抗 GPRC5D/BCMA/CD3 三特异性抗体的制备及其用途

相关申请的交叉引用

本申请基于申请号为 202310664900.5、申请日为 2023 年 6 月 6 日的中国专利申请，以及申请号为 202410713270.0、申请日为 2024 年 6 月 4 日的中国专利申请提出，并要求该中国专利申请的优先权，该中国专利申请的全部内容在此引入本申请作为参考。

技术领域

本发明涉及三特异性抗原结合蛋白，更具体地，涉及特异性结合 GPRC5D 和 BCMA 两种肿瘤抗原和 T 细胞表面抗原 CD3 的三特异性抗体，以及包含其的药物组合物、制备方法和用途。

背景技术

T 细胞双特异性抗体(BsAb)已经被用于肿瘤治疗。此类抗体可以在细胞毒性 T 淋巴细胞与肿瘤细胞之间形成突触，诱导肿瘤细胞破坏。BsAb 通常涉及针对肿瘤相关抗原(TAA)和 T 细胞表面抗原(也称作 T 细胞衔接抗原，TEA)的双重靶向。然而，基于 BsAb 的治疗策略典型地依赖于肿瘤相关抗原在待治疗的肿瘤细胞上的分布。这就导致治疗对于患者群体的选择性和治疗的局限性。此外，研究也显示，靶向单个 TAA 位点的治疗形式可能会因肿瘤的逃逸机制而引起疾病的复发，从而限制治疗的有效性。

已经提出了开发三特异性和/或四特异性抗体来有效募集免疫细胞到肿瘤部位和改善治疗的功效。为此，近年来，多种多价、多特异性抗体形式(format)被描述。然而，不同治疗产品在治疗功能性和治疗行为上的要求具有多样性，决定了并不存在可以适用于大多数不同期望分子组合的“最佳形式”。因此，在实现多特异性时，需要考虑多种因素，包括，例如不同靶抗原的空间分布或大小，以及肿瘤细胞表面的肿瘤相关抗原表达密度。在许多情况下，对于特定靶抗原组合有效的抗体形式，必须通过产生和比较不同的抗体形式的功能性来鉴定。

B 细胞成熟抗原（BCMA，即 CD269，TNFRSF17）是肿瘤坏死因子受体超家族成员（TNFRSF）。BCMA 是 III 型跨膜蛋白，在胞外结构域（ECD）中具有 TNFR 家族成员特征性的富半胱氨酸结构域（CRD），该结构域形成配体结合基序。BCMA 的配体包括 B 细胞激活因子（BAFF）和 B 细胞增殖诱导配体（APRIL），其中 B 细胞增殖诱导配体（APRIL）与 BCMA 以更高的亲和力结合，促进肿瘤细胞增殖。

临床前模型以及人体肿瘤中发现 BCMA 在多发性骨髓瘤（Multiple Myeloma, MM）细胞中过表达，其上调经典以及非经典 NF-κB 信号，促进 MM 细胞生长、生存、粘附，诱导破骨细胞激活、血管生产、转移及免疫抑制等，BCMA 表达已经成为诊断 MM 的重要标志物。此外，MM 患者血清中 sBCMA 水平升高，与骨髓中 MM 细胞数量呈正比例相关，且其浓度变化与 MM 预后及治疗应答密切相关。多发性骨髓瘤，也称为浆细胞瘤或者卡勒氏病，是一种难治愈的 B 细胞系的恶性肿瘤，特征是浆细胞异常增生。鉴于 BCMA 仅限于表达在浆细胞中，在天然和记忆性 B 细胞中不表达的特性，BCMA 成为治疗 B 细胞恶性肿瘤，尤其是多发性骨髓瘤的热门靶点。本领域存在开发针对 BCMA 的抗体，特别是多特异性抗体的需要。

虽然现有技术例如 WO2022174813A1 公开了一种特异性结合 CD3、BCMA 和 GPRC5D

的三特异性抗体，但是在该分子结构中，BCMA 抗原结合区为 scFv 的形式，且在 Fc 的 C 端。其面临如下问题：抗体纯化收率低，聚集体高；BCMA 抗原结合区 scFv 对抗原的亲和力低，空间位置也不佳，进而导致 BCMA 介导的肿瘤细胞杀伤很弱；BCMA 抗原结合区中含有一部分成药性不好的 hotspot 位点。

因此，需要一种新的抗 GPRC5D/BCMA/CD3 三特异性抗体，其能够克服上述缺点，具有更好的肿瘤杀伤效果，且更易纯化和成药。

发明概述

本发明提供了一种三特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区，和特异性结合其它抗原的第二和第三抗原结合区。

在一些实施方案中，第二抗原结合区特异性结合 CD3，且第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体通过施用电荷突变和二硫键突变，从而防止轻链错配。在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中，特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区为 Fab。

在一些实施方案中，特异性结合 CD3 的第二抗原结合区为 Fab。

在一些实施方案中，所述特异性结合 BCMA 的抗原结合区例如 Fab 位于特异性结合 CD3 的抗原结合区例如 Fab 的 N 末端。在一些实施方案中，所述三特异性抗体在形成 T 细胞杀伤的免疫突触时，T 细胞距离肿瘤细胞相比现有技术中已知的三特异性抗体（例如 WO2022174813A1 中公开的三特异性抗体，特别是特异性结合 BCMA 的 scFv 位于 Fc 的 C 端）更近，因此本发明的三特异性抗体具有更强的 T 细胞杀伤。在一些实施方案中，本发明的所述三特异性抗体的结构中，特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区能够遮挡 CD3 的功能，因此能够避免在无肿瘤抗原存在时对周身非特异性 T 细胞激活以及继而带来的毒性。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体具有特定的特异性结合 BCMA 的抗原结合区，从而具有提高的成药性，和/或降低了抗体免疫原性的产生。

因此，本发明的三特异性抗体具有以下一种或多种或全部优势，特别是相比于 WO2022174813A1 中公开的三特异性抗体：

i)具有提高的 BCMA 的亲和力；

ii) 具有提高的 BCMA 介导的肿瘤杀伤；

iii)具有降低的抗体分子的聚集倾向，和/或提高的纯化收率；

iv) 具有更强的 T 细胞杀伤；

v) 具有降低的非特异性细胞毒性，例如能够避免在无肿瘤抗原存在时对周身非特异性 T 细胞激活以及继而带来的毒性；

vi) 具有降低的抗体免疫原性；和/或

vii)具有提高的成药性。

附图说明

结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

图 1 显示了三特异性抗体的示例性结构，其中图 1A 对应于 B3 和 B3b 形式，图 1B 对应于 B5 结构，图 1C 对应于 F2 形式。

图 2A 显示了示例抗体与人 BCMA（GS-CHO-hBCMA）的基于细胞的亲和力-1。

图 2B 显示了示例抗体与人 BCMA（GS-CHO-hBCMA）的基于细胞的亲和力-2。

图 2C 显示了示例抗体与食蟹猴 BCMA（GS-CHO-cynoBCMA）的基于细胞的亲和力-1。

图 2D 显示了示例抗体与人 GPRC5D（GS-CHO-hGPRC5D）的基于细胞的亲和力-1。

图 2E 显示了示例抗体与人 GPRC5D（GS-CHO-hGPRC5D）的基于细胞的亲和力-2。

图 2F 显示了示例抗体与食蟹猴 GPRC5D（GS-CHO-cynoGPRC5D）的基于细胞的亲和力-1。

图 2G 显示了示例抗体与人 CD3（Jurkat）的基于细胞的亲和力-1。

图 2H 显示了示例抗体与人 CD3（$CD8^+$ T 细胞，$CD4^+$ T 细胞）的基于细胞的亲和力。

图 2I 显示了示例抗体与表达突变体 BCMA 抗原的 293T 细胞的细胞亲和力。

图 2J 显示了示例抗体与表达突变体 BCMA 抗原的 GS CHO 细胞的细胞亲和力。

图 3A 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 细胞的杀伤作用-1。

图 3B 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 细胞的杀伤作用-2。

图 3C 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 细胞的杀伤作用-3。

图 3D 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko BCMA 细胞的杀伤作用-1。

图 3E 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko BCMA 细胞的杀伤作用-2。

图 3F 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko BCMA 细胞的杀伤作用-3。

图 3G 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用-1。

图 3H 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用-2。

图 3I 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用-3。

图 3J 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-1。

图 3K 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-2。

图 3L 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-3。

图 3M 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-4。

图 3N 显示了示例抗体介导的 PBMC 对混合细胞的杀伤作用-1。

图 3O 显示了示例抗体介导的 PBMC 对混合细胞的杀伤作用-2。

图 3P 显示了示例抗体介导的 PBMC 对非靶细胞 Calu-6 的杀伤作用。

图 3Q 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 的杀伤过程伴随的三种细胞因子的释放量（3 个抗体浓度）-1。

图 3R 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 的杀伤过程伴随的三种细胞因子的释放量（3 个抗体浓度）-2。

图 3S 显示了示例抗体介导的 PBMC 的非抗原特异性细胞因子的释放量（无靶细胞，3 个抗体浓度）-1。

图 3T 显示了示例抗体介导的 PBMC 的非抗原特异性细胞因子的释放量（无靶细胞，3 个抗体浓度）-2。

图 3U 显示了示例抗体介导的 PBMC 对过表达 BCMA 突变株 GS CHO 的杀伤作用。

图 4A 显示了在 sBCMA 存在下，示例抗体介导的 PBMC 中 CD4 T 细胞的激活。

图 4B 显示了在 sBCMA 存在下，示例抗体介导的 PBMC 中 CD8 T 细胞的激活。

图 4C 显示了在 sBCMA 存在下，示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤。

图 5A 显示了示例抗体在 H929 ko GPRC5D 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤作用，给药剂量和统计方法标注于图注，给药时间分别为肿瘤细胞接种后第 7 天、第 14 天和第 21 天。

图 5B 显示了示例抗体在 H929 ko BCMA 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤作用，给药剂量和统计方法标注于图注，给药时间分别为肿瘤细胞接种后第 7 天和第 14 天。

图 5C 显示了示例抗体在 MM1S 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤作用，给药剂量标注于图注，给药时间分别为肿瘤细胞接种后第 7 天和第 14 天。

图 5D 显示了示例抗体在 L363 荷瘤人源化小鼠模型中的抑瘤作用，给药时间分别为肿瘤细胞接种后第 7 天和第 18 天。

图 6 显示了 H929，H929 ko GPRC5D 和 H929 ko BCMA 细胞系流式分析 BCMA 与 GPRC5D 的表达结果。

图 7 显示了 B3(24)分子与对比分子（F2 (24)）的聚集体差异。

发明详述

除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技

术人员通常理解的相同含义。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。此外，本文中所述的材料、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明显得到。

定义

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。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。

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。

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，但是不排除任意其他要素、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。

术语“GPRC5D”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 UniProt Q9NZD1 下的人 GPRC5D 蛋白)。在一个实施方案中，通过流式细胞术检测，本发明抗体分子中结合 GPRC5D 的抗原结合区可以对表达 GPRC5D 的细胞具有高亲和力结合活性，对表达人 GPRC5D 的细胞具有例如，1-150nM,如 20-135nM 的 EC_{50} 值。在一个实施方案中，所述抗原结合特异性对人和猴 GPRC5D 具有交叉反应性。

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)。“BCMA”不仅涵盖野生型蛋白，还涵盖突变体，例如天然变体或涵盖在疾病中突变的变体（特别是具有导致耐药性的突变的变体）。在一个实施方案中，通过生物膜层光学干涉技术检测，本发明抗体分子中结合 BCMA 的抗原结合区可以对 BCMA 具有高亲和力结合活性，例如，对人 BCMA 具有 0.1-10nM,如 0.125nM 的 K_D 值。在一个实施方案中，所述抗原结合特异性对人和猴 BCMA 具有交叉反应性。

术语“CD3”指 T 细胞衔接抗原 T 细胞表面糖蛋白 CD3(例如，登录号 UniProt P07766 下的人 CD3 蛋白)。在一个实施方案中，通过生物膜层光学干涉技术检测，本发明抗体分子中结合 CD3 的抗原结合区可以对 CD3（例如 CD3E&G）具有高亲和力结合活性，对人 CD3E&G 具有例如 10-100nM,如 10-70nM 的 KD 值。在一个实施方案中，所述抗原结合特异性对人和猴 CD3 具有交叉反应性。

在本文中当提及“第一”、“第二”、“第三”时，仅为了区分三个结构域或三条链或三个抗原结合区，而不以任何方式表明三个结构域或三个抗原结合区的位置。

在描述本发明抗体结构时，术语“N 端/N 末端”指 N 端的最末氨基酸，术语“C 端/C 末端”指 C 端的最末氨基酸。

如本文所用，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对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。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法测定。

“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(KD)代表，解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是 kdis 和 kon)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。

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。在一些实施方案中，抗原为肿瘤相关抗原（即与肿瘤的发生进展有关的抗原）或T细胞衔接器。

如本文所用的术语“靶标结合区”是指多特异性结合分子，例如三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可以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，用于本发明的三特异性抗体分子的抗原结合区可以是Fab。

本文所述的“IgG样多特异性抗体”是指包含Fc二聚体的多特异性抗体。

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，例如三特异性结合分子，即所述分子包含至少第一靶标结合区和第二靶标结合区和第三靶标结合区，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且所述第三靶标结合区结合第三种靶标。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。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多特异性抗体，例如三特异性抗体。

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，本文提供了这样的三特异性抗体，其具有针对第一抗原和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、GPRC5D和CD3的三特异性抗体。

当在多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或1个或1个以上的第三抗原结合区。在一些实施方案，本发明的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“全抗体”或“全长抗体”在本文中可互换使用，是指具有天然免疫球蛋白分子结构的抗体分子。在常规四链 IgG 抗体的情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。在仅具有重链而缺乏轻链的重链抗体情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)。对于常规四链 IgG 抗体，全长抗体重链通常由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成，其中重链恒定区至少包含 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3。全长抗体轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成，其中轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。每个重链可变区 VH 和每个轻链可变区都由三个 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。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。

术语抗体的“抗原结合片段”是与全长抗体不同的分子，其包含全长抗体的一部分，但其能结合全长抗体的抗原或与全长抗体(即与抗原结合片段所来源的全长抗体)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)、单域抗体(sdAb)、纳米抗体。例如，通过木瓜蛋白酶消化全长抗体能够获得 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。Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 可以由独立的基因编码，但是也可以使用重组方法，使用合成性连接肽连接这两个结构域以使其作为单条蛋白链产生，并且在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv (scFv)。

术语“可变区”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。在一些情况下，单个 VH 或 VL 结构域可以足以给予抗原结合特异性。

“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区 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变区 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 多肽链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 多肽链也称作“Fab 轻链”。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变区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。位于抗体重链可变区内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变区

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。

术语"Fc 结构域"或"Fc 区"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 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interes，第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系（也称作 EU 索引）进行编号。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。两个 Fc 区可以实现二聚化以构成二聚 Fc，两个不同的 Fc 异二聚化形成异二聚 Fc。在本文中，术语"Fc 区"、"Fc 部分"和"二聚 Fc（例如异二聚 Fc）"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 端的铰链区。在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Asp221 或从 Cys226 或从 Asp231 延伸至重链的羧基端。

在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体包含 Fc 区。在一个实施方案中，Fc 区是人 Fc 区。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG4 亚类。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG1 亚类。

在一个实施方案中，人 IgG1 Fc 区多肽（包含铰链区）包含以下氨基酸序列：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:87)。

人 IgG4 Fc 区多肽（包含铰链区）包含以下氨基酸序列：

PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:88)。

在本文中，"异二聚 Fc 或 Fc 异二聚体"是指包含两个不同的 Fc 区或由两个不同的 Fc 区二聚化后形成的支架，其可以在其 N 末端或 C 末端连接结合抗原的结构域（例如可以与靶分子结合的抗体的重链和/或轻链可变区或抗体的抗原结合片段，或可以与靶分子结合的配体或受体的可溶性部分），用于构成多特异性抗体例如双特异性抗体。

术语“CH1 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 118 延伸至 EU 位置 220 的部分(EU 编号体系)。在一个实施方案中，CH1 结构域包含 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(SEQ ID NO: 82)的氨基酸序列。在一个实施方案中，通过突变 CH1 中的半胱氨酸为非半胱氨酸来去除内部二硫键，或者通过将非半胱氨酸突变为半胱氨酸来重塑新的二硫键。

术语“CH2 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 231 延伸至 EU 位置 340 的部分(EU 编号体系)。在一个实施方案中，CH2 结构域包含

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:83)的氨基酸序列。

术语“CH3 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 341 延伸至 EU 位置 447 的部分。在一个实施方案中，CH3 结构域包含 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:84)的氨基酸序列。

术语“铰链区”指抗体重链多肽的部分，所述部分在野生型抗体重链中连接 CH1 区和 CH2 区，例如，IgG1 铰链区，例如根据 EU 编号，D221 到 P230 的序列。可以通过与 IgG1 亚类序列的铰链区半胱氨酸残基对齐，确定其他 IgG 亚类的铰链区。铰链区通常情况下是由具有相同氨基酸序列的两条多肽组成的二聚体分子。在一个实施方案中，铰链区具有氨基酸序列 DKTHTCPXCP (SEQ ID NO: 99)，其中 X 是 S 或 P。在一个实施方案中，铰链区包含氨基酸序列 HTCPXCP (SEQ ID NO: 19)，其中 X 是 S 或 P。在一个实施方案中，铰链区包含氨基酸序列 CPXCP (SEQ ID NO: 81)，其中 X 是 S 或 P。在一个实施方案中，通过突变铰链区中的半胱氨酸为非半胱氨酸来去除铰链区的内部二硫键。

如本文所用，重链和轻链的全部可变区的氨基酸位置根据 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中描述的 Kabat 编号系统编号并且在本文中称作“ Kabat 编号”。

如本文所用，用于提及抗体除可变区之外的结构域（例如恒定区，例如 Fc 区）中的氨基酸位置时，根据 Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)中描述的 EU 编号系统编号并且在本文中称作“EU 编号”。当将位置编号和/或氨基酸残基赋予特定抗体同种型时，其旨在适用于任何其它抗体同种型的相应的位置和/或氨基酸残基，这是本领域技术人员已知的。

如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接多特异性抗体的不同部分的任何分子。在多特异性抗体不同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，根据本发明的术语“肽接头”是指氨基酸的序列，其中所述序列将多特异性抗体的各个部分的氨基酸序列连接在一起。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。肽接头可以主要包括或可以不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物，包括例如$(GS)_n$(SEQ ID NO:112)、$(GSGGS)_n$(SEQ ID NO:113)、$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:114)、$(GGGS)_n$(SEQ ID NO:115)和$(GGGGS)_nG$(SEQ ID NO:116)，其中 n 是至少 1(且优选 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。

“分离的”抗体是指已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中，将抗体纯化至超过95%或99%纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相HPLC)确定的。

“分离的”核酸是指这样的核酸分子，其已经与其天然环境的组分分离。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子，但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。“分离的编码抗体的核酸”是指一个或多个核酸分子，其编码抗体的链或其片段，包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子，以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中，为比较目的，所比对的参考序列的长度是至少30%、优选地至少40%、更优选地至少50%、60%和甚至更优选地至少70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

术语“氨基酸取代”或“氨基酸突变”指将预先确定的亲本氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基替换为不同的“取代”氨基酸残基。该取代残基或多个残基可以是“天然存在的氨基酸残基”(即由遗传密码编码)并且选自：丙氨酸(Ala)；精氨酸(Arg)；天冬酰胺(Asn)；天冬氨酸(Asp)；半胱氨酸(Cys)；谷氨酰胺(Gln)；谷氨酸(Glu)；甘氨酸(Gly)；组氨酸(His)；异亮氨酸(Ile)：亮氨酸(Leu)；赖氨酸(Lys)；甲硫氨酸(Met)；苯丙氨酸(Phe)；脯氨酸(Pro)；丝氨酸(Ser)；苏氨酸(Thr)；色氨酸(Trp)；酪氨酸(Tyr)；和缬氨酸(Val)。本文的氨基酸取代定义中还涵盖用一种或多种非天然存在的氨基酸残基置换。“非天然存在的氨基酸残基”指除上文所列的那些天然存在的氨基酸残基之外，能够共价结合多肽链中相邻氨基酸残基的残基。非天然存在的氨基酸残基的例子包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸、Aib和其他氨基酸残基类似物。

