

抗 BCMA 单域抗体及其制备方法与应用

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2023 年 10 月 12 日提交中国专利局的申请号为 202311320141.7、发明名称为“抗 BCMA 单域抗体及其制备方法与应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本申请属于生物医药领域，具体涉及抗 BCMA 单域抗体及其制备方法与应用。

背景技术

多发性骨髓瘤（MM）是一种单克隆浆细胞异常增殖的恶性疾病，是血液系统常见恶性肿瘤。MM 常见的症状包括骨髓瘤相关器官功能损伤以及继发淀粉样变性等相关表现。中国多发性骨髓瘤诊治指南（2022 年修订）推荐经全身体能状态评分良好的多发性骨髓瘤患者，首选自体造血干细胞移植（autologous hematopoietic stem cell transplantation, ASCT），对于年轻的具有高危预后因素且有合适供者的患者，可考虑异基因造血干细胞移植（Allo-SCT）。另外，复发患者也可采用嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）（临床试验、研究者发起的研究）治疗方案。目前以 BCMA（B-cell maturation antigen）为靶点的 CAR-T 疗法已证明在多发性骨髓瘤中具有临床有效性。BCMA（CD269, TNFRSF17）是一种 III 型跨膜糖蛋白，属于人类肿瘤坏死因子受体（TNFR）超家族，在 B 细胞成熟和分化为浆细胞中起主要作用。BAFF 和 APRIL 是与 BCMA 结合的两种 B 细胞激活和扩增诱导配体，共同调控 B 细胞功能。BCMA 主要在成熟的 B 细胞中表达，其表达量随着 B 细胞的发育成熟而逐渐增加，并且在浆细胞恶性转化过程中选择性地过度表达，促进肿瘤细胞生长、存活和耐药性的发生。BCMA 在多种肿瘤细胞上高表达，而在其他正常组织不表达或者表达量低，是癌症靶向治疗的理想靶点。

重链抗体（Heavy chain antibody, HcAb）是天然存在的一种抗体类型，是骆驼科动物或软骨鱼类所具有的独特抗体类型，其抗体结构域天然缺失轻链，只由两条重链组成。重链抗体的抗原识别功能主要由重链抗体的可变区（VHH）决定。单独的 VHH 即可以识别抗原，因此其又被称为单域抗体（Single-domain antibody, sdAb）。单域抗体缺失抗体轻链，只有重链可变区，因其分子量小，也被称为纳米抗体（Nanobody, Nb）。单域抗体的分子量只有约 13-15 KDa，直径约为 2.5 nm，长 4 nm，是迄今为止最小的具有抗原结合功能的抗体片段，其与抗原结合的能力及其稳定性同完全抗体基本一致或具有更高的特异性抗原亲和力。与传统抗体相比，单域抗体还具有许多独特的性质，比如更好的组织渗透性、更高的热稳定性和化学稳定性、可抵达特殊抗原表位、可砌块模式任意组合、生产成本低等。获得单域抗体的常规方法由多次免疫骆驼科动物、B 淋巴细胞分离、VHH 区扩增、展示文库构建和

筛选等众多步骤构成。随着合成生物学的发展，构建基于全合成的高质量随机化大容量单域抗体库成为可能。目前，VHH 单域抗体因其结构稳定、分子小、溶解性好、组织渗透性好、易于重组表达、与人源抗体同源性高易于人源化和免疫原性低等优点，已经被广泛使用在小型化基因工程抗体研究、新药开发以及疾病的诊断治疗上。单域抗体在生物医学研究和医学治疗方面具有广泛的应用前景。

发明概述

本申请的目的之一是提供一种靶向 BCMA 抗原的单域抗体及其在肿瘤靶向治疗中的应用。本申请首先利用 BCMA 重组蛋白免疫羊驼得到单域抗体基因，并构建单域抗体表达文库，然后通过噬菌体展示筛选技术从单域抗体表达文库中筛选得到高亲和力的抗 BCMA 单域抗体（BCMA-VHH-54）。测序得到抗体基因序列后，采用基因工程的方法制备 BCMA-VHH-54。进一步对获得的抗体进行了亲和力、特异性等功能实验。结果表明，本申请的单域抗体亲和力高，能够很好地特异性靶向 BCMA 阳性细胞（表达 BCMA 蛋白的细胞），并可以成功应用于 MM 患者骨髓细胞中 BCMA 的表达的检测。本申请的单域抗体可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞及任何重组系统中表达和生产，可制成临床上用于预防和治疗 BCMA 靶点相关疾病（多发性骨髓瘤、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤）的特异性抗体药物，或 BCMA 蛋白的检测试剂盒等。本申请单域抗体药物结构稳定、分子小、易于重组表达、生产成本低，可单独使用或作为载药系统携带相关药物，在药物应用和临床诊断等领域具有十分广阔的前景和重要的意义。

技术问题

本申请的目的之一是提供一种靶向 BCMA 抗原的单域抗体及其在肿瘤靶向治疗中的应用。

技术方案

为实现上述目的，本申请首先提供了单域抗体，名称为 BCMA-VHH-54，所述单域抗体可由重链可变区（VHH）组成，所述重链可变区可包含氨基酸序列分别是 SEQ ID No.1 的第 26-33 位的互补决定区 CDR1、SEQ ID No.1 的第 51-58 位的互补决定区 CDR2 和 SEQ ID No.1 的第 97-106 位的互补决定区 CDR3。

所述单域抗体（抗 BCMA 单域抗体）可为特异性结合 BCMA 蛋白的单域抗体。

进一步地，所述重链可变区的氨基酸序列可为 SEQ ID No.1 或与 SEQ ID No.1 具有至少 80% 的同一性且具有相同的功能的氨基酸序列。

所述单域抗体 BCMA-VHH-54 只有重链抗体的可变区（VHH），依次由框架区 FR1、互补决定区 CDR1、框架区 FR2、互补决定区 CDR2、框架区 FR3、互补决定区 CDR3 和框架区 FR4 组成。

所述单域抗体 BCMA-VHH-54 的氨基酸序列可为 SEQ ID No.1。其中，SEQ ID No.1 的第 1-25 位为框架区 FR1，第 26-33 位为互补决定区 CDR1，第

34-50 位为框架区 FR2，第 51-58 位为互补决定区 CDR2，第 59-96 位为框架区 FR3，第 97-106 位为互补决定区 CDR3，第 107-117 位为框架区 FR4。编码单域抗体 BCMA-VHH-54 的核酸分子（BCMA-VHH-54 基因）的核苷酸序列如 SEQ ID No.2 所示。

