



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117120478 A

(43) 申请公布日 2023.11.24

(21) 申请号 202280027168.4

张玲 毛浪勇 叶鑫 陶维康

(22) 申请日 2022.05.12

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

(66) 本国优先权数据

202110527339.7 2021.05.14 CN

专利代理师 程伟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.08

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/092529 2022.05.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/237882 ZH 2022.11.17

(71) 申请人 江苏恒瑞医药股份有限公司

地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号

申请人 上海恒瑞医药有限公司

(72) 发明人 应华 胡齐悦 金薪盛 石金平

(54) 发明名称

一种抗原结合分子

(57) 摘要

提供一种抗原结合分子。具体地,涉及一种结构域改造的抗体,所述抗体的至少一个恒定区结构域CH1/CL被Titin T链/Obsecurin-0链替代。

(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11月17日 (17.11.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/237882 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/46 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/092529

(22) 国际申请日: 2022年5月12日 (12.05.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110527339.7 2021年5月14日 (14.05.2021) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司(JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司(SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 应华(YING, Hua); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。胡齐悦(HU, Qiyue); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。金薪盛(JIN, Xincheng); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。石金平(SHI, Jinping); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。张玲(ZHANG, Ling); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。毛浪勇(MAO, Langyong); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫(YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康(TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层程伟 (David W.Cheng), Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, 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))。

(54) Title: ANTIGEN-BINDING MOLECULE

(54) 发明名称: 一种抗原结合分子

(57) Abstract: Provided is an antigen-binding molecule, particularly a domain-engineered antibody, wherein at least one constant region domain CH1/CL of the antibody is replaced by a Titin T-chain/Obscurin-O chain.

(57) 摘要: 提供一种抗原结合分子, 具体地涉及一种结构域改造的抗体, 所述抗体的至少一个恒定区结构域CH1/CL被Titin T链/Obscurin-O链替代。



WO 2022/237882 A1

一种抗原结合分子

技术领域

本披露涉及抗体药物领域。具体地包括 CH1 和 CL 结构被替代的抗原结合分子以及其应用。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

随着抗体人源化技术的不断完善，近年来单克隆抗体发展迅速。多种单克隆抗体已被用于治疗恶性肿瘤、自身免疫病等重大疾病。但是肿瘤的免疫逃逸往往伴随着多种不同的机制，而单一的单克隆抗体只能结合一个特定靶点，这使得单克隆抗体的治疗效果被大打折扣。

双特异性抗体（Bispecific antibody, BsAb）是通过基因工程手段将靶向两个不同抗原或两个不同抗原表位的抗体组合在一起而形成的人工抗体。与单克隆抗体不同，双特异性抗体具有同时靶向 2 个不同抗原或抗原表位的能力，并能起到特殊的生物学功能，例如免疫细胞召集、受体共刺激或共抑制、多价病毒中和等，有望获得比单一的单克隆抗体甚至抗体联用更好的临床治疗效果。

已经开发了广泛多样的重组双特异性抗体形式，例如通过融合例如 IgG 抗体形式和单链结构域的四价双特异性抗体（参见 Coloma, M.J., 等, *Nature Biotech.* 15 (1997) 159-163; Morrison, S.L., *Nature Biotech.* 25 (2007) 1233-1234）。其它双特异性形式，如 DVD-Ig、CrossMab、BiTE 等（Spiess 等, *Molecular Immunology*, 67 (2), pp.95-106 (2015)）。

有关双特异性抗体的各种结构模型也已见公开：例如，向 Fc 区引入突变“knobs-into-holes”（Ridgway 等, *Protein Engineering*, 9 (7), pp.617-21 (1996)）；引入静电设计（Gunasekaran 等, *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), pp.19637-19646 (2010)），或负状态设计（Kreudenstein 等, *mAbs*, 5(5), pp.646-654 (2013)；Leaver-Fay 等, *Structure*, 24 (4), pp.641-651 (2016)）、交换 CH1 和 CL 结构域（CrossMab 平台）（Schaefer 等, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (27), pp.11187-11192 (2011)）、与 TCR 恒定区融合（WO2019057122A1）等等。

发明内容

在制备多特异性抗体过程中，不同抗原的轻链和重链随机组合会产生多种不同的产物，而仅有一种产物是所需的，这些副产物包括缺失一条轻链的抗体、半抗体、重链聚合物、轻链和重链错配等等，这给下游工艺开发提出了很大的挑战。为此，本披露提供了一种二聚化多肽、以及包含所述二聚化多肽的抗原结合分子。

在一些实施方案中，本披露提供一种二聚化多肽，其包含 Titin-T 链和 Obscurin-O 链，或 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链，其中，

i) 所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 的变体，所述变体在选自第 60 和 64 位中的一个或更多个位点上具有氨基酸残基取代，和/或

ii) 所述 Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 的变体，所述变体在选自 13、32、48、66、82 和 93 位中的一个或更多个位点上具有氨基酸残基取代；

并且其条件是：

a) 当所述变体在第 13、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 32 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 32 位的氨基酸取代不是 32P；

b) 当所述变体在第 32、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 13 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 13 位的氨基酸取代不是 13Y；和

c) 当所述变体在 48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 13 和 32 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 13 位的氨基酸残基取代不是 13Y，且所述第 32 位的氨基酸残基取代不是 32P。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，

i) 所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 变体，所述变体在选自第 60 和 64 位中的一个或更多个位点上具有氨基酸残基取代，和/或

ii) 所述 Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 变体，所述变体具有一个或更多个氨基酸残基取代，所述氨基酸残基取代选自 13S、32F、第 48 位上的氨基酸残基取代、第 66 位上的氨基酸残基取代、第 82 位上的氨基酸残基取代和第 93 位上的氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 32 变体具有选自 60S 和 64T 中的一个或更多个氨基酸残基取代，和/或所述 SEQ ID NO: 33 变体具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或更多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 32 的变体具有 60S 和 64T 的氨基酸残基取代，和/或所述 SEQ ID NO: 33 的变体具有选自 a) 至 c) 中任一项的氨基酸残基取代：

a) 32F 和 48V，

b) 13S、32F、48V 和 82H，和

c) 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C。

在一些实施方案中，本披露提供一种二聚化多肽，其由 Titin-T 链和 Obscurin-O 链组成，或由 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链组成，其中，

i) 所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 的变体，所述变体与 SEQ ID NO: 32 相比，至少包含在第 60 和/或 64 位中的氨基酸残基取代，和/或

ii) 所述 Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 的变体，所述变体与 SEQ ID NO:

33 相比，至少包含在选自 13、32、48、66、82 和 93 位中的一个或多个氨基酸残基取代；

并且其条件是：

a) 当所述变体在第 13、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 32 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 32 位的氨基酸取代不是 32P；

b) 当所述变体在第 32、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 13 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 13 位的氨基酸取代不是 13Y；和

c) 当所述变体在 48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 13 和 32 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 13 位的氨基酸残基取代不是 13Y，且所述第 32 位的氨基酸残基取代不是 32P。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，

i) 所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 变体，所述变体与 SEQ ID NO: 32 相比，至少包含在第 60 和/或 64 位中的一个或多个氨基酸残基取代，和/或

ii) 所述 Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 变体，所述变体与 SEQ ID NO: 33 相比，具有一个或多个氨基酸残基取代，所述氨基酸残基取代选自 13S、32F、第 48 位上的氨基酸残基取代、第 66 位上的氨基酸残基取代、第 82 位上的氨基酸残基取代和第 93 位上的氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，至少包含 60S 和/或 64T 中的氨基酸残基取代，和/或所述 SEQ ID NO: 33 变体与 SEQ ID NO: 33 相比，至少包含选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 32 的变体与 SEQ ID NO: 32 相比，至少包含 60S 和 64T 的氨基酸残基取代，和/或所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，至少包含选自 a) 至 c) 中任一一项的氨基酸残基取代：

a) 32F 和 48V，

b) 13S、32F、48V 和 82H，和

c) 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还在选自第 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代，例如还具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个氨基酸残基取代。在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还包含选自 3W、8C、11I、13L、20C、22M/22C、25S、26C、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S/66K、70R、75V、

77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一个或多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还包含在选自第 8、11、20、25、26、39、66、79 和 81 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还具有选自 8C、11I、20C、25S、26C、39T、66K、79T 和 81R 中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还包含在第 8、11、25、39、66、79 和 81 位点上具有氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还包含 8C、11I、25S、39T、66K、79T 和 81R 氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还包含 8C、11I、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R 氨基酸残基取代，以及 20C 和/或 26C 氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比，还包含选自 a) 至 l) 中任一项的氨基酸残基取代：

- a) 8C、25S 和 39T，
- b) 20C、25S 和 39T，
- c) 25S、26C 和 39T，
- d) 22C、25S 和 39T，
- e) 8C、25S、39T、66S 和 77S，
- f) 8C、25S、39T、66K、70R、79T 和 81R，
- g) 3W、8C、11I、13L、22M、25S、39T 和 82M，
- h) 8C、11I、25S、39T、66K、79T 和 81R，
- i) 8C、25S、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L，
- j) 8C、25S、39T、47E、49G、56S、58E 和 75V，
- k) 8C、25S、39T、56S、58E 和 75V，和
- l) 8C、25S、39T、56S、58E、66S 和 77S；

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 32 的变体与 SEQ ID NO: 32 相比，具有选自 A) 至 C) 中任一项的氨基酸残基取代：

- A) 8C、11I、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R，
- B) 8C、11I、20C、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R，和
- C) 8C、11I、25S、26C、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 33 变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还在选自第 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还具有选自 2E、3C、

7K/7R、9C、11L、12S、13Y、14T、17E、20L、22M/22S、25S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E/62K/62H、67Q/67T、69S、76S、88C、89L、92E、94G 和 97G 中的一个或多个氨基酸残基取代；

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 33 变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还具有选自 A) - R) 中任一项的氨基酸残基取代：

- A) 88C,
- B) 3C,
- C) 9C,
- D) 25S、76S 和 88C,
- E) 25S、76S 和 3C,
- F) 25S、76S 和 9C,
- G) 7K、25S、62K、76S 和 88C,
- H) 7K、25S、62H、76S 和 88C,
- I) 7R、25S、62K、76S 和 88C,
- J) 7R、25S、62H、76S 和 88C,
- K) 11L、25S、62K、76S 和 88C,
- L) 11L、25S、62H、76S 和 88C,
- M) 12S、13Y、14T、22S、25S、62K、76S 和 88C,
- N) 2E、11L、17E、25S、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S、76S、88C 和 97G,
- O) 11L、20L、22M、25S、53L、62K、76S 和 88C,
- P) 11L、25S、41K、45T、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L;
- Q) 11L、25S、42L、45T、62K、67T、69S、76S、88C、92E 和 94G, 和
- R) 11L、12S、13Y、22S、25S、42L、45T、62K、67Q、69S、76S、88C、92E 和 94G。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 33 变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还在选自第 3、9、25、41、45、62、67、69、76、88 和 89 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还具有选自 3C、9C、25S、41K、45T、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L 中的一个或多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还在选自第 41、45、62、67、69、88 和 89 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，具有选自 41K、45T、62K、67Q、69S、88C 和 89L 中的一个或多个氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体具有 41K、45T、62K、67Q、69S、88C 和 89L 氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，具有 13S、32F、48V 和 82H 氨基酸残基取代以及选自 3C、9C、25S、41K、45T、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L 中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还具有选自 41K、45T、62K、67Q、69S 和 89L 中的一个或多个氨基酸残基取代，例如具有 41K、45T、62K、67Q、69S 和 89L 氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还具有选自：3C、9C、25S、66C、76S、88C、V93C 中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代，例如具有选自 a) 至 j) 中任一项的氨基酸残基取代：a) 25S、76S 和 88C，b) 3C、25S、76S 和 88C，c) 9C、25S、76S 和 88C，d) 88C，e) 3C 和 88C，f) 9C 和 88C，g) 25S、66C、76S、88C 和 93C，h) 9C、25S、66C、76S、88C 和 93C，i) 3C、25S、66C、76S、88C 和 93C，和 j) 3C、9C、25S、66C、76S 和 93C。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 33 变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还在选自第 25、41、45、62、67、69、76、88 和 89 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，还具有选自 25S、41K、45T、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L 中的一个或多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 SEQ ID NO: 33 变体与 SEQ ID NO: 33 相比，具有选自 a) 至 j) 中任一项的氨基酸残基取代：

- a) 25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L，
- b) 13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和 89L，
- c) 3C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和 89L，
- d) 9C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和 89L，
- e) 13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L，
- f) 3C、13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L；
- g) 9C、13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L，
- h) 13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、88C、89L 和 93C，
- i) 3C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、88C、89L 和 93C，和
- j) 9C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、88C、89L 和 93C。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，所述 Obscurin-样-O 链为 SEQ ID NO: 34 或其变体，所述 SEQ ID NO: 34 的变体与 SEQ ID NO: 34 相比，在选自第 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；所述 SEQ ID NO: 34 变体的氨基酸残基取代位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 34 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一个或多个氨基酸残基取代；在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 34 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比，具有选自 A) 至 F) 中任一项的氨基酸残基取代：

- A) 6E 和 74C,
- B) 6E 和 84C,
- C) 6E 和 86C,
- D) 6E、26S、77S 和 74C,
- E) 6E、26S、77S 和 84C, 和
- F) 6E、26S、77S 和 86C。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链是 SEQ ID NO: 32、68 或 127 的变体，所述变体具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代，所述 Obscurin-O 链是 SEQ ID NO: 33、80 或 128 的变体，所述变体具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代。所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链是 SEQ ID NO: 32、68 或 127 的变体，所述变体与 SEQ ID NO: 32、68 或 127 相比，具有选自 60S 和/或 64T 中的氨基酸残基取代，所述 Obscurin-O 链是 SEQ ID NO: 33、80 或 128 的变体，所述变体与 SEQ ID NO: 33、80 或 128 相比，具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代。所述 Titin-T 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链与 SEQ ID NO: 129 至 SEQ ID NO: 131 中任一氨基酸序列具有至少 85%（例如，具有至少 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）的序列同一性，所述 Obscurin-O 链与 SEQ ID NO: 132 至 SEQ ID NO: 141 中任一氨基酸序列具有至少 85%（例如，具有至少 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）的序列同一性。在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 至 SEQ ID NO: 131 中任一所示，所述 Obscurin-O 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 132 至 SEQ ID NO: 141 中任一所示。在一些实施

方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中所述 Titin-T 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 所示，和所述 Obscurin-O 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 133 所示；或者所述 Titin-T 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 所示，和所述 Obscurin-O 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 135 所示；或者所述 Titin-T 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 所示，和所述 Obscurin-O 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 136 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链能够与 Obscurin-O 链彼此缔合形成二聚化多肽；在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链能够与 Obscurin-样-O 链彼此缔合形成二聚化多肽。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，Titin-T 链上第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合，所述 Titin-T 链上第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链包含 SEQ ID NO: 32 的第 7-60 位氨基酸，和/或进一步包含前面任一项所述相应位点的氨基酸残基取代；Obscurin-O 链包含 SEQ ID NO: 33 的第 3-90 位氨基酸，和/或进一步包含前面任一项所述位点氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链包含 SEQ ID NO: 32 的第 1-96 位氨基酸，和/或进一步包含前面任一项所述相应位点氨基酸残基取代，Obscurin-样-O 链包含 SEQ ID NO: 34 第 4-91 位氨基酸，和/或进一步包含前面任一项所述位点氨基酸残基取代。

如上任一项所述的二聚化多肽，所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；所述 Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；所述 Obscurin-样-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，如上任一项所述的二聚化多肽，其中，前述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32、68 或 127 上具有选自 60S 和 64T 位中的一个或多个氨基酸残基取代，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33、80 或 128 上具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 位中的一个或多个氨基酸残基取代。所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 32 的变体包含与 SEQ ID NO: 32 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 32 的变体相比 SEQ ID NO: 32，仅具有上述任一项所述的氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体包含与 SEQ ID NO: 33 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 33，

