和基因合成, 并克隆到稳转载体 PiggyBac 中。使用 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Cat#11668019) 转染试剂将编码人 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 蛋白基因序列分别转染到 293T (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-502) 细胞中。转染后的细胞经过 0.3μg/mL 嘌呤霉素 (Gibco, Cat#A1113802) 加压筛选 1 周以上。加压筛选的细胞通过酶解消化成单细胞悬液, 分别与商品化阳性抗体 Human GPRC5A Antibody (R&D, MAB5239)、Human GPRC5B Antibody (R&D, MAB10253) 和 Human GPRC5C Antibody (R&D, MAB6594) 的 10μg/mL 稀释液孵育。4°C 孵育 3 分钟后, 细胞沉淀用 PBS 洗一遍, 离心弃上清, 细胞沉淀用 1:200 稀释的 R-Phycoerythrin AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (subclasses 1+2a+2b+3), Fcγ Fragment Specific (min X Hu, Bov, Rb Sr Prot) (Jackson ImmunoResearch, 115-115-164) 重悬, 4°C 避光孵育 30 分钟。细胞用 PBS 洗两遍后, 流式上机检测细胞的阳性率。经流式检测表明通过转染获得了表达人 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 的 293T 工程化多克隆细胞 (表 8)。

表 8: GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 表达型细胞系

构建细胞系名称	蛋白质	细胞系	启动子	抗性
293T-humanGPRC5A	HuGPRC5A	293T	CMV	嘌呤霉素
293T-humanGPRC5B	HuGPRC5B	293T	CMV	嘌呤霉素
293T-humanGPRC5C	HuGPRC5C	293T	CMV	嘌呤霉素

5.6.2 人源化抗 GPRC5D VHH 抗体与表达同家族蛋白的 293T 工程化细胞结合

酶解消化上述 3 种表达同家族蛋白的 293T 工程化细胞 (293T-humanGPRC5A、293T-humanGPRC5B 和 293T-humanGPRC5C) 获得单细胞悬液。抗人 GPRC5D VHH-Fc 抗体和对照抗体 GC5B596(HC:SEQ ID NO:67; LC: SEQ ID NO:68) 用 PBS 稀释到 20 μg/mL 和 2 μg/mL, 重悬细胞沉淀, 于 4°C 冰箱孵育 30 分钟, 同时以不加入抗体的细胞作为空白对照组。细胞用 PBS 洗一遍后, 用 1:200 稀释的 R-Phycoerythrin AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ fragment specific (min X Bov, Hrs, Ms Sr Prot) 重悬, 4°C 避光孵育 30 分钟。细胞用 PBS 洗两遍后, 用 100 μL 的 PBS 重悬后, 在 Beckman CytoFlex 流式细胞仪上检测抗体与细胞的结合情况。为确保细胞表达蛋白无误, 同时按上述同家族蛋白工程化 293T 细胞构建的方法, 用商品化阳性抗体 Human GPRC5A Antibody (R&D, MAB5239)、Human GPRC5B Antibody (R&D, MAB10253) 和 Human GPRC5C Antibody (R&D, MAB6594) 做细胞的流式鉴定。

流式检测结果如图 24、图 25 和图 26 所示, 抗人 GPRC5D VHH 抗体与表达同家族蛋白 GPRC5A、GPRC5B 和 GPRC5C 的 293T 工程化细胞结合较弱。

实施例 6 抗人 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体的制备及其表征

6.1 三特异性抗体构建

本发明构建了如图 7 所示的两种不同非对称结构的三特异性抗体, 其中各个三特异性抗体的抗人 BCMA 部分来源于上述人源化抗体 huBH56-3, 抗 GPRC5D 部分来源于人源化抗体 hu8H5 和 hu29H6 (其中 hu29H6 抗体来源于 PCT/CN2023/071314), 抗 CD3 部分来源于人源化 CD3 抗体 (PCT/CN2023/071314), 双特异性抗体恒定区均包含杵臼结构 (knob-in-

hole, KIH) (Merchant, A. M., et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." Nat Biotechnol 16(7): 677-681.). 这类三特异性抗体在本文中也称为“抗 CD3/BCMA/GPRC5D 三特异性抗体”或“抗 CD3/抗 BCMA/抗 GPRC5D 三特异性抗体”，有时简称为“三特异性抗体分子、三抗”。抗 CD3/BCMA/GPRC5D 三特异性抗体的抗 BCMA 部分靶向表达 BCMA 的细胞，抗 GPRC5D 部分靶向表达 GPRC5D 的细胞，或抗 BCMA 部分和抗 GPRC5D 部分靶向同时表达 BCMA 和 GPRC5D 的肿瘤细胞，而抗 CD3 部分活化 T 细胞。三抗同时结合肿瘤细胞上的 BCMA、GPRC5D 和 T 细胞的 CD3 有助于通过经活化的 T 细胞定向杀伤肿瘤细胞。

本申请使用标准构建方法获得了如图 7 所示结构的 2 种抗 CD3/BCMA/GPRC5D 三特异性抗体：

CD3Fab 重链-knob：将编码抗 CD3 人源化单抗重链可变区序列克隆到包含含有 Fc(knob)的 IgG1 重链恒定区的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 CD3Fab 重链-knob 分子。

CD3Fab 轻链：将编码抗 CD3 人源化单抗 H34L-2 轻链可变区序列克隆到包含含有 IgG1 轻链 lamda 恒定区的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 CD3-LC 分子。

huBH56-3-hole：以抗 BCMA 人源化抗体 hu BH56-3 可变区序列克隆到包含 Fc (hole) 的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 hu BH56-3-hole 分子。

hu8H5-huBH56-3-hole：采用重叠 PCR 技术，将编码 hu8H5 可变区序列和编码 hu BH56-3 可变区序列顺序串联拼接（2 个编码片段之间含连接子：GGSGG），再将拼接好的序列克隆到包含含有到包含 Fc (hole) 的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 hu8H5-huBH56-3-hole 分子。

29H6-CD3ScFv-knob：采用重叠 PCR 技术，将编码抗 GPRC5D 抗体 29H6 的重链可变区序列抗 CD3 单链抗体 23L2 的核苷酸序列顺序串联拼接（2 个编码片段之间含连接子：GGGGS），再将拼接好的序列克隆到带有 Fc (knob) 的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 29H6-CD3ScFv-knob 分子。

29H6Fab 轻链：将编码 29H6 的轻链可变区序列克隆到包含含有 IgG1 轻链 kappa 恒定区的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 29H6Fab 轻链分子。

根据表 9 所示的具体组成，将上述各个表达载体相应组合，在合适的条件下表达获得图 7 中的三特异性抗体。

三特异性抗体的构建、表达、纯化、初步分析步骤同实施例 2.1。

表 9. 三特异性抗体

克隆	链	结构	氨基酸序列
Tri8H5BH563-CD3 Fab	HC1: hu8H5-huBH56-3-hole SEQ ID NO:58	Hu8H5-VH	SEQ ID NO:27
		连接肽	SEQ ID NO:101
		huBH56-3-VH	SEQ ID NO:12
		连接肽(部分铰链区)	SEQ ID NO:94
		Fc(hole)（铰链区-CH2-CH3 hole）	SEQ ID NO:84
	HC2: CD3-Fab HC-knob	HuCD3-VH	SEQ ID NO:34
		CH1	SEQ ID NO:88