术语“保守改变”或 “保守修饰”指未显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰或变化。这类种保守修饰包括保守的氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术，如位点定向诱变和PCR介导的诱变向本发明的抗体或抗体片段引入修饰。保守性取代是氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。已经在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、β-侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。

氨基酸突变用（原始氨基酸,氨基酸位置,突变氨基酸）来表示。例如，当突变位点位于V区时，“Q39D”是指，位于Kabat位置39的谷氨酰胺氨基酸被天冬氨酸(D)取代；当突变位点位于C区时，“Q124C”是指，位于EU位置124的谷氨酰胺被半胱氨酸（C）取代。在本发明提及氨基酸位置时，如无明确说明，是指根据IgG1重链或kappa轻链编号的氨基酸位置，即

其涵盖基于 IgG1 重链或 Kappa 轻链编号的氨基酸位置，以及在其他重链或轻链上对应于所述氨基酸位置的氨基酸位置。应当注意，在描述突变时，在一个具体位置上的原始氨基酸可以是描述的氨基酸，或者也可以是在对应位置上的其他氨基酸。

“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，“结入扣”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”，在欲与之配对的另一条链的界面引入相应的“空穴”，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。

术语“效应功能”指随免疫球蛋白同种型变动的归因于免疫球蛋白 Fc 区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括：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、C1q 结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、下调细胞表面受体(例如 B 细胞受体)和 B 细胞活化。

术语“抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)”是某些细胞毒性效应细胞(例如天然杀伤(NK)细胞)介导对靶细胞和外来宿主细胞杀伤的主要机制之一。在一些实施方案中，本发明的抗体提供 T 淋巴细胞的抗体依赖性细胞毒作用、增强 NK 细胞的抗体依赖性细胞毒作用。

术语“抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)”指一种细胞反应，其中通过结合靶细胞的抗体与巨噬细胞表面的 FcγRIIIa 结合，诱导激活巨噬细胞，从而使靶细胞内化和被吞噬体酸化降解。ADCP 也可由 FcγRIIa 和 FcγRI 介导，但是占比较小。

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

“缀合物”是与一个或多个其他物质(包括但不限于治疗剂或标记)缀合的抗体。

术语“个体”或“受试者”可互换地使用，包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，牛、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，个体或受试者是人。

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“肿瘤”涵盖实体瘤和液体肿瘤。在一些实施方案中，肿瘤是癌症。术语“癌症”和“癌性”是指哺乳动物中细胞生长不受调节的生理疾患。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、

病症、病况或疾病的进展或严重性。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。在一些实施方案中，本发明的抗体分子用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

用于本文时，“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于癌症症状发生前的药物施用。

术语“有效量”指本发明的抗体或组合物的这样的量或剂量，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其组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。

“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“药物组合”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒。术语“非固定组合”意指活性成分（例如，(i)本发明抗体、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。在一些实施方案中，药物组合中使用的本发明抗体以不超过它们单独使用时的水平施用。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。

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。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的后代。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后代，而不考虑传代的数目。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细胞，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。

本文所使用的术语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至试剂(诸如，抗体)并且促进其所缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如，放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即，物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体，以及通过与直接被标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的第二抗体进行的第一抗体的检测和具有生物素的 DNA 探针的末端标记，使得其可以用荧光标记的链霉抗生素蛋白来检测。

“受试者/患者样品”指从患者或受试者得到的细胞、组织或体液的集合。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。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。肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活检、细针吸出物、支气管灌洗液、胸膜液(胸水)、痰液、尿液、手术标本、循环中的肿瘤细胞、血清、血浆、循环中的血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系，以及保存的肿瘤样品，诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

本文中使用的术语“检测”包括定量或定性检测。示例性的检测方法包括但不限于，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)。在一些实施方案中，生物样品包括体液、细胞或组织。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。

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，本文中所述的材料、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。

I. 多特异性抗体

本发明一方面涉及一种多特异性抗体例如三特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区、和特异性结合第二和第三抗原的第二抗原结合区和第三抗原结合区。

本发明一方面涉及一种特异性结合 GPRC5D、BCMA 和 CD3 的三特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区、特异性结合 CD3 的第二抗原结合区和特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区。

在一些实施方案中，第一抗原结合区来自抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段，例如是抗 BCMA 抗体的 Fab 片段。在一些实施方案中，第一抗原结合区来自本文所述的抗 BCMA 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，第二抗原结合区来自抗 CD3 抗体或其抗原结合片段，例如抗 CD3 抗体的 Fab 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 CD3 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，第三抗原结合区来自抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段，例如抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段。在一些实施方案中，第三抗原结合区来自本文所述的抗 GPRC5D

抗体或其抗原结合片段。

适用于本发明的三特异性抗体的第一抗原结合区可以包含本发明的抗 BCMA 全长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 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。优选地，第一抗原结合区是特异性结合 BCMA 的 Fab。

适用于本发明的三特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 CD3 全长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。优选地，第二抗原结合区是特异性结合 CD3 的 Fab。

适用于本发明的三特异性抗体的第三抗原结合区可以包含抗 GPRC5D 全长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。优选地，第三抗原结合区是特异性结合 GPRC5D 的 Fab。

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。在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体包含 Fc 二聚体，例如包含 Fc 异二聚体。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体包含特异性结合 BCMA 的 Fab 作为第一抗原结合区。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体的三个抗原结合区均为 Fab 片段。

- **适用于本发明的三特异性抗体的抗原结合区**

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体的抗原结合区是 Fab 片段。

适用于三特异性抗体抗原结合区的 Fab 片段由包含抗体 VH、CH1、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，在所述三特异性抗体中，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；或通过包含 VH 的链的 N 端融合在抗体的 Fc 结构域的 C 端，其中 Fc 结构域可以包含或不包含铰链区。在一些实施方案中，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 结构域的 N 端融合，或通过 VH-CH1 连的 VH 的 N 端与抗体 Fc 结构域的 C 端融合。

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，所述接头是(GGGGS) n，其中 n=1、2、3 或 4。

在一些实施方案中，对本发明三特异性抗体中的抗原结合区例如 Fab 进行突变以减少错配。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体的一个抗原结合区例如 Fab 片段包含二硫键重塑突变。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体的一个抗原结合区例如 Fab 片段包含电荷突变，所述电荷突变为将所述氨基酸对上的两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体的一个抗原结合区例如 Fab 片段包含电荷突变和二硫键重塑突变。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体的两个抗原结合区例如两个 Fab 片段中，其中一个抗原结合区包含电荷突变，且另一个抗原结合区包含电荷突变和二硫键重塑突变。在一些实施方案中，两个抗原结合区在对应位置上分别包含电荷突变，优选地，两个抗原结合区所包含的电荷突变相反。

二硫键重塑突变：

在一些实施方案中，二硫键重塑突变为在抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 126 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 124 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 126C（例如 F126C），且在 CL 中包含 124C(例如 Q124C)（EU 编号）。在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变还包括将天然半胱氨酸取代为非半胱氨酸。在一些实施方案中，所述抗原结合区中的 CH1 在位置 220 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸被一个非半胱氨酸氨基酸的取代。在一些实施方案中，所述抗原结合区中的轻链 CL 在位置 214 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸至一个非半胱氨酸氨基酸的取代。在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 C220S/A/V（IgG1 亚型，或在 IgG2、IgG3 或 IgG4 的对应的位置上包含 C131S/A/V），且在 CL 中包含 C214S/A/V（EU 编号）。在一些实施方案中，所述 Fab 包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 F126C 突变，且所述 CL 中包含 Q124C 突变（EU 编号）。在一些实施方案中，所述抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 F126C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 Q124C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，包含二硫键重塑突变的 Fab 片段包含 CH1，其中所述 CH1 包含与 SEQ ID NO:85 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，且包含 F126C。在一些实施方案中，所述 CH1 包含 SEQ ID NO:85 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，所述 CH1 包含与 SEQ ID NO:86 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，且包含 F126C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，包含二硫键重塑突变的 Fab 片段包含 CL，其中所述 CL 包含与 SEQ ID NO:97 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，且包含 Q124C。在一些实施方案中，所述 CL 包含 SEQ ID NO:97 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，所述 CL 包含与 SEQ ID NO:98 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，且包含 Q124C 和 C124S。在一些实施方案中，所述 CL 包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

电荷突变：

在一些实施方案中，所述电荷突变是在至少一个抗原结合区的重链和轻链的接触面上

的氨基酸对的突变，其中所述氨基酸对中的两个氨基酸被突变为相反电荷。在一些实施方案中，所述电荷突变包括在以下位置的氨基酸对上将两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸：重链可变区的位置 39 和轻链可变区的位置 38（Kabat 编号）。在一些实施方案中，所述电荷突变包括在以下位置的氨基酸对上将两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸：重链可变区的 Q39 和轻链可变区的 Q38（kabat 编号）。

在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 D。在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 K。

在本文中，两个抗原结合区“包含的电荷突变相反”是指在第一抗原结合区和第二抗原结合区的 1 个或多个相同的氨基酸对的位置上包含电荷突变，但是在一个抗原结合区中的氨基酸对上的电荷突变与另一个抗原结合区中的氨基酸对上的电荷突变不同，例如在相同位置上，第一抗原结合区中突变的氨基酸所带电荷与第二抗原结合区中突变的氨基酸所带电荷相反。例如，在第一抗原结合区中，在位置 X1 上的重链氨基酸被突变带正电荷的氨基酸，且在位置 X2 上的轻链氨基酸被突变为带负电荷的氨基酸，同时在第二抗原结合区中，在位置 X1 上的重链氨基酸被突变带负电荷的氨基酸，且在位置 X2 上的轻链氨基酸被突变为带正电荷的氨基酸，其中在第一抗原结合区中的带正电荷的氨基酸与在第二抗原结合区中的带正电荷的氨基酸可以相同或不同，例如相同；且在第一抗原结合区中的带负电荷的氨基酸与在第二抗原结合区中的带负电荷的氨基酸可以相同或不同，例如相同。

在一些实施方案中，在第一抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和/或在第二抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

在一个实施方案中，本发明的三特异性抗体包含两个抗原结合区，其中

在一个抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 D，同时，在另一个抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 K。

- **抗原结合区**

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体包含特异性结合 BCMA 的抗原结合区、特异性结合 CD3 的抗原结合区和特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区。

- **特异性结合 BCMA 的抗原结合区**

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 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，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，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，特异性结合 BCMA 的抗原结合区包含重链可变区（VH）。在一些方面中，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，特异性结合 BCMA 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，HCDR 和 LCDR 通过 Kabat 方案（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中描述的 Kabat 编号系统）确定。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 的抗原结合区的重链可变区 VH

(i)包含与 SEQ ID NO:56 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:56 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:56 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（优选氨基酸取代，更优选氨基酸保守取代）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，特异性结合 BCMA 的抗原结合区的轻链可变区 VL

(i)包含与 SEQ ID NO:60 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:60 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:60 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（优选氨基酸取代，更优选氨基酸保守取代）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，特异性结合 BCMA 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 为如 SEQ ID NO:56 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 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 为如 SEQ ID NO:60 中任一项所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 BCMA 的抗原结合区中，

HCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; HCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; LCDR1 包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; LCDR2 包含 SEQ ID NO:62 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:63 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，特异性结合 BCMA 的抗原结合区包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:56 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:60 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，特异性结合BCMA的抗原结合区包含如SEQ ID NO:56中所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:60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，特异性结合BCMA的抗原结合区包含：如SEQ ID NO:57所示的HCDR1、如SEQ ID NO:58示的HCDR2、如SEQ ID NO:59示的HCDR3；如SEQ ID NO:61示的LCDR1、如SEQ ID NO:62示的LCDR2和如SEQ ID NO:63的LCDR3。

在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合BCMA的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH含有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列，且所述VL含有SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列。在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合BCMA的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH由SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列组成，且所述VL由SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列组成。

在一个实施方案中，特异性结合BCMA的抗原结合区是抗BCMA抗体的抗原结合片段，其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。优选地，特异性结合BCMA的抗原结合区是Fab。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中包含的第一抗原结合区是特异性结合BCMA的Fab片段。在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中包含的特异性结合BCMA的Fab片段来源于抗BCMA抗体。

在一些实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合BCMA的Fab片段包含二硫键重塑突变，例如其在CH1包含F126C，或包含F126C和C220S，且其在CL包含Q124C，或包含Q124C和C214S。

在一些实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合BCMA的Fab片段包含电荷突变，例如其在重链可变区包含Q39K，且在轻链可变区包含Q38D；或其在轻链可变区包含Q38K，且在重链可变区包含Q39D。

适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合BCMA的Fab片段包含二硫键重塑突变和电荷突变，例如其在重链可变区包含Q39K，且在CH1包含F126C，或包含F126C和C220S；且在轻链可变区包含Q38D，且在CL包含Q124C，或包含Q124C和C214S。

适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合BCMA的Fab片段包含二硫键重塑突变和电荷突变，例如其在重链可变区包含Q39D，且在CH1包含F126C，或包含F126C和C220S；且在轻链可变区包含Q38K，且在CL包含Q124C，或包含Q124C和C214S。

在一些实施方案中，适用于本发明三特异性抗体的特异性结合BCMA的Fab包含Fab重链和Fab轻链，所述Fab重链包含重链可变区，所述Fab轻链包含轻链可变区，

其中所述Fab重链的重链可变区

(i) 包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与SEQ ID NO:76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，且包含Q39K突变；和/或

所述Fab轻链的轻链可变区

(i) 包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:75 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，且包含 Q38D 突变。

- **特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区**

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 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，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，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，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含重链可变区（VH）。在一些方面中，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含轻链可变区（VH）。在一些方面中，特异性结合 GPRC5D 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，HCDR 和 LCDR 通过 Kabat 方案（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中描述的 Kabat 编号系统）确定。

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/CN2022/076832 中公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体。在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 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特异性结合 GPRC5D 的抗体的重链可变区和轻链可变区。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区的重链可变区 VH

(i)包含与 SEQ ID NO:40 或 48 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: 40 或 48 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: 40 或 48 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（优选氨基酸取代，更优选氨基酸保守取代）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，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区的轻链可变区 VL

(i)包含与 SEQ ID NO:44 或 52 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: 44 或 52 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: 44 或 52 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（优选氨基酸取代，更优选氨基酸保守取代）

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，特异性结合 GPRC5D 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 为如 SEQ ID NO:40 或 48 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 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 为如 SEQ ID NO:44 或 52 中任一项所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区中，

HCDR1 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:46 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:47 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:54 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:55 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，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:40 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:44 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；或者

所述 VH 含有 SEQ ID NO:48 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:52 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，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO:40 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:44 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，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO:48 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:52 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，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含：如 SEQ ID NO:41 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:42 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:43 示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:45 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:46 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:47 的 LCDR3。在本发明的一些具体实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区包含：如 SEQ ID NO:49 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:50 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:51 示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:53 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:54 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:55 的 LCDR3。

在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合GPRC5D的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH含有SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列，且所述VL含有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列。在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合GPRC5D的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH由SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列组成，且所述VL由SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合GPRC5D的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH含有SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列，且所述VL含有SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列。在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合GPRC5D的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH由SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列组成，且所述VL由SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列组成。

在一个实施方案中，特异性结合GPRC5D的抗原结合区是抗GPRC5D抗体的抗原结合片段，其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。优选地，特异性结合GPRC5D的抗原结合区是Fab。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中包含的第三抗原结合区是特异性结合GPRC5D的Fab片段。在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中包含的特异性结合GPRC5D的Fab片段来源于抗GPRC5D抗体。

在一些实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合GPRC5D的Fab片段包含二硫键重塑突变，例如其在CH1包含F126C，或包含F126C和C220S，且其在CL包含Q124C，或包含Q124C和C214S。

在一些实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合GPRC5D的Fab片段包含电荷突变，例如其在重链可变区包含Q39K，且在轻链可变区包含Q38D；或其在轻链可变区包含Q38K，且在重链可变区包含Q39D。

适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合GPRC5D的Fab片段包含二硫键重塑突变和电荷突变，例如其在重链可变区包含Q39K，且在CH1包含F126C，或包含F126C和C220S；且在轻链可变区包含Q38D，且在CL包含Q124C，或包含Q124C和C214S。

适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合GPRC5D的Fab片段包含二硫键重塑突变和电荷突变，例如其在重链可变区包含Q39D，且在CH1包含F126C，或包含F126C和C220S；且在轻链可变区包含Q38K，且在CL包含Q124C，或包含Q124C和C214S。

在一些实施方案中，适用于本发明三特异性抗体的特异性结合GPRC5D的Fab包含Fab重链和Fab轻链，所述Fab重链包含重链可变区，所述Fab轻链包含轻链可变区，

其中所述Fab重链的重链可变区

(i) 包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与SEQ ID NO:80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，且包含Q39K突变；和/或

所述Fab轻链的轻链可变区

(i) 包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与SEQ ID NO:79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，且包含 Q38D 突变。

- **特异性结合 CD3 的抗原结合区**

在一些实施方案中，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，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，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，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，特异性结合 CD3 的抗原结合区包含轻链可变区（VH）。在一些方面中，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，HCDR 和 LCDR 通过 Kabat 方案（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中描述的 Kabat 编号系统）确定。

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 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特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 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特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些实施方案中，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:64 或 72 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: 64 或 72 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: 64 或 72 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（优选氨基酸取代，更优选氨基酸保守取代）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，特异性结合CD3的抗原结合区的轻链可变区VL

(i)包含与SEQ ID NO:68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:68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:68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（优选氨基酸取代，更优选氨基酸保守取代）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，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为如SEQ ID NO: 64或72中任一项所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3。

在一些实施方案中，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为如SEQ ID NO:68中任一项所示的VL中所含的三个互补决定区域LCDR1、LCDR2和LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合CD3的抗原结合区中，

HCDR1包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; HCDR2包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3包含SEQ ID NO:67或73的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2包含SEQ ID NO:70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:71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，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:64或72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:68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，特异性结合CD3的抗原结合区包含如SEQ ID NO:64或72中所示的VH中所含的三个互补决定区域HCDR1、HCDR2和HCDR3，和如SEQ ID NO:68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，特异性结合CD3的抗原结合区包含: 如SEQ ID NO:65所示的HCDR1、如SEQ ID NO:66示的HCDR2、如SEQ ID NO:67或73示的HCDR3；如SEQ ID NO:69示的LCDR1、如SEQ ID NO:70示的LCDR2和如SEQ ID NO:71的LCDR3。

在本发明的一些具体的实施方案中，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:64或72所示的氨基酸序列，且所述VL含有SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列。在本发明的一些具体的实施方案中，特异性结合CD3的抗原结合区包含VH和VL，其中所述VH由SEQ ID NO:64或72所示的氨基酸序列组成，且所述VL由SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列组成。

在一个实施方案中，特异性结合 CD3 的抗原结合区是抗 CD3 抗体的抗原结合片段，其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。优选地，特异性结合 CD3 的抗原结合区是 Fab。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中包含的第二抗原结合区是特异性结合 CD3 的 Fab 片段。在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体中包含的特异性结合 CD3 的 Fab 片段来源于抗 CD3 抗体。

在一些实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合 CD3 的 Fab 片段包含二硫键重塑突变，例如其在 CH1 包含 F126C，或包含 F126C 和 C220S，且其在 CL 包含 Q124C，或包含 Q124C 和 C214S。

在一些实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合 CD3 的 Fab 片段包含电荷突变，例如其在重链可变区包含 Q39K，且在轻链可变区包含 Q38D；或其在轻链可变区包含 Q38K，且在重链可变区包含 Q39D。

适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合 CD3 的 Fab 片段包含二硫键重塑突变和电荷突变，例如其在重链可变区包含 Q39K，且在 CH1 包含 F126C，或包含 F126C 和 C220S；且在轻链可变区包含 Q38D，且在 CL 包含 Q124C，或包含 Q124C 和 C214S。

适用于本发明的三特异性抗体的特异性结合 CD3 的 Fab 片段包含二硫键重塑突变和电荷突变，例如其在重链可变区包含 Q39D，且在 CH1 包含 F126C，或包含 F126C 和 C220S；且在轻链可变区包含 Q38K，且在 CL 包含 Q124C，或包含 Q124C 和 C214S。

在一些实施方案中，适用于本发明三特异性抗体的特异性结合 CD3 的 Fab 包含 Fab 重链和 Fab 轻链，所述 Fab 重链包含重链可变区，所述 Fab 轻链包含轻链可变区，