所述互补决定区的序列根据 Kabat 编号系统定义。

本申请单域抗体序列具有改善的亲合力和/或效价的其他变体可通过采用在本领域已知的方法来获得，并包括在本申请的保护范围内。例如，氨基酸置换可用于获得具有进一步改善的亲合力的抗体。或者，核苷酸序列的密码子优化也可用来改善用于产生抗体的表达系统中的翻译效率。此外，包含通过对本申请的任何核酸序列应用定向进化法而优化抗体特异性的序列的多核苷酸也属于本申请的范围。

在某些实施方案中，可以在本申请所述单域抗体的一个或多个互补决定区或框架区内发生替代、插入或删除，只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如，可以对互补决定区和/或框架区做出保守变化（例如，保守替代，本领域技术人员所熟知，氨基酸的保守性取代不改变蛋白质的性质和功能），其不实质性降低结合亲和力。例如，此类变化可以在互补决定区中的抗原接触残基以外。

本申请还提供了与所述单域抗体 BCMA-VHH-54 相关的生物材料，所述生物材料可为下述任一种：

C1) 编码所述单域抗体 BCMA-VHH-54 重链可变区的核酸分子；

C2) 含有 C1) 所述核酸分子的表达盒；

C3) 含有 C1) 所述核酸分子的重组载体、或含有 C2) 所述表达盒的重组载体；

C4) 含有 C1) 所述核酸分子的重组宿主细胞、或含有 C2) 所述表达盒的重组宿主细胞、或含有 C3) 所述重组载体的重组宿主细胞。

其中，C4) 所述的重组宿主细胞可表达所述单域抗体 BCMA-VHH-54。

上述生物材料中，所述核酸分子可为下述任一种：

D1) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No.2 的 DNA 分子；

D2) 与 D1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且具有相同功能的 DNA 分子。

SEQ ID No.2 所示的 DNA 分子编码氨基酸序列为 SEQ ID No.1 的单域抗体 BCMA-VHH-54。

上述 75% 或 75% 以上同一性，可为 80%、85%、90% 或 95% 以上的同一性。

本文中，同一性是指氨基酸序列或核苷酸序列的同一性。可使用国际互联网上的同源性检索站点测定氨基酸序列的同一性，如 NCBI 主页网站的 BLAST 网页。例如，可在高级 BLAST2.1 中，通过使用 blastp 作为程序，将 Expect 值设置为 10，将所有 Filter 设置为 OFF，使用 BLOSUM62 作为 Matrix，将 Gap existence cost，Per residue gap cost 和 Lambda ratio 分别设置为 11，1

和 0.85（缺省值）并进行检索以对氨基酸序列的同一性进行计算，然后即可获得同一性的值（%）。

本文所述宿主细胞（也称为受体细胞）是指可用于导入载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞（例如 HEK293、CHO 和骨髓瘤细胞等），或者可以是原核细胞（例如大肠杆菌等）。所述宿主细胞可理解为不仅是指特定的受体细胞，而且也指这种细胞的后代，且由于天然的、偶然的或有意的突变和/或改变，该子代可以不必与原始的亲代细胞完全一致，但仍包括在宿主细胞的范围中。在本申请的一个或多个实施方案中，所述宿主细胞为大肠杆菌 TG1 和/或 HEK293 细胞。

本文所述重组载体是指将外源目的基因与载体在体外连接构建而成的重组 DNA 分子，可以任何合适的方式构建，只要构建的重组载体可携带外源目的基因进入受体细胞、并为外源目的基因提供在受体细胞的复制、整合、扩增和/或表达能力即可。在本申请的一个或多个实施方案中，所述重组载体为 pcDNA3.1-BCMA-VHH-54-hFc。

所述重组载体 pcDNA3.1-BCMA-VHH-54-hFc 是为了便于纯化，在单域抗体 BCMA-VHH-54 的编码基因（SEQ ID No.2）3'末端添加人源 IgG1Fc 基因（hFc 基因，核苷酸序列为 SEQ ID No.3），得到 BCMA-VHH-54-hFc 融合基因，然后分别在该融合基因的 5'端起始密码子前加入 *Bam*HI 酶切位点，3'端终止密码子后加入 *Eco*RI 酶切位点，将其克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 识别位点之间，得到表达 C 端融合 hFc 基因的单域抗体 BCMA-VHH-54 的重组真核表达载体 pcDNA3.1-BCMA-VHH-54-hFc。所述重组真核表达载体 pcDNA3.1-BCMA-VHH-54-hFc 含有 SEQ ID No.2 所示的单域抗体 BCMA-VHH-54 的编码基因。

人源 IgG1Fc 基因核苷酸序列（696 bp）如 SEQ ID No.3 所示，其编码的氨基酸序列如 SEQ ID No.4 所示。

本申请还提供了所述单域抗体 BCMA-VHH-54 和/或所述生物材料的下述任一种应用：

E1) 在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的应用，或在预防或治疗肿瘤中的应用；

E2) 在制备用于预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病的药物中的应用，或在预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病中的应用；

E3) 在制备用于筛查、诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病的产品中的应用，或在筛查、诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病中的应用；

E4) 在检测 BCMA 蛋白或制备用于检测 BCMA 蛋白的产品中的应用；

E5) 在制备用于结合 BCMA 蛋白的产品中的应用；

E6) 在介导药物特异性地识别表达 BCMA 抗原的肿瘤或制备介导药物特异性地识别表达 BCMA 抗原的肿瘤的产品中的应用；

E7)在 BCMA 蛋白的体内显像或制备用于 BCMA 蛋白的体内显像的产品中的应用;

E8)在制备靶向 BCMA 的 CAR 细胞中的应用。

本文中,所述 BCMA 靶点相关疾病可为 BCMA 阳性癌症(如多发性骨髓瘤)。

本文中,所述 BCMA 阳性癌症可包括多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、慢性髓细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CML)、B 细胞急性淋巴细胞白血病(acute B-lymphoblastic leukemia, ALL)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)和霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)但不限于此。

E6)中所述介导药物特异性地识别表达 BCMA 抗原的肿瘤的产品可为特异性靶向 BCMA 蛋白的载药系统,所述载药系统含有所述单域抗体 BCMA-VHH-54。

所述载药系统可为脂质体递药系统、聚合物胶束递药系统、聚合物圆盘递药系统或纳米粒递药系统。

所述载药系统可用于药物的靶向运输和/或定点释放。

本申请还提供了试剂盒,所述试剂盒含有所述单域抗体 BCMA-VHH-54,所述试剂盒可具有下述任一用途:

F1)检测 BCMA 蛋白;

F2)筛查、诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病;