	SEQ ID NO:59	铰链区	SEQ ID NO:96
	CD3-Fab-HC:SEQ ID NO:11	Fc(knob) (CH2-CH3knob)	SEQ ID NO:87
	LC1:CD3Fab-LC	CD3-VL	SEQ ID NO:35
	SEQ ID NO:60	轻链恒定区 (lambda)	SEQ ID NO:91
TriBH563CD3G11-1G4S	HC1:huBH56-3-hole SEQ ID NO:56	HuBH56-3 VH	SEQ ID NO:12
		连接肽(部分铰链区)	SEQ ID NO:94
		Fc(hole) (CH2-CH3knob)	SEQ ID NO:84
	HC2: 29H6-CD3ScFv-knob SEQ ID NO:61 29H6-Fab-HC(29H6-VH-CH1-铰链区): SEQ ID NO:110	29H6-VH	SEQ ID NO:42
		CH1	SEQ ID NO:88
		铰链区	SEQ ID NO:96
		连接肽	SEQ ID ND:99
		CD3-ScFv	SEQ ID NO: 109
		Fc(knob) (铰链区-CH2-CH3knob)	SEQ ID NO:47
	LC1:29H6Fab-LC SEQ ID NO:62	29H6-VL	SEQ ID NO:43
		轻链恒定区	SEQ ID NO:93

将获得的重链和轻链表达载体(见表 9)共转染 ExpiCHO-S 细胞，在合适的条件下表达获得三特异性抗体蛋白，表达、纯化、初步分析步骤同实施例 2.1。

IBI3003 三特异性抗体按照 WO2022/174813/A1 中公开的方法制备。

BGCB491 三特异性抗体按照 WO2022/175255 A2 中公开的方法制备。

6.2 抗人 BCMA×GPPRC5×CD3 三特异性抗体与内源性表达人 BCMA 和人 GPRC5D 蛋白的肿瘤细胞结合实验

通过细胞结合实验来判断本发明中的三特异性抗体能否与内源性表达人 BCMA 和人 GPRC5D 蛋白的肿瘤细胞表面的蛋白结合。

收集 MM.1R（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，SCSP-5050）和 NCI-H929（南京科佰生物科技有限公司，CBP60243）的单细胞悬液，室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的抗 CD3/BCMA/GPRC5D 三特异性抗体（初始浓度为 150nM，4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点）重悬，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098)，4℃避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞，最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 8 所示的结果可知,所有待测样品与 MM.1R 和 NCI-H929 肿瘤细胞均有较好的结合活性。

6.3 抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体对肿瘤细胞的杀伤活性以及对 T 细胞的活化和衰竭指标的检测

为了检测抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的活性,我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统,以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 不同表达量的 MM.1R(高) (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, SCSP-5050)、NCI-H929(中) (南京科佰生物科技有限公司, CBP60243)、MOLP-8 (低) (南京科佰生物科技有限公司, CBP60243) 肿瘤细胞为靶细胞,人外周血单个核细胞 PBMC (取自健康人血) 为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞,用 1640 完全培养基 (添加 10% FBS) 调整细胞密度至 $5 \sim 10 \times 10^6/\text{mL}$,加入终浓度为 100 IU/mL IL2 (江苏金丝利药业有限公司) 激活过夜。靶细胞 MM.1R、NCI-H929 和 MOLP-8, $400 \times g$ 离心 5 min 收集细胞弃上清。用含 1% FBS (Gibco, Cat#TCHu 44) 和 100 IU/mL IL2 的 MEM- α (Gibco, Cat#41061-029) 测试缓冲液调整靶细胞密度至 $4 \times 10^5/\text{mL}$,按每孔 50 μL (即每孔 20,000 个细胞) 铺到 96 孔板 (Corning, Cat#3599) 中。

准备等比梯度稀释的待测抗体稀释液 (待测抗体最高检测浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 倍等比梯度稀释,共 9 个浓度点),每孔加入 50 μL 。实验同时设置靶细胞最大杀伤 (靶细胞中加 2% Triton100 裂解液)、最小杀伤 (靶细胞中加测试缓冲液) 及自然杀伤 (靶细胞中加效应细胞) 对照,每孔加入 50 μL 。最终效应细胞 E 和靶细胞 T 的比例为 3:1,然后放置于细胞培养箱继续孵育 48 h。孵育结束后,取出实验板, $400 \times g$ 离心 3 min 使所有细胞沉到板底,小心吸取 50 μL 上清至新的 96 孔板,加入 50 μL LDH 检测液 (Roche, Cat#11644793001) 室温孵育,颜色变化时在 F50 酶标仪上读板,检测波长为 492nm,参比波长为 650nm,当最大杀伤孔的 OD492 值介于 0.4~1.0 之间时进行检测分析。

结果见图 9,表明抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体能够特异性诱导 T 细胞杀伤肿瘤细胞,且杀伤活性强于对照抗体。

为了检测抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体在 TDCC 杀伤体系中对 T 细胞功能的影响,我们测试了杀伤实验中 T 细胞表达 CD25 (Biolegend, Cat#302612)、CD69 (Biolegend, Cat#310904)、PD1 (Biolegend, Cat#329908)、TIM3 (Biolegend, Cat#345006) 以及 T 细胞凋亡 (Biolegend, Cat#423114) 指标。

将上述杀伤实验样品板中剩余细胞用 PBS 重悬,并转移细胞至 96 孔 V 底板 (NEST, 淘宝), $500 \times g$ 离心 5 min 收集细胞弃上清。用含有检测抗体的 PBS 重悬细胞。4℃孵育 30min 后,取出实验板, $500 \times g$ 离心 5 min,弃上清, PBS 重悬细胞,进行流式分析,测试 T 细胞激活 (CD25 和 CD69 表达)、T 细胞功能衰竭 (PD1 和 TIM3 表达) 以及 T 细胞凋亡指标变化情况。

结果见图 10, T 细胞激活和衰竭标志物检测结果同杀伤趋势基本一致。显示抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体对 T 细胞的激活作用比对照抗体更强,同时也更促进了 T 细胞的凋亡。

6.4 抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体激活 T 细胞后诱导细胞因子释放

为了检测抗 BCMA×GPPRC5D×CD3 三特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞同时对细胞因子分泌诱导的情况,我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统,以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 的 MM.1R、NCI-H929 和 MOLP-8 细胞为靶细胞,人外周血单核细胞

PBMCs 为效应细胞。如 5.8 所示进行杀伤孵育。在杀伤终点, 取上清检测体系里的 IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 。

杀伤孵育结束后, 取出实验板, 500 $\times$ g 离心 5 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 100 μ L 上清至新的 96 孔板, 分别检测上清中的人 IFN γ (检测试剂盒: Cisbio, Cat#62HIFNGPEH)、人 TNF α (检测试剂盒: R&D, Cat#DY210) 以及人 IL-6 (检测试剂盒: R&D, Cat#DY206) 因子水平。

结果见图 11, 表明抗 BCMA $\times$ GPRC5D $\times$ CD3 三特异性抗体在 MM.1R、NCI-H929 和 MOLP-8 体系中能够诱导 T 细胞释放人 IFN γ (图)、人 TNF α (图) 以及人 IL-6 因子(图)。表明因子释放趋势同杀伤结果一致。杀伤效应越强, 因子释放越高。

6.5 比较抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体和 CD3 $\times$ BCMA、CD3 $\times$ GPRC5D 双抗联用在肿瘤细胞和阴性细胞上的杀伤活性

