

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年2月24日 (24.02.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/037528 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/112758

(22) 国际申请日: 2021年8月16日 (16.08.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010842501.X 2020年8月20日 (20.08.2020) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(72) 发明人: 甄子朋 (ZHEN, Zipeng); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 谢美娟 (XIE, Meijuan); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 杜秀贞 (DU, Xiuzhen); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 马毅敏 (MA, Yimin); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 张兵 (ZHANG, Bing); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 徐同杰 (XU, Tongjie); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 张喜全 (ZHANG, Xiquan); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) Title: SINGLE VARIABLE DOMAIN AND ANTIGEN BINDING MOLECULE BINDING BCMA

(54) 发明名称: 结合BCMA的单可变结构域及抗原结合分子

(57) Abstract: Provided is an immunoglobulin single variable domain and antigen binding molecule binding BCMA, specifically comprising an immunoglobulin single variable domain and antigen binding molecule, a nucleic acid for encoding the binding molecule, a vector containing the nucleic acid, a cell containing the vector, and a pharmaceutical composition containing the above. Further provided is a therapeutic use thereof.

(57) 摘要: 提供了一种结合BCMA的免疫球蛋白单可变结构域及抗原结合分子, 具体地包括免疫球蛋白单可变结构域及抗原结合分子、编码它们的核酸、包含该核酸的载体、包含该载体的细胞、包含它们的药物组合物, 还提供了其治疗用途。



WO 2022/037528 A1

结合 BCMA 的单可变结构域及抗原结合分子

技术领域

本发明涉及抗原结合分子，尤其涉及结合 BCMA 的单可变结构域及抗原结合分子。

背景技术

B 细胞成熟抗原(BCMA)，也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 17(TNFRSF17)，是一种在人体中由 TNFRSF17 基因编码的蛋白质。

BAFF、APRIL 是 BCMA 的配体，其中 BAFF(也称为 BLyS、TALL-1、THANK、zTNF4、TNFSF20、D8Ert387e)是 BCMA 的高亲和力配体，APRIL(增殖诱导配体，也称为 TNFSF13、TALL-2、TRDL-1)是 BCMA 的低亲和力配体。此外，BAFF、APRIL 还是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员 B 细胞活化因子受体(B-cell activation factor receptor; BAFF-R)、跨膜激活剂及钙调亲环素配体相互作用分子(transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor; TACI)的配体。BCMA 与 BAFF-R、TACI 一起调控 B 细胞的增殖、存活、成熟与分化。

多发性骨髓瘤是一种恶性浆细胞病，在多发性骨髓瘤细胞中，BCMA 的表达水平显著增加。BCMA 可以是针对多发性骨髓瘤的免疫治疗剂的合适肿瘤抗原靶标。免疫治疗剂如与 BCMA 结合的抗体可阻断 BCMA 和其天然配体 BAFF 或/和 APRIL 之间的结合。作为潜在的治疗靶点，已有一些靶向 BCMA 的抗体被开发，但仍然是有限的，需要更多可用的选择。

骆驼科动物体内的 IgG 抗体，除传统包含轻链和重链的 4 链结构抗体 IgG1 外，还天然存在不含有轻链的仅重链抗体(HcAb) IgG2 和 IgG3。仅重链抗体中的单个可变区结构域(V_HH 或单可变结构域)具备特异性结合抗原的特点，且对抗原具有较高的亲和力，被称为单域抗体(sdAb)。基于其独特性，使用 V_HH 结构域-单独或作为较大抗原结合分子的一部分，具有一些比常规 scFv、抗体片段如 Fab 等更加显著的优势，例如仅需要单一结构域以高亲和力特异结合抗原、可容易地改造成多价及多特异性形式、V_HH 结构域高度可溶且无聚集趋势、分子小从而显示较高的组织渗透性、单域抗体不需要与轻链配对，在组成双特异性抗体或多特异性抗体时不存在轻重链错配问题，等等。

发明内容

本发明提供了结合 BCMA 的单可变结构域及抗原结合分子。本发明还提供了能够编码所提供的单可变结构域及抗原结合分子的相关核苷酸、载体、细胞、组合物、构建方法及用途。

在一方面，本发明提供了分离的单可变结构域，其结合 BCMA，其中所述单可变结构域包含选自以下的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

(a)与选自 SEQ ID NO: 7、10、13 和 16 的氨基酸序列具有至少 70%的序列同一性的 CDR1；

(b)与选自 SEQ ID NO: 8、11、14 和 17 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR2；和

(c)与选自 SEQ ID NO: 9、12、15 和 18 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR3。

在一些实施方案中，所述单可变结构域包含选自以下任一组的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

(i)包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 CDR3；

(ii)包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列的 CDR3；

(iii)包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列的 CDR3；或

(iv)包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的 CDR3。

在一些实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的序列同一性的氨基酸序列。

在一方面，本发明提供了分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在一方面，本发明提供了分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的氨基酸序列。

在一方面，本发明提供了分离的单可变结构域，其结合 BCMA 胞外区，结合位点处于所述 BCMA 胞外区的 Gln7-His19、Pro23-Ser30 以及 Asn31-Ser44 位置中的一个或多个氨基酸，BCMA 胞外区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 或 SEQ ID NO: 36 所示。该处所述位置从人 BCMA 胞外区的第一个氨基酸（位置 1）开始顺次编号。

在一方面，本发明提供了分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域与本文任一实施方案中所述的单可变结构域结合相同表位。

在一方面，本发明提供了分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域与本文任一实施方案中所述的单可变结构域竞争结合 BCMA。

在一些实施方案中，本文上述单可变结构域是骆驼科动物的或人源化的。在一些实施方案中，本文上述单可变结构域是 V_HH，优选是骆驼科动物的或人源化的 V_HH。

在一方面，本发明提供了本文所述的单可变结构域的用途，包括用于构建抗原结合分子优选抗体、单特异性抗体、多特异性抗体或免疫偶联物。

在一方面，本发明提供了分离的抗原结合分子，其结合 BCMA 且包含至少一个本文所述的单可变结构域。

在一方面，本发明提供了组合物，其包含活性成分以及药学上可接受的载体，其中活性成分为本文所述的单可变结构域或根据本文所述的抗原结合分子。在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含如 SEQ ID NO: 27、29、31 或 33 所示氨基酸序列。

在一方面，本发明提供了分离的核酸，其编码本文所述的单可变结构域或本文所述的抗原结合分子。

在一方面，本发明提供了载体，其包含本文所述的分离的核酸。

在一方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本文所述的载体。

在一方面，本发明提供了检测或测量样品中的 BCMA 的方法，其包括使所述样品与本文所述的单可变结构域或本文所述的抗原结合分子接触并且检测或测量结合复合物。

在一方面，本发明提供了制备本文所述的单可变结构域的方法，包括：培养所述的宿主细胞，分离所表达的所述单可变结构域，其中载体为表达载体，所述宿主细胞包含编码所述单可变结构域的核酸。

在一方面，本发明提供了制备所述的抗原结合分子的方法，包括：培养所述的宿主细胞，分离所表达的所述抗原结合分子，其中载体为表达载体，所述宿主细胞包含编码所述抗原结合分子的核酸。

在另一方面，本发明提供了治疗患有表达 BCMA 的肿瘤的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的所述的单可变结构域、所述的抗原结合分子或所述的组合物。

在另一方面，本发明提供了抑制、减少或阻断细胞中的 BCMA 信号传导的方法，其包括向所述细胞施用有效量的所述的单可变结构域、所述的抗原结合分子或所述的组合物。

在另一方面，本发明提供了杀伤表达 BCMA 的肿瘤细胞或抑制表达 BCMA 的肿瘤细胞生长的方法，其包括使所述肿瘤细胞与所述的单可变结构域、所述的抗原结合分子或所述的组合物接触。

在另一方面，本发明提供了治疗患有自身免疫性疾病的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的组合物。

附图说明

图 1 为 ELISA 检测抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体结合抗原的曲线；

图 2A 为流式细胞术检测抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体与 CHO-hBCMA 细胞的结合曲线；

图 2B 为流式细胞术检测抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体与 U266 细胞的结合曲线；
图 2C 为流式细胞术检测抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体与 RPMI8226 细胞的结合曲线；
图 2D 为流式细胞术检测抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体与 HUVEC 细胞的结合曲线；
图 3A 为流式细胞术检测 1A10-Fc、1A11-Fc 嵌合抗体与 HEK293T-CynoBCMA 的结合曲线；
图 3B 为流式细胞术检测 1A10-Fc、1A11-Fc 嵌合抗体与 HEK293T 的结合曲线；
图 4 显示了人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体与配体 APRIL 的竞争 ELISA 检测结果；
图 5A 为人、食蟹猴 BCMA 的胞外区氨基酸序列对比图；
图 5B 为人 BCMA 的胞外区晶体结构；
图 5C 为 1A1、1A10、1A11 和 1B10 的表位关系。

具体实施方式

术语

术语“抗原结合分子”在其最广泛的含义上指特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合分子的一些实例是抗体、融合蛋白、抗体偶联物。

术语“免疫球蛋白”指具有天然存在的抗体的结构的蛋白质。例如，人 IgG 类的免疫球蛋白是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白，由二硫键连接的两条轻链和两条重链组成。从 N 端至 C 端，每条重链具有重链可变区(VH)，随后是铰链区(HR)和三个恒定结构域(CH1、CH2 和 CH3)，也称为重链恒定区。在 IgE 类免疫球蛋白的情况下，重链还具有 CH4 结构域。因此，免疫球蛋白重链是在 N 端至 C 端方向上由以下结构域组成的多肽：VH-CH1-HR-CH2-CH3-(CH4)。类似地，从 N 端至 C 端，每条轻链具有轻链可变区(VL)，随后是恒定轻链结构域，也称为轻链恒定区(CL)。因此，免疫球蛋白轻链是在 N 端至 C 端方向上由以下结构域组成的多肽：VL-CL。人的免疫球蛋白基本上由通过免疫球蛋白铰链区连接的两个 Fab 和 Fc 结构域组成。

术语“抗体”以最广泛的含义使用，涵盖包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体、三特异性抗体)以及抗体片段的多种抗体结构，只要它们显示希望的抗原结合活性。

术语“可变结构域”或“可变区”是指抗体的涉及该抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的每个可变结构域基本上由四个“框架区”和三个互补决定区组成。四个“框架区”在本领域中和在下文中分别称为“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”；所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此，可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。可变结构域因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。

术语“单可变结构域”是指能够在不与其他可变结构域配对的情况下特异性结合抗原表位的可变结构域。单可变结构域的抗原结合位点通常由三个 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)形成，存在于单个结构域上。在一些情况下，单可变结构域可以是重链可变结构域(例如 VH)或其合适的片段；只要它能够形成单个抗原结合单元(即基本上由单可变结构域组成的功能性抗原结合单元，这样单抗原结合结构域就不需要与另一个可变结构域相互作用即可形成功能性抗原结合单元)。单可变结构域的另一个实例为骆驼科的“VHH 结构域”(或简称为“VHH”或“V_HH”)。

“VHH 结构域”，亦称为 VHH、V_HH、V_HH 结构域或单域抗体，最初被描述为“仅重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的结合抗原的可变结构域。使用术语“VHH 结构域”以将这些可变结构域与存在于常规 4 链抗体中的重链可变结构域(其在本文中称为“VH 结构域”或“VH”)以及存在于常规 4 链抗体中的轻链可变结构域(其在本文中称为“VL 结构域”或“VL”)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规 4 链抗体中的 VH 或 VL 结构域不同，在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。

“CDR”(互补决定区)，也称为“高变区(HVR)”通常是指在序列上高度可变和/或形成结构限定的环的抗体可变区的每个区域。天然四链抗体通常包含六个 CDR，三个在重链可变区中(重链 CDR1、重链 CDR2 和重链 CDR3)，三个在轻链可变区中(轻链 CDR1、轻链

