(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 10 月 20 日 (20.10.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/218380 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/086842

(22) 国际申请日: 2022 年 4 月 14 日 (14.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110405638.3 2021年4月15日 (15.04.2021) 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: **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)。 **赵伟(ZHAO, Wei)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **陆亚敏(LU, Yamin)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **杜敏(DU, Min)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **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)。 **汪鑫(WANG, Xin)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **席俊晓(XI, Junxiao)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **宋馨(SONG, Xin)**; 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)。

(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,

(54) **Title:** MULTI-SPECIFIC ANTIBODY TARGETING BCMA

(54) **发明名称:** 靶向BCMA的多特异性抗体

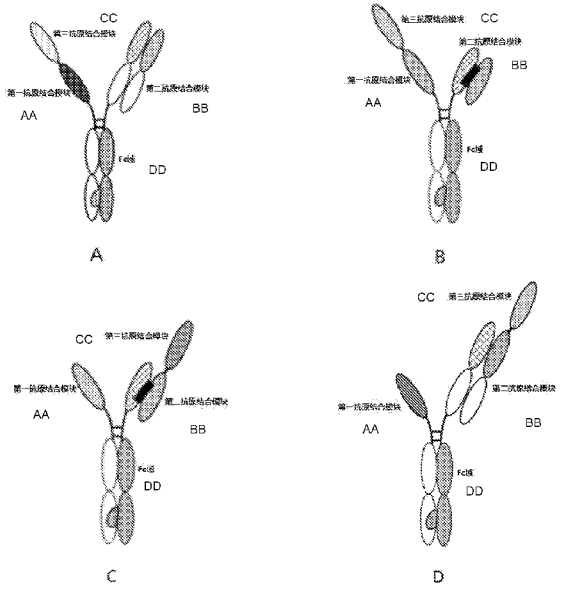


图5

AA First antigen binding module
BB Second antigen binding module
CC Third antigen binding module
DD Fc domain

(57) **Abstract:** Provided is a multi-specific antibody targeting BCMA. Specifically provided are a multi-specific antibody, a nucleic acid encoding same, a vector comprising the nucleic acid, a cell comprising the vector, and a pharmaceutical composition comprising same. Further provided is the use thereof for treating a subject having a disease related to BCMA expression.

(57) **摘要:** 提供了一种靶向BCMA的多特异性抗体。具体地提供了多特异性抗体、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，还提供了其治疗患有BCMA表达相关疾病的受试者的用途。

WO 2022/218380 A1

[见续页]

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, JM, 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))。

靶向 BCMA 的多特异性抗体

技术领域

本发明涉及多特异性抗体，尤其涉及靶向 BCMA 的多特异性抗体。

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(TNFRS17)，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、D8Ertd387e)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。

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。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，在组成多特异性抗体时不存在轻重链错配问题，等等。

以 B 细胞成熟抗原(BCMA)和 T 细胞 CD3 受体为靶点的多特异性抗体，可以将 CD3 T 细胞重新定向到表达 BCMA 的骨髓瘤细胞，以诱导针对靶细胞的细胞毒作用。

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。

发明内容

本发明提供了靶向 BCMA 的抗体，其中涉及靶向 BCMA 以及活化性 T 细胞抗原例如 CD3 的多特异性抗体。本发明还提供了能够编码所提供的抗体的相关核酸、载体、细胞、组合物、制备方法及用途。

一方面，本发明提供了多特异性抗体，其包含

(i)结合第一抗原的第一抗原结合模块；

(ii)结合第二抗原的第二抗原结合模块；和，

(iii)结合第一抗原的第三抗原结合模块；

其中所述第一抗原为 BCMA 且所述第二抗原为活化性 T 细胞抗原，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域并且各自独立的包含以下任一项：

(a)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

(b)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(c)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(d)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含以下

任一项：

(b)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(c)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；以及，所述第三抗原结合模块包含包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。进一步的，在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

在另一些实施方案中，所述第三抗原结合模块包含包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；以及，所述第一抗原结合模块包含包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。进一步的，在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块结合 BCMA 不同表位。

所述第二抗原结合模块提供与活化性 T 细胞抗原结合的能力，在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 43 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 45 所示氨基酸序列的 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 46 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 48 所示氨基酸序列的 LCDR3。进一步具体的实施方案，所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，并且其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述的多特异性抗体，其还包含由两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

在一些具体的实施方案中，多特异性抗体中，所述第一抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；所述第三抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；以及，所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 43 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 45 所示氨基酸序列的 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 46 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 48 所示氨基酸序列的 LCDR3。进一步具体的实施方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。进一步具体的实施方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。在这些具体的实施方案中，一种可选择的构型方式，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，

所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 N 端。进一步一种更具体的实施方案，多特异性抗体由两条多肽链组成，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述的第二抗原结合模块、第三抗原结合模块和 Fc 域的另一个 Fc 多肽。

在另一些具体的实施方案中，多特异性抗体中，所述第三抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；所述第一抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；以及，所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 43 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 45 所示氨基酸序列的 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 46 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 48 所示氨基酸序列的 LCDR3。进一步具体的实施方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。进一步具体的实施方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。在这些实施方案中，一种可选择的构型方式，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端。对于此实施方案，进一步更具体的方案，多特异性抗体由三条多肽链组成，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块、第三抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块的 Fab 重链和 Fc 域的另一个 Fc 多肽，第三条多肽链为上述第二抗原结合模块的 Fab 轻链。另一种可选择的构型方式，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端。对于此实施方案，进一步更具体的方案，多特异性抗体由两条多肽链组成，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块、第三抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块和 Fc 域的另一个 Fc 多肽。另一种可选择的构型方式，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 Fab 轻链的 N 端。对于此实施方案，进一步更具体的，多特异性抗体由三条多肽链组成，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块的 Fab 重链和 Fc 域的另一个 Fc 多肽，第三条多肽链含有上述的第三抗原结合模块和第二抗原结合模块的 Fab 轻链。

一方面，本发明提供了分离的核酸，其包含编码所述的多特异性抗体的多核苷酸。

一方面，本发明提供了载体，其包含本发明所述的核酸。

一方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本发明所述的核酸，或所述的载体。

另一方面，本发明提供了制备本发明所述的多特异性抗体的方法，其包括培养所述的宿主细胞，使其表达所述的多特异性抗体，并且在体系中分离纯化所述多特异性抗体。

另一方面，本发明提供了药物组合物，其包含所述的多特异性抗体和药学上可接受的载体。

另一方面，本发明提供了所述的多特异性抗体或所述的药物组合物在制备治疗 BCMA 表达相关疾病的药物中的用途。

另一方面，本发明提供了在受试者中治疗 BCMA 表达相关的疾病的方法，其包括对所述受试者施用治疗有效量的所述的多特异性抗体或所述的药物组合物。

又一方面，本发明提供了一种结合 BCMA 的抗体，其包含单可变结构域，所述单可变结构域包含：

(1)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

(2)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(3)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(4)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

在一些实施方案中，所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 41 或 42 所示的氨基酸序列，同时所述单可变结构域不包含 SEQ ID NO: 21 或 23 所示的氨基酸序列。

本发明提供了靶向 BCMA 以及活化性 T 细胞抗原例如 CD3 的多特异性抗体。某些方案中，利用某些单可变结构域构建了多种形式的多特异性抗体，均展现了良好的抗肿瘤效果如肿瘤细胞裂解性能和安全性。

附图说明

图 1A 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 1B 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 1C 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 1D 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 2 为流式细胞术检测 1A10-Fc、1A11-Fc 嵌合抗体与 HEK293T-CynoBCMA 或 HEK293T 的结合曲线；

图 3 显示了抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体与配体 APRIL 的竞争 ELISA 检测结果；

图 4A 为人、食蟹猴 BCMA 的胞外区氨基酸序列对比图；

图 4B 为人 BCMA 的胞外区晶体结构；

图 5 为本发明示例性的多特异抗体的结构示意图；

图 6 为示例性抗体 BC24、PC1、PC2 和 PC3 的结构示意图；

图 7 为 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与 NCI-H929 细胞的结合曲线；

图 8 为 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与 MM1S 细胞的结合曲线；

图 9 为 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与 RPMI-8226 细胞的结合曲线；

图 10 为 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与 $CD3^+$T 细胞的结合曲线；

图 11 为不同浓度下 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的效应细胞对 NCI-H929 肿瘤细胞的裂解率；

图 12 为不同浓度下 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的效应细胞对 MM1S 肿瘤细胞的裂解率；

图 13 为不同浓度下 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的效应细胞对 RPMI-8226 肿瘤细胞的裂解率；

图 14 为靶细胞 NCI-H929 存在时，anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体对 T 细胞活化的影响；

图 15 为靶细胞 MM1S 存在时，anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体在对 T 细胞活化的影响；

图 16 为不同浓度 anti-BCMA/anti-CD3 抗体与 NCI-H929 细胞和效应细胞共孵育 24h，细胞因子 IL-2、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 的释放量；

图 17 为 anti-BCMA/anti-CD3 抗体对 NCI-H929 皮下移植瘤生长的影响；

图 18 为 anti-BCMA/anti-CD3 抗体 PC1 的 LC-MS 分析结果。

发明详述

术语

术语“抗体”指的是包含抗原结合位点的蛋白，涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体、三特异性抗体等)、单链抗体等。

术语“多特异性”意指抗体能够特异性结合多种不同的抗原决定簇，例如能够特异性结合两种或两种以上不同的抗原决定簇。通常，双特异性抗体包含两种抗原结合位点，其中每种特异于不同的抗原性决定簇。不同的抗原决定簇可以在相同或不同的细胞上表达。不同的抗原决定簇可以因抗原种类不同而不同（例如结合抗原 CD3 和 BCMA），也可以存在同一种抗原上。抗原决定簇是抗原物质分子表面或其他部位，具有一定组成和结构的特殊化学基团，能与其相应抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合的结构。抗原决定簇一个例子是，抗原 B 细胞成熟抗原(BCMA)作为一种抗原物质，其具有多种结构已确定或结构未确定的抗原决定簇，在本文中，只要能结合抗原上的两种或两种以上不同抗原决定簇的抗体即被称为多特异性抗体。

术语“N 价抗体”意在说明抗体中存在 N 个抗原结合位点。例如“二价抗体”指抗体存在两个抗原结合位点，“三价抗体”指抗体存在三个抗原结合位点。天然的人免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点，Fab 通常具有单个抗原结合位点，单可变结构域、ScFv 通常具有单个抗原结合位点。

术语“抗原结合模块”指特异性结合抗原决定簇的多肽分子。具体的抗原结合模块可是 Fab、ScFv 或单可变结构域。本文中的抗原决定簇与抗原表位同义。

术语“活化性 T 细胞抗原”指在 T 淋巴细胞例如细胞毒性 T 淋巴细胞的表面上表达的抗原，其在与抗体相互作用后能诱导 T 细胞活化。例如，抗体与活化性 T 细胞抗原的相互作用可诱导 T 细胞活化，其通过触发 T 细胞受体复合物的信号传导级联进行。在一个具体的实施方案中，所述活化性 T 细胞抗原是 CD3，例如是 CD3 的 ε 亚基。

术语“T 细胞活化”指 T 淋巴细胞例如细胞毒性 T 淋巴细胞的一种或多种细胞应答，细胞应答选自增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒性活性、活化标志物的表达等。本发明的多特异性抗体能够诱导 T 细胞活化。合适的测量 T 细胞活化的方法是本领域已知的且在本文中有描述。

本发明中关于抗原结合模块、抗原、Fc 多肽、肽接头、多肽链等所用的术语“第一”、“第二”或“第三”是为了在存在一个以上各类型的部分时方便区分而使用。除非明确说明，这些术语的使用并非旨在赋予多特异性抗体的具体顺序或取向。

术语“融合”意指组分(例如 Fab、ScFv、Fc 多肽等)直接或经一个或多个肽接头通过肽键连接。

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。例如天然四链抗体(例如来源于人、鼠等)具有重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，来源于骆驼科或鲨鱼等动物的仅重链抗体具有单可变结构域。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。单可变结构域通常有三个 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)，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)；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”)。

“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(HCDR1、HCDR2和HCDR3)，三个在轻链可变区中(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。仅重链抗体或单可变结构域通常具有三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。

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。然而，应当注意的是，基于不同的方法划分定义获得的同一抗体可变区的CDR的边界可能有所差异，即不同方法划分定义的同一抗体可变区的CDR序列可能有所不同。因此，在涉及用本发明划分定义的具体CDR序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了转换为其他任意定义(例如Chothia、AbM定义等)的CDR序列限定的抗体。

本文中给出的CDR序列一般是依照Kabat定义(Elvin A.Kabat, et al， Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md .(1991))划分的。

术语“框架区”或“FR”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“Fab”指由免疫球蛋白的重链的 VH 和 CH1 以及轻链的 VL 和 CL 域组成的蛋白。本文中 Fab 意指处于它的天然型式的 Fab 分子，即包含由重链可变区 VH 和恒定区 CH1 构成的 Fab 重链(VH-CH1，N 至 C 端方向)，和由轻链可变区和恒定区 CL 构成的 Fab 轻链(VL-CL，N 至 C 端方向)。

术语“scFv”包括免疫球蛋白的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施方案中，scFv 还包含介于 VH 和 VL 结构域之间的肽接头，其使得 scFv 能够形成抗原结合所需的结构。

术语“Fc 结构域”、“Fc”或“Fc 域”在本文中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(Lys447)可存在或不存在。除非另有说明，Fc 或恒定区中氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，描述于 Kabat，E.A 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版， Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991) ,NIH Publication 91-3242。本文所用的 Fc 域的其中一个“Fc 多肽”指形成二聚体 Fc 结构域的两条多肽之一。例如，IgG Fc 域的 Fc 多肽包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定区。

术语“效应子功能”指可归因于抗体的Fc结构域的那些生物学活性，其随抗体同种型而不同。抗体效应子功能的实例例如：C1q结合和依赖补体的细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、依赖抗体的细胞毒性(ADCC)、依赖抗体的吞噬作用(ADCP)等等。

术语“KD”在用于本文时指解离常数，以摩尔浓度(M)表示。抗体的 KD 值可以使用本领域公知的方法测定。例如，一种测定抗体 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”指试图改变治疗个体中疾病的自然进程，并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发，缓解症状，降低疾病的任何直接或间接病理学后果，预防转移，减缓疾病进展率，改善或减轻疾病状态，及消退或改善的预后。

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“分离的”是指目标化合物(例如，VHH、多特异性抗体、抗体或核酸等)已经从其天然环境中分离。

氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将待比对序列与本文中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不以任何保守置换作为序列同一性的一部分时，待比对序列中与本文中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。氨基酸序列的同一性比对可以采用本领域范围内的多种方式进行，例如BLAST，BLAST-2，ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员

可决定用于比对序列的适宜参数，包括在比较序列的全长里获得最大比对需要的任何算法。

本发明的各个方面将在下述分部中进一步详细描述。

I.单可变结构域

本发明提供结合至 BCMA(诸如人 BCMA)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。所述单可变结构域对人 BCMA 具有良好的亲和力，可提供靶向性。在某些情况下，所述单可变结构域能够提供阻断增殖诱导配体 APRIL 与 BCMA 的结合能力。特别的，在一些方案中，所述单可变结构域与人 TACI 和 BAFF-R 蛋白不结合，表现了特异性；在一些实施方案中，所述单可变结构域与猴 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。

本发明提供了结合 BCMA 的单可变结构域，其包含：

(1)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

(2)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(3)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(4)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

在一些实施方案中，所述单可变结构域包含：如 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，如 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中，所述单可变结构域包含：如 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中，所述单可变结构域包含：如 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，如 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中，所述单可变结构域包含：如 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，如 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中，所述单可变结构域是骆驼科动物的。在一些实施方案中，所述单可变结构域是人源化的。

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、25、37、38、39、40、41 或 42 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。在一些更具体的实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 19 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且包含：包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 41 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且包含：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 37 或 38 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且包含：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 42 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且包含：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 39 或 40 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且包含：包含 SEQ ID NO: 13

所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些更具体的实施方案中，所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 25 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且包含：包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。在一些实施方案中，具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列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、41、42 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。

在一些实施方案中，所述单可变结构域的氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 19、21、23、25、37、38、39、40、41 或 42 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述单可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19、21、23、25、37、38、39、40、41 或 42 所示。

在一些实施方案中，所述单可变结构域是V_HH。在一些实施方案中，V_HH是人源化的。源自非人的单可变结构域可通过以人抗体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。通常单可变结构域从N端至C端具有以下结构：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

在一些实施方案中，本发明提供了与本发明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、25、37、38、39 或 40 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。因此，在一些实施方案中，本发明提供了与本发明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、25、37、38、39 或 40 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。本发明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 S1 中。示例性的单可变结构域的全长氨基酸序列提供于下表 S2 中。

表 S1：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)
1A10-V1 单可变结构域	VACMA (SEQ ID NO: 10)	TIVADFGTTNYAASVKG (SEQ ID NO: 11)	TQRGGIDWCDEINY (SEQ ID NO: 12)
1A10-V2 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)
1A11-V1 单	SACMG (SEQ ID NO: 13)	RIETGYGGTVYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	KRSWCTPTWWHELDYNY (SEQ ID NO: 15)

可变结构域			
1A11-V2 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 S2：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	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTFRGWNKHWYRQAPGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQDNADATVYLQMNSLKPEDTAMYYCKYDLPGSGLPAFWGQGTLVTVSS	19
1A10 单可变结构域	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKEREWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDSAMYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSS	21
1A11 单可变结构域	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTFNSACMGWFRQAPGKEREGVARIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS	23
1B10 单可变结构域	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTFRGWNKHWYRQAPGKERELVSSIFRDGKTAYTDSVKGRFTISQDSADATVYLQMNSLKPEDTAMYYCKYDLPGSGLPEFWGQGTLVTVSS	25
1A10-V1 单可变结构域	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKGLEWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSS	37
1A10-V2 单可变结构域	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKEREWVSTIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSS	38
1A11-V1 单可变结构域	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSACMGWFRQAPGKGREGVSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS	39
1A11-V2 单可变结构域	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSACMGWFRQAPGKEREGVSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS	40

SEQ ID NO: 41 序列：

QVQLVESGGGX$_1$VQX$_2$GGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKX$_3$X$_4$EWVX$_5$TIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNX$_6$KNTVYLQMNSLX$_7$X$_8$EDX$_9$AX$_{10}$YYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSS

其中，X$_1$为 S 或 L，X$_2$为 P 或 A，X$_3$为 G 或 E，X$_4$为 R 或 L，X$_5$为 A 或 S，X$_6$为 A 或 S，X$_7$为 R 或 K，X$_8$为 A 或 P，X$_9$为 T 或 S，X$_{10}$为 V 或 M。