F3)用于 BCMA 蛋白的体内显像。

所述试剂盒可为化学发光免疫试剂盒、酶联免疫检测试剂盒、胶体金免疫试剂盒、或荧光免疫试剂盒,但不限于此。

进一步地,所述试剂盒还可包括免疫检测所需试剂,如标记抗体或抗原、磁微粒、封闭液、稀释液、洗涤液、显色液、终止液等但不限于此。

所述试剂盒的各种试剂组分可以存在于分开的容器中,或者可以全部或部分预组合成试剂混合物。

所述试剂盒的组分可以溶液形式提供,例如水溶液的形式提供。在以水溶液状态存在的情况下,这些成分的浓度或含量是本领域技术人员能够根据不同需求而方便地确定的。例如,用于储存的目的时,组分的浓度可以较高的形式存在,当处于工作状态或使用时,可通过稀释上述较高浓度的溶液来将浓度降低至工作浓度。

所述试剂盒还可包含例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。所述试剂盒还可包含用于检测可检测标记所必需的组分,例如酶或底物。试剂盒还可含有一个对照样品或一系列对照样品,可测定这些对照样品并将其与测试样品进行比较。所述试剂盒可在试剂盒容器上或试剂盒容器中包含书面产品。书面产品描述了如何使用试剂盒中包含的试剂。

本文所述检测 BCMA 蛋白可为检测待测样品中是否含有 BCMA 蛋白和/或检测待测样品中 BCMA 蛋白的含量。

所述待测样品可为细胞或组织样品。

本文所述用于检测 BCMA 蛋白的产品包括利用酶联免疫吸附法、免疫荧光检测法、放射免疫法、发光免疫测定法、胶体金免疫层析法、凝集法或免疫比浊法等检测抗原抗体结合的产品。

本文所述产品可为试剂、试剂盒、芯片或试纸。

本申请还提供了药物组合物，所述药物组合物可含有所述单域抗体 BCMA-VHH-54。

进一步地，所述药物组合物还可含有药学上可接受的载体。

所述药学上可接受的载体可为稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、吸附载体、表面活性剂或润滑剂。

所述药物组合物可具有下述至少一种用途：

M1) 用于预防或治疗肿瘤；

M2) 用于预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病；

M3) 用于介导药物特异性地识别表达 BCMA 抗原的肿瘤。

所述药物组合物的剂型可包括吸入制剂、口服制剂和注射制剂但不限于此。所述吸入制剂可为吸入气雾剂、吸入粉雾剂、吸入喷雾剂、吸入液体制剂、吸入雾化剂、吸入用冻干粉针剂或鼻喷剂。所述口服制剂可为片剂、粉剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、散剂、膏剂、固体饮料或口服液。所述注射制剂可为注射液或注射用粉针剂。

为了将所述药物组合物制成注射用制剂，如溶液剂、乳剂、冻干粉针剂和混悬剂，可以使用本领域常用的所有稀释剂（载体），例如，水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外，为了制备等渗注射液，可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油等载体，此外，还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH 调节剂等载体。

所述药物组合物可根据本领域中熟知并且通常实践的方法制备。参见例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy，第 22 版，Lloyd V. Allen 等人编，Pharmaceutical Press（2012）。药物组合物优选在 GMP 或 cGMP 条件下制造。

本申请还提供了所述单域抗体 BCMA-VHH-54 的制备方法，所述方法可包括：构建含有本文所述核酸分子（编码所述单域抗体 BCMA-VHH-54 重链可变区的核酸分子）的重组表达载体；将所述重组表达载体导入宿主细胞，获得表达所述单域抗体的重组细胞；培养所述重组细胞，经分离纯化获得所述单域抗体。

进一步地，所述编码所述单域抗体 BCMA-VHH-54 重链可变区的核酸分子可为下述任一种：

D1) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No.2 的 DNA 分子；

D2) 与 D1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且具有相

同功能的 DNA 分子。

进一步地，所述宿主细胞可为 HEK293 细胞。

进一步地，所述导入可为通过磷酸钙共沉淀法、脂质体介导法、电穿孔法或病毒载体法等任何已知的转染方法将携带本申请单域抗体基因的载体转化宿主细胞。

本申请还提供了诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病的方法，所述方法可包括：从受试者分离获得样品，然后利用所述单域抗体 BCMA-VHH-54 检测所述样品中 BCMA 蛋白的含量，根据所述 BCMA 蛋白的含量进行 BCMA 靶点相关疾病的诊断或辅助诊断。

进一步地，所述方法还可包括：将所述检测结果中 BCMA 蛋白的含量与参考值（疾病诊断标准的 BCMA 蛋白的含量）进行比较的步骤。所述参考值可以是 BCMA 蛋白在来自己知不具有与 BCMA 靶点相关疾病的受试者（例如健康对照）的样品中的水平（也称作“阴性参考值”）。比较的结果可指示所述受试者是否患有与 BCMA 靶点相关的疾病或是否有患有与 BCMA 靶点相关的疾病的风险，或者指示患者的病情进展和/或治疗后的康复情况。

本申请还提供了筛查 BCMA 靶点相关疾病的方法，所述方法可包括：从受试者分离获得样品，然后利用所述单域抗体 BCMA-VHH-54 检测所述样品中 BCMA 蛋白的含量，根据所述 BCMA 蛋白的含量（与疾病筛查标准的 BCMA 蛋白的含量比较）进行 BCMA 靶点相关疾病的筛查。

进一步地，所述方法还可包括：将所述检测结果中 BCMA 蛋白的含量与参考值（疾病筛查标准的 BCMA 蛋白的含量）进行比较的步骤。所述参考值可以是 BCMA 蛋白在来自己知不具有与 BCMA 靶点相关疾病的受试者（例如健康对照）的样品中的水平（也称作“阴性参考值”）。比较的结果可指示适用于本申请治疗性产品的广泛人群。

本申请还提供了预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病的方法，所述方法可包括向患有 BCMA 靶点相关疾病的受试者施用所述单域抗体 BCMA-VHH-54 或本文所述药物组合物。

上述方法中，所述 BCMA 靶点相关疾病可为 BCMA 靶点相关肿瘤。

上述方法中，所述 BCMA 靶点相关肿瘤可为 BCMA 阳性癌症。

上述方法中，所述 BCMA 阳性癌症可包括多发性骨髓瘤、慢性髓细胞白血病、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤但不限于此。

进一步地，所述施用的量可为治疗有效量。所述治疗有效量可指（i）治疗或预防特定疾病、病况或障碍；（ii）减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状；或（iii）预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的所述药物的用量。治疗有效量可以通过在已知的体外或体内（例如动物模型）系统中测试而确定。

进一步地，所述施用包括但不限于肌肉注射、皮下注射、皮内注射、透皮注射、静脉注射、动脉注射、腹腔注射、腹膜内注射、鞘内注射、微针注射、瘤内注射、粘膜给药、口服、口鼻腔喷入、雾化吸入、体内植入和体外携带装置给药。

优选的施用方式（给药途径）是胃肠外（如静脉内、肌肉内、腹腔内、胸骨内、皮下和关节内）给药。技术人员应理解，给药途径将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中，本申请的纳米抗体、双特异性抗体或多特异性抗体、分离的核酸分子、重组载体、重组宿主细胞、抗体偶联物或药物组合物可通过注射或连续输注（包括但不限于静脉内、腹膜内、皮内、皮下、肌肉内、眼内和门静脉内）进行施用。