CDR2和轻链CDR3)。仅重链抗体或单可变结构域通常具有三个CDR(CDR1(或HVR1)、CDR2(或HVR2)和CDR3(或HVR3))。CDR3显示出在三种CDR中最具多样性,并且据信在赋予抗体精细特异性方面发挥了独特的作用。

当前有许多方法来划分定义CDR。其中, Kabat定义基于序列可变性划分CDR,并且是最常用的(Elvin A.Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991));而Chothia定义则基于结构环的位置(Cyrus Chothia, et al, Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM 定义是Kabat定义和Chothia定义之间的折衷方案,并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触(contact)”定义CDR的基础是对可用的复合物晶体结构的分析。这些CDR中的每个的残基记录于下表S1。

表S1 CDR划分

CDR	Kabat	AbM	Chothia	接触(contact)
VL CDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
VL CDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
VL CDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
VH CDR1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat编号)	H26-H32	H30-H35B
VH CDR1	H31-H35	H26-H35 (Chothia编号)	H26-H32	H30-H35
VH CDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
VH CDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

在本文的某些特定语境下,“互补决定区”、“CDR”、或“HVR”用于指Kabat定义的CDR(Elvin A.Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))。基于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定任意定义的CDR包含哪些氨基酸残基,对于其他任意定义(例如Chothia、AbM定义等)的CDR也将涵盖在本发明的范围内。

单可变结构域(诸如V_HH)的氨基酸残基编号根据Kabat等人(Elvin A.Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))给出的VH通用编号系统进行,如在Riechmann等人的文章(L Riechmann, et al, Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains, J. Immunol. Methods.(1999))中应用于骆驼科动物的V_HH结构域。根据该编号, V_HH的FR1包含位置1-30处的氨基酸残基, V_HH的CDR1包含位置31-35处的氨基酸残基, V_HH的FR2包含位置36-49处的氨基酸, V_HH的CDR2包含位置50-65处的氨基酸残基, V_HH的FR3包含位置66-94处的氨基酸残基, V_HH的CDR3包含位置95-102处的氨基酸残基, V_HH的FR4包含位置103-113处的氨基酸残基。在这方面,应该注意的是,正如本领域熟知的VH和V_HH,每个CDR中氨基酸残基的总数是可以变化的,并且可能不对应于Kabat编号所指示的氨基酸残基总数(即,在实际序列中根据Kabat编号的一个或多个位置可以不被占用,或实际序列可能含有比Kabat编号允许的数量更多的氨基酸残基)。

“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变化是指Kabat等人(Elvin A.Kabat, et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))用于编码抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,实际线性氨基酸序列可以含有更少或另外的氨基酸,这些氨基酸对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可包括CDR2的氨基酸残基52之后的单个氨基酸插入物(根据Kabat的氨基酸残基52a)和重链FR氨基酸残基82之后的插入氨基酸残基(例如根据Kabat的氨基酸残基82a、82b和82c等)。对于给定抗体而言,可以通过抗体序列与“标准”Kabat编号的同源区序列比对来确定给定抗体的氨基酸残基的Kabat编号。

术语“框架区”或“FR”残基是除了本文定义的CDR残基之外的那些可变结构域的氨基酸残基。

术语“人共有框架区”或“受体人框架”是代表人免疫球蛋白VL或VH框架区序列的

选择中最常出现的氨基酸残基的框架。一般而言，人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。一般而言，序列的亚组是Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中的亚组。实例包括：对于VL，亚组可以是Kabat等人(出处同上)所述的亚组 κ I、 κ II、 κ III或 κ IV。另外，对于VH，亚组可以是Kabat等人所述的亚组I、亚组II或亚组III。或者，人共有区框架可衍生自上文特定的残基，比如当通过将供体框架区序列与各种人框架区序列的集合进行比对根据人框架区残基与供体框架区的同源性来选择人框架区残基时“衍生自”人共有框架区的受体人框架可包含其相同的氨基酸序列，或它可含有预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中，预先存在的氨基酸变化的数目为10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小或2或更小。

术语“Fc 结构域”或“Fc”用来定义免疫球蛋白重链的C端区域，其包含至少部分恒定区。该术语包括天然序列Fc和变体Fc。Fc的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的Lys447)可存在或不存在。

术语“EC50”是指有效浓度，抗原结合分子的50%最大应答。术语“IC50”是指抑制浓度，抗原结合分子的50%最大应答。EC50和IC50两者均可以通过ELISA或FACS分析或本领域已知的任何其他方法进行测量。

术语“KD”在用于本文时指平衡解离常数，以摩尔浓度(M)表示。抗原结合分子的KD值可以使用本领域公知的方法测定。一种测定抗原结合分子KD的方法是使用表面等离子共振(surface plasmon resonance)，如使用生物传感器系统，例如Biacore系统。

术语“治疗”是指为了以统计学显著的方式治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进或影响疾患(例如疾病)、疾患的症状，或预防或延缓症状、并发症、生化指标的发作，或以其他方式阻滞或抑制疾病、疾患或病症的进一步发展而使用措施。

术语“治疗有效量”是指向受试者提供治疗性和/或预防性益处所必需的抗原结合分子或组合物或其他施用物的量。

术语“受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。优选地，根据本发明的受试者是人。除非标明，术语“患者”或“受试者”可以互换使用。

术语“特异性的结合”或“特异性结合”意为结合对于抗原而言是选择性的并且可以与不需要或非特异性的相互作用区别开。抗原结合分子或单可变结构域与特定抗原决定簇结合的能力可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其它技术测量，例如表面等离子体共振(SPR)技术(在Biacore仪器上分析)。

术语“分离的”是指已经从其天然环境中分离的目标化合物(例如，VHH、抗原结合分子、抗体或核酸)。

术语“表位”或可互换使用的术语“抗原决定簇”指抗体的互补位所结合的抗原上的任何抗原决定簇。抗原决定簇通常包含分子的化学活性表面基团，例如氨基酸或糖侧链，并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性”表位或“构象”表位。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

术语序列“同一性(identity)”，也称一致性。两序列间的百分比同一性为序列共有的相同位置数的函数(即%同一性=相同位置数/位置总数 \times 100)，其中需考虑产生两序列的最优比对需要引入的缺口数和每个缺口的长度。如下述非限制性实施例所示，可以使用数学算法完成序列的比较和两序列间百分比同一性的测定。可以使用E.Meyers和W.Miller的算法(*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17(1988))测定两氨基酸序列间的百分比同一性，该算法已收入到ALIGN程序(版本2.0)中，其使用PAM120残基权重表，缺口长度罚分为12，缺口罚分为4。此外，可以使用Needleman和Wunsch的算法(*J. Mol. Biol.* 484-453(1970))测定两氨基酸序列的百分比同一性，该算法已掺入到GCG软件包(可在www.gcg.com获得)中的GAP程序中，

其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵, 缺口权重为 16、14、12、10、8、6 或 4, 长度权重为 1、2、3、4、5 或 6。

如本文所用,“约”表示在本领域普通技术人员判定的对特定值可以接受的误差范围内, 其部分取决于如何测量或测定该值, 即测量系统的限制。例如,“约”按照本领域实践可表示 1 倍或超过 1 倍标准偏差以内。或者,“约”可以表示多至 5%(即 $\pm 5\%$)的范围, 例如在所给定的具体数值范围 $\pm 2\%$ 范围内、 $\pm 1\%$ 范围内或 $\pm 0.5\%$ 范围内波动。此外, 特别对于生物学系统或方法, 该术语可以表示多至一个数量级或多至某值的 5 倍。当本申请或权利要求中给出特定值时, 除非另有说明,“约”的含义应认为是在该特定值的可接受的误差范围内。

在本文中, 除非另有说明, 术语“包括”或其等同物(例如含有、包含等)为开放式术语, 表示包括但不限于所指明的要素、步骤或者组成, 而是对于未指明的要素、步骤或者组成是开放的。

在本文中, 除非另有说明, 否则单数术语涵盖复数的指代物, 反之亦然。

为了描述和公开的目的, 以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息, 并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且, 在任何国家, 在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。本发明的各个方面将在下述分部中进一步详细描述。

单可变结构域

本发明的一个方面提供结合至 BCMA(诸如人 BCMA)的经分离的单可变结构域。单可变结构域为靶向 BCMA 药物的开发或药物构建提供了更多可用的选择。所述单可变结构域具有诸多期望的治疗特性, 例如对人 BCMA 具有良好的亲和力, 能够阻断增殖诱导配体 APRIL 与 BCMA 的结合。特别的, 在一些方案中, 单可变结构域与人 TACI 和 BAFFR 蛋白不结合, 表现了特异性; 在一些实施方案中与猴 BCMA 有交叉反应, 由于猴是药物毒理实验中的理想实验动物, 与猴的交叉反应将利于药物毒理实验的开展。

在一些实施方案中, 提供了包含 SEQ ID NO:19 所示单可变结构域的一个、两个或全部三个 CDR 的结合 BCMA 的单可变结构域。一个具体的实施方案, 提供了包含 SEQ ID NO:19 所示单可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的结合 BCMA 的单可变结构域。在一些实施方案中, 提供了包含 SEQ ID NO:21 所示单可变结构域的一个、两个或全部三个 CDR 的结合 BCMA 的单可变结构域。一个具体的实施方案, 提供了包含 SEQ ID NO:21 所示单可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的结合 BCMA 的单可变结构域。在一些实施方案中, 提供了包含 SEQ ID NO:23 所示单可变结构域的一个、两个或全部三个 CDR 的结合 BCMA 的单可变结构域。一个具体的实施方案, 提供了包含 SEQ ID NO:23 所示单可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的结合 BCMA 的单可变结构域。在一些实施方案中, 提供了包含 SEQ ID NO:25 所示单可变结构域的一个、两个或全部三个 CDR 的结合 BCMA 的单可变结构域。一个具体的实施方案, 提供了包含 SEQ ID NO:25 所示单可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的结合 BCMA 的单可变结构域。在一些实施方案中, 单可变结构域是骆驼科动物的。在一些实施方案中, 单可变结构域是人源化的。在一些实施方案中, 单可变结构域包含受体人框架。

在一些实施方案中, 提供了包含选自以下的至少一个、至少两个或全部三个 CDR 的结合 BCMA 的单可变结构域: (a)包含选自 SEQ ID NO:7、10、13 和 16 的氨基酸序列的 CDR1; (b)包含选自 SEQ ID NO:8、11、14 和 17 的氨基酸序列的 CDR2; 和(c)包含选自 SEQ ID NO:9、12、15 和 18 的氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中, 单可变结构域是骆驼科动物的。在一些实施方案中, 单可变结构域是人源化的。在一些实施方案中, 单可变结构域包含受体人框架。

在一些实施方案中, 提供了包含三种 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)的结合 BCMA 的单可变结构域, 所述 CDR 包括: (a)与选自 SEQ ID NO:7、10、13 和 16 的氨基酸序列具有

至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR1；(b)与选自 SEQ ID NO: 8、11、14 和 17 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR2；和(c)与选自 SEQ ID NO: 9、12、15 和 18 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR3。在一些具体的实施方案中，提供了包含三种 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)的结合 BCMA 的单可变结构域，所述 CDR 包括：(a)与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR1；(b)与 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR2；和(c)与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR3。在一些具体的实施方案中，提供了包含三种 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)的结合 BCMA 的单可变结构域，所述 CDR 包括：(a)与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR1；(b)与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR2；和(c)与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR3。在一些具体的实施方案中，提供了包含三种 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)的结合 BCMA 的单可变结构域，所述 CDR 包括：(a)与 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列具有至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR1；(b)与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR2；和(c)与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR3。在一些具体的实施方案中，提供了包含三种 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)的结合 BCMA 的单可变结构域，所述 CDR 包括：(a)与 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列具有至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 CDR1；(b)与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约