为了比较抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体和 Teclistamab、Talquetamab 双抗联用介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的活性, 我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统, 以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 双低表达 MOLP-8 (南京科佰生物科技有限公司, CBP60243) 肿瘤细胞和 293T (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, GNHu17) 阴性细胞株作为靶细胞, 人外周血单个核细胞 PBMC (取自健康人血) 为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞, 用 1640 完全培养基 (添加 10% FBS) 调整细胞密度至 $5\sim 10\times 10^6$ /mL, 加入终浓度为 100 IU/mL IL2 (江苏金丝利药业有限公司) 激活过夜。靶细胞 MOLP-8 和 293T, 400 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞弃上清。PBS 清洗一遍后, 加入 CellTrace™ Violet (1E7 cells/ μ L) (Invitrogen, Cat#C34557) 染料标记细胞, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 然后加入等体积血清, 37 $^{\circ}$ C 终止 5min。400g 4 min 离心后去上清, 用含 1% FBS (Gibco, Cat#TCHU 44) 和 100 IU/mL IL2 的 MEM- α (Gibco, Cat#41061-029) 测试缓冲液调整标记后的靶细胞密度至 4×10^5 /mL, 按每孔 50 μ L (即每孔 20,000 个细胞) 铺到 96 孔板 (Corning, Cat#3599) 中。

准备等比梯度稀释的待测抗体稀释液 (待测抗体最高检测浓度为 2nM, 5 倍等比梯度稀释, 共 8 个浓度点), 每孔加入 50 μ L。实验同时设置靶细胞最大杀伤 (靶细胞中加 2% Triton100 裂解液)、最小杀伤 (靶细胞中加测试缓冲液) 及自然杀伤 (靶细胞中加效应细胞) 对照, 每孔加入 50 μ L。最终效应细胞 E 和靶细胞 T 的比例为 3:1, 然后放置于细胞培养箱继续孵育 48 h。孵育结束后, 取出实验板, 400 $\times$ g 离心 3 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 100 μ L 上清至新的 96 孔板, 保留备用。剩余细胞用 PBS 重悬, 并转移细胞至 96 孔 V 底板 (NEST, Cat#701201), 500 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞弃上清。用含有 Fixable Viability Stain 780 (Bioscience, Cat#565388) (1: 2000 稀释) 检测抗体的 PBS 重悬细胞。4 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后, 取出实验板, 500 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬细胞, 进行流式分析, 测试靶细胞杀伤情况。

结果见图 12, 表明抗 CD3/BCMA/GPRC5D 三特异性抗体介导的 T 细胞杀伤肿瘤细胞效应强于对照抗体 Teclistamab 和 Talquetamab 联用的杀伤作用。并且 TriBH563CD3G111-1G4S 三抗对 293T 阴性细胞没有非特异性杀伤。

6.6 抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体和 CD3 $\times$ BCMA、CD3 $\times$ GPRC5D 双抗联用在肿瘤细胞和阴性细胞上激活 T 细胞后诱导细胞因子释放

为了比较抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体和 Teclistamab、Talquetamab 双抗联用介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的同时对细胞因子分泌诱导的情况, 我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统, 以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 双低表达 MOLP-8 (南京科佰生物科技有限公司, CBP60243) 肿瘤细胞和 293T (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, GNHu17) 阴性细胞株作为靶细胞, 人外周血单个核细胞 PBMC (取自健康人血) 为效应细胞。

如实施例 6.3 所示进行杀伤孵育。在杀伤终点, 取上清检测体系里的 TNF- α 。

杀伤孵育结束后, 取出实验板, 500 $\times$ g 离心 5 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 100 μ L 上清至新的 96 孔板, 分别检测上清中的人 TNF α (检测试剂盒: R&D, Cat#DY210) 因子水平。

结果见图 13, 表明因子释放趋势同杀伤结果一致。杀伤效应越强, 因子释放越高。且 TriBH563CD3G111-1G4S 三抗在 293T 阴性细胞杀伤实验中, 没有明显的促进 T 细胞因子释放作用。

6.7 抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体与内源性表达人 BCMA 和人 GPRC5D 蛋白的肿瘤细胞结合实验

通过细胞结合实验来判断本发明中的三特异性抗体能否与内源性表达人 BCMA 和人 GPRC5D 蛋白的肿瘤细胞表面的蛋白结合。

收集 AMO-1 (南京科佰生物科技有限公司, CBP60242) 和 ARD (武汉普诺赛生命科技有限公司, CL-0778) 的单细胞悬液, 室温 400 $\times$ g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的抗 CD3/BCMA/GPRC5D 三特异性抗体 (初始浓度为 200nM, 5 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞, 最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 14 所示的结果可知, 待测三特异性抗体与 AMO-1 和 ARD 肿瘤细胞均有较好的结合活性, 并且结合活性强于对照双抗 Teclistamab、Talquetamab 和对照三抗 IBI3003、BGCB491。

6.8 抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体对肿瘤细胞的杀伤活性

为了检测抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的活性, 我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统, 以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 不同表达量的 AMO-1 (南京科佰生物科技有限公司, CBP60242) 和 ARD (武汉普诺赛生命科技有限公司, CL-0778) 肿瘤细胞为靶细胞, 人外周血单个核细胞 PBMC (取自健康人血) 为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞, 用 1640 完全培养基 (添加 10% FBS) 调整细胞密度至 5~10 $\times$ 10⁶/mL, 加入终浓度为 100 IU/mL IL2 (江苏金丝利药业有限公司) 激活过夜。靶细胞 AMO-1 和 ARD, 400 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞弃上清。PBS 清洗一遍后, 加入 CellTrace™ Violet (1E7 cells/ μ L) (Invitrogen, Cat#C34557) 染料标记细胞, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 然后加入等体积血清, 37 $^{\circ}$ C 终止 5min。400g 4 min 离心后去上清, 用含 1% FBS (Gibco, Cat#TCHu 44) 和 100 IU/mL IL2 的 MEM- α (Gibco, Cat#41061-029) 测试缓冲液调整标记后的靶细胞密度至 4 $\times$ 10⁵/mL, 按每孔 50 μ L (即每孔 20,000 个细胞) 铺到 96 孔板 (Corning, Cat#3599) 中。

准备等比梯度稀释的待测抗体稀释液 (待测抗体最高检测浓度为 0.5nM, 5 倍等比梯度稀释, 共 8 个浓度点), 每孔加入 50 μ L。实验同时设置靶细胞最大杀伤 (靶细胞中加 2% Triton100 裂解液)、最小杀伤 (靶细胞中加测试缓冲液) 及自然杀伤 (靶细胞中加效应细胞) 对照, 每孔加入 50 μ L。最终效应细胞 E 和靶细胞 T 的比例为 3:1, 然后放置于细胞培养箱继续孵育 48 h。孵育结束后, 取出实验板, 400 $\times$ g 离心 3 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 100 μ L 上清至新的 96 孔板, 保留备用。剩余细胞用 PBS 重悬, 并转移细胞至 96 孔 V 底板 (NEST, 淘宝), 500 $\times$ g 离心 5 min 收集细胞弃上清。用含有 Fixable Viability Stain 780 (Bioscience, Cat#565388) (1: 2000 稀释) 检测抗体的 PBS 重悬细胞。4 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后, 取出实验板, 500 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬细胞, 进行流式分析, 测试靶细胞杀伤情况。

结果见图 15, 表明抗 CD3 $\times$ BCMA $\times$ GPRC5D 三特异性抗体能够特异性诱导 T 细胞杀伤

肿瘤细胞, 其中 Tri8H5BH563-Fab 杀伤活性强于对照双抗 Teclistamab、Talquetamab 和对照三抗 IBI3003、BGCB491。