SEQ ID NO: 42 序列：

QVQLVESGGGX$_{11}$VQX$_{12}$GGSLRLSCAASGX$_{13}$TFNSACMGWFRQAPGKX$_{14}$REGVX$_{15}$RIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNX$_{16}$KNTVYLQMNSLX$_{17}$X$_{18}$EDTAX$_{19}$YYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSS

其中，X$_{11}$为 S 或 L，X$_{12}$为 P 或 A，X$_{13}$为 F 或 V，X$_{14}$为 E 或 G，X$_{15}$为 A 或 S，X$_{16}$为 A 或 S，X$_{17}$为 R 或 K，X$_{18}$为 A 或 P，X$_{19}$为 V 或 M。

本发明提供了结合 BCMA 的抗体，其包含所述的单可变结构域。

在一些实施方案中，所述结合 BCMA 的抗体可以是单特性抗体或多特性抗体。

在一个实施方案中，所述单特异性抗体包含 Fc 结构域，优选的，所述 Fc 为人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc。

在一些实施方案中，所述单特性抗体包含与 SEQ ID NO: 27、29、31、33、51、53、55 或 57 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

本发明提供了示例性的单特异性抗体(例如 1A10-V1，1A10-V1，1A11-V1，1A11-V2 等)，将单可变结构域与人 IgG1 的 Fc 融合，通过 Fc 形成同二聚体。

本发明提供了分离的核酸，其包含编码本发明所述的结合 BCMA 的抗体的多核苷酸。

本发明提供了载体，其包含本发明所述的核酸。

本发明提供了分离的宿主细胞，其包含本发明所述的核酸或本发明所述的载体。

本发明提供了制备本发明所述的结合 BCMA 的抗体的方法，其包括培养本发明所述的宿主细胞，使其表达所述的结合 BCMA 的抗体，并且在体系中分离纯化所述结合 BCMA 的抗体。

本发明提供了药物组合物，其包含本发明所述的结合 BCMA 的抗体和药学上可接受的载体。

本发明提供了在受试者中治疗 BCMA 表达相关的疾病的方法，其包括对所述受试者施用治疗有效量的本发明所述的结合 BCMA 的抗体或所述的药物组合物。

II.多特异性抗体

本发明提供了包含单可变结构域的多特异性抗体，其可以靶向肿瘤细胞表面表达的 BCMA，还可以与 T 细胞结合，激活 T 细胞的肿瘤杀伤活性。

采用单可变结构域，相较于更多个(例如两个)采用 Fab 的形式，可降低或避免轻链和重链的错配。

本发明的多特异性抗体还展现了优异的抗肿瘤性能例如裂解肿瘤细胞。在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体能够诱导杀伤多种肿瘤细胞，并且，本发明的多特异性抗体对不同 BCMA 表达水平的肿瘤细胞展现了良好的肿瘤杀伤活性。特别的，对一些 BCMA 中低表达的肿瘤细胞展现了更优异的杀伤性能。

本发明的多特异性抗体在展现良好的抗肿瘤性能的同时，细胞因子释放水平较低，可降低靶向 CD3 的抗体导致的细胞因子风暴的风险，提高安全性。

可以采用第 I 节中描述的任一种单可变结构域构建多特异性抗体。因此，本发明提供了多特异性抗体，其包含

(i)结合第一抗原的第一抗原结合模块；

(ii)结合第二抗原的第二抗原结合模块；和，

(iii)结合第一抗原的第三抗原结合模块；

其中所述第一抗原为 BCMA 且所述第二抗原为活化性 T 细胞抗原，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域并且各自独立的包含以下任一项：

(a)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

(b)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(c)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(d)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

本发明中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为结合 BCMA 的单可变结构域。在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含上文(a)、(b)、(c)或(d)所述的互补决定区。在一些实施方案中，所述第三抗原结合模块包含上文(a)、(b)、(c)或(d)所述的互补决定区。在所述多特异性抗体中，所述第一抗原结合模块与第三抗原结合模块可以相同或不同，可以独立的选择任意本发明所述的单可变结构域进行组合；一个具体的方案，所述第一抗原结合模块与第三抗原结合模块是相同的；另一个具体的方案，所述第一抗原结合模块与第三抗原结合模块是不同的。

表 S3 示例性的列举了限定 CDR 特征的第一抗原结合模块与第三抗原结合模块不同组合方式构建的多特异性抗体。一个具体的实施方案，所述第一抗原结合模块包含上文(b)所述的互补决定区，并且所述第三抗原结合模块包含上文(c)所述的互补决定区，即所述第一抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；并且所述第三抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。另一个具体的实施方案，所述第三抗原结合模块包含上文(b)所述的互补决定区，并且所述第一抗原结合模块包含上

文(c)所述的互补决定区，即所述第三抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；并且所述第一抗原结合模块包含：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。更具体的一个方案，所述第一抗原结合模块包含 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；并且所述第三抗原结合模块包含 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。另一个更具体的方案，所述第三抗原结合模块包含 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；并且所述第一抗原结合模块包含 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。

表 S3 示例性的限定第一抗原结合模块和第三抗原结合模块的 CDR 特征的多特异性抗体

第一抗原结合模块 / 第三抗原结合模块	(a)	(b)	(c)	(d)
(a)	(a)+ (a)	(a)+ (b)	(a) +(c)	(a) +(d)
(b)	(b) +(a)	(b) +(b)	(b) +(c)	(b) +(d)
(c)	(c) +(a)	(c) +(b)	(c) +(c)	(c) +(d)
(d)	(d) +(a)	(d) +(b)	(d) +(c)	(d) +(d)

注：表中(X)+ (Y)表示多特异性抗体中第三抗原结合模块和第一抗原结合模块的组合方式，例如(b) +(a)表示多特异性抗体中第三抗原结合模块包含(b)所述的互补决定区，同时第一抗原结合模块包含(a)所述的互补决定区。

进一步的，在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含与 SEQ ID NO: 19、41、42 或 25 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 19、41、42 或 25 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 19、21、23、37、38、39、40 或 25 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 19、41、42 或 25 所示的氨基酸序列。在一些更具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 19、21、23、37、38、39、40 或 25 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 19、41、42 或 25 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 19、21、23、37、38、39、40 或 25 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 19、41、42 或 25 所示的氨基酸序列。在一些更具体的实施方案中，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 19、21、23、37、38、39、40 或 25 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 41 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；并且所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 42 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，

所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列。一些更具体的方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 21、37 或 38 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 42 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 41 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。一个具体的方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。一些更具体的方案，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 21、37 或 38 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含 21、23、37、38、39 或 40 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列，所述第一抗原结合模块包含 21、23、37、38、39 或 40 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，并且所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列，并且所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，并且所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，并且所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

一个实例，所述第三抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，并且所述第一抗原结合模块包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列。

一个实例，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均包含 SEQ ID NO: 21、23、37、38、39 或 40 所示的氨基酸序列。

表 S4 示例了全长氨基酸序列特征的第一抗原结合模块与第三抗原结合模块不同组合方式构建的多特异性抗体。

表 S4 示例性的限定第一抗原结合模块和第三抗原结合模块氨基酸序列的多特异性抗体

第一抗原结合模块 / 第三	1A1 单可变结构域	1A10 单可变结构域	1A11 单可变结构域	1B10 单可变结构域	1A10-V1 单可变结构域	1A10-V2 单可变结构域	1A11-V1 单可变结构域	1A11-V2 单可变结构域

抗原结合模块								
1A1 单可变结构域	1A1+1A1 单可变结构域	1A1+1A10 单可变结构域	1A1+1A11 单可变结构域	1A1+1B10 单可变结构域	1A1+1A10-V1 单可变结构域	1A1+1A10-V2 单可变结构域	1A1+1A11-V1 单可变结构域	1A1+1A11-V2 单可变结构域
1A10 单可变结构域	1A10+1A1 单可变结构域	1A10+1A10 单可变结构域	1A10+1A11 单可变结构域	1A10+1B10 单可变结构域	1A10+1A10-V1 单可变结构域	1A10+1A10-V2 单可变结构域	1A10+1A11-V1 单可变结构域	1A10+1A11-V2 单可变结构域
1A11 单可变结构域	1A11+1A1 单可变结构域	1A11+1A10 单可变结构域	1A11+1A11 单可变结构域	1A11+1B10 单可变结构域	1A11+1A10-V1 单可变结构域	1A11+1A10-V2 单可变结构域	1A11+1A11-V1 单可变结构域	1A11+1A11-V2 单可变结构域
1B10 单可变结构域	1B10+1A1 单可变结构域	1B10+1A10 单可变结构域	1B10+1A11 单可变结构域	1B10+1B10 单可变结构域	1B10+1A10-V1 单可变结构域	1B10+1A10-V2 单可变结构域	1B10+1A11-V1 单可变结构域	1B10+1A11-V2 单可变结构域
1A10-V1 单可变结构域	1A10-V1+1A1 单可变结构域	1A10-V1+1A10 单可变结构域	1A10-V1+1A11 单可变结构域	1A10-V1+1B10 单可变结构域	1A10-V1+1A10-V1 单可变结构域	1A10-V1+1A10-V2 单可变结构域	1A10-V1+1A11-V1 单可变结构域	1A10-V1+1A11-V2 单可变结构域
1A10-V2 单可变结构域	1A10-V2+1A1 单可变结构域	1A10-V2+1A10 单可变结构域	1A10-V2+1A11 单可变结构域	1A10-V2+1B10 单可变结构域	1A10-V2+1A10-V1 单可变结构域	1A10-V2+1A10-V2 单可变结构域	1A10-V2+1A11-V1 单可变结构域	1A10-V2+1A11-V2 单可变结构域
1A11-V1 单可变结构域	1A11-V1+1A1 单可变结构域	1A11-V1+1A10 单可变结构域	1A11-V1+1A11 单可变结构域	1A11-V1+1B10 单可变结构域	1A11-V1+1A10-V1 单可变结构域	1A11-V1+1A10-V2 单可变结构域	1A11-V1+1A11-V1 单可变结构域	1A11-V1+1A11-V2 单可变结构域
1A11-V2 单可变结构域	1A11-V2+1A1 单可变结构域	1A11-V2+1A10 单可变结构域	1A11-V2+1A11 单可变结构域	1A11-V2+1B10 单可变结构域	1A11-V2+1A10-V1 单可变结构域	1A11-V2+1A10-V2 单可变结构域	1A11-V2+1A11-V1 单可变结构域	1A11-V2+1A11-V2 单可变结构域

注：表中(X)+ (Y)表示多特异性抗体中第三抗原结合模块和第一抗原结合模块的组合，例如“1A10+1A1 单可变结构域”表示多特异性抗体中第三抗原结合模块为 1A10 单可变结构域的氨基酸序列，同时第一抗原结合模块为 1A1 单可变结构域的氨基酸序列；该表中涉及的单可变结构域的氨基酸序列参见表 S2。

本发明中，所述的第一抗原结合模块可以是骆驼科动物的或人源化的。所述的第三抗原结合模块可以是骆驼科动物的、或人源化。人源化可降低免疫原性，在一些实施方案中，所示第一抗原结合模块和第三抗原结合模块都是人源化的。在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块都是骆驼科动物的。

本发明的多特异性抗体中，所述第二抗原结合模块提供靶向活化性 T 细胞抗原的能力。所述第二抗原结合模块可以为 Fab、ScFv 或 ScFab。一个实施方案中，所述活化性 T 细胞抗原为 CD3。一个具体的方案，所述第二抗原结合模块为结合 CD3 的 Fab。另一个具体的方案，所述二抗原结合模块为结合 CD3 的 ScFv。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块是鼠源的、嵌合的或人源化的。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 43 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 45 所示氨基酸序列的 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 46 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 48 所示氨基酸序列的 LCDR3。

一个具体的方案，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的可变区的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的可变区的 LCDR1，HCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 49 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列的重链可变区和包含与 SEQ ID NO: 50 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列的轻链可变区。一个具体的方案，所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，并且其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。一个更具体的方案，所述第二抗原结合模块的重链可变区和轻链可变区依次分别如 SEQ ID NO: 49、50 所示。

表 S5 示例性的第二抗原结合模块的 CDR 和可变区序列

区	氨基酸序列	SEQ ID NO:
CD3-HCDR1	TYAMN	43
CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	44
CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	45
CD3-LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN	46
CD3-LCDR2	GTNKRAP	47
CD3-LCDR3	ALWYSNLWV	48
CD3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	49
CD3-VL	ELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTITGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	50

本发明的多特异性抗体可以是无 Fc 域的，第一抗原结合模块、第二抗原结合模块、第三抗原结合模块通过合适的接头进行连接。

本发明的多特异性抗体可以是有 Fc 域的，Fc 域可以延长半衰期、提供 Fc 域相关的效应子等功能。

多特异性抗体构型

本发明多特异性抗体的各组分可以以多种构造彼此融合。在一些实施方案中，所述的多特异性抗体，其还包含(iv)由两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

第三抗原结合模块可以与第一抗原结合模块或者第二抗原结合模块彼此融合。在第（1）种可选择的实施方案中，所述第三抗原结合模块与所述第一抗原结合模块彼此融合，任选经由肽接头彼此融合。在第（2）种可选择的实施方案中，所述第三抗原结合模块和所述第二抗原结合模块彼此融合，任选经由肽接头彼此融合。

在第（1）种可选择的实施方案中，所述第三抗原结合模块与所述第一抗原结合模块彼此融合，任选经由肽接头彼此融合。一个更具体的方案，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至第一抗原结合模块的 N 端。进一步的，在一些实施方案中，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块为 ScFv 且所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端。在另一些实施方案中，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块为 Fab 且所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端。

在一个具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端。此类构造示意性的描述于图 5A 中。对于此实施方案，进一步更具体的方案，多特异性抗体具有三条多肽链，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块、第三抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块的 Fab 重链和 Fc 域的另一个 Fc 多肽，第三条多肽链为上述第二抗原结合模块的 Fab 轻链。

在另一个具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端。此类构造示意性的描述于图 5B 中。对于此实施方案，进一步更具体的方案，多特异性抗体具有两条多肽链，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块、第三抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块和 Fc 域的另一个 Fc 多肽。

对于第三抗原结合模块的连接方式，在第（2）种可选择的实施方案中，所述第三抗原结合模块和所述第二抗原结合模块彼此融合，任选经由肽接头彼此融合。更具体的方案，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至第二抗原结合模块的 N 端。进一步的，在一些实施方案中，第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块为 ScFv 且所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端。在另一些实施方案中，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块为 Fab 且所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端。其中，所述第三抗原结合模块融合至所述第二抗原结合模块的 Fab 轻链或 Fab 重链的 N 端。

在一个具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 N 端。此类构造示意性的描述于图 5C 中。对于此实施方案，进一步更具体的，多特异性抗体具有两条多肽链，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述的第二抗原结合模块、第三抗原结合模块和 Fc 域的另一个 Fc 多肽。

在另一个具体的实施方案中，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域，所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 Fab 轻链的 N 端(此类构造示意性的描述于图 5D 中)或所述第二抗原结合模块的 Fab 重链的 N 端。对于此实施方案，进一步更具体的，多特异性抗体具有三条多肽链，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块的 Fab 重链和 Fc 域的另一个 Fc 多肽，第三条多肽链含有上述的第三抗原结合模块和第二抗原结合模块的 Fab 轻链。可选的，多特异性抗体具有三条多肽链，其中第一条多肽链含有上述的第一抗原结合模块和 Fc 域的其中一个 Fc 多肽，第二条多肽链含有上述第二抗原结合模块的 Fab 重链、第三抗原结合模块和 Fc 域的另一个 Fc 多肽，第三条多肽链含有上述的第二抗原结合模块的 Fab 轻链。

上述所述第二抗原结合模块为 ScFv 时，其包含的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的排列顺序是任意的，例如，在一个实施方案中，所述第二抗原结合模块的 VH 和 VL 从 N 端到 C 端按照 VL-VH 的顺序排列；在另一个实施方案中，所述第二抗原结合模块的 VH 和 VL 从 N 端到 C 端按照 VH - VL 的顺序排列。在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块的 VH 和 VL 经肽接头融合形成 ScFv。

上述任一实施方案，多特异性抗体的各组分可操作性的连接，如直接地或经由本文中

描述或本领域已知的各种肽接头(例如是包含一个或多个氨基酸，通常约 1-50 个氨基酸的肽接头)、铰链融合，本领域技术人员可以合理选择。

所述第三抗原结合模块可以直接或经由肽接头与第一抗原结合模块或第二抗原结合模块融合。一种实施方案，所述第三抗原结合模块经由肽接头与第一抗原结合模块或第二抗原结合模块融合。在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块为 ScFv 结构时，其轻链可变区和重链可变区经由肽接头连接。

各肽接头均可以各自独立的采用任何适宜的，例如可以使用带电的和/或柔性的接头多肽。在具体的实施方案中，肽接头由通过肽键连接的 1 到 50 个氨基酸组成，其中所述氨基酸可以选自 20 个天然存在的氨基酸；在更优选的实施方案中，1 到 50 个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸。因此，示例性的肽接头可以是聚甘氨酸(尤其是(Gly)4、(Gly)5)、聚(Gly-Ser)、(Gly)3AsnGlySer(Gly)2、(Gly)3Cys(Gly)4、GlyProAsnGlyGly，或者专利申请 WO2019195535 的表 4 所公开的那些，等等。

在一些实施方案中，所述肽接头可以是由甘氨酸和丝氨酸组成的肽接头。在一些实施方案中，所述肽接头包含的氨基酸数目可以是 0 个、1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、或 20 个以上。在一些实施方案中，所述肽接头为包含以 GGGGS 为单位的肽接头、包含 GGSGGSGGSGGSGG(SEQ ID NO: 2)的肽接头或包含 GGGPGKR 的肽接头。优选的，所述以 GGGGS 为单位的肽接头为(GGGGS)n，其中 n 是 1-10 之间的任意数，即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，或由前述数字中的任意两个限定的任何范围，例如 1-5、2-5、3-6、2-4、1-4 等等。在一些具体的实施方案中，所述的肽接头为包含 GGGGS、(GGGGS)2、(GGGGS)3 或(GGGGS)4 的接头多肽。在一些具体的实施方案中，所述第三抗原结合模块经由肽接头 GGGGS(SEQ ID NO: 1)或(GGGGS)2 或(GGGGS)3 与第一抗原结合模块或第二抗原结合模块融合。在一些实施方案中，所述第二抗原结合模块为 ScFv 结构时，其轻链可变区和重链可变区经由肽接头 GGGGS 或(GGGGS)2 或(GGGGS)3 连接。