99%或约100%中的任一者的序列同一性的CDR2；和(c)与SEQ ID NO: 18的氨基酸序列具有至少约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%中的任一者的序列同一性的CDR3。在一些实施方案中，具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%中的任一者的同一性的CDR相对于参考序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失，但包含该序列的单可变结构域保留了结合至BCMA的能力。在一些实施方案中，提供了包含三种CDR(CDR1、CDR2和CDR3)的单可变结构域，所述CDR包括：(a)与选自SEQ ID NO: 7、10、13和16的氨基酸序列相比，具有约1个或约2个中的任一者的氨基酸取代(例如，保守取代)、插入或缺失的CDR1；(b)与选自SEQ ID NO: 8、11、14和17的氨基酸序列相比，具有约1个、约2个或约3个中的任一者的氨基酸取代(例如，保守取代)、插入或缺失的CDR2；和(c)与选自SEQ ID NO: 9、12、15和18的氨基酸序列相比，具有约1个、约2个或约3个中的任一者的氨基酸取代(例如，保守取代)、插入或缺失的CDR3。在一些实施方案中，单可变结构域是亲和力成熟的。在一些实施方案中，单可变结构域是骆驼科动物的。在一些实施方案中，单可变结构域是人源化的。在一些实施方案中，单可变结构域包含受体人框架。

在一些实施方案中，提供了包含三种CDR(CDR1、CDR2和CDR3)的结合BCMA的单可变结构域，所述CDR包括：包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1；包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR2；和包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中，提供了包含三种CDR(CDR1、CDR2和CDR3)的结合BCMA的单可变结构域，所述CDR包括：包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR1；包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2；和包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中，提供了包含三种CDR(CDR1、CDR2和CDR3)的结合BCMA的单可变结构域，所述CDR包括：包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR1；包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR2；和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中，提供了包含三种CDR(CDR1、CDR2和CDR3)的结合BCMA的单可变结构域，所述CDR包括：包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR1；包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR2；和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中，单可变结构域是骆驼科动物的。在一些实施方案中，单可变结构域是人源化的。在一些实施方案中，单可变结构域包含受体人框架。

在一些实施方案中，单可变结构域(包括上述任何实施方案，例如上述包含特定CDR1、CDR2和/或CDR3的单可变结构域)包含与选自SEQ ID NO:19、21、23和25的氨基酸序列具有至少约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%中的任一者的序列同一性的V_HH。在一些具体的实施方案中，单可变结构域(包括上述任何实施方案，例如上述包含特定CDR1、CDR2和/或CDR3的单可变结构域)包含与选自SEQ ID NO: 19的氨基酸序列具有至少约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%中的任一者的序列同一性的V_HH。在一些具体的实施方案中，单可变结构域(包括上述任何实施方案，例如上述包含特定CDR1、CDR2和/或CDR3的单可变结构域)包含与选自SEQ ID NO: 21的氨基酸序列具有至少约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%中的任一者的序列同一性的V_HH。在一些具体的实施方案中，单可变结构域(包括上述任何实施方案，例如上述包含特定CDR1、CDR2和/或CDR3的单可变结构域)

域)包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 V_HH 域。在一些具体的实施方案中,单可变结构域(包括上述任何实施方案,例如上述包含特定 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的单可变结构域)包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 V_HH。在一些更具体的实施方案中,单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 V_HH, 并且 V_HH 包括: 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1, 包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR2, 和包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中,单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 V_HH, 并且 V_HH 包括: 包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列的 CDR1, 包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 CDR2, 和包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中,单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 V_HH, 并且 V_HH 包括: 包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列的 CDR1, 包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列的 CDR2, 和包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中,单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%中的任一者的序列同一性的 V_HH, 并且 V_HH 包括: 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 CDR1, 包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的 CDR2, 和包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中,具有至少约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%中的任一者的同一性的 V_HH 序列相对于参考序列含有取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的单可变结构域保留了结合至 BCMA 的能力。在一些实施方案中,在选自 SEQ ID NO: 19、21、23 和 25 的氨基酸序列中总共 1-18、1-16、1-14、1-12、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3 或 1-2 个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,取代、插入或缺失发生在 CDR 之外的区域中(即,FR 中)。在一些实施方案中,取代、插入或缺失发生在 CDR 区域,例如发生 CDR1、CDR2、CDR3 中的一个、两个或三个。在一些实施方案中,取代、插入或缺失发生在 CDR 区域和非 CDR 区域。任选地,单可变结构域包含选自 SEQ ID NO: 19、21、23 和 25 的氨基酸序列,包括该序列的翻译后修饰。

在一些实施方案中,提供了包含 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的氨基酸序列的 V_HH 的经分离的单可变结构域。

在一些实施方案中,所述单可变结构域(包括上述任何实施方案,例如上述包含特定 CDR1、CDR2和/或CDR3的单可变结构域)是V_HH。基本V_HH从N-末端至C-末端具有以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1至FR4分别指框架区1至4,其中CDR1至CDR3是指互补决定区1至3。

在一些实施方案中,所述单可变结构域(包括上述任何实施方案,例如上述包含特定 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的单可变结构域)是人源化的 V_HH。源自非人的单可变结构域可通过以人常规 4 链抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始单可变结构域序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而经“人源化”。人源化可以期望的降低免疫原性。

在一些实施方案中,根据上述实施方案中的任一种的单可变结构域可单独地或组合地包括下述性质特征中的一种或几种:

- (i)结合人 BCMA;
- (ii)结合猴 BCMA;
- (iii)阻断 APRIL 与 BCMA 的结合; 或
- (iv)与人 TACI 或/和 BAFFR 蛋白不结合。

在一些实施方案中,所述的单可变结构域结合人 BCMA。在一些实施方案中,所述的单可变结构域结合人 BCMA 和猴 BCMA 如食蟹猴 BCMA。

在一些实施方案中,所述的单可变结构域阻断 APRIL 与 BCMA 的结合。

在一些实施方案中,所述的单可变结构域与人 TACI 或/和 BAFFR 蛋白不结合,表现了良好的特异性。

在一些实施方案中,所述的单可变结构域组合上述性质特征(i)-(ii)。在一些实施方案中,所述的单可变结构域组合上述性质特征(i)和(iii); 在一些实施方案中,所述的单可变结构域组合上述性质特征(i)、(iii)和(iv); 在一些实施方案中,所述的单可变结构域组合上述性质特征(i)-(iv)。

在一些实施方案中,本发明提供了与本文所述的单可变结构域中的任一者结合相同表位的单可变结构域。在一些具体的实施方案中,提供与包含 SEQ ID NO:19、21、23 或 25 的氨基酸序列的单可变结构域结合相同的表位的单可变结构域。在一些实施方案中,所述结合相同表位的单可变结构域是骆驼科动物的、或人源化的。

可使用本领域技术人员已知的常规技术,就与相同表位的结合竞争性筛选单可变结构域。例如,可进行竞争和交叉竞争研究,以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的单可变结构域。因此,在一些实施方案中,本发明提供了与本文所述的单可变结构域中的任一者竞争结合至 BCMA 的单可变结构域。在一些具体的实施方案中,提供与包含 SEQ ID NO:19、21、23 或 25 的氨基酸序列的单可变结构域竞争结合至 BCMA 的单可变结构域。可以通过 ELISA、流式细胞术、表面等离子体共振(SPR)测定或本领域已知的任何其他方法测量与 BCMA 的结合。在一些实施方案中,所述竞争结合至 BCMA 的单可变结构域是骆驼科动物的、或人源化的。

本发明提供了一些示例性的结合 BCMA 的单可变结构域。本文提供的示例性的单可变结构域的 CDR (CDR1、CDR2 和 CDR3) 的氨基酸序列提供于下表 S2 中。示例性的单可变结构域的全长氨基酸序列提供于下表 S3 中。

表 S2: 单可变结构域的 CDR 序列

名称	CDR1	CDR2	CDR3
1A1 单可变结构域	GWNKH (SEQ ID NO: 7)	SIFRDGKTAYTDSVKG (SEQ ID NO: 8)	DLPGSGLPAF (SEQ ID NO: 9)
1A10 单可变结构域	VACMA (SEQ ID NO: 10)	TIVADFGTTNYAASVKG (SEQ ID NO: 11)	TQRGGIDWCDEINY (SEQ ID NO: 12)
1A11 单可变结构域	SACMG (SEQ ID NO: 13)	RIETGYGGTVYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	KRSWCTPTWWHELDYNY (SEQ ID NO: 15)
1B10 单可变结构域	GWNKH (SEQ ID NO: 16)	SIFRDGKTAYTDSVKG (SEQ ID NO: 17)	DLPGSGLPEF (SEQ ID NO: 18)

表 S3: 单可变结构域全长序列

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
1A1 单可变结构域	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTFRGWNKHWYRQ APGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQDNADATVYL QMNSLKPEDTAMY YCKYDLPGSGLPAFWGQGLTVTVSS	19
1A10 单可变结构域	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLS CAASGYSSNVACMAWYRQ APGKEREWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNAKNTV YLQMNSLKPEDSAMYYCAATQ RGGIDWCDEINYWGQGLTVTVSS	21
1A11 单可变结构域	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLS CAASGVTFNSACMGWFRQ APGKEREGVARIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLKPEDTAMY YCAAKRSWCTPTWWHELDYNYW GQGTQVTVSS	23
1B10 单可变结构域	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTFRGWNKHWYRQ APGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQDSADATVYL QMNSLKPEDTAMY YCKYDLPGSGLPEFWGQGLTVTVSS	25

抗原结合分子

本发明的单可变结构域可以用于构建任何需要的抗原结合分子,从而赋予抗原结合分子靶向结合 BCMA 的特性或其他所述单可变结构域的特性。因此,本发明提供了包含至少一个(一个或多个)本发明单可变结构域的分选的抗原结合分子。

在一些实施方案中,所述抗原结合分子包含至少一个单可变结构域,所述单可变结构域包含选自以下任意一组的 CDR1、CDR2 和 CDR3:

(i)SEQ ID NO: 7 所示的 CDR1, SEQ ID NO: 8 所示的 CDR2, 和 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR3;

(ii)SEQ ID NO: 10 所示的 CDR1, SEQ ID NO: 11 所示的 CDR2, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR3;

(iii)SEQ ID NO: 13 所示的 CDR1, SEQ ID NO: 14 所示的 CDR2, 和 SEQ ID NO: 15 所示的 CDR3; 或

(iv)SEQ ID NO: 16 所示的 CDR1, SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2, 和 SEQ ID NO: 18 所示的 CDR3。

在一些实施方案中,所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 所示的氨基酸序列。一些更具体的实施方案,所述单可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 所示。

当抗原结合分子包含的单可变结构域是两个或两个以上时,可以选择相同或不同的单可变结构域。

所述的抗原结合分子包括抗体、单特异性抗体、多特异性抗体或免疫偶联物。在一个实施方案中,所述的抗原结合分子是抗体。一个具体的例子,抗体是单特异性抗体,另一个具体的例子,抗体是双特异性抗体。在一个实施方案中,所述抗体或免疫偶联物包含免疫球蛋白恒定区。一个更具体的实施方案,所述的抗体或免疫偶联物包含人免疫球蛋白 Fc。优选的,所述 Fc 为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc。

在一些实施方案中,所述抗原结合分子是骆驼科动物的、嵌合的或人源化的。

在一些实施方案中,根据上述实施方案中的任一种的抗原结合分子可单独地或组合地包括下述性质特征中的一种或几种:

(i)结合人 BCMA;

(ii)结合猴 BCMA;

(iii)阻断 APRIL 与 BCMA 的结合; 或

(iv)与人 TACI 或/和 BAFFR 蛋白不结合。

在一些实施方案中,所述的抗原结合分子结合人 BCMA。在一些实施方案中,所述的抗原结合分子对人 BCMA 具有下述结合亲和力(KD): 在约 1E-12 M 至约 1E-08M、约 1E-11 M 至约 1E-08 M、约 8.12E-10 M 至约 1.29E-10 M、或约 8.12E-10 M 至约 3.13E-10 M 的范

围内。在一些实施方案中，所述抗原结合分子对人 BCMA 具有下述结合亲和力(KD)：约 1E-08 M 或更小、约 1E-09 M 或更小、约 8.12E-10 M 或更小、约 6.49E-10 M 或更小、约 3.13 E-10 M 或更小，或，约 1.29 E-10 M 或更小。在一些实施方案中，通过 Biacore 来测量本文提供的抗原结合分子的结合亲和力 KD。