6.9 抗 CD3×BCMA×GPRC5D 三特异性抗体激活 T 细胞后诱导细胞因子释放

为了检测抗 CD3×BCMA×GPRC5D 三特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞同时对细胞因子分泌诱导的情况, 我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统, 以内源性表达人 BCMA 和 GPRC5D 的 AMO-1 和 ARD 细胞为靶细胞, 人外周血单核细胞 PBMCs 为效应细胞。如补充实施例 2 所示进行杀伤孵育。在杀伤终点, 取上清检测体系里的 TNF-α。

杀伤孵育结束后, 取出实验板, 500×g 离心 5 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 100μL 上清至新的 96 孔板, 分别检测上清中的人 TNFα (检测试剂盒: R&D, Cat#DY210) 因子释放水平。

结果见图 17 和 18, 表明抗 CD3×BCMA×GPRC5D 三特异性抗体在 AMO-1 和 ARD 体系中能够诱导 T 细胞释放人 TNFα 因子 (图 17 和 18)。因子释放趋势同杀伤结果一致。杀伤效应越强, 因子释放越高。

实施例 7 抗 BCMA×GPRC5D×CD3 三特异抗体在 hPBMC-B-NDG 小鼠 NCI-H929 肿瘤模型的体内功效

在 hPBMC-B-NDG 小鼠 NCI-H929 肿瘤模型中研究了抗 BCMA×GPRC5D×CD3 三特异抗体的体内抗肿瘤作用。

重度免疫缺陷小鼠 B-NDG 购自百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司; 人外周血单个核细胞(PBMC) 购自秒顺 (上海) 生物科技有限公司。

人骨髓瘤细胞 NCI-H929 购自南京科佰生物科技有限公司。细胞培养在 37℃、5% CO2 的培养箱中, 培养基成分为含有 10 % 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。

在 Day-8, 先将 18 只重度免疫缺陷 B-NDG 小鼠尾静脉接种 5.5×10^6 个人外周血单个核细胞/0.2mL RPMI 1640/只小鼠, 然后在 Day0, 在小鼠右前皮下植入 5×10^6 个 NCI-H929 细胞/0.2mL RPMI 1640+Matrigel/只小鼠。在平均肿瘤体积达到 147.7mm³ 左右时, 根据小鼠肿瘤体积和 PBMC 重建 (hCD45% 占比) 选择 12 只合适的小鼠入组, 随机分配到 2 个实验组中, 每组 6 只小鼠。在分组后的第 0、3、7 和 10 天, 分别向小鼠腹腔内施用空白对照 PBS 和 Talquetamab(0.3 mg/kg)和 Tri8H5BH563-Fab 三特异抗体(0.3 mg/kg)。在实验期间每周两次通过游标卡尺测量监测肿瘤体积。

抗 GPRC5D×CD3 双特异抗体 Talquetamab 的处理导致与 PBS 组相比抑制肿瘤生长, 但无显著性差异, TGI 为 37%; 抗 BCMA×GPRC5D×CD3 三特异抗体 Tri8H5BH563-Fab 的处理导致与 PBS 组相比均显著的抑制肿瘤生长, TGI 为 80.4%。结果如图 19 和下表 7 所示。

表 10. 受试品对 NCI-H929 肿瘤的生长抑制

组别	剂量	动物数量 (N)	肿瘤体积(mm ³) ^a (在首次给药后的第 14 天)	TGI(%) ^b	P ^c
空白对照 (PBS)	/	6	2513.49±146.83	-	/
Talquetamab	0.3 mg/kg	6	1637.6±309.63	37.0	0.0673
Tri8H5BH563-Fab	0.3 mg/kg	6	608.90±384.46	80.4	***0.0005

注: a. 平均数±标准误; b. TGI=(1-施用组的肿瘤体积变化/对照组的肿瘤体积变化)×100%; c. 给药组肿瘤体积与 PBS 对照组肿瘤体积在分组给药第 14 天进行统计学分析(t tests), ***P<0.001。

整个实验过程中，实验动物在给药期间活动和进食状态良好，G1 组动物体重有一定程度上升，G2 组动物体重无明显降低，表示动物对受试品耐受性良好。所有动物体重变化情况见表 11。

表 11. 受试品对小鼠体重的影响

组别	体重(g) ^a			给药 14 天后 体重变化(%)
	给药前	分组给药 第 14 天	p ^b	
空白对照 (PBS)	21.6±0.8	22.8±1.5	-	+5.3
Talquetamab	22.2±0.6	22.5±1.0	0.9778	+1.4
Tri8H5BH563-Fab	22.0±0.6	21.7±1.1	0.5460	-0.9

注：a.平均数±标准误；b.给药组与 PBS 对照组体重在分组给药第 14 天进行统计学分析(t tests)。

实施例 8 抗 BCMA×GPC5D×CD3 三特异抗体在 hPBMC-NCG 小鼠 MOLP8 肿瘤模型的体内功效

在 hPBMC-NCG 小鼠 MOLP8 肿瘤模型中研究了抗 BCMA×GPC5D×CD3 三特异抗体的体内抗肿瘤作用。

重度免疫缺陷小鼠 NCG 购自江苏集萃药康生物科技有限公司；人外周血单个核细胞 (PBMC) 购自秒顺（上海）生物科技有限公司。

人骨髓瘤细胞 MOLP8 购自南京科佰生物科技有限公司。细胞培养在 37℃、5% CO2 的培养箱中，培养基成分为含有 20 %灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。

在 Day-8，先将 36 只重度免疫缺陷 NCG 小鼠尾静脉接种 5×10⁶ 个人外周血单个核细胞 /0.2mL RPMI 1640/只小鼠，然后在 Day0，在小鼠右前皮下植入 5×10⁶ 个 MOLP8 细胞/0.2mL RPMI 1640+Matrigel/只小鼠。在平均肿瘤体积达到 160.6mm³ 左右时，根据小鼠肿瘤体积和 PBMC 重建 (hCD45%占比) 选择 24 只合适的小鼠入组，随机分配到 4 个实验组中，每组 6 只小鼠。在分组后的第 0、3 和 7 天，分别向小鼠腹膜内施用空白对照 PBS、对照抗体 Talquetamab、Tri8H5BH563-Fab 和 TriBH563CD3G111-1G4S 三特异抗体(0.3 mg/kg)。在实验期间每周两次通过游标卡尺测量监测肿瘤体积。

抗 GPC5D×CD3 对照抗体 Talquetamab 和抗 BCMA×GPC5D×CD3 三特异抗体 Tri8H5BH563-Fab 的处理导致与 PBS 组相比抑制肿瘤生长,但无显著性差异,TGI 分别为 39% 和 46.4%；TriBH563CD3G111-1G4S 的处理导致与 PBS 组相比显著的抑制肿瘤生长，TGI 分别为 46.4%和 73.8%。结果如图 20 和下表 12 所示。

表 12. 受试品对 MOLP8 肿瘤的生长抑制

组别	剂量	动物数量(N)	肿瘤体积(mm ³) ^a (在首次给药后的第 10 天)	TGI(%) ^b	P ^c
空白对照 (PBS)	/	6	2354.12±453.87	-	/
Talquetamab	0.3 mg/kg	6	1497.29±400.95	39.0	0.2798
Tri8H5BH563-Fab	0.3 mg/kg	6	1328.98±524.71	46.4	0.1331

TriBH563CD3G111-1G4S	0.3 mg/kg	6	739.03±199.86	73.8	*0.0166
----------------------	-----------	---	---------------	------	---------

注：a.平均数±标准误；b.TGI=(1-施用组的肿瘤体积变化/对照组的肿瘤体积变化)×100%；
c. 给药组肿瘤体积与 PBS 对照组肿瘤体积在分组给药第 10 天进行统计学分析(One-way ANOVA)，*P<0.05。