当与 Fc 融合时，典型的是通过铰链区融合。一种实施方案，所述第一抗原结合模块经第一铰链与 Fc 域的其中一个 Fc 多肽融合，所述第二抗原结合模块经第二铰链与 Fc 域的其中一个 Fc 多肽融合。在一些实施方案中，所述第一铰链和第二铰链能够相互形成共价键，例如二硫键。第一铰链或/和第二铰链可以包含人 IgG 的铰链区的氨基酸，人 IgG 的铰链区包含天然的铰链区或其变体。在一些实施方案中，第一铰链或/和第二铰链包含人 IgG1 的铰链区的氨基酸；在一些实施方案中，第一铰链或/和第二铰链包含人 IgG4 的铰链区的氨基酸。在一些具体的实施方案中，第一铰链包含 GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 3)，第二铰链包含 EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 4)；在另一些具体的实施方案中，第一铰链包含 EPKSCDKTHTCPPCP，第二铰链包含 GEPKSSDKTHTCPPCP。在一些具体的实施方案中，第一铰链和第二铰链均包含 GEPKSSDKTHTCPPCP 或 EPKSCDKTHTCPPCP。

Fc 域

多特异性抗体的 Fc 域由一对包含免疫球蛋白分子重链结构域的多肽链组成。例如，免疫球蛋白 G(IgG)分子的 Fc 域是二聚体，其每个 Fc 多肽包含 IgG 重链恒定区的 CH2 和 CH3。Fc 域的两个 Fc 多肽能够彼此稳定缔合。在一个实施方案中，本发明的多特异性抗体包含一个 Fc 域。

在一个实施方案中，多特异性抗体的 Fc 域是 IgG Fc 域。在一个具体的实施方案中，Fc 域是 IgG1 Fc 域。在另一个实施方案中，Fc 域是 IgG4 Fc 域。在一个更具体的实施方案中，Fc 域是包含位置 S228 处的氨基酸替代，特别是氨基酸替代 S228P 的 IgG4 Fc 域，此氨基酸替代降低 IgG4 抗体的体内 Fab 臂交换。在又一个具体的实施方案中，Fc 域是人 Fc 域。在一个更具体的实施方案中，Fc 域是人 IgG 1Fc 域。

在一些实施方案中，所述 Fc 域包含修饰，例如氨基酸取代。所述修饰例如可以是促进异二聚化的修饰，改变效应子功能的修饰或改变与 A 蛋白结合能力的修饰等。

在一些实施方案中，所述 Fc 包含促进异二聚化的修饰。

本发明的多特异性抗体包含与 Fc 域中的两个 Fc 多肽中的一个或另一个融合的不同抗原结合模块，因此，两个 Fc 多肽通常包含在两条不同的多肽链中。这些多肽的重组共表达

和随后的二聚化产生两种多肽的几种可能的组合。为了提高重组产生中多特异性抗体的产率和纯度，在该多特异性抗体的 Fc 域中引入促进希望的多肽结合的修饰将是有利的。因此，在具体实施方案中，所述 Fc 域包含促进所述 Fc 域的两个 Fc 多肽相缔合的氨基酸取代。

人 IgG Fc 域的两条 Fc 多肽之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的部位在 Fc 域的 CH3 结构域中。因此，在一个实施方案中，该修饰在 Fc 域的 CH3 结构域中。

在具体实施方案中，该修饰是所谓的“杵入臼(knob-into-hole)”修饰，其包含 Fc 域的两个 Fc 多肽之一中的“杵”修饰和 Fc 域的两个 Fc 多肽的另一个中的“臼”修饰。通常，该方法涉及在一条 Fc 多肽的界面引入凸起(“杵”)，而在另一条 Fc 多肽的界面引入对应的凹陷(“臼”)，使得该凸起可以定位在该凹陷中，以促进异二聚体形成和妨碍同二聚体形成。通过用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸等)取代来自一条 Fc 多肽的界面的小的氨基酸侧链来构建凸起。通过用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸等)取代大的氨基酸侧链来在另一条 Fc 多肽的界面中产生具有与凸起相同或相似的大小的互补凹陷。

因此，在具体实施方案中，在该多特异性抗体的一个 Fc 多肽的 CH3 结构域中，用具有更大侧链体积的氨基酸残基取代氨基酸残基，从而在该 Fc 多肽的 CH3 结构域内产生可定位在另一个 Fc 多肽的 CH3 结构域内的凹陷中的凸起，在另一个 Fc 多肽的 CH3 结构域中，用具有更小侧链体积的氨基酸残基取代氨基酸残基，从而在该 Fc 多肽的 CH3 结构域内产生凹陷。

在一些具体实施方案中，Fc 域的一个 Fc 多肽包含 T366Y/W 或/和 S354C，且另一个 Fc 多肽包含 Y407T/V、Y349C、T366S 或/和 L368A。一个更具体的实例，所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽包含氨基酸取代 T366Y/W 和 S354C，另一个 Fc 多肽包含氨基酸取代 Y407T/V、Y349C、T366S 和 L368A。在更具体的实例中，Fc 可以是人 IgG1 的 Fc。

在一些实施方案中，所述 Fc 域包含改变效应子功能的修饰。在一些具体的实施方案中，将该多特异性抗体的 Fc 域进行修饰为与未进行所述修饰的 Fc 相比，降低 Fc 域对 Fc 受体的结合亲和力和/或效应子功能。降低 Fc 域对 Fc 受体的结合亲和力和/或效应子功能对改善细胞因子释放和副作用是有利的。

在一些实施方案中，降低该 Fc 域与 Fc 受体的结合亲和力和/或减少效应子功能的修饰是氨基酸取代。在一些实施方案中，该 Fc 域在选自 E233、L234、L235、N297、P331 和 P329 的一个或多个位置上包含氨基酸取代。在一些实施方案中，该 Fc 域在选自 L234、L235 和 P329 的一个或多个位置上包含氨基酸取代。在一些实施方案中，该 Fc 域包含氨基酸取代 L234A 和 L235A。在一个这种实施方案中，该 Fc 是 IgG1 Fc，尤其是人 IgG1 Fc。在一些实施方案中，该 Fc 域在 P329 位包含氨基酸取代。在更具体的实施方案中，该氨基酸取代是 P329A、P329R 或 P329G。在一些实施方案中，该 Fc 域包含 P329 位的氨基酸取代及选自 E233、L234、L235、N297 和 P331 的位置上的另一氨基酸取代。在更具体的实施方案中，该另一氨基酸取代是 E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D 或 P331S。在一些实施方案中，该 Fc 域在 P329、L234 和 L235 位包含氨基酸取代。在更具体的实施方案中，该 Fc 域包含氨基酸取代 L234A、L235A 和 P329G(“P329G LALA”)。在更具体的另一个实施方案中，该 Fc 域包含氨基酸取代 L234A、L235A 和 P329A(“P329A LALA”)。在一个这种实施方案中，该 Fc 是 IgG1 Fc，尤其是人 IgG1 Fc。

在一些具体实施方案中，所述 Fc 域是包含氨基酸取代 L234A、L235A 和 P329A/G/R 的人 IgG1 Fc 结构域。

以上所述降低该 Fc 域与 Fc 受体的结合亲和力和/或效应子功能的氨基酸取代发生在 Fc 域的两条多肽链上。

在一些实施方案中，所述 Fc 域包含减少或消除 Fc 域中的一个 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白(Protein A from Staphylococcus aureus)的结合的修饰。在一些实施方案中，该修饰为氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc 域包含氨基酸取代 H435R 或/和 Y436F，该氨基酸取代仅发生在一个 Fc 多肽上，而不发生在另一个 Fc 多肽上。在一个具体的实施方案中，所述 Fc 域包含仅发生在其中一个 Fc 多肽的氨基酸取代 H435R 或/和 Y436F。在一个这种具体的实施方案中，该 Fc 是 IgG1 Fc，尤其是人 IgG1 Fc。

本发明的多特异性抗体中，所述 Fc 域可以包含促进异二聚化的修饰、改变效应子功能的修饰、减少或消除 Fc 中的一条 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白的结合的修饰中的一种、两

种或三种。在一些实施方案中，所述 Fc 包含促进两个 Fc 多肽缔和的修饰、所述降低 Fc 域对 Fc 受体的结合亲和力和/或减少的效应子功能的修饰、以及减少或消除 Fc 中的一个 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白的结合的修饰。对于上述不同种修饰类型的具体方案，可以进行组合。例如，一个具体的实施方案，所述 Fc 域包含下组的氨基酸取代：

i. Y407T/V、Y349C、T366S、L368A、T366Y/W 和 S354C；其中，氨基酸取代 T366Y/W 和 S354C 在同一个 Fc 多肽上，且与(i.)中的其他氨基酸取代均不在同一个 Fc 多肽上；

ii. L234A、L235A 和 P329A；以及，

iii. H435R 和 Y436F，仅发生在其中一个 Fc 多肽上。

一个更具体的实施方案中，根据 EU 编号，所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽包含氨基酸取代：L234A、L235A、P329A、Y349C、T366S、L368A 和 Y407V，另一个 Fc 多肽包含氨基酸取代：L234A、L235A、P329A、S354C、T366W、H435R 和 Y436F。在这个这种具体的实施方案中，该 Fc 是 IgG1 Fc，尤其是人 IgG1Fc。

本发明上下文中，氨基酸取代表示为：原氨基酸-位置-取代的氨基酸，使用三字母码（Xaa）或单字母码（X）来表示氨基酸残基。因此，例如“H435R”意为将位置 435 处的氨基酸 H 取代为氨基酸 R；对于取代的氨基酸可以包含多于 1 个，例如 T366Y/W 意为将位置 366 处的氨基酸 T 取代为氨基酸 Y 或 W。

在一些实施方案中，本发明所述的多特异性抗体是三价的，即第一抗原结合模块、第二抗原结合模块、第三抗原结合模块均各自提供与相应抗原的单价结合。

本发明提供了示例性的三价多特异性抗体。

一个实例，多特异性抗体由两条多肽链组成，两条多肽链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 65 和 SEQ ID NO: 67 所示。在一些实施方案中，编码两条多肽链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 66 和 SEQ ID NO: 68 所示。

一个实例，多特异性抗体由两条多肽链组成，两条多肽链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 71 所示。在一些实施方案中，编码两条多肽链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 70 和 SEQ ID NO: 72 所示。

一个实例，多特异性抗体由三条多肽链组成，三条多肽链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 61 和 SEQ ID NO: 63 所示。在一些实施方案中，编码两条多肽链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62 和 SEQ ID NO: 64 所示。

一个实例，多特异性抗体由三条多肽链组成，三条多肽链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 61 和 SEQ ID NO: 75 所示。在一些实施方案中，编码两条多肽链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 62 和 SEQ ID NO: 76 所示。

组合物

本发明提供了药物组合物，所述药物组合物包含多特异性抗体，并且还包含一种或多种药学上可接受的载体。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，其包含编码本发明所述的多特异性抗体的多核苷酸。序列表中示例性的列举了一些多特异性抗体的核酸序列。

载体

本发明提供了包含所述的核酸的载体。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，一个具体的例子，表达载体为 pcDNA3.1(+)。所述表达载体可选的能够表达本文所述多特异性抗体的任意表达载体。

宿主细胞

在一些实施方案中，本发明提供包含所述本发明载体的宿主细胞，宿主细胞为用于克隆或表达多特异性抗体的适当宿主细胞。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、哺乳动物细胞或适用于制备多特异性抗体的其他细胞。哺乳动物细胞例如为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、CHO-S细胞。

制备多特异性抗体的方法

在一些实施方案中，本发明提供了制备多特异性抗体的方法，所述方法包括：培养所

述的宿主细胞，使其表达所述的多特异性抗体，并且在体系中分离纯化所述多特异性抗体。为了产生所述的多特异性抗体，分离编码所述多特异性抗体的核酸，并插入一个或多个载体，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

本发明提供了多特异性抗体的用途。在一些具体的实施方案中，使用的多特异性抗体可以为 BC24、PC1、PC2 和/或 PC3。

本发明提供了所述的多特异性抗体或所述的药物组合物在制备治疗 BCMA 表达相关疾病的药物中的用途。

本发明提供了在受试者中治疗 BCMA 表达相关的疾病的方法，其包括对所述受试者施用治疗有效量所述的多特异性抗体或所述的药物组合物。

在一些实施方案中，所述疾病为肿瘤或自身免疫性疾病。

在一些实施方案中，所述疾病为淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、系统性红斑狼疮或类风湿性关节炎。

本发明还提供了示例性实施方案：

实施方案1. 一种多特异性抗体，其包含

(i)结合第一抗原的第一抗原结合模块；

(ii)结合第二抗原的第二抗原结合模块；和，

(iii)结合第一抗原的第三抗原结合模块；

其中所述第一抗原为 BCMA 且所述第二抗原为活化性 T 细胞抗原，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域并且各自独立的包含以下任一项：

(a)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

(b)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(c)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(d)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

实施方案2. 根据实施方案 1 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含以下任一项：

(b)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(c)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。

实施方案3. 根据实施方案 2 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3，并且所述第三抗原结合模块包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。

实施方案4. 根据实施方案 2 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3，并且所述第一抗原结合模块包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3。

实施方案5. 根据实施方案 1 所述的多特异性抗体，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19、21、23、25、37、38、39 或 40 所示的单可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3；优选的，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 或 39 所示的单可变结构域的

CDR1、CDR2 和 CDR3。

实施方案6. 根据实施方案 1-5 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含与 SEQ ID NO: 19、41、42 或 25 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案7. 根据实施方案 1-6 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 41 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案8. 根据实施方案 7 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 21、37 或 38 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；优选的，所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 37 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案9. 根据实施方案 1-8 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 42 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案10. 根据实施方案 9 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；优选的，所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 39 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案11. 根据实施方案 1-6 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 42 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案12. 根据实施方案 11 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；优选的，所述第一抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 39 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案13. 根据实施方案 1-6、11-12 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 41 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案14. 根据实施方案 13 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 21、37 或 38 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；优选的，所述第三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 37 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案15. 根据实施方案 1-5 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块选自以下任一项：

(1)包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块；

(2)包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块；

(3)包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块；

(4)包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(5)包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(6)包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(7) 包含 SEQ ID NO: 41 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 42 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(8) 包含 SEQ ID NO: 42 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 41 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(9) 包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；或，

(10) 包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块。

实施方案16. 根据实施方案 1-15 任一项所述的多特异性抗体，其中所述单可变结构域是骆驼科动物的或人源化的。

实施方案17. 根据实施方案 1-16 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块相同。

实施方案18. 根据实施方案 1-16 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块不同。

实施方案19. 根据实施方案 1-18 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块为 Fab、ScFv 或 ScFab。

实施方案20. 根据实施方案 1-19 任一项所述的多特异性抗体，其中所述活化性 T 细胞抗原为 CD3。

实施方案21. 根据实施方案 1-20 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 43 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 45 所示氨基酸序列的 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 46 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 48 所示氨基酸序列的 LCDR3。

实施方案22. 根据实施方案 1-20 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的可变区的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的可变区的 LCDR1，HCDR2 和 LCDR3。

实施方案23. 根据实施方案 1-22 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 49 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列的重链可变区和与 SEQ ID NO: 50 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列的轻链可变区；优选的，所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，并且其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

实施方案24. 根据实施方案 1-23 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块是鼠源的、嵌合的或人源化的。

实施方案25. 根据实施方案 1-24 任一项所述的多特异性抗体，所述第三抗原结合模块和所述第一抗原结合模块彼此融合，任选经由肽接头彼此融合。

实施方案26. 根据实施方案 25 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至第一抗原结合模块的 N 端。

实施方案27. 根据实施方案 1-24 任一项所述的多特异性抗体，所述第三抗原结合模块和所述第二抗原结合模块彼此融合，任选经由肽接头彼此融合。

实施方案28. 根据实施方案 27 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至第二抗原结合模块的 N 端。

实施方案29. 根据实施方案 1-28 任一项所述的多特异性抗体，其还包含

(iv)由两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

实施方案30. 根据实施方案 29 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块为 ScFv 且所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端。

实施方案31. 根据实施方案 30 所述的多特异性抗体，其中所述第二结合模块从 N 端

到 C 端的结构为 VL-VH 或 VH-VL。

实施方案32. 根据实施方案 29 所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块为 Fab 且所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端。

实施方案33. 根据实施方案 32 所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块融合至所述第二抗原结合模块的 Fab 轻链或 Fab 重链的 N 端。

实施方案34. 根据实施方案 29 所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端。

实施方案35. 根据实施方案 29 所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 N 端。

实施方案36. 根据实施方案 29 所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端。

实施方案37. 根据实施方案 29 所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 Fab 轻链的 N 端或所述第二抗原结合模块的 Fab 重链的 N 端。

实施方案38. 根据实施方案 29-37 任一项所述的多特异性抗体，其中所述 Fc 域是 IgG Fc 域。

实施方案39. 根据实施方案 38 所述的多特异性抗体，其中所述 IgG Fc 域是人 IgG Fc 域，优选为人 IgG1 或人 IgG4 的 Fc 域。

实施方案40. 根据实施方案 29-39 任一项所述的多特异性抗体，其中所述 Fc 域包含促进所述 Fc 域的两个 Fc 多肽相缔合的氨基酸取代。

实施方案41. 根据实施方案 29-40 任一项所述的多特异性抗体，其中根据 EU 编号，所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽包含氨基酸取代 T366Y/W 和 S354C，另一个 Fc 多肽包含氨基酸取代 Y407T/V、Y349C、T366S 和 L368A。

实施方案42. 根据实施方案 29-41 任一项所述的多特异性抗体，所述 Fc 域包含降低 Fc 域对 Fc 受体的结合亲和力和/或效应子功能的氨基酸取代。

实施方案43. 根据实施方案 42 所述的多特异性抗体，其中根据 EU 编号，降低 Fc 域对 Fc 受体的结合亲和力和/或效应子功能的氨基酸取代在选自下组的一个或多个位置处：L234，L235 和 P329；优选的，所述 Fc 域的两个 Fc 多肽均包含氨基酸取代 L234A、L235A 和 P329G，或者均包含氨基酸取代 L234A、L235A 和 P329A。

实施方案44. 根据实施方案 29-41 任一项所述的多特异性抗体，所述 Fc 域包含减少或消除 Fc 域中的一个 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白的结合的氨基酸取代。

实施方案45. 根据实施方案 44 所述的多特异性抗体，其中，根据 EU 编号，所述 Fc 域包含仅发生在其中一个 Fc 多肽的氨基酸取代 H435R 或/和 Y436F。