仅具有上述任一项所述的氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 34 的变体包含与 SEQ ID NO: 34 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 SEQ ID NO: 34 的变体相比 SEQ ID NO: 34，仅具有上述任一项所述的氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，本披露提供一种抗原结合分子，其包含如上任一所述的二聚化多肽。

在一些实施方案中，如上任一所述的抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含结构域改造的 Fab，所述结构域改造的 Fab 包含重链可变区 VH1，轻链可变区 VL1，和所述的二聚化多肽，但不包含轻链恒定区 CL 与重链恒定区 CH1，所述 VH1 与 VL1 分别通过连接子与二聚化多肽中的任一条肽链连接。在一些实施方案中，所述 VH1 的 C 端通过连接子融合至所述 Titin-T 链的 N 端，所述 VL1 的 C 端通过连接子融合至所述 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端；在一些实施方案中，所述 VL1 的 C 端通过连接子融合至所述 Titin-T 链的 N 端，所述 VH1 的 C 端通过连接子融合至所述 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端。

在一些实施方案中，本披露提供一种抗原结合分子，其包含替代轻链恒定区 CL 与重链恒定区 CH1 的如上任一所述的二聚化多肽。

在一些实施方案中，如上任一所述的抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含结构域改造的 Fab，所述结构域改造的 Fab 包含重链可变区 VH1、轻链可变区 VL1、和如上所述的二聚化多肽，所述 VH1 与 VL1 分别通过连接子与二聚化多肽中的任一肽链连接。在一些实施方案中，所述 VH1 的 C 端通过连接子融合至所述 Titin-T 链的 N 端，所述 VL1 的 C 端通过连接子融合至所述 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端；在一些实施方案中，所述 VL1 的 C 端通过连接子融合至所述 Titin-T 链的 N 端，所述 VH1 的 C 端通过连接子融合至所述 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端。

在一些实施方案中，如上任一所述的抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含：

a. 从 N 端到 C 端依次为 [VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链] 的肽链和从 N 端到 C 端依次为 [VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链] 的肽链；或

b. 从 N 端到 C 端依次为 [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链] 的肽链；和从 N 端到 C 端依次为 [VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链] 的肽链；

所述连接子 1 与连接子 2 相同或不相同。在一些实施方案中，所述肽连接子是柔性肽连接子。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中：A) 连接子 1 和连接子 2 均为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数（例如 1、2、3、4 或 5），y 选自 0-6 的整数（例如，0、1、2、3、4、5 或 6），其中，当 y 值为 0 时，所述连接子为键，或 B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端

截短的序列，连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列。在另外在一些实施方案中，其中：A) 连接子 1，其序列如 SEQ ID NO: 173 所示；连接子 2，其序列如 SEQ ID NO: 174 所示；或 B) 连接子 1 和连接子 2，其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示；或 C) 连接子 1 和连接子 2，其序列均如 SEQ ID NO: 176 所示。

在一些实施方案中，本披露提供了抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，其中所述第一抗原结合部分如上所定义，所述第二抗原结合部分包含重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2，并且所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分结合不同的抗原或者结合同一种抗原上的不同的表位；

在一些实施方案中，所述第二抗原结合部分包含 Fab。

在一些实施方案中，其中所述抗原结合分子还包含 Fc 区；所述 Fc 区包含能够彼此缔合的第一亚基 Fc1 与第二亚基 Fc2；在一些实施方案中，所述 Fc 区为 IgG 的 Fc 区；在一些实施方案中，所述 Fc 区为 IgG₁ 的 Fc 区；在一些实施方案中，所述 Fc 区具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代；和/或所述 Fc 区具有一个或多个能够减少 Fc 区与 Fc 受体结合的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc 区具有 YTE 突变 (M252Y、S254T 和 T256E)，L234A、L235A 突变，和/或 S228P 突变，所述突变编号依据为 EU 索引。在一些实施方案中，Fc 区包含能够彼此缔合的第一亚基与第二亚基，所述第一亚基和/或第二亚基具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述第一亚基具有根据杵臼技术的凸起结构，所述第二亚基具有根据杵臼技术的孔结构，或者所述第一亚基具有根据杵臼技术的孔结构，所述第二亚基具有根据杵臼技术的凸起结构。在一些实施方案中，所述第一亚基具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述第二亚基具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代；在一些实施方案中，所述第二亚基具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述第一亚基具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述第一亚基具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代，所述第二亚基具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述第二亚基具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代，所述第一亚基具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述第一亚基包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代，所述第二亚基包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述第二亚基包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代，所述第一亚基包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示，且所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示；或者所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示，且所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗原结合分子，其包含第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中，

a. 所述第一重链从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

所述第一轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]，

所述第二重链从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，

所述第二轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；或

b. 所述第一重链从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

所述第一轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，

所述第二重链从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，

所述第二轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 相同或不相同。在一些实施方案中，所述肽连接子是柔性肽连接子。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方式中，Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3，其中：A) 连接子 1、连接子 2 和连接子 3 均为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数（例如 1、2、3、4 或 5），y 选自 0-6 的整数（例如，0、1、2、3、4、5 或 6），（其中：当 y 值为 0 时，所述连接子为键）；或者 B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列，连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列，连接子 3 为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数（例如 1、2、3、4 或 5），y 选自 0-6 的整数（例如，0、1、2、3、4、5 或 6）。在一些实施方案中，所述连接子 3 为键，所述连接子 1 和连接子 2 为：A) 连接子 1，其序列如 SEQ ID NO: 173 所示；连接子 2，其序列如 SEQ ID NO: 174 所示；或 B) 连接子 1 和连接子 2，其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示；或 C) 连接子 1 和连接子 2，其序列均如 SEQ ID NO: 176 所示。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构，或者所述 Fc1 具有根据杵臼技术的孔结构，所述 Fc2 具有根据杵臼技术的凸起结构。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc2 具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc2 具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc1 具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc2 具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc2 具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨

基酸取代, 所述 Fc1 具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc1 包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代, 所述 Fc2 包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc2 包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代, 所述 Fc1 包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc1 如 SEQ ID NO: 177 所示, 且所述 Fc2 如 SEQ ID NO: 178 所示; 或者所述 Fc2 如 SEQ ID NO: 177 所示, 且所述 Fc1 如 SEQ ID NO: 178 所示。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗原结合分子为多特异性抗体。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗原结合分子为双特异性抗体、三特异性抗体或四特异性抗体。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗原结合分子为双特异性抗体。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗原结合分子, 其中:

(I) 所述抗原结合分子能够结合 NGF 和 RANKL; 在一些实施方案中, 所述抗原结合分子包含第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链, 其中:

第一重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 3]-[Fc1],

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链],

第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[CH1]-[Fc2], 和

第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL]; 其中, VH1 与 VL1 形成结合 NGF 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 RANKL 的第二抗原结合部分; 或

VH1 与 VL1 形成结合 RANKL 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 NGF 的第二抗原结合部分。

在一些实施方案中, 所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 26 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 27 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 24 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 25 所示, 或者

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 24 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 25 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 26 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 27 所示;

并且, 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 132 至 141 中任一所示, 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 129 至 131 中任一所示;

在一些实施方案中, 所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示; 所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示; 所述 CH1 的序列如 SEQ ID NO: 179 所示; 所述 CL 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述连接子 3 是键; 所述连接子 1 和连接子 2 选自: a) 连接子 1 和连接子 2, 其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示; 或 b) 连接子 1, 其

序列如 SEQ ID NO: 173 所示, 和连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 174 所示;

(II) 所述抗原结合分子能够结合 PDL1 和 CTLA4; 在一些实施方案中, 所述抗原结合分子包含第一重链、第一轻链、第二重链、和第二轻链, 其中:

第一重链从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 3]-[Fc1],

第一轻链从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链],

第二重链从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[CH1]-[Fc2], 和

第二轻链从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL]; 其中: VH1 与 VL1 形成结合 PDL1 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 CTLA4 的第二抗原结合部分; 或

VH1 与 VL1 形成结合 CTLA4 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 PDL1 的第二抗原结合部分。

在一些实施方案中, 所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 169 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 170 所示; 或者

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 169 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 170 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示;

并且所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 132 至 141 中任一所示, 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 129 至 131 中任一所示;

在一些实施方案中, 所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示; 所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示; 所述 CH1 的序列如 SEQ ID NO: 179 所示; 所述 CL 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述连接子 3 是键, 所述连接子 1 和连接子 2 选自: a) 连接子 1 和连接子 2, 其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示; 或 b) 连接子 1, 其序列如 SEQ ID NO: 173 所示, 和连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 174 所示; 或

(III) 所述抗原结合分子能够结合 IL5 和 TSLP; 在一些实施方案中, 所述抗原结合分子包含第一重链、第一轻链、第二重链、和第二轻链, 其中:

第一重链从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[Fc1];

第一轻链从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链];

第二重链从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[CH1]-[Fc2]; 和

第二轻链从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL]; 其中:

VH1 与 VL1 形成结合 IL5 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 TSLP 的第二抗原结合部分; 或

VH1 与 VL1 形成结合 TSLP 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 IL5 的第二抗原结合部分。

在一些实施方案中, 所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 16 所示, 所述 VL1 的

序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 171 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 172 所示, 或者

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 171 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 172 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 16 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

并且所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 132 至 141 中任一所示, 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 129 至 131 中任一所示;

在一些实施方案中, 所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示; 所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示; 所述 CH1 的序列如 SEQ ID NO: 179 所示; 所述 CL 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述连接子 3 是键; 所述连接子 1 和连接子 2 选自:
a) 连接子 1 和连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 175 所示; 或 b) 连接子 1, 其序列如 SEQ ID NO: 173 所示, 和连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 174 所示。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗原结合分子, 其包含:

a. 第一重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1];

第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2];

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]; 和

第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL]; 或者

b. 第一重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1];

第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2],

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]; 和

第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL];

其中, 所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 相同或不相同; 在一些实施方案中, 所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 为 A) 或 B):

A) 连接子 1、连接子 2 和连接子 3 均为 $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, x 选自 1-5 的整数, y 选自 0-6 的整数, 和

B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列, 连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列, 连接子 3 为 $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, x 选自 1-5 的整数, y 选自 0-6 的整数;

在一些实施方案中, 所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 选自 A) 至 C) 中任一项:

A) 连接子 1, 其序列如 SEQ ID NO: 173 所示; 连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 174 所示; 连接子 3, 其序列如 SEQ ID NO: 175 或 SEQ ID NO: 176 所示,

B) 连接子 1、连接子 2 和连接子 3，其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示，

C) 连接子 1、连接子 2 和连接子 3，其序列均如 SEQ ID NO: 176 所示；

在一些实施方案中，所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc1 和 Fc2 相同。在一些实施方案中，所述抗原结合分子，其包含 1 条第一重链和 1 条第二重链，2 条第一轻链和 2 条第二轻链，所述第一重链和第二重链的氨基酸序列相同。

在一些实施方案中，所述抗原结合分子特异性结合 PDL1 和 TIGIT。在一些实施方案中，所述第一抗原为 PDL1，所述第二抗原为 TIGIT。在一些实施方案中，所述第一抗原为 TIGIT，所述第二抗原为 PDL1。在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含能与 PDL1 特异性结合的第一抗原结合部分和能与 TIGIT 特异性结合第二抗原结合部分，其中所述第一抗原结合部分包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1，第二抗原结合部分包含重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2；其中：

所述 VH1 包含分别如 SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164 和 SEQ ID NO: 165 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL1 包含分别如 SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 167、SEQ ID NO: 168 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；和/或

所述 VH2 包含分别如 SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158 和 SEQ ID NO: 159 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL2 包含分别如 SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 162 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示或与 SEQ ID NO: 156 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）的序列同一性，所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示或与 SEQ ID NO: 155 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）序列同一性；和/或

所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 154 所示或与 SEQ ID NO: 154 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）序列同一性，所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 153 所示或与 SEQ ID NO: 153 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含：

重链，其序列如 SEQ ID NO: 148 所示或与 SEQ ID NO: 148 具有至少 90% 序列同一性；第一轻链，其序列如 SEQ ID NO: 146 所示或与 SEQ ID NO: 146 具有至少 90% 序列同一性；和第二轻链，其序列如 SEQ ID NO: 147 所示或与 SEQ ID NO: 147 具有至少 90% 序列同一性；在一些实施方案中，所述抗原结合分子具有 2 条所述重链，2 条所述第一轻链，2 条所述第二轻链。

在一些实施方案中，本披露提供一种抗原结合分子，其包含能与 PDL1 特异性结合的第一抗原结合部分和能与 TIGIT 特异性结合第二抗原结合部分，其中所述

第一抗原结合部分包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1，第二抗原结合部分包含重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2；其中：

所述 VH1 包含分别如 SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164 和 SEQ ID NO: 165 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL1 包含分别如 SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 167、SEQ ID NO: 168 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；和/或

所述 VH2 包含分别如 SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158 和 SEQ ID NO: 159 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL2 包含分别如 SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 162 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示或与 SEQ ID NO: 156 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）的序列同一性，所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示或与 SEQ ID NO: 155 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）序列同一性；和/或

所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 154 所示或与 SEQ ID NO: 154 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）序列同一性，所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 153 所示或与 SEQ ID NO: 153 具有至少 90%（例如，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%）序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗原结合分子具有：

重链，其序列如 SEQ ID NO: 148 所示或与 SEQ ID NO: 148 具有至少 90% 序列同一性；第一轻链，其序列如 SEQ ID NO: 146 所示或与 SEQ ID NO: 146 具有至少 90% 序列同一性；和第二轻链，其序列如 SEQ ID NO: 147 所示或与 SEQ ID NO: 147 具有至少 90% 序列同一性。在一些实施方案中，所述抗原结合分子具有 2 条重链，2 条第一轻链，2 条第二轻链。

在一些实施方案中，本披露提供一种结构改造的抗体，其为重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL 被如上任一项所述的二聚化多肽替代的抗体。在一些实施方案中，所述结构改造的抗体，其中，所述重链恒定区 CH1 被 Titin-T 链替代，所述轻链恒定区 CL 被 Obscurin-O 链替代。在一些实施方案中，所述结构改造的抗体，其中，所述轻链恒定区 CL 被 Titin-T 链替代，所述重链恒定区 CH1 被 Obscurin-O 链替代。在一些实施方案中，所述结构改造的抗体，其中，所述重链恒定区 CH1 被 Titin-T 链替代，所述轻链恒定区 CL 被 Obscurin-样-O 链替代。在一些实施方案中，所述结构改造的抗体，其中，所述轻链恒定区 CL 被 Titin-T 链替代，所述重链恒定区 CH1 被 Obscurin-样-O 链替代。

在一些实施方案中，本披露提供一种药物组合物，其包含如上任一项所述的抗原结合分子或结构改造的抗体，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在一些实施方案中，本披露提供如上任一项所述的二聚化多肽在减少抗体轻链/重链错配中的用途。

在一些实施方案中，本披露提供如上任一项所述的二聚化多肽在减少双特异性抗体制备过程中抗体轻链/重链错配中的用途。

在一些实施方案中，本披露提供如上任一项所述的二聚化多肽在减少多特异性抗体制备过程中轻链/重链错配中的用途。

在一些实施方案中，本披露提供如上任一项所述的二聚化多肽在减少四特异性抗体、三特异性抗体和双特异性抗体制备过程中轻链/重链错配中的用途。

在一些实施方案中，本披露提供一种核酸分子，其编码如上任一项所述的二聚化多肽、抗原结合分子或结构改造的抗体。

在一些实施方案中，本披露提供一种表达载体，其包含如上任一项所述的核酸分子。

在一些实施方案中，本披露还提供一种宿主细胞，其包含如上任一项所述的核酸分子。

在一些实施方案中，如上任一项所述宿主细胞，其由前述的载体转化（或转导、转染）获得；所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。所述宿主细胞不包括任何能够发育成完整个体的动物或植物细胞，如人胚胎干细胞、受精卵、生殖细胞。在一些实施方案中，所述宿主细胞为真核细胞，更优选哺乳动物细胞，其中所述的哺乳动物细胞包括但不限于 CHO、293、NSO，以及在哺乳动物细胞中进行基因编辑可改变抗体或其抗原结合片段的糖基化修饰，进而改变抗体或其抗原结合片段的 ADCC 功能的细胞，例如，敲除 FUT8 或 GnT-III 等基因。