其中所述 Fab 重链的重链可变区

(i) 包含 SEQ ID NO:77 或 78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:77 或 78 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，且包含 Q39D 突变；和/或

所述 Fab 轻链的轻链可变区

(i) 包含 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:74 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，且包含 Q38K 突变。

- **适用于本发明三特异性抗体的 Fc 二聚体**

在一个实施方案中，本发明三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 Fc 区和第二 Fc 区不同，其能够二聚化形成异二聚体 Fc 支架。

在一些实施实施方案中，Fc 区涵盖天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然序列 Fc 区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)。在一些实施方案中， Fc 区为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc, 人 IgG2 Fc, 人 IgG3 Fc 或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87 或 88 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，本发明的 Fc 区包含抗体 CH2 和 CH3。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。

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 区可以包含利于第一 Fc 区与第二 Fc 区异二聚化的突变。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 Fc 区的 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 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。

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取代(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取代(Y407V)（hole 突变），任选地 366 位的苏氨酸残基用丝氨酸残基取代(T366S)，和/或第 368 位的亮氨酸残基用丙氨酸残基取代(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，第 366 位的苏氨酸残基用色氨酸残基取代(T366W)且第 354 位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基取代(S354C)或第 356 位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基取代(E356C) (特别是,第 354 位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基取代) ; 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取代(Y407V)（hole 突变），任选地 366 位的苏氨酸残基用丝氨酸残基取代(T366S)且第 368 位的亮氨酸残基用丙氨酸残基取代(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取代(Y349C) (编号方式依照 EU 索引)。

在一个具体的实施方案中，一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366W ,且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366S、L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

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

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的三特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列或由其组成。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的三特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的三特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 T366S、L368A 和 Y407V。

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。

还可以将本发明的结合分子例如抗体中的 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；或进行 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，根据本发明结合分子例如抗体分子的预期用途，本发明结合分子例如抗体分子也可以在 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 Fcγ 受体，特别地是人 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 区包含降低与 Fcγ 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 Fcγ 受体结合的 L234A/L235A 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 Fcγ 受体结合的突变的 Fc 区包含 SEQ ID NO:89 或 90 所示的氨基酸序列或与其具有至少 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: 89 或 90 所示的氨基酸序列具有至少 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。

在一个优选的实施方案中，适用于本发明的三特异性抗体的异二聚 Fc 包含两个 Fc 区，其中

一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列或由其组成，且另一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列或由其组成；或者

一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 L234A/L235A 和 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 L234A/L235A、T366S、L368A 和 Y407V。

- **本发明的三特异性抗体结构和示例性三特异性抗体**

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 BCMA 的第一 Fab、特异性结合 CD3 的 Fab，以及特异性结合 GPRC5D 的 Fab，以及 Fc 异二聚体。

在一些实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含一个特异性结合 BCMA 的第一 Fab、一个特异性结合 CD3 的 Fab，以及一个特异性结合 GPRC5D 的 Fab，以及 Fc 异二

聚体。

在一些优选的实施方案中，本发明的三特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一Fab、特异性结合第二抗原的第二Fab，以及特异性结合第三抗原的第三Fab，以及Fc异二聚体，其中所述第一抗原选自BCMA、CD3和GPRC5D中的一个，第二抗原选自BCMA、CD3和GPRC5D中的一个，第三抗原选自BCMA、CD3和GPRC5D中的一个，且第一抗原、第二抗原和第三抗原不同，其中

（1） 特异性结合第一抗原的第一Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的Fc区之一（第一Fc区，例如包含Knob突变的Fc区或包含hole突变的Fc区）的CH2或铰链区；
特异性结合第二抗原的第二Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的另一Fc区（第二Fc区，例如包含hole突变的Fc区或包含knob的Fc区）的CH2或铰链区，且
特异性结合第三抗原的第三Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至第二Fab的Fab重链的VH的N末端；或者

特异性结合第三抗原的第三Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的Fc区之一（第一Fc区，例如包含Knob突变的Fc区或包含hole突变的Fc区）的CH2或铰链区；
特异性结合第二抗原的第二Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的另一Fc区（第二Fc区，例如包含hole突变的Fc区或包含knob的Fc区）的CH2或铰链区，且
特异性结合第一抗原的第一Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至第二Fab的Fab重链的VH的N末端；

例如如图1A所示的结构；

（2） 特异性结合第一抗原的第一Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的Fc区之一（第一Fc区，例如包含Knob突变的Fc区或包含hole的Fc区）的CH2或铰链区；
特异性结合第二抗原的第二Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的另一Fc区（第二Fc区，例如包含hole突变的Fc区或包含knob的Fc区）的CH2或铰链区，且
特异性结合第三抗原的第三Fab在Fab重链的VH的N末端融合至与第二Fab融合的Fc区的C末端；或者

特异性结合第三抗原的第三Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的Fc区之一（第一Fc区，例如包含Knob突变的Fc区或包含hole的Fc区）的CH2或铰链区；
特异性结合第二抗原的第二Fab在Fab重链的CH1的C末端融合至Fc异二聚体的另一Fc区（第二Fc区，例如包含hole突变的Fc区或包含knob的Fc区）的CH2或铰链区，且
特异性结合第一抗原的第一Fab在Fab重链的VH的N末端融合至与第二Fab融合的Fc区的C末端；

例如如图1B所示的结构。

在一些实施方案中，所述第二抗原为CD3。在一些实施方案中，所述第一抗原和第三抗原分别为GPRC5D或BCMA，或所述第三抗原和第一抗原分别为GPRC5D或BCMA。

在一些实施方案中，所述第一抗原为BCMA，第二抗原为CD3且第三抗原为GPRC5D；或者所述第一抗原为GPRC5D，第二抗原为CD3或者第三抗原为BCMA。

在一些实施方案中，融合包括直接融合或通过接头融合。在一些实施方案中，所述接头是(GGGGS)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。在一些实施方案中，第一 Fc 区包含 knob 突变和 L234A 和 L235A 突变，且第二 Fc 区包含 hole 突变和 L234A 和 L235A 突变。在一些实施方案中，第一 Fc 区包含 hole 突变和 L234A 和 L235A 突变，且第二 Fc 区包含 knob 突变和 L234A 和 L235A 突变。

在一些实施方案中，其中第二 Fab 包含电荷突变。在一些实施方案中，其中第一 Fab 或第三 Fab 中的一个或两个包含电荷突变和二硫键重塑突变。

在一些实施方案中，其中第二 Fab 包含电荷突变，且第一或第三 Fab 之一包含电荷突变和二硫键重塑突变。在一些实施方案中，包含电荷突变的两个 Fab 中分别包含相反的电荷突变。

在一些实施方案中，第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38K 突变，且在 Fab 重链包含 Q39D 突变。在一些实施方案中，第一或第三 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变，其在 Fab 重链包含 Q39K 和 F126C 突变，且在 Fab 轻链包含 Q38D 和 Q124C 突变。在一些实施方案中，第一或第三 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变，其在 Fab 重链包含 Q39K、F126C 和 C220S 突变，且在 Fab 轻链包含 Q38D、Q124C 和 C214S 突变。

在一些实施方案中，第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38D 突变，且在 Fab 重链包含 Q39K 突变。在一些实施方案中，第一或第三 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变，其在 Fab 重链包含 Q39D 和 F126C 突变，且在 Fab 轻链包含 Q38K 和 Q124C 突变。在一些实施方案中，第一或第三 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变，其在 Fab 重链包含 Q39D、F126C 和 C220S 突变，且在 Fab 轻链包含 Q38K、Q124C 和 C214S 突变。

在一些实施方案中，包含电荷突变和二硫键重塑突变的第一或第三 Fab 与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合。

在一些具体的实施方案中，本发明的三特性抗体是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成：

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 4#，以及

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第一和第二 Fab，例如如图 1A 所示。

在一些具体的实施方案中，肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，肽链 1#包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:15 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 2#包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:14 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，本发明的三特性抗体是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#,

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 2#,

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#,

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第一 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第三和第二 Fab，例如如图 1A 所示。

在一些具体的实施方案中，肽链 1#包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:11 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:10 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:9 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:8 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，或由所述氨基酸序列组成；以及

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，本发明的三特性抗体是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域，特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 重链的肽链 3#，

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第二和第一 Fab，例如如图 1B 所示。

在一些具体的实施方案中，肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:7 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成。

II 多特异性抗体生产和纯化

在一个实施方案中，本发明提供制备本发明抗体分子或其片段或其链的方法，其中所述方法包括在适于表达编码本发明抗体分子或其片段或其链的核酸的条件下培养所述宿主细胞，以及任选地分离所述抗体或其片段或其链。在某个实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞回收本发明抗体分子或其片段或其链。

可以将编码本发明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。

如本文所述制备的抗体分子可以通过已知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、大小排阻层析等纯化。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。

III 免疫缀合物

在一些实施方案中，本发明提供了免疫缀合物，其包含本文中提供的任何抗体和其它物质，例如治疗剂或标记。在一些实施方案中，治疗剂可以是适合与抗体形成免疫缀合物的治疗剂。在一些实施方案中，所述治疗剂选自以下类别(i)-(iii)任一类别的治疗剂：(i)增强抗原呈递(例如，肿瘤抗原呈递)的药物；(ii)增强效应细胞反应(例如，B 细胞和/或 T 细胞活化和/或动员)的药物；(iii)减少免疫抑制的药物；(iv)具有抑制肿瘤作用的药物。在一些实施方案中，所示治疗剂是化疗剂。

在一些实施方案中，免疫缀合物是抗体药物偶联物（ADC）。

IV 核酸和宿主细胞

本发明提供编码本发明的多特异性抗体例如三特异性抗体的任一条链或任何单体或结构域或抗原结合区的核酸。可以采用本领域熟知的方法，产生编码各条链的多核苷酸序列。此外，本发明的多核苷酸和核酸可以包含编码分泌信号肽的区段，并与编码本发明多特异性抗体例如三特异性抗体中的抗体或蛋白可操作连接，从而可以指导本发明多特异性抗体例如三特异性抗体以及其各条链的分泌性表达。

本发明也提供包含本发明核酸的载体。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)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是 pCNDA 载体，例如 pCDNA3.1 表达载体。

本发明也提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。适用于复制并支持本发明多特异性抗体例如三特异性抗体表达的宿主细胞是本领域中公知的。可以用特定的表达载体转染或转导这类细胞，并且可以生长大量的含载体细胞以用于接种大规模发酵罐，从而获得充足量的多特异性抗体例如三特异性抗体用于临床应用。

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 细胞或 293 细胞，例如 Expi293 细胞或 HEK293 细胞)。可用的哺乳动物宿主细胞系的例子是由 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚胎肾系(293 或 293T 细胞，如记载于 Graham 等,JGenVirol36,59(1977))、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4 细胞，如例如记载于 Mather,BiolReprod23,243-251(1980))、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)，buffalo 大鼠肝细胞(BRL3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(HepG2)、小鼠乳房肿瘤细胞(MMT060562)、TRI 细胞(如例如记载于 Mather 等,AnnalsN.Y.AcadSci383,44-68(1982))、MRC5 细胞和 FS4 细胞。其它可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(Urlaub 等,ProcNatlAcadSciUSA77,4216(1980))；和骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0。在一个实施方案中，宿主细胞是真核生物细胞，优选为哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞或淋巴细胞(例如 Y0、NS0、Sp20 细胞)。

V. 药物组合物、药物组合和试剂盒

在一个方面，本发明提供了组合物或药物或制剂，例如，药物组合物，其包含本发明的三特异性抗体分子，以及任选地药用辅料。在一些实施方案中，药用辅料是可药用载体。

本发明的组合物可以处于多种形式。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，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、分散体剂或混悬剂、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。常见的优选组合物处于可注射用溶液剂或可输注溶液剂形式。优选的施用模式是肠胃外注射或输注。如本文所用的短语“肠胃外施用“和“肠胃外方式施用”意指除了肠施用和局部施用之外的施用模式，通常通过注射施用，并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、皮内、腹腔、经气管、皮下注射和输注。

在一个优选实施方案中，通过静脉内输注或注射施用抗体分子。在另一个优选实施方案中，通过肌内、腹腔或皮下注射施用抗体分子。

在一些实施方案中，本发明抗体分子是药物组合物中的唯一活性成分。在另一些实施方案中，药物组合物可以包含本文所述的抗体分子与一种或多种其它治疗剂。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述抗体分子。

包含本文所述抗体分子的药盒也处于本发明的范围内。药盒可以包含一个或多个其他要素，例如包括：使用说明书；其他试剂，例如标记物或用于偶联的试剂；可药用载体；和用于施用至受试者的装置或其他材料。

在另一方面，本发明也提供包含本文所述的抗体分子与一种或多种其它治疗剂的药物组合或药物组合产品。

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:

- 含有包含本发明的三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。

适用于本发明的药物组合物和药物组合中的其它治疗剂可以为选自以下类别(i)-(iii)任一类别的治疗剂：(i)增强抗原呈递(例如，肿瘤抗原呈递)的药物；(ii)增强效应细胞反应(例如，B 细胞和/或 T 细胞活化和/或动员)的药物； (iii)减少免疫抑制的药物；(iv)具有抑制肿瘤作用的药物。在一些实施方案中，所述其它治疗剂是化疗剂。

VI.本发明分子的用途和方法

在一个方面，本发明提供了本发明抗体分子的体内、体外用途和应用方法。

在一些实施方案中，本发明的用途和方法涉及将本发明抗体分子在体内和/或体外应用于：

-以高亲和力，结合 GPRC5D 抗原，包括细胞表面表达 GPRC5D 抗原；

-使 T 细胞(例如 CD4+和/或 CD8+ T 细胞)靶向表面表达 GPRC5D 的细胞，尤其是 GPRC5D 阳性肿瘤细胞；

-使 T 细胞 (例如 CD4+和/或 CD8+ T 细胞) 靶向表面表达 BCMA 的细胞，尤其是 BCMA 阳性肿瘤细胞；

-激活 T 细胞的 CD3 下游信号通路；

-介导 T 细胞对 GPRC5D 阳性肿瘤细胞和/或 BCMA 阳性肿瘤细胞的杀伤作用；

-诱导 T 细胞释放细胞因子，例如 TNF-α，IFN-γ，和 IL-2；

-抑制或杀伤 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性肿瘤细胞，或

-治疗 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性肿瘤，例如多发性骨髓瘤，例如治疗 BCMA 阳性患者群、GPRC5D 阳性患者群，或在抗 BCMA 分子结合后 BCMA 丢失的 GPRC5D 阳性患者群；

-用于避免由 BCMA 逃逸介导的肿瘤复发，例如多发性骨髓瘤复发。

在一些实施方案中，本发明提供了在受试者中预防或治疗 GPRC5D 和/或 BCMA 相关疾病的方法，包括向受试者施用本发明的三特异性抗体，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用于上述用途的方法，包括向受试者施用本发明的三特异性抗体，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，所述癌症是 GPRC5D 单阳性癌症、BCMA 单阳性癌症、GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症或 BCMA 和 GPRC5D 双低表达癌症，例如 GPRC5D 低表达且/或 BCMA 低表达癌症 (例如抗 BCMA 治疗或抗 GPRC5D 治疗后复发的癌症)。在一些实施方案中，癌症可以是实体肿瘤或血液肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症是多发性骨髓瘤。

由于具有针对 BCMA 和 GRPC5D 的抗原结合特异性，本发明的三特异性抗体分子可以比靶向 BCMA 和 CD3 双特异性抗体和靶向 GPRC5D 和 CD3 的双特异性抗体具有更宽的治疗癌症患者群体。在一些实施方案中，本发明提供应用本发明的三特异性抗体分子治疗 GPRC5D 单阳性癌症。在一些实施方案中，本发明提供应用本发明的三特异性抗体分子治疗 BCMA 单阳性癌症。在一些实施方案中，本发明提供应用本发明的三特异性抗体分子治疗 GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症。在一些实施方案中，本发明还提供应用本发明的三特异性抗体分子治疗 BCMA 和/或 GPCR5D 低表达癌症的方法，例如 GRPC5D 低表达且/或 BCMA 低表达癌症或

BCMA 和 GPRC5D 双低表达癌症(例如抗 BCMA 治疗和/或抗 GPRC5D 治疗后复发的癌症)。

本发明所述的“GPRC5D 单阳性癌症”是指癌症细胞中仅具有 GPRC5D 表达，或仅 GPRC5D 表达在癌症细胞中比健康细胞（例如健康受试者的相同组织细胞或癌症细胞临近的健康细胞）中升高(即过表达)。本发明所述的“GPRC5D 低表达癌症”是指癌症细胞中 GPRC5D 的表达较低，例如比正常组织健康细胞中的表达水平稍高。

本发明所述的 “BCMA 单阳性癌症” 是指癌症细胞中仅具有 BCMA 表达，或仅 BCMA 表达在癌症细胞中比健康细胞(例如健康受试者的相同组织细胞或癌症细胞临近的健康细胞) 中升高(即过表达)。本发明所述的“BCMA 低表达癌症”是指癌症细胞中 BCMA 的表达较低，例如比正常组织健康细胞中的表达水平稍高。

本发明所述的“GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症”是指癌症细胞中具有 GPRC5D 和 BCMA 表达，或 GPRC5D 和 BCMA 表达在癌症细胞中比健康细胞（例如健康受试者的相同组织细胞或癌症细胞临近的健康细胞）中升高。“GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症”还涵盖具有 BCMA 表达和 GPRC5D 表达但是二者或其中之一表达较低的癌症，例如 BCMA 和/或 GPCR5D 低表达癌症，例如 GRPC5D 低表达且/或 BCMA 低表达癌症或 BCMA 和/或 GPRC5D 双低表达癌症（例如抗 BCMA 治疗和/或抗 GPRC5D 治疗后复发的癌症）。

当本文中提及 “BCMA 阳性” 时，其不仅涵盖野生型 BCMA 表达的情况，还涵盖 BCMA 变体表达的情况。BCMA 变体可以是因突变例如缺失或氨基酸取代而获得的变体。在一些实施方案中，BCMA 突变导致个体对靶向 BCMA 的免疫疗法的耐药性。因此，本发明的 “BCMA 阳性癌症” 还涵盖癌症细胞中具有 BCMA 变体表达，或 BCMA 变体表达在癌症细胞中比健康细胞（例如健康受试者的相同组织细胞或癌症细胞临近的健康细胞）中升高(即过表达)的癌症。

在一些实施方案中，BCMA 变体包含以下一种或多种或全部突变:

(i) 第 34 位脯氨酸 P 缺失（P34del）;

(ii)第 30 位丝氨酸 S 缺失（S30del）;

(iii) 第 39 位氨基酸取代，例如精氨酸 R 取代为丙氨酸 A（R39A）;

(iv)第 27 位氨基酸取代，例如精氨酸 R 取代为脯氨酸 P（R27P）。

在一些实施方案中，本发明提供了抑制或杀伤 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性细胞的方法。

在一些实施方案中，所述 GPRC5D 阳性细胞是在细胞中具有 GPRC5D 表达或过表达的细胞。在一些实施方案中，所述 BCMA 阳性细胞是在细胞中具有 BCMA 表达或过表达的细胞。

在一些实施方案中，所述 BCMA 阳性细胞中的 BCMA 变体包含以下一种或多种或全部突变:

(i) 第 34 位脯氨酸 P 缺失（P34del）;

(ii)第 30 位丝氨酸 S 缺失（S30del）;

(iii) 第 39 位氨基酸取代，例如精氨酸 R 取代为丙氨酸 A（R39A）;

(iv)第 27 位氨基酸取代，例如精氨酸 R 取代为脯氨酸 P（R27P）。

在一些实施方案中，本发明的具有 BCMA 变体表达或过表达的 BCMA 阳性细胞对靶向 BCMA 的免疫疗法（例如 Elranatamab 或 Teclistamab 治疗）具有耐药性。在一些实施方案中，本发明的具有 BCMA 变体表达或过表达的 BCMA 阳性细胞对靶向 BCMA 和 GPRC5D 的免疫疗法具有耐药性。

在一些实施方案中，本发明的具有 BCMA 变体表达或过表达的 BCMA 阳性细胞中，BCMA 具有 P34del、S30del、R39A 或 R27P 突变。在一些实施方案中，本发明的具有 BCMA 变体表达或过表达的 BCMA 阳性细胞中，具有 P34del、S30del、R39A 或 R27P 突变的 BCMA 有表达，或者其表达比健康细胞（例如健康受试者的相同组织细胞或癌症细胞临近的健康细胞）中升高(即过表达)。