实施方案46. 根据实施方案 29-39 任一项所述的多特异性抗体，其中，根据 EU 编号，所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽包含氨基酸取代：L234A、L235A、P329A、Y349C、T366S、L368A 和 Y407V，另一个 Fc 多肽包含氨基酸取代：L234A、L235A、P329A、S354C、T366W、H435R 和 Y436F。

实施方案47. 根据实施方案 1-46 任一项所述的多特异性抗体，其为三价的。

实施方案48. 根据实施方案 1-46 任一项所述的多特异性抗体，其中所述多特异性抗体组成为：

(1)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 65 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的

氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 67 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的的氨基酸序列；

(2)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 69 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 71 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；

(3)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 59 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 61 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，还有一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 63 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；或，

(4)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 73 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 61 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，还有一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 75 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案49. 根据实施方案 1 所述的多特异性抗体，其组成为：

(1)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列；

(2)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列；

(3)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，还有一条多肽链包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列；或，

(4)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，还有一条多肽链包含 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列。

实施方案50. 一种分离的核酸，其包含编码根据实施方案 1-49 任一项所述的多特异性抗体的多核苷酸。

实施方案51. 一种载体，其包含根据实施方案 50 所述的核酸。

实施方案52. 一种宿主细胞，其包含根据实施方案 50 所述的核酸，或根据实施方案 51 所述的载体。

实施方案53. 一种制备实施方案 1-49 中任一项所述的多特异性抗体的方法，其包括培养实施方案 52 所述的宿主细胞，使其表达所述的多特异性抗体，并且在体系中分离纯化所述多特异性抗体。

实施方案54. 一种药物组合物，其包含实施方案 1-49 中任一项所述的多特异性抗体和药学上可接受的载体。

实施方案55. 一种在受试者中治疗 BCMA 表达相关的疾病的方法，其包括对所述受试者施用治疗有效量的实施方案 1-49 中任一项所述的多特异性抗体或实施方案 54 所述的药物组合物。

实施方案56. 根据实施方案 55 所述的方法，其中所述疾病为淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、系统性红斑狼疮或类风湿性关节炎。

实施方案57. 一种结合 BCMA 的抗体，其包含单可变结构域，所述单可变结构域包含：

(1)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

(2)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(3)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序

列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；或

(4)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

实施方案58. 根据实施方案 57 所述的结合 BCMA 的抗体，其中所述单可变结构域包含与 SEQ ID NO: 19、21、23、25、37、38、39、40、41 或 42 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

实施方案59. 根据实施方案 58 所述的结合 BCMA 的抗体，其中所述单可变结构域包含 SEQ ID NO: 37、38、39 或 40 所示的氨基酸序列。

实施方案60. 根据实施方案 57-59 中任一项所述的结合 BCMA 的抗体，其中所述的单可变结构域是骆驼科动物的或人源化的。

实施方案61. 根据实施方案 57-60 中任一项所述的结合 BCMA 的抗体，其中所述抗体包含与 SEQ ID NO: 27、29、31、33、51、53、55 或 57 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

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

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。在多轮免疫后取双峰驼外周血，分离外周血单个核细胞(PBMC)。提取PBMC的RNA后逆转录为cDNA，扩增骆驼抗体的V_HH编码片段。

将扩增得到的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，构建得到文库原种。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℃、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)，2.5 M 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℃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

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。将淘选获得的单克隆进行培养，异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达制备上清。

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。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，采用采用表面等离子共振技术检测抗体与人TACI、BAFF-R蛋白的结合情况(方法参见3.2)。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、BAFF-R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 表面等离子共振技术检测抗体与人TACI、BAFF-R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 VHH-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 Na_2HPO_4▪$12H_2O$，1.8 mM KH_2PO_4，0.05% 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BAFF-R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、BAFF-R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。检测发现，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，1A1-Fc、1B10-Fc和BM-Fc未显示与食蟹猴BCMA蛋白有结合。

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2×10^5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1A-1C，表1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1D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1 抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与靶细胞的亲和力

V_HH-Fc嵌合抗体	CHO-hBCMA 细胞 EC50(nM)	U266 细胞 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5×10^5/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2×10^5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2中A采用瞬转食蟹猴BCMA的HEK293T细胞(HEK293T-CynoBCMA)，图2中B采用未转染食蟹猴BCMA的HEK293T细胞，表2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(Bmax)。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2 抗人BCMA V_HH-Fc嵌合抗体与瞬转食蟹猴BCMA的HEK293T细胞的结合

VHH-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和BM-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。按照公式阻断率=(对照组信号值-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结合信号值的阻断率，并进行曲线拟合。结果如图3和表3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4A所示，人BCMA胞外区（SEQ ID NO: 35）与食蟹猴BCMA胞外区（SEQ ID NO: 36）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4B为PDB数据库中人BCMA的胞外区结构(PDB编号：2kn1)。如图4A、4B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3 抗人BCMA V_HH-Fc阻断APRIL与BCMA的结合

V_HH-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

将抗人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的抗人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4所示，棋盘中“\”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4 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-Fc 1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5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5 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 2×10^5 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 2×10^5 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 6 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。

表 6 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 μg/ml+ 1A11-Fc, 10 μg/ml	1443.5
b	1A10-Fc, 20 μg/ml	902.0
c	1A11-Fc, 20 μg/ml	702.0

d	1A10-Fc, 10 μg/ml	823.5
e	1A11-Fc, 10 μg/ml	697.5

。

实施例 7 抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合单抗及其人源化单抗的构建、表达、纯化

分别对 V_HH-Fc 嵌合抗体 1A10-Fc 和 1A11-Fc 进行人源化改造，其中对嵌合抗体 1A10-Fc 进行人源化改造后获得两种人源化抗体，分别为 1A10-V1 和 1A10-V2；对嵌合抗体 1A11-Fc 进行人源化改造后获得两种人源化抗体，分别为 1A11-V1 和 1A11-V2，上述抗体的核苷酸和氨基酸序列见表 7。

合成编码抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体及其人源化抗体的 DNA 序列(SEQ ID NO: 30，52，54，32，56，58，对应名称见表 7)并且分别克隆到 pcDNA3.1(+)表达载体中。通过使用 ExpiCHO 表达试剂盒(Thermo Fisher，目录号 A29133)对每种抗体进行表达，首先将构建好的包含抗体 DNA 序列的表达载体转染到 ExpiCHO 细胞(CHO-S，Thermo 公司)中，再使细胞在 ExpiCHO 表达培养基中于 37℃、含有 8% CO_2 的湿润气氛的培养箱中并在以 130 rpm 旋转的有轨摇床平台上培养。收集培养上清，使用蛋白 A 磁珠(Genscript，目录号 L00273)进行蛋白纯化。通过 UV-Vis 分光光度计(NanoDrop lite, Thermo Scientific)测量蛋白浓度。

表 7：抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合单抗及其人源化单抗的序列信息

名称	氨基酸序列(SEQ ID NO:)	编码 DNA 序列(SEQ ID NO:)	备注
1A10-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKEREWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDSAMYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	人骆驼嵌合抗体
1A10-V1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKGLEWVATIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52	人源化抗体
1A10-V2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSNVACMAWYRQAPGKEREWVSTIVADFGTTNYAASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54	人源化抗体
1A11-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTFNSACMGWFRQAPGKEREGVARIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP	SEQ ID NO: 32	人骆驼嵌合抗体

	KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 31		
1A11-V1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSACMGWFRQ APGKGREGVSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYW GQGTQVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56	人源化抗体
1A11-V2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSACMGWFRQ APGKEREGVSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLKAEDTAVYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYW GQGTQVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58	人源化抗体

实施例 8 抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体及其人源化抗体与抗原人源 BCMA 结合

通过 Biacore T200(GE)测定待测抗体与人源 BCMA 蛋白的亲和力，实验过程描述如下：

用偶联 Anti-hIgG(Cytiva, 产品目录 29234600)的 CM5 芯片(Cytiva, 产品目录 29149603)捕获一定量的待测抗体(包括：1A10-Fc，1A11-Fc，1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1, 1A11-V2)，然后于芯片表面流经人源 BCMA，利用 Biacore 软件实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 Biacore 通用缓冲液(137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM Na_2HPO_4▪$12H_2O$，1.8 mM KH_2PO_4，0.05% surfactant P-20(w/v)，pH 7.4)。Anti-hIgG 偶联至 CM5 芯片表面反应值达到 9000RU 左右，捕获待测抗体 (包括：1A10-Fc，1A11-Fc，1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1, 1A11-V2)约 200RU，然后检测不同浓度的人源 BCMA(100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM)与待测抗体 (包括：1A10-Fc，1A11-Fc，1A10-V1, 1A10-V2, 1A11-V1, 1A11-V2)相互作用的信号值。流动池的流速为 50μl/min，结合时间 240s，解离时间 1400s，用 3 M $MgCl_2$(GE)再生 60s，基线平稳。根据 biacore evaluation software 中 affinity and kinetics 1：1 结合模式运算获得结果。抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体及其人源化抗体(包括：1A10-Fc，1A11-Fc，1A10-V1，1A10-V2，1A11-V1，1A11-V2)与人源 BCMA 亲和力见表 8。

表 8 抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体及人源化抗体与人源 BCMA 的结合亲和力

名称	备注	抗原 BCMA (KD)
1A10-Fc	人骆驼嵌合抗体	0.94 nM
1A10-V1	人源化抗体	0.337 nM
1A10-V2	人源化抗体	1.31 nM
1A11-Fc	人骆驼嵌合抗体	3.96 nM
1A11-V1	人源化抗体	5.05 nM

1A11-V2	人源化抗体	4.37 nM

实施例 9 抗 BCMA/抗 CD3 多特异性抗体构建、表达、纯化

以 Knobs-into-holes(Ridgway, et al., 1996) Fc 工程改造产生作为人 IgG1 的 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体。Fc 域的其中一条多肽序列设计有 H435R、Y436F 突变(Jendeberg et al.,1997)降低 Fc 对蛋白 A 的亲和力，有利于在蛋白 A 亲和纯化中去除多特异性抗体组装过程中形成的同源二聚体。

本实施例中，构建本发明的四种 anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体，分别命名为 BC24、PC1、PC2 和 PC3，其中 BC24 的构型如图 6 中 A 所示，PC1 的构型如图 6 中 B 所示，PC2 的构型如图 6 中 C 所示，PC3 的构型如图 6 中 D 所示。构建的多特异性抗体中，结合 BCMA 的抗原结合结构域来源于抗人 BCMA V_HH-Fc 嵌合抗体及其人源化抗体，结合 CD3 的抗原结合结构域由 sp34 抗体（Silvana Pessano, et al., The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kd T3 (T3-delta and T3 - epsilon) subunits, EMBO J. 1985 Feb; 4(2): 337 - 344.）进行人源化改造获得。

anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 BC24 具有三条多肽链，其中一条多肽链(命名为 A10-linker-A11-Fc)包含两个串联的结合 BCMA 的抗原结合结构域，这两个结合 BCMA 的抗原结合结构域分别来源于 1A10-Fc 和 1A11-Fc 的单可变结构域，该多肽链 A10-linker-A11 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示； anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 BC24 的另外两条多肽链形成包含结合 CD3 的 Fab 形式的抗原结合结构域，这两条多肽链分别命名为 anti-CD3-HC-Fc(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示)和 anti-CD3-LC(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 64 所示)。

anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC1 具有两条多肽链，其中一条多肽链(命名为 anti-BCMA-A10-v1-linker-A11-v1-Fc)包含两个串联的结合 BCMA 的抗原结合结构域，这两个结合 BCMA 的抗原结合结构域分别来源于人源化抗体 1A10-V1 和 1A11-V1 的单可变结构域，Fc 的其中一条多肽的 N 端与结合 BCMA 的抗原结合结构域(来源 1A11-V1)融合，该多肽链 anti-BCMA-A10-v1-linker-A11-v1-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 66 所示；anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC1 另一条多肽链(命名为 anti-CD3-scFv-Fc)包含结合 CD3 的抗原结合结构域，该抗原结合结构域由结合 CD3 的重链可变区和轻链可变区串联形成 ScFv 结构，Fc 的另一条多肽的 N 端与结合 CD3 的抗原结合结构域融合，该多肽链 anti-CD3-scFv-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 67 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 68 所示。

anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC2 具有两条多肽链，其中一条多肽链(命名为 anti-BCMA-A10-v1-Fc)包含一个结合 BCMA 的抗原结合结构域，该结合 BCMA 的抗原结合结构域来源于人源化抗体 1A10-v1 的单可变结构域，Fc 的其中一条多肽的 N 端与结合 BCMA 的抗原结合结构域融合，该多肽链 anti-BCMA-A10-v1-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 70 所示；anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC2 的另一条多肽链(命名为 anti-BCMA-A11-v1-linker-anti-CD3-scFv-Fc)包含串联的结合 CD3 的抗原结合结构域和结合 BCMA 的抗原结合结构域，其中结合 CD3 的抗原结合结构域由结合 CD3 的重链可变区和轻链可变区串联形成 ScFv 结构，结合 BCMA 的抗原结合结构域来源于人源化抗体 1A11-v1 的单可变结构域，Fc 的另一条多肽的 N 端与结合 CD3 的抗原结合结构域融合，该多肽链 anti-BCMA-A11-v1-linker-anti-CD3-scFv-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 71 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 72 所示。

anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC3 具有三条多肽链，其中一条多肽链(命名为 anti-BCMA-A11-v1-Fc)包含一个结合 BCMA 的抗原结合结构域，该结合 BCMA 的抗原结合结构域来源于人源化抗体 1A11-v1 的单可变结构域，Fc 的其中一条多肽的 N 端与结合 BCMA 的抗原结合结构域融合，该多肽链 anti-BCMA-A11-v1-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 73 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 74 所示；anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC3 的另外两条多肽链形成包含结合 CD3 的 Fab 形式的抗原结合结构域，Fab 轻链的 N 端与结合 BCMA 的抗原结合结构域融合，该结合 BCMA 的抗原结合结构域来源于人源化抗体 1A10-v1 的单

可变结构域，Fc 的另一条多肽的 N 端与结合 CD3 的抗原结合结构域的 Fab 重链融合，这两条多肽链分别命名为 anti-CD3-HC-Fc(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示)和 anti-BCMA-A10-v1-linker-anti-CD3-VL (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 76 所示)。

本实施例中以新基公司的 anti-BCMA/anti-CD3 双特异性抗体为对照抗体，序列来源 US20190263920A1。本实施例中 anti-BCMA/anti-CD3 双特异性对照抗体 Benchmark (简称新基 BM 或 celgene BM)包含两个结合 BCMA 的 Fab 形式的抗原结合结构域和一个结合 CD3 的 Fab 形式的抗原结合结构域，其中一条 anti-BCMA 臂为 anti-BCMA-Fab-Fc 结构形式，包括多肽链 anti-BCMA-HC-Fc(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 78 所示)和 anti-BCMA-LC(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 79 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 80 所示)，并在 anti-BCMA-HC-Fc(SEQ ID NO: 77)中增加了 H435R 和 Y436F 点突变，提高纯化工艺收率；anti-BCMA/anti-CD3 双特异性对照抗体 BM 的另一条 anti-BCMA/anti-CD3 臂的结构为 anti-BCMA-Fab-CD3-Fab-Fc 结构形式，包括多肽链 anti-BCMA–VH-anti-CD3-VL-Fc(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 81，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示)、anti-CD3-VH-CL(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 83，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 84 所示)和 anti-BCMA-LC(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 79 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 80 所示)。

对于每种 anti-BCMA/anti-CD3 抗体，将编码组成抗体的各多肽链的 DNA 序列分别插入 pCDNA3.1(+)载体中，获得表达相应多肽链的表达载体。蛋白质表达受 CMV 启动子驱动。聚腺苷酸化受到位于 CDS 的 3’端的合成的 polyA 信号序列驱动。另外，每种载体含有用于自主复制的 Ori 序列。

为了生成这些抗体分子，使用 ExpiCHO 表达试剂盒(Thermo Fisher，目录号 A29133)对每种抗体组合进行表达。首先将相应的表达载体以特定比率(PC1 中转染比率为，载体(anti-BCMA-A10-v1-linker-A11-v1-Fc)：载体(anti-CD3-scFv-Fc)为 1:1.5；PC2 中转染比率为，载体(anti-BCMA-A10-v1-Fc)：载体(anti-BCMA-A11-v1-linker-anti-CD3-scFv-Fc)为 1:1.5；PC3 中转染比率为，载体(anti-BCMA-A11-v1-Fc)：载体(anti-CD3-HC-Fc)：载体(anti-BCMA-A10-v1-linker-anti-CD3-VL)为 1:1.5:1.5；celgene BM 的转染比率为，载体(anti-BCMA-HC-Fc)：载体(anti-BCMA-LC)：载体(anti-BCMA-VH-anti-CD3-VL-Fc)：载体(anti-CD3-VH-CL)为 1:2:1:1.5；BC24 中的转染比率为，载体(A10-linker-A11-Fc)：载体(anti-CD3-HC-Fc)：载体(anti-CD3-LC)为 1:1.5:2)转染到 ExpiCHO 细胞(CHO-S，Thermo 公司)中，再使细胞在 ExpiCHO 表达培养基中于 37℃、含有 8% CO_2 的湿润气氛的培养箱中并在以 130 rpm 旋转的有轨摇床平台上培养。培养 10-14 天收获细胞培养上清液，通过离心去除细胞。上清液在 AKTA purifier 100 (GE)系统进行亲和层析、离子交换层析和凝胶层析纯化。

通过测量 280 nm 处的光密度(OD)来测定经过纯化的蛋白质样品的蛋白质浓度，其使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数进行。

利用大小排阻层析(size exclusion chromatography；SEC)检测收集的各级分管中样品的纯度。具体方法：使用 ACQUITY UPLC Protein BEH SEC column 分析性大小排阻色谱柱(WATERS)在 16 mM NaH_2PO_4，34 mM Na_2HPO_4，200 mM NaCl，pH7.0 运行缓冲液于 25℃分析分子的聚集体含量。根据 SEC 结果将纯度大于 95%的样品合并。

采用 Waters LC-MS 系统(Waters,Singapore,USA,UK)进行完整分子量分析。采用 MAbPac RP 4 μm 2.1×50 mm(Thermo,USA)色谱柱；以 A 相(0.1%甲酸水溶液)、B 相(0.1%甲酸乙腈溶液)为流动相，检测波长为 280 nm。取 1 μg 蛋白注入液质联用仪，梯度为：5.5 分钟内，5%B~100%B。质谱仪采用正离子模式，扫描范围：200-4000 m/z。采用 MassLynx 4.1 采集数据，并通过 UNIFI 1.8.2.169 进行数据处理。经 LC-MS 分析显示，以上各 anti-BCMA/anti-CD3 抗体样品的检测分子量与理论分子量相一致；其中图 18 显示了 PC1 的完整分子量检测结果，样品主峰分子量为 108516 Da，与 PC1 理论分子量一致，未见同源杂质峰。