在一些实施方案中，本披露提供一种制备如上任一项所述二聚化多肽、抗原结合分子或结构改造的抗体的方法，其包含步骤：培养前述的宿主细胞，然后纯化并回收二聚化多肽、抗原结合分子或结构改造的抗体。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的抗原结合分子、结构改造的抗体或药物组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。

在一些实施方案中，本披露提供一种治疗或预防疾病或病症方法，所述方法包括给予有需要的受试者有效量的如上任一项所述的抗原结合分子、结构改造的抗体或药物组合物。

在一些实施方案中，本披露提供一种用作药物的如上任一项所述的抗原结合分子、结构改造的抗体或药物组合物；在一些实施方案中，所述药物用于治疗或预防疾病或病症。

在一些实施方案中，如上任一项所述的疾病或病症为骨相关性疾病，骨质疏松症、骨质减少或骨关节炎、类风湿性关节炎、牙周病或多发性骨髓瘤的疾病或障碍。在一些实施方案中，所述肿瘤选自癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血

病或淋巴样恶性肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自：鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软组织肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。在一些实施方案中，所述炎性疾病选自：类风湿关节炎、牛皮癣、克罗恩病、强直性脊柱炎、多发性硬化症、I 型糖尿病、肝炎（例如乙肝、甲肝、丙肝）、心肌炎、Sjogren 综合征、移植排斥后的自体免疫性溶血性贫血、水疱性类天疱疮、格雷夫氏病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮（SLE）、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血。在一些实施方案中，所述免疫性疾病可选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病（IBD）、Crohn 病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、多发性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜）、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎（RA）、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多征、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征、脉络视网膜炎（choreoretinitis）、以及病毒感染引起的免疫性疾病（如伊波病毒（EBV）感染 B 细胞引起或介导的疾病）。

附图说明

图 1A 和图 1B 为 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用形成二聚化多肽复合物的界面结构图，其中，图 1A 为 Titin-T 链和 Obscurin-O 链相互作用界面结构图；图 1B 为 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链相互作用界面结构图；

图 2: CH1 和 CL 被替换的 Fab 示意图;

图 3: 双侧 CH1 和 CL 被替换的 IgG 单特异性抗体结构示意图;

图 4: 单侧 CH1 和 CL 被替换 IgG 双特异性抗体结构示意图;

图 5: DI-1 双特异性抗体结构示意图;

图 6A 至图 6C 为 DI-1 质谱分析图; 其中, 图 6A 为 LC1/LC2 质谱分析图, 图 6B 为 HC1/HC2 质谱分析图; 图 6C: 为 LC1+LC2+HC1+HC2 质谱分析图;

图 7: 抗体轻链/重链交叉错配分子结构示意图;

图 8: BU5 双特异性抗体结构示意图;

图 9A 至图 9C 为质谱分析图, 其中, 图 9A 为 B0 质谱分析图, 图 9B 为 U0 质谱分析图, 图 9C 为 BU5 质谱分析图;

图 10: DI-1 双特异性抗体破骨细胞分化实验结果图;

图 11: DI-1 双特异性抗体 TF1 细胞增殖实验结果图;

图 12: 双特异性抗体 HJ-1、HJ-2、HJ-3 和 HJ-4 的结构示意图;

图 13A 至图 13D 为 HJ 双特异性抗体四条链共表达的质谱分析图, 其中, 图 13A 为 HJ-1 的四条链共表达的质谱分析图, 图 13B 为 HJ-2 的四条链共表达的质谱分析图, 图 13C 为 HJ-3 的四条链共表达的质谱分析图, 图 13D 为 HJ-4 的四条链共表达的质谱分析图;

图 14A 至图 14B: 双特异性抗体 HJ-1 的 HJ-1-H1、HJ-1-H2、HJ-1-L2 的三条链共表达的质谱分析图, 其中, 图 14A 为 120000-130000 (amu) 解卷积部分的质谱分析图, 图 14B 为 140000-160000 (amu) 解卷积部分的质谱分析图;

图 15 A 至图 15B: 双特异性抗体 HJ-3 的 HJ-3-H1、HJ-3-H2、HJ-3-L2 的三条链共表达的质谱分析图; 其中, 图 15A 为 122600-125200 (amu) 解卷积部分的质谱分析图, 图 15B 为 120000-148000 (amu) 解卷积部分的质谱分析图;

图 16 A 至图 16B: 其中, 图 16 A 为 Titin-T 链/Obscurin-O 链残基之间的相互作用位点图, 图 16B 为 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链残基之间的相互作用位点图;

图 17. 结构域改造的 Fab 构建的(FabV)₂-IgG 模式的双特异性抗体结构示意图;

图 18. PDL1-TIGIT 双特异性抗体阻断 PD-L1 与 PD-1 结合以及 TIGIT 与 CD155 结合实验结果图;

图 19. PDL1-TIGIT 双特异性抗体促进 IFN- γ 分泌的实验结果图;

图 20. PDL1-TIGIT 双特异性抗体对 MC38-HL1 小鼠移植瘤抑制实验结果图。

具体实施方式

为了更容易理解本披露, 以下对某些技术和科学术语进行了描述。除非在本文中另有明确定义, 本文使用的全部技术和科学术语具有与本领域的普通技术人员通常所理解的含义。

说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代,

除非上下文清楚表明并非如此。

除非上下文另外清楚要求，否则在专利说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为“包括但不限于”的意义，而不是排他性或穷举性意义。

术语“和/或”，意指包含“和”与“或”两种含义。例如短语“A、B 和/或 C”旨在涵盖以下方面中的每一个：A、B 和 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 和 C；A 和 B；B 和 C；A(单独)；B(单独)；和 C(单独)。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构（即与氢、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。此类类似物具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

术语“氨基酸突变”包括氨基酸取代（也称氨基酸替换）、缺失、插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体拥有期望的特性，例如降低或对 Fc 受体的结合。氨基酸序列缺失和插入包括在多肽链的氨基端和/或羧基端的缺失和插入。具体的氨基酸突变可以是氨基酸取代。在一个实施方式中，氨基酸突变是非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种天然氨基酸的衍生物（例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸）替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR，基因合成等。预计基因工程以外的改变氨基酸侧链基团的方法，如化学修饰也可能是可用的。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。本文中，可采用位置+氨基酸残基的方式表示特定位点的氨基酸残基，例如 366W，表示在 366 位点上的氨基酸残基为 W。T366W 则表示第 366 位点上的氨基酸残基由原来的 T 突变为 W。

术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体）；全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N

至 C 端，每条重链具有一个可变区 (VH)，又称作可变重域、重链可变区，接着是重链恒定区，重链恒定区 (CH) 通常含三个恒定域 (CH1、CH2 和 CH3)。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区 (VL)，又称作可变轻域，或轻链可变域，接着是一个恒定轻域 (轻链恒定区、CL)。术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用，指具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有如本文所限定的 Fc 区的重链的抗体。天然完整抗体轻链包括轻链可变区 VL 及恒定区 CL，VL 处于轻链的氨基末端，轻链恒定区包括 κ 链及 λ 链；重链包括可变区 VH 及恒定区 (CH1、CH2 及 CH3)，VH 处于重链的氨基末端，恒定区处于羧基末端，其中 CH3 最接近多肽的羧基末端，重链可属于任何同种型，包括 IgG(包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亚型)、IgA(包括 IgA1 及 IgA2 亚型)、IgM 及 IgE。

术语抗体“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中涉及抗体结合抗原的域。本文中，抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 各包含四个保守的框架区 (FR) 和三个互补决定区 (CDR)。其中，术语“互补决定区”或“CDR”指可变结构域内主要促成与抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。每个 VH 和 VL 由从氨基末端 (也称 N 末端) 排到羧基末端 (也称 C 末端) 按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

可以通过各种公知方案来确定 CDR 的氨基酸序列边界，例如：“Kabat”编号规则 (参见 Kabat 等 (1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、 “Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则 (参见 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) 和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则 (Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2278) 等；各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的，示例性的，如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

除非另有说明，本披露中的可变区和 CDR 序列均适用“Kabat”编号规则。

术语“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体所结合的抗原相结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab’、

Fab'-SH、F(ab')₂、单域抗体、单链 Fab (scFab)、双抗体、线性抗体、单链抗体分子 (例如 scFv); 以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施方案中, 所述抗体的抗原结合片段为一价 Fab (也即 Fab)、二价 Fab (F(ab)₂)、三价 Fab 片段 (F(ab)₃)、多价 Fab (两个或以上 Fab), 也可以是包含至少一个 Fab 片段的单特异性或多特异性抗原结合片段。

术语“抗原结合分子”指能够与抗原特异性结合的蛋白质。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域, 包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。在一些实施方式中, Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。在一些实施方式中, 人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适 Fc 区包括人 IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3 和 IgG4 的 Fc 区。在一些实施方式中, Fc 区的边界还可以变化, 例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸 (根据 EU 编号系统的残基 447) 或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸 (根据 EU 编号系统的残基 446 和 447)。除非另有说明, Fc 区的编号规则为 EU 编号系统, 又称作 EU 索引。

本披露所述“结构域改造的抗体”是指抗体的 CH1 和/或 CL 被其它结构域或肽片段替换形成的抗体, 例如 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链或被 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换。在一些实施方案中, 所述结构改造抗体为单特异性抗体或多特异性抗体; 在一些实施方案中, 所述结构改造抗体为一价抗体、二价抗体或多价抗体; 在一些实施方案中, 所述结构改造抗体为完整抗体或其抗原结合片段; 在一些实施方案中, Fab 的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链或被 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换的结构改造的 Fab, 其结构示意图见附图 2; 单克隆抗体的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链、或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换的结构域改造的抗体的结构示意图见附图 3; 双特异性抗体的一侧 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链、或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换的结构域改造的抗体的结构示意图见附图 4。其它 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链、或被 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换的结构域改造的抗体包括但不限于: 二价抗体的一侧 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换; 双特异性抗体的两侧 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链、或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换; F(ab)₂ 的 2 个 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链、或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换; F(ab)₃ 的 1 个或 2 个或 3 个 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链、或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换。

“Titin” (肌联蛋白) 是一个巨大的肌小节蛋白, 具有复杂的分子折叠结构。已知它具有将粗肌丝与 Z-线连接, 维持肌原纤维的完整性和稳定性等功能。肌联蛋白是骨骼肌纤维中第三类丰富蛋白质, 它的分子量为 2700kDa (25000 多个氨基酸), 长度为 1 μ m, 约占肌节的一半。

“Titin Ig-样 152 结构域”是 Titin 蛋白上一段命名为 Titin Ig-样 152 的 Ig 样结构

域，该结构域能够与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域相互结合形成复合物（RCSB PDB 数据库获得）。

“Titin-T 链”或“T 链”是指 Titin 蛋白中一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Titin Ig-样 152 结构域的肽段或其功能变体，所述 Titin-T 链能够与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此结合形成二聚化复合物。所述 T 链功能变体是对野生型 T 链的部分氨基酸进行突变，但依然具有与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 彼此结合形成二聚化复合物的多肽。本披露中 Titin-T 链可用于替换抗体的 CH1 或 CL 结构域，而不影响抗体与抗原的结合。可以对 Titin Ig-样 152 结构域部分氨基酸进行突变，而仍保留其与 Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物的功能。例如，在 Titin Ig-样 152 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸；可增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基；例如在 Titin Ig-样 152 结构域 N 端增加 5 个野生型 Titin 蛋白中紧邻 Titin Ig-样 152 结构域 N 端的“KAGIR”这 5 个氨基酸，其仍具有与 Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物的功能。还可对 Titin Ig-样 152 结构域氨基酸进行其它突变，例如，对某些氨基酸突变以便改善链间二硫键，提高复合物稳定性等。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为包含 SEQ ID NO: 32 的第 7-60 位氨基酸残基的多肽或其突变序列。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为包含 SEQ ID NO: 32 的第 1-96 位氨基酸残基的多肽或其突变序列。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 的变体，所述变体在选自第 60 和 64 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代，例如具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 的变体，所述变体在选自第 60 和 64 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代，还在选自第 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；例如还包含选自 3W、8C、11I、13L、20C、22M/22C、25S、26C、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S/66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为包含 SEQ ID NO: 32 的第 7-60 位氨基酸残基的多肽或其突变序列。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为包含 SEQ ID NO: 32 的第 1-96 位氨基酸残基的多肽或其突变序列。

“Obscurin”（遮蔽蛋白），是一种由 OBSCN 基因编码的蛋白质，属于巨型肌氨酸信号蛋白家族。Obscurin 在心肌和骨骼肌中表达，并在肌节组装过程中在肌原纤维的组织中发挥重要作用。Obscurin 是肌浆网状蛋白 sANK1 的主要细胞质配体，其可以阻止 sANK1 的降解(Lange S 等. *Molecular Biology of the Cell*. 23(13): 2490–504); Obscurin 在肌浆网状结构域和肌浆网状结构域之间起着信号联系的作用 (Bagnato P 等, *The Journal of Cell Biology*. 160 (2) : 245–53.); Obscurin 在肌原

纤维组装过程中参与新肌节的形成 (Borisov AB, 等, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 310 (3) : 910–918)。

“Obscurin Ig-样 1 结构域”是 Obscurin 蛋白中一段命名为 Obscurin Ig-样 1 的 Ig 样结构域, 该结构域能够与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物 (可从 RCSB PDB 数据库获得)。

“Obscurin-O 链”或“O 链”是指 Obscurin 蛋白上一段长度为 87-117 个氨基酸的包含 Obscurin Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体, 所述 Obscurin-O 链能够与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物。所述的 Obscurin-O 链功能变体是对野生型 O 链的部分氨基酸进行突变, 但依然具有与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物的多肽。本披露中, Obscurin-O 链可替换抗体的 CH1 或 CL 结构域, 而不影响抗体与抗原的结合。可以对 Obscurin Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行突变, 而仍具有其与 Titin Ig-样 152 结构域彼此缔合形成复合物的功能。例如, 在 Obscurin-O 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸, 例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸; 例如在 Obscurin-O 结构域 N 端增加 5 个野生型 Obscurin 蛋白中紧邻 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端的“DQPQF”这 5 个氨基酸, 其仍具有与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物的功能。还可对 Obscurin Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行其它突变, 例如, 对某些氨基酸突变以便改善链间二硫键, 或提高抗体稳定性等。在一些实施方案中, Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 的变体, 所述变体在选自 13、32、48、66、82 和 93 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代, 例如具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代; 在一些实施方案中, Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 的变体, 还在选自第 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代, 例如还具有选自 2E、3C、7K/7R、9C、11L、12S、13Y、14T、17E、20L、22M/22S、25S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E/62K/62H、67Q/67T、69S、76S、88C、89L、92E、94G 和 97G 中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中, Obscurin-O 链为包含 SEQ ID NO: 33 的第 3-90 位氨基酸的多肽或其突变序列。

“Obscurin-样 1”、“类遮蔽蛋白 1”, 是由位于人染色体 2q35 的 SPEG 内的 OBSL1 基因编码的一种蛋白质, 该蛋白与 Obscurin 密切相关。其可变剪接产生多种同工型, 预测分子量范围为 130 kD 至 230 kD (Geisler SB 等. (2007). *Genomics*. 89 (4) : 521–31)。

“Obscurin-样 Ig-样 1 结构域”是 Obscurin-样 1 蛋白中一段命名为 Obscurin-样 Ig-样 1 的 Ig 样结构域, 该结构域能够与 Titin Ig-样 152 结构域通过分子间天然相互作用形成复合物 (可从 RCSB PDB 数据库获得)。

“Obscurin-样-O 链”或“OL 链”是指 Obscurin-样 1 蛋白上一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体。所述 Obscurin-样-O 链能够与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物。所述的 Obscurin-样-O 链功能变体为对野生型 OL 链的部分氨基酸进行突变，但其依然具有与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物的多肽。本披露中，Obscurin-样-O 链可替换抗体的 CH1 或 CL 结构域，而不影响抗体 VH 和 VL 形成抗原结合位点，不影响抗体与抗原的结合。可以对 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行突变，而仍具有与 Titin Ig-样 152 结构域彼此缔合形成二聚化复合物。例如，在 Obscurin-O 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸，例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸。还可对 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行其它突变，例如，对某些氨基酸突变以便改善链间二硫键、或提高抗体稳定性等。在一些实施方案中，Obscurin-样-O 链为 SEQ ID NO: 34 的变体，所述变体在选自第 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；例如具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中，Obscurin-样-O 链包含 SEQ ID NO: 34 第 4-91 位氨基酸残基多肽或其突变序列。