在一些实施方案中，本发明的具有 BCMA 变体表达或过表达的 BCMA 阳性细胞中具有含 P34del 或 R27P 突变的 BCMA 变体的表达或过表达，且对 Elranatamab 具有耐药性。

在一些实施方案中，本发明的具有 BCMA 变体表达或过表达的 BCMA 阳性细胞中具有含 P34del、S30del、R39A 或 R27P 突变的 BCMA 变体的表达或过表达且对 Teclistamab 具有耐药性。

在一些实施方案中，本发明抗体分子或包含本发明抗体分子的药物组合物用作在个体中治疗和／或预防 GRPC5D 和/或 BCMA 相关疾病或用于杀伤或抑制 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性细胞的药物或用作 GRPC5D 和/或 BCMA 相关疾病的诊断工具，优选地，所述个体是哺乳动物，更优选地是人。

在其他方面，本发明提供本发明的三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或用于杀伤或抑制 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性细胞。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体(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或用于杀伤或抑制 GPRC5D 阳性和/或 BCMA 阳性细胞。

在一些实施方案中，所述治疗方式例如手术或放疗。

在一个方面，本发明提供了体外或体内检测生物样品，例如血清、精液或尿或组织活检样品(例如，来自过度增生性或癌性病灶)中存在相关抗原的诊断方法。该诊断方法包括：(i)在允许相互作用发生的条件下使样品(和任选地，对照样品)与如本文所述的抗体分子接触或向受试者施用所述抗体分子和(ii)检测所述抗体分子和样品(和任选地，对照样品)之间复合物的形成。复合物的形成表示存在相关抗原，并且可以显示本文所述治疗和／或预防的适用性或需求。

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相关抗原，例如 GRPC5D 和/或 BCMA。可以使用的检测方法包括免疫组织化学、免疫细胞化学、FACS、ELISA 测定、PCR 技术(例如，RT-PCR)或体内成像技术。一般地，体内和体外检测方法中所用的抗体分子直接或间接地用可检测物质标记以促进检测结合的或未

结合的结合物。合适的可检测物质包括多种生物学活性酶、辅基、荧光物质、发光物质、顺磁(例如，核磁共振活性)物质和放射性物质。

在一些实施方案中，体内确定相关抗原例如 GRPC5D 和/或 BCMA 的水平和/或分布，例如，以非侵入方式确定(例如，通过使用合适的成像技术(例如，正电子发射断层摄影术(PET)扫描)检测可检测物标记的本发明抗体分子。在一个实施方案中，例如，通过检测用 PET 试剂(例如，18F-氟脱氧葡萄糖(FDG))以可检测方式标记的本发明抗体分子，体内测定相关抗原的水平和/或分布。

在一个实施方案中，本发明提供了包含本文所述抗体分子和使用说明书的诊断试剂盒。

VII. 具体实施方案

在本发明的一个方面，本发明涉及以下具体的实施方案:

1、特异性结合 BCMA 的三特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区，以及特异性结合其他抗原的第二和第三抗原结合区。

2、实施方案 1 的三特异性抗体，其中所述第二抗原结合区特异性结合 CD3，和/或第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

3、实施方案 1 或 2 的三特异性抗体，其中所述第一抗原结合区、第二抗原结合区和第三抗原结合区分别为第一 Fab、第二 Fab 和第三 Fab。

4、实施方案 3 的三特异性抗体，其中

(1)第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区;第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 Fab 重链的 VH 的 N 末端;

或者

第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区;第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 Fab 重链的 VH 的 N 末端;

或者

(2)第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区;第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第三 Fab 在 Fab 重链的 VH 的 N 末端融合至与第二 Fab 融合的 Fc 区的 C 末端; 或者

第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区;第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第一 Fab 在 Fab 重链的 VH 的 N 末端融合至与第二 Fab 融合的 Fc 区的 C 末端。

5、实施方案 4 的三特异性抗体，其中融合包括直接融合或通过接头融合。

6、实施方案 5 的三特异性抗体，其中所述接头是(GGGGS) n，其中 n=1、2、3 或 4。

7、实施方案 3-6 中任一项的三特异性抗体，其中第二 Fab 包含电荷突变，且与第二 Fab 融合或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变。

8、实施方案 7 的三特异性抗体，其中所述电荷突变为在 Fab 的 VH 的第 39 位突变为 D 或 K，且在 Fab 的 VL 的 38 位突变为 K 或 D，例如

所述第二 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K，且

所述与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者

所述第二 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，且所述 VL 包含 38D，且

所述与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39D，所述 VL 包含 38K。

9、实施方案 7 或 8 的三特异性抗体，其中所述二硫键重塑突变为在 Fab 的 CH1 包含 F126C 且在 Fab 的 CL 包含 Q124C。

10、实施方案 9 的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1

(i)包含与 SEQ ID NO:85 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，且包含 F126C;或

(ii) 包含 SEQ ID NO:85 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

11、实施方案 9 或 10 的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的 Fab 包含 CL，其中所述 CL

(i)包含与 SEQ ID NO:97 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，且包含 Q124C;或

(ii) 包含 SEQ ID NO:97 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

12、实施方案 9 的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的 Fab 包含 CH1 和 CL，其中所述 CH1 包含 SEQ ID NO:85 所示的氨基酸序列或由所述序列组成，且所述 CL 包含 SEQ ID NO:97 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

13、实施方案 7 或 8 的三特异性抗体，其中所述二硫键重塑突变为在 Fab 的 CH1 包含 F126C 和 C220S 且在 Fab 的 CL 包含 Q124C 和 C214S。

14、实施方案 13 的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1

(i)包含与 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，且包含 F126C 和 C220S;或

(ii) 包含 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

15、实施方案 13 或 14 的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的 Fab 包含 CL，其中所述 CL

(i)包含与 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，且包含 Q124C 和 C214S;或

(ii) 包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

16、实施方案 13 的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的 Fab 包含 CH1 和 CL，其中所述 CH1 包含 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列或由所述序列组成，且所述 CL 包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

17、实施方案 1-16 中任一项的三特异性抗体，其中所述三特异性抗体包含第一 Fc 区和第二 Fc 区，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区相同或不同。

18、实施方案 17 的三特异性抗体，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区分别为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，人 IgG3 Fc，或人 IgG4 Fc，例如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87 或 88 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。

19、实施方案 18 的三特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变。

20、实施方案 19 的三特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89 或 90；或包含 SEQ ID NO: 89 或 90 所示的氨基酸序列具有至少 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氨基酸取代 L234A/L235A。

21、实施方案 17-20 中任一项的三特异性抗体，其中所述第一和第二 Fc 区之一包含 Knob 突变，另一包含 Hole 突变。

22、实施方案 21 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366W，且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366S、L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

23、实施方案 22 的三特异性抗体，其中一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

24、实施方案 23 的三特异性抗体，其中一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列或由其组成。

25、实施方案 17 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区包含氨基酸取代 L234A/L235A 和 T366W ,且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 L234A/L235A 和 T366S ,L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

26、实施方案 25 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

27、实施方案 26 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列或由其组成。

28、实施方案 1-27 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2

和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:63 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

29、实施方案 28 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VH 含有 SEQ ID NO:56 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。

30、实施方案 28 或 29 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VL 含有 SEQ ID NO:60 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。

31、实施方案 30 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列组成，且所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VL 由 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列组成。

32、实施方案 28 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K

例如，

所述第一抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:76 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:76 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，且包含 Q39K 突变；

和/或所述第一抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:75 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，且包含 Q38D 突变。

33、实施方案 1-32 中任一项的三特异性抗体，其中所述第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D，且包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ

ID NO:50 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

34、实施方案 33 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VH 含有

(i)SEQ ID NO:40 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；或

(ii) SEQ ID NO:48 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。

35、实施方案 33 或 34 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VL 含有

(i)SEQ ID NO:44 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；或

(ii) SEQ ID NO:52 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。

36、实施方案 35 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列组成，且所述 VL 由 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列组成；或者所述 VH 由 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列组成，且所述 VL 由 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列组成。

37、实施方案 33-36 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K，例如

所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:80 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，且包含 Q39K 突变；

且所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:79 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:79 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，且包含 Q38D 突变。

38、实施方案 1-37 中任一项的三特异性抗体，其中第二抗原结合区特异性结合 CD3 且包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ

ID NO:66 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:67 或 73 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

39、实施方案 38 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VH 含有 SEQ ID NO:64 或 72 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。

40、实施方案 38 或 39 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VL 含有 SEQ ID NO:68 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。

41、实施方案 40 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:64 或 72 所示的氨基酸序列组成，且所述第二抗原结合区的 VL 由 SEQ ID NO:68 所示的氨基酸序列组成。

42、实施方案 38-41 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K。

43、实施方案 42 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:77 或 78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO: 77 或 78 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，且包含 Q39D 突变；

且所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:74 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，且包含 Q38K 突变。

44、实施方案 3-43 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成:

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#,

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#,

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#,

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第一和第二 Fab。

45、实施方案 44 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

46、实施方案 44 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:15 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:14 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

47、实施方案 1-43 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第一 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第三和第二 Fab。

48、实施方案 47 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:11 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:10 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:9 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:8 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

49、实施方案 1-43 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域，特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 重链的肽链 3#，

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第二和第一 Fab。

50、实施方案 49 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 3#包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:7 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 4#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成; 和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成。

51、核酸分子，其编码实施方案 1-50 中任一项的三特异性抗体的任一条链，或由所述核酸序列组成。

52、表达载体，其包含实施方案 51 的核酸分子，例如所述表达载体是 pCNDA 载体，例如 pCDNA3.1 表达载体。

53、宿主细胞，其包含实施方案 51 所述的核酸分子或实施方案 52 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 HEK293 细胞。

54、制备实施方案 1-50 中任一项的三特异性抗体的方法，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 51 所述的核酸分子或实施方案 52 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。

55、免疫缀合物，其包含实施方案 1-50 中任一项的三特异性抗体。

56、药物组合物或药物或制剂，其包含实施方案 1-50 中任一项的三特异性抗体，或实施方案 55 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

57、药物组合，其包含实施方案 1-50 中任一项的三特异性抗体，或实施方案 55 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂。

58、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 1-50 中任一项的三特异性抗体，或实施方案 55 的免疫缀合物，或实施方案 56 的药物组合物或制剂;或实施方案 57 的药物组合。

59、实施方案 58 的方法，其中所述癌症是 GPRC5D 单阳性癌症、BCMA 单阳性癌症、GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症或 BCMA 和 GPCR5D 双低表达癌症，例如 GRPC5D 低表达且/或 BCMA 低表达癌症（例如抗 BCMA 治疗或抗 GPRC5D 治疗后复发的癌症）。

60、实施方案 58 或 59 的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如所述癌症是多发性骨髓瘤。

61、实施方案 58-60 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）组合施用。

在本发明的一个方面，本发明还涉及以下具体的实施方案：

1、一种特异性结合 GPRC5D 的三特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区、第二抗原结合区和第三抗原结合区，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:62 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:63 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

优选地，所述第二抗原结合区特异性结合区 CD3 和/或所述第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

2、实施方案 1 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VH 含有 SEQ ID NO:56 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。

3、实施方案 1 或 2 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VL 含有 SEQ ID NO:60 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。

4、实施方案 1 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列组成，且所述第一抗原结合区的 VL 由 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列组成。

5、实施方案 1-4 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K。

6、实施方案 5 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:76 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:76 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，且包含 Q39K 突变；

且所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:75 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，且包含 Q38D 突变。

7、实施方案 1-6 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区是 Fab。

8、实施方案 1-7 中任一项的三特异性抗体，其中特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:46 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:47 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:54 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:55 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

9、实施方案 8 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VH 含有

(i)SEQ ID NO:40 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；或

(ii) SEQ ID NO:48 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。

10、实施方案 8 或 9 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VL 含有

(i)SEQ ID NO:44 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；或

(ii) SEQ ID NO:52 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。

11、实施方案 8 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列组成，且所述 VL 由 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列组成；或者所述 VH 由 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列组成，且所述 VL 由 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列组成。

12、实施方案 1-11 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K。

13、实施方案 12 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:80 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，且包含 Q39K 突变；

且所述第三抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:79 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:79 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，且包含 Q38D 突变。

14、实施方案 1-13 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区是 Fab。

15、实施方案 1-14 中任一项的三特异性抗体，其中特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:66 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:67 或 73 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 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:71 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

16、实施方案 15 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VH 含有 SEQ ID NO:64 或 72 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。

17、实施方案 15 或 16 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VL 含有 SEQ ID NO:68 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。

18、实施方案 15 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:64 或 72 所示的氨基酸序列组成，且所述第二抗原结合区的 VL 由 SEQ ID NO:68 所示的氨基酸序列组成。

19、实施方案 15-18 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K。

20、实施方案 19 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:77 或 78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO: 77 或 78 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，且包含 Q39D 突变；

且所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:74 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，且包含Q38K突变。

21、实施方案1-20中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合CD3的第二抗原结合区是Fab。

22、实施方案1-21中任一项的三特异性抗体，其中所述第一抗原结合区、第二抗原结合区和第三抗原结合区分别为第一Fab、第二Fab和第三Fab。

23、实施方案22的三特异性抗体，其中所述第一Fab或第三Fab还包含二硫键重塑突变。

24、实施方案23的三特异性抗体，其中所述二硫键重塑突变为在Fab的CH1包含F126C且在Fab的CL包含Q124C。

25、实施方案24的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1，其中所述CH1

(i)包含与SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含F126C;或

(ii) 包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

26、实施方案24或25的的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CL，其中所述CL

(i)包含与SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含Q124C;或

(ii) 包含SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

27、实施方案24的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1和CL，其中所述CH1包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列或由所述序列组成，且所述CL包含SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

28、实施方案24的三特异性抗体，其中所述二硫键重塑突变为在Fab的CH1包含F126C和C220S且在Fab的CL包含Q124C和C214S。

29、实施方案28的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1，其中所述CH1

(i)包含与SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含F126C和C220S;或

(ii) 包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

30、实施方案28或29的的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CL，其中所述CL

(i)包含与SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含Q124C;或

(ii) 包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

31、实施方案28的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1和CL，

其中所述 CH1 包含 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列或由所述序列组成，且所述 CL 包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

32、实施方案 1-31 中任一项的三特异性抗体，其中所述三特异性抗体包含第一 Fc 区和第二 Fc 区，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区相同或不同。

33、实施方案 32 的三特异性抗体，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区分别为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，人 IgG3 Fc，或人 IgG4 Fc，例如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87 或 88 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。

34、实施方案 33 的三特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变。

35、实施方案 34 的三特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89 或 90；或包含 SEQ ID NO: 89 或 90 所示的氨基酸序列具有至少 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氨基酸取代 L234A/L235A。

36、实施方案 32-35 中任一项的三特异性抗体，其中所述第一和第二 Fc 区之一包含 Knob 突变，另一包含 Hole 突变。

37、实施方案 36 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366W ，且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366S ，L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

38、实施方案 37 的三特异性抗体，其中一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

39、实施方案 32 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区包含氨基酸取代 L234A/L235A 和 T366W ，且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 L234A/L235A 和 T366S ，L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

40、实施方案 39 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

41、实施方案 1-40 中任一项的三特异性抗体，其中所述第一抗原结合区、第二抗原结合区和第三抗原结合区分别为第一 Fab、第二 Fab 和第三 Fab，且其中

(1)第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 Fab 重链的 VH 的 N 末端；

或者

第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 Fab 重链的 VH 的 N 末端；

或者

(2)第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第三 Fab 在 Fab 重链的 VH 的 N 末端融合至与第二 Fab 融合的 Fc 区的 C 末端；或者

第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第一 Fab 在 Fab 重链的 VH 的 N 末端融合至与第二 Fab 融合的 Fc 区的 C 末端。

42、实施方案 41 的三特异性抗体，其中融合包括直接融合或通过接头融合。

43、实施方案 42 的三特异性抗体，其中所述接头是(GGGGS) n，其中 n=1、2、3 或 4。

44、实施方案 41-43 中任一项的三特异性抗体，其中第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38K 或 Q38D 突变，且在 Fab 重链包含 Q39D 或 Q39K 突变。

45、实施方案 41-44 中任一项的三特异性抗体，其中与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 中，其中 Fab 重链包含 Q39K 或 Q39D 和 F126C 突变，且 Fab 轻链包含 Q38D 或 Q38K 和 Q124C 突变；或者

与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 中，其中 Fab 重链包含 Q39K 或 Q39D 和 F126C 突变和 C220S，且 Fab 轻链包含 Q38D 或 Q38K 和 Q124C 突变和 C214S。

46、实施方案 41-43 中任一项的三特异性抗体，其中

第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38K 突变，且在 Fab 重链包含 Q39D 突变；且与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 中，其中 Fab 重链包含 Q39K 和 F126C 突变，且 Fab 轻链包含 Q38D 和 Q124C 突变；或者

第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38K 突变，且在 Fab 重链包含 Q39D 突变；且与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 中，其中 Fab 重链包含 Q39K 和 F126C 突变和 C220S，且 Fab 轻链包含 Q38D 和 Q124C 突变和 C214S；或者

第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38D 突变，且在 Fab 重链包含 Q39K 突变；且与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 中，其中 Fab 重链包含 Q39D 和 F126C 突变，且 Fab 轻链包含 Q38K 和 Q124C 突变；或者

第二 Fab 包含电荷突变，其在 Fab 轻链包含 Q38D 突变，且在 Fab 重链包含 Q39K 突变；且与第二 Fab 融合，或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 中，其中 Fab 重链包含 Q39D 和 F126C 突变和 C220S，且 Fab 轻链包含 Q38K 和 Q124C 突变和 C214S。

47、实施方案 1-46 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成：

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第一和第二 Fab。

48、实施方案 47 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

49、实施方案 47 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:15 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:14 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

50、实施方案 1-46 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第一 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第三和第二 Fab。

51、实施方案 50 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:11 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:10 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:9 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:8 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

52、实施方案 1-46 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域，特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 重链的肽链 3#，

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第二和第一 Fab。

53、实施方案 52 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:7 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成。

54、核酸分子，其编码实施方案 1-53 中任一项的三特异性抗体的任一条链，或由所述核酸序列组成。

55、表达载体，其包含实施方案 54 的核酸分子，例如所述表达载体是 pCNDA 载体，例如 pCDNA3.1 表达载体。

56、宿主细胞，其包含实施方案 54 所述的核酸分子或实施方案 52 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 HEK293 细胞。

57、制备实施方案 1-53 中任一项的三特异性抗体的方法，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 54 所述的核酸分子或实施方案 55 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。

58、免疫缀合物，其包含实施方案 1-53 中任一项的三特异性抗体。

59、药物组合物或药物或制剂，其包含实施方案 1-53 中任一项的三特异性抗体，或实施方案 58 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

60、药物组合，其包含实施方案 1-53 中任一项的三特异性抗体，或实施方案 55 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂。

61、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 1-53 中任

一项的三特异性抗体，或实施方案 58 的免疫缀合物，或实施方案 59 的药物组合物或制剂；或实施方案 57 的药物组合。

62、实施方案 61 的方法，其中所述癌症是 GPRC5D 单阳性癌症、BCMA 单阳性癌症、GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症或 BCMA 和 GPCR5D 双低表达癌症，例如 GRPC5D 低表达且/或 BCMA 低表达癌症（例如抗 BCMA 治疗或抗 GPRC5D 治疗后复发的癌症）。

63、实施方案 61 或 62 的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如所述癌症是多发性骨髓瘤。

64、实施方案 58-60 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）组合施用。

应当理解，本发明还涵盖本文所述的任何技术特征的任意组合，或任何技术方案的任意组合。

实施例

实施例 1. 三特异性抗体(Ts)的分子结构设计和构建

示例抗体为同时靶向 GPRC5D，BCMA 和 CD3 的 T 细胞衔接器（T-cell engager）类多特异性抗体，其可同时结合多发性骨髓瘤细胞（Multiple Myeloma, MM）表面的两类肿瘤相关抗原（即 GPRC5D 和 BCMA）以及 T 细胞表面的 CD3 受体。以 2 个不同亲和力的抗 GPRC5D 抗体（hz7F5.3，hz5E12.1.P1）、1 个抗 BCMA 抗体（ADI-38497）和 2 个不同亲和力的抗 CD3 抗体(hzsp34.24, hzsp34.87)为基础，设计了同时靶向 GPRC5D、BCMA 和 CD3 的且包含二硫键重塑突变和电荷突变的多特异性抗体。上述三种抗体的可变区和 CDR 序列的序列编号和具体序列见序列信息。