表 9：anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体的序列信息

名称	组成	氨基酸序列 (SEQ ID NO:)	核苷酸 (SEQ ID NO:)

BC24	A10-linker-A11-Fc	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYSSN VACMAWYRQAPGKEREWVATIVADFGTTNY AASVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPED SAMYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQAGG SLRLSCAASGVTFNSACMGWFRQAPGKERE GVARIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLKPEDTAMYYCAAKRSWCTPT WWHELDYNYWGQGTQVTVSSGEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60
	anti-CD3-HC-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62
	anti-CD3-LC	ELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTITGVQPEDEAEYYCALW YSNLWVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADG SPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64
PC1	anti-BCMA-A10-v1-linker-A11-v1-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSN VACMAWYRQAPGKGLEWVATIVADFGTTNY AASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFNSACMGWFRQAPGKGREG VSRIETGYGGTVYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCAAKRSWCTPTW WHELDYNYWGQGTQVTVSSGEPKSSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS	SEQ ID NO: 66

		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK SEQ ID NO: 65	
	anti-CD3-scFv-Fc	ELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTITGVQPEDEAEYYCALW YSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68
PC2	anti-BCMA-A10-v1-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSN VACMAWYRQAPGKGLEWVATIVADFGTTNY AASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVT VSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 70
	anti-BCMA-A11-v1-linker-anti-CD3-scFv-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNS ACMGWFRQAPGKGREGVSRIETGYGGTVY ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQ GTQVTVSSGGGGSELVVTQEPSLTTSPGGTV TLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTITGV QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGN SYVSWFAYWGQGTLVTVSSGEPKSSDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72

PC3	anti-BCMA-A11-v1-Fc	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNS ACMGWFRQAPGKGREGVSRIETGYGGTVY ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAAKRSWCTPTWWHELDYNYWGQ GTQVTVSSGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74
	anti-CD3-HC-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62
	anti-BCMA-A10-v1-linker-anti-CD3-VL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSSN VACMAWYRQAPGKGLEWVATIVADFGTTNY AASVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAATQRGGIDWCDEINYWGQGTLVT VSSGGGGSELVVTQEPSLTTSPGGTVTLTCRS STGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTITGVQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKA NPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76
新基BM	anti-BCMA-HC-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 78

		SEQ ID NO: 77	
	anti-BCMA-LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGY PPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
	anti-BCMA-VH-anti-CD3-VL-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLT VLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
	anti-CD3-VH-CL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST YAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84

实施例 10：Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与抗原结合 SPR

通过 Biacore T200(GE)测定待测抗体与人源 CD3e 或人源 BCMA 蛋白的亲和力，实验过程描述如下：

用偶联 Anti-hIgG(Cytiva, 产品目录 29234600)的 CM5 芯片(Cytiva, 产品目录 29149603)捕获一定量的 anti-BCMA/anti-CD3 抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、新基 BM)，然后于芯片表面流经人源 CD3e(Acro，货号 CDE-H5223)或人源 BCMA，利用 Biacore 软件实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线。实验中用到的缓冲液为 Biacore 通用缓冲液(137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM Na_2HPO_4·$12H_2O$，1.8 mM KH_2PO_4，0.05% surfactant P-20(w/v)，pH 7.4)。Anti-hIgG 偶联至 CM5 芯片表面反应值达到 9000 RU 左右，捕获 anti-BCMA/anti-CD3 抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、新基 BM)约 200RU，然后检测不同浓度的人源 CD3e 蛋白(100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM)或人源 BCMA(100 nM、

50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM)与 anti-BCMA/anti-CD3 抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、新基 BM)相互作用的信号值。流动池的流速为 50 μl/min，结合时间 240 s，解离时间 1400 s，用 3 M $MgCl_2$(GE)再生 60 s，基线平稳。根据 biacore evaluation software 中 affinity and kinetics 1:1 结合模式运算获得结果。anti-BCMA/anti-CD3 抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、新基 BM)与人源 CD3e 蛋白或人源 BCMA 亲和力见表 10。

表 10 anti-BCMA/anti-CD3 抗体与人源 CD3e 或人源 BCMA 蛋白的亲和力

名称	抗原 hBCMA (KD)	抗原 hCD3e (KD)
BC24	0.0627 nM	0.286 nM
PC1	0.0396 nM	1.43 nM
PC2	0.0185 nM	1.33 nM
PC3	0.0347 nM	1.17 nM
新基 BM	0.821 nM	1.60 nM

。

实施例 11 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与多发性骨髓瘤细胞表面 BCMA 的结合

通过流式细胞术分析 Anti-BCMA/anti-CD3 抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、Celgene BM)与表达 BCMA 的 NCI-H929 细胞(BCMA 高表达细胞株，来源：南京科佰生物)、MM1S 细胞(BCMA 中表达细胞株，来源：北纳生物)和 RPMI-8226 细胞(BCMA 低表达细胞株，来源：中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)上的 BCMA 的结合，阴性样品为曲妥珠单抗。

具体实验过程如下：

取对数生长期的 NCI-H929 细胞(BCMA+++)、MM1S 细胞(BCMA++)和 RPMI-8226 细胞(BCMA+)分别使用含 2% FBS(胎牛血清)的 RPMI 培养基(Hyclon，目录号 SH30809.01)调整细胞密度至 5 × 10^6 – 10 × 10^6 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔 U 型细胞培养板(Costar，目录号：3799)。使用上述培养基配制不同浓度的待测抗体，对于 BCMA 高表达和中表达细胞，抗体浓度最高为 440 nM，5 倍倍比稀释共 9 个浓度梯度，对于 BCMA 低表达细胞，抗体浓度最高为 2200 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl，混匀后 4℃孵育 1 小时。加入预冷的 Running buffer(MACS，目录号 130-091-221)洗涤细胞后弃去上清，加入预冷的荧光标记羊抗人 IgG 抗体(Jackson，目录号 109-116-170)，每孔 100 μl 重悬，混匀后 4℃孵育 30 分钟。洗涤后加入预冷的 running buffer 100 μl 重悬细胞，混匀后在 Attune TM NxT 流式细胞仪器上进行流动采集，并使用 Graphpad Prism5 软件进行数据分析。

图 7-9、表 11 显示 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体对 NCI-H929 细胞(BCMA+++)、MM1S 细胞(BCMA++)和 RPMI-8226 细胞(BCMA+)的结合能力。结果显示在 BCMA 高、中表达的靶细胞中，PC1、PC2、PC3 和 BC24 对于靶抗原的最大结合量均优于 Celgene BM。在 BCMA 低表达的靶细胞中，PC3 和 BC24 对于靶抗原的结合优于其他样品。

表 11：不同细胞中各待测样品对靶细胞的结合 EC50 值和最大结合量

样品名称	NCI-H929		MM1S	
	EC_{50}(nM)	Top(MFI)	EC_{50}(nM)	Top(MFI)
Celgene BM	0.8207	165553	0.3808	71438
BC24	1.556	185797	0.535	106924
PC1	1.261	226017	0.3503	100056.5
PC2	1.035	233759	0.311	114684
PC3	0.8366	222679.5	0.3378	123519
阴性对照	67.32	4046	/	7405

实施例 12 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体与 T 细胞表面 CD3 的结合

通过流式细胞术分析 Anti-BCMA/anti-CD3 抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、Celgene BM)与 T 细胞表面 CD3 的结合。阴性对照为曲妥珠单抗。

具体实验过程如下：

人 PBMC 细胞使用 CD3 磁珠(Miltenyi，目录号 130-097-043)进行 $CD3^+$T 细胞的分选：将冻存的 PBMC 复苏，离心清洗两遍进行计数。按照每 10^7 个细胞加入 80 μl Running buffer(MACS，目录号 130-091-221)的比例加入缓冲液，并按照每 10^7 个细胞加入 20 μl CD3 磁珠，混匀后 4℃孵育 15 分钟。按照每 10^7 个细胞加入 1-2 ml 缓冲液洗涤细胞，离心弃去上清后，加入 500 μl 缓冲液重悬细胞沉淀。将 LS 分选柱(Miltenyi，目录号 130-042-401)放置 MidiMACS Starting Kit (LS)磁力架(Miltenyi，目录号 130-091-051)上，经润洗后加入细胞悬液，并洗涤三次。将 LS 分选柱从磁力架上取下，置于干净的离心管上，加入 5 ml 缓冲液收集分选得到的 $CD3^+$T 细胞。计数后将 $CD3^+$T 细胞使用含 2% FBS(胎牛血清)的 RPMI 培养基(Hyclone，目录号 SH30809.01)调整细胞密度至 5×10^6 -10×10^6 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔 U 型细胞培养板(Costar，目录号：3799)。使用上述培养基配制不同浓度的待测抗体，抗体浓度最高为 2200 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl，混匀后 4℃孵育 1 小时。加入预冷的 Running buffer(MACS，目录号 130-091-221)洗涤细胞后弃去上清，加入预冷的荧光标记羊抗人 IgG 抗体(Jackson，目录号 109-116-170)，每孔 100 μl 重悬，混匀后 4℃孵育 30 分钟。洗涤后加入预冷的 running buffer 100 μl 重悬细胞，混匀后在 Attune TM NxT 流式细胞仪器上进行流动采集，并使用 Graphpad Prism5 软件进行数据分析。

图 10、表 12 显示 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体对 $CD3^+$T 细胞的结合能力。结果表明，各 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体均可结合 $CD3^+$T 细胞。

表 12 待测抗体对 $CD3^+$T 细胞的结合 EC50 和最大结合量

样品名称	EC_{50}(nM)	Top(MFI)
Celgene BM	18.12	93499
BC24	38.34	162535
PC1	485.4	92854
PC2	~461.6	37242
PC3	85.81	98353
阴性对照	NA	5980

实施例 13 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体对多发性骨髓瘤靶细胞 NCI-H929 的杀伤

通过人 PBMC(外周血单个核细胞)提供 T 细胞来研究抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、Celgene BM)诱导的对靶细胞(NCI-H929 BCMA+++，来源：南京科佰生物)的杀伤作用。阴性对照为曲妥珠单抗。

具体实验过程如下：

靶细胞 NCI-H929 细胞使用含 2% FBS(胎牛血清)的 1640 实验培养基调整细胞密度至 5×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板(eppendorf，目录号：0030730199)。使用实验培养基配制不同浓度的待测抗体，抗体浓度最高为 8 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。效应细胞人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 2.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +抗体 50 μl)，靶细胞组(靶细胞 50 μl+培养基 150 μl)，效应细胞组(人 PBMC 100 μl+培养基 100 μl)，靶细胞+效应细胞组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +培养基 50 μl)，空白对照组(培养基 200 μl)和裂解液对照组(培养基 200 μl+20 μl 裂解液)，靶细胞最大释放组(靶细胞 50 μl +培养基 150 μl+20 μl 裂解液)，效靶比为 10：1，共孵育 24 小时。在检测前 45 min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液(Promega，目录号 G182A)。使用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒(cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780)试剂盒检测细胞裂解率。

裂解率(%)=($OD_{给药组}$-$OD_{靶细胞+效应细胞组}$)/($OD_{靶细胞最大释放组}$-$OD_{靶细胞组}$)×100%

图 11、表 13 显示了 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的效应细胞对 NCI-H929/BCMA+++肿瘤细胞的裂解率。anti-BCMA/anti-CD3 抗体 PC1 所诱导的细胞杀伤效果优于 PC2 和 PC3，其中 PC1 的 EC50 约为 0.067 nM，PC2 和 PC3 的 EC50 分别约为 0.53 nM 和 0.19 nM。BC24 和 Celgene BM 对 NCI-H929 的杀伤效果优于 PC1、PC2 和 PC3，BC24 的 EC50 约为 0.022 nM，Celgene BM 的 EC50 约为 0.044 nM。

表 13：各待测样品对 NCI-H929 细胞的裂解 EC50 值和最大裂解率

样品名称	EC_{50}(nM)	最大裂解率
PC1	0.06736	36%
PC2	0.5268	38%
PC3	0.1871	35%
BC24	0.02177	40%
Celgene BM	0.04435	41%

实施例 14 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体对多发性骨髓瘤靶细胞 MM1S 的杀伤

通过人 PBMC(外周血单个核细胞)提供 T 细胞来研究抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、Celgene BM)诱导的对靶细胞(MM1S BCMA++，来源：北纳生物)的杀伤作用。阴性对照为曲妥珠单抗。

具体实验过程如下：

靶细胞 MM1S 细胞使用含 2% FBS(胎牛血清)的 1640 实验培养基调整细胞密度至 5×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板(eppendorf，目录号：0030730199)。使用实验培养基配制不同浓度的待测抗体，抗体浓度最高为 8 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。效应细胞人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 2.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +抗体 50 μl)，靶细胞组(靶细胞 50 μl+培养基 150 μl)，效应细胞组(人 PBMC 100 μl+培养基 100 μl)，靶细胞+效应细胞组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +培养基 50 μl)，空白对照组(培养基 200 μl)和裂解液对照组(培养基 200 μl+20 μl 裂解液)，靶细胞最大释放组(靶细胞 50 μl +培养基 150 μl+20 μl 裂解液)，效靶比为 10：1，共孵育 24 小时。在检测前 45 min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液(Promega，目录号 G182A)。使用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒(cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780)试剂盒检测细胞裂解率。

裂解率(%)=(OD 给药组-OD 靶细胞+效应细胞组)/(OD 靶细胞最大释放组-OD 靶细胞组)×100%

图 12、表 14 显示了 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的效应细胞对 MM1S/BCMA++肿瘤细胞的裂解率。anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC1 所诱导的细胞杀伤优于 PC2 和 PC3，其中 PC1 的 EC50 约为 0.0084 nM，PC2 和 PC3 的 EC50 分别约为 0.061 nM 和 0.041 nM。PC3 具有更好的最大裂解率，Celgene BM 对 MM1S 的杀伤效果最弱，EC50 约为 0.085 nM，最大裂解率为 23%。

表 14：各待测样品对 MM1S 细胞的裂解 EC50 值和最大裂解率

样品名称	EC_{50}(nM)	最大裂解率
PC1	0.008398	26%
PC2	0.06052	28%
PC3	0.04069	36%
BC24	0.009373	21%
Celgene BM	0.08465	23%

实施例 15 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体对多发性骨髓瘤靶细胞 RPMI-8226 的杀伤

通过人 PBMC(外周血单个核细胞)提供 T 细胞来研究抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、Celgene BM）诱导的对靶细胞(RPMI-8226 BCMA+，来源：中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)的杀伤作用。阴性对照为曲妥珠单抗。

具体实验过程如下：

靶细胞 RPMI-8226 细胞使用含 2% FBS(胎牛血清)的 1640 实验培养基调整细胞密度至 5×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板(eppendorf，目录号：0030730199)。使用实验培养基配制不同浓度的待测抗体，抗体浓度最高为 8 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。效应细胞人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 2.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +抗体 50 μl)，靶细胞组(靶细胞 50 μl+培养基 150 μl)，效应细胞组(人 PBMC 100 μl+培养基 100 μl)，靶细胞+效应细胞组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +培养基 50 μl)，空白对照组(培养基 200 μl)和裂解液对照组(培养基 200 μl+20 μl 裂解液)，靶细胞最大释放组(靶细胞 50 μl +培养基 150 μl+20 μl 裂解液)，效靶比为 10：1，共孵育 24 小时。在检测前 45 min，靶细胞最大释放组和裂解液对照组加入 20 μl/孔裂解液(Promega，目录号 G182A)。使用 CytoTox96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒(cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay，Promega，G1780)试剂盒检测细胞裂解率。

裂解率(%)=(OD 给药组-OD 靶细胞+效应细胞组)/(OD 靶细胞最大释放组-OD 靶细胞组)×100%

图 13、表 15 显示了 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的效应细胞对 RPMI-8226/BCMA+肿瘤细胞的裂解率。Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体 PC1 对 RPMI-8226 的最大裂解率与 BC24 相当，但具有更低的 EC50；PC2 和 PC3 对 RPMI-8226 的杀伤效果相当，PC2 和 PC3 的 EC50 分别为 0.0185 nM 和 0.0142 nM，最大裂解率均为 39%。Celgene BM 的对 RPMI-8226 的杀伤效果最弱，EC50 为 0.27 nM，最大裂解率为 29%。

表 15：各待测样品对 RPMI-8226 细胞的裂解 EC50 值和最大裂解率

样品名称	EC_{50}(nM)	最大裂解率
PC1	0.0070	29%
PC2	0.0185	39%
PC3	0.01419	39%
BC24	0.01129	29%
Celgene BM	0.2712	29%

实施例 16 由 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的 T 细胞活化

CD69 和 CD25 是 T 细胞活化标志物，本实施例涉及多特异性抗体(包括: BC24、PC1、PC2、PC3、Celgene BM)在骨髓瘤靶细胞存在时对 T 细胞的活化检测。阴性对照（NC）为曲妥珠单抗。

具体实验过程如下：

靶细胞 NCI-H929 细胞和 MM1S 分别使用含 2% FBS(胎牛血清)的 1640 实验培养基调整细胞密度至 5×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板(eppendorf，目录号：0030730199)。使用实验培养基配制不同浓度的待测抗体，抗体浓度最高为 8 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。效应细胞人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 2.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置给药组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +抗体 50 μl)，不加药组（培养基 50 ul+效应细胞 100 μl +抗体 50 μl)，靶细胞组(靶细胞 50 μl+培养基 150 μl)，效应细胞组(人 PBMC 100 μl+培养基 100 μl)，靶细胞+效应细胞组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +培养基 50 μl)，空白对照组(培养基 200 μl)，阴性对照抗体 NC 为曲妥珠单抗，效靶比为 10：1，共孵育 24 小时。离心去除上清，加入预冷的 Running buffer(MACS，目录号 130-091-221)离心洗涤细胞，去除上清后每孔加入 100 μl Running buffer，混匀细胞，每孔加入 CD4-BV421(BD，目录号 564713)、CD8-PE-Cy7(BD，目录号 557746)、CD25-APC(BD，目录号 555434)、CD69-FITC(BD，目录号 555530)各 2.5 μl，冰上孵育 30 分钟。使用预冷的 Running buffer 洗涤细胞，加入 75 μl/孔 Running buffer 重悬细胞，混匀后置于流式细胞仪进行检测。