在一些实施方案中，所述的抗原结合分子结合人 BCMA 和猴 BCMA。例如 1A10 单可变结构域、1A11 单可变结构域、1A10-Fc、1A11-Fc 不仅对人 BCMA 具有良好的亲和力，还与食蟹猴 BCMA 有结合。与猴 BCMA 的交叉反应将有利于药物毒理实验的开展与进行。

在一些实施方案中，所述的抗原结合分子阻断 APRIL 与 BCMA 的结合。

在一些实施方案中，所述的抗原结合分子与人 TACI 或/和 BAFFR 蛋白不结合，表现了良好的特异性。

在一些实施方案中，所述的抗原结合分子组合上述性质特征(i)-(ii)。在一些实施方案中，所述的抗原结合分子组合上述性质特征(i)和(iii)；在一些实施方案中，所述的抗原结合分子组合上述性质特征(i)、(iii)和(iv)；在一些实施方案中，所述的抗原结合分子组合上述性质特征(i)-(iv)。

本发明提供了示例性的抗原结合分子，如单特异性抗体(包括 1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc 和 1B10-Fc 抗体)，将单可变结构域与人 IgG1 的 Fc 融合，通过 Fc 形成同二聚体。示例性的单特异性抗体的氨基酸序列提供于下表 S4 中。

表 S4：示例性抗原结合分子的全长序列

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
1A1-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRSLCTASGYTFRGWNKHWYR QAPGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQDNADATV YLQMNSLKPEDTAMYYCKYDLPGSGLPFWGQGLVTV SSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
1A10-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRSLCAASGYSSNVACMAWYR QAPGKEREWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNAKN TVYLYQMNSLKPEDSAMYYCAATQRGGIDWCDEINYWG QGLTVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	29
1A11-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRSLCAASGVTFNSACMGWFR QAPGKEREGVARIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDAKN TVYLYQMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWCTPTWWHELDYN YWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	31
1B10-Fc	EVQLVESGGGSVQAGGSLRSLCTASGYTFRGWNKHWYR QAPGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQDSADATV YLQMNSLKPEDTAMYYCKYDLPGSGLPEFWGQGLVTV	33

	SSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
--	--	--

组合物

本发明提供了药物组合物，其包含活性成分以及药学上可接受的载体，其中活性成分为本文所述的单可变结构域或本文所述的抗原结合分子。在一些实施方案中，将 1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc 和 1B10-Fc 抗体的任意一个或几个，以及药学上可接受的载体制成药物组合物。药学上可接受的载体包括，例如，赋形剂、稀释剂、包封材料、填充剂、缓冲剂或其他试剂。

分离的核酸

本发明提供了分离的核酸，其编码本文所述的单可变结构域或本文所述的抗原结合分子。在一些实施方案中，所述核酸编码单可变结构域，如 1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc 或 1B10-Fc 的单可变结构域。在一些实施方案中，所述核酸编码抗原结合分子，如 1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc 或 1B10-Fc。序列表中示例性的列举了一些单可变结构域、抗原结合分子的核酸序列。

载体

本发明提供了包含所述的分离的核酸的载体。在一些实施方案中，所述的载体为克隆载体；在另一些实施方案中，所述的载体为表达载体。所述表达载体可选的能够表达本文所述单可变结构域或抗原结合分子的任意表达载体，一个具体的例子，表达载体为 pcDNA3.1。

宿主细胞

在一些实施方案中，本文提供包含本文所述载体的宿主细胞，宿主细胞为用于克隆或表达单可变结构域或抗原结合分子的适当宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为原核细胞。在另一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳细胞或适用于制备抗原结合分子的其他细胞。哺乳细胞例如为中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、CHO-S 细胞。

制备单可变结构域或抗原结合分子的方法

在一些实施方案中，本文提供了制备单可变结构域的方法，所述方法包括：培养包含编码本文所述单可变结构域的核酸的宿主细胞，从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述单可变结构域。在一些实施方案中，本文提供了制备抗原结合分子的方法，所述方法包括：培养包含编码本文所述抗原结合分子的核酸的宿主细胞，从所述宿主细胞或宿主细胞培养基中回收所述抗原结合分子。

为了产生所述的单可变结构域或抗原结合分子，将编码所述单可变结构域或抗原结合分子的核酸插入载体，用于在宿主细胞中进一步克隆或/和表达。所述核酸可以采用基因拼接、化学合成等多种本领域所熟知的方法获取。

用途

本发明提供了单可变结构域或抗原结合分子的用途。

本发明提供了治疗患有表达 BCMA 的肿瘤的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的组合物。需要治疗的受试者包括那些已经患有疾病或病状的受试者，以及可能患疾病或病状并且其目的是预防、延迟或减弱疾病或病状的受试者。本发明还提供了本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的组合物在制备治疗患有表达 BCMA 的肿瘤的受试者的药物中的用途。

本发明提供了抑制、减少或阻断细胞中的 BCMA 信号传导的方法，其包括向所述细胞施用有效量的本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的组合物。本发明还提供了单可变结构域或抗原结合分子在制备抑制、减少或阻断细胞中的 BCMA 信号传导的药物中的用途。一些实施方案中，细胞为肿瘤细胞。

本发明提供了杀伤表达 BCMA 的肿瘤细胞或抑制表达 BCMA 的肿瘤细胞生长的方法，其包括使所述肿瘤细胞与本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的

组合物接触。本发明还提供了所述的单可变结构域、抗原结合分子或本文所述的组合物在制备杀伤表达 BCMA 的肿瘤细胞或抑制表达 BCMA 的肿瘤细胞生长的药物中的用途。

上述肿瘤可以为 B 细胞恶性肿瘤，具体的实例例如淋巴瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤或白血病。

本发明提供了治疗患有自身免疫性疾病的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的组合物。本发明还提供了本文所述的单可变结构域、本文所述的抗原结合分子或本文所述的组合物在制备治疗患有自身免疫性疾病的受试者的药物中的用途。所述自身免疫性疾病可以为系统性红斑狼疮。

在一些实施方案中，提供了检测或测量样品中的 BCMA 的方法，其包括使所述样品与本文所述的单可变结构域或抗原结合分子接触并且检测或测量结合复合物。

尽管为了清楚理解的目的，已经通过举例说明和实施例相当详细地描述了前述发明，但是根据本发明的教义，本领域的普通技术人员将显而易见的是，可另外对本发明进行某些改变和修改而不背离所附权利要求的精神和范围。以下实施例仅以说明方式提供，而并不起限制作用。本领域的技术人员将容易地识别多种非关键性参数，所述参数可发生改变或修改以产生基本上类似的结果。

具体实施方式

实施例1 抗BCMA单域抗体噬菌体展示文库构建

1.1 动物免疫

将重组人BCMA-Fc融合蛋白(ACRO, 产品目录No.BC7-H5254)与完全弗氏佐剂按照体积比1:1混合乳化, 对双峰驼进行首次皮下多点注射免疫; 之后每间隔2周, 将重组人BCMA-Fc融合蛋白与不完全弗氏佐剂按照体积比1:1混合乳化后进行加强免疫。在第4或第5次免疫之后取血清检测抗人BCMA抗体的滴度。在多次免疫后取双峰驼外周血, 分离外周血单个核细胞(PBMC)。

1.2 RNA提取

使用TRIzol™试剂从PBMC(来自1.1)中提取总RNA。提取的总RNA用1%琼脂糖凝胶电泳来评估质量, 并通过测量260 nm和280 nm下的吸光度来定量, OD_{260nm}/OD_{280nm}的比值应在1.8-2.0之间。

1.3 V_HH扩增

用cDNA合成试剂盒PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA, 产品目录No.6210A)按照说明, 将总RNA逆转录成cDNA。使用巢式PCR法扩增骆驼抗体的可变区序列, 具体方法如下。以cDNA为模板, 使用引物Call001(SEQ ID NO:1)和Call002(SEQ ID NO:2)进行第一轮PCR扩增, 扩增得到的DNA产物短片用胶回收试剂盒(QIAGEN, 产品目录No. 28706)纯化。以第一轮PCR产物为模板, 使用引物V-Back(SEQ ID NO:3)和V-Fwd(SEQ ID NO:4)进行第二轮PCR扩增, 扩增得到的DNA产物即为V_HH编码片段, 用胶回收试剂盒(QIAGEN, 产品目录No. 28706)进行纯化。

Call001(SEQ ID NO:1): GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG

Call002(SEQ ID NO:2): GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

V-Back(SEQ ID NO:3): GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

V-Fwd(SEQ ID NO:4): CTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT

第一轮及第二轮的PCR反应程序为: 94 °C 预变性6 min, 随后进行94 °C 变性30 s、55 °C 退火30 s、72 °C 延伸30 s, 共反应30个循环, 最后进行72 °C 延伸10min。

1.4 V_HH噬菌体文库构建

将巢式PCR扩增得到的V_HH编码片段经PstI/NotI内切酶酶切后, 插入噬菌粒载体pMECS(NTCC质粒载体菌种细胞基因保藏中心, 产品目录No. pMECS)中, 构建成重组载体, 并电转入大肠杆菌TG1(Lucigen, 产品目录No. 60502-1)中。取一小部分转化后的菌液稀释后

涂布含有100 µg/ml氨苄青霉素的选择性平板,通过菌落计数法来计算文库容量,并随机挑取100个克隆测序来评估文库质量。其余菌液涂布含有100 µg/ml氨苄青霉素的选择性平板,从平板上刮下菌落的菌苔,补充甘油后冻存于-80 °C作为文库原种。将V_HH文库原种扩增到对数生长期,加入M13KO7辅助噬菌体(New England Biolabs, 产品目录No. N0315S)进行文库扩增,28 °C、200转/分钟振摇过夜。将菌液离心取上清,加入上清1/4体积的PEG6000/NaCl溶液(20% PEG6000(w/v), 2.5M NaCl),冰上孵育1-2小时沉淀噬菌体,离心收取噬菌体沉淀,用PBS重悬后加20%甘油保存于-80 °C作为单域抗体噬菌体展示文库。

实施例2 抗人BCMA单域抗体筛选

2.1 淘选

采用固相淘选的方式对单域抗体噬菌体展示文库进行淘选。将重组BCMA-Avitage™(ACRO, 产品目录No. BCA-H82E4)固定在高吸附酶标板上,封闭后将1.4中获得的噬菌体加入孔板中37 °C孵育1-2 h。采用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗10次以去除非特异性结合的噬菌体,PBS清洗后,用trypsin酶将结合的噬菌体洗脱下来,用4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐(AEBSF)将酶中和后,感染大肠杆菌TG1扩增后进行下一轮文库淘选。通过2-3轮淘选富集后,将收集的噬菌体感染对数生长期大肠杆菌TG1,涂布含20%(w/v)葡萄糖和100 µg/ml氨苄青霉素的选择性平板。挑取单克隆进行培养,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达制备上清。

2.2 阳性克隆鉴定

通过针对人BCMA-His(ACRO, 产品目录No. BCA-H522y)的间接ELISA方法对挑选的克隆进行阳性鉴定。将人BCMA-His或对照蛋白人Fc蛋白(ACRO, 产品目录No. FCC-H5214)包被在高吸附酶标板上,然后用封闭液封闭,加2.1中制备的上清37°C孵育1小时,清洗后加HRP缀合的抗HA标签二抗(GenScript, 产品目录No. A01296),37 °C孵育0.5小时,清洗5次,加显色底物进行显色,检测450 nm波长及650 nm参比波长处光吸收信号值。挑选仅结合人BCMA-His且信号值比较高的阳性克隆进行保种并测序。筛选获得阳性克隆1A1、1A10、1A11和1B10。经序列分析,1A1的V_HH核苷酸序列为SEQ ID NO: 20,氨基酸序列为SEQ ID NO: 19;1A10的V_HH核苷酸序列为SEQ ID NO: 22,氨基酸序列为SEQ ID NO: 21;1A11的V_HH核苷酸序列为SEQ ID NO: 24,氨基酸序列为SEQ ID NO: 23;1B10的V_HH核苷酸序列为SEQ ID NO: 26,氨基酸序列为SEQ ID NO: 25。