在一些实施方案中，对 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域和/或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域上的部分氨基酸进行突变，其仍具有使 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物的能力，或者具有使 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物的能力。在一些实施方案中，公开一种 Titin-T 链/Obscurin-O 链二聚化多肽，以及 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链二聚化多肽，其中 Titin-T 链上第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合，所述 Titin-T 链上第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合；所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO:32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO:33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

“Fab”是 Fab 指由免疫球蛋白的 VH 和 CH1（Fab 重链）与 VL 和 CL（Fab 轻链）组成的蛋白质。

“结构域改造的 Fab”或“FabV”是指 Fab 中 CL 和/或 CH1 被其它结构域或肽片段替换后形成的多肽片段，结构域改造的 Fab，其 VH 和 VL 仍能相互作用形成抗原结合位点，保留与抗原的结合能力。在一些实施方案中，结构域改造的 Fab 可以作为多价抗体（例如 2 价抗体，3 价抗体）的一部分。在另一些实施方案中，结构域改造的 Fab 片段作为一个单一的抗原结合分子。在一些实施方案中，Fab 的

CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链或被 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换，结构改造的 Fab 的结构示意图见附图 2。

术语“特异性抗体”、“特异性结合的抗体”指能够对目标抗原或抗原表位特异性结合的抗体。根据抗体结合的不同目标抗原或不同抗原表位的数目，分为单特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、四特异性抗体……，多特异性抗体（结合两个或两个以上不同目标抗原或相同抗原不同表位）。例如，“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的两个不同抗原表位特异性结合的抗体。现有技术已公开了各种结构的双特异性抗体；根据 IgG 分子的完整性可分为 IgG 样双特异性抗体和抗体片段型双特异性抗体；根据抗原结合区域的数量可分为二价、三价、四价……多价（二价及以上）双特异性抗体；根据结构左右是否对称性可分为对称结构双特异性抗体和不对称结构双特异性抗体。其中，基于抗体片段的双特异性抗体，例如缺乏 Fc 片段的 Fab 片段，其通过将 2 个或多个 Fab 片段结合在一个分子中形成双特异性抗体，其具有较低的免疫原性，且分子量小，具有较高的肿瘤组织渗透性，该类型的典型的抗体结构如 F(ab)₂、scFv-Fab、(scFv)₂-Fab 等双特异性抗体；IgG 样双特异性抗体（例如具有 Fc 片段的抗体），这类抗体相对分子量较大，Fc 片段有助于抗体后期的纯化，并提高其溶解性、稳定性，Fc 部分还可能与受体 FcRn 结合，增加抗体血清半衰期，典型的双特异性抗体结构模型如 KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、FcΔAdp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2:1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP-DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)₂-CrossMAb、IgG-(scFv)₂、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent-DART-Fc、(scFv)₄-Fc、CODV-Ig、mAb2、F(ab)₄-CrossMAb 等双特异性抗体（参见 Aran F. Labrijn 等, Nature Reviews Drug Discovery volume 18, pages585–608 (2019); Chen S1 等, J Immunol Res. 2019 Feb 11; 2019:4516041）。

术语“一价”、“二价”、“三价”或“多价”抗体是指抗体中存在指定数量的抗原结合位点的抗体。例如“一价抗体”表示抗体中存在一个抗原结合位点，“二价抗体”表示抗体中存在两个抗原结合位点，“三价抗体”表示抗体中存在三个抗原结合位点，“多价抗体”表示抗体中存在多个（例如 2 个或 2 个以上）抗原结合位点。

术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明，否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

术语“抗原结合域”是指在抗原结合分子（例如抗体）中与抗原特异性结合的区域，抗原结合域可以是能直接与抗原结合的配体结合结构域的部分，也可以是能直接与抗原结合的包含抗体可变区的结构域。术语“抗原结合部分”是指抗原结合分子（例如抗体）中包含抗原结合域的部分。

术语“融合”或“连接”是指部件（例如两条多肽）直接地或经由一个或多个连接子通过共价键连接。当连接子是肽连接子时，所述共价键是肽键。

术语“相互作用结构域”是指能够促进两个或更多个同源或异源多肽的相互作用或缔合的多肽的结构域。例如相互作用结构域为促进彼此缔合以形成二聚体的二聚化结构域。蛋白间相互作用的结构域是两个或更多个蛋白之间相互作用或缔合的多肽的结构域，例如，Obscurin-like 蛋白中的 Obscurin-like Ig-like 1 结构域，能够与 Titin 蛋白的 Titin Ig-样 152 结构域通相互作用形成复合物。在一些实施方案中，与 Titin-T 链相互作用的结构域是 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链。

术语“二聚化多肽”是指两个多肽通过共价或非共价相互作用而彼此缔合形成的二聚体多肽（也称二聚化复合物）。同型二聚体是由两个相同的多肽形成的二聚体，异型二聚体（或称异二聚体）是由两个不同的多肽形成的二聚体。多肽可以通过任何合适的方式进行结合或连接或键合形成二聚体；例如，通过连接子，二硫键，氢键，静电相互作用，盐桥，或疏水-亲水相互作用，或者其组合。示例性的，两个多肽分子可以通过天然链间键形成二聚体，也可以通过非天然链间键形成二聚体。本披露的一些实施方案中，二聚化多肽 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链可通过天然链间键形成二聚体。另外，本领域技术人员公知，两个彼此缔合形成二聚体的结构域，其中第一结构域与第二结构域之间间距在 6 埃以内的接触界面残基（尤其是 4.5 埃以内的残基）对维持两个结构域的彼此缔合起到关键作用（Yan, Changhui et al. “Characterization of protein-protein interfaces.” The protein journal vol. 27, 1 (2008): 59-70）。本披露中，通过 MOE(Molecular Operating Environment)系统分析 Titin-T 链与 Obscurin-O 链，以及 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链缔合形成的二聚化复合物（见附图 1A 和图 1B），发现 Titin-T 链上的第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相互作用，Titin-T 链上的第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相互作用（结合位点参见附图 16A 和图 16B），上述二聚化复合物中上述位点的接触界面残基间距在 4.5 埃以内，其对维持两个结构域的缔合起到重要作用。本披露中，在一些实施方案中，所述 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链通过非天然链间键形成二聚体，其中所述二聚体包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个非天然链间键。可以通过对 Titin-T 链、Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链上的一些氨基酸进行突变，从而使 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链二硫键更稳定，促进它们之间形成稳定化二聚体。在本披露的一些实施方案中，通过对 Titin-T 链上选自第 8、20、22、25、26 和 39 位，和/或 Obscurin-O 链上选自第 3、9、25、66、76、88 和 93 位中的一个或多个氨基酸残基突变而使两条链间键更稳定；或者通过对 Titin-T 链选自第 8、20、22、

25、26 和 39 位，和/或 Obscurin-样-O 链上选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变而使两条链间键更稳定。

本披露中，“错配”是指两个或更多个同源或异源多肽相互作用或缔合形成不期望的二聚体或多聚体配对。“不容易发生错配”意指，例如，当多肽 A1、B1 和 B2 共表达时，期望的是产生 A1-B1 二聚体，不期望产生 A1-B2 二聚体，如果最终生成的 A1-B1 二聚体的表达量大于 A1-B2 二聚体的量，那么认为 A1 与 B1 优先配对，即 A1 与 B2 之间不容易发生错配。本披露中，在一些实施例中，包含本披露的二聚化多肽 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链的双特异性抗体，VH1 与 VL2 之间不容易发生错配，和/或 VL1 与 VH2 之间不容易发生错配，VH1 与 VL1 之间优先配对，VH2 与 VL2 之间优先配对。

“二硫键”是指结构 R-S-S-R' 中硫原子间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含硫醇基团，其可以与第二个硫醇基团形成二硫键，例如与另一个半胱氨酸残基的硫醇基团形成二硫键。二硫键可以在分别位于两条多肽链上的两个半胱氨酸残基的硫醇基团之间形成，从而形成链间桥或链间键。

静电相互作用，是非共价相互作用，并且在蛋白质折叠，稳定性，柔韧性和功能中起到重要作用，包括离子相互作用，氢键和卤素键合。静电相互作用可以在多肽中形成，例如，在 Lys 和 Asp 之间，在 Lys 和 Glu 之间，在 Glu 和 Arg 之间，或在第一链上的 Glu，Trp 和在第二链上的 Arg，Val 或 Thr 之间。

盐桥，是近距离静电相互作用，其主要来自 Asp 或 Glu 的阴离子羧酸根和来自 Lys 的阳离子铵或 Arg 的胍基，其是天然蛋白质结构中的空间上靠近的带相反电荷残基对。疏水的界面中的带电和极性残基可以作为用于结合的热点。其中，具有可电离侧链的残基如 His，Tyr 和 Ser 也可参与盐桥的形成。

亲水相互作用，带有极性基团的分子，对水有大的亲和能力，分子能透过氢键和水形成短暂键结。疏水相互作用是非极性分子之间的一种非共价的相互作用。这些非极性分子（如一些中性氨基酸残基，也称疏水残基）在水相环境中具有避开水而相互聚集的倾向。例如可以在第一链上的一个或多个 Val，Tyr 和 Ala 与第二链上的一个或多个 Val，Leu 和 Trp 之间形成疏水相互作用，或者在第一链上形成 His 和 Ala，在第二链上形成 Thr 和 Phe。（参见 Brinkmann 等，2017）。

术语“氢键”，当氢原子与高电负性原子如氮，氧或氟共价结合时，通过两个极性基团之间的静电引力形成氢键。在多肽的两个残基的骨架氧（例如硫族元素基团）和酰胺氢（氮基团）之间可以形成氢键，例如 Asn 中的氮基团和 His 中的氧基团，或者 Asn 中的氧基团和 Lys 中的氮基团之间形成氢键。氢键比范德华相互作用强，但弱于共价键或离子键，并且对于维持二级结构和三级结构是关键的。例如，当氨基酸残基的间隔在位置 i 和 $i + 4$ 之间有规律地发生时形成 α 螺旋，当两条肽通过至少两个或三个骨架氢键连接时形成的 3-10 个氨基酸长的肽段形成扭曲的褶皱的片层为 β 折叠。

“非天然的链间键”是指在野生型多肽聚合物中未发现的链间键。例如，非天然链间键可以在一条多肽的突变的氨基酸残基和另一条多肽的野生型氨基酸残基或突变氨基酸残基之间形成。在某些实施方案中，至少一个非天然链间键为氨基酸突变后形成的“二硫键”。

术语“接触界面”是指多肽上的特定区域，其中多肽彼此接触或相互作用。接触界面包含一个或多个氨基酸残基，相互作用发生时，某多肽上的接触界面氨基酸残基能够和与其接触的相应氨基酸残基相互作用。接触界面中的氨基酸残基可以是连续或不连续序列。例如，当界面是三维时，界面内的氨基酸残基可以在线性序列上的不同位置分开。

术语“连接子”、“Linker”或“接头”指连接两个多肽片段的连接单元。连接子通常具有一定的柔性，接头的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。在本文中，同一结构中出现的连接子可以是相同或不同的。连接子可以是肽连接子，其包含一个或多个氨基酸，典型的包含约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸。应用于本文的连接子可以是相同或不同的。在一些实施方案中，所述连接子选自 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 0-6 的整数，当 y 为 0 时，表示连接子为键，两条多肽链通过键直接连接；在一些实施方案中，所述 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 为 1-5 的整数（例如 x 为 4），y 为选自 1-6 的整数（例如 1、2、3、4、5 或 6）；例如连接子为“GGGGS”（SEQ ID NO: 175）或“GGGGS GGGGS”（SEQ ID NO: 176）多肽。在另一些实施方案中，连接子为重链恒定区 CH1 的 C 端截短的序列（也即截去 CH1 的 C 端部分，保留 CH1 的 N 端部分形成的肽序列，例如 CH1 的 C 端截短的序列为：CH1 的 N 端的第 1 至第 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 位氨基酸残基形成的多肽，例如第 1 至第 5 位残基多肽“ASTKG”（SEQ ID NO: 173）；或者连接子为轻链恒定区 CL 的 C 端截短的序列（也即截去 CL 的 C 端部分，保留 CL 的 N 端部分形成的肽序列，例如 CL 的 C 端截短的序列为：CL 的 N 端的第 1 至第 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 位氨基酸残基多肽，例如第 1 至第 5 位残基“RTVAS”（SEQ ID NO: 174）。在一些实施方案中，所述连接子 1 为“ASTKG”多肽，连接子 2 为“RTVAS”多肽，或者连接子 1 和连接子 2 均为“GGGGS”多肽或“GGGGS GGGGS”多肽。

“ T_m ”是溶解变性温度（内源荧光）。当蛋白质变性（加热或变性剂作用）时，三级结构打开，芳香族氨基酸微环境发生变化，导致发射荧光光谱改变。本披露中， T_{m1} 是指荧光变化到最大值的一半时的温度。

“Tonset”是变性起始温度。意指蛋白质开始变性时的温度，即荧光值开始变化时的温度。

“Tagg”是聚集起始温度。通过静态光散射，在 266nm 和 473nm 两个波长下检测聚集体，监测到样品开始聚集时的温度。Tagg 266 指的是 266nm 下监测到聚

集起始温度。

“SEC 纯度 (%)”或“SEC %”是指 SEC 单体含量百分比。 $SEC\% = A \text{ 单体} / A \text{ 总} * 100\%$ (A 单体为样品中主峰单体的峰面积, A 总为所有峰面积之和)。本披露中, 可通过 SEC 分子排阻色谱法 (根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质进行分离的分析的方法。) 测定抗体的 SEC%。SEC 测定用仪器, 例如: 安捷伦 1260; 柱子: waters, XBrige BEH200Å SEC (300×7.8mm 3.5μm)。

“NR-CE-SDS%”或“NR-CE-SDS 纯度 (%)”是指非还原毛细管电泳纯度百分比。 $NR-CE-SDS\% = A \text{ 主峰} / A \text{ 总} * 100\%$ (A 主峰为样品中轻链主峰+重链主峰的峰面积, A 总为所有峰面积之和。本披露中, 可通过 NR-CE 毛细管凝胶电泳法 (将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳, 并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法) 测定抗体的 NR-CE-SDS%, NR-CE-SDS 测定用仪器, 例如: Beckman 型号 plus800。

本披露的抗体, 可以是源自动物的抗体 (如鼠、禽、兔、骆驼、猴等来源抗体)、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

术语“嵌合”抗体指抗体中的重和/或轻链的一部分自特定的来源或物种衍生, 而重和/或轻链的剩余部分自另外的不同来源或物种衍生的抗体。

术语“人源化”抗体是保留非人抗体的反应性同时在人中具有较低免疫原性的抗体。例如, 可以通过保留非人 CDR 区并用其人对应物 (即, 恒定区以及可变区的框架区部分) 替换抗体的其余部分来实现。

术语“人抗体”、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用, 意指可变区及恒定区是人序列的抗体。该术语涵盖源自人基因但具有, 例如, 降低可能的免疫原性、增加亲和力、消除可能会引起不期望的折叠的半胱氨酸或糖基化位点等序列已发生改变的抗体。该术语涵盖这些在非人细胞 (其可能会赋予不具人细胞特征的糖基化) 中重组产生的抗体。该术语亦涵盖已在含有一些或所有人免疫球蛋白重链及轻链基因座的转基因小鼠中饲养的抗体。人抗体的含义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

术语“亲和力”是指分子 (例如, 抗体) 的单个结合部位与其结合配体 (例如, 抗原) 之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明, 如本文所用, 结合“亲和力”是指内部结合亲和力, 其反映出结合对 (例如, 抗体与抗原) 的成员之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由解离常数 (KD) 表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法 (包括本文所述的那些方法) 测量。