图 14-15 显示了 Anti-BCMA/anti-CD3 抗体浓度为 8 nM 时，在 NCI-H929 或 MM1S 靶细胞存在与不存在的情况下，T 细胞的激活程度，纵坐标显示活化标志物 CD25 或 CD69 呈阳性的 CD8 或 CD4 细胞的百分比，横坐标代表不同组别，其中 CD4+CD25+/CD4+表示某一组中 CD4 细胞中 CD25 呈阳性的 CD4 细胞所占百分比，CD4+CD69+/CD4+表示某一组中 CD4 细胞中 CD69 呈阳性的 CD4 细胞所占百分比，CD8+CD25+/CD8+表示某一组中 CD8 细

胞中 CD25 呈阳性的 CD8 细胞所占百分比，CD8+CD69+/CD8+表示某一组中 CD8 细胞中 CD69 呈阳性的 CD8 细胞所占百分比。结果表明，在靶细胞不存在时，T 细胞基本不被激活，而在靶细胞存在情况下，抗体 BC24、PC1、PC2、PC3 可激活 T 细胞。

实施例 17 由 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体诱导的细胞因子释放

通过检测 IL-2、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 的含量，研究多特异性抗体在靶细胞存在的情况下，诱导的细胞因子释放。根据细胞因子释放量，评估多特异性抗体的安全性。

具体实验过程如下：

靶细胞 NCI-H929 细胞使用含 2% FBS(胎牛血清)的 1640 实验培养基调整细胞密度至 5×10^5 cells/ml，50 μl 每孔接种于 96 孔细胞培养板(eppendorf，目录号：0030730199)。使用实验培养基配制不同浓度的待测抗体，抗体浓度最高为 8 nM，5 倍倍比稀释共 10 个浓度梯度。将不同浓度的抗体加入上述 96 孔细胞培养板中，每孔 50 μl。效应细胞人 PBMC 使用实验培养基调整细胞密度至 2.5×10^6 cells/ml，每孔 100 μl。设置标准品组、给药组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +抗体 50 μl)，靶细胞组(靶细胞 50 μl+培养基 150 μl)，效应细胞组(人 PBMC 100 μl+培养基 100 μl)，靶细胞+效应细胞组(靶细胞 50 μl +效应细胞 100 μl +培养基 50 μl)，效应细胞+抗体组(效应细胞 100 μl+抗体 50 μl+培养基 50 μl)，空白对照组(培养基 200 μl)，效靶比为 10：1，共孵育 24 小时。离心取上清，使用 human-IL2 kit(Cisbio，目录号 62HIL02PEG)、human-IL6 kit(Cisbio，目录号 62HIL06PEG)、human-TNF-α kit(Cisbio，目录号 62HTNFAPEG)、human-IFN-γ kit(Cisbio，目录号 62HIFNGPEG)检测试剂盒，按照试剂盒说明书进行样品处理，使用酶标仪(Molecular Devices，型号 Paradigm)进行检测分析。

计算所有样品 Ratio 值，以标准品 Ratio(Net)为 Y 轴，Log(标准品浓度值)为 X 轴，用 Graph Pad Prism 进行四参数拟合，分别代入标准品和供试品 Ratio(Net)值得到相应 log(浓度测定值)，计算供试品各因子的浓度测定值。

图 16、表 16 显示不同浓度 Anti-BCMA/anti-CD3 抗体与 NCI-H929 细胞和效应细胞共孵育 24 小时，IL-2、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 因子的释放量。各待检测抗体的 IL-2 释放均较低。本发明的 BC24、PC1、PC2 和 PC3 多特异性抗体相对于 Celgene BM 具有更低的 IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 因子释放水平，显示更好的安全性。

表 16 各待测抗体细胞因子最大释放量

样品名称	IL-2(pg/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)	IFN-γ(pg/ml)
PC1	112.06	964.63	302.56	5463.63
PC2	82.49	1	42.69	2841.61
PC3	97.51	3045.68	371.69	14391.37
BC24	88.07	260.3	200.25	4753.13
Celgene BM	117.37	3040.77	464.18	21552.72

实施例 18 Anti-BCMA/anti-CD3 双抗对小鼠肿瘤模型中对多发性骨髓瘤靶细胞 NCI-H929 的生长抑制

使用人骨髓瘤 NCI-H929 细胞小鼠模型检测 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体的抗肿瘤活性。NCI-H929 细胞 7.5×10^6/只，hPBMC 人外周淋巴细胞 0.5×10^6/只，两者混合后，在无菌条件下，接种于 8-10 周龄雌性 B-NDG 小鼠(来源：百奥赛图，合格证号：3207262001001790 34)右侧腋窝下。皮下移植瘤接种后待肿瘤瘤体积至 100-300 mm^3 将动物随机分成 2 组：i. 模型组(空白对照组，生理盐水)；ii. PC1 组：PC1 供试抗体。在第 0 天小鼠分组，每周两次给药，给药一周，给药剂量 1.5 mpk，给药体积是 10 ml/kg，每三日测量一次体重和瘤径，每日观察动物表现，第 17 天停止观察。实验过程中，分别在第 0、4、8、11、14、17 天测量肿瘤体积。使用下面公式计算肿瘤体积和抑瘤率：

肿瘤体积(TV)=(长╳宽 ^{2})/2；

相对肿瘤体积(RTV)=TV_t/TV_0，其中 TV_0 为分笼给药时肿瘤体积，TV_t 为每一次测量时的肿瘤体积；

相对肿瘤增值率 T/C(%)=(T_{RTV}/C_{RTV})*100%，其中 T_{RTV} 为治疗组 RTV，C_{RTV} 为空白对照组 RTV；

抑瘤率(TGI)=(1-T/C)*100%。

实验结果见图 17，与模型组对比，PC1 抗体药物组可以明显抑制人多发性骨髓瘤 NCI-H929 皮下移植瘤的生长。PC1 抗体在第 8、11、14、17 天的抑瘤率分别为 84.4%、90.9%、94.2%、95.5%。

实施例 19 食蟹猴单次静脉注射 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体的药代动力学

食蟹猴（编号 1M01-1M03，2M01-2M03，每个剂量组 3 只，雄性，体重：2-3 kg）单次静脉滴注 PC1 注射液，PC1 多特异性抗体给药剂量为 1 或 9 mg/kg，静脉滴注时间 30 Min，在给药前及给药后各时间点采集血样，血样在 1 h 内以 4000 rpm 离心约 10 min（2-8℃）分离血清，以 ELISA 法检测各时间点血样中药物浓度。采样时间：0 h（给药前），给药结束 0.5 h、4 h、24 h、48 h、96 h、168 h、240 h、336 h。

各参数如下：

C_{max}：最大观察药物浓度

AUC：血浆浓度-时间曲线下的面积

$T_{1/2}$：半衰期

Cl：清除率

MRT：药物滞留时间

实验结果显示，以 1、9 mg/kg 经单次静脉输注给 Anti-BCMA/anti-CD3 多特异性抗体，药物末端消除半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 105、112 h，C_{max} 为分别为 19、200 μg/mL，AUC_{last} 分别为 700、7200 h*μg/mL，本品在血清中的暴露量与剂量基本成比例增加。

表 17 食蟹猴单次静脉注射 1、9 mg/kg PC1 注射液后主要平均药代动力学参数

组	C_{max} (μg/mL)	AUC_{last} (h*μg/mL)	$t_{1/2}$ (h)	Cl (mL/h/kg)	MRT_{last} (h)
1 mg/kg	19	700	105	1.417	70
9 mg/kg	200	7200	112	1.174	66

。

权利要求书

1. 一种多特异性抗体，其包含

(i)结合第一抗原的第一抗原结合模块；

(ii)结合第二抗原的第二抗原结合模块；和，

(iii)结合第一抗原的第三抗原结合模块；

其中所述第一抗原为BCMA且所述第二抗原为活化性T细胞抗原，所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块均为单可变结构域并且各自独立的包含以下任一项：

(b)包含SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 11所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列的CDR3；

(c)包含SEQ ID NO: 13所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 14所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 15所示氨基酸序列的CDR3；

(a)包含SEQ ID NO: 7所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 8所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 9所示氨基酸序列的CDR3；

或

(d)包含SEQ ID NO: 16所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 17所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 18所示氨基酸序列的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块各自独立的包含以下任一项：

(b)包含SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 11所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列的CDR3；或

(c)包含SEQ ID NO: 13所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 14所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 15所示氨基酸序列的CDR3。

3. 根据权利要求2所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块包含以下互补决定区：包含SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 11所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列的CDR3，并且所述第三抗原结合模块包含以下互补决定区：包含SEQ ID NO: 13所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 14所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 15所示氨基酸序列的CDR3。

4. 根据权利要求2所述的多特异性抗体，其中所述第三抗原结合模块包含以下互补决定区：包含SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 11所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列的CDR3，并且所述第一抗原结合模块包含以下互补决定区：包含SEQ ID NO: 13所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID NO: 14所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID NO: 15所示氨基酸序列的CDR3。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的多特异性抗体，其中

所述第一抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 21、37或38所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 23、39或40所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列；或，

所述第一抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 37所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 39所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1-4任一项所述的多特异性抗体，其中

所述第一抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 23、39或40所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列，所述第三抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 21、37或38所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列；或，

所述第一抗原结合模块包含与SEQ ID NO: 39所示序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列，所述第

三抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 37 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一抗原结合模块和第三抗原结合模块选自以下任一项：

(1)包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块；

(2)包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块；

(3)包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块；

(4)包含 SEQ ID NO: 21 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(5)包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(6)包含 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 23、39 或 40 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(7) 包含 SEQ ID NO: 41 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 42 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(8) 包含 SEQ ID NO: 42 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 41 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；

(9) 包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块；或，

(10) 包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序列的第三抗原结合模块和包含 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列的第一抗原结合模块。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的多特异性抗体，其中所述活化性 T 细胞抗原为 CD3。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含以下互补决定区：包含 SEQ ID NO: 43 所示氨基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 44 所示氨基酸序列的 HCDR2，和包含 SEQ ID NO: 45 所示氨基酸序列的 HCDR3；所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 46 所示氨基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 47 所示氨基酸序列的 LCDR2，和包含 SEQ ID NO: 48 所示氨基酸序列的 LCDR3；或，

所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的可变区的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的可变区的 LCDR1，HCDR2 和 LCDR3。

10. 根据权利要求 1-9 任一项所述的多特异性抗体，其中所述第二抗原结合模块包含与 SEQ ID NO: 49 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列的重链可变区和与 SEQ ID NO: 50 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列的轻链可变区；或，所述第二抗原结合模块的重链可变区包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列，并且其轻链可变区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的多特异性抗体，其还包含

(iv)由两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

12. 根据权利要求 11 所述的多特异性抗体，其中

（1）所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端；

（2）所述第二抗原结合模块为 ScFv，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 N 端；

（3）所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的

另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第一抗原结合模块的 N 端；或，

（4）所述第二抗原结合模块为 Fab，所述第一抗原结合模块在其 C 端融合至所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽的 N 端，所述第二抗原结合模块在其 Fab 重链的 C 端融合至所述 Fc 域的另一个 Fc 多肽的 N 端，所述第三抗原结合模块在其 C 端融合至所述第二抗原结合模块的 Fab 轻链的 N 端或所述第二抗原结合模块的 Fab 重链的 N 端。

13. 根据权利要求 11-12 任一项所述的多特异性抗体，其中所述 Fc 域是 IgG Fc 域、人 IgG Fc 域、人 IgG1 或人 IgG4 的 Fc 域；

可选的，所述 Fc 域包含促进所述 Fc 域的两个 Fc 多肽相缔合的氨基酸取代；或/和，所述 Fc 域包含降低 Fc 域对 Fc 受体的结合亲和力和/或效应子功能的氨基酸取代；或/和，所述 Fc 域包含减少或消除 Fc 域中的一个 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白的结合的氨基酸取代。

14. 根据权利要求 1-13 任一项所述的多特异性抗体，其中所述多特异性抗体组成为：

(1)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 65 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 67 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的的氨基酸序列；

(2)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 69 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 71 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；

(3)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 59 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 61 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，还有一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 63 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；

(4)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 73 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，另一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 61 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，还有一条多肽链包含与 SEQ ID NO: 75 所示序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列；

(5)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 65 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 67 所示的氨基酸序列；

(6)由两条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 69 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸序列；

(7)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，还有一条多肽链包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列；或，

(8)由三条多肽链组成，其中一条多肽链包含 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列，另一条多肽链包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列，还有一条多肽链包含 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列。

15. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-14 中任一项所述的多特异性抗体和药学上可接受的载体。

16. 一种在受试者中治疗 BCMA 表达相关的疾病的方法，其包括对所述受试者施用治疗有效量的权利要求 1-14 中任一项所述的多特异性抗体或权利要求 15 所述的药物组合物；所述疾病为淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、系统性红斑狼疮或类风湿性关节炎。

17. 一种结合 BCMA 的抗体，其包含单可变结构域，所述单可变结构域包含：

(2)包含 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的 CDR3；

(3)包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列的 CDR3；

(1)包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的 CDR3；

或

(4)包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列的 CDR1，包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的 CDR2，和包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的 CDR3。

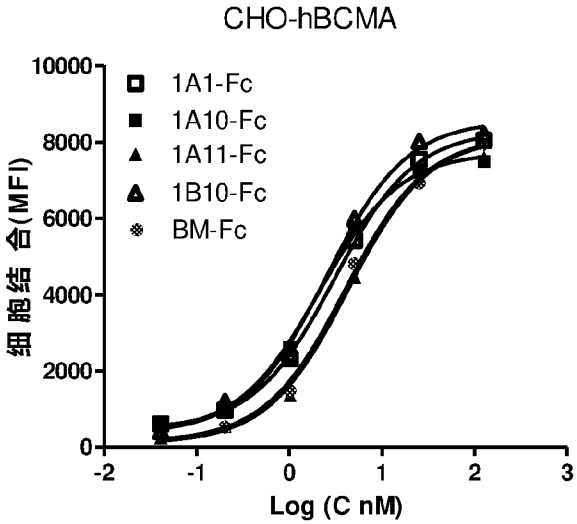

CHO-hBCMA
细胞结合(MFI)
10000
8000
6000
4000
2000
0
1A1-Fc
1A10-Fc
1A11-Fc
1B10-Fc
BM-Fc
-2
-1
0
1
2
3
Log (C nM)

图 1A

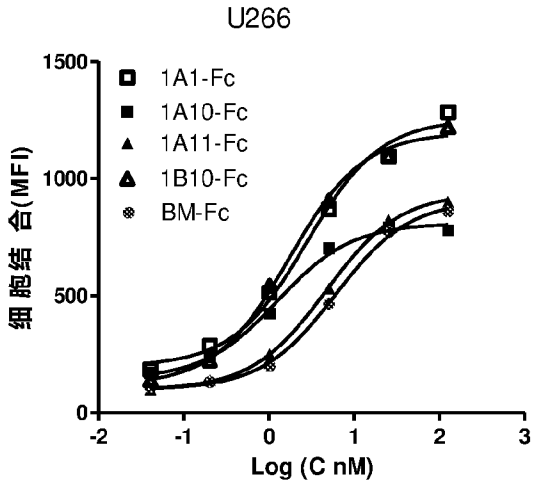

U266
细胞结合(MFI)
1500
1000
500
0
1A1-Fc
1A10-Fc
1A11-Fc
1B10-Fc
BM-Fc
-2
-1
0
1
2
3
Log (C nM)

图 1B

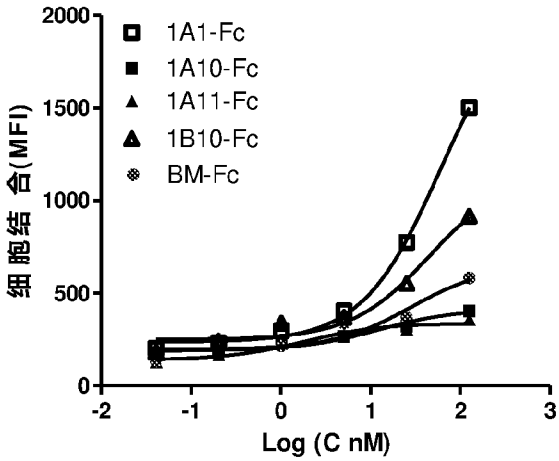

RPMI8226
细胞结合(MFI)
2000
1500
1000
500
0
1A1-Fc
1A10-Fc
1A11-Fc
1B10-Fc
BM-Fc
-2
-1
0
1
2
3
Log (C nM)

图 1C

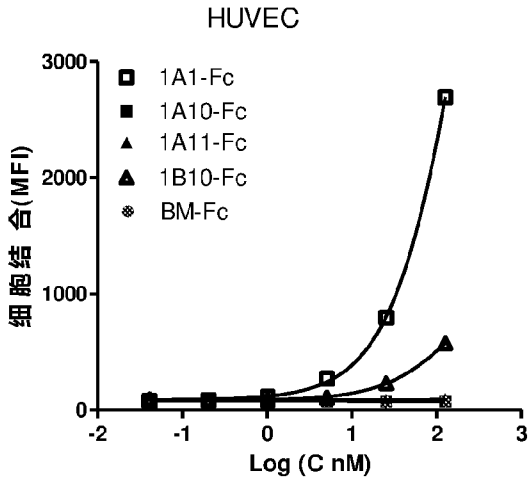

HUVEC
1A1-Fc
1A10-Fc
1A11-Fc
1B10-Fc
BM-Fc
细胞结合(MFI)
Log (C nM)

图 1D

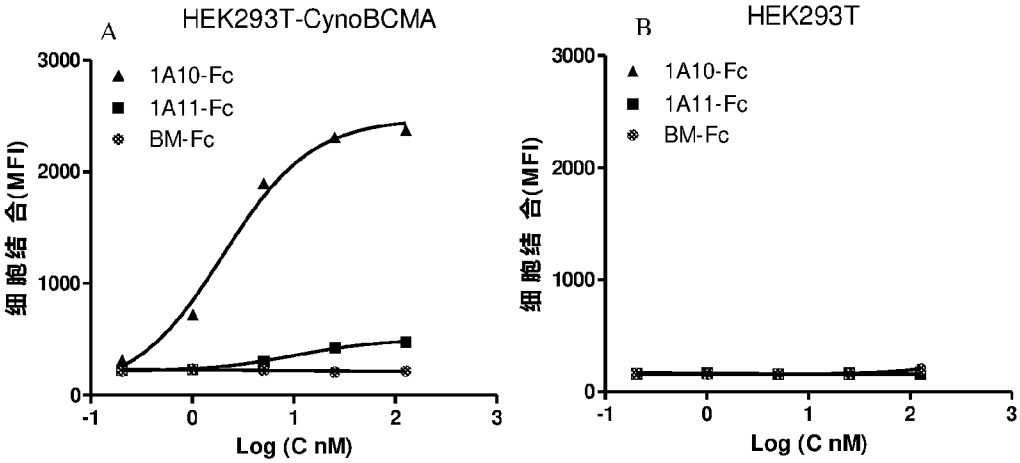

A
HEK293T-CynoBCMA
1A10-Fc
1A11-Fc
BM-Fc
细胞结合(MFI)
Log (C nM)
B
HEK293T
1A10-Fc
1A11-Fc
BM-Fc
细胞结合(MFI)
Log (C nM)