本申请还提供了体外检测 BCMA 蛋白的方法，所述方法可包括利用所述单域抗体 BCMA-VHH-54 或本文所述试剂盒检测 BCMA 蛋白。

本申请还提供了抗体药物偶联物，包括抗体部分和偶联部分，所述抗体部分可包含所述单域抗体 BCMA-VHH-54。

进一步地，所述偶联部分可包括可检测的标记、化学药物或细胞毒素。

所述抗体部分和偶联部分可直接或通过接头共价连接。

所述可检测的标记可选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

所述化学药物可为可杀伤肿瘤细胞的药物。

所述细胞毒素可为微管蛋白抑制剂（如美登素、阿里他汀）、DNA 合成抑制剂（如卡奇霉素）或 RNA 合成抑制剂（如鹅膏毒素）。

本申请所述应用和方法的目的可以是疾病诊断目的、疾病预后目的和/或疾病治疗目的，它们的目的也可以是非疾病诊断目的、非疾病预后目的和非疾病治疗目的；它们的直接目的可以是获取疾病诊断结果、疾病预后结果和/或疾病治疗结果的中间结果的信息，它们的直接目的可以是非疾病诊断目的、非疾病预后目的和/或非疾病治疗目的。

本文所述受试者可为人类或非人类动物。在某些实施方案中，所述受试者患有 BCMA 靶点相关疾病。

本文所述非人类动物可为非人类哺乳动物。

本文所述非人类哺乳动物可为小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、猪、犬，羊，猴，兔、猫、牛、马中的任意一种但不限于此。

本文所述 BCMA（CD269，TNFRSF17）是一种 III 型跨膜糖蛋白，属于人类肿瘤坏死因子受体（TNFR）超家族，在 B 细胞成熟和分化为浆细胞中起主要作用。BAFF 和 APRIL 是与 BCMA 结合的两种 B 细胞激活和扩增诱导配体，共同调控 B 细胞功能。BCMA 主要在成熟的 B 细胞中表达，其表达量随着 B 细胞的发育成熟而逐渐增加，并且在浆细胞恶性转化过程中选择性地过度表达，促进肿瘤细胞生长、存活和耐药性的发生。BCMA 在多发性骨髓瘤、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、和霍奇金淋巴瘤等肿瘤细胞上表

达。

有益效果

本申请的单域抗体 BCMA-VHH-54 亲和力高，能够很好地特异性靶向 BCMA 阳性细胞（表达 BCMA 蛋白的细胞），并可以成功应用于 MM 患者骨髓细胞中 BCMA 的表达的检测。本申请的单域抗体可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞及任何重组系统中表达和生产，可制成临床上用于预防和治疗 BCMA 靶点相关疾病（多发性骨髓瘤、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤）的特异性抗体药物，或 BCMA 蛋白的检测试剂盒等。本申请单域抗体药物结构稳定、分子小、易于重组表达、生产成本低，可单独使用或作为载药系统携带相关药物，在药物应用和临床诊断等领域具有十分广阔的前景和重要的意义。

附图说明

图 1 为本申请的研究流程图。

图 2 为使用 FITC 标记的 BCMA-VHH-54 抗体检测不同肿瘤细胞株上的 BCMA 表达结果。其中 Isotype 表示对照组，BCMA 表示 FITC-BCMA-VHH-54-hFc 抗体。

图 3 为使用 FITC 标记的 BCMA-VHH-54 抗体检测 MM 患者骨髓细胞上 BCMA 的表达结果。FMO 为对照组，BCMA-FITC 表示 FITC 标记的 BCMA-VHH-54 抗体。

本发明的实施方式

下面结合具体实施方式对本申请进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本申请，而不是为了限制本申请的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南，并不以任何方式构成对本申请的限制。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

下述实施例中的 pComb3XSS 质粒为北京庄盟国际生物基因科技有限公司产品，货号 ZK129。

下述实施例中的辅助噬菌体 M13K07 为成都仁域生物技术有限公司产品，货号 A001-1。

下述实施例中的 K562 细胞（BCMA 阴性细胞）为南京科佰生物科技有限公司产品，货号 CBP60529；KG-1a 细胞（BCMA 阴性细胞）为南京科佰生物科技有限公司产品，货号 CBP61455；RPMI-8226（BCMA 阳性细胞）细胞为南京科佰生物科技有限公司产品，货号 CBP60244；Daudi（BCMA 阳性细胞）为南京科佰生物科技有限公司产品，货号 CBP60262；MM1.S 细胞（BCMA 阳性细胞）为北京百欧博伟生物技术有限公司产品，货号 bio-129535。

下述实施例中 MM 患者骨髓细胞来源于浙江省人民医院。

下述实施例中 BCMA 阳性细胞 K562-BCMA 的制备方法为将 BCMA 插

入 pcDNA3.1 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点之间,制备的重组载体转染 K562 细胞,得到 BCMA 阳性细胞 K562-BCMA。

下述实施例中的载体 pcDNA3.1 为长沙艾碧维生物科技有限公司产品,货号: HG-VPI0001。

本申请的研究流程图如图 1 所示。

实施例 1、抗 BCMA 单域抗体的筛选与制备

本实施例利用 BCMA-FC 重组蛋白免疫羊驼得到单域抗体基因,并构建单域抗体表达文库,然后通过噬菌体展示筛选技术从单域抗体表达文库中筛选得到高亲和力的抗 BCMA 单域抗体,具体步骤如下所示:

1、动物免疫

1.1、抗原的获得

作为抗原的 BCMA 重组蛋白如下所示:

BCMA 免疫抗原: Human BCMA Llma IgG2b FC (BCA-H5259) 蛋白为上海百英生物科技有限公司产品。

BCMA 筛选抗原: Human BCMA-6×His (BCA-H522Y) 蛋白为上海百英生物科技有限公司产品。

1.2、免疫羊驼

使用 BCMA 抗原 Human BCMA Llma IgG2b FC 免疫羊驼(2-3 岁,体重 100 斤左右)共三次,每次皮下注射 0.5 mg Human BCMA Llma IgG2b FC,两次免疫间隔 2 周。下一次免疫前,抽取 5 ml 血液,分离血浆后检测上一次免疫后的抗体效价。免疫三次后的三免效价在注射一周后进行检测。

通过间接 ELISA 法来检测血清中抗体的效价,步骤如下所示:

A.将抗原用 PBS 稀释至 5 μg/mL,按 100 μL/well,4℃包被过夜;

B.弃包被液,PBST 洗涤 3 次,每孔加入 300 μL 5%脱脂牛奶,37℃封闭 1 h;