如本文所使用的, 术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率, 术语“kdis”或“kd”指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。术语“KD”指解离常数, 其获得自 kd 与 ka 的比率 (即 kd/ka) 并且表示为摩尔浓度 (M)。可以使用本领域公知的方法测定抗体的 KD 值。例如, 使用生物传感系统例如系统测量表面等离

子体共振，或通过溶液平衡滴定法（SET）测量溶液中的亲和力。

术语“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列突变的 Fc 区）且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括但不限于：C1q 结合和补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、吞噬作用、细胞表面受体（例如 B 细胞受体）下调；和 B 细胞活化。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的，除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下，多克隆抗体制剂通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体，其通常特异性针对不同表位。“单克隆”表示从基本上均质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。在一些实施方式中，本披露提供的抗体是单克隆抗体。

术语“抗原”是指能够由诸如抗原结合蛋白（包括例如抗体）的选择性结合剂结合，且另外能够用于动物中以产生能够结合该抗原的抗体的分子或分子部分。抗原可具有一个或多个能够与不同的抗原结合蛋白（例如抗体）相互作用的表位。

术语“表位”指能够与抗体或其抗原结合片段特异性结合的抗原上的区域（area 或 region）。表位可以由连续氨基酸串（线性表位）形成或包含非连续氨基酸（构象表位），例如因抗原的折叠（即通过蛋白质性质的抗原的三级折叠）而变成空间接近。构象表位和线性表位的差别在于：在变性溶剂的存在下，抗体对构象表位的结合丧失。表位包含处于独特空间构象的至少 3，至少 4，至少 5，至少 6，至少 7，或 8-10 个氨基酸。筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的）可以使用本领域例行方法来进行，例如但不限于丙氨酸扫描，肽印迹，肽切割分析，表位切除，表位提取，抗原的化学修饰（见 Prot. Sci. 9（2000）487-496），和交叉阻断。

术语“能够特异性结合”、“特异性结合”或“结合”是指相比其他抗原或表位，抗体能够以更高的亲和力结合至某个抗原或该抗原内的表位。通常地，抗体以约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小（例如约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小）的平衡解离常数（KD）结合抗原或抗原内的表位。在一些实施方式中，抗体与抗原结合的 KD 为该抗体结合至非特异性抗原（例如 BSA、酪蛋白）的 KD 的 10% 或更低（例如 1%）。可使用已知的方法来测量 KD，例如通过 BIACORE® 表面等离子体共振测定法所测量的。然而，特异性结合至抗原或抗原内的表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种（同源）（诸如人或猴，例如食蟹猕猴（*Macaca fascicularis*）（*cynomolgus*, cyno）、黑猩猩（*Pan troglodytes*）（*chimpanzee*, chimp））或狨猴（*Callithrix jacchus*）（*commonmarmoset*, marmoset）的相应抗原具有交叉反应性。

术语“抗体依赖性细胞的细胞毒性”、“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是诱导细胞死亡的机制，该机制依赖于抗体包被靶细胞与具有裂解活性的

效应细胞（诸如自然杀伤细胞（NK）、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞）经由效应细胞上表达的 Fc γ 受体(Fc γ R)发生的相互作用。例如，NK 细胞表达 Fc γ RIIIa，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIIIa。本文提供的抗体的 ADCC 活性可使用体外测定，使用表达抗原的细胞作为靶细胞和 NK 细胞作为效应细胞进行评定。根据从裂解的细胞中释放的标记物（例如放射性底物、荧光染料或天然胞内蛋白）来检测细胞裂解。

术语“抗体依赖性细胞吞噬作用”（“ADCP”）是指通过吞噬细胞（诸如巨噬细胞或树突状细胞）的内化作用消除抗体包被的靶细胞的机制。

术语“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指诱导细胞死亡的机制，其中靶结合抗体的 Fc 效应域结合并激活补体成分 C1q，C1q 继而激活补体级联，从而导致靶细胞死亡。补体的激活也可导致补体成分沉积在靶细胞表面上，这些补体成分通过结合白细胞上的补体受体（例如，CR3）来促进 CDC。

术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用，并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考试核酸相似的结合特性，并且以类似于参考试核酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸（PNA）。“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。编码多肽或融合蛋白的分离的核酸指编码多肽或融合蛋白的一个或更多个核酸分子，包括在单一载体或分开的载体中的这样的一个或更多个核酸分子，和存在于宿主细胞中一个或更多个位置的这样的一个或更多个核酸分子。除非另有说明，否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体（例如，简并密码子取代）和互补序列以及明确指明的序列。具体地，如下详述，简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得，在这些序列中，一个或多个所选的（或全部）密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代。

术语序列“同一性”指，当对两条序列进行最佳比对时，必要时引入间隙，以获取最大序列同一性百分比，且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分，两条序列的氨基酸/核酸在等价位置相同的程度（百分比）。为测定序列同一性百分比，比对可以通过本领域技术已知的技术来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

本披露中，例如“相对于 XX 序列的位点”，意指待测序列与 XX 序列进行最佳比对，获得最高百分比同一性，此时待测序列与 XX 序列对应位置的位点，即为

两条序列的相对位点。例如 Titin-T 链中，序列 SEQ ID NO: 32 上的自然顺序编码的位点 1，其相对于 SEQ ID NO: 127 的自然顺序编号的位点为位点 6；再例如 Obscurin-O 链中，序列 SEQ ID NO: 33 上的自然顺序编码的位点 3，其相对于 SEQ ID NO: 128 的自然顺序编号的位点为位点 8。

术语“载体”意指能够转运与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指环状双链 DNA 环，其中可以连接附加的 DNA 区段。另一种类型的载体是病毒载体，例如腺相关病毒载体 (AAV 或 AAV2)，其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制 (例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体 (例如，非附加型哺乳动物载体) 可以在引入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。术语“表达载体”或“表达构建体”是指可对宿主细胞进行转化，且含有指导和/或控制 (连同宿主细胞一起) 与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且指已经导入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代，而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同，而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞，其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、犬、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞，包括但不限于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人肝细胞癌细胞 (例如，Hep G2)、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞。真菌细胞包括酵母和丝状真菌细胞，包括例如巴氏毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母 (*Pichia finlandica*)、海藻毕赤酵母 (*Pichia trehalophila*)、科克拉马毕赤酵母 (*Pichia koclamae*)、膜状毕赤酵母 (*Pichia membranaefaciens*)、小毕赤酵母 (*Pichia minuta*) (*Ogataea minuta*、*Pichia lindneri*)、仙人掌毕赤酵母 (*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母 (*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母 (*Pichia salictaria*)、*Pichia guercuum*、皮杰普毕赤酵母 (*Pichia pijperi*)、具柄毕赤酵母 (*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母 (*Pichia methanolica*)、毕赤酵母属、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、酿酒酵母属、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母属、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、勒克氏菌 (*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀菌属 (*Fusarium*

sp.)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium gramineum*)、菜镰刀菌 (*Fusarium venenatum*)、小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)。毕赤酵母属、任何酿酒酵母属、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、任何克鲁维酵母属、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、任何曲霉属、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、勒克霉菌 (*Chrysosporium lucknowense*)、任何镰刀菌属、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)。

如在本申请中所使用的, 表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用, 并且所有这样的名称均包括子代。因而, 词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和来源于其的培养物, 而与传代的次数无关。还应理解的是, 由于有意或无意的突变, 使得并非所有子代均具有完全相同的 DNA 内容物。包括与筛选出其的原始转化细胞具有相同功能或生物活性的突变子代。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生, 该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述的抗原结合分子与其他化学组分的混合物, 所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。

术语“药学上可接受的载体”指药学配制剂中与活性成分不同的, 且对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

术语“受试者”或“个体”包括人类和非人类动物。非人动物包括所有脊椎动物 (例如哺乳动物和非哺乳动物) 例如非人灵长类 (例如, 食蟹猴)、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非指出时, 否则所述术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。如本文所使用的, 术语“食蟹猴 (cyno)”或“食蟹猴 (cynomolgus)”是指食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

“施用”或“给予”, 当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时, 是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。

术语“样本”是指从受试者分离的类似流体、细胞、或组织的采集物, 以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。示例性样本为生物流体, 诸如血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、唾液、囊液、泪液、排泄物、痰、分泌组织和器官的粘膜分泌物、阴道分泌物、腹水、胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔的流体、由支气管灌洗液收集的流体、滑液、与受试者或生物来源接触的液体溶液, 例如细胞和器官培养基 (包括细胞或器官条件培养基)、灌洗液等, 组织活检样本、细针穿刺、手术切除的组织、器官培养物或细胞培养物。

“治疗 (treatment 或 treat)”和“处理” (及其语法变型) 指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预, 并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生, 减轻症状, 减轻/减少疾病的任何间接病理后果, 预防转移, 降低疾病进展速率, 改善或减轻疾病状态,

和消退或改善的预后。在一些实施方案中，使用本披露的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤（例如肺病）的量。在一些实施例中，有效量是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状的发作（或复发）可能性的量。完全治疗或预防效未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于多种因素变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如患者改善的健康状况。

本披露的二聚化多肽，以及包含所述二聚化多肽的抗原结合分子

在一个方面中，本披露设计了不同的二聚化多肽，所述二聚化多肽包括 Titin-T 链，以及 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链，所述二聚化多肽可用于替换抗体 CH1/CL 以改善多特异性抗体（例如双特异性抗体）的重链/轻链之间的错配，同时不影响抗体与抗原的结合。

在一些实施方案中，本披露提供一种二聚化多肽，其包括 Titin-T 链以及 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链。

在一些实施方案中，本披露提供一种二聚化多肽，前述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基替代，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变；或者 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变；所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些具体的实施方案中，前述 Titin-T 链具有选自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一个或多个氨基酸残基取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 3C、9C、25S、76S 和 88C 中的一个或多个氨基酸残基取代；或者所述 Titin-T 链具有选自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一个或多个氨基酸残基取代，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一个或多个氨

氨基酸残基突变。在一些实施方式中,所述 Titin-T 链和 Obscurin-O 链或者所述 Titin-T 链和所述 Obscurin-样-O 链具有如下氨基酸残基取代: Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-O 链具有 88C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 取代,且 Obscurin-O 链具有 3C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 26C 取代,且 Obscurin-O 链具有 9C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 88C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 3C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 26C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 9C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 74C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 取代,且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 84C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 22C 取代,且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 86C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 74C 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 取代,且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 84C 取代; 或者 Titin-T 链具有 25S、39T 和 22C 取代,且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 86C 取代。在一些实施方案中,所述 Titin-T 为在 SEQ ID NO: 32 或 127 基础上具有前述位点取代;所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 或 128 基础上具有前述位点取代; Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 基础上具有前述位点取代。

在一些实施方案中,前述的二聚化多肽,其中,前述 Obscurin-O 链具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变。在一些实施方案中,所述 Obscurin-O 链具有选自 7R 或 7K、62K 或 62H、和 11L 的一个或多个氨基酸残基取代;在一些实施方案中,所述 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、7K 和 62K 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、7K 和 62H 取代; Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、11L 和 62K 取代;或者 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 取代,且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、11L 和 62H。在一些实施方案中,所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 或 45 基础上具有前述位点取代。Titin-T 链取代位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点; Obscurin-O 链取代位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中,前述的二聚化多肽,其中,前述 Titin-T 链具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变,和/或 Obscurin-O 链具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点; Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中,所述 Titin-T 链具有选自 3W、11I、13L、22M、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S 或 66K、

70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一个或多个氨基酸取代，和/或 Obscurin-O 链具有选自 2E、11K、12S、13Y、14T、17E、20L、22M 或 22S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E、67Q 或 67T、69S、89L、92E、94G 和 97G 中的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有 66S 和 77S 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 11K、12S、13Y、14T 和 22S 氨基酸取代；所述 Titin-T 链具有 66K、70R、79T 和 81R 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 2E、17E、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S 和 97G 氨基酸取代；所述 Titin-T 链具有 3W、11I、13L、22M 和 82M 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 20L、22M 和 53L 氨基酸取代；所述 Titin-T 链具有 11I、66K、79T 和 81R 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 41K、45T、67Q、69S 和 89L 氨基酸取代；所述 Titin-T 链具有 40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸取代；所述 Titin-T 链具有 47E、49G、56S、58E 和 75V 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸取代；所述 Titin-T 链具有 56S、58E 和 75V 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸取代；或者所述 Titin-T 链具有 56S、58E、66S 和 77S 氨基酸取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有 12S、13Y、22S、42L、45T、67Q、69S、92E 和 94G 氨基酸取代；上述 Titin-T 链取代位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链取代位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 基础上具有所述氨基酸取代，Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 基础上具有所述氨基酸取代。

在一些实施方案中，前述的二聚化多肽，其中，所述 Titin-T 链还具有选自第 60 和 64 位中的一个或多个位点氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 13、32、48、66、82 和 93 位中的一个或多个位点氨基酸残基突变；所述 Titin-T 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；所述 Obscurin-O 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，前述二聚化多肽，其中，所述 Titin-T 链具有选自 60S 和 64T 位中的一个或多个氨基酸残基取代，例如 1 个或 2 个，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 位中的一个或多个氨基酸残基取代，例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个或多个；所述 Titin-T 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；所述 Obscurin-O 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，前述二聚化多肽，所述 Titin-T 链具有 60S 和 64T 位氨基酸残基取代，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 a)-c) 中任一项的氨基酸残基取代：a) 13S 和 48V 位氨基酸残基取代， b) 13S、32F、48V 和 82H 位氨基酸残基取代，

和 c) 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 位氨基酸残基取代；所述 Titin-T 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；所述 Obscurin-O 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，前述的二聚化多肽，其中，前述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32、68 或 127 上具有选自 60S 和 64T 位中的一个或多个氨基酸残基取代，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33、80 或 128 上具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 位中的一个或多个氨基酸残基取代。所述 Titin-T 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；所述 Obscurin-O 链氨基酸残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述的二聚化多肽，其中，前述 Titin-T 链上选自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的选自第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合形成二聚化复合物，或者所述 Titin-T 链上的选自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的选自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合形成二聚化复合物；所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链包含 SEQ ID NO: 32 的第 7-60 位氨基酸或其突变体，Obscurin-O 链包含 SEQ ID NO: 33 的第 3-90 位氨基酸或其突变体；或所述 Titin-T 链包含 SEQ ID NO: 32 的第 1-96 位氨基酸或其突变体，Obscurin-样-O 链包含 SEQ ID NO: 34 第 4-91 位氨基酸或其突变体。

在一些实施方案中，所述的二聚化多肽，其包含 Titin-T 链和 Obscurin-O 链，或 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链，其中：i) 所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 的变体，所述变体相比 SEQ ID NO: 32 具有在选自第 60 和 64 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代，和/或 ii) 所述 Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 的变体，所述变体相比 SEQ ID NO: 33 具有在选自 13、32、48、66、82 和 93 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代；并且：a) 当所述变体在第 13、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 32 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 32 位的氨基酸取代不是 32P；b) 当所述变体在第 32、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 13 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 13 位的氨基酸取代不是 13Y；和 c) 当所述变体在 48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代，且在第 13 和 32 位上具有氨基酸残基取代时，所述第 13 位的氨基酸残基取代不是 13Y，且所述第 32 位的氨基酸残基取代不是 32P。

在一些实施方案中，所述的二聚化多肽，其中，所述 SEQ ID NO: 32 的变体相比 SEQ ID NO: 32 具有选自 60S 和 64T 组成的组中的一个或多个氨基酸残基

取代, 和/或所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 33 具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中组成的组中的一个或多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体相比 SEQ ID NO: 32 具有 60S 和 64T 的氨基酸残基取代, 和/或所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 32 具有选自 a) 至 c) 中任一项的氨基酸残基取代: a) 32F 和 48V, b) 13S、32F、48V 和 82H, c) 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C。