具体地，本发明设计了如图 1 和表 1 所述的 1+1+1 结构（B3，B3b，B5）的 6 个示例抗体，并获得了比双特异性抗体更优的效能。进一步，示例抗体设计利用特定的突变技术（二硫键重塑突变和电荷突变，具体突变信息见序列信息表）解决了非 BCMA 和 CD3 Fab 的轻链错配，且 Fc 部分用“结入扣”（knob-in-hole）技术解决了非对称 IgG 样双特异性抗体的重链错配，其中 Fc 为 IgG1 的重链恒定区且引入减弱效应子功能（effector function）的 L234A，L235A（ “EU”编号）氨基酸突变。

上述 6 个示例抗体的设计结构见图 1 和表 1。

表 1 示例抗体的片段编号和描述

	示例抗体	结构
第 1 示例抗体	B3(24)	B3
第 2 示例抗体	B3(87)	B3
第 3 示例抗体	B5(87)	B5
第 4 示例抗体	B3b (87)	B3b
第 5 示例抗体	B3-7F5.3 (87)	B3
第 6 示例抗体	B3-7F5.3 (24)	B3

上述 6 个示例抗体的结构为 B3、B3b 和 B5 形式。

B3 形式（具体信息例如链#参见图 1A）由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成:

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第一和第二 Fab，例如如图 1A-Format B3 所示。

B3b 形式(具体信息例如链#参见图 1A)由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#，

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第一 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第三和第二 Fab，例如如图 1A-Format B3b 所示。

B5 形式（具体信息例如链#参见图 1B）由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域，特异性结合 BCMA 的抗原结合

区的 Fab 重链的肽链 3#,

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第二和第一 Fab，例如如图 1B 所示。

同时，本专利表达纯化了以下的双或者三特异性抗体:

Inno-B（对照 Hel/BCMA/CD3, Hel 为鸡蛋溶菌酶抗体，不与任何人相关蛋白结合，用于对照），Inno-G（对照 Hel/GPRC5D/CD3），F2 (24) (GPRC5D/BCMA/CD3，结构来源于 WO2022174813A1 （BCMA 抗原结合区为 scFv）), F2 (87) (GPRC5D/BCMA/CD3，结构来源于 WO2022174813A1 （BCMA 抗原结合区为 scFv）)， JNJ-BCMA/CD3（BCMA/CD3，来源于专利 WO2017031104A1，又称为 Teclistamab）， Roche- BCMA/CD3 (BCMA/CD3，来源于专利 WO2018083204A1，又称为 Alnuctamab)，REGN-BCMA/CD3 (BCMA/CD3，来源于专利 US20200024356A）, JNJ-GPRC5D/CD3(GPRC5D/CD3,来源于专利 WO2018017786A2）, Roche-GPRC5D/CD3（GPRC5D/CD3，来源于专利 WO 2019/154890 A1），Elranatamab（Pfizer BCMAxCD3，来源于专利 WO2016166629A1）。

还表达纯化了如下阴性对照抗体：抗 Hel 抗体（附图中标识为 IgG 或标识为 hIgG1），其重链序列为 SEQ ID NO:101，轻链序列为 SEQ ID NO:100。

实施例 2. 三特异性抗体的制备和纯化

质粒制备

编码本发明的各个抗体的各条链的核酸由金唯智基因合成，并分别构建到 pCDNA3.1 模板质粒上，并制备一定量的质粒。用 0.22 μm 的滤头过滤，用于细胞的瞬转表达。

转染和表达

根据所需转染体积传代 Expi293 细胞（Invitrogen），转染前一天将细胞密度调整至 3×10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度再次调整为 3×10^6 个细胞/ml。每个分子在表达时分成 A、B 两瓶，A 瓶中将含有 1#和 2#肽链的质粒按照 1：1 的比例加入，B 瓶中将含有 3#、4#和 5#肽链的质粒按照 1:1:1 的比例加入,取终体积 1/10 (v/v)的 Opti-MEM 培养基(Gibco 货号: 31985-070）作为转染缓冲液稀释质粒，混匀。加合适的聚乙烯亚胺(PEI)（Polysciences，23966）到上一步的质粒中(质粒与 PEI 的质量比例为 1:3)，混匀后室温孵育 10 min，获得 DNA/PEI 混合物。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 HEK293 细胞并混匀，在 37 ℃，8% CO_2 的条件下培养 24 h 后，补加 VPA（Sigma，货号：P4543-100G）使终浓度至 2 mM 及 2%（v/v）Feed（1 g/L Phytone Peptone + 1g/L Difco Select Phytone），继续培养 6 天。

纯化

收集培养物，以 4000 转／分钟离心 30 分钟，取细胞上清用 0.45 μM 滤膜过滤，通过 ProteinA 亲和层析进行纯化，进一步 KappaSelect 亲和层析和 LambdaFabSelect 亲和层析进一

步精纯，最后通过体外重组，离子交换层析纯化完整分子。

具体的 ProteinA 亲和层析纯化操作步骤为：用预装柱 Hitrap Mabselect Sure（GE, 11-0034-95）纯化上清液。操作如下：纯化前用 5 倍柱体积的平衡液（20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.2）平衡填料柱；将收集的上清通过柱子，再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（100 mM sodium citrate，pH 3.5）冲洗填料，收集洗脱液。加入 2M Tris 中和 pH 到 6.5。用液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）对纯化后的抗体进行正确配对比例定量测定。

具体的 KappaSelect 亲和层析纯化操作步骤为：用预装柱 HiTrap KappaSelect（GE, 17-5458-11）纯化上清液。操作如下：纯化前用 5 倍柱体积的平衡液（PBS, pH7.4）平衡填料柱；将收集的上清通过柱子，再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（0.1 M 甘氨酸缓冲液, pH 2.5）冲洗填料，收集洗脱液。加入 2M Tris 中和 pH 到 6.5。用液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）对纯化后的抗体进行正确配对比例定量测定。

具体的 LambdaFabSelect 亲和层析纯化操作步骤为：用预装柱 HiTrap LambdaFabSelect（GE, 17-5482-11）纯化上清液。操作如下：纯化前用 5 倍柱体积的平衡液（PBS, pH7.4）平衡填料柱；将收集的上清通过柱子，再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（0.1 M 醋酸盐缓冲液, pH 3.5）冲洗填料，收集洗脱液。加入 2M Tris 中和 pH 到 6.5。用液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）对纯化后的抗体进行正确配对比例定量测定。

体外重组

具体的体外重组方法为：将 A 瓶中得到的 A 分子和 B 瓶中得到的 B 分子按照摩尔比 1:1 混合，加入终浓度 5mM 的 GSH（Sigma Aldrich，G4251），终浓度 50mM 的精氨酸（Sigma Aldrich，A5006），37°C孵育 6 小时。

精细纯化

具体的离子交换层析纯化操作步骤为：使用超滤浓缩管（MILLIPORE，货号：UFC901096）将体外重组得到的产物交换到 pH6.0 低盐 PB 缓冲液（10 mM 磷酸盐，pH6.0）中，并用 Capto HiRes S 10/100（GE，货号 29275879）进行精细纯化。纯化前用 5 倍柱体积的 pH6.0 低盐 PB 缓冲液平衡填料柱；将换液后的样品通过柱子，再用 10 倍柱体积的 pH6.0 低盐 PB 缓冲液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；洗脱时，线性增加 pH6.0 高盐 PB 缓冲液（10 mM 磷酸盐，pH 6.0，1 M NaCl）的浓度（线性梯度：30 个柱体积内将 pH6.0 高盐 PB 缓冲液比例从 1%增加到 100%），收集洗脱主峰。使用超滤浓缩管（MILLIPORE，货号：UFC901096）交换到 PBS 缓冲液（Gibco，货号：70011-044）中。

图 7 显示了 B3(24)分子与对照分子（F2 (24)）的聚集体差异。

与 WO2022174813A1 专利申请中的三特异性抗体（F2 (24)相比，本发明的 B3(24)分子在蛋白性质方面有明显改善。具体表现在，体外重组后的阳离子交换纯化过程中，聚集体的产生比例大大降低。WO2022174813A1 专利申请中的三特异性抗体 F2 (24)在体外重组后，阳离子交换层析显示有大约 35%的聚集体（图 7A），而 B3(24)分子在体外重组后产生的聚集体则极少或者基本不可见（图 7B）。由于聚集体也是纯化过程中需要去除的杂质之一，聚集体的大幅减少可以使纯化过程中的回收率大大提高。

实施例 3. 三特异性抗体对表达抗原的细胞的亲和力测定

3.1 三特异性抗体对表达抗原的细胞的亲和力测定

在示例的三特异性抗体中，在 GS-CHO-hBCMA 和 GS-CHO-cynoBCMA 细胞株上检测与人（h-）和食蟹猴（cyno-）BCMA 的亲和力；在 GS-CHO-hGPRC5D 和 GS-CHO-cynoGPRC5D 细胞株上检测与人（h-）和食蟹猴（cyno-）GPRC5D 的亲和力；在 Jurkat 细胞系（吉满生物科技, GM-C01459）、人冻存 PBMC (Saily, SLB-HP050B) 中的 T 细胞上检测与人 CD3 的亲和力。

其中，过表达 GPRC5D 的 GS-CHO 细胞系（GS-CHO-hGPRC5D 和 GS-CHO-cynoGPRC5D）的获得方法如下： 将人、猴的 GPRC5D 的全长序列（人 GPRC5D（Q9NZD1，uniprot 数据库）; 猴 GPRC5D（A0A2K5W6I7，uniprot 数据库））的编码核酸分别插入到 PEE17.4 质粒（Lonza, GS Xceed Expression System）中，经过加压筛选构建的稳转细胞系；

过表达 BCMA 的 GS-CHO 细胞系（GS-CHO-hBCMA 和 GS-CHO-cynoBCMA）的获得方法如下：将人、猴的 BCMA 的全长序列（人 BCMA（Q02223，uniprot 数据库）；猴 BCMA（A0A2K5UD97，uniprot 数据库））的编码核酸分别插入到 T2A-EGFP 质粒（金唯智）中，经过加压筛选构建的稳转细胞系。

具体地，获得培养细胞或按照相关说明书从人 PBMC 中分离出 T 细胞，按照 1E5/孔细胞数接种于 96 孔 V 底板中，接着将待测及对照分子进行梯度稀释（详见图 2）后与表达相应抗原的细胞在 4 摄氏度共同孵育 40 分钟，然后加入荧光标记的二抗（按 1:200 稀释；同时混合标记细胞死活染色剂 DCM，按 1:2000 稀释；其中在分离人 T 细胞中加入 CD4 和 CD8 抗体用来标记区分相应 T 细胞，抗体均按 1:200），最后通过流式细胞仪（BD）检测细胞荧光强度后利用 GraphPad Prism 8.0 拟合曲线并计算 EC_{50} 值。图 2A-H，表 2- 9 显示了本发明的抗体与相应抗原结合的亲和力。试剂与材料

名称	货号	厂家
Pan T Cell Isolation Kit	130-096-535	Miltenyi Biotec
DCM-APC/CY7	L34975	Invitrogen
anti-human Fc-PE	ab98596	Abcam
Anti-human CD4	612912	BD
Anti-human CD8	612889	BD

具体结果见图 2 和表 2-10。

表 2. 示例抗体与人 BCMA 的亲和力-1

示例抗体	EC50 (nM)
F2(87)	119.6
B3(87)	37.7
B5(87)	N.D.
REGN-BCMA/CD3	76.1
JNJ-BCMA/CD3	32.1

N.D.: not detected

表 3. 示例抗体与人 BCMA 的亲和力-2

示例抗体	EC50 (nM)
F2(87)	211.20
F2(24)	141.70
B3 (24)	11.45
B3-7F5.3 (24)	7.36
JNJ-BCMA/CD3	19.79
Roche-BCMA/CD3	3.08
REGN-BCMA/CD3	59.19

表 4. 示例抗体与食蟹猴 BCMA 的亲和力-1

示例抗体	EC50 (nM)
F2(87)	116.80
F2(24)	83.01
B3 (24)	14.20
B3-7F5.3 (24)	9.69
JNJ-BCMA/CD3	829.30
Roche-BCMA/CD3	3.81
REGN-BCMA/CD3	1316.00

表 5. 示例抗体与人 GPRC5D 的亲和力-1

示例抗体	EC50 (nM)
F2(87)	98.56
F2(24)	73.27
B3(24)	80.73
B3-7F5.3(24)	53.40
JNJ-GPRC5D/CD3	284.60
Roche-GPRC5D/CD3	15.98

表 6. 示例抗体与人 GPRC5D 的亲和力-2

示例抗体	EC50 (nM)
F2(87)	94.06
B3(87)	131.70

B3b (87)	95.88
B3-7F5.3 (87)	24.40
JNJ-GPRC5D/CD3	236.20
Roche-GPRC5D/CD3	9.78

表 7. 示例抗体与食蟹猴 GPRC5D 的亲和力-1

示例抗体	EC_{50} (nM)
F2(87)	195.61
F2(24)	107.74
B3 (24)	255.53
B3-7F5.3 (24)	437.53
JNJ-GPRC5D/CD3	N.D.
Roche-GPRC5D/CD3	N.D.

表 8. 示例抗体与人 CD3 的亲和力-1

示例抗体	EC_{50} (nM)
F2(87)	N.D.
B3(87)	N.D.
B3b (87)	N.D.
B5(87)	N.D.
F2(24)	8.94
B3 (24)	34.46
REGN-BCMA/CD3	12.04
JNJ-BCMA/CD3	6.39
Roche-GPRC5D/CD3	30.43

表 9. 示例抗体与人 T 细胞的亲和力

	EC_{50} (nM)	
示例抗体	CD8 T cell	CD4 T cell
F2(87)	N.D.	N.D.
F2(24)	33.72	32.49
B3 (24)	54.49	53.62
B3(87)	N.D.	N.D.
B3-7F5.3 (24)	42.42	43.37
B3-7F5.3 (87)	N.D.	N.D.

REGN-BCMA/CD3	31.88	33.41
JNJ-BCMA/CD3	24.59	25.88
Roche-GPRC5D/CD3	65.82	66.58

3.2 三特异性抗体对表达突变体抗原的细胞的亲和力测定

过表达 BCMA 突变株的 293T 细胞系（293T-hBCMA-P34del、293T-hBCMA-S30del、293T-hBCMA-R39A、293T-hBCMA-R27P）及过表达 BCMA 突变株的 GS CHO 细胞系（GS CHO-hBCMA-P34del、GS CHO -hBCMA-S30del、GS CHO -hBCMA-R39A、GS CHO -hBCMA-R27P）的获得方法如下：将人的 BCMA 的全长序列（人 BCMA（Q02223，uniprot 数据库）进行相对应的点突变或者缺失突变，将突变后的编码核酸分别插入到 T2A-EGFP 质粒（金唯智）中，经过加压筛选构建的稳转细胞系。人 BCMA 全长序列、hBCMA-P34del、hBCMA-S30del、hBCMA-R39A 和-hBCMA-R27P 的氨基酸序列和编码核酸序列参见序列信息。

1 具体构建方法：

复苏后的 293T 细胞经过 2-3 次传代后，倒去培养基，10 ml PBS 清洗细胞，2 ml 胰酶消化，用培养基终止后 400 xg 离心 3 min 弃上清，培养基重悬，取 20 ul 细胞悬液至 1.5 ml EP 管，计数，以 1.5 x 10^7 cells 接种于 T175 flask 中，晃匀，水平置于 37° C 培养箱中培养过夜。取出提前铺板的 293T 细胞，将培养基弃去，每瓶加入 20 ml 含 10%FBS 和 1%PS 的 DMEM 培养基，配制转染混合物 1：

试剂 体积

opti-MEM 1500 μL

Lipo 3000 44.5 μL

配制转染混合物 2：

试剂 体积

opti-MEM 1500 μL

DNA 质粒 27.42μg

包装质粒 1 13.72 μg

包装质粒 2 6.86 μg

P3000 96 μL

将混合物 1 一次性缓慢滴入混合物 2，混匀后室温静置 15 min；

将转染混合物加入到 293T 细胞的培养基，做好标记，晃动培养瓶使转染混合物均匀分布在培养基中。转染 4-6 h 后弃去培养液，加入 20 mL 含 2% FBS 的 DMEM 新鲜培养液；转染后 48、72 h 收集细胞培养上清液，4℃，500 × g，离心 10 min，0.45 μ m 低蛋白结合滤膜过滤；去上清后的细胞 2 ml 胰酶消化，用培养基终止后 400 xg 离心 3 min 弃上清，培养基重悬，放入培养瓶中，得到过表达 BCMA 突变株的 293T 细胞系（293T-hBCMA-P34del、293T-hBCMA-S30del、293T-hBCMA-R39A、293T-hBCMA-R27P），将细胞放入培养箱中继续

培养。

病毒上清：Takara 病毒浓缩液=3: 1（v/v）混匀，封口膜密封，4℃，孵育过夜；孵育过夜后的混合液，4℃，1500 × g，离心 45 min，弃上清；用 1 mL CD CHO 培养基重悬慢病毒沉淀，放置在 4℃至完全溶解，分装-80℃保存。

构建过表达 BCMA 突变株的 GS CHO 细胞系：400 × g 离心 4 min 收集 GS CHO 细胞，弃上清，加入 3 mL 完全培养基重悬，细胞计数，以病毒上清：重悬细胞=2:1 的比例，将 1 × 10^6 cells 接种于 6 孔板中，每孔补足培养基至 1 mL；感染后 4 h 补足细胞培养基至 2 mL；感染后 24 h 将细胞放入离心管中，400 × g 离心 4 min 收集细胞，去掉含有病毒的培养基，用新鲜的含有 10%FBS、1%PS 的 CD CHO 培养基重悬细胞，将细胞接种于 T25 flask 中，竖直放入二氧化碳培养箱中培养；细胞培养 48 h 后补足培养基至 10 mL，放入二氧化碳培养箱中继续培养；取出 37℃培养的 CHO 细胞，400 × g 离心 4 min 收集细胞，弃上清，接种于 125 mL 锥形瓶中，放入 37℃恒温摇床震荡培养。得到过表达 BCMA 突变株的 GS CHO 细胞系（GS CHO-hBCMA-P34del 、GS CHO -hBCMA-S30del 、GS CHO-hBCMA-R39A 、GS CHO -hBCMA-R27P ）。

2 检测方法：

取出培养的过表达 BCMA 突变株的 293T 细胞系（293T-hBCMA-P34del、293T-hBCMA-S30del、293T-hBCMA-R39A、293T-hBCMA-R27P），倒去培养基，10 ml PBS 清洗细胞，2 ml 胰酶消化，用培养基终止后 400 xg 离心 5 min 弃上清，培养基重悬，取 20 ul 细胞悬液至 1.5 ml EP 管，计数，按照 1E5/孔细胞数接种于 96 孔 U 底板中，接着将待测抗体及对照分子进行梯度稀释，将抗体利用 PBS 进行 3 倍梯度稀释，起始浓度为 1500nM，共稀释 12 个浓度，取 50 ul 梯度稀释的药物与铺板的细胞在 4 摄氏度共同孵育 30 分钟，然后加入荧光标记的二抗（Anti-human Fc-PE，Abcam, ab98596，按 1:200 稀释），在 4 摄氏度共同孵育 30 分钟，,最后通过流式细胞仪（BD）检测细胞荧光强度后利用 GraphPad Prism 8.0 拟合曲线并计算 EC_{50} 值。

取出培养的过表达 BCMA 突变株的 GS CHO 细胞系（GS CHO-hBCMA-P34del、GS CHO -hBCMA-S30del、GS CHO -hBCMA-R39A、GS CHO -hBCMA-R27P），400 xg 离心 5 min 弃上清，培养基重悬，取 20 ul 细胞悬液至 1.5 ml EP 管，计数，按照 1E5/孔细胞数接种于 96 孔 U 底板中，接着将待测及对照分子进行梯度稀释，将抗体利用 PBS 进行 3 倍梯度稀释，起始浓度为 800nM，共稀释 12 个浓度，取 50 ul 梯度稀释的药物与铺板的细胞在 4 摄氏度共同孵育 30 分钟，然后加入荧光标记的二抗（按 1:200 稀释），在 4 摄氏度共同孵育 30 分钟，，最后通过流式细胞仪(BD)检测细胞荧光强度后利用 GraphPad Prism 8.0 拟合曲线并计算 EC_{50} 值。