图 2

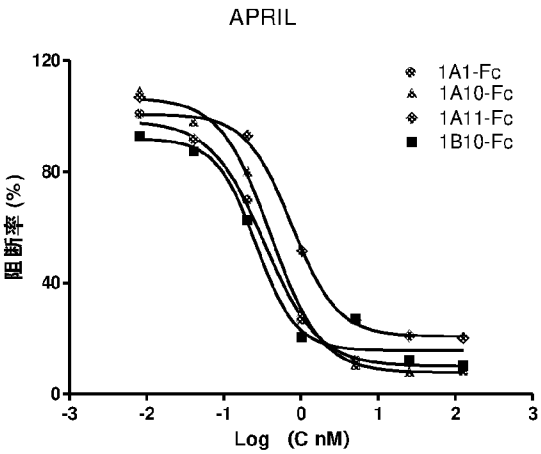

APRIL
1A1-Fc
1A10-Fc
1A11-Fc
1B10-Fc
阻断率(%)
Log (C nM)

图 3

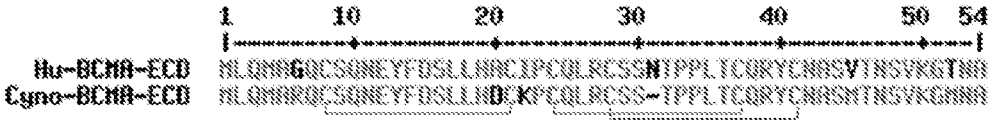

Hu-BCMA-ECD
Cyno-BCMA-ECD

图 4A

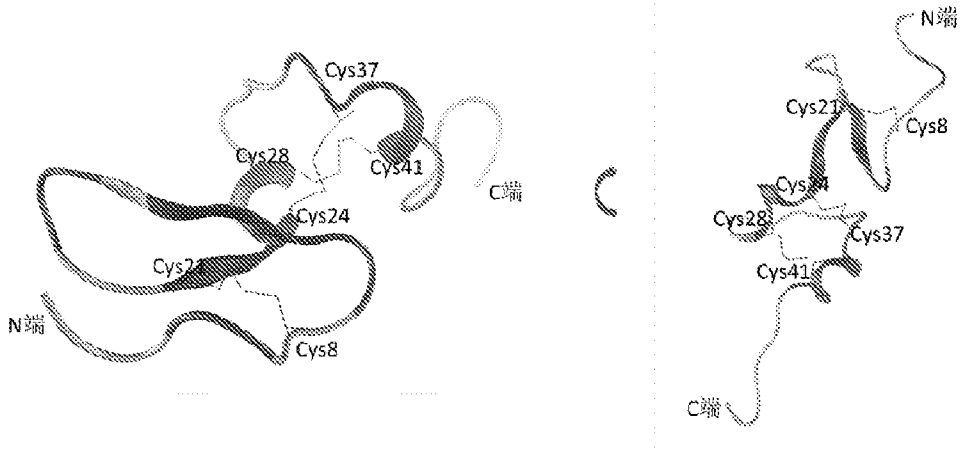

Cys37
Cys28
Cys41
C端
Cys24
Cys21
N端
Cys8
N端
Cys21
Cys8
Cys24
Cys28
Cys37
Cys41
C端

图 4B

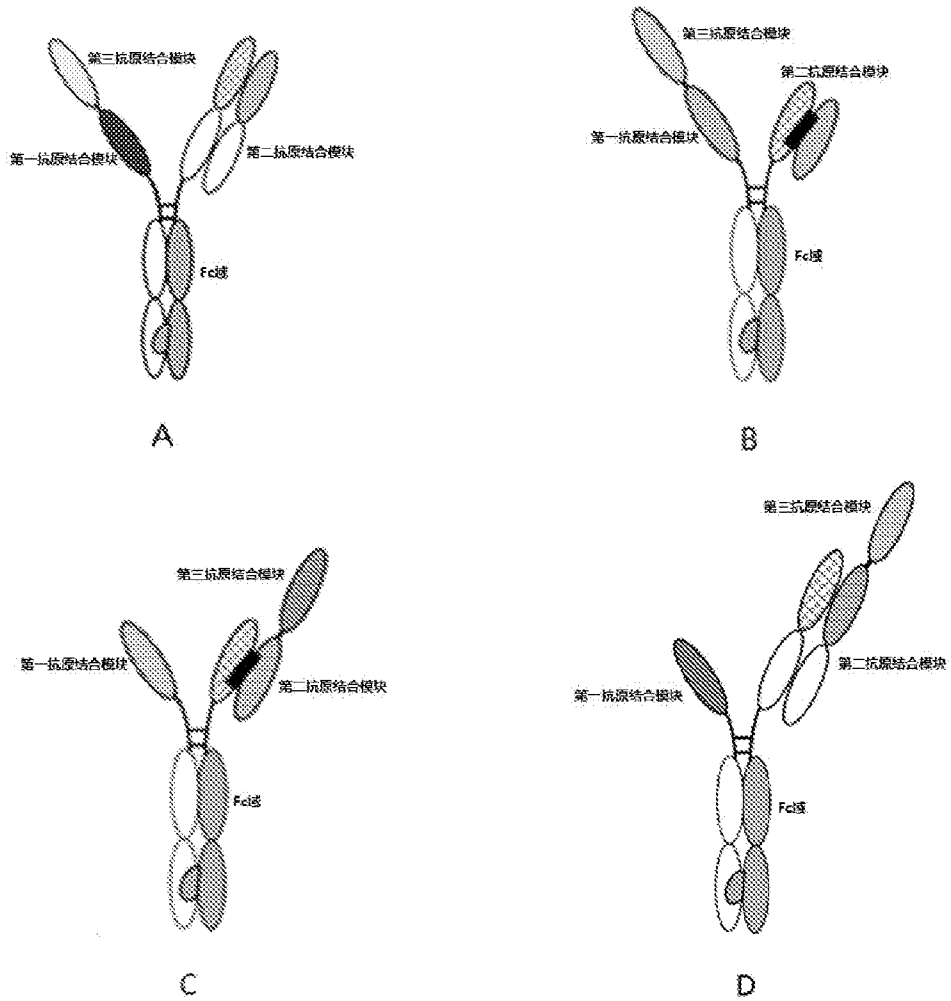

第三抗原结合模块
第一抗原结合模块
第二抗原结合模块
Fc域
A
第三抗原结合模块
第二抗原结合模块
第一抗原结合模块
Fc域
B
第三抗原结合模块
第一抗原结合模块
第二抗原结合模块
Fc域
C
第三抗原结合模块
第二抗原结合模块
第一抗原结合模块
Fc域
D

图 5

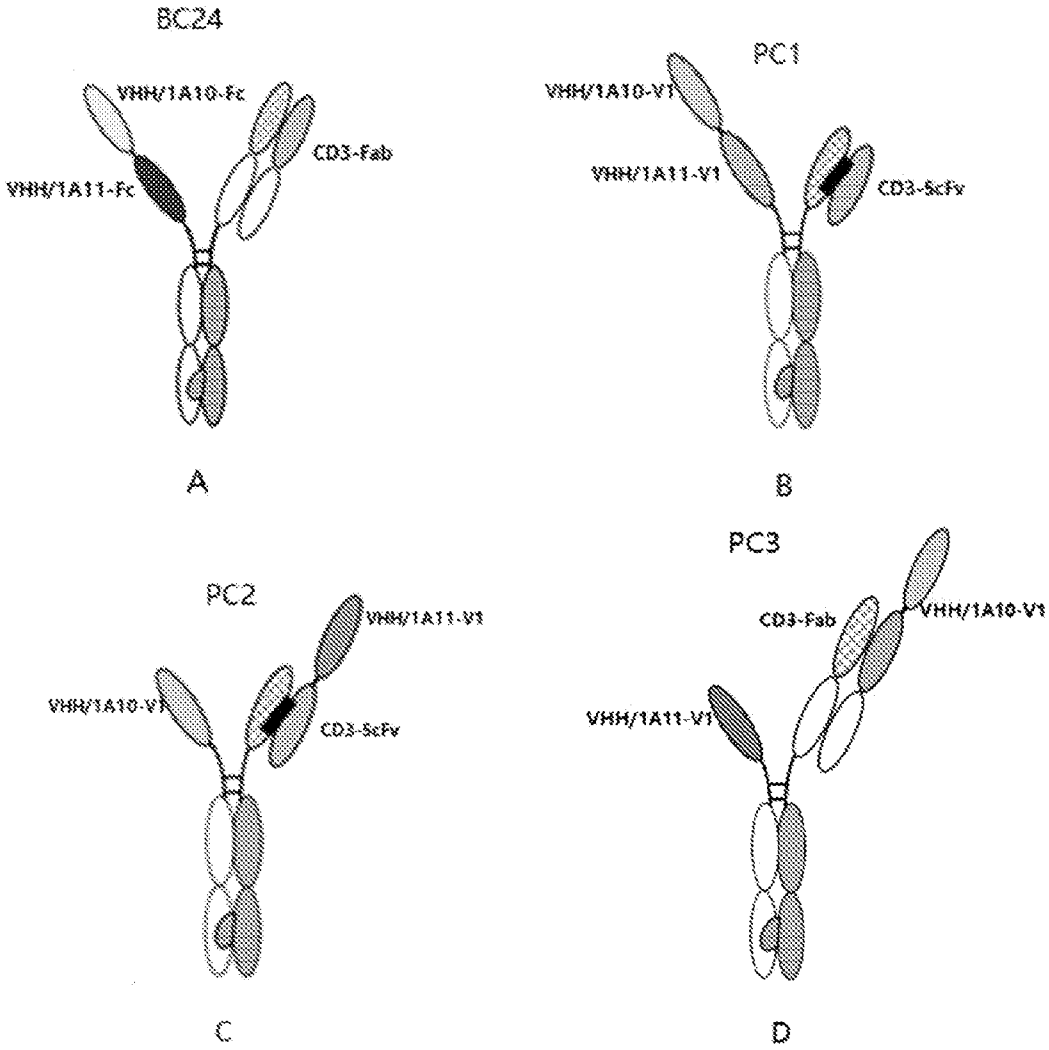

BC24
VHH/1A10-Fc
CD3-Fab
VHH/1A11-Fc
A
PC1
VHH/1A10-V1
VHH/1A11-V1
CD3-ScFv
B
PC2
VHH/1A11-V1
VHH/1A10-V1
CD3-ScFv
C
PC3
CD3-Fab
VHH/1A10-V1
VHH/1A11-V1
D

图 6

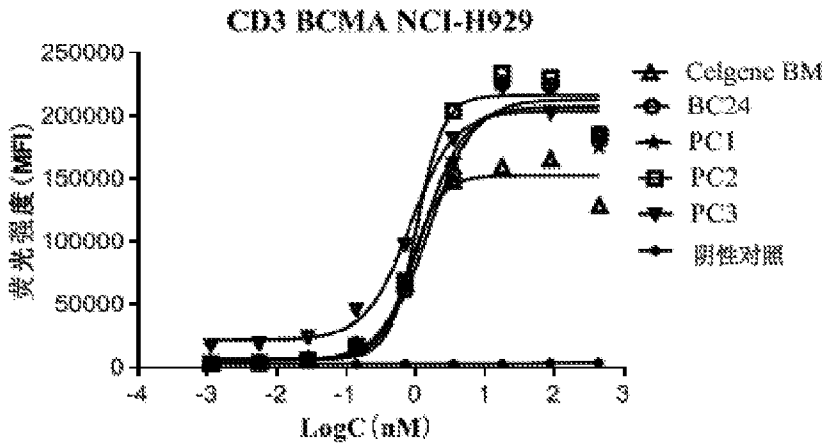

CD3 BCMA NCI-H929
荧光强度(MFI)
250000
200000
150000
100000
50000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
LogC (nM)
Celgene BM
BC24
PC1
PC2
PC3
阴性对照

图 7

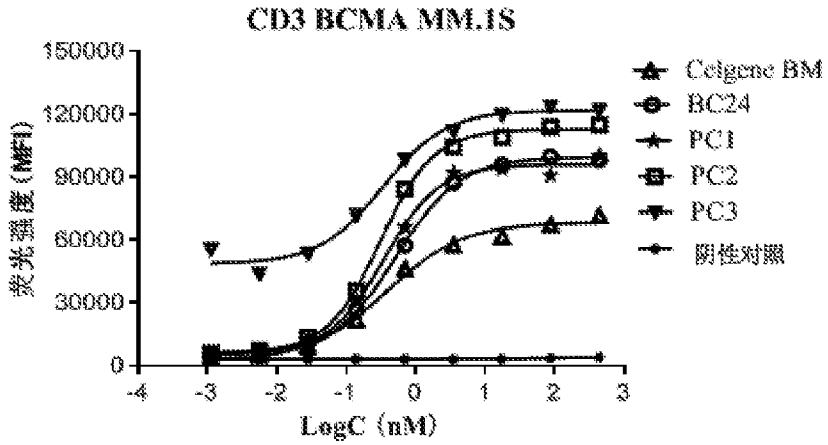

CD3 BCMA MM.1S
荧光强度（MFI）
150000
120000
90000
60000
30000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
LogC（nM）
Celgene BM
BC24
PC1
PC2
PC3
阴性对照

图 8

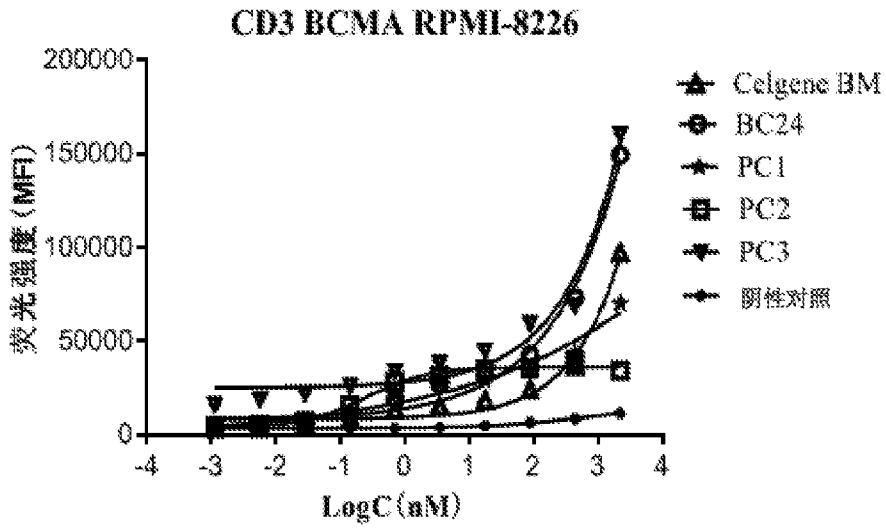

CD3 BCMA RPMI-8226
荧光强度（MFI）
200000
150000
100000
50000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
LogC（nM）
Celgene BM
BC24
PC1
PC2
PC3
阴性对照

图 9

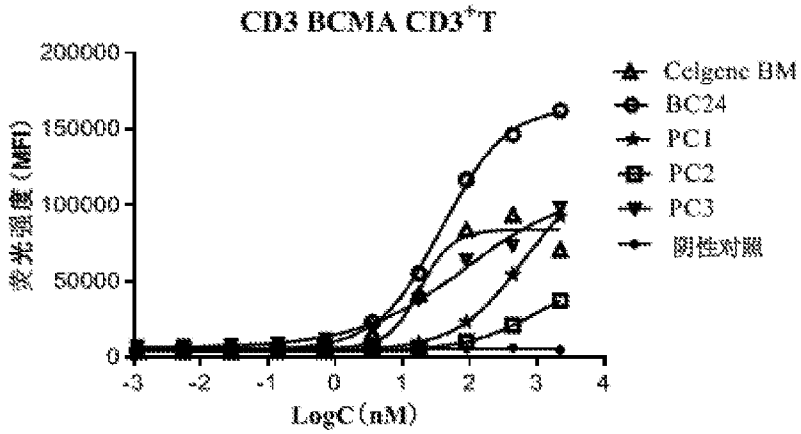

CD3 BCMA CD3+T
荧光强度（MFI）
200000
150000
100000
50000
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
LogC（nM）
Celgene BM
BC24
PC1
PC2
PC3
阴性对照