在一些实施方案中, 所述的二聚化多肽, 其中, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体相比 SEQ ID NO: 32 还在选自第 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代; 在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 32 变体相比 SEQ ID NO: 32, 还在选自 3W、8C、11I、13L、20C、22M/22C、25S、26C、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S/66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 组成的组中具有一个或多个氨基酸残基取代; 在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 32 变体相比 SEQ ID NO: 32 还包含选自 a) 至 l) 中任一项的氨基酸残基取代 a) 8C、25S 和 39T, b) 20C、25S 和 39T, c) 25S、26C 和 39T, d) 22C、25S 和 39T, e) 8C、25S、39T、66S 和 77S, f) 8C、25S、39T、66K、70R、79T 和 81R, g) 3W、8C、11I、13L、22M、25S、39T 和 82M, h) 8C、11I、25S、39T、66K、79T 和 81R, i) 8C、25S、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L, j) 8C、25S、39T、47E、49G、56S、58E 和 75V, k) 8C、25S、39T、56S、58E 和 75V, l) 8C、25S、39T、56S、58E、66S 和 77S; 在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体相比 SEQ ID NO: 32 具有选自 A) 至 C) 中任一项的氨基酸残基取代: A) 8C、11I、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R, B) 8C、11I、20C、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R, C) 8C、11I、25S、26C、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R。

在一些实施方案中, 所述的二聚化多肽, 其中, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 33, 还在选自第 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代。在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 33, 还具有选自 2E、3C、7K/7R、9C、11L、12S、13Y、14T、17E、20L、22M/22S、25S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E/62K/62H、67Q/67T、69S、76S、88C、89L、92E、94G 和 97G 组成的组中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 33 还具有选自 A) - R) 中任一项的氨基酸残基取代: A) 88C, B) 3C, C) 9C, D) 25S、76S 和 88C, E) 25S、76S 和 3C, F) 25S、76S 和 9C, G) 7K、25S、62K、76S 和 88C, H) 7K、25S、62H、76S 和 88C, I) 7R、25S、62K、76S 和 88C, J) 7R、25S、62H、76S 和 88C,

K) 11L、25S、62K、76S 和 88C, L) 11L、25S、62H、76S 和 88C, M) 12S、13Y、14T、22S、25S、62K、76S 和 88C, N) 2E、11L、17E、25S、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S、76S、88C 和 97G, O) 11L、20L、22M、25S、53L、62K、76S 和 88C, P) 11L、25S、41K、45T、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L, Q) 11L、25S、42L、45T、62K、67T、69S、76S、88C、92E 和 94G, R) 11L、12S、13Y、22S、25S、42L、45T、62K、67Q、69S、76S、88C、92E 和 94G。在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体相比 SEQ ID NO: 33 具有选自 a) 至 j) 中任一项的氨基酸残基取代: a) 25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L, b) 13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和 89L, c) 3C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和 89L, d) 9C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和 89L, e) 13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L, f) 3C、13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L, g) 9C、13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L, h) 13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、88C、89L 和 93C, i) 3C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、88C、89L 和 93C, j) 9C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、88C、89L 和 93C。

在一些实施方案中, 所述的二聚化多肽, 其中, 所述 Obscurin-样-O 链为 SEQ ID NO: 34 或其变体, 所述 SEQ ID NO: 34 的变体相比 SEQ ID NO: 34 在选自第 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代。在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 34 的变体相比 SEQ ID NO: 34 具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 组成的组中的一个或多个氨基酸残基取代。在一些实施方案中, 所述 SEQ ID NO: 34 的变体相比 SEQ ID NO: 34 具有选自 A) 至 F) 中任一项的氨基酸残基取代: A) 6E 和 74C, B) 6E 和 84C, C) 6E 和 86C, D) 6E、26S、77S 和 74C, E) 6E、26S、77S 和 84C, F) 6E、26S、77S 和 86C。

在一些实施方案中, 所述的二聚化多肽, 所述 Titin-T 链是 SEQ ID NO: 32、68 或 127 的变体, 所述 SEQ ID NO: 32 变体相比 SEQ ID NO: 32 具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代; 所述 SEQ ID NO: 68 变体相比 SEQ ID NO: 68 具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代; 所述 SEQ ID NO: 127 变体相比 SEQ ID NO: 127 具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代; 所述 Obscurin-O 链是 SEQ ID NO: 33、80 或 128 的变体, 所述 SEQ ID NO: 33 变体相比 SEQ ID NO: 33 具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代; 所述 SEQ ID NO: 80 变体相比 SEQ ID NO: 80 具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代; 所述 SEQ ID NO: 128 变体相比 SEQ ID NO: 128 具有选自 13S、32F、48V、66C、82H

和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代。

在一些实施方案中，如上任一项所述的抗原结合分子，其包含其包含第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中，

- a. 第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[Fc1]，
第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链]，
第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，
第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；或
- b. 第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[Fc1]，
第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，
第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，
第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

所述连接子 1 和连接子 2 相同或不相同；在一些实施方案中，所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代；在一些实施方案中，所述连接子 1 和连接子 2，其中：A) 连接子 1 和连接子 2 均为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数（例如 1、2、3、4 或 5），y 选自 0-6 的整数（例如，0、1、2、3、4、5 或 6），（其中：当 y 值为 0 时，所述连接子为键）；或者 B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列，连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列；在一些实施方案中，在一些实施方案中，所述连接子 1 和连接子 2 选自 A) 至 C) 中任一项：A) 连接子 1，其序列如 SEQ ID NO: 173 所示；连接子 2，其序列如 SEQ ID NO: 174 所示；B) 连接子 1 和连接子 2，其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示；和 C) 连接子 1 和连接子 2，其序列均如 SEQ ID NO: 176 所示。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构，或者所述 Fc1 具有根据杵臼技术的孔结构，所述 Fc2 具有根据杵臼技术的凸起结构。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc2 具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc2 具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc1 具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc2 具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc2 具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc1 具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc1 包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代，所述 Fc2 包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc2 包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代，所述 Fc1 包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案

中, 所述 Fc1 如 SEQ ID NO: 177 所示, 且所述 Fc2 如 SEQ ID NO: 178 所示; 或者所述 Fc2 如 SEQ ID NO: 177 所示, 且所述 Fc1 如 SEQ ID NO: 178 所示。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的抗原结合分子, 其包含其包含第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链, 其中,

- a. 第一重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[Fc1],
第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-样-O 链],
第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[CH1]-[Fc2],
第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL]; 或

b. 第一重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-样-O 链]-[Fc1],

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链],

第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[CH1]-[Fc2],

第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL];

所述连接子 1 和连接子 2 相同或不相同; 在一些实施方案中, 所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或更多个减少同源二聚化的氨基酸取代; 在一些实施方案中, 所述连接子 1 和连接子 2, 其中: A) 连接子 1 和连接子 2 均为 $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, x 选自 1-5 的整数 (例如 1、2、3、4 或 5), y 选自 0-6 的整数 (例如, 0、1、2、3、4、5 或 6), (其中: 当 y 值为 0 时, 所述连接子为键); 或者 B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列, 连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列; 在一些实施方案中, 在一些实施方案中, 所述连接子 1 和连接子 2 选自 A) 至 C) 中任一项: A) 连接子 1, 其序列如 SEQ ID NO: 173 所示; 连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 174 所示; B) 连接子 1 和连接子 2, 其序列均如 SEQ ID NO: 175 所示; 和 C) 连接子 1 和连接子 2, 其序列均如 SEQ ID NO: 176 所示。在一些实施方案中, 所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构, 所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构, 或者所述 Fc1 具有根据杵臼技术的孔结构, 所述 Fc2 具有根据杵臼技术的凸起结构。在一些实施方案中, 所述 Fc1 具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代, 所述 Fc2 具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc2 具有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代, 所述第 Fc1 具有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc1 具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代, 所述 Fc2 具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc2 具有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代, 所述 Fc1 具有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中, 所述 Fc1 包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代, 所述 Fc2 包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些

实施方案中,所述 Fc2 包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代,所述 Fc1 包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述 Fc1 如 SEQ ID NO: 177 所示,且所述 Fc2 如 SEQ ID NO: 178 所示;或者所述 Fc2 如 SEQ ID NO: 177 所示,且所述 Fc1 如 SEQ ID NO: 178 所示。

Fc 区的修饰

在一个方面,本披露的 Fc 区包含一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代减少其与 Fc 受体的结合,例如其与 Fc γ 受体的结合,并且降低或消除效应子功能。天然 IgG Fc 区,具体地是 IgG1 Fc 区或 IgG4 Fc 区,可能导致本披露的融合蛋白靶向表达 Fc 受体的细胞,而不是表达抗原的细胞。在一些实施方案中,本披露改造的 Fc 区表现出降低的对 Fc 受体的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在一些实施方案中,改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比,对 Fc 受体的结合亲和力下降 50%、80%、90%或 95%以上。在一些实施方案中,所述的 Fc 受体是 Fc γ 受体。在一些实施方案中,所述 Fc 受体是人 Fc γ 受体,例如 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIa。在一些实施方案中,改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比,对补体,如 C1q 的结合亲和力也降低。在一些实施方案中,改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比,对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合亲和力不降低。在一些实施例中,改造的 Fc 区具有降低的效应子功能,所述降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个:降低的补体依赖性细胞毒性 (CDC)、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、降低的抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP)、减少的细胞因子分泌、减少的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、减少的与 NK 细胞的结合、减少的与巨噬细胞的结合、减少的与单核细胞的结合、减少的与多形核细胞的结合、减少的直接信号传导诱导性细胞凋亡、降低的树突细胞成熟或减少的 T 细胞引发。对于 IgG1 Fc 区,在 238、265、269、270、297、327 和 329 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。在一些实施方案中,所述 Fc 区是人 IgG1 Fc 区,并且在 234 和 235 位置的氨基酸残基为 A,编号依据为 EU 索引。对于 IgG4 Fc 区,在 228 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。

抗原结合分子可包含与 Fc 区的两个亚基融合的不同抗原结合域,因此可能导致不期望的同源二聚化。为了提高产率和纯度,可以在本披露的抗原结合分子的 Fc 区中引入促进异源二聚化的修饰将是有利的。在一些实施方式中,本披露的 Fc 区包含根据杵臼 (knob-into-hole, KIH) 技术的改造,该方法涉及在第一亚基的界面处引入凸起结构 (knob) 以及在第二亚基的界面处引入孔结构 (hole); 或者在第一亚基的界面处引入凸起结构 (hole) 以及在第二亚基的界面处引入孔结构 (knob)。使得所述凸起结构可以定位在孔结构中,促进异源二聚体的形成并抑制同源二聚体的产生。凸起结构是通过用较大侧链 (例如酪氨酸或色氨酸) 取代来自第一亚基的界面的小氨基酸侧链而构建的。而孔结构是通过用较小的氨基酸侧链 (例如丙氨酸或苏氨酸) 取代大氨基酸侧链而在第二亚基的界面中创建的。凸

起结构和孔结构通过改变编码多肽的核酸来制备，示例性地，可选的氨基酸取代如下表 2 所示：

表 2. KIH 突变组合

第一亚基	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A
第二亚基	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S

除了杵臼技术外，用于修饰多特异性抗体的重链的 CH3 结构域以实现异源二聚化的其他技术也是本领域中已知的，例如 WO96/27011、WO98/050431、EP1870459、WO2007/110205、WO 007/147901、WO2009/089004、WO2010/129304、WO2011/90754、WO2011/143545、WO2012/058768、WO2013/157954 和 WO 013/096291。

Fc 区的 C 末端可以是以氨基酸残基 PGK 结束的完整 C 末端；也可以是缩短的 C 末端，例如在所述缩短的 C 末端中已经去除了一个或两个 C 末端氨基酸残基。在一个优选的方面中，重链的 C 末端是以 PG 结束的缩短的 C 末端。因此，在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。

重组方法

抗原结合分子或多肽可以使用重组方法来产生。对于这些方法，提供编码多肽或抗原结合分子的一个或更多个分离的核酸。

在一个实施方案中，本披露提供了编码如前所述的多肽或抗原结合分子的分离的核酸。此类核酸可以给自独立的编码前述的任一多肽链。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的一种或多种载体（例如表达载体）。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个实施方案中，提供制备多肽或抗原结合分子的方法，其中所述方法包括，在适合表达的条件下，培养包含编码所述多肽或融合蛋白的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述蛋白。

为了重组产生多肽或抗原结合分子，将编码蛋白的核酸分离并插入一个或更多个载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序，或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

用于克隆或表达编码多肽或抗原结合蛋白的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，可在细菌中产生，特别是当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。在表达后，可以在可溶级分中从细菌细胞糊状物分离，并且可进一步

纯化。

除了原核生物以外，真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是用于编码抗原结合分子的载体的合适的克隆或表达宿主，包括真菌和酵母菌株。适于表达抗原结合分子的合适的宿主细胞也可源自多细胞生物体（无脊椎动物和脊椎动物）；无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株，其可与昆虫细胞联合使用，特别是用于草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞的转染；还可利用植物细胞培养物作为宿主，例如 US5959177、US 6040498、US6420548、US 7125978 和 US6417429；也可将脊椎动物细胞用作宿主，例如适应于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系。适宜的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是经 SV40 转化的猴肾 CV1 系（COS-7）；人胚肾系（293 或 293T 细胞）；幼仓鼠肾细胞（BHK）；小鼠塞托利（sertoli）细胞（TM4 细胞）；猴肾细胞（CV1）；非洲绿猴肾细胞（VERO-76）；人宫颈癌细胞（HELA）；犬肾细胞（MDCK）；水牛鼠（buffalo rat）肝细胞（BRL3A）；人肺细胞（W138）；人肝细胞（Hep G2）；小鼠乳房肿瘤（MMT 060562）；TRI 细胞；MRC 5 细胞；和 FS4 细胞。其它适宜的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，包括 DHFR-CHO 细胞；以及骨髓瘤细胞系，如 Y0、NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如 Yazaki, P. 和 Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol.248, Lo, B.K.C. (编), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 第 255-268 页。

测定

本文提供的多肽或抗原结合分子可以通过本领域已知的多种测定法对其物理/化学特征和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。在一个方面中，例如通过已知方法如 ELISA、蛋白印迹法等，测试本披露的多肽或抗原结合分子的活性。

治疗方法与施用途径

本文提供的任何抗原结合分子可用于治疗方法。在又一个方面，本披露提供抗原结合分子在药物的制造或制备中的用途。在一些实施方案中，在一个此类实施方案中，所述用途进一步包括向受试者施用有效量的至少一种另外的治疗剂（例如一种、两种、三种、四种、五种或六种另外的治疗剂）。根据任意以上实施方案的“受试者”可以是人。

在又一个的方面，提供包含所述抗原结合分子的药物组合物，例如，其用于以上任何制药用途或治疗方法。在一个实施方案中，药物组合物包含本文提供的任何抗原结合分子和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中，药物组合物还包含至少一种另外的治疗剂。

本披露的抗原结合分子可单独使用或与其他试剂联合用于治疗。例如，本披露的抗体可与至少一种另外的治疗剂共同施用。

本披露的抗原结合分子（和任何另外的治疗剂）可通过任何合适的手段施用，

包括肠胃外、肺内和鼻内，并且如果需要局部治疗，则病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何适当的途径，例如，通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分取决于施用是短期的还是长期的。本文考虑多种给药时间方案，包括但不限于，单次或在多个时间点多次施用，推注施用和脉冲输注。

本披露的抗原结合分子将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的起因、试剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及医学从业者已知的其他因素。多肽或融合蛋白可以与或不与目前用于预防或治疗所述病症的一种或更多种试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于药物组合中存在的量、病症或治疗的类型以及其它因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用路径使用，或以本文所述剂量的约 1 至 99% 使用，或以其它剂量使用，并通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

为了预防或治疗疾病，本披露的抗原结合分子（当单独使用或与一种或更多种其他另外的治疗剂组合使用时）的适当的剂量将取决于待治疗的疾病的类型，治疗分子的类型，疾病的严重性和病程，是为预防还是治疗目的施用，之前的治疗，患者的临床病史和对治疗分子的响应，和主治医师的判断。治疗分子恰当地以一次或经过一系列治疗施用于患者。