3 实验结果：

图 2I 和图 2J 显示了如下结果：

B3(24)可以结合过表达野生型 BCMA 的细胞，过表达 BCMA-P34del 的细胞，过表达 BCMA-P30del 的细胞，过表达 BCMA-R39A 的细胞，过表达 BCMA-R27P 的细胞；

Alnuctamab（Roche- BCMAxCD3）可以结合过表达野生型 BCMA 的细胞，过表达 BCMA-P34del 的细胞，过表达 BCMA-P30del 的细胞，过表达 BCMA-R39A 的细胞，过表达 BCMA-R27P 的细胞；

Elranatamab(Pfizer BCMAxCD3)可以结合过表达野生型 BCMA 的细胞，过表达 BCMA-P34del 的细胞，弱结合过表达 BCMA-R39A 的细胞；

Teclistamab/JNJ-BCMA/CD3（J&J BCMAxCD3）可以弱结合过表达野生型 BCMA 的细胞，与过表达 BCMA-R39A 的细胞有及其微弱的结合。

实施例 4. 通过 BLI 测定三特异性抗体亲和力

本发明三特异性示例抗体中，抗 BCMA 端和抗 CD3 端的亲和力通过生物膜层光学干涉技术（BLI）检测。本发明基于光纤生物传感器的 BLI，测定示例抗体与人 BCMA、猴 BCMA，人 CD3 E&G 和猴 CD3 E&G 的结合动力学。当生物分子结合到传感器表面就形成了一层生物膜，生物膜对透过传感器的光的波形造成干涉现象，干涉现象以相位移动的方式被检测，从而可以检测结合到传感器分子数量的变化；根据实时响应值的变化拟合出动力学曲线，并计算出 k_{on}、k_{off}、K_D。

具体地，将偶联链霉亲和素蛋白（streptavidin protein，SA）或抗 human-Fc（AHC）的探针 sensors 浸泡于 200ul SD buffer（1x PBS, 0.1% BSA, 0.05% tween-20）中预湿。示例抗体和生物素标记或带 Fc-tag 的 BCMA 和 CD3 E&G 异源二聚体抗原分别用 SD buffer 稀释，然后取 200μl 的 SD buffer，并各稀释样品（100 nM）分别加入到 96 孔黑板中。将探针和样品置于 Octet 中（Fortebio， Red96e）。打开 Data Acquisition 10.0，选择“New Kinetic Experiment”，根据样品位置布板，选择 sensors 位置，设置运行步骤及时间：Baseline 60 s、Loading 250 s、Baseline 100 s、Association 600 s 和 Dissociation 600 s。实验转速为 1000rpm，温度为 30℃。

在“Data Analysis 10.0”软件中对结果分析，扣除 buffer 参比通道，选择 1：1 binding 对数据进行拟合，计算出示例抗体的 kon、koff、KD 值。

抗原信息

抗原/受体名称	货号	厂家
Human BCMA	BCA-H522Y	ACRO
Cyno BCMA	BCA-C52H7	ACRO
Human CD3E&G	CDG-H52W5	ACRO
Cyno CD3E&G	CDG-C52W6	ACRO

试剂和材料信息

名称	货号	厂家
1*PBS	10010-23	Gibco
Tween-20	A600560-0500	BBI life sciences
BSA	001-000-162	Jackson Immuno Research
SA sensor	18-5019	Fortebio
96 孔黑色微孔板	655209	Greiner

在如以上测定法所述进行的实验中，结果如表 10 所示。结果显示，B3 的 4 个示例抗体与 BCMA 和 CD3 的亲和力与 F2 抗体接近。

表 10 通过 BLI 检测的示例抗体的亲和力

Name	Antigen	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
F2(87)	human CD3E&G-His/Free	5.50E-08	2.39E+05	1.31E-02
F2(24)		1.72E-08	4.45E+05	7.65E-03
B3(87)		6.94E-08	2.18E+05	1.51E-02
B3(24)		1.33E-08	6.46E+05	8.59E-03
B3-7F5.3(87)		6.41E-08	2.36E+05	1.52E-02
B3-7F5.3(24)		1.44E-08	6.08E+05	8.74E-03
REGN-BCMA/CD3		N.D.	N.D.	N.D.
JNJ-BCMA/CD3		1.54E-08	3.70E+05	5.70E-03
Roche-BCMA/CD3		1.30E-08	3.61E+05	4.69E-03
F2(87)	cyno CD3E&G-His/Free	7.11E-08	1.75E+05	1.24E-02
F2(24)		1.25E-08	4.76E+05	5.97E-03
B3(87)		6.11E-08	2.14E+05	1.31E-02
B3(24)		9.51E-09	6.92E+05	6.58E-03
B3-7F5.3(87)		5.86E-08	2.05E+05	1.20E-02
B3-7F5.3(24)		1.02E-08	6.62E+05	6.75E-03
REGN-BCMA/CD3		N.D.	N.D.	N.D.
JNJ-BCMA/CD3		1.21E-08	3.96E+05	4.81E-03
Roche-BCMA/CD3		1.05E-08	3.77E+05	3.96E-03
F2(87)	human BCMA-His	1.33E-09	5.97E+05	7.95E-04
B3(87)		1.24E-09	7.39E+05	9.16E-04
B3-7F5.3(87)		1.04E-09	7.87E+05	8.20E-04
REGN-BCMA/CD3		1.13E-09	7.01E+05	7.92E-04
JNJ-BCMA/CD3		4.35E-10	1.66E+06	7.22E-04
Roche-BCMA/CD3		2.05E-10	1.28E+06	2.62E-04
F2(87)	Cyno BCMA-His	1.55E-09	6.21E+05	9.61E-04
B3(87)		1.58E-09	7.73E+05	1.22E-03
B3-7F5.3(87)		2.44E-10	8.21E+05	2.00E-04
REGN-BCMA/CD3		1.40E-08	7.67E+05	1.08E-02
JNJ-BCMA/CD3		1.75E-08	1.94E+06	3.38E-02
Roche-BCMA/CD3		8.90E-10	1.40E+06	1.25E-03

N.D.: not detected

实施例 5. 三特异性抗体对人多发性骨髓瘤细胞的杀伤实验和细胞因子释放

当多抗与 MM 细胞表面的 GPRC5D 和/或 BCMA 结合，同时与 primary T 细胞表面的 CD3E 结合时，可以通过肿瘤相关抗原（TAA，即 GPRC5D 和/或 BCMA）依赖性的与 T 细胞交联，刺激 T 细胞激活，介导肿瘤细胞的杀伤。由于在实际多发性骨髓瘤病人中，BCMA 和 GPRC5D 的表达肿瘤细胞存在较强的异质性，因此该特异性表现在存在不同亚型的肿瘤细胞表达一种或者多种抗原，或者肿瘤细胞表达的抗原的水平也存在着个体的差异。

KO 细胞系制备和流式

H929 ko BCMA 和 H929 ko GPRC5D 是通过 RNP 的方式转染 H929 细胞制备。利用 gRNA 设计网站（broadinstitute.org），选择 MIT specificity Score 较高的 gRNA（Genescript），化学合成的 gRNA （每个靶蛋白三条）和 Cas9 蛋白（Genscript SC1841 NA）混合，通过电转的方式转入细胞。获得稳定培养后，在 gRNA 切割位点附近设计引物 PCR，扩增的产物进行测序，切割效率用 Sanger 测序（Genescript）后 CRISPR 分析的方法，计算出靶基因切割的比例。敲除后的细胞池采用流式细胞分选仪（BD）标记 BCMA 和 GPRC5D，分选出靶蛋白阴性的细胞群。结果：最终选取的 gRNA 序列和获得的细胞系流式分析结果见下表和图 6。

表 11. 敲除 H929 细胞系选取的 gRNA 序列:

靶基因	gRNA Sequence	分选前切割效率	细胞池
GPRC5D	GACTCCAGAATGATGCCCCA SEQ ID NO:12	94%	H929 ko GPRC5D pool
BCMA	CAATAACGCTGACATGTTAG SEQ ID NO:13	94%	H929 ko GPRC5D pool

杀伤实验和细胞因子释放

为了进一步检验示例抗体在多发性骨髓瘤中的杀伤作用， 1）将单表达单一 TAA，即 H929 ko BCMA 以及 H929 ko GPRC5D 细胞（制备方法如上文所述） 2) 高表达双 TAA 的 H929 细胞（MM 细胞，南京科佰，CBP60243）或低表达双 TAA 的 L363 细胞（MM 细胞，南京科佰，CBP60240）与 PBMC (Saily, SLB-HP050B)，按照效应细胞与肿瘤细胞比例为 10:1 共孵育，加入示例抗体和对照抗体，16 小时后利用乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测死亡细胞。利用两个抗原都不表达的非靶细胞 Calu-6（NSCLC 细胞，中国科学院细胞库，TCHu144）同相应的抗体以及 PBMC 进行共孵育来作为非特异性杀伤的对照。3）将表达单一 TAA 的 H929 KO GPRC5D，H929 KO BCMA 和表达双抗原的亲本 H929 细胞进行 1:1:1 混合后与 PBMC 共孵育，加入示例抗体和对照抗体，16 小时后通过流式细胞技术分析目标肿瘤细胞存活比例。

试剂和材料:

名称	货号	厂家
RPMI medium 1640 (1x)，无酚红	L230KJ	上海源培
FBS	SH30406.06	Hyclone
CytoTox 96 LDH	G1781	Promega
Human TNF alpha kit	62HTNFAPEH	Cisbio
Human IL6 KIT	62HIL06PEH	Cisbio
Human IFN gamma kit	62HIFNGPEH	Cisbio

Human IL2 kit	62HIL02PEH	Cisbio
DCM-APC/CY7	L34975	Invitrogen
CellTrace™ Violet	C34557	Thermo Fisher

实验步骤：将 PBMC 细胞(Saily, SLB-HP050B) 从液氮中取出，于 37 摄氏度水浴锅迅速化开，加入 9 ml 无血清培养基中， 300g 离心 5min，弃上清，重悬于 10%FBS 无酚红 1640 培养基，调整细胞密度为 2×10^6 cell/ml。收集对数期生长肿瘤细胞，用 PBS 清洗两遍以去除多余血清。此时如果需要流式检测细胞死亡，则在 MM 细胞收集后加入 CTV staining solution（1 μM，CellTrace™ Violet DMSO stock solution: PBS=1:50,000； 2E6 cells / mL CTV staining solution）37℃ 避光孵育 15 分钟。如利用 LDH 检测肿瘤细胞死亡则跳过该步骤直接离心。300×g 离心 5 分钟，弃上清保留细胞沉淀。用无酚红培养基重悬细胞后，调整细胞密度为 4×10^5 cell/mL。根据不同细胞按照需要将抗体利用完全培养基进行 10 倍梯度稀释，共稀释 8 个浓度，（其中 H929 系细胞（包括 KO 细胞）配制时起始浓度为 200nM，终浓度最大为 50nM。L363 以及 Calu-6 配制时起始浓度为 400nM，终浓度最大为 100nM），加最后一个浓度为 0。96 孔细胞培养板(U 型底，COSTAR，Cat.7007)中加入 50μL 的肿瘤细胞、50μL 梯度稀释的抗体和 100μL PBMC 细胞进行共孵育。如果需要 LDH 检测肿瘤细胞死亡，则要设置仅有 50μL 的肿瘤细胞的靶细胞自发 LDH 释放孔，以及 50μL 的肿瘤细胞加入 Lysis buffer (LDH 试剂盒自带，1:10 稀释)的靶细胞最大 LDH 释放孔，同时用完全培养基补足体积至 200μL/孔。混合后的细胞放入 37 摄氏度 CO_2 培养箱培养 16 小时。

共孵育后 400g，5min 离心细胞培养板，每孔吸出 160μL 上清，每孔转移 50μL 上清至一个新的 96 孔平底板（碧云天，Cat.FPT019）中，用于 LDH 检测。剩余冻存（-80℃）用于后续检测细胞因子检测。细胞沉淀用于流式检测细胞死亡。

LDH 检测肿瘤细胞死亡: 96 孔白底平板每孔加入细胞上清 50μL ，后加入检测液 50μL，室温避光孵育 10-30 分钟 (根据细胞类型和反应颜色而定)后，加入 50μL 终止液。加入 Stop Solution 后 1 小时内在多功能酶标仪（SPARK）上 492/650nm 处读取吸光值。其中 0 浓度抗体加肿瘤细胞和免疫细胞孔作为背景，只有肿瘤细胞的孔为最小值，肿瘤细胞经裂解液处理的孔作为最大值，杀伤计算为（样品值-背景值）/ （最大值-最小值）。

流式检测肿瘤细胞死亡：上述细胞培养板中每孔加 200μL FACS buffer (1XPBS, 2%FBS , 2mM EDTA) 洗一遍，离心后倾去液体，每孔加入 45μL DCM 染液（1:2000 用 FACS buffer 配制），4 摄氏度避光孵育 20min，用 200μL FACS buffer 洗 1 遍，扣干后用 150μL FACS buffer 重悬后在流式细胞仪（BD）上机检测。杀伤计算为 DCM^+CTV^+细胞数/ CTV^+细胞总数。

Cisbio 检测细胞因子：用 H_2O 溶解标准品，成为 Standard Stock solution; 利用 Diluent 进行 3 倍稀释，成为 Std7(Standard 7); 然后进行 2 倍梯度稀释，共 6 个孔即 Std1-6，Std 0 为 Diluent 空白对照。96 孔板（#66PL96025）中每孔加入 16ul 待测上清; 标准品同样每孔加入 16μL。Eu Cryptate 和 d2 antibody 均用 detection buffer 进行 1:20 稀释，将两种稀释液 1:1 混合，每孔加入 4μL 混合液。用封口膜封板，室温孵育 2 小时。多功能酶标仪(SPARK)对 Emission 信号进行检测，665nm/620nm 即为细胞因子含量相对数值。

实验结果: 示例抗体可以剂量依赖性的激活介导 PBMC 对 MM 细胞的杀伤作用(图 3A-3O，表 12-表 24)。

1. 在表达单一 TAA 的 H929 ko GPRC5D 和 H929 ko BCMA 中相应抗体的杀伤结果如图 3A-3F，表 12-16。具体实验结果如下：

示例抗体在有存在 TAA 表达的细胞中，同对应抗体对照分子一样均能以剂量依赖性地激活 PBMC 中 T 细胞对其的杀伤。对比不表达 TAA 的非靶细胞（图 3P）中没有观察到的杀伤作用。说明该杀伤是结合相应 TAA 依赖的特异性杀伤。示例抗体的抗 CD3 端亲和力越高杀伤肿瘤细胞的能力越好，即特异性结合 CD3 的抗原结合区含有来自 sp34.24 的重链可变区（SEQ ID NO:77）的分子（即图中标有（24））强于特异性结合 CD3 的抗原结合区来自 sp34.87 的重链可变区（SEQ ID NO:78）的分子（即图中标有（87））。

从介导 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 的杀伤中， B3, B3b 和 B5 形式的示例抗体介导杀伤肿瘤细胞的能力好于 F2 形式的分子。这说明避免了 scFv 的 B3，B3b，B5 的设计提高了 BCMA 的功能。

从介导 PBMC 对 H929 ko BCMA 的杀伤中， B3 和 B5 形式的示例抗体介导杀伤肿瘤细胞的能力与 F2 形式的分子接近，优于 B3b 的分子。

上述结果表明 B3，B5，B3b 形式的示例抗体的抗 GPRC5D 端和抗 BCMA 端都能成功作为 TCE 的 TAA 抗体，并发挥介导 T 细胞对肿瘤细胞杀伤的功能。

2. 在同时表达两个抗原的细胞 H929 和 L363 中（图 3G-3M，表 18-表 24）：L363 细胞表面的 BCMA 和 GPRC5D 水平都比较低；H929 细胞表面的 BCMA 和 GPRC5D 水平都比较高（相比 WO2022174813 中公开的抗体）。具体结果如下所示：

在 H929 细胞中，同上文观察，特异性结合 CD3 的抗原结合区含有来自 sp34.24 的重链可变区（SEQ ID NO:77）的分子强于对应的特异性结合 CD3 的抗原结合区来自 sp34.87 的重链可变区（SEQ ID NO:78）的分子。且三特异性示例抗体 B3（24）和 B3-7F5.3（24）的杀伤优于 JNJ 的双抗对照分子，即 JNJ-BCMA/CD3， JNJ-GPRC5D/CD3，比 Roche 的双抗对照分子，即 Roche-GPRC5D 与 Roche-BCMA/CD3 略弱或相当。

同时，在对 H929 细胞杀伤过程中引起的细胞因子释放的比较中，三特异性示例抗体与对照的双特异性抗体，即 JNJ-BCMA/CD3， JNJ-GPRC5D/CD3 以及 REGN-BCMA/CD3，引起的细胞因子释放没有显著区别（图 3Q-3R）。

而当没有靶细胞存在的情况下，三特异性示例抗体同对照的双特异性抗体，即 JNJ-BCMA/CD3 ， JNJ-GPRC5D/CD3, Roche-GPRC5D/CD3, Roche-BCMA/CD3, 与 REGN-BCMA/CD3，一样，并未引起非特异性的细胞因子释放，即水平与 hIgG 对照相当（图 3S-3T）。

在 L363 细胞中，示例三特异性抗体 B3（24）和 B3-7F5.3（24）的杀伤强于 JNJ 的双抗对照分子（JNJ-BCMA/CD3， JNJ-GPRC5D/CD3），且与 Roche 的对照双抗分子（Roche-GPRC5D/CD3, Roche-BCMA/CD3）相当。当利用其与对照分子（Inno-B, Inno-G 或 Inno-G-7F5.3）分别进行杀伤时，本发明示例性三特异性抗体的抗 GPRC5D 端和抗 BCMA 端均可以发挥作用；将 JNJ 和 Roche 的对照 BCMA/CD3 和 GPRC5D/CD3 双抗分子以 1:1 进行混合，与同等浓度的本发明示例性三特异性抗体进行比较，本发明示例性三特异性抗体介导的对于 L363 细胞的杀伤优于对照的 BCMA/CD3 和 GPRC5D/CD3 双抗分子的联合。上述结果说明三特异性抗体的抗 GPRC5D 端和抗 BCMA 端对肿瘤细胞的杀伤具有相互的协同效应，优于两种双抗的联合。

3. 在将表达单一 TAA 的 H929 ko GPRC5D，H929 ko BCMA 和表达双抗原的亲本 H929 细胞进行 1:1:1 混合后，本发明示例性三特异性抗体的杀伤曲线较对照分子高，即其最大杀伤比例较对照分子高 (图 3N，3O)。

表 12 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 细胞的杀伤作用-1，N.A.表示未分析（Not analyzed）。

示例抗体	EC50 (pM)
F2(87)	67.67
B3(87)	175.53
B3(24)	16.97
B5(87)	182.03
REGN-BCMA/CD3	37.47
JNJ-BCMA/CD3	16.52
JNJ-GPRC5D/CD3	N.A.