整个实验过程中，实验动物在给药期间活动和进食状态良好，G1-G3 组动物体重均有一定程度上升，表示动物对受试品耐受性良好。所有动物体重变化情况见表 13。

表 13. 受试品对小鼠体重的影响

组别	体重(g) ^a			给药 10 天后 体重变化(%)
	给药前	分组给药 第 10 天	p ^b	
空白对照 (PBS)	22.5±0.9	25.2±1.2	-	+11.9
Talquetamab	22.3±0.8	24.0±0.8	0.6202	+7.6
Tri8H5BH563-Fab	22.1±0.3	23.2±0.9	0.2125	+5.4
TriBH563CD3G111-1G4S	20.6±1.0	21.9±0.6	*0.0283	+7.2

注：a.平均数±标准误；b.给药组与 PBS 对照组体重在分组给药第 10 天进行统计学分析(One-way ANOVA)，*P<0.05。

本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。此外，本文所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

序列信息

SEQ NO.	序列信息	具体序列
1	BH56-VHH>HCDR1	PSAMS
2	BH56-VHH>HCDR2	GIYGDGRTTYADSVKG
3	BH56-VHH>HCDR3	GIRLLSESWAQAL
4	BH56-VHH>VH	EVQVVESGGGLVQAGESLTLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGD GRTTYADSVKGRFTISRDNAAKKTVTLQMNPLEPDSGNVICVVGIRLLSESWAQAL LRGQGTQVTVSS
5	HA68-VHH>HCDR1	PSAMN
6	HA68-VHH>HCDR2	GIYGDGKAEYADSVKG
7	HA68-VHH>HCDR3	GIRPTDAPWAASL
8	HA68-VHH>VH	QVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMNWARQAPGKGLEWVAGIYGD GKAEYADSVKGRFTISRDNAAKNMVYLMVNLRPEDTAVYSCAVGIRPTDAPWA ASLRGQGTQVTVSS
1	huBH56-1>HCDR1	SEQ ID NO:1
9	huBH56-1>HCDR2	VIYGDGRTTYADSVKG
3	huBH56-1>HCDR3	SEQ ID NO:3

10	huBH56-1>VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWVRQPPGKLEWVSVIYGDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LWGQGT LTVSS
1	huBH56-3>HCDR1	SEQ ID NO:1
2	huBH56-3>HCDR2	SEQ ID NO:2
3	huBH56-3>HCDR3	SEQ ID NO:3
12	huBH56-3>VH	EVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSS
1	huBH56-4>HCDR1	SEQ ID NO:1
13	huBH56-4>HCDR2	GIYGDGR TYYADSVKG
3	huBH56-4>HCDR3	SEQ ID NO:3
14	huBH56-4>VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSS
1	huBH56-5>HCDR1	SEQ ID NO:1
2	huBH56-5>HCDR2	SEQ ID NO:2
3	huBH56-5>HCDR3	SEQ ID NO:3
15	huBH56-5>VH	EVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYICVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSS
1	huBH56-6>HCDR1	SEQ ID NO:1
13	huBH56-6>HCDR2	SEQ ID NO:13
3	huBH56-6>HCDR3	SEQ ID NO:3
16	huBH56-6>VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKLEWVSGIYGDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSS
1	huHA68-1>HCDR1	SEQ ID NO:1
17	huHA68-1>HCDR2	VIYGDGKAYYADSVKG
7	huHA68-1>HCDR3	SEQ ID NO:7
18	huHA68-1>VH	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSVIYGDG KAYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVGIRPTDAPWAAS LWGQGT LTVSS
1	huHA68-2>HCDR1	SEQ ID NO:1
17	huHA68-2>HCDR2	SEQ ID NO:17
7	huHA68-2>HCDR3	SEQ ID NO:7
21	huHA68-2>VH	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSVIYGDG KAYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVGIRPTDAPWAAS LRGQGT LTVSS
1	huHA68-3>HCDR1	SEQ ID NO:1
6	huHA68-3>HCDR2	SEQ ID NO:6
7	huHA68-3>HCDR3	SEQ ID NO:7
22	huHA68-3>VH	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSGIYGDG KA EYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAVGIRPTDAPWAAS LRGQGT LTVSS
1	huHA68-4>HCDR1	SEQ ID NO:1
6	huHA68-4>HCDR2	SEQ ID NO:6
7	huHA68-4>HCDR3	SEQ ID NO:7
23	huHA68-4>VH	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSGIYGDG KA EYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYSCAVGIRPTDAPWAAS LRGQGT LTVSS
24	8H5>HCDR1	ASVMS
25	8H5>HCDR2	SMLNSNTNYADSVKG
26	8H5>HCDR3	ERSGVY

27	8H5>VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFLSASVMSWYRQAPGKQRELVASMLNSN TNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCNAERSGVYWGQGTQ VTVSS
28	CD3>HCDR1	TYAMN
29	CD3>HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
30	CD3>HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
31	CD3>LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
32	CD3>LCDR2	GTNKRAP
33	CD3>LCDR3	ALWYSNLWV
34	CD3>VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSY VSWFAYWGQGTTVTVSS
35	CD3>VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLGGKAALTLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL G
36	29H6>HCDR1	THYMY
37	29H6>HCDR2	GINPSNEATNFNEKFKT
38	29H6>HCDR3	VGGLSYTMDY
39	29H6>LCDR1	KSSQSLLYSSNQKNYLA
40	29H6>LCDR2	WASTRES
41	29H6>LCDR3	QQYYSYPRT
42	29H6>VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPS NEATNFNEKFKTKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGLSYTMDY WGQGTLLTVSS
43	29H6>VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGYGTDFLTITSSLAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGKTL EIK
44	BH56-IgG(FC 具有突变 (L234A、L235A、 D265A、P329A))>HC	EVQVVESGGGLVQAGESLTLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGD GRTTYADSVKGRFTISRDN AKKTVTLQMNLEPEDSGNYICVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	BH68-IgG(FC 具有突变 (L234A、L235A、 D265A、P329A))>HC	QVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMNWARQAPGKGLEWVAGIYGD GKAEYADSVKGRFTISRDN AKNMVYLQMVNLRPEDTAVYSCAVGIRPTDAPWA ASLRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	huBH56-1-IgG(FC 具有 突变(L234A、L235A、 D265A、P329A))>HC	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWVRQPPGKGLEWVSVIYGDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LWGQGTLLTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	huBH56-3-IgG(FC 具有 突变(L234A、L235A、 D265A、P329A))>HC	EVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
49	huBH56-4-IgG(具有突 变(L234A、L235A、 D265A、P329A))>HC	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50	huBH56-5-IgG(FC 具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A))>HC	EVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYICVVGIRLLSESWAQAL RGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC V V VAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	huBH56-6-IgG(FC 具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A))>HC	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKLEWVSGIYGDG RTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	huHA68-1-IgG(FC 具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A))>HC	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWVRQAPGKLEWVSVIYGDG KAYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAVGIRPTDAPWAAS LWGQGT LTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	huHA68-2-IgG(FC 具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A))>HC	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSVIYGDG KAYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAVGIRPTDAPWAAS LRGQGT LTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	huHA68-3-IgG(FC 具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A))>HC	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSGIYGDG KA EYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAVGIRPTDAPWAAS LRGQGT LTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	huHA68-4-IgG(FC 具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A))>HC	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKLEWVSGIYGDG KA EYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYSCAVGIRPTDAPWAAS LRGQGT LTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	huBH56-3-hole-IgG1-mut(hole)(具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A、Y407V、T366S、L368A、Y349C))>HC	EVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDG RTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCVVGIRLLSESWAQA LRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	CD3ScFv-knob-IgG1-mut(knob)(具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A、S354C、T366W))>HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDN SKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTR HGNFGNSY VSWFAYWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTC RSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALT LSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	hu8H5-huBH56-3-hole-IgG1-mut(hole)(具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A、Y407V、T366S、L368A、Y349C))>HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFLSASVMSWYRQAPGKQRELVASMLNSN TNYADSVKGRFTISRDN SKNTMY LQMNSLRAEDTAVYYCNAERSGVYWGQGTQ VTVSSGGSGGEVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEV EWVSGIYGDGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCVVGI RLLSESWAQALRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDEL

		TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	CD3-Fab-HC-knob- IgG1-mut(knob)(具有突 变(L234A、L235A、 D265A、P329A、 S354C、T366W))>HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSY VSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
60	CD3Fab>LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLGGAALTLGSAQPEDEAEYFCALWYNSLWVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
61	29H6-CD3ScFv-knob- IgG1-mut(knob)(具有突 变(L234A、L235A、 D265A、P329A、 S354C、T366W))>HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPS NEATNFNEKFKTKATLTVDKSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGLSYTMDY WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEP KSCGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSAVVTQEPSLTVS PGGTITVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSL LGGKAALTLGSAQPEDEAEYFCALWYNSLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVSKEDVEKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
62	29H6Fab>LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDFRSGSGYGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQYYSYPRTFGGGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	Teclistamab-analog- BCMA>HC	QLQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISGSGYFWGWIRQPPGKLEWIGSIYSG ITYYNPSLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHGDGAVAGLFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVSDVQEDVEKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLRTVLDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
64	Teclistamab-analog- BCMA>LC	SYVLTQPPSVSAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPS GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSDDHVVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
65	Teclistamab-analog- CD3>HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSK YNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSY VSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVSDV DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLRTVLDKSRWQEGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
66	Teclistamab-analog- CD3>LC	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLGGAALTLGSAQPEDEAEYFCALWYNSLWVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
67	Talquetamab- GPRC5D>HC GC5B596 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINP YNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALD YWGGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVAVSDVQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

		GQPENNYKTPPPVLSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK
68	Talquetamab - GPRC5D>LC GC5B596LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRY SGVPSRFSGSGSTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	BGCB491>HC1	QVQLQQSGPRLVLRPSQTLSTLCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYY RSKWLYDYAVSVKSRTVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYD GQGTILVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHCTCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKA LPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPPVLSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTFT QKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQTPPLSPVTLGQPASISCRSS QSLVHSDGNTYLSWLQRRPGQPPRLIYKISNRFPGVDRFSGSGAGTDFTLKISR EAEDVGVYYCMQATQFPHFTFGQGTKEIKGGSEKSGSGSEKSTGSGVTEQ SGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTNIRMSVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDEKSYST SLKSRLTISRDTSKSQVVLTLTNVDPVDTATYYCARMRLPYGMDVWVGQGTITV SS
70	BGCB491>HC2	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSISSSFLTWYQQKPGQAPRLIYGASSRATG IPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPMYTFGQGTKEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKDEYSSGHYYGMDVWVGQGTITVTSSEPKSSDKTHTLTPCPPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLSDSGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
71	BGCB491>LC	ALTQPASVSGSPGQITISCTGTSSNIGTYKFSVSWYQQHPDKAPKVLLEYVSKRPSG VSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
72	IBI3003>HC1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINP YNDVSVQHQQKFKGRVTMTSDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREGRLGLRVL AYWVGQGTILVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHCTCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV SNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPPVLSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
73	IBI3003>HC2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSY VSWFAYWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTV VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSSDKTHCTCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCK VSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPPVLSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFLTISLSEPEDFAVY YCQASALPLTFGCGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGRS RLSAAASGFTFGDYAIHWVRQAPGKCLEWVSGISWDSIIAYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSPPVRDSFGSIAFDIWWGQGTMTVTVSS
74	IBI3003>LC1	QAVVTQEPSLTVSPGGTITLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLLDGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGQGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
75	IBI3003>LC2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS NQSGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
76	269B094>HC	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGRFTFSIVMGWFRQAPGKEREFVGAIMWN DGITYLQDSVKGRTIFTRDNAKNTVYLYLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEY WGQGTQVTVSSEPKSSDKTHCTCPPEAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

		VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
77	huBCMA-huFc	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
78	cynoBCMA-huFc	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHDCPKCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNAE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	huBCMA-his	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAE HHHHH
80	IgG1 Fc(有铰链区, 无突变, CH2-CH3)	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
81	HuGPC5A	MATTVPDGCRLKSKYYRLCDKAEAWGIVLETVATAGVVTSAFMLTLPILVC KVQDSNRRKMLPTQFLGLGVLGIFGLTFAFIIGLDGSTGPTRFLLGILFISICFSCLLAHAVSLTKLVRGRKPLSLVILGLAVGFSLVQDVIAEYIVLTMNRNINVNFSELSAPRRNEDFVLLTYVLFMLALTFLMSSFTFCGSFTGWKRHGAHIYLTMLLSIAIWVAWITLLMLPDFDRRWDDTILSSALAANGWVFLLAYVSPEFWLLTKQRNPMMDYPVEDAFCKPQLVKKSYGVENRAYSQEITQGFETGDTLYAPYSTHFQLQNQPQKEFSIPRAHAWPSYKDYEVKKEGS
82	HuGPC5B	MFVASERKMRAHQVLTFLLLFVITSVASENASTSRGCGLDLLPQYVSLCDLDAIW GIVVEAVAGAGALITLLMLILLVRLPFKEKEKKSPVGLHFLGLGLGLTFAFIHQEDETICSVRRFLWGVLFALCFSCLLSQAWRVRLVRHGTGPAGWQLVGLALCLMLVQVIAVEWLVTVLDRTPACAYEPMDFVMALYDMVLLVVTGLALFTLCGKFKRWKLNAGAFLLITAFLSVLIWVAWMTMYLFGNVKLQQGDANDPTLAI TLAASGWVVFIFHAIPEIHCTLLPALQENTPNYFDTSQPRMRETAFEEDVQLPRAYMENKAFSMDEHNAALRTAGFPNGSLGKRPSGSLGKRPSAPFRSNVYQPTEMAVV LNGGTIPTAPPSHTGRHLW
83	HuGPC5C	MAIHKALVMCLGLPLFLPGAWAQGHVPPGCSQGLNPLYNLCDSRGAWGIVLEAVAGAGIVTTFVLTIILVASLFPVQDTKKRSLGTQVFLLGTLGLFCLVFACVVKP DFSTCASRRFLFGVLFALCFSCLAHVFALNFLARKNHGPRGWVIFTVALLLTVEVIINTEWLITLVRSGEGGPGQGNSSAGWAVASPCAIAANDVFMALYDMVLLLG AFLGAWPALCGRYKRWKRGVGVLLTTATSAIWWVWVWVMTYGNKQHNSTP WDDPTLAIALAANAWAFVLFYVPEVSQVTKSSPEQSYQGDMPYTRGVGYETILKEQKGQSMFVENKAFSMDEPVA AKRPVSPYSGYNGQLLTSVYQPTMALMHKVPSEGAYDILPRATANSQVMGSANSTLRAEDMYSAQSHQAATPPKDGKNSQVFRNP YVWD
84	多特异性抗体 Fc-hole (CH2-CH3hole)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	Fc-hole(铰链区-CH2-CH3 hole)	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	多特异性抗体 Fc-knob (铰链区-CH2-CH3knob)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	多特异性抗体 Fc-knob (CH2-CH3knob)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

		GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
89	IgG1 恒定区 (LALA 突变+D265A+P329A)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (划线部分为恒定区 Fc 序列)
90	Fc(无铰链区, CH2-CH3+LALA 突变+D265A+P329A)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	lambda 轻链恒定区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYLASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
92	IgG1 恒定区 (无突变)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (划线部分为恒定区 Fc 序列)
93	Kappa 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
94	铰链区	EPKSS
95	连接肽	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
96	铰链区	EPKSC
97	Fc(有铰链区, CH2-CH3+LALA 突变+D265A+P329A)	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	IgG1 Fc(无铰链区, 无突变, CH2-CH3)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
99	连接肽	GGGGS
100	连接肽	GGGGSGGGSGGGGS
101	连接肽	GGSGG
102	huHA68-4-hole-IgG1-mut(hole)(具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A、Y407V、T366S、L368A、Y349C))>HC	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKGLEWVSGIYGDGKAEYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYSCAVGIRPTDAPWAASLRGQGT LTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	2xhuHA68-4-hole-IgG1-mut(hole)(具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A、Y407V、T366S、L368A、Y349C))>HC	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSPSAMSWARQAPGKGLEWVSGIYGDGKAEYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYSCAVGIRPTDAPWAASLRGQGT LTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	2xhuBH56-3-hole-IgG1-mut(hole)(具有突变(L234A、L235A、D265A、P329A、Y407V、T366S、L368A、Y349C))>HC	EVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYVCVVGIRLLSESWAQALRGQGTQVTVSSSGGGGSEVQVVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFAPSAMSWARQPPGKEVEWVSGIYGDGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYVCVVGIRLLSESWAQALRGQGTQVTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL

	Y407V、T366S、L368A、Y349C))>HC	FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	人源抗 GPRC5D VHH 8H5-Fc(人源抗 GPRC5D HC)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGIFLSASVMSWYRQAPGKQRELVASMLNSNTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCNAERSGVYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
106	驼源抗 GPRC5D VHH 8	EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSAAAGIFLSASVMRWYRRAPGKQRELVASMLNSNTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCNAERSGVYWGQGTQVTVSS
107	驼源抗 GPRC5D VHH8-Fc(驼源抗 GPRC5D HC)	EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSAAAGIFLSASVMRWYRRAPGKQRELVASMLNSNTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCNAERSGVYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	人 GPRC5D 蛋白	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIIELAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPQTLLFLLSVLGLFGLAFIIEELNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLV KLVRGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQIIATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFV VLLVYVLFMLMALTFVSKATFCGPCENWKQHGRLLFITVLFIIIWVWISMLLRGNP QFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNACPVTA YQHSFQVENQELSRARSDGAEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSQQD AGGV
109	CD3-ScFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAAAGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSAVVYQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
110	29H6-Fab>HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNEATNFNEKFKTKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTRVGGLSYTMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
11	CD3-Fab>HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAAAGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
47	多特异性抗体 Fc-knob (铰链区-CH2-CH3knob) (具有突变 (L234A、L235A、D265A、P329A、S354C、T366W))	EPKSSDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	多特异性抗体 Fc-hole (铰链区-CH2-CH3 hole) (具有突变 (L234A、L235A、D265A、P329A、Y407V、T366S、L368A、Y349C))	EPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

权利要求

1、特异性结合BCMA的VHH抗体，其包含

SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的VHH中所含的三个互补决定区域（CDR），

优选地，所述CDR序列根据IMGT定义。

2、权利要求1的VHH抗体，其包含互补决定区域（CDR）VHH CDR1、VHH CDR2和VHH CDR3，其中

(i) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 9 或 13 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由其组成；或

(ii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成；或

(iii) VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成，VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成。

3、权利要求1的VHH抗体，其包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区

(i)包含与选自SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含选自SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii)包含与选自SEQ ID NO: 4、8、10、12、14、15、16、18、21、22或23中任一项所示的氨基酸序列相比具有1个或多个（优选不超过10个，更优选不超过5、4、3、2、1个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在CDR区中。

4、特异性结合BCMA的重链抗体，其包含权利要求1-3中任一项所述的VHH抗体。

5、权利要求4的重链抗体，其包含与抗体恒定区或Fc区连接的权利要求1-3中任一项所述的VHH抗体，优选地，所述抗体恒定区或Fc区来自人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4，任选地，所述VHH抗体与所述Fc区通过铰链区或其部分连接，任选地，所述铰链区部分的氨基酸序列为EPKSS（SEQ ID NO:94）或EPKSC（SEQ ID NO:96）。

6、权利要求4的重链抗体，其包含与抗体Fc区连接的权利要求1-3中任一项所述的VHH抗体，其中所述Fc区为来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区，任选地，所述Fc区包含L234A/L235A突变、D265A突变和P329A突变，优选地，所述Fc区

(i)包含与SEQ ID NO:80、90、97或98中所示的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含SEQ ID NO: 80、90、97或98所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与SEQ ID NO: 80、90、97或98所示的氨基酸序列相比具有1个或多个（优选不超过10个，更优选不超过5、4、3、2、1个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列。

7、权利要求4的重链抗体，其

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 44-46 和 48-55 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 44-46 和 48-55 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 44-46 和 48-55 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

8、权利要求1-3中任一项的VHH抗体，或权利要求4-7中任一项的重链抗体，其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

9、多特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，以及任选地第三抗原结合区，其中所述第二抗原结合区特异性结合BCMA，且包含权利要求1-3和8中任一项的VHH抗体，或权利要求4-8中任一项的重链抗体，优选地，所述多特异性抗体为双特异性抗体或三特异性抗体。

10、权利要求9的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合区特异性结合CD3。

11、权利要求 10 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合区包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 VL 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为 SEQ ID NO:34 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:35 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(ii) HCDR1 由 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列组成，HCDR2 由 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列组成，HCDR3 由 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列组成，LCDR1 由 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列组成，LCDR2 由 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列组成，且 LCDR3 由 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列组成。

12、权利要求 11 所述的多特异性抗体，其中第一抗原结合区包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或

所述 VL 含有 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

13、权利要求 10-12 中任一项的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 Fab 或 scFv。

14、权利要求 13 所述的多特异性抗体，所述 Fab 包含第一抗原结合区的 VH 和 CH1，以及任选地部分铰链区（例如 EPKSS 和 EPKSC），其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。

15、权利要求 14 所述的多特异性抗体，其中所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

16、权利要求 15 所述的多特异性抗体，其中第一抗原结合区的 Fab 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或第一抗原结合区的 Fab 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

17、权利要求 13 所述的多特异性抗体，其中所述 scFv 包含从 N 末端到 C 末端包含第一抗原结合区的重链可变区 VH，接头和第一抗原结合区的轻链可变区。

18、权利要求 17 所述的多特异性抗体，其中所述 scFv 包含如 SEQ ID NO:109 所示的序列或与 SEQ ID NO:109 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。

19、权利要求 9-18 中任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合区为权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH。

20、权利要求 9-19 中任一项所述的多特异性抗体，其中所述多特异性抗体为三特异性抗体且其包含第三抗原结合区，所述第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

21、权利要求 20 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合区包含抗 GPRC5D 的 VHH 或由其组成。

22、权利要求 21 所述的多特异性抗体，其中所述抗 GPRC5D 的 VHH 包含重链可变区或由其组成，所述重链可变区包含

(i) SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域（CDR），或

(ii) 互补决定区域 (CDR) VHH CDR1、VHH CDR2 和 VHH CDR3, 其中 VHH CDR1 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR2 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列或由其组成, VHH CDR3 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由其组成。