制品

在本披露的另一方面中，提供一种制品，所述制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料。该制品包含容器和在容器上或与容器联合的标签或包装插页（package insert）。合适的容器包括，例如，瓶子、管形瓶、注射器、IV 溶液袋等。容器可以自各种材料诸如玻璃或塑料形成。容器装有单独或与另一种组合物组合有效治疗，预防和/或诊断疾患的组合物，并且可具有无菌的存取口（例如，容器可以是具有由皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或管形瓶）。组合物中的至少一种活性试剂是本披露的抗原结合分子。标签或包装插页指示使用该组合物是来治疗选择的病况。此外，制品可以包含：(a) 其中装有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本披露的抗原结合分子；和 (b) 其中装有组合物的第二容器，其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他方面的治疗剂。本披露的该实施方案中的制品可进一步包含包装插页，所述包装插页指示所述组合物可以用于治疗特定病况。备选地，或另外地，制品可进一步包含第二（或第三）容器，所述第二（或第三）容器包含药学上可接受的缓冲液。从商业和用户立场，它可进一步包括所需的其它材料，包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

尽管实施例中所用抗体靶向特定的抗原，但是技术人员在本披露的教导下，能够理解技术效果的实现不依赖于特定的 CDR 序列，也不依赖于特定的抗原序列，而是受益于 Titin T 链/Obsecurin-O 链、或 Titin T 链/Obsecurin-样-O 链对 CH1/CL 的

替代，以改善重链/轻链之间的错配。

实施例与测试例

以下结合实施例和测试例进一步描述本披露，但这些实施例和测试例并非限制着本披露的范围。本披露实施例和测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1、抗体或多肽蛋白的制备方法

设计引物 PCR 搭建基因片段（例如，抗体 VH/VK 基因片段），再与表达载体（例如 pHr（带信号肽及恒定区基因（例如 CH1-Fc/CL）片段））进行同源重组，构建表达载体（例如 VH-CH1-Fc-pHr/VK-CL-pHr），然后将构建的表达载体导入到原核生物或真核生物中表达，最后对产物进行纯化，从而获得所需的抗体或多肽蛋白。非限制性地，抗体恒定区可选自人 κ 、 λ 链轻链恒定区，以及选自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区。非限制性实施例，还包括对人抗体恒定区进行优化设计，例如对重链恒定区恒定区的 L234A/L235A 或 L234F/L235E 等位点突变等。示例性的，抗体轻/重链恒定区序列如下：

> IgG1 重链恒定区（简称 hIgG1）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1);

备注：序列中，单下划线部分为 CH1，点划线部分为 CH2，斜体字部分为 CH3。

> knob-IgG1 重链恒定区（简称 knob-IgG1）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 2);

备注：序列中，单下划线部分为 CH1，点划线部分为 CH2，斜体字部分为 CH3。

> hole-IgG1 重链恒定区（简称 hole-IgG1）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3);

备注:序列中,单下划线部分为 CH1,点划线部分为 CH2,斜体字部分为 CH3。

> kappa 轻链恒定区 (简称 kappa 或 κ)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO: 4)。

> lambda 轻链恒定区 (简称 lambda 或 λ)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
S (SEQ ID NO: 5)。

> hole-IgG1 重链恒定区的 Fc 部分氨基酸序列:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 177);

> knob-IgG1 重链恒定区的 Fc 部分氨基酸序列:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSMH
EALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 178);

> IgG1 重链恒定区的 CH1 部分氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
(S (SEQ ID NO: 179);

本披露实施例或测试例中提及的针对 B7H3、CD3 等抗原的抗体的轻链和重链可变区的氨基酸序列如下:

> F0 抗体 VH 氨基酸序列:

QVQLVQSGGGVVPQGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAV
ISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYA
SFDYWGQGalVTVSS (SEQ ID NO: 6);

> F0 抗体 VL 氨基酸序列

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY

NTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCAIHVDRDIWVFGGT
KLTVL (SEQ ID NO: 7);

>N0 抗体 VH 氨基酸序列

DVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTSSLSWMSWLRQAPGKGLEWVA
NINQDGSEKNYVDSVKGRFTISRDNQNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGLWT
FDSWGQGTLLTVSP (SEQ ID NO: 8);

>N0 抗体 VL 氨基酸序列

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQNINRFLAWYQQRPGQAPRLLIYAA
SSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDFAMYHCQQYGSFPRTFGQGMVDI
K (SEQ ID NO: 9);

>S0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYI
SSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDVAVYYCAAHYFGSSG
PFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 10);

>S0 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTR
TLAEGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLPEDFATYYCQHHYGTPTFGSGTKLEIK
(SEQ ID NO: 11);

>V0 抗体 VH 氨基酸序列

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYSFTSYTIHWVKQRPQGLEWIG
YINPNSRNTDYNQKFKDETTLTADRSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARYSGSTP
YWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 12);

>V0 抗体 VL 氨基酸序列

QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKPGSSPKPWIYATSN
LASGVPARFSVSVSGTSHSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
(SEQ ID NO: 13);

>J0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMHWVRQAPGKGLEWVG
HIKSKTDAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAREIY
YYAFDSWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 14);

>J0 抗体 VL 氨基酸序列

SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDN
ERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRQAGDEADYYCQAADWVDFYVFGGGLTKL
VL (SEQ ID NO: 15);

>H0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYMAWVRQAPGKGLEWVT
SISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCASQTLRES
FDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 16);

>H0 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTS
NLEVGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 17);

>R0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLTNSNVNWIRQAPGKGLEWVGLI
WSNGD TDYNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYGYFD
YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 18);

>R0 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCLASEGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGAN
SLQTGVPSRFSGSGSATDYTLTISSLQPEDFATYYCQQSYKFPNTFGQGTKVEVK
(SEQ ID NO: 19);

>Bmab (简称 B0) 抗体 VH 氨基酸序列

QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNAINWVRQAPGQGLEWM
GGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDTAVYYCARSDDL
LFPHHALSPWGRGTMVT VSS (SEQ ID NO: 20);

>Bmab (简称 B0) 抗体 VL 氨基酸序列

SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKN
NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELT
VL (SEQ ID NO: 21);

>Umab (简称 U0) 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGI
MSPVDS DIRYSPSFQGGQVTMSVDKSITTAYLQWNSLKASDTAMY YCARRRPGQ
GYFDFWGGQTLVT VSS (SEQ ID NO: 22);

>Umab (简称 U0) 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPYTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 23);

>Dmab (简称 D0) 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTV
IMSWFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 24);

>Dmab (简称 D0) 抗体 VL 氨基酸序列

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAV FYCQQY GSSPRTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 25);

>Tmab (简称 I0) 抗体 VH 氨基酸序列

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHW

GDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATS
YYFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 26);

>Tmab (简称 I0) 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPSSL SASVGDRTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYS
RFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 27);

>C0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYHMNWVRQAPGQRLEWM
GDINPDIGGTSYNQNFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWDFDS
FANWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 28);

>C0 抗体 VL 氨基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVSIIGTNLIHWYQQKPGQPPKLLIY
HASNLETGVPDRFSGSGSGTDFTLTSSLQAEDVAVYYCLQSRKIPYTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO: 29);

>A0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA
RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG
NFGNEYISYWAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 105);

>A0 抗体 VL 氨基酸序列

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG
GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGT
KLTVL (SEQ ID NO: 106);

上述抗体 F0、N0、S0、V0、J0、H0、R0、B0、U0、D0、I0、C0、A0 抗体的重链恒定区序列为 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 1), N0、S0、H0、R0、U0、I0、C0 抗体轻链恒定区序列为 kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 4); F0、V0、J0、B0、D0、A0 抗体轻链恒定区序列为 lambda 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 5)。

另外, hB7H3 抗原蛋白的序列如下:

LEVQVPEDPVVALVGTATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFA
EGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGGQVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRS
PTGAVEVQVPEDPVVALVGTATLRCFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSF
TEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAV
SLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGGQVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSGSVTITGQP
MTDYKDDDDKHHHHHH (SEQ ID NO: 111);

hCD3 抗原蛋白为 hCD3 抗原的 δ 亚基和 ϵ 亚基组成的异源二聚体, 其中, hCD3 抗原的 δ 亚基序列:

FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCN
GTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVASAENAQCEKELQALEKENAQL
WELQALEKELAQDYKDDDDK (SEQ ID NO: 112);

hCD3 抗原的 ϵ 亚基序列:

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDK
NIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD
AKNAQCKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQH HHHHH (SEQ ID NO:
113)。

实施例 2、抗体 CH1/CL 结构域的替换

分别用天然 Titin/Obseurin 复合物、Titin/Obseurin-样 O 复合物和 IL6Ra/IL6Rb 复合物中具备天然的分子间相互作用的 Ig-样结构域, 来替换抗体的 CH1/CL 结构域, 获得 CH1/CL 结构域被改造的抗体。

其中, IL6Ra/IL6Rb 复合物中, 用于替换抗体 CH1 或 CL 的 IL6Ra 蛋白中的 Ig-样结构域为 IL6Ra.0 链, 用于替换抗体 CL 或 CH1 的 IL6Rb 蛋白中的 Ig-样结构域为 IL6Rb.0 链; Titin/Obseurin 复合物中, 用于替换抗体 CH1 或 CL 的 Titin 蛋白中的 Ig-样结构域 (Titin Ig-样 152 结构域) 为 T.0 链, 用于替换抗体 CL 或 CH1 的 Obseurin 蛋白中的 Ig-样结构域 (Obseurin Ig-样-1 结构域) 为 O.0 链; Titin/Obseurin-样 O 复合物中, 用于替换抗体 CH1 或 CL 的 Obseurin-样蛋白中的 Ig-样结构域 (Obseurin-样-Ig-样-1 结构域) 为 OL.0 链, 用于替换抗体 CL 或 CH1 的 Titin 蛋白中的 Ig-样结构域 (Titin Ig-样 152 结构域) 为 T.0 链。其中:

>IL6Ra.0 链序列为:

GILQPDPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERS
KTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGT
PW (SEQ ID NO: 30);

> IL6Rb.0 链序列为:

FDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDas
TWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGIT
(SEQ ID NO: 31);

>T.0 链序列为:

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQRFH
ENTDDLTTLIIMDVQKQDGGlyTLsLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 32);

> O.0 链序列为:

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFR
LAQDGDLYRLTILDALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 33);

>OL.0 链序列为:

QGSPPCFLRFPRPVRVVS GAEAE LKCVVLGEP PPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGEAYAAA AVTVLEPP (SEQ ID
NO: 34);

构建多种 CH1/CL 被替换的抗体，检测抗体的纯度和与其相应抗原的结合活性（检测方法参见本披露测试例 2 和 4）。实验结果见下表 3，实验结果表明，F0、V0、S0、N0、J0、H0、R0、和 C0 等结合不同抗原的抗体，其 CH1/CL 同时被 T.0 链/O.0 链或 T.0 链/OL.0 链替换后，抗体仍保持良好的结合活性，且抗体纯度高。

表 3. 抗体的纯度和与抗原结合实验结果

抗体名称		CH1/CL 及替换其的肽		抗体纯度 SEC (%)	抗原结合实验 EC50 (nM)
		CH1	CL		
F0 系列	F0	CH1	CL	98	1.29
	F1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	47	71.6
	F2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	59.28
	F3	T.0	O.0	100	2.83
	F4	T.0	OL.0	100	2.17
V0 系列	V0	CH1	CL	86	1.8
	V1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	38	38.4
	V2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	-
	V3	T.0	O.0	99	3.6
	V4	T.0	OL.0	97	2.9
	V5	O.0	T.0	98	3.2
	V6	OL.0	T.0	97	4.7
S0 系列	S0	CH1	CL	97	1.01
	S1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	NA	-
	S2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	-
	S3	T.0	OL.0	83	3.5
	S4	OL.0	T.0	90	1.96
N0 系列	N0	CH1	CL	99	0.82
	N1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	100	1229
	N2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	766.5
	N3	T.0	O.0	90	6.45
	N4	T.0	OL.0	83	5.93
	N5	O.0	T.0	90	5.24
J0 系列	J0	CH1	CL	95	0.08
	J1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	NA	-
	J2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	179
	J3	OL.0	T.0	93	0.25
H0 系列	H0	CH1	CL	NA	1.74
	H1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	19.35

	H2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	80	24.38
	H3	T.0	O.0	95	2.753
	H4	T.0	OL.0	95	2.702
R0 系列	R0	CH1	CL	NA	1.75
	R1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	24.45
	R2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	60	18.4
	R3	O.0	T.0	98	1.576
	R4	OL.0	T.0	98	1.667
	R5	T.0	O.0	98	1.589
	R6	T.0	OL.0	97	2.016
C0 系列	C0	CH1	CL	96	5.81
	C1	O.0	T.0	95	17.7
	C2	OL.0	T.0	99	16.48

备注：例如，F1 表示 F0 抗体的重链 CH1 被 IL6Rb.0 链（SEQ ID NO: 31）替换，轻链 CL 被 IL6Ra.0 链（SEQ ID NO: 30）替换，其它部分保持与 F0 相同，而获得的抗体。其它依此类推。表中“-”表示未检测，SEC 为尺寸排阻色谱法检测抗体的纯度结果（NA 表示因表达过低而未检测）。

实施例 3、CH1/CL 结构域改造抗体的优化设计

一、对 Titin Ig-样 152 结构域（T.0 链）、Obscurin Ig-样 1 结构域（O.0 链）、Obscurin-样 Ig-样 1 结构域（OL.0 链）的个别氨基酸残基进行突变。

示例性地，首先，通过对 T.0 链、O.0 链以及 OL.0 链上的氨基酸残基进行突变，增加链间二硫键；其次，还对结构域中的其它个别氨基酸进行突变，例如对 Obscurin Ig-样 1 结构域的第 7、62、11 位进行氨基酸突变；在 Titin Ig-样 152 结构域 N 端增加 5 个野生型 Titin 蛋白中紧邻 Titin Ig-样 152 结构域 N 端的 5 个氨基酸“KAGIR（SEQ ID NO: 180）”；在 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端增加 5 个野生型 Obscurin 蛋白中紧邻 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端的 5 个氨基酸“DQPQF（SEQ ID NO: 181）”。具体结构域优化设计见表 4-1 至表 4-3。

表 4-1. T.0 链氨基酸突变

Titin-T 链	
名称	突变方式
T.0	野生型（SEQ ID NO: 32）
T.1	C25S, C39T, A8C
T.2	C25S, C39T, V20C
T.3	C25S, C39T, A26C
T.4	C25S, C39T, T22C
T.5	C25S, C39T, A8C, N 端+Titin KAGIR

T.6	N 端+Titin KAGIR
-----	-----------------

备注：表中，例如 T.1 突变方式“C25S, C39T, A8C”，表示将 T.0 (SEQ ID NO: 32) 序列的第 25 位氨基酸残基由 C 突变为 S，第 39 位氨基酸残基由 C 突变为 T，且第 8 位氨基酸残基由 C 突变为 A；T.6 的突变方式“N 端+Titin_KAGIR”，表示 T.0 (SEQ ID NO: 32) 序列的 N 末端增加“KAGIR”5 个氨基酸；其它依此类推。

表 4-2. O.0 链的氨基酸突变

名称	突变方式
O.0	野生型 (SEQ ID NO: 33)
O.1	A88C
O.2	A3C
O.3	R9C
O.4	C25S, C76S, A88C
O.5	C25S, C76S, A3C
O.6	C25S, C76S, R9C
O.7	C25S, C76S, A88C, L7K, T62K
O.8	C25S, C76S, A88C, L7K, T62H
O.9	C25S, C76S, A88C, K11L, T62K
O.10	C25S, C76S, A88C, K11L, T62H
O.11	C25S, C76S, A88C, N 端+Obscurin_DQPQF
O.12	C25S, C76S, A88C, L7K, T62K, N 端+Obscurin_DQPQF
O.13	C25S, C76S, A88C, L7K, T62H, N 端+Obscurin_DQPQF
O.14	C25S, C76S, A88C, L7R, T62K, N 端+Obscurin_DQPQF
O.15	C25S, C76S, A88C, L7R, T62H, N 端+Obscurin_DQPQF
O.16	N 端+Obscurin_DQPQF