表 13 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 细胞的杀伤作用-2

示例抗体	EC_{50} (pM)
F2(87)	427.68
F2(24)	474.81
B3(24)	86.68
B3-7F5.3(24)	75.12
JNJ-BCMA/CD3	70.38
Roche-BCMA/CD3	16.08

表 14 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko GPRC5D 细胞的杀伤作用-3

示例抗体	EC_{50} (pM)；donor1	EC_{50} (pM)；donor2
F2 (87)	30.35	N.A.
B3(87)	345.95	601.53
B3b(87)	139.52	131.73
B3-7F5.3(87)	166.83	346.35
B3(24)	17.48	18.33
Roche-BCMA/CD3	4.50	3.11
JNJ-BCMA/CD3	24.13	11.40
REGN-BCMA/CD3	39.48	13.79

表 15 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko BCMA 细胞的杀伤作用-1。N.A.表示未分析（Not analyzed）。

示例抗体	EC_{50} (pM)
F2(87)	7.39
B3(87)	25.00
B3(24)	1.49
B5(87)	10.46
REGN-BCMA/CD3	N.A.
JNJ-BCMA/CD3	N.A.
JNJ-GPRC5D/CD3	38.50

表 16 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko BCMA 细胞的杀伤作用-2。N.A.表示未分析（Not analyzed）。

示例抗体	EC_{50} (pM)
F2(87)	25.56
F2(24)	4.00
B3(24)	6.98
B3-7F5.3(24)	34.56
JNJ-GPRC5D/CD3	120.44
Roche-GPRC5D/CD3	4.19

表 17 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 ko BCMA 细胞的杀伤作用-3。N.A.表示未分析（Not analyzed）。

示例抗体	EC_{50} (pM)；donor1	EC_{50} (pM)；donor2
F2 (87)	34.24	83.22
B3(87)	66.25	72.33
B3b(87)	878.88	1453.36
B3-7F5.3(87)	308.30	1436.04
B3(24)	9.31	17.56
Roche-GPRC5D/CD3	4.86	2.67
JNJ-GPRC5D/CD3	99.83	44.74

表 18 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用-1。

示例抗体	EC_{50} (pM)
F2(87)	1.41
B3(87)	9.25
B3(24)	0.14
B5(87)	2.18

REGN-BCMA/CD3	12.07
JNJ-BCMA/CD3	9.77
JNJ-GPRC5D/CD3	26.16

表 19 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用-2。

示例抗体	EC_{50} (pM)
Roche-BCMA/CD3	4.28
Roche-GPRC5D/CD3	1.76
JNJ-BCMA/CD3	30.01
JNJ-GPRC5D/CD3	54.94
B3(24)	3.41
B3-7F5.3(24)	4.95

表 20 示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用-3

示例抗体	EC_{50} (pM)
B3-7F5.3(24)	0.77
JNJ-BCMA/CD3	12.57
JNJ-GPRC5D/CD3	23.71
B3(24)	0.92
B3(87)	13.51
B3-7F5.3(87)	26.83
F2(87)	5.30

表 21 示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-1。

示例抗体	EC_{50} (pM)
REGN-BCMA/CD3	32.89
JNJ-GPRC5D/CD3	23.96
JNJ-BCMA/CD3	57.30
B3(24)	0.43
B3(87)	3.29
B5(87)	1.08
F2(87)	1.52

表 22 示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-2。

示例抗体	EC_{50} (pM)
Roche-BCMA/CD3	2.58

Roche-GPRC5D/CD3	9.35
JNJ-BCMA/CD3	127.80
JNJ-GPRC5D/CD3	NA
F2(87)	10.54
B3(24)	3.43
B3(87)	38.89
B3-7F5.3(24)	3.01
B3-7F5.3(87)	26.48

表 23 示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-3。

示例抗体	EC_{50} (pM)
B3(24)	14.86
B3-7F5.3(24)	20.36
Inno-B	192.27
Inno-G	355.50
Inno-G-7F5.3	1069.29

表 24 示例抗体介导的 PBMC 对 L363 细胞的杀伤作用-4。

示例抗体	EC_{50} (pM)
B3(24)	19.79
B3-7F5.3(24)	16.88
Inno-B+Inno-G	127.42
Inno-B+ Inno-G-7F5.3	187.69
JNJ-GPRC5D/CD3 + JNJ-BCMA/CD3	489.68
Roche-GPRC5D/CD3 + Roche-BCMA/CD3	18.16

对表达突变体抗原的细胞的杀伤实验

实验步骤：将 PBMC 细胞(Saily, SLB-HP100B) 从液氮中取出，于 37 摄氏度水浴锅迅速化开，加入 9ml 无血清培养基中， 300g 离心 5min，弃上清，重悬于 10%FBS 无酚红 1640 培养基，调整细胞密度为 2×10^6 cell/ml。收集对数期生长肿瘤细胞，用 PBS 清洗两遍以去除多余血清。将示例 1 中构建的过表达 BCMA 突变株的 GS CHO 细胞系分别 300×g 离心 5 分钟，弃上清保留细胞沉淀。用无酚红培养基重悬细胞后，调整细胞密度为 4×10^5 cell/mL。将抗体利用完全培养基进行 10 倍梯度稀释，共稀释 8 个浓度，（配制时起始浓度为 200nM，终浓度最大为 50nM），加最后一个浓度为 0。96 孔细胞培养板(U 型底，COSTAR，Cat.7007)中加入 50μL 的肿瘤细胞、50μL 梯度稀释的抗体和 100μL PBMC 细胞进行共孵育。设置仅有 50μL 的肿瘤细胞的靶细胞自发 LDH 释放孔，以及 50μL 的肿瘤细胞加入 Lysis buffer (LDH 试剂盒自带，1:10 稀释)的靶细胞最大 LDH 释放孔，同时用完全培养基补足体积至 200μL/孔。混合

后的细胞放入 37 摄氏度 CO_2 培养箱培养 16 小时。

共孵育后 400g，5min 离心细胞培养板，每孔吸出 160μL 上清，每孔转移 50μL 上清至一个新的 96 孔平底板（碧云天，Cat.FPT019）中，用于 LDH 检测。

LDH 检测肿瘤细胞死亡：96 孔白底平板每孔加入细胞上清 50μL ，后加入检测液 50μL，室温避光孵育 10-30 分钟 (根据细胞类型和反应颜色而定)后，加入 50μL 终止液。加入 Stop Solution 后 1 小时内在多功能酶标仪（SPARK）上 492/650nm 处读取吸光值。其中 0 浓度抗体加肿瘤细胞和免疫细胞孔作为背景，只有肿瘤细胞的孔为最小值，肿瘤细胞经裂解液处理的孔作为最大值，杀伤计算为（样品值-背景值）/（最大值-最小值）。

实验结果：B3(24)可以剂量依赖性的激活介导 PBMC 对过表达 BCMA 突变株的 GS CHO（GS CHO-hBCMA-P34del、GS CHO -hBCMA-S30del、GS CHO -hBCMA-R39A、GS CHO -hBCMA-R27P）的杀伤作用；Teclistamab 在 BCMA 的突变株 R27P 和 R39A 上并没有体外杀伤的功能（图 3U）。

实施例 6. 三特异性抗体克服 sBCMA 的影响

可溶形式的 BCMA（sBCMA）是由受到于 γ-分泌酶的裂解而从血浆细胞表面脱落的结果，在 MM 患者中升高，并与不良的临床结果相关（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395119/）。 sBCMA 由细胞外结构域和 BCMA 的一部分跨膜结构域组成，它不仅降低了靶抗原的密度，而且还提供了一种可溶性诱饵，能够限制 BCMA/CD3 分子的效力。因为含有不受 sBMCA 限制的 GPRC5D 端，GPRC5D/BCMA/CD3 分子理论上受到 sBCMA 的影响较小。

实验步骤：将人冻存 PBMC 细胞（SAILY）从液氮中取出，于 37 摄氏度水浴锅迅速化开，加入 9 ml 无血清培养基中， 300g 离心 4min，弃上清，重悬于 1%FBS 无酚红 1640 培养基（完全培养基），调整细胞密度为 4×10^6 cell/ml。收集细胞培养基至 50 ml 无菌离心管中，300×g 离心 5 min，弃上清保留细胞沉淀。利用完全培养基调整细胞密度为 4×10^5 cell/mL。将抗体用完全培养基稀释到 200 nM，10 倍梯度稀释。同时利用完全培养基稀释将人重组 BCMA（hBCMA；原液为 0.5mg/mL，由 PBS 配置）稀释到 800 ng/mL，即为 sBCMA 溶液。96 孔细胞培养板(U 型，Costar)中加入 50μL 的肿瘤细胞（H929）、50μL 梯度稀释的抗体，50μL PBMC 细胞和 50μL 的 sBCMA 溶液，此时共孵育体系中有 200ng/mL 的 sBCMA。放入 37 摄氏度 CO_2 培养箱培养 16h。共孵育后 400g，5min 离心细胞培养板，每孔转移 50μL 上清至一个新的 96 孔平底板（碧云天，Cat.FPT019）中，用于 LDH 检测。细胞沉淀通过流式细胞仪（BD）检测 T 细胞中 CD69 阳性细胞的百分比。所用细胞信息参见实施例 5。

LDH 检测肿瘤细胞死亡：96 孔白底平板每孔加入细胞上清 50μL ，后加入检测液 50μL，室温避光孵育 10-30 分钟 (根据细胞类型和反应颜色而定)后，加入 50μL 终止液。加入 Stop Solution 后 1 小时内在多功能酶标仪（SPARK）上 492/650nm 处读取吸光值。其中 0 浓度抗体加肿瘤细胞和免疫细胞孔作为背景，只有肿瘤细胞的孔为最小值，肿瘤细胞经裂解液处理的孔作为最大值，杀伤计算为（样品值-背景值）/（最大值-最小值）。

流式检测 CD8 和 CD4 T 细胞激活：上述细胞培养板中每孔加 200μL FACS buffer (1XPBS, 2%FBS , 2mM EDTA) 洗一遍，离心后倾去液体，每孔加入 45μL 染液（用 FACS buffer 配制），4 摄氏度避光孵育 20min，用 200μL FACS buffer 洗 1 遍，扣干后用 150μL FACS buffer 重悬后上机检测。计算 CD8 T 细胞和 CD4 T 细胞中 CD69 阳性细胞的占比。

试剂和材料:

名称	货号	厂家
RPMI medium 1640 (1x)，无酚红	L230KJ	上海源培
FBS	SH30406.06	Hyclone
CytoTox 96 LDH	G1781	Promega
PE-Anti-human CD2	Biolegend	309208
PE/Cy7-anti-human CD4	BD	560644
BUV805-anti-human CD8	BD	612889
FITC-anti-human CD69	Biolegend	310904
DCM-APC/CY7	L34975	Invitrogen
CellTrace™ Violet	C34557	Thermo Fisher

实验结果如图 4A、4B 和 4C、表 25 和 26 所示。该结果说明三特异性抗体介导的 T 细胞激活以及对 H929 细胞的杀伤受到 sBCMA 的影响较小。

表 25 示例抗体介导的 PBMC 中 T 细胞的激活 （w/o: 不含，w: 含）

激活 EC_{50} (nM)	JNJ-BCMA/CD3		B3(24)		B3(87)		B3-7F5.3(24)		B3-7F5.3(87)	
	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA
CD4	0.05207	0.5461	0.009738	0.01971	0.05289	0.08106	0.01256	0.05445	0.04927	0.5367
CD8	0.02906	0.4948	0.004015	0.008615	0.02026	0.03852	0.004301	0.02193	0.01859	0.1515

表 26 示例抗体介导的 PBMC 中 T 细胞的激活 （w/o: 不含，w: 含）

	B3-7F5.3 (24)		B3(24)		JNJ-BCMA/CD3		Roche-BCMA/CD3	
	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA	w/o sBCMA	w sBCMA
EC_{50} (pM)	0.7377	29.83	1.020	10.41	2.43	294.5	0.4525	96.55

实施例 7. 三特异性抗体在荷瘤人源化小鼠模型体内的抗肿瘤药效

雌性 NOG 小鼠（35-48 天）购自北京维通达实验动物技术有限公司。等级为 SPF 级。小鼠在到达后驯化检疫 5-7 天，随后开始研究。

将肿瘤细胞进行常规传代培养用于后续体内实验，离心收集细胞，以 PBS 分散细胞。将 NOG 小鼠静脉注射接种 PBMC 细胞，$4x10^6$ 个/只，接种体积 200 ul/只。PBMC 细胞接种后第 3 天，小鼠右侧背腹部剃毛，皮下接种肿瘤细胞，接种体积 200 ul/只（接种密度：H929 ko BCMA: $4x10^6$ 个/只，H929 ko GPRC5D: $4x10^6$ 个/只，MM.1S（MM 细胞，南京科佰，CBP60239）: $3x10^6$ 个/只，L363: $1x10^6$ 个/只。肿瘤细胞接种后第 7 天，根据小鼠瘤体积进行分组（每组 6-7 只）进行腹腔给药（给药频次剂量详见图 5 以及附图说明）。每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：V=L×W2/2。采用电子天平测定体重。在整个研究期间，当肿瘤达到端点时或当小鼠具有＞20 %体重减轻时，使小鼠安乐死。统计肿瘤大小。

实验结果：

H929 ko GPRC5D 肿瘤（图 5A）：B3(24)分子可以有效抑制 H929 ko GPRC5D 细胞的生长，其抗肿瘤能力与 JNJ-BCMA/CD3 对照分子较一致。较 B3（87）分子，REGN-BCMA/CD3 分子以及 F2（87）分子更强。

H929 ko BCMA 肿瘤（图 5B）：B3(24)分子可以有效抑制 H929 ko BCMA 细胞的生长，其抗肿瘤能力与 JNJ-GPRC5D/CD3 对照分子较一致；其抗肿瘤能力相较于所有 BCMA/CD3 以及（JNJ-GPRC5D/CD3+JNJ-BCMA/CD3）联合更强；其相较于 Roche-GPRC5D/CD3 和（Roche-BCMA/CD3+Roche-GPRC5D/CD3）联合略弱。

MM1S 肿瘤（图 5C）：示例抗体和对照分子均显示出较好的抗肿瘤效果。

L363 肿瘤（图 5D）：B3(24)分子可以有效抑制 L363 细胞的生长，其抗肿瘤能力较 JNJ-GPRC5D/CD3，JNJ-BCMA/CD3 以及（JNJ-BCMA/CD3+JNJ-GPRC5D/CD3）联合的抗肿瘤能力强；较 Roche-GPRC5D/CD3, Roche-BCMA/CD3 和（Roche-GPRC5D/CD3+Roche-GPRC5D/CD3）联合比较接近。

B3(24)分子相较于其他对照分子在所有模型中均未显示出对小鼠体重的影响区别。

蛋白名称	结构	SEQ ID NO	Chain	突变信息	可变区序列
I2_sp34.24_497_triFab	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		2	497_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:75
		3	497(SGL)_KCS_sp34.24_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	SEQ ID NO:76(第一可变区)
		4	hz5E12.1-L	N/A	SEQ ID NO:52
		5	hz5E12.1-H	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:48
I2_sp34.87_497_triFab	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		2	497_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:75
		6	497(SGL)_KCS_sp34.87_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	SEQ ID NO:76（第一可变区 SEQ ID NO:78（第二可变区
		4	hz5E12.1-L	N/A	SEQ ID NO:52
		5	hz5E12.1-H	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:48
I2_sp34.87_497_triFab	图1B	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		2	497_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:75
		7	KCS_sp34.87_D_hole_AA_497(SGL)	Q39D(第一个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V，Q39K F126C C220S(第二个 Fab)	SEQ ID NO:78（第一可变区 SEQ ID NO:76（第二可变区
		4	hz5E12.1-L	N/A	SEQ ID NO:52
		5	hz5E12.1-H	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:48
3LS)_sp34.87_5E12_triFa	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		8	GPRC5D_LC_Q38D_Q124C_C214S	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:79
		9	GPRC5D_KCS_sp34.87_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	SEQ ID NO:80（第一可变区 SEQ ID NO:78（第二可变区
		10	497_L	NA	SEQ ID NO:60
		11	497(SGL)_H_knob_AA	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:56
_sp34.87_497_triFab	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		2	497_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:75
		6	497(SGL)_KCS_sp34.87_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	SEQ ID NO:76（第一可变区 SEQ ID NO:78（第二可变区
		14	hz7F5K.g0	N/A	SEQ ID NO:44
		15	hz7F5H.g3-knob	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:40
I2_sp34.24_Hel_triFab	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		18	Hel_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	\
		20	Hel_KCS_sp34.24_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	\
		4	hz5E12.1-L	N/A	SEQ ID NO:52
		5	hz5E12.1-H	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:48
p34.24_497_triFab	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		2	497_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:75
		3	497(SGL)_KCS_sp34.24_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	SEQ ID NO:76（第一可变区 SEQ ID NO:77（第二可变区
		16	Hel_CL	N/A	\
		17	Hel_LALA_knob	L234A L235A, T366W	\
_sp34.24_497_triFab	图1A	1	sp34_K_CL(lambda)	Q38K	SEQ ID NO:74
		2	497_DCS_CL	Q38D Q124C C214S	SEQ ID NO:75
		3	497(SGL)_KCS_sp34.24_D_hole_AA	Q39K F126C C220S(第一个 Fab), Q39D(第二个 Fab), L234A L235A, T366S L368A Y407V	SEQ ID NO:76（第一可变区 SEQ ID NO:77（第二可变区
		14	hz7F5K.g0	N/A	SEQ ID NO:44
		15	hz7F5H.g3-knob	L234A L235A, T366W	SEQ ID NO:40

4.24-SC38497	图1C	4	hz5E12.1-H	L234A L235A, T366W	\
		5	hz5E12.1-L	N/A	\
		21	SP34.24-HC（hole）-sc38497	L234A L235A, T366S L368A Y407V，100C 44C(scFv)	\
		22	SP34-CL	N/A	\
4.87-SC38497	图1C	4	hz5E12.1-H	L234A L235A, T366W	\
		5	hz5E12.1-L	N/A	\
		23	SP34.87-HC（hole）-sc38497	L234A L235A, T366S L368A Y407V，100C 44C(scFv)	\
		22	SP34-CL	N/A	\
5458		24	bcma-VH	\	\
		25	Common L chain-VL	\	\
		26	CD3-1	\	\
PRC5D/CD3		27	JJ-GPRC5D-HC	\	\
		28	JJ-GPRC5D-LC	\	\
		29	JJ-CD3ε-HC	\	\
		30	JJ-CD3ε-LC	\	\
GPRC5D/CD3		31	5E11-GPRC5D-LC	\	\
		32	CD3-LC	\	\
		33	5E11-TCB-HC-hole	\	\
		34	5E11-TCB-HC-knob	\	\
CMA/CD3		35	BCMA69-CH1-Fc(hIgG4_LALAF405L)	\	\
		36	BCMA69-CL(hLambda)	\	\
		29	CD3B219-CH1-Fc(hIgG4_LALAF405L)	\	\
		30	CD3B219(Teclistamab)-CL(hLambda)	\	\
BCMA/CD3		32	CD3 VH-CL	\	\
		37	BCMA_VH_CH1xCD3_VL_CH1_Fc_knob LALA PG	\	\
		38	BCMA huIgG1 LC (BCMA LC)	\	\
		39	BCMA HC hole LALA PG (hole BCMA HC)	\	\

2、抗原结合区所来源抗体序列

类型	抗体名称	具体序列信息	SEQ ID NO
抗 GPRC5D 抗体	hz7F5.3	重链可变区	40
		HCDR1	41
		HCDR2	42
		HCDR3	43
		轻链可变区	44
		LCDR1	45
		LCDR2	46
		LCDR3	47
	hz5E12.1.P1	重链可变区	48
		HCDR1	49
		HCDR2	50
		HCDR3	51
		轻链可变区	52
		LCDR1	53
		LCDR2	54
		LCDR3	55
抗 BCMA 抗体	ADI-38497	重链可变区	56
		HCDR1	57
		HCDR2	58
		HCDR3	59
		轻链可变区	60
		LCDR1	61
		LCDR2	62
		LCDR3	63
抗 CD3 抗体	hzsp34.24	重链可变区	64
		HCDR1	65
		HCDR2	66
		HCDR3	67
		轻链可变区	68
		LCDR1	69
		LCDR2	70
		LCDR3	71
	hzsp34.87	重链可变区	72
		HCDR1	65
		HCDR2	66
		HCDR3	73
		轻链可变区	68
		LCDR1	69
		LCDR2	70
		LCDR3	71