实施例3 制备抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体

3.1 V_HH-Fc嵌合抗体的制备

将筛选的阳性克隆的V_HH序列与人Fc区的连接,构建V_HH-Fc嵌合抗体。具体的,将2.2中测序获得的V_HH序列或抗人BCMA V_HH对照抗体(BM)序列(氨基酸序列与CN109153731A中SEQ ID NO: 125相同)插入含有人IgG1恒定区(氨基酸序列为SEQ ID NO: 5)的pCDNA3.1真核表达载体中,使用Expifectamine™ CHO Transfection Kit瞬转表达系统(Thermo Fisher Scientific Inc., 产品目录No. A29129)表达这些V_HH-Fc嵌合抗体(BM-Fc为对照)。使用蛋白A亲和柱纯化后,采用针对人BCMA-His蛋白的间接ELISA法(方法参见3.2)检测V_HH-Fc嵌合抗体与人BCMA蛋白的结合活性,并采用表面等离子技术共振技术检测抗体与人TACI、BAFFR蛋白的结合情况(方法参见3.3)。经检测1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc、和1B10-Fc均可特异性结合BCMA-His蛋白,而不结合人TACI、BAFFR蛋白。经序列分析,1A1-Fc的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 27,核苷酸序列如SEQ ID NO: 28;1A10-Fc的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 29,核苷酸序列如SEQ ID NO: 30;1A11-Fc的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 31,核苷酸序列如SEQ ID NO: 32;1B10-Fc的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 33,核苷酸序列如SEQ

ID NO: 34。

3.2 间接ELISA法检测抗体与人BCMA-His蛋白的结合

将2 µg/ml 人BCMA-His蛋白(ACRO, 产品目录No. BCA-H522y)包被在高吸附酶标板上, 然后用3%(w/v) BSA封闭液封闭, 加入100 µl/孔梯度稀释(初始浓度126 nM, 5倍梯度稀释, 7个浓度)的抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体, 37 °C孵育1小时, 清洗后加HRP缀合的抗人IgG Fc标签二抗(PerkinElmer, 产品目录No. NEF802001EA), 37 °C孵育0.5小时, 清洗5次, 加100 µl/孔TMB底物溶液(TIANGEN, 产品目录No.PA107)进行显色, 检测450 nm波长及650 nm参比波长处光吸收信号值, 拟合曲线(图1)并计算EC50值(表1)。

表1 V_HH-Fc嵌合抗体与人BCMA-His蛋白亲和力

V _H H-Fc 嵌合抗体	EC50(nM)
1A1-Fc	0.069
1A10-Fc	0.150
1A11-Fc	0.210
1B10-Fc	0.131

3.3 表面等离子技术共振技术检测抗体与人TACI、BAFFR蛋白的结合

使用生物分子相互作用分析系统(GE, Biacore T200)检测抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体的特异性。氨基偶联Anti-hIgG(Fc) Antibody(GE, 产品目录No. BR-1008-39)至CM5传感芯片, 使用运行缓冲液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.05% surfactant P-20(w/v), pH 7.4)稀释抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体至2 µg/ml, 30 µl/min流速通过实验通道进行捕获90 s。使用运行缓冲液稀释人TACI或BAFFR蛋白至100 nM, 50 µl/min流速结合, 观察结合信号曲线。1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc和1B10-Fc均未观察到结合曲线, 与TACI、BAFFR蛋白均不结合。

实施例4 抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与人、食蟹猴BCMA的亲和力

4.1 表面等离子技术共振技术测定抗体与人、食蟹猴BCMA的亲和力

使用生物分子相互作用分析系统(GE, Biacore T200)进行抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体的亲和力检测。氨基偶联Anti-hIgG(Fc) Antibody(GE, 产品目录No. BR-1008-39)至CM5传感芯片, 使用运行缓冲液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.05% surfactant P-20(w/v), pH 7.4)稀释抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体至1 µg/ml, 30 µl/min流速通过实验通道进行捕获。使用运行缓冲液稀释人BCMA-His(ACRO, 产品目录No. BCA-H522y)或食蟹猴BCMA-His(ACRO, 产品目录No.BCA-C52H7)至100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nmol/L、6.25 nM、3.125 nM, 50 µl/min流速结合, 结合时间设置为200 s, 之后停止进样进行解离, 解离时间设置为800 s。软件BiaControl Software 2.0实时采集数据信号, 软件BiaEvaluation Software 2.0数据分析, 用Langmuir 1: 1模型拟合, 计算结合速率常数K_a (1/Ms)、解离速率常数K_d(1/s)、平衡常数K_D(M)值。检测结果如表2所示, 1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc和1B10-Fc与人BCMA蛋白均有较高的亲和力, 其中1A10-Fc和1A11-Fc与食蟹猴BCMA蛋白有交叉反应。

表2 V_HH-Fc嵌合抗体与人、食蟹猴BCMA的亲和力

V _H H-Fc 嵌合抗体	人BCMA-his			食蟹猴BCMA-His		
	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)
1A1-Fc	1.14E+06	7.42E-04	6.49E-10	不结合		
1A10-Fc	1.52E+06	4.76E-04	3.13E-10	1.26E+06	2.94E-02	2.33E-08

1A11-Fc	1.74E+06	1.41E-03	8.12E-10	6.57E+05	6.31E-02	9.61E-08
1B10-Fc	1.53E+06	1.98E-04	1.29E-10		不结合	
BM-Fc	7.42E+05	2.43E-04	3.28E-10		不结合	

4.2 流式细胞术测定抗体与细胞的结合

采用流式细胞术检测抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与BCMA不同表达水平的靶细胞的结合,其中CHO-hBCMA细胞(爱康得生物医学技术(苏州)有限公司,产品目录No.AKD001A)为BCMA高表达的稳转细胞系,U266细胞(中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,产品目录No.3111C0001CCC000684)为BCMA中等表达水平的天然人骨髓瘤细胞系,PRMI8226细胞(中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,产品目录No.3111C0001CCC000083)为BCMA低表达水平的天然人骨髓瘤细胞系,HUVEC细胞(ScienCell Research Laboratories,产品目录No.AKD001A 8000)为不表达BCMA的人脐静脉内皮细胞系。用梯度稀释(初始浓度126 nM,5倍梯度稀释,6个浓度)的抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体孵育2×10⁵靶细胞,冰上孵育1小时后清洗细胞,加PE标记的抗人IgG Fc抗体(Jackson Immuno Research,产品目录No.109-116-170),冰上孵育0.5小时,清洗细胞后使用流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific Inc., Attune NXT)检测。

如图2A~2C,表3所示,1A1-Fc、1A10-Fc、1A11-Fc和1B10-Fc均可有效靶向结合BCMA表达水平较高的CHO-hBCMA细胞以及BCMA中等表达水平的U266细胞,与BCMA表达水平偏低的RPMI8226细胞也有明显的结合,1A10-Fc和1A11-Fc对U266细胞的结合优于BM-Fc。如图2D所示,1A10-Fc和1A11-Fc与不表达BCMA的HUVEC细胞无结合,但1A1-Fc和1B10-Fc与不表达BCMA的HUVEC细胞有结合。

表3 抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与靶细胞的亲和力

V _H H-Fc嵌合抗体	CHO-hBCMA 细胞	U266 细胞
	EC50(nM)	EC50(nM)
1A1-Fc	3.04	2.77
1A10-Fc	4.28	4.64
1A11-Fc	2.08	1.26
1B10-Fc	2.51	1.72
BM-Fc	4.06	6.02

4.3流式细胞术测定抗体与瞬转食蟹猴BCMA的HEK293T细胞的结合

体外合成食蟹猴BCMA全长(SEQ ID NO: 6)基因并插入到pCDNA3.1真核表达载体中。根据制造商方案,使用Lipofectamine™ 3000(Thermo Fisher Scientific Inc.,产品目录No.L3000015)将表达载体转染到HEK293T细胞中。简而言之,将HEK293T细胞按照5×10⁵/孔铺入6孔板。约24小时后吸去含胎牛血清培养基并用PBS清洗细胞,之后按照每孔DNA:Lipo3000=5 μg:7.5 μl的比例加入转染试剂。约6小时后更换为含10%胎牛血清(v/v)的培养基。转染约24小时后取细胞进行流式细胞术检测。

将1A10-Fc、1A11-Fc及BM-Fc抗体进行梯度稀释(初始浓度126 nM,5倍梯度稀释,5个浓度,样品稀释液为阴性对照组),分别孵育2×10⁵个瞬转食蟹猴BCMA和未转染的HEK293T细胞,冰上孵育1小时后清洗细胞,加PE标记的抗人IgG Fc抗体(Jackson Immuno Research,产品目录No.109-116-170),冰上孵育0.5小时,清洗细胞后使用流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific Inc., Attune NXT)检测。图3A采用瞬转食蟹猴BCMA的HEK293T细胞(HEK293T-CynoBCMA),图3B采用未转染食蟹猴BCMA的HEK293T细胞,表4为Fc嵌合抗体与瞬转食蟹猴BCMA的HEK293T细胞结合的EC50值和最大结合MFI值(B_{max})。结果表明,1A10-Fc、

1A11-Fc结合细胞的食蟹猴BCMA，BM-Fc抗体不结合食蟹猴BCMA。

表4 抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与瞬转食蟹猴BCMA的HEK293T细胞的结合

V _H H-Fc 嵌合抗体	EC50(nM)	Bmax(MFI)
1A10-Fc	2.02	2475.0
1A11-Fc	10.36	501.8
BM-Fc	/	217.0
阴性对照	/	157.0

实施例5 抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体阻断APRIL与BCMA的结合

将梯度稀释(初始浓度252 nM, 5倍梯度稀释, 7个浓度)的抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体1A10-Fc、1A11-Fc分别与100 ng/ml生物素缀合的重组BCMA-His蛋白(ACRO, 产品目录No.BCA-H522y)按照1:1的体积比混合并室温孵育1小时后, 加入到固定有重组APRIL蛋白(ACRO, 产品目录No.APL-H5244)的酶标板中, 同时设置对照组仅加入50 ng/ml生物素缀合的重组BCMA-His蛋白; 37℃孵育1小时, 清洗掉未结合的生物素缀合的BCMA-His蛋白, 加入HRP缀合的链霉亲和素(eBioscience, 产品目录No. 18-4100-51), 洗板5次后进行显色。检测450 nm波长及650 nm参比波长处光吸收信号值。按照公式结合量= 样品信号值/对照组信号值×100%, 计算各抗体的各浓度样品对BCMA与APRIL结合量, 并进行曲线拟合。结果如图4和表5所示, 1A1-Fc、1B10-Fc、1A10-Fc和1A11-Fc均可有效阻断APRIL与BCMA的结合。

如图5A所示, 人BCMA胞外区与食蟹猴BCMA胞外区氨基酸序列存在差异的位置为Gly6、Ala20、Ile22、Asn31、Val45和Thr52。克隆1A10和1A11与食蟹猴BCMA蛋白有交叉反应, 据此推测这两个克隆可能的表位位于Gln7~His19, 和/或Pro23~Ser30, 和/或Asn31~Ser44, 和/或Thr46~Gly51。图5B为PDB数据库中人BCMA的胞外区结构(PDB编号: 2kn1)。如图5A、5B所示, 人BCMA的胞外区含有3对二硫键, 分别为Cys8-Cys21、Cys24-Cys37和Cys28-Cys41; 人BCMA与APRIL主要结合在β-发卡结构上(Bossen, C. et al. Semin. Immunol. 2006, 18(5):263-275), 据此推测克隆1A10-Fc和1A11-Fc的主要结合位点在Gln7~His19之间, 和/或Pro23~Ser30之间, 和/或Asn31~Ser44之间。