备注：表中，例如 O.1 突变方式“A88C”，表示将 O.0 (SEQ ID NO: 33) 序列的第 88 位氨基酸残基由 A 突变为 C；O.11 突变方式“C25S, C76S, A88C, N 端+Obscurin_DQPQF”，表示对 O.0 (SEQ ID NO: 33) 序列进行 C25S、C76S、A88C 氨基酸突变，并在 O.0 的 N 末端增加“DQPQF”5 个氨基酸；其它依此类推。

表 4-3. OL.0 链的氨基酸突变

Obscurin-样-O 链	
名称	突变方式
OL.0	野生型 (SEQ ID NO: 34)
OL.1	C6E, V74C
OL.2	C6E, G84C
OL.3	C6E, A86C
OL.4	C6E, C26S, C77S, V74C
OL.5	C6E, C26S, C77S, G84C
OL.6	C6E, C26S, C77S, A86C

备注：表中，例如 OL.1 突变方式“C6E, V74C”，表示将 OL.0 (SEQ ID NO: 34) 序列的第 6 位氨基酸残基由 C 突变为 E，第 74 位氨基酸残基由 V 突变为 C；其它依此类推。

34) 序列的第 6 位氨基酸残基由 C 突变为 E, 第 74 位氨基酸残基由 V 突变为 C; 其它依此类推。

氨基酸突变后的 Titin-T 链、Obscurin-O 链、Obscurin-样-O 链序列如下:

>T.1 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEQGRFH
IENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
35) ;

>T.2 (T.0 具有 C25S, C39T, V20C 的突变)

GIPPKIEALPSDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEQGRFH
IENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
36) ;

>T.3 (T.0 具有 C25S, C39T, A26C 的突变)

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEQGRFH
IENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
37) ;

>T.4 (T.0 具有 C25S, C39T, T22C 的突变)

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEQGRF
HIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
38) ;

>T.5 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变; N 端添加 KAGIR)

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSE
QGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID
NO: 39) ;

>T.6 (T.0 N 端添加 KAGIR)

KAGIRGIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSE
QGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID
NO: 127) ;

>T.1-L1 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变; N 端添加 (G₄S)₁ 连接子)

GGGGSGGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSE
EQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ
ID NO: 40) ;

>T.1-L2 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变; N 端添加 (G₄S)₂ 连接子)

GGGGSGGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGR
KIHSEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI
(SEQ ID NO: 41) ;

>O.1 (O.0 具有 A88C 突变)

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF

RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 42) ;

>O.2 (O.0 具有 A3C 突变)

SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 43) ;

>O.3 (O.0 具有 R9C 突变)

SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 44) ;

>O.4 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变)

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 45) ;

>O.5 (O.0 具有 C25S, C76S, A3C 突变)

SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 46) ;

>O.6 (O.0 具有 C25S, C76S, R9C 突变)

SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 47) ;

>O.7 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, L7K, T62K 突变)

SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 48) ;

>O.8 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, L7K, T62H 突变)

SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 49) ;

>O.9 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, K11L, T62K 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 50) ;

>O.10 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, K11L, T62H 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID

NO: 51) ;

>O.11 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变; N 端添加 DQPQF)

DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 52) ;

>O.12 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, L7K, T62K 突变; N 端添加 DQPQF)

DQPQFSGAPR~~F~~KTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 53) ;

>O.13 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, L7K, T62H 突变; N 端添加 DQPQF)

DQPQFSGAPR~~F~~KTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 54) ;

>O.14 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, L7R, T62K 突变; N 端添加 DQPQF)

DQPQFSGAPR~~F~~RTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 55) ;

>O.15 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C, L7R, T62H 突变; N 端添加 DQPQF)

DQPQFSGAPR~~F~~RTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 56) ;

>O.16 (O.0 N 端添加 DQPQF)

DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAF~~A~~AVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 128) ;

>O.4-L1 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变; N 端添加 (G₄S)₁ 连接子)

GGGGSSGAPRFLTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 57) ;

>O.4-L2 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变; N 端添加 (G₄S)₂ 连接子)

GGGGSGGGGSSGAPRFLTRPKAFVVS~~V~~GKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKD
QQPVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV
DAEA (SEQ ID NO: 58) ;

>OL.1 (OL.0 具有 C6E, V74C 突变)

QGSPEFLR~~F~~PRPVRVVS~~G~~AEAE~~L~~KCVVLGEPPP~~V~~VVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVCRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 59) ;

>OL.2 (OL.0 具有 C6E, G84C 突变)

QGSPEFLRFPRPVRVVS~~SGAE~~ELKC~~VVL~~GEPPP~~VVV~~WEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAACEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 60) ;

> OL.3 (OL.0 具有 C6E, A86C 突变)

QGSPEFLRFPRPVRVVS~~SGAE~~ELKC~~VVL~~GEPPP~~VVV~~WEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGECYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 61) ;

> OL.4 (OL.0 具有 C6E, C26S, C77S, V74C 突变)

QGSPEFLRFPRPVRVVS~~SGAE~~ELKS~~VVL~~GEPPP~~VVV~~WEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVSRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 62) ;

> OL.5 (OL.0 具有 C6E, C26S, C77S, G84C 突变)

QGSPEFLRFPRPVRVVS~~SGAE~~ELKS~~VVL~~GEPPP~~VVV~~WEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAACEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 63) ;

> OL.6 (OL.0 具有 C6E, C26S, C77S, A86C 突变)

QGSPEFLRFPRPVRVVS~~SGAE~~ELKS~~VVL~~GEPPP~~VVV~~WEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAAGECYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 64) 。

备注：上述序列中，双下滑线部分为连接子序列

利用上述 Titin-T 链、Obscurin-O 链、Obscurin-样-O 链构建 CH1/CL 被替换的抗体（具体替换见表 5），通过本披露的测试例 4 的方法，检测优化后各突变抗体与相应抗原结合的结合活性，实验结果见表 5。结果表明，改造后抗体保持良好抗原结合活性。

表 5. 抗体与抗原结合实验结果

抗体名称		替换 CH1/CL 的肽		与相应抗原结合实验 EC50 (nM)
		CH1	CL	
F0 系列	F3	T.0	O.0	2.64
	F5	T.1	O.1	1.21
	F6	T.2	O.2	2.71
	F7	T.3	O.3	3.38
	F8	T.1	O.4	3.14
	F9	T.2	O.5	3.52
	F10	T.3	O.6	3.94
	F4	T.0	OL.0	3.01
	F11	T.1	OL.1	6.15
	F12	T.2	OL.2	8.19
	F13	T.4	OL.3	6.08
	F14	T.1	OL.4	5.15
	F15	T.2	OL.5	4.44
	H0 系列	H3	T.0	O.0
H5		T.1	O.1	3.40

	H6	T.2	O.2	2.10
	H7	T.3	O.3	2.70
	H8	T.1	O.4	2.11
	H9	T.2	O.5	2.92
	H10	T.3	O.6	2.86
	H4	T.0	OL.0	3.28
	H11	T.1	OL.1	3.38
	H12	T.2	OL.2	4.34
	H13	T.4	OL.3	3.56
	H14	T.1	OL.4	2.61
	H15	T.4	OL.6	4.26
R0 系列	R5	T.0	O.0	4.13
	R7	T.1	O.1	4.89
	R8	T.2	O.2	3.84
	R9	T.3	O.3	3.95
	R10	T.1	O.4	3.20
	R11	T.2	O.5	3.30
N0 系列	R12	T.3	O.6	4.36
	N3	T.0	O.0	4.5
	N6	T.2	O.5	8.4
	N4	T.0	OL.0	4.6
	N7	T.5	OL.1	2.8
N8	T.5	OL.4	2.6	

备注：表中抗体例如“F5”表示 F0 抗体的重链 CH1 被 T.1 链 (SEQ ID NO: 35) 替换，且轻链 CL 被 O.1 链 (SEQ ID NO: 42) 替换，其它部分与 F0 相同，而获得的抗体，其它依此类推。

另外，利用上述突变或结构改造的 Titin-T 链、Obscurin-O 链，构建 CH1/CL 被替换的抗体，通过本披露的测试例 2 和测试例 4 的方法，检测其它 CH1/CL 被替换的抗体功能活性。实验结果见表 6，实验结果表明，CH1/CL 被替换后，抗体仍具有良好的抗原结合活性，抗体纯度 SEC (%) 较高。

表 6. 结构域改造抗体的纯度及结合活性的检测结果

抗体名称		替换 CH1/CL 的肽		抗体纯度 SEC (%)	与相应抗原结合实验 EC50 (nM)
		CH1	CL		
F0 系列	F16	T.5	O.4	65	2.0
	F17	T.5	O.7	72	4.8
	F18	T.1	O.8	70	3.9
	F19	T.5	O.8	68	2.2
	F20	T.1	O.9	71	1.9
	F21	T.5	O.9	68	3.4
	F22	T.1	O.10	74	2.4
	F23	T.5	O.10	73	4.1
	F24	T.1	O.12	71	2.4
	F25	T.5	O.12	66	2.6
	F26	T.1	O.13	73	2.6
	F27	T.5	O.13	71	1.2
	F28	T.1	O.14	75	2.4
F29	T.5	O.14	68	3.6	

	F30	T.1	O.15	75	3.4
	F31	T.5	O.15	69	2.4
	F32	T.1-L1	O.4-L2	72	3.69
	F33	T.1-L2	O.4-L1	69	1.92
	F34	T.1-L2	O.4-L2	73	2.38
N0 系列	N10	T.5	O.4	89	3.0
	N11	T.1	O.7	86	5.0
	N12	T.1	O.8	84	5.3
	N13	T.5	O.8	82	2.9
	N14	T.1	O.9	92	1.9
	N15	T.5	O.9	92	2.6
	N16	T.5	O.10	91	3.4
	N17	T.1	O.11	90	2.2
	N18	T.5	O.11	89	3.2
	N19	T.1	O.12	84	4.3
	N20	T.5	O.12	84	2.8
	N21	T.5	O.13	84	5.2
	N22	T.5	O.14	87	4.5
	N23	T.1	O.15	86	9.4
	N24	T.5	O.15	84	6.7
	N25	T.1-L1	O.4-L2	92	0.62
	N26	T.1-L2	O.4-L1	93	0.84
N27	T.1-L2	O.4-L2	94	0.67	
R0 系列	R10	T.1	O.4	84	0.37
	R13	T.5	O.4	76	0.4
	R14	T.5	O.7	78	0.2
	R15	T.5	O.8	82	0.3
	R16	T.5	O.9	80	0.33
	R17	T.5	O.10	77	0.4
	R18	T.5	O.11	71	0.44
	R19	T.5	O.12	78	0.36
	R20	T.5	O.13	75	0.39
	R21	T.5	O.14	77	0.37
	R22	T.5	O.15	74	0.39

备注：例如，表中抗体“F16”表示 F0 抗体的重链 CH1 被 T.5 链（SEQ ID NO：39）替换，轻链 CL 被 O.4 链（SEQ ID NO：45）替换，其它部分保持与 F0 相同，而获得的抗体，其它依此类推。

二、对 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域的其他氨基酸进行突变。

Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域具体氨基酸突变设计如表 7。

表 7. T.1 链/O.9 链的氨基酸突变设计

Titin-T 链		Obscurin-O 链	
名称	突变方式	名称	突变方式
T.1	T.1 (SEQ ID NO: 35)	O.9	O.9 (SEQ ID NO: 50)
T.7	T.1+ (M66S, T77S)	O.17	O.9+ (L11K, A12S, F13Y, V14T, T22S)

T.8	T.1+(M66K, K70R, S79T, G81R)	O.18	O.9+(G2E, V17E, N30D, T32P, Q34E, S36T, V44I, A45T, L58V, K62E, A67Q, G69S, A97G)
T.9	T.1+(P3W, S11I, I13L, T22M, N82M)	O.19	O.9+(D20L, T22M, A53L)
T.10	T.1+(S11I, M66K, S79T, G81R)	O.20	O.9+(Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L)
T.11	T.1+(G40S, R42K, H45S, Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V, E83D, F84L)	O.21	O.9+(Q42L, A45T, A67T, G69S, Q92E, D94G)
T.12	T.1+(Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V)	O.22	O.9+(A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G)
T.13	T.1+(N56S, D58E, L75V)	O.23	O.9+(A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G), N 端+ DQPQF
T.14	T.1+(N56S, D58E, M66S, T77S)		
T.15	T.1+(N56S, D58E, M66S, T77S), N 端+ KAGIR		

备注：表中，例如 T.7 表示对 T.1 (SEQ ID NO: 35) 序列进行 M66S、T77S 氨基酸突变后获得的 Titin-T 链；O.23 表示对 O.9 (SEQ ID NO: 50) 先进行 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变，然后在 N 末端添加“DQPQF”序列，而获得的 Obscurin-O 链，其它依此类推。

T.1 链和 O.9 链的突变体序列如下：

> T.7 (T.1 具有 M66S, T77S 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRGFRHI
ENTDDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 65);

> T.8 (T.1 具有 M66K, K70R, S79T, G81R 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRGFRH
IENTDDLTTLIKDVQRQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 66);

> T.9 (T.1 具有 P3W, S11I, I13L, T22M, N82M 突变)

GIWPKIECLPIDLSIDEGKVLMLVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRGFRF
HIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
67);

> T.10 (T.1 具有 S11I, M66K, S79T, G81R 突变)

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRGFRHI
ENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 68);

> T.11 (T.1 具有 G40S, R42K, H45S, Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V,

E83D, F84L 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTSGKKISSEEGGRFHI
ESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLISLGNDLGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 69);

> T.12 (T.1 具有 Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEGGRFHI
ESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 70);

> T.13 (T.1 具有 N56S, D58E, L75V 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFH
IESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 71);

> T.14 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFH
IESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 72);

> T.15 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变, N 端+ KAGIR)

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE
QGRFH IESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID
NO: 74);

> T.10-L1 (T.1 具有 S11I, M66K, S79T, G81R 突变, + (G₄S)₁ 连接序列)

GGGGSGGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE
QGRFH IENTDDLTLIHKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID
NO: 73);

> T.15-L1 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变, N 端+ KAGIR, + (G₄S)₁ 连接序列)

GGGGSKAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGR
KIHSQEQRFH IESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI
(SEQ ID NO: 75);

> T.14-L1 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变, + (G₄S)₁ 连接序列)

GGGGSGGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE
QGRFH IESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID
NO: 76);

> O.17 (O.9 具有 L11K, A12S, F13Y, V14T, T22S 突变)

SGAPRFLTRPKSYTVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLKILDALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 77);

> O.18 (O.9 具有 G2E, V17E, N30D, T32P, Q34E, S36T, V44I, A45T,
L58V, K62E, A67Q, G69S, A97G 突变)

SEAPRFLTRPLAFVVSEGKDATLSSQIVGDPPEVTWEKDQQPITAGARFRL
AQDGDVYRLEILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEG (SEQ ID NO:

78);

> O.19 (O.9 具有 D20L, T22M, A53L 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVS VGK LAMLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLLQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 79);

> O.20 (O.9 具有 Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVS VGK DATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 80);

> O.21 (O.9 具有 Q42L, A45T, A67T, G69S, Q92E, D94G 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVS VGK DATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFR
LAQDGDLYRLKILDLTLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAEA (SEQ ID
NO: 81);

> O.22 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E,
D94G 突变)

SGAPRFLTRPLSYVVS VGK DASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFR
LAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAEA (SEQ ID
NO: 82);

> O.23 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E,
D94G 突变, N 端+ DQPQF)

DQPQFSGAPRFLTRPLSYVVS VGK DASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTA
GARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAEA
(SEQ ID NO: 85);

> O.20-L1 (O.9 具有 Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L 突变; + (G4S) 1
连接序列)

GGGGSSSGAPRFLTRPLAFVVS VGK DATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVT
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 83);

> O.22-L1 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E,
D94G 突变, + (G4S) 1 连接序列)

GGGGSSSGAPRFLTRPLSYVVS VGK DASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVT
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAEA
(SEQ ID NO: 84);

> O.23-L1 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E,
D94G 突变, N 端+ DQPQF; + (