3、其他序列

序列名称	突变信息	SEQ ID NO
野生型 IgG1 CH1 结构域	N/A	82

野生型 IgG1 CH2 结构域	N/A	83
野生型 IgG1 CH3 结构域	N/A	84
人 IgG1 CH1 突变	F126C	85
人 IgG1 CH1 突变	F126C,C220S	86
野生型人 IgG1 Fc 区多肽		87
野生型人 IgG4 Fc 区多肽		88
人 IgG1 Fc 区多肽（LALA 突变无 kih 突变）	L234A/L235A	89
人 IgG4 Fc 区多肽（LALA 突变无 kih 突变）	L234A/L235A	90
人 IgG1 Fc 区多肽(包含 hole 突变）	T366S、L368A、Y407V	91
人 IgG1 Fc 区多肽(包含 knob 突变）	T366W	92
人 IgG1 Fc 区多肽(包含 hole 突变和 LALA）	L234A、L235A、T366S、L368A、Y407V	93
人 IgG1 Fc 区多肽(包含 knob 突变和 LALA）	L234A、L235A、T366W	94
人 Kappa 轻链 CL 区	N/A	95
人 Lambda 轻链 CL 区	N/A	96
人 Kappa 轻链 CL 区	Q124C	97
人 Kappa 轻链 CL 区	Q124C 和 C214S	98
铰链区		99
阴性对照抗 Hel 抗体轻链		100
阴性对照抗 Hel 抗体重链		101
人的 BCMA 的全长氨基酸序列		102
BCMA-P34del（第 34 位氨基酸 P 缺失）氨基酸序列		103
BCMA- R27P（第 27 位氨基酸 R 突变为 P）氨基酸序列		104
BCMA- R39A（第 39 位氨基酸 R 突变为 A）氨基酸序列		105
BCMA- S30del（第 30 位氨基酸 S 缺失）氨基酸序列		106
人的 BCMA 的全长核酸序列		107
BCMA-P34del（第 34 位氨基酸 P 缺失）核酸序列		108
BCMA- R27P（第 27 位氨基酸 R 突变为 P）核酸序列		109
BCMA- R39A（第 39 位氨基酸 R 突变为 A）核酸序列		110
BCMA- S30del（第 30 位氨基酸 S 缺失）核酸序列		111

4、具体序列信息

SEQ ID NO:	序列
1	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDK AALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQDKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQKYFDITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
3	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWTWIRKPPGKGLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWGQGTLVTVSS ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS GGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVT

	MTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWTWIRKPPGKGLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWGQGTLVTVSS ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS GGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
7	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGSGGGGS QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWTWIRKPPGKGLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWGQGTLVTVSS ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS
8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQDKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRKAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVT MTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS GGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQKYFDITFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWTWIRQPPGKGLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
12	GACTCCAGAATGATGCCCCA
13	CAATAACGCTGACATGTTAG
14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGNMLPWTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL

	SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIVYIDYTGRTSYNPSLKSRVTLSRDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGRYYYVMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSR DDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQDKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
19	HTCPXCP
20	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRKAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSR DDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGG GGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGKCLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS
22	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDK AALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
23	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGG GGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGKCLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFWMTWVRQAPGKGLEWVANMNQDGSEKYYVDSVKGRFTIS RDNAKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDREYCISTSCYDDFDYWGQGTLVTVSS
25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
26	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYSMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSKGY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKFYHYGLDVWGQGTTV TVSS
27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP

	REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK
28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFT ISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK
30	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
31	DIVLTQSPALAVSPGQRATISCRASQSVSISGINLMNWYQQKPGQQPKLLIYHASILASGIPTRFSGSGSGTDFTL TIDPVQADDIATYYCQQTRESPLTFGSGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
33	ELQLEQSGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSKYAMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISR DNAKNTQYLQMDSLRSEDTATYYCATHTGDYFDYWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
34	ELQLEQSGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSKYAMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISR DNAKNTQYLQMDSLRSEDTATYYCATHTGDYFDYWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEP KSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK
36	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC DGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
38	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAI SRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
39	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC

	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
40	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIVYIDYTGRTSYNPSLKSRVTLSRDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGRYYYVMDYWGQGTLVTVSS
41	SDYAWN
42	YIDYTGRTSYNPSLKS
43	GNYGRYYYVMDY
44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGNMLPWTFGQGTKLEIK
45	RASQDIRNYLN
46	YTSRLHS
47	QQGNMLPWT
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVT MTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSS
49	GYVMH
50	YINPYNDVSQHQGKFKG
51	EGRLGLRVLAY
52	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
53	RASESVDSYGITFMN
54	AASNQGS
55	QQSKEVPWT
56	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWTWIRQPPGKGLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWGQGTLVTVSS
57	SSSYYWT
58	SISIAGSTYYNPSLKS
59	DRGDQILDV
60	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQKYFDITFGGGTKVEIK
61	RASQSISRYLN
62	AASSLQS
63	QQKYFDIT
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS
65	TYAMN
66	RIRSKYNNYATYYADSVKD
67	HGNFGQSYVSWFAY
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDK AALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVL
69	RSSTGAVTTSNYAN
70	GTNKRAP
71	ALWYSNLWV
72	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS
73	HYNFGQSYVSWFAY
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDK AALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVL
75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQDKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQKYFDITFGGGTKVEIK
76	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWTWIRKPPGKGLEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWGQGTLVTVSS
77	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS

78	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRDASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS
79	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQDKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRKAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVT MTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSS
81	CPXCP
82	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
83	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
84	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
86	ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**
87	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
88	PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
89	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
90	PPCPSCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK
91	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
92	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
93	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
94	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
95	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
96	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
97	RTVAAPSVFIFPPSDECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
98	RTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**
99	DKTHTCPXCP
100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
101	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSR DDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

	KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
102	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLM FLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAM EEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
103	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMF LLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAME EGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
104	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLPCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLM FLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAM EEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
105	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQAYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLM FLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAM EEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
106	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMF LLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAME EGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
107	ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCCCAAAATGAATATTTTGACAGTTTGTTGCATGCTTGCATACCTTG TCAACTTCGATGTTCTTCTAATACTCCTCCTCTAACATGTCAGCGTTATTGTAATGCAAGTGTGACCAATTC AGTGAAAGGAACGAATGCGATTCTCTGGACCTGTTTGGGACTGAGCTTAATAATTTCTTTGGCAGTTTTCG TGCTAATGTTTTTGCTAAGGAAGATAAACTCTGAACCATTAAAGGACGAGTTTAAAAACACAGGATCAGG TCTCCTGGGCATGGCTAACATTGACCTGGAAAAGAGCAGGACTGGTGATGAAATTATTCTTCCGAGAGGC CTCGAGTACACGGTGGAAGAATGCACCTGTGAAGACTGCATCAAGAGCAAACCGAAGGTgGACTCTGACC ATTGCTTTCCACTCCCAGCTATGGAGGAAGGCGCAACCATTCTTGTCACCACGAAAACGAATGACTATTG CAAGAGCCTGCCAGCTGCTTTGAGTGCTACGGAGATAGAGAAATCAATTTCTGCTAGG
108	ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCCCAAAATGAATATTTTGACAGTTTGTTGCATGCTTGCATACCTTG TCAACTTCGATGTTCTTCTAATACTCCTCTAACATGTCAGCGTTATTGTAATGCAAGTGTGACCAATTCAG TGAAAGGAACGAATGCGATTCTCTGGACCTGTTTGGGACTGAGCTTAATAATTTCTTTGGCAGTTTTCGTG CTAATGTTTTTGCTAAGGAAGATAAACTCTGAACCATTAAAGGACGAGTTTAAAAACACAGGATCAGGTC TCCTGGGCATGGCTAACATTGACCTGGAAAAGAGCAGGACTGGTGATGAAATTATTCTTCCGAGAGGCCT CGAGTACACGGTGGAAGAATGCACCTGTGAAGACTGCATCAAGAGCAAACCGAAGGTGGACTCTGACCA TTGCTTTCCACTCCCAGCTATGGAGGAAGGCGCAACCATTCTTGTCACCACGAAAACGAATGACTATTGC AAGAGCCTGCCAGCTGCTTTGAGTGCTACGGAGATAGAGAAATCAATTTCTGCTAGG
109	ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCCCAAAATGAATATTTTGACAGTTTGTTGCATGCTTGCATACCTTG TCAACTTCCTTGTTCTTCTAATACTCCTCCTCTAACATGTCAGCGTTATTGTAATGCAAGTGTGACCAATTC AGTGAAAGGAACGAATGCGATTCTCTGGACCTGTTTGGGACTGAGCTTAATAATTTCTTTGGCAGTTTTCG TGCTAATGTTTTTGCTAAGGAAGATAAACTCTGAACCATTAAAGGACGAGTTTAAAAACACAGGATCAGG TCTCCTGGGCATGGCTAACATTGACCTGGAAAAGAGCAGGACTGGTGATGAAATTATTCTTCCGAGAGGC CTCGAGTACACGGTGGAAGAATGCACCTGTGAAGACTGCATCAAGAGCAAACCGAAGGTGGACTCTGAC CATTGCTTTCCACTCCCAGCTATGGAGGAAGGCGCAACCATTCTTGTCACCACGAAAACGAATGACTATT GCAAGAGCCTGCCAGCTGCTTTGAGTGCTACGGAGATAGAGAAATCAATTTCTGCTAGG
110	ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCCCAAAATGAATATTTTGACAGTTTGTTGCATGCTTGCATACCTTG TCAACTTCGATGTTCTTCTAATACTCCTCCTCTAACATGTCAGGCTTATTGTAATGCAAGTGTGACCAATTC AGTGAAAGGAACGAATGCGATTCTCTGGACCTGTTTGGGACTGAGCTTAATAATTTCTTTGGCAGTTTTCG TGCTAATGTTTTTGCTAAGGAAGATAAACTCTGAACCATTAAAGGACGAGTTTAAAAACACAGGATCAGG TCTCCTGGGCATGGCTAACATTGACCTGGAAAAGAGCAGGACTGGTGATGAAATTATTCTTCCGAGAGGC CTCGAGTACACGGTGGAAGAATGCACCTGTGAAGACTGCATCAAGAGCAAACCGAAGGTGGACTCTGAC CATTGCTTTCCACTCCCAGCTATGGAGGAAGGCGCAACCATTCTTGTCACCACGAAAACGAATGACTATT GCAAGAGCCTGCCAGCTGCTTTGAGTGCTACGGAGATAGAGAAATCAATTTCTGCTAGG
111	ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCCCAAAATGAATATTTTGACAGTTTGTTGCATGCTTGCATACCTTG TCAACTTCGATGTTCTAATACTCCTCCTCTAACATGTCAGCGTTATTGTAATGCAAGTGTGACCAATTCAG TGAAAGGAACGAATGCGATTCTCTGGACCTGTTTGGGACTGAGCTTAATAATTTCTTTGGCAGTTTTCGTG CTAATGTTTTTGCTAAGGAAGATAAACTCTGAACCATTAAAGGACGAGTTTAAAAACACAGGATCAGGTC TCCTGGGCATGGCTAACATTGACCTGGAAAAGAGCAGGACTGGTGATGAAATTATTCTTCCGAGAGGCCT CGAGTACACGGTGGAAGAATGCACCTGTGAAGACTGCATCAAGAGCAAACCGAAGGTGGACTCTGACCA TTGCTTTCCACTCCCAGCTATGGAGGAAGGCGCAACCATTCTTGTCACCACGAAAACGAATGACTATTGC AAGAGCCTGCCAGCTGCTTTGAGTGCTACGGAGATAGAGAAATCAATTTCTGCTAGG

权 利 要 求

1、特异性结合 BCMA 的三特异性抗体，其包含特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区，以及特异性结合其他抗原的第二和第三抗原结合区。

2、权利要求 1 的三特异性抗体，其中所述第二抗原结合区特异性结合 CD3，和/或第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D。

3、权利要求 1 或 2 的三特异性抗体，其中所述第一抗原结合区、第二抗原结合区和第三抗原结合区分别为第一 Fab、第二 Fab 和第三 Fab。

4、权利要求 3 的三特异性抗体，其中

(1)第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 Fab 重链的 VH 的 N 末端；

或者

第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 Fab 重链的 VH 的 N 末端；

或者

(2)第一 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第三 Fab 在 Fab 重链的 VH 的 N 末端融合至与第二 Fab 融合的 Fc 区的 C 末端；或者

第三 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一的 CH2 或铰链区；第二 Fab 在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区的 CH2 或铰链区，且第一 Fab 在 Fab 重链的 VH 的 N 末端融合至与第二 Fab 融合的 Fc 区的 C 末端。

5、权利要求 4 的三特异性抗体，其中融合包括直接融合或通过接头融合。

6、权利要求 5 的三特异性抗体，其中所述接头是(GGGGS) n，其中 n=1、2、3 或 4。

7、权利要求 3-6 中任一项的三特异性抗体，其中第二 Fab 包含电荷突变，且与第二 Fab 融合或与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变。

8、权利要求 7 的三特异性抗体，其中所述电荷突变为在 Fab 的 VH 的第 39 位突变为 D 或 K，且在 Fab 的 VL 的 38 位突变为 K 或 D，例如

所述第二 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K，且

所述与第二 Fab 通过 Fc 区融合的第一或第三 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者

所述第二 Fab 包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，且所述 VL 包含 38D，且

所述与第二Fab通过Fc区融合的第一或第三Fab包含VH和VL，且所述VH包含39D，所述VL包含38K。

9、权利要求7或8的三特异性抗体，其中所述二硫键重塑突变为在Fab的CH1包含F126C且在Fab的CL包含Q124C。

10、权利要求9的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1，其中所述CH1

(i)包含与SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含F126C;或

(ii) 包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

11、权利要求9或10的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CL，其中所述CL

(i)包含与SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含Q124C;或

(ii) 包含SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

12、权利要求9的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1和CL，其中所述CH1包含SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列或由所述序列组成，且所述CL包含SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

13、权利要求7或8的三特异性抗体，其中所述二硫键重塑突变为在Fab的CH1包含F126C和C220S且在Fab的CL包含Q124C和C214S。

14、权利要求13的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1，其中所述CH1

(i)包含与SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含F126C和C220S;或

(ii) 包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

15、权利要求13或14的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CL，其中所述CL

(i)包含与SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列，且包含Q124C和C214S;或

(ii) 包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

16、权利要求13的三特异性抗体，其中所述包含二硫键重塑突变的Fab包含CH1和CL，其中所述CH1包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列或由所述序列组成，且所述CL包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

17、权利要求1-16中任一项的三特异性抗体，其中所述三特异性抗体包含第一Fc区和第二Fc区，其中第一Fc区和第二Fc区相同或不同。

18、权利要求 17 的三特异性抗体，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区分别为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，人 IgG3 Fc，或人 IgG4 Fc，例如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87 或 88 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。

19、权利要求 18 的三特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变。

20、权利要求 19 的三特异性抗体，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89 或 90; 或包含 SEQ ID NO: 89 或 90 所示的氨基酸序列具有至少 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氨基酸取代 L234A/L235A。

21、权利要求 17-20 中任一项的三特异性抗体，其中所述第一和第二 Fc 区之一包含 Knob 突变，另一包含 Hole 突变。

22、权利要求 21 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366W ，且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 T366S 、L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

23、权利要求 22 的三特异性抗体，其中一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

24、权利要求 23 的三特异性抗体，其中一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列或由其组成。

25、权利要求 17 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区包含氨基酸取代 L234A/L235A 和 T366W ,且另一个 Fc 区包含氨基酸取代 L234A/L235A 和 T366S ,L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

26、权利要求 25 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

27、权利要求 26 的三特异性抗体，其中所述一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列或由其组成。

28、权利要求 1-27 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; HCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; LCDR1 包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; LCDR2 包含 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成; 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:63 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

29、权利要求 28 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VH 含有 SEQ ID NO:56 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。

30、权利要求 28 或 29 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VL 含有 SEQ ID NO:60 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。

31、权利要求 30 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列组成，且所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区的 VL 由 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列组成。

32、权利要求 28 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 BCMA 的第一抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K

例如，

所述第一抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:76 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:76 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，且包含 Q39K 突变；

和/或所述第一抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:75 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，且包含 Q38D 突变。

33、权利要求 1-32 中任一项的三特异性抗体，其中所述第三抗原结合区特异性结合 GPRC5D，且包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:46 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

34、权利要求 33 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的

VH 含有

(i)SEQ ID NO:40 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；或

(ii) SEQ ID NO:48 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。

35、权利要求 33 或 34 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VL 含有

(i)SEQ ID NO:44 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；或

(ii) SEQ ID NO:52 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。

36、权利要求 35 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列组成，且所述 VL 由 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列组成；或者所述 VH 由 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列组成，且所述 VL 由 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列组成。

37、权利要求 33-36 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K，例如

所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:80 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，且包含 Q39K 突变；

且所述特异性结合 GPRC5D 的第三抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:79 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:79 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，且包含 Q38D 突变。

38、权利要求 1-37 中任一项的三特异性抗体，其中所述第二抗原结合区特异性结合 CD3，且包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:65 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:66 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:67 或 73 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

39、权利要求 38 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VH 含有 SEQ ID NO:64 或 72 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。

40、权利要求 38 或 39 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VL 含有 SEQ ID NO:68 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。

41、权利要求 40 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中所述 VH 由 SEQ ID NO:64 或 72 所示的氨基酸序列组成，且所述第二抗原结合区的 VL 由 SEQ ID NO:68 所示的氨基酸序列组成。

42、权利要求 38-41 中任一项的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区包含 VH 和 VL，且所述 VH 包含 39K，所述 VL 包含 38D；或者所述 VH 包含 39D，且所述 VL 包含 38K。

43、权利要求 42 的三特异性抗体，其中所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VH

(i) 包含 SEQ ID NO:77 或 78 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO: 77 或 78 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，且包含 Q39D 突变；

且所述特异性结合 CD3 的第二抗原结合区的 VL

(i) 包含 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或

(ii)包含与 SEQ ID NO:74 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，且包含 Q38K 突变。

44、权利要求 3-43 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成:

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#,

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#,

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#,

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链 1#的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链 3#的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第一和第二 Fab。

45、权利要求 44 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

46、权利要求 44 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:15 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 2#包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:14 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:3 或 6 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:3 或 6 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

47、权利要求 1-43 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 BCMA 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#，

一条包含特异性结合 BCMA 的 Fab 轻链的肽链 2#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链、特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域的肽链 3#，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第一 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第三和第二 Fab。

48、权利要求 47 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:11 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 2#包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:10 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 3#包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:9 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 4#包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:8 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成。

49、权利要求 1-43 中任一项的三特异性抗体，其是由 5 条多肽链组成左右非对称的 IgG 样五聚体，其由如下肽链组成，

一条依次包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 重链和 Fc 结构域的肽链 1#,

一条包含特异性结合 GPRC5D 的 Fab 轻链的肽链 2#,

一条依次包含特异性结合 CD3 的 Fab 重链、Fc 结构域，特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 重链的肽链 3#,

一条包含特异性结合 CD3 的 Fab 轻链的肽链 4#,以及

一条包含特异性结合 BCMA 的抗原结合区的 Fab 轻链的肽链 5#,

其中肽链#1 的 Fab 重链和肽链 2#的 Fab 轻链配对形成第三 Fab，肽链#3 的两个 Fab 重链分别与肽链 4#以及肽链 5#的 Fab 轻链配对，形成第二和第一 Fab。

50、权利要求 49 的三特异性抗体，其中

肽链 1#包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:5 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，或由所述氨基酸序列组成;

肽链 2#包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:4 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 3#包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:7 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，或由所述氨基酸序列组成；

肽链 4#包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 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，或由所述氨基酸序列组成；和/或

肽链 5#包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 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，或由所述氨基酸序列组成。

51、核酸分子，其编码权利要求 1-50 中任一项的三特异性抗体的任一条链，或由所述核酸序列组成。

52、表达载体，其包含权利要求 51 的核酸分子，例如所述表达载体是 pCNDA 载体，例如 pCDNA3.1 表达载体。

53、宿主细胞，其包含权利要求 51 所述的核酸分子或权利要求 52 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 HEK293 细胞。

54、制备权利要求 1-50 中任一项的三特异性抗体的方法，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 51 所述的核酸分子或权利要求 52 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。

55、免疫缀合物，其包含权利要求 1-50 中任一项的三特异性抗体。

56、药物组合物或药物或制剂，其包含权利要求 1-50 中任一项的三特异性抗体，或权利要求 55 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

57、药物组合，其包含权利要求 1-50 中任一项的三特异性抗体，或权利要求 55 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂。

58、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 1-50 中任一项的三特异性抗体，或权利要求 55 的免疫缀合物，或权利要求 56 的药物组合物或制剂；或权利要求 57 的药物组合。

59、权利要求 58 的方法，其中所述癌症是 GPRC5D 单阳性癌症、BCMA 单阳性癌症、GPRC5D 和 BCMA 双阳性癌症或 BCMA 和 GPCR5D 双低表达癌症，例如 GRPC5D 低表达且/或 BCMA 低表达癌症（例如抗 BCMA 治疗或抗 GPRC5D 治疗后复发的癌症）。

60、权利要求 58 或 59 的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如所述癌症是多发性骨髓瘤。

61、权利要求 58-60 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）组合施用。