表5 抗人BCMA V_HH-Fc阻断APRIL与BCMA的结合

V _H H-Fc嵌合抗体	IC50(nM)
1A1-Fc	0.34
1A10-Fc	0.41
1A11-Fc	0.76
1B10-Fc	0.26

实施例6 抗人BCMA V_HH不同克隆间的表位差异分析

6.1 ELISA(棋盘法)检测抗人BCMA V_HH不同克隆间的竞争关系

将人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体稀释至2 μg/ml, 包被在高吸附酶标板中并洗板后封闭; 将20 μg/ml的人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与生物素缀合的BCMA-His蛋白(ACRO, 产品目录No.BCA-H522y)室温孵育0.5小时得抗原抗体混合物, 按照棋盘排布方法, 按顺序将孵育的抗体抗原混合物或仅生物素缀合的BCMA-His蛋白(对照组)按100 μl/孔加入孔板37℃孵育1小时; 清洗掉未结合的生物素缀合的BCMA-His蛋白, 加入HRP缀合的链霉亲和素(eBioscience, 产品目录No. 18-4100-51), 洗板5次后进行显色。检测450 nm波长及650 nm参比波长处光吸收信号值。按照公式阻断率=(对照组信号值-样品组信号值)/对照组信号值×100%, 计算一个抗体对另一抗体与BCMA-Bio结合信号的阻断率。结果如表6所示, 棋盘中“v”对角线位置(灰

色标记)为抗体自我竞争的阳性对照组, 阻断率均达到99%以上。1A10-Fc对1A11-Fc与人BCMA结合的阻断率(32.6%)小于50%, 且1A11-Fc对1A10-Fc与人BCMA结合的阻断率(21.6%)亦小于50%, 说明1A10-Fc与1A11-Fc之间不存在明显竞争关系, 表明1A10-Fc与1A11-Fc可同时结合BCMA蛋白的不同表位。同理, 1A10-Fc与1A1-Fc, 1A10-Fc与1B10-Fc之间也均不存在明显竞争关系, 表明1A10-Fc与1A1-Fc可同时结合BCMA蛋白的不同表位, 1A10-Fc与1B10可同时结合BCMA蛋白的不同表位。1A1-Fc、1A11-Fc和1B10-Fc相互间的阻断率均超过99%。

表6 ELISA(棋盘法)表位竞争

棋盘法	1A1-Fc	1A10-Fc	1A11-Fc	1B10-Fc
1A1-Fc	100.1%	7.6%	99.4%	101.2%
1A10-Fc	36.9%	100.4%	32.6%	46.4%
1A11-Fc	100.6%	21.6%	99.7%	99.4%
1B10-Fc	100.3%	26.7%	99.5%	100.6%

6.2 表面等离子技术共振技术表位差异分析

使用生物分子相互作用分析系统(GE, Biacore T200)进行表位竞争关系分析。氨基偶联 Anti-His Antibody(GE, 产品目录No. 28995056)至CM5传感芯片, 使用运行缓冲液稀释BCMA-His蛋白(ACRO, 产品目录No.BCA-H522y)至1 μg/ml左右, 30 μl/min流速通过实验通道进行捕获, 通过调整结合时间将捕获信号控制在180 RU-190 RU。使用运行缓冲液稀释抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体 V_HH-Fc1至10 μg/ml(饱和浓度, 浓度增加后结合信号值不变)进样至信号到达平台, 进样结束后立即进另一抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体V_HH-Fc2。观察抗体结合曲线并分别记录两个抗体的结合信号值。信号值变化如表7所示, 1A10-Fc抗体与BCMA结合达到饱和的信号值为472.5RU; 此时再进样1A11-Fc, 饱和信号值为579.0RU, 与单独进样1A11-Fc的饱和信号值653.1RU相当。反之亦然, 且正反两种进样顺序累积信号值相当, 说明1A10-Fc和1A11-Fc可以同时结合BCMA蛋白上的不同表位。

表7 V_HH-Fc抗体SPR信号值变化及分析

	BCMA 捕获信号 (RU)	VHH-Fc1	VHH-Fc2	VHH-Fc1 结合信号 (RU)	VHH-Fc2 结合信号 (RU)	累积信号值(RU)
RUN1	184.0	1A10-Fc	A11-Fc	472.5	579.0	1051.5
RUN2	184.6	1A11-Fc	A10-Fc	653.1	405.5	1058.6

6.3 流式细胞术表位差异分析

由于细胞膜上表达的 BCMA 蛋白可能与游离蛋白在表位的有效暴露方面存在差异, 因此采用流式细胞术进一步确认 1A10、1A11 两个克隆是否可以同时结合细胞膜上的 BCMA 蛋白。靶细胞为 U266 细胞。将 20 μg/ml 或 10 μg/ml 的 1A10-Fc、1A11-Fc 抗体单独孵育 2×10⁵ 靶细胞, 或将 20 μg/ml 的 1A10-Fc 抗体与 20 μg/ml 的 1A11-Fc 抗体按照 1:1 体积比混合后孵育 2×10⁵ 靶细胞, 冰上孵育 1 小时后清洗细胞, 加 PE 标记的抗人 IgG Fc 抗体(Jackson Immuno Research, 产品目录 No. 109-116-170), 冰上孵育 0.5 小时, 清洗细胞后使用流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific Inc., Attune NXT)检测。结果如表 8 所示, 当增加 10 μg/ml 相同抗体, 1A10-Fc 样品的荧光均值增加百分比为 902.0/823.5-1=9.5%, 1A11-Fc 样品的荧光均值增加百分比为 702.0/697.5-1=0.6%, 说明两个抗体 10 μg/ml 均接近饱和浓度。在此基础上增加 10 μg/ml 不同抗体, 即 10 μg/ml 的 1A10-Fc 增加 10 μg/ml 的 1A11-Fc, 荧光均值增加百分比为 1443.5/823.5-1=75.3%; 10 μg/ml 的 1A11-Fc 增加 10 μg/ml 的 1A10-Fc, 荧光均值增加百分比为 1443.5/697.5-1=107.0%, 说明两个抗体 1A10-Fc、1A11-Fc 可以同时结合细胞

膜上 BCMA 蛋白的不同表位。

推测 1A1、1A10、1A11 和 1B10 的表位关系如图 5C 所示：1A10 结合人 BCMA 的表位与 1A1、1A11、1B10 的表位无重叠或有小部分重叠，而 1A1、1A11、1B10 结合人 BCMA 的表位有大部分重叠或完全重叠。

表8 抗人BCMA VHH嵌合抗体与U266细胞的结合

编号	VHH-Fc 嵌合抗体	荧光均值 (MFI)
a	1A10-Fc, 10 $\mu\text{g/ml}$ + 1A11-Fc, 10 $\mu\text{g/ml}$	1443.5
b	1A10-Fc, 20 $\mu\text{g/ml}$	902.0
c	1A11-Fc, 20 $\mu\text{g/ml}$	702.0
d	1A10-Fc, 10 $\mu\text{g/ml}$	823.5
e	1A11-Fc, 10 $\mu\text{g/ml}$	697.5

。

权利要求书

1、一种分离的单可变结构域，其结合 BCMA，其中所述单可变结构域包含选自以下的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

- (a)与选自 SEQ ID NO:10、13、7 和 16 的氨基酸序列具有至少 70%的序列同一性的 CDR1；
- (b)与选自 SEQ ID NO:11、14、8 和 17 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR2；

和

- (c)与选自 SEQ ID NO:12、15、9 和 18 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR3。

2、根据权利要求 1 所述的分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域包含选自以下任一组的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

(ii)与 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列具有至少 70%的序列同一性的 CDR1，与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR2，以及与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR3；

(iii)与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列具有至少 70%的序列同一性的 CDR1，与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR2，以及与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR3；

(i)与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列具有至少 70%的序列同一性的 CDR1，与 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR2，以及与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR3；或，

(iv)与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列具有至少 70%的序列同一性的 CDR1，与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR2，以及与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列具有至少 85%的序列同一性的 CDR3。

3、根据权利要求 2 所述的分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域包含选自以下任一组的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

(ii)包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列的 CDR3；

(iii)包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列的 CDR3；

(i)包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 CDR3；或

(iv)包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 CDR1；包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的 CDR2；和包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的 CDR3。

4、一种分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

5、根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的序列具有至少 85%的序列同一性的氨基酸序列；或所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 19、21、23 或 25 的氨基酸序列。

6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的分离的单可变结构域，其中所述的单可变结构域是骆驼科动物的或人源化的；可选的，所述的单可变结构域是 V_HH。

7、根据权利要求 1-6 中任一项所述的分离的单可变结构域，其中所述单可变结构域展现出下述性质中的一种或几种的组合：

(i)结合人 BCMA；

(ii)结合猴 BCMA；

(iii)阻断 APRIL 与 BCMA 的结合；或

(iv)与人 TACI 或/和 BAFFR 蛋白不结合。

8、一种分离的抗原结合分子，其结合 BCMA 且包含至少一个权利要求 1-7 中任一项所述的单可变结构域。

9、根据权利要求 8 所述的分离的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子是抗体、单特异性抗体、多特异性抗体或免疫偶联物，可选地，所述抗体或免疫偶联物包含免疫球蛋白恒定区；可选的，所述免疫球蛋白恒定区包含人免疫球蛋白 Fc，优选为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc；可选的，所述抗原结合分子包含如 SEQ ID NO: 27、29、31 或 33 所示氨基酸序列。

10、根据权利要求 8 或 9 所述的分离的抗原结合分子，其展现出下述性质中的一种或几种的组合：

- (i)结合人 BCMA；
- (ii)结合猴 BCMA；
- (iii)阻断 APRIL 与 BCMA 的结合；和，
- (iv)与人 TACI 或/和 BAFFR 蛋白不结合。

11、一种组合物，其包含活性成分以及药学上可接受的载体，其中活性成分为根据权利要求 1-7 中任一项所述的单可变结构域或根据权利要求 8-10 中任一项所述的抗原结合分子。

12、一种分离的核酸，其编码根据权利要求 1-7 中任一项所述的单可变结构域或根据权利要求 8-10 中任一项所述的抗原结合分子。

13、一种治疗患有表达 BCMA 的肿瘤的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求 1-7 中任一项所述的单可变结构域、权利要求 8-10 中任一项所述的抗原结合分子或权利要求 11 所述的组合物；可选的，所述的肿瘤为 B 细胞恶性肿瘤；可选的，所述 B 细胞恶性肿瘤为淋巴瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤或白血病。

14、一种抑制、减少或阻断细胞中的 BCMA 信号传导的方法，其包括向所述细胞施用有效量的权利要求 1-7 中任一项所述的单可变结构域、根据权利要求 8-10 中任一项所述的抗原结合分子或权利要求 11 所述的组合物；可选的，细胞为 B 细胞恶性肿瘤细胞；可选的，所述 B 细胞恶性肿瘤为淋巴瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤或白血病。

15、一种治疗患有自身免疫性疾病的受试者的方法，其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求 1-7 中任一项所述的单可变结构域、权利要求 8-10 中任一项所述的抗原结合分子或权利要求 11 所述的组合物；可选的，所述自身免疫性疾病为系统性红斑狼疮。