图 10

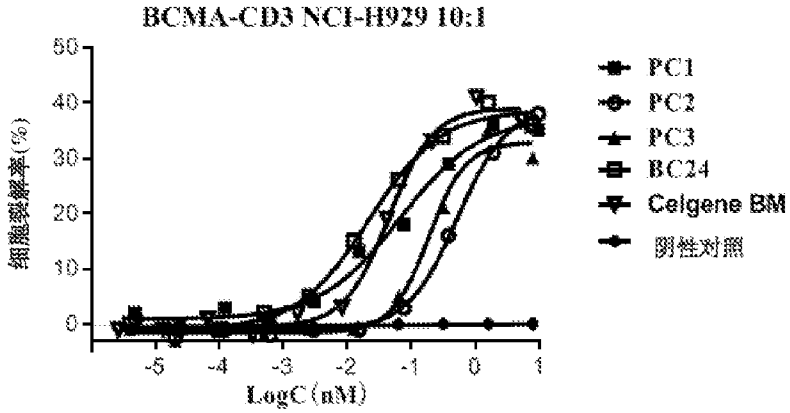

BCMA-CD3 NCI-H929 10:1
细胞裂解率(%)
LogC(nM)
PC1
PC2
PC3
BC24
Celgene BM
阴性对照

图 11

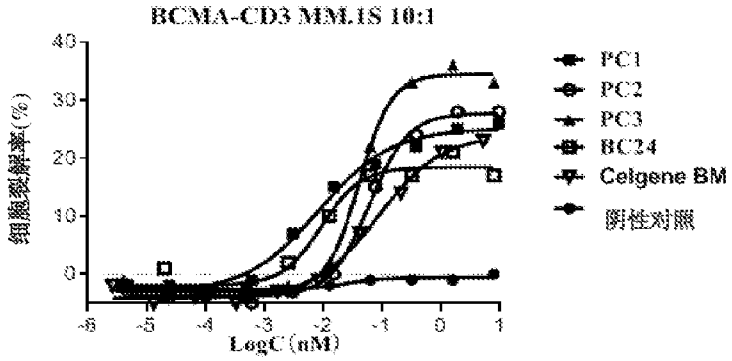

BCMA-CD3 MM.1S 10:1
细胞裂解率(%)
LogC (nM)
PC1
PC2
PC3
BC24
Celgene BM
阴性对照

图 12

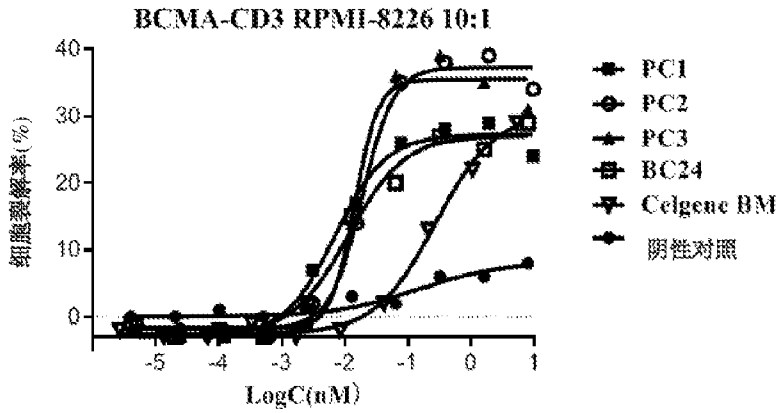

BCMA-CD3 RPMI-8226 10:1
细胞裂解率(%)
LogC(nM)
PC1
PC2
PC3
BC24
Celgene BM
阴性对照

图 13

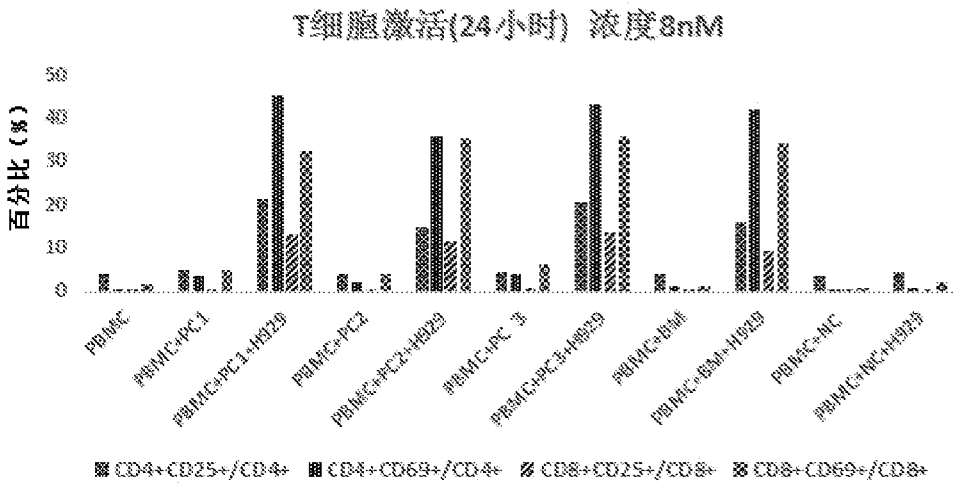

T细胞激活(24小时) 浓度8nM
百分比（%）
50
40
30
20
10
0
PBMC
PBMC+PC1
PBMC+PC1+H929
PBMC+PC2
PBMC+PC2+H929
PBMC+PC 3
PBMC+PC3+H929
PBMC+BM
PBMC+BM+H929
PBMC+NC
PBMC+NC+H929
CD4+CD25+/CD4+
CD4+CD69+/CD4+
CD8+CD25+/CD8+
CD8+CD69+/CD8+

图 14

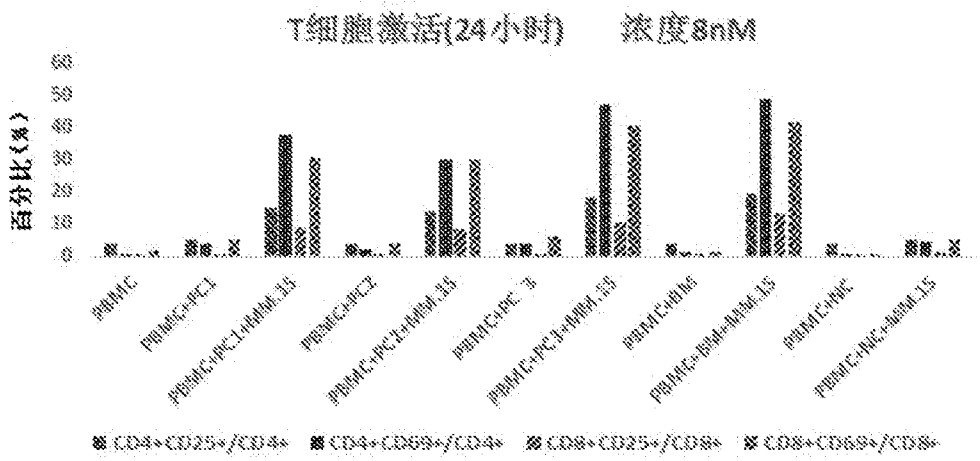

T细胞激活(24小时) 浓度8nM
百分比（%）
PBMC
PBMC+PC1
PBMC+PC2
PBMC+PC 3
PBMC+BM
PBMC+NC
CD4+CD25+/CD4+
CD4+CD69+/CD4+
CD8+CD25+/CD8+
CD8+CD69+/CD8+

图 15

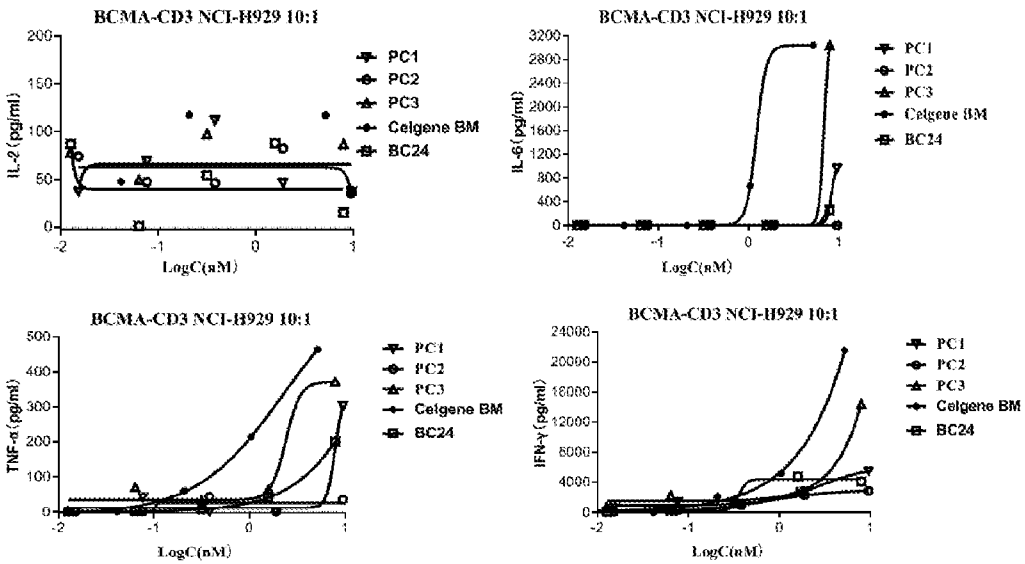

BCMA-CD3 NCI-H929 10:1
IL-2 (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
TNF-α (pg/ml)
IFN-γ (pg/ml)
LogC(nM)
PC1
PC2
PC3
Celgene BM
BC24

图 16

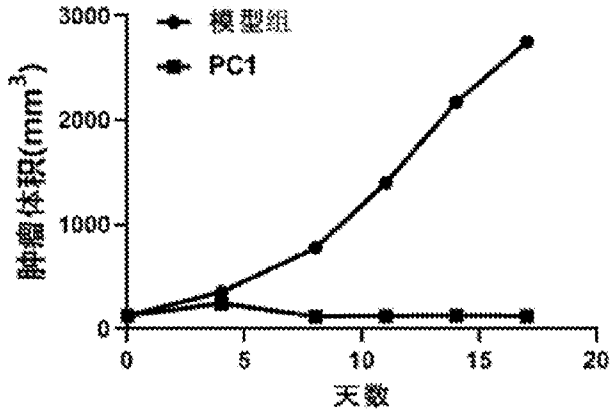

3000
2000
1000
0
模型组
PC1
肿瘤体积(mm3)
0
5
10
15
20
天数

图 17

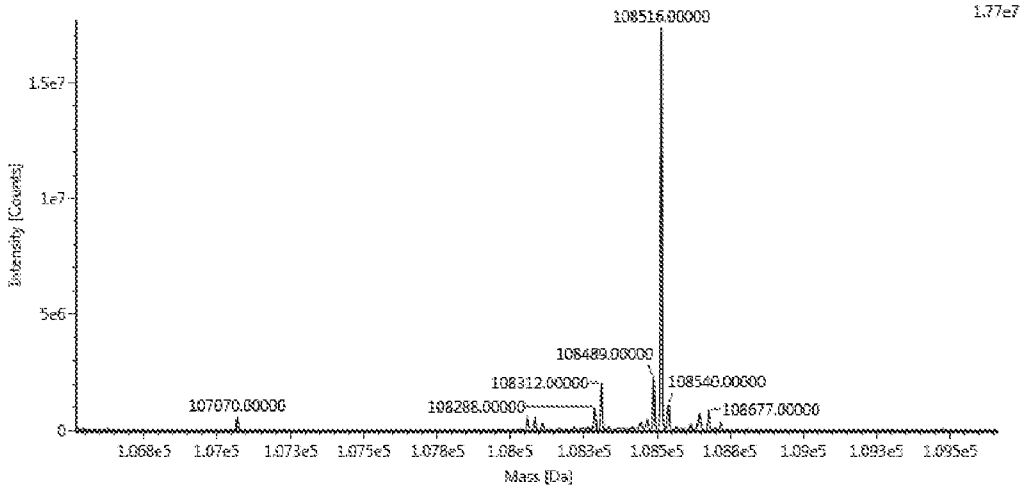

108516.00000
1.77e7
1.5e7
1e7
5e6
0
Intensity [Counts]
108489.00000
108312.00000
108540.00000
107870.00000
108288.00000
108677.00000
1.068e5
1.07e5
1.073e5
1.075e5
1.078e5
1.08e5
1.083e5
1.085e5
1.088e5
1.09e5
1.093e5
1.095e5
Mass [Da]

图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/086842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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, SIPOABS, DWPI, CNKI, 万方, WANFANG, NCBI, ISI web of knowledge, 百度, BAIDU, STN: BCMA, CD3, 抗体, 双特异抗体, 多特异抗体, 单域抗体, VHH, B细胞成熟抗原, bispecific, multipecific, single domain, B cell maturation antigen, T cell antigen, 序列7-50 blast

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	CN 112794916 A (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP NANJING SHUNXIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 14 May 2021 (2021-05-14) claims 1-9, and sequences 37-44	1-16
PY	WO 2022037528 A1 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 24 February 2022 (2022-02-24) claims 1-15, and sequences 7-25	1-16
PX	WO 2022037528 A1 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 24 February 2022 (2022-02-24) claims 1-15, and sequences 7-25	17
A	CN 111138542 A (SHANGDONG NEW TIME PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) entire document	1-17
A	CN 110551221 A (GUANGZHOU EXCELMAB BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 December 2019 (2019-12-10) entire document	1-17

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ 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	Date of mailing of the international search report
17 June 2022	**18 July 2022**
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	CN 110891971 A (TENEOBIO, INC.) 17 March 2020 (2020-03-17) entire document	1-17
A	DILILLO, D. J. et al. "A BCMAxCD3 bispecific T cell–engaging antibody demonstrates robust antitumor efficacy similar to that of anti-BCMA CAR T cells" *BLOOD ADVANCES,* Vol. 5, No. 5, 02 March 2021 (2021-03-02), pp. 1291-1304	1-17
A	HIPP, S. et al. "A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo" *LEUKEMIA,* 13 January 2017 (2017-01-13), pp. 1743-1751	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/086842

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/086842

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 16 comprises a method for treating a living human or animal body, and therefore, said claim does not comply with PCT Rule 39.1(iv). The present report is based on a search conducted on the basis of a pharmaceutical use of the antibody or pharmaceutical composition in claim 16.

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/CN2022/086842

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 112794916 A	14 May 2021	None	
WO 2022037528 A1	24 February 2022	None	
CN 111138542 A	12 May 2020	EP 3875485 A1	08 September 2021
		AU 2019370758 A1	10 June 2021
		EP 3875479 A1	08 September 2021
		US 2021371526 A1	02 December 2021
		US 2022002431 A1	06 January 2022
		CN 112996817 A	18 June 2021
		CN 111138544 A	12 May 2020
		CN 112996807 A	18 June 2021
		CN 111138545 A	12 May 2020
		WO 2020088608 A1	07 May 2020
		WO 2020088164 A1	07 May 2020
		KR 20210087472 A	12 July 2021
		CA 3118238 A1	07 May 2020
		EP 3875489 A1	08 September 2021
		KR 20210089697 A	16 July 2021
		CN 112996810 A	18 June 2021
		AU 2019370339 A1	10 June 2021
		CN 111138547 A	12 May 2020
		WO 2020088403 A1	07 May 2020
		EP 3889174 A1	06 October 2021
		CA 3118397 A1	07 May 2020
		US 2022002407 A1	06 January 2022
		CO 2021006970 A2	30 July 2021
		WO 2020088605 A1	07 May 2020
		CN 112955461 A	11 June 2021
		PE 20211867 A1	21 September 2021
		JP 2022512865 A	07 February 2022
		CN 111138546 A	12 May 2020
		JP 2022512997 A	07 February 2022
		WO 2020088437 A1	07 May 2020
		EP 3889179 A1	06 October 2021
		CL 2021001143 A1	22 October 2021
CN 110551221 A	10 December 2019	EP 3967713 A1	16 March 2022
		AU 2019452936 A1	20 January 2022
		WO 2021000530 A1	07 January 2021
CN 110891971 A	17 March 2020	IL 271194 D0	30 January 2020
		RU 2020100891 A3	20 July 2021
		WO 2018237037 A2	27 December 2018
		CA 3067584 A1	27 December 2018
		KR 20200018498 A	19 February 2020
		AU 2018289515 A1	06 February 2020
		BR 112019026907 A2	30 June 2020
		JP 2020524506 A	20 August 2020
		EP 3642237 A2	29 April 2020
		US 2021147564 A1	20 May 2021
		SG 11201912774 R A	30 January 2020

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/086842

A. 主题的分类

C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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））

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, 万方, NCBI, ISI web of knowledge, 百度, STN：BCMA, CD3, 抗体, 双特异抗体, 多特异抗体, 单域抗体, VHH, B细胞成熟抗原, bispecific, multipecific, single domain, B cell maturation antigen, T cell antigen, 序列7-50 blast

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
PY	CN 112794916 A (正大天晴药业集团南京顺欣制药有限公司 等) 2021年5月14日 (2021-05-14) 权利要求1-9，序列37-44	1-16
PY	WO 2022037528 A1 (正大天晴药业集团股份有限公司) 2022年2月24日 (2022-02-24) 权利要求1-15，序列7-25	1-16
PX	WO 2022037528 A1 (正大天晴药业集团股份有限公司) 2022年2月24日 (2022-02-24) 权利要求1-15，序列7-25	17
A	CN 111138542 A (山东新时代药业有限公司) 2020年5月12日 (2020-05-12) 全文	1-17
A	CN 110551221 A (广州爱思迈生物医药科技有限公司) 2019年12月10日 (2019-12-10) 全文	1-17
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	1-17

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"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）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"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

"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

"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

"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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年6月17日	2022年7月18日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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 传真号 (86-10)62019451	受权官员 王慧 电话号码 86-(10)-53962103

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	DILILLO, D. J.等. "A BCMAxCD3 bispecific T cell-engaging antibody demonstrates robust antitumor efficacy similar to that of anti-BCMA CAR T cells" BLOOD ADVANCES, 第5卷, 第5期, 2021年3月2日 (2021-03-02), 第1291-1304页	1-17
A	HIPP, S.等. "A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo" LEUKEMIA, 2017年1月13日 (2017-01-13), 第1743-1751页	1-17

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/086842

第I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：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/086842

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： 16
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 由于权利要求16包括了对有生命的人体或动物体的治疗方法，不符合PCT细则39.1(iv)的规定。本报告基于权利要求16中的抗体或药物组合物的制药用途作出检索。

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/CN2022/086842

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	112794916	A	2021年5月14日	无			
WO	2022037528	A1	2022年2月24日	无			
CN	111138542	A	2020年5月12日	EP	3875485	A1	2021年9月8日
				AU	2019370758	A1	2021年6月10日
				EP	3875479	A1	2021年9月8日
				US	2021371526	A1	2021年12月2日
				US	2022002431	A1	2022年1月6日
				CN	112996817	A	2021年6月18日
				CN	111138544	A	2020年5月12日
				CN	112996807	A	2021年6月18日
				CN	111138545	A	2020年5月12日
				WO	2020088608	A1	2020年5月7日
				WO	2020088164	A1	2020年5月7日
				KR	20210087472	A	2021年7月12日
				CA	3118238	A1	2020年5月7日
				EP	3875489	A1	2021年9月8日
				KR	20210089697	A	2021年7月16日
				CN	112996810	A	2021年6月18日
				AU	2019370339	A1	2021年6月10日
				CN	111138547	A	2020年5月12日
				WO	2020088403	A1	2020年5月7日
				EP	3889174	A1	2021年10月6日
				CA	3118397	A1	2020年5月7日
				US	2022002407	A1	2022年1月6日
				CO	2021006970	A2	2021年7月30日
				WO	2020088605	A1	2020年5月7日
				CN	112955461	A	2021年6月11日
				PE	20211867	A1	2021年9月21日
				JP	2022512865	A	2022年2月7日
				CN	111138546	A	2020年5月12日
				JP	2022512997	A	2022年2月7日
				WO	2020088437	A1	2020年5月7日
				EP	3889179	A1	2021年10月6日
				CL	2021001143	A1	2021年10月22日
CN	110551221	A	2019年12月10日	EP	3967713	A1	2022年3月16日
				AU	2019452936	A1	2022年1月20日
				WO	2021000530	A1	2021年1月7日
CN	110891971	A	2020年3月17日	IL	271194	D0	2020年1月30日
				RU	2020100891	A3	2021年7月20日
				WO	2018237037	A2	2018年12月27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
				BR	112019026907	A2	2020年6月30日
				JP	2020524506	A	2020年8月20日
				EP	3642237	A2	2020年4月29日
				US	2021147564	A1	2021年5月20日
				SG	11201912774R	A	2020年1月30日