23、权利要求 22 所述的多特异性抗体, 其中所述重链可变区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 27 或 106 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

24、权利要求 20 所述的多特异性抗体, 其中所述第三抗原结合区包含 VH 和 VL, 所述 VH 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR), HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 且所述 VL 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR), LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中

(i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为 SEQ ID NO:42 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 且 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为 SEQ ID NO:43 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

(ii) HCDR1 包含 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列或由其组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或由其组成, 和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成。

25、权利要求 24 所述的多特异性抗体, 其中第三抗原结合区包含 VH 和 VL, 其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和/或

所述 VL 含有 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

26、权利要求 24 或 25 的多特异性抗体, 其中所述第三抗原结合区为特异性结合 GPRC5D 的 Fab。

27、权利要求 26 所述的多特异性抗体, 所述 Fab 包含第三抗原结合区的 VH 和 CH1, 以及任选地所述 CH1 包含部分铰链区 (例如 EPKSS 和 EPKSC), 其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1, 优选地来自 IgG1 的 CH1。

28、权利要求 27 所述的多特异性抗体, 其中所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

29、权利要求 28 所述的多特异性抗体, 其中第三抗原结合区的 Fab 重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

和/或第三抗原结合区的 Fab 轻链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

30、权利要求 9-29 中任一项所述的多特异性抗体, 其中所述多特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体, 其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同。

31、权利要求 30 所述的多特异性抗体, 其中所述两个 Fc 区不同, 优选地, 在两个 Fc 区中分别引入相应的 knob 突变和 Hole 突变。

32、权利要求 31 所述的多特异性抗体, 其中

d) 一个 Fc-区多肽包含 knob 突变 T366W, 而另一个 Fc-区多肽包含 hole 突变 T366S、L368A 和 Y407V, 或

e) 一个 Fc-区多肽包含 knob 突变 T366W 和 Y349C, 而另一个 Fc-区多肽包含 hole 突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C, 或

f) 一个 Fc-区多肽包含 knob 突变 T366W 和 S354C, 而另一个 Fc-区多肽包含 hole 突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C;

任选地, 所述 Fc 区还包含降低与 Fcγ 受体结合的突变, 例如, L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个; 例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

33、权利要求 30-32 中任一项所述的双特异性抗体, 其中所述 Fc 区之一或二者包含铰链区, 例如 EPKSS (SEQ ID NO:94) 或 EPKSC (SEQ ID NO:96)。

34、权利要求 32 所述的多特异性抗体, 其中

(i) 包含 knob 突变的 Fc 区

a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47、86 或 87 或由其组成; 或

b) 包含与 SEQ ID NO:47、86 或 87 具有至少 90%同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99%或更高的同一性且包含 knob 突变 (例如 S354C 和 T366W) 的氨基酸序列或由其组成; 和/或

(ii) 包含 hole 突变的 Fc 区

- a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84、85 或 111 或由其组成；或
- b) 包含与 SEQ ID NO:84、85 或 111 具有至少 90% 同一性，例如 95%，96%，97%，99% 或更高的同一性且包含 hole 突变（例如 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V）的氨基酸序列或由其组成。

35、权利要求 9-34 中任一项的多特异性抗体，其为双特异性抗体，且包含第一抗原结合区、第二抗原结合区和 Fc 二聚体，其中第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 scFv 片段，且第二抗原结合区为特异性结合 BCMA 的 VHH，例如权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH。

36、权利要求 35 的多特异性抗体，其包含一个或两个特异性结合 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 scFv 包含 VH-VL（任选地所述 VH 和 VL 通过接头融合），所述 VHH 包含重链可变区或由其组成，

其中所述 scFv 的 VL 的 C 末端融合至第一 Fc 区（例如包含 knob 突变或包含 hole 突变）的 CH2 或铰链区，构成第一重链；

所述一个抗 BCMA 的 VHH 或两个串联的抗 BCMA 的 VHH 的 C 末端与第二 Fc 区（例如包含 hole 突变或包含 knob 突变）融合构成第二重链（例如所述 VHH 的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区）。

37、权利要求 36 所述的多特异性抗体，其中所述

第一重链包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

第二重链包含 SEQ ID NO: 56、102、103 或 104 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

38、权利要求 9-34 中任一项的多特异性抗体，其为三特异性抗体，且包含第一抗原结合区、第二抗原结合区、第三抗原结合区和 Fc 二聚体，其中第一抗原结合区为特异性结合 CD3 的 scFv 片段或 Fab 片段，第二抗原结合区为特异性结合 BCMA 的 VHH，例如权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH，且第三抗原结合区为特异性结合 GPRC5D 的 VHH 或 Fab 片段。

39、权利要求 38 的多特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 的 VHH、一个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 的 Fab 片段，以及 Fc 二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 GPRC5D VHH、抗 BCMA VHH 和第一 Fc 区；或者经由或不经由接头融合的抗 BCMA VHH、抗 GPRC5D VHH 和第一 Fc 区

第二重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 CD3 的 Fab 片段重链和第二 Fc 区；

轻链：抗 CD3 的 Fab 片段轻链。

40、权利要求 39 的多特异性抗体，其中

第一重链包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二重链包含 SEQ ID NO: 59 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO: 60 中任一项所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

41、权利要求 38 的多特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 的 Fab 片段、一个抗 BCMA 的 VHH、一个抗 CD3 的 scFv，以及 Fc 二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 VHH 包含重链可变区，所述 scFv 包含 VH-VL，所述三特异性抗体包含第一重链，第二重链和轻链，或由所述链组成，其中

第一重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 BCMA VHH 和第一 Fc 区；

第二重链从 N 末端到 C 末端依次包含：经由或不经由接头融合的抗 GPRC5D 的 Fab 片段重链、抗 CD3 的 scFv 和第二 Fc 区；

轻链：抗 GPRC5D 的 Fab 片段轻链。

42、权利要求 41 的多特异性抗体，其中

第一重链包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二重链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

43、核酸分子，其编码权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的多特异性抗体的任一条链，或由所述核酸序列组成。

44、表达载体，其包含权利要求 43 的核酸分子。

45、宿主细胞，其包含权利要求 43 所述的核酸分子或权利要求 44 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 293T 细胞或 CHO-S 细胞。

46、制备权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的多特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体的链表达的条件下，培养包含权利要求 43 所述的核酸分子或权利要求 44 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

47、免疫缀合物，其包含权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的多特异性抗体。

48、药物组合物或药物或制剂，其包含权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的多特异性抗体，或权利要求 47 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

49、药物组合产品，其包含权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的多特异性抗体，或权利要求 47 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）。

50、在受试者中预防或治疗癌症的方法，包括向受试者施用有效量的权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的双特异性抗体，或权利要求 47 的免疫缀合物，或权利要求 48 的药物组合物或药物或制剂；或权利要求 49 的药物组合产品。

51、权利要求 50 的方法，其中所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的 BCMA 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）。

52、权利要求 50 或 51 的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如骨髓瘤例如多发性骨髓瘤如转移性多发性骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

53、权利要求 50-52 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）组合施用。

54、检测 BCMA 在生物样品中的存在的方法，其包括

(i) 将生物样品与权利要求 1-3 和 8 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 4-8 中任一项的重链抗体或权利要求 9-42 中任一项的多特异性抗体在允许其与 BCMA 结合的条件下接触，

(ii) 检测在该抗体或双特异性抗体和 BCMA 之间是否形成复合物，

其中复合物的形成表示存在 BCMA。