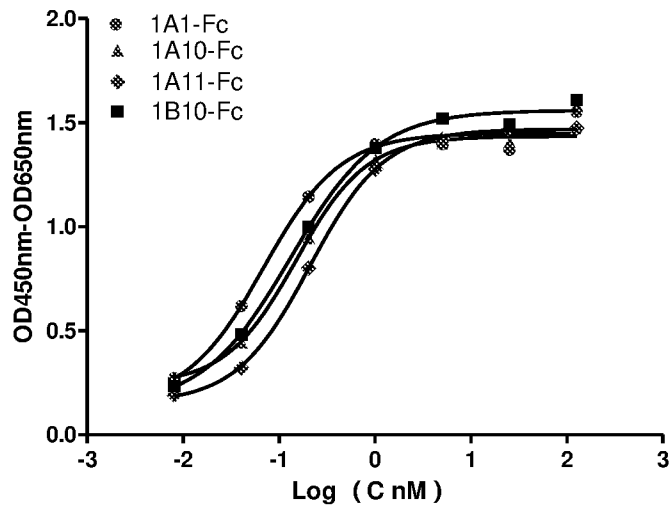


图 1

CHO-hBCMA

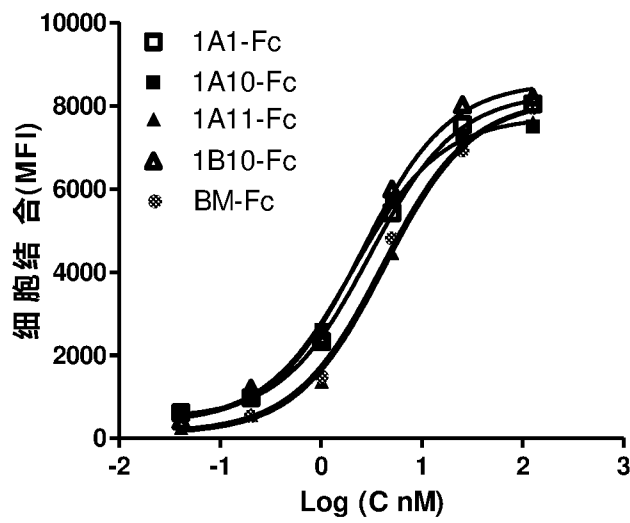


图 2A

U266

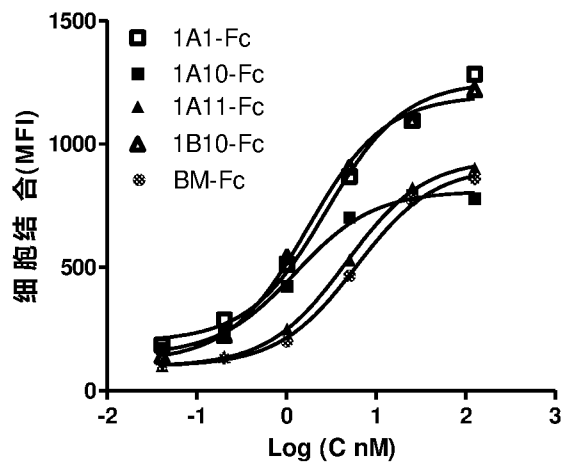


图 2B

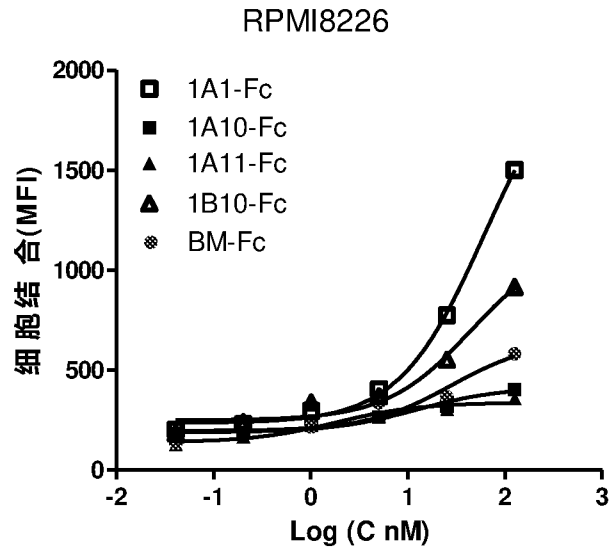


图 2C

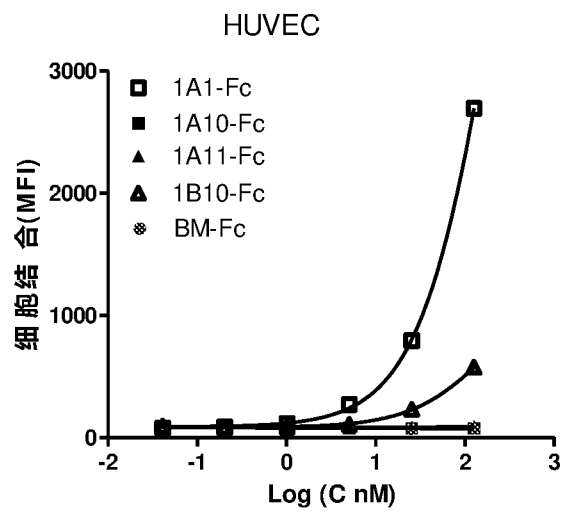


图 2D

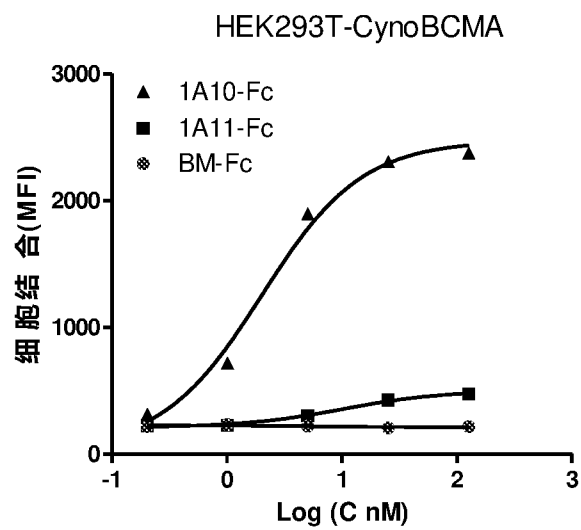


图 3A

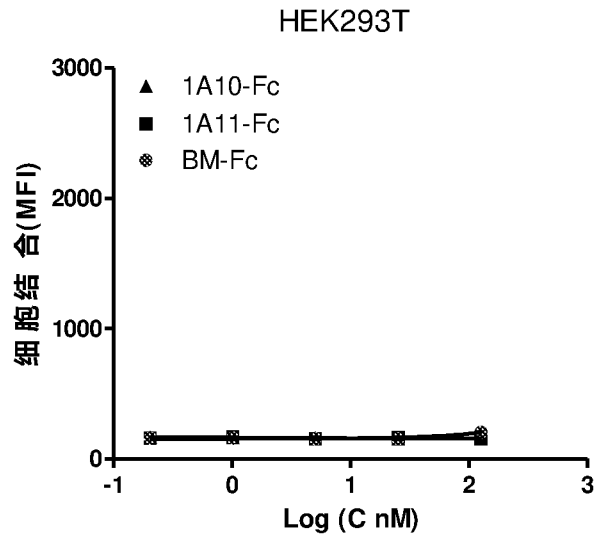


图 3B

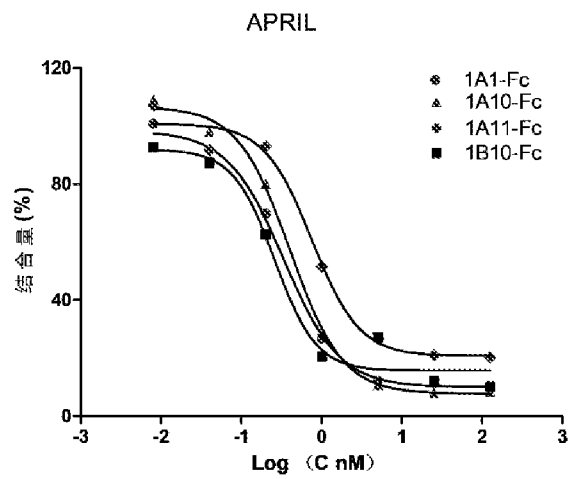


图 4

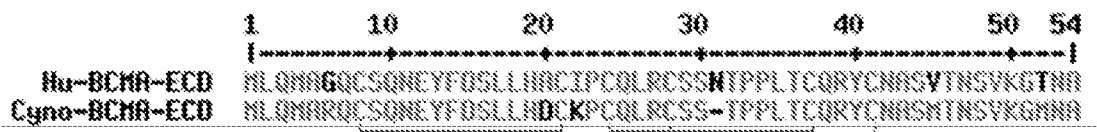


图 5A

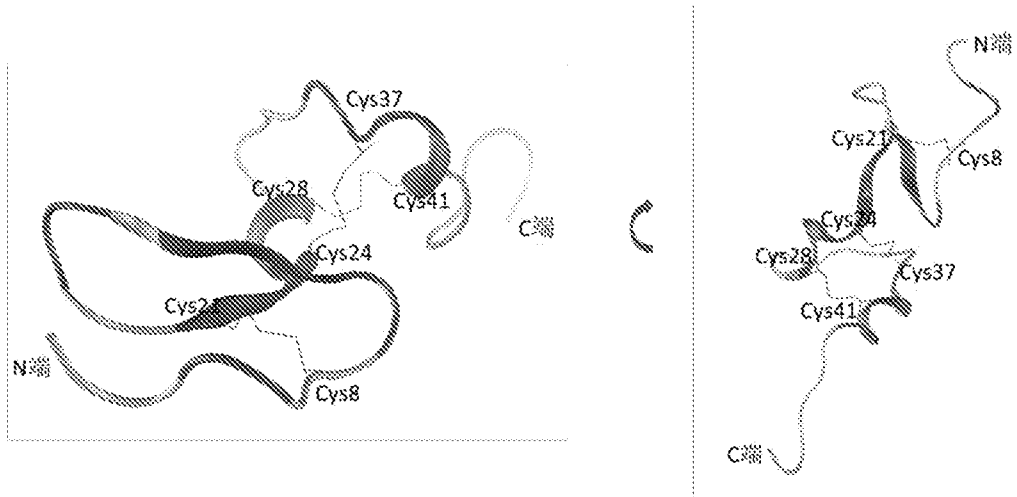


图 5B

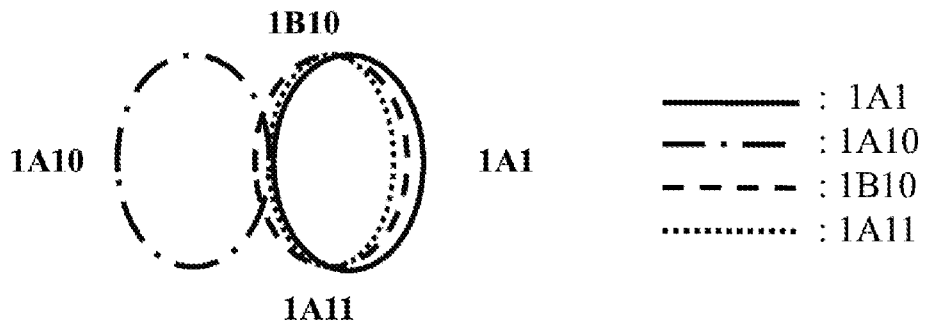


图 5C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/112758

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, STNext, B细胞成熟抗原, 肿瘤坏死因子超家族成员17, 单域抗体, 单链, 单个可变结构域, 单个可变结构域, 抗原结合分子, B cell maturation antigen, BCMA, TNFRSF17, CD269, VHH, sdAb, UniAb, antibody, SEQ ID NO: 7-18, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110891971 A (TENEObIO, INC.) 17 March 2020 (2020-03-17) entire document	1-15
A	CN 104877026 A (BIOGEN IDEC INC) 02 September 2015 (2015-09-02) entire document	1-15
A	WO 2019149269 A1 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 08 August 2019 (2019-08-08) entire document	1-15
A	US 2020197529 A1 (GLAXO GROUP LTD.) 25 June 2020 (2020-06-25) entire document	1-15
A	栾春燕 等 (LUAN, Chunyan et al.). "B细胞成熟抗原(BCMA)靶向免疫治疗多发性骨髓瘤的研究进展 (Advance of Research on the Immunotherapy Targeting B Cell Maration Antigen for Multiple Myeloma—Review)" <i>中国实验血液学杂志 (Journal of Experimental Hematology)</i> , Vol. 27, No. 5, 20 October 2019 (2019-10-20), pp. 1701-1705	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October 2021		Date of mailing of the international search report 17 November 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	高友林 等 (GAO, Youlin et al.). "血清BCMA和MIF含量与系统性红斑狼疮疾病活动性的关联度研究 (Non-official translation: Correlation Between Serum BCMA and MIF Levels and Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus)" <i>临床和实验医学杂志 (Journal of Clinical and Experimental Medicine)</i> , Vol. 12, No. 1, 31 January 2013 (2013-01-31), pp. 59-60	1-15
A	GAVRIATOPOULOU, M. et al. "Anti-BCMA antibodies in the future management of multiple myeloma" <i>EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY</i> , Vol. 19, No. 4, 18 March 2019 (2019-03-18), pp. 319-326	1-15
A	CHO, S.F. et al. "Targeting B Cell Maturation Antigen(BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based immunotherapy" <i>Frontiers in Immunology</i> , Vol. 9, 10 August 2018 (2018-08-10), Document Number 1821, pages 1-15	1-15