C.PBST 洗涤 3 次,加入 100 μL/孔的血清稀释液(从 1:2000 开始倍比稀释),37℃,孵育 45 min;

D.PBST 洗涤 5 次,分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗 Alpaca 二抗(用 PBS 按 1:1W 稀释),100 μL/孔,37℃孵育 45 min;

E.PBST 洗板 5 次。加入 TMB 显色液显色,100 μL/孔,37℃,5 min,加入终止液终止反应,50 μL/孔,于 450 nm 下测光密度。阳性孔判定标准:免疫血清样品的 OD450 读值大于未免疫血清的 OD450 读值,且读值大于 0.5。

1.3、免疫结果

血清效价检测结果如表 1 所示,加粗字体的为阳性孔。经过三次免疫后,B 羊驼体内的血清效价达到 64K,即抗体水平达到 64K。

表 1、血清效价检测结果

Dilution	二免	三免	二免	三免
	A 羊驼		B 羊驼	

1:2K	0.0609	0.1573	1.2114	3.0033
1:4K	0.0538	0.1010	0.8225	2.4910
1:8K	0.0525	0.0810	0.5097	2.2286
1:16K	0.0464	0.0937	0.3469	1.5065
1:32K	0.0475	0.0624	0.2027	0.8956
1:64K	0.0466	0.0514	0.1185	0.5198
1:128K	0.0463	0.0556	0.1062	0.2561
BLANK	0.0578	0.0479	0.0442	0.0443

如表 1 所示：经过第三次免疫后，羊驼体内抗体水平达到 64K。Ag 包被为抗原 Human BCMA Protein His tag 包被。

2、噬菌体文库构建

免疫成功之后采集上述 B 羊驼外周血单个核细胞（PBMC）用于构建噬菌体文库：即抗 BCMA VHH 噬菌体抗体库。

2.1、RNA 提取和反转录

采用密度梯度离心方法分离羊驼外周血单个核细胞（简称羊驼 PBMC 细胞），溶于 Trizol 中保存。提取羊驼 PBMC 细胞总 RNA，使用 Takara 反转录试剂盒对得到的总 RNA 进行反转录成 cDNA。具体步骤如下：

A：外周血淋巴细胞分离

采集 B 羊驼三免之后 50 mL 外周血，按照淋巴细胞分离液使用说明分离 PBMC。

B：RNA 提取

用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA。

C：凝胶电泳检测 RNA 纯度

取 1 μg RNA 电泳，检测 RNA 纯度，结果表明 RNA 纯度良好。

D：反转录

参见 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara, 货号：6210A）说明书，共转录 5 μg RNA。

2.2、BCMA 抗体的 VHH 目的片段 PCR 扩增

将获得的 cDNA 原液等比例混合后稀释 5 倍，选择加 5.0 μL 为最佳扩增浓度。在巢式 PCR 第一轮后割胶回收 750 bp 左右的 VHH 片段，在巢式 PCR 第二轮后用 DNA 产物纯化试剂盒纯化 VHH 片段。

2.3、酶切和连接

1) 使用 pComb3XSS 作为噬菌体质粒载体，用限制性内切酶 SfiI 分别酶切 pComb3XSS 载体和 VHH 的 PCR 产物（即 VHH 目的片段），50℃过夜孵育。

2) 使用 DNA 回收纯化试剂盒对酶切后的 pComb3XSS 载体和 VHH 的 PCR 产物进行纯化，共获得 3.1 μg 连接产物，4℃保存。

3) 酶切后的 pComb3XSS 载体和 VHH 目的片段进行连接、回收，共获得 3.1 μg 连接产物，连接摩尔比例为 Vector：VHH=1:3。

2.4、细菌文库构建

共进行了 10 次电击转化，电击之后立即向电击杯中加入 1 mL 2YT 培养基（37°C 预热）复苏，吸出电击产物并用 2YT 培养基洗净电击杯，共计获得 100 ml 复苏产物，37°C，180 rpm 复苏 45 min，取 100 μ L 梯度稀释至 10^{-3} 和 10^{-4} 测定库转化子数目，涂布于 90 mm 的平板上，其余离心，加入 8 mL 2YT 重悬，涂布于 8 块 200 mm 的平板上。第二天在测定库转化子数目的平板上共有 105 个克隆。随机从测库转化子数目滴度平板上挑取 48 个克隆进行鉴定，结果表明插入率为 100%。根据库转化子数，库插入率和多样性测序分析结果，建库库容为 1.05×10^9 ($105 \times 1000 \times 10^4 \times 1 \times 1$)。文库库容和多样性良好，可以进行下一步筛选。

2.5、噬菌体文库制备

- (1) 将细菌文库接入 2×300 mL 2YT+A+G (Amp:100 μ g/ml、Glu:1%) 培养基中，至其初始 OD600=0.1-0.2，37°C、230 rpm 培养至 OD600=0.8 以上。
- (2) 根据 OD600 值加入辅助噬菌体 M13KO7，(辅助噬菌体: 细菌=20:1)。
- (3) 加入辅助噬菌体 M13KO7 后，混匀，37°C 静置 30 min。
- (4) 37°C，180 rpm 缓摇 30 min。
- (5) 5000 rpm 离心 10 min，弃尽上清，用等体积 2YT+A+K (Amp:100 μ g/ml、Kan:50 μ g/ml) 培养基重悬沉淀，30°C，220 rpm 过夜。
- (6) 过夜培养物 4°C，10000 rpm 离心 20 min，收取上清，弃沉淀。更换离心筒，4°C，10000 rpm，离心 20 min，收取上清。
- (7) 按上清体积的 1/5 加入 PEG8000/NaCl，混匀，冰浴沉淀 2 小时以上。
- (8) 4°C，10000 rpm，离心 20 min，弃上清，空离一次除尽上清。1 mL 1×PBS 悬起沉淀，加入 1/5 体积的 PEG8000/NaCl 二次沉淀 1 h。
- (9) 4°C，12000 rpm，离心 10 min 弃上清，空离一次除尽上清。根据沉淀的量，加入 1×PBS 重悬沉淀。
- (10) 加 100% 甘油至终浓度为 50%，混匀后分装到 1.5 mL EP 管中，-80°C 保存。
- (11) 取 10 μ L 库噬菌体用 2YT 梯度稀释，从 10^{-8} 和 10^{-9} 管中取 10 μ L 加到 90 μ L 的 TG1 菌液中，轻柔混匀。37°C 静置 15 min，分别涂布 Amp 抗性平板，过夜培养。
- (12) 第二天，在 10^{-9} 滴度平板上共有 540 个克隆，噬菌体文库滴度为 5.40×10^{13} cfu/mL ($540 \times 10^9 \times 100$)。

3、亲和筛选

3.1、利用筛选抗原 (BCMA-6×His) 对噬菌体文库进行 2 轮亲和筛选，包含效价检测、噬菌体洗脱液的扩增与噬菌体的纯化。

1) 分别将靶分子 BCMA-6×His 抗原用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 5 μ g/mL，按 100 μ L/孔加入酶标孔中，每个靶分子包被 8 孔（第二轮筛选包被 4 孔，第三轮和第四轮筛选各包被 2 孔），4°C 包被过夜；

2) 弃包被液，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 300 μ L 3% OVA-PBS 封闭液，

37°C封闭 1 h;

3) PBS 洗涤 3 次, 加入 100 μL 噬菌体文库, 37°C 孵育 1 h;

4) 吸出未结合的噬菌体, 用 PBST 洗涤 6 次, PBS 洗涤 2 次;

5) 加入 100 μL Gly-HCl 洗脱液, 37°C 孵育 8 min, 洗脱特异性结合的噬菌体; 将该洗脱液转移至 1.5 mL 无菌离心管中, 迅速用 10 μL Tris-HCl 中和缓冲液中和;

6) 取 10 μL 进行梯度稀释, 测定滴度, 计算淘选回收率, 其余洗脱物混合后进行扩增和纯化, 用于下一轮亲和淘选, 改变淘选条件。

3.2、淘选后文库的扩增

1) 将淘选洗脱物与处于对数生长前期的 E.coli TG1 培养物 20 mL 混匀, 37°C, 静置 30 min, 加入 1 mL 20% 葡萄糖, 220 r/min 振荡培养 30 min 后, 按 cell: phage = 1: 20 的比例加入 M13K07 噬菌体和 4 μL Amp⁺, 37°C, 静置 30 min 后, 补加 2 mL 2YT 液体培养基, 220 r/min 振荡培养 30 min;

2) 将培养物分装于离心管中, 4°C, 5000 r/min, 10 min, 细胞沉淀以 50 mL 2 $\times$ YT-AK 液体培养基重悬, 30°C, 250 r/min 振荡培养过夜;

3) 将过夜培养物 4°C, 10000 r/min 离心 20 min, 将上清转移至新离心管, 加入 1/5 体积的 PEG-NaCl, 混匀后置于 4°C 2 h 以上;

4) 4°C, 10000 r/min, 20 min, 去除上清, 将沉淀重悬于 1 mL PBS 中, 加入 1/5 体积的 PEG/NaCl, 混匀后置于 4°C 1 h 以上;

5) 4°C, 12000 r/min, 2 min, 去除上清, 将沉淀悬浮于 200 μL PBS 中, 即为扩增产物, 测定滴度, 用于下一轮淘选或者分析。

3.3、特异性噬菌体克隆的鉴定及分析

1) 从淘选洗脱物滴度的平板上, 用灭菌牙签从第二轮滴度测定平板上各随机挑选 480 个克隆, 接种于 300 μL 2 $\times$ YT-A 中, 37°C, 230 r/min 振荡培养 8 h。

2) 取 100 μL 上述培养物, 按 cell: phage = 1: 20 的比例加入 M13K07 噬菌体, 37°C, 静置 15 min, 220 r/min 振荡培养 45 min。

3) 补加 300 μL 体积的 2 $\times$ YT-AK, 30°C, 剧烈振荡培养过夜。

4) 第二天 12000 rpm 离心 2 min, 取上清, 用于单克隆 ELISA 鉴定。

3.4、阳性噬菌体克隆的鉴定

1) 将靶分子 hBCMA -his 抗原用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 按 100 μL /孔分别加入酶标孔中, 4°C 包被过夜;

2) 弃包被液, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 300 μL 5% 脱脂牛奶, 37°C 封闭 1 h;

3) PBST 洗涤 1 次, 每孔加入 50 μL 噬菌体培养菌液上清和 50 μL 5% 脱脂牛奶, 37°C, 孵育 1 h;

4) PBST 洗涤 5 次, 加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体 (用 PBS 按 1:10000 稀释), 100 μL /孔, 37°C 作用 1 h;

5) PBST 洗板 6 次。加入 TMB 显色液显色, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 7 min, 加入终止液终止反应, 50 μ L/孔, 于 450 nm 下测光密度。

6) hBCMA 抗原亲和淘选: 采用 Gly-HCl 酸洗脱方法进行筛选, 筛选过程中富集度如下表。

表 2、以 hBCMA 抗原为靶分子的酸洗脱筛选回收量

轮次	抗原包被量浓度 (μ g/mL)	文库投入量 (cfu)	回收量 (cfu)	回收率	富集度
1	5	2×10^{11}	1.70×10^5	8.5×10^{-7}	
2	2	1×10^{11}	1.54×10^7	1.54×10^{-4}	181.18

4、BCMA VHH 单克隆 ELISA 鉴定

以 hBCMA 抗原为靶分子, 采用 Gly-HCl 酸洗脱方法, 洗脱特异噬菌体, 用灭菌牙签从 HBCMA 第二轮滴度测定平板上各随机挑选 480 个克隆 (编号为 NB405-ANTI-Human-1-96、NB405-ANTI-HBCMA-97-480, 1-480 为二轮单克隆), 采用间接 ELISA 筛选阳性克隆, 450 nm 下测定光密度值。

经过二轮筛选, 在第二轮测滴度平板上鉴定共 480 个克隆, 获得阳性克隆 317 个。其中 48、342、423 号克隆为非单克隆。146、150、155、321、414、445 号克隆复检为阴性克隆。在对上述阳性克隆测序后数据分析, 根据 CDR3 序列不同, 获得 41 条 unique sequence。结合阳性克隆 ELISA 筛选的结果, 我们挑选 54 号克隆用 HEK293 细胞表达 VHH-hIgG1Fc。

5、抗 BCMA 单域抗体的制备

5.1、抗 BCMA 单域抗体的结构和序列

挑选步骤 4 中的阳性单克隆测序得到抗体基因序列, 利用基因工程的方法制备抗 BCMA 单域抗体 (BCMA-VHH), 将其中一个抗体命名为 BCMA-VHH-54。

单域抗体只有重链抗体的可变区 (VHH), 依次由框架区 FR1、互补决定区 CDR1、框架区 FR2、互补决定区 CDR2、框架区 FR3、互补决定区 CDR3 和框架区 FR4 组成。具体序列信息如下:

单域抗体 BCMA-VHH-54 的氨基酸序列为 SEQ ID No.1。SEQ ID No.1 的第 1-25 位为框架区 FR1, 第 26-33 位为互补决定区 CDR1, 第 34-50 位为框架区 FR2, 第 51-58 位为互补决定区 CDR2, 第 59-96 位为框架区 FR3, 第 97-106 位为互补决定区 CDR3, 第 107-117 位为框架区 FR4。编码单域抗体 BCMA-VHH-54 的核酸分子 (BCMA-VHH-54 基因) 的核苷酸序列如 SEQ ID No.2 所示。

单域抗体 BCMA-VHH-54 的氨基酸序列: 5'-QLQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFKDYAMNWYRQAPGKEREWVALISSDGGTTEYEQSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSVKPEDTAVYRCNKFAGSYNYWGQGTLLVTVSS-3' (SEQ ID No.1)。三个下划线部分依次为 CDR1、CDR2 和 CDR3。

BCMA-VHH-54 基因的核苷酸序列: 5'-CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCA

GGTGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTGCAG
CCTCTGGATTACCTTCAAAGACTATGCCATGAACTGGTACCGTCAGGC
TCCAGGGAAGGAGCGCGAGTGGGTCGCACTTATTAGTAGTGATGGTGG
TACCACAGAGTATGAGCAGTCCGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAG
AGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCGTGAAACC
TGAGGACACGGCCGTGTATCGCTGTAATAAGTTCGGAGCAGGATCCTAT
AACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCCAGC-3' (SEQ ID N
o.2)。

互补决定区的序列根据 Kabat 编号系统定义。

上述单域抗体为特异性结合 BCMA 蛋白的单域抗体。

5.2、抗 BCMA 单域抗体的表达和纯化

采用真核表达载体 pcDNA3.1 来表达抗 BCMA 单域抗体 (BCMA-VHH-54)。

5.2.1、重组载体的构建

为了便于纯化,在单域抗体 BCMA-VHH-54 的编码基因 (SEQ ID No.2) 3'末端添加人源 IgG1Fc 基因 (hFc 基因,核苷酸序列为 SEQ ID No.3,其编码的氨基酸序列为 SEQ ID No.4),得到 BCMA-VHH-54-hFc 融合基因,然后将该融合基因的 5'端起始密码子前加入 *Bam*HI 酶切位点,3'端终止密码子后加入 *Eco*RI 酶切位点,将其克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 识别位点之间,得到表达 C 端融合 hFc 基因的单域抗体 BCMA-VHH-54 的重组真核表达载体 pcDNA3.1-BCMA-VHH-54-hFc。

5.2.2、抗 BCMA 单域抗体的表达

将步骤 5.2.1 中得到的真核表达载体 pcDNA3.1-BCMA-VHH-54-hFc 采用常规电转的方法转染至 HEK293 细胞中进行表达。

5.2.3、抗 BCMA 单域抗体的纯化

Protein A 具有和 IgG 的 Fc 片段结合的活性,因此采用 Protein A 柱纯化 HEK293 细胞表达的抗 BCMA 单域抗体 (常规纯化步骤)。

最终制备得到纯化后的融合了 hFc 基因的抗 BCMA 单域抗体 (BCMA-VHH-54-hFc)。

实施例 2、抗 BCMA 单域抗体的功能鉴定

1、抗原抗体亲和力测定

待测抗体:步骤 5.2.3 中制备的融合了 hFc 基因的抗 BCMA 单域抗体 (BCMA-VHH-54-hFc)。

(1) 将待测抗体 BCMA-VHH-54-hFc 用 Pierce™ NHS-Fluorescein Antibody Labeling Kit 标记获得 FITC 直标抗体 FITC-BCMA-VHH-54-hFc,用于流式检测;

(2) 将 BCMA 阳性细胞 K562-BCMA 细胞重悬至密度为 2×10^6 个细胞/mL，取 100 μL 分别置于 96 孔 V 底板中离心弃上清并收集细胞（K562 和 KG-1a 细胞作为 BCMA 阴性细胞对照）；

(3) 将 40 μL 不同梯度稀释（具体分组见表 3）的 FITC-BCMA-VHH-54-hFc 同上述细胞混合，室温避光孵育 10 min；

表 3、FITC-BCMA-VHH-54-hFc 抗体亲和力试验分组

	抗体浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）							
K562-BCMA	5.7	2.85	1.425	0.7125	0.3563	0.1781	0.0891	0.0445
抗体稀释比	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800

(4) 200 μL FACS buffer 离心清洗 2 次，用 200 μL FACS buffer 重悬后立即进行流式检测平均荧光强度（MFI）；

(5) 根据公式计算 BCMA VHH 抗体与靶细胞结合的平衡解离常数(KD)来判定亲和力的强弱。其中 KD 值越小，则亲和力越强。

$$1/(MFI-Con)=1/Fmax+(KD/Fmax)(1/[BCMA\ IgG\ Fc])。$$

其中，MFI-Con 代表相对平均荧光强度，系实验组平均荧光强度减去背景平均荧光强度的值；BCMA IgG Fc 代表抗体使用量（单位：nM）。

以抗体使用量的倒数为横坐标、相对平均荧光强度的倒数为纵坐标绘制标准曲线，得到线性回归方程。根据线性回归方程计算，标准曲线与纵坐标的交点为 $1/Fmax$ ，KD 即为直线斜率乘以 $Fmax$ 。

计算所得的平衡解离常数见表 4：

表 4、BCMA-VHH-54-hFc 与 K562-BCMA 细胞的平衡解离常数（KD）

单域抗体	亲和常数 KD (nM)	线性回归方程式	线性回归的相差系数 R^2
BCMA-VHH-54	26.9	$y=0.004x+0.0004$	0.999

2、单域抗体 BCMA-VHH-54 的特异性检测

使用 FITC 标记的 BCMA-VHH-54 抗体（FITC-BCMA-VHH-54-hFc）检测不同肿瘤细胞上 BCMA 的表达。

(1) BCMA 阴性细胞株（对照组）：K562 细胞和 KG-1a 细胞；BCMA 阳性细胞株（实验组）：RPMI-8226、Daudi、MM1.S 细胞和 BCMA 过表达细胞株 K562-BCMA 均于 37℃复苏后加入细胞培养瓶中，于 37℃、5% CO_2 培养，传代 2 次后用于检测抗 BCMA 单域抗体（FITC-BCMA-VHH-54-hFc）。

(2) 将各细胞浓度调整到 2×10^6 个/mL，200 μL /孔加入 96 孔板中，1500 rpm 离心 5 min；

(3) 用 FACS buffer 清洗，离心；

(4) 加入 20 μL 稀释的 FITC-BCMA-VHH-54-hFc 抗体（1：400）混匀，室温孵育 10 min；

(5) 加入 FACS buffer 离心洗去抗体，再加入 buffer 重悬，用流式细胞仪进行检测。

流式结果显示：FITC-BCMA-VHH-54-hFc 抗体能够特异性结合肿瘤细胞上表达的 BCMA 抗原分子（图 2）。

3、MM 患者骨髓细胞中 BCMA 表达的检测

使用 FITC 标记 BCMA-VHH-54 抗体（FITC-BCMA-VHH-54-hFc）检测 2 例多发性骨髓瘤（MM）患者的骨髓细胞，流式分析步骤如下：

（1）冻存的 2 位多发性骨髓瘤（MM）患者的骨髓细胞于 37°C 复苏。

（2）将细胞密度调整为 2×10^6 个/ml，200 μ L/孔加入 96 孔板中，1500 rpm 离心 5 min；

（3）用 FACS buffer 清洗，离心；

（4）加入 20 μ L 稀释的 FITC-BCMA-VHH-54-hFc 抗体（1：400）混匀，室温孵育 10 min；

（5）加入 FACS buffer 离心洗去抗体，再加入 buffer 重悬，用流式细胞仪进行检测。

结果显示：本申请的单域抗体 BCMA-VHH-54 能够特异性识别 MM 肿瘤细胞表达的 BCMA（图 3）。

以上对本申请进行了详述。对于本领域技术人员来说，在不脱离本申请的宗旨和范围，以及无需进行不必要的实验情况下，可在等同参数、浓度和条件下，在较宽范围内实施本申请。虽然本申请给出了特殊的实施例，应该理解为，可以对本申请作进一步的改进。总之，按本申请的原理，本申请欲包括任何变更、用途或对本申请的改进，包括脱离了本申请中已公开范围，而用本领域已知的常规技术进行的改变。

工业实用性

本申请的单域抗体（BCMA-VHH-54）亲和力高，能够很好地特异性靶向 BCMA 阳性细胞（表达 BCMA 蛋白的细胞），并可以成功应用于 MM 患者骨髓细胞中 BCMA 的表达的检测。本申请的单域抗体可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞及任何重组系统中表达和生产，可制成临床上用于预防和治疗 BCMA 靶点相关疾病（多发性骨髓瘤、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤）的特异性抗体药物，或 BCMA 蛋白的检测试剂盒等。本申请单域抗体药物结构稳定、分子小、易于重组表达、生产成本低，可单独使用或作为载药系统携带相关药物，在药物应用和临床诊断等领域具有十分广阔的前景和重要的意义。

权利要求

1.单域抗体，其特征在于，所述单域抗体由重链可变区组成，所述重链可变区包含氨基酸序列分别是 SEQ ID No.1 的第 26-33 位的互补决定区 CDR1、SEQ ID No.1 的第 51-58 位的互补决定区 CDR2 和 SEQ ID No.1 的第 97-106 位的互补决定区 CDR3。

2.根据权利要求 1 所述的单域抗体，其特征在于，所述重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 或与 SEQ ID No.1 具有至少 80% 的同一性且具有相同的功能的氨基酸序列。

3.与权利要求 1 或 2 所述单域抗体相关的生物材料，其特征在于，所述生物材料为下述任一种：

C1) 编码权利要求 1 或 2 所述单域抗体重链可变区的核酸分子；

C2) 含有 C1) 所述核酸分子的表达盒；

C3) 含有 C1) 所述核酸分子的重组载体、或含有 C2) 所述表达盒的重组载体；

C4) 含有 C1) 所述核酸分子的重组宿主细胞、或含有 C2) 所述表达盒的重组宿主细胞、或含有 C3) 所述重组载体的重组宿主细胞。

4.根据权利要求 3 所述的生物材料，其特征在于，所述核酸分子为下述任一种：

D1) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No.2 的 DNA 分子；

D2) 与 D1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且具有相同功能的 DNA 分子。

5.权利要求 1 或 2 所述单域抗体和/或权利要求 3 或 4 所述生物材料的下述任一种应用：

E1) 在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的应用，或在预防或治疗肿瘤中的应用；

E2) 在制备用于预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病的药物中的应用，或在预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病中的应用；

E3) 在制备用于筛查、诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病的产品中的应用，或在筛查、诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病中的应用；

E4) 在检测 BCMA 蛋白或制备用于检测 BCMA 蛋白的产品中的应用；

E5) 在制备用于结合 BCMA 蛋白的产品中的应用；

E6) 在介导药物特异性地识别表达 BCMA 抗原的肿瘤或制备介导药物特异性地识别表达 BCMA 抗原的肿瘤的产品中的应用；

E7) 在 BCMA 蛋白的体内显像或制备用于 BCMA 蛋白的体内显像的产品中的应用；

E8) 在制备靶向 BCMA 的 CAR 细胞中的应用。

6.根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述 BCMA 靶点相关疾病为 BCMA 阳性癌症。

7.根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述 BCMA 阳性癌症包括多发性骨髓瘤、慢性髓细胞白血病、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

8.试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求 1 或 2 所述的单域抗体,所述试剂盒具有下述任一用途:

F1) 检测 BCMA 蛋白;

F2) 筛查、诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病;

F3) 用于 BCMA 蛋白的体内显像。

9.药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有权利要求 1 或 2 所述的单域抗体。

10.权利要求 1 或 2 所述单域抗体的制备方法,其特征在于,所述方法包括:构建含有权利要求 3 或 4 中所述核酸分子的重组表达载体;将所述重组表达载体导入宿主细胞,获得表达所述单域抗体的重组细胞;培养所述重组细胞,经分离纯化获得所述单域抗体。

11.诊断或辅助诊断 BCMA 靶点相关疾病的方法,其特征在于,所述方法包括:从受试者分离获得样品,然后利用权利要求 1 或 2 所述的单域抗体检测所述样品中 BCMA 蛋白的含量,根据所述 BCMA 蛋白的含量进行 BCMA 靶点相关疾病的诊断或辅助诊断。

12.筛查 BCMA 靶点相关疾病的方法,其特征在于,所述方法包括:从受试者分离获得样品,然后利用权利要求 1 或 2 所述的单域抗体检测所述样品中 BCMA 蛋白的含量,根据所述 BCMA 蛋白的含量进行 BCMA 靶点相关疾病的筛查。

13.预防或治疗 BCMA 靶点相关疾病的方法,其特征在于,所述方法包括向患有 BCMA 靶点相关疾病的受试者施用权利要求 1 或 2 所述的单域抗体或权利要求 9 所述的药物组合物。

14.根据权利要求 11-13 中任一所述的方法,其特征在于,所述 BCMA 靶点相关疾病为 BCMA 靶点相关肿瘤。

15.根据权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述 BCMA 靶点相关肿瘤为 BCMA 阳性癌症。

16.根据权利要求 15 所述的方法,其特征在于,所述 BCMA 阳性癌症包括多发性骨髓瘤、慢性髓细胞白血病、B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

17.体外检测 BCMA 蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括利用权利要求 1 或 2 所述的单域抗体或权利要求 8 所述的试剂盒检测 BCMA 蛋白。

18.抗体药物偶联物,包括抗体部分和偶联部分,其特征在于,所述抗体部分包含权利要求 1 或 2 所述的单域抗体。

19.根据权利要求 18 所述的抗体药物偶联物,其特征在于,所述偶联部分包括可检测的标记、化学药物或细胞毒素。