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **13-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 13-15 relates to a method for treating diseases, and does not comply with PCT Rule 39.1(iv). The present report is provided on the basis of amending the claims to be for a pharmaceutical use.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/112758

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
CN	110891971	A	17 March 2020	IL	271194	D0	30 January 2020				
				WO	2018237037	A2	27 December 2018				
				WO	2018237037	A3	07 February 2019				
				RU	2020100891	A3	20 July 2021				
				RU	2020100891	A	20 July 2021				
				CA	3067584	A1	27 December 2018				
				KR	20200018498	A	19 February 2020				
				AU	2018289515	A1	06 February 2020				
				AU	2018289515	A2	20 February 2020				
				JP	2020524506	A	20 August 2020				
				EP	3642237	A2	29 April 2020				
				BR	112019026907	A2	30 June 2020				
				US	2021147564	A1	20 May 2021				
				SG	11201912774 R	A	30 January 2020				
				<hr/>							
				CN	104877026	A	02 September 2015	SI	2406284	T1	31 January 2017
JP	2015187164	A	29 October 2015								
AU	2014204447	A1	31 July 2014								
AU	2014204447	B2	20 August 2015								
ES	2593583	T3	09 December 2016								
ES	2593583	T9	05 June 2017								
JP	2012520308	A	06 September 2012								
JP	6061469	B2	25 January 2017								
PT	2406284	T	29 September 2016								
NZ	594985	A	26 July 2013								
CY	1118069	T1	28 June 2017								
US	2019161552	A1	30 May 2019								
US	11111307	B2	07 September 2021								
PL	2406284	T3	29 September 2017								
US	2012082661	A1	05 April 2012								
US	9034324	B2	19 May 2015								
DK	2406284	T3	26 September 2016								
DK	2406284	T5	12 June 2017								
HK	1166333	A1	26 October 2012								
EP	3141562	A1	15 March 2017								
CA	2754938	A1	16 September 2010								
CA	2754938	C	11 October 2016								
MX	2011009430	A	18 November 2011								
WO	2010104949	A2	16 September 2010								
WO	2010104949	A3	25 November 2010								
US	2015125460	A1	07 May 2015								
KR	20110126740	A	23 November 2011								
KR	101589785	B1	28 January 2016								
LT	2406284	T	10 October 2016								
HR	P20161194	T1	04 November 2016								
CN	102421801	A	18 April 2012								
CN	102421801	B	16 March 2016								
US	2017029518	A1	02 February 2017								
EP	2406284	A2	18 January 2012								
EP	2406284	B1	27 July 2016								
EP	2406284	B9	01 March 2017								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/112758

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				IL	214996	D0	30 November 2011
				IL	214996	A	31 October 2016
				MX	341884	B	07 September 2016
				NZ	612647	A	27 March 2015
				AU	2010224160	A1	22 September 2011
				HU	E029619	T2	28 March 2017
				HU	E029619	T4	28 July 2017
WO	2019149269	A1	08 August 2019	US	2020339699	A1	29 October 2020
				CA	3081125	A1	08 August 2019
				EP	3693392	A1	12 August 2020
				AU	2019214183	A1	14 May 2020
				TW	201940513	A	16 October 2019
				CN	111601825	A	28 August 2020
				JP	2021512592	A	20 May 2021
US	2020197529	A1	25 June 2020	US	2013280280	A1	24 October 2013
				US	9273141	B2	01 March 2016
				US	2016193358	A1	07 July 2016
				US	2018147293	A1	31 May 2018
				UA	112434	C2	12 September 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/112758

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, STNext, B细胞成熟抗原, 肿瘤坏死因子超家族成员17, 单域抗体, 单链, 单个可变结构域, 单可变结构域, 抗原结合分子, B cell maturation antigen, BCMA, TNFRSF17, CD269, VHH, sdAb, UniAb, antibody, SEQ ID NO:7-18、19、21、23、25、27、29、31、33</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 110891971 A (特尼奥生物股份有限公司) 2020年 3月 17日 (2020 - 03 - 17) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104877026 A (比奥根MA公司) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019149269 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 8月 8日 (2019 - 08 - 08) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2020197529 A1 (GLAXO GROUP LTD.) 2020年 6月 25日 (2020 - 06 - 25) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>栾春燕等. "B细胞成熟抗原(BCMA)靶向免疫治疗多发性骨髓瘤的研究进展" 中国实验血液学杂志, 第27卷, 第5期, 2019年 10月 20日 (2019 - 10 - 20), 第1701-1705页</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>高友林等. "血清BCMA和MIF含量与系统性红斑狼疮疾病活动性的关联度研究" 临床和实验医学杂志, 第12卷, 第1期, 2013年 1月 31日 (2013 - 01 - 31), 第59-60页</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 110891971 A (特尼奥生物股份有限公司) 2020年 3月 17日 (2020 - 03 - 17) 全文	1-15	A	CN 104877026 A (比奥根MA公司) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 全文	1-15	A	WO 2019149269 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 8月 8日 (2019 - 08 - 08) 全文	1-15	A	US 2020197529 A1 (GLAXO GROUP LTD.) 2020年 6月 25日 (2020 - 06 - 25) 全文	1-15	A	栾春燕等. "B细胞成熟抗原(BCMA)靶向免疫治疗多发性骨髓瘤的研究进展" 中国实验血液学杂志, 第27卷, 第5期, 2019年 10月 20日 (2019 - 10 - 20), 第1701-1705页	1-15	A	高友林等. "血清BCMA和MIF含量与系统性红斑狼疮疾病活动性的关联度研究" 临床和实验医学杂志, 第12卷, 第1期, 2013年 1月 31日 (2013 - 01 - 31), 第59-60页	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 110891971 A (特尼奥生物股份有限公司) 2020年 3月 17日 (2020 - 03 - 17) 全文	1-15																					
A	CN 104877026 A (比奥根MA公司) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 全文	1-15																					
A	WO 2019149269 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 8月 8日 (2019 - 08 - 08) 全文	1-15																					
A	US 2020197529 A1 (GLAXO GROUP LTD.) 2020年 6月 25日 (2020 - 06 - 25) 全文	1-15																					
A	栾春燕等. "B细胞成熟抗原(BCMA)靶向免疫治疗多发性骨髓瘤的研究进展" 中国实验血液学杂志, 第27卷, 第5期, 2019年 10月 20日 (2019 - 10 - 20), 第1701-1705页	1-15																					
A	高友林等. "血清BCMA和MIF含量与系统性红斑狼疮疾病活动性的关联度研究" 临床和实验医学杂志, 第12卷, 第1期, 2013年 1月 31日 (2013 - 01 - 31), 第59-60页	1-15																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> </td> <td> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																			
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																						
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 10月 29日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 11月 17日</p>																						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>王瑶</p> <p>电话号码 86-(10)-53961926</p>																						

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	GAVRIATOPOULOU, M. 等. "Anti-BCMA antibodies in the future management of multiple myeloma" EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY, 第19卷, 第4期, 2019年 3月 18日 (2019 - 03 - 18), 第319-326页	1-15
A	CHO, S.F. 等. "Targeting B Cell Maturation Antigen(BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based immunotherapy" FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 第9卷, 2018年 8月 10日 (2018 - 08 - 10), 文献编号 1821, 第1-15页	1-15

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 13-15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求13-15的主题涉及疾病的治疗方法，不符合PCT第39.1(iv)的规定。本报告基于其修改为制药用途权利要求而作出。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/112758

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110891971	A	2020年 3月 17日	IL	271194	D0	2020年 1月 30日
				WO	2018237037	A2	2018年 12月 27日
				WO	2018237037	A3	2019年 2月 7日
				RU	2020100891	A3	2021年 7月 20日
				RU	2020100891	A	2021年 7月 20日
				CA	3067584	A1	2018年 12月 27日
				KR	20200018498	A	2020年 2月 19日
				AU	2018289515	A1	2020年 2月 6日
				AU	2018289515	A2	2020年 2月 20日
				JP	2020524506	A	2020年 8月 20日
				EP	3642237	A2	2020年 4月 29日
				BR	112019026907	A2	2020年 6月 30日
				US	2021147564	A1	2021年 5月 20日
				SG	11201912774R	A	2020年 1月 30日
				CN	104877026	A	2015年 9月 2日
JP	2015187164	A	2015年 10月 29日				
AU	2014204447	A1	2014年 7月 31日				
AU	2014204447	B2	2015年 8月 20日				
ES	2593583	T3	2016年 12月 9日				
ES	2593583	T9	2017年 6月 5日				
JP	2012520308	A	2012年 9月 6日				
JP	6061469	B2	2017年 1月 25日				
PT	2406284	T	2016年 9月 29日				
NZ	594985	A	2013年 7月 26日				
CY	1118069	T1	2017年 6月 28日				
US	2019161552	A1	2019年 5月 30日				
US	11111307	B2	2021年 9月 7日				
PL	2406284	T3	2017年 9月 29日				
US	2012082661	A1	2012年 4月 5日				
US	9034324	B2	2015年 5月 19日				
DK	2406284	T3	2016年 9月 26日				
DK	2406284	T5	2017年 6月 12日				
HK	1166333	A1	2012年 10月 26日				
EP	3141562	A1	2017年 3月 15日				
CA	2754938	A1	2010年 9月 16日				
CA	2754938	C	2016年 10月 11日				
MX	2011009430	A	2011年 11月 18日				
WO	2010104949	A2	2010年 9月 16日				
WO	2010104949	A3	2010年 11月 25日				
US	2015125460	A1	2015年 5月 7日				
KR	20110126740	A	2011年 11月 23日				
KR	101589785	B1	2016年 1月 28日				
LT	2406284	T	2016年 10月 10日				
HR	P20161194	T1	2016年 11月 4日				
CN	102421801	A	2012年 4月 18日				
CN	102421801	B	2016年 3月 16日				
US	2017029518	A1	2017年 2月 2日				
EP	2406284	A2	2012年 1月 18日				
EP	2406284	B1	2016年 7月 27日				
EP	2406284	B9	2017年 3月 1日				

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/112758

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				IL	214996	D0	2011年 11月 30日
				IL	214996	A	2016年 10月 31日
				MX	341884	B	2016年 9月 7日
				NZ	612647	A	2015年 3月 27日
				AU	2010224160	A1	2011年 9月 22日
				HU	E029619	T2	2017年 3月 28日
				HU	E029619	T4	2017年 7月 28日
WO	2019149269	A1	2019年 8月 8日	US	2020339699	A1	2020年 10月 29日
				CA	3081125	A1	2019年 8月 8日
				EP	3693392	A1	2020年 8月 12日
				AU	2019214183	A1	2020年 5月 14日
				TW	201940513	A	2019年 10月 16日
				CN	111601825	A	2020年 8月 28日
				JP	2021512592	A	2021年 5月 20日
US	2020197529	A1	2020年 6月 25日	US	2013280280	A1	2013年 10月 24日
				US	9273141	B2	2016年 3月 1日
				US	2016193358	A1	2016年 7月 7日
				US	2018147293	A1	2018年 5月 31日
				UA	112434	C2	2016年 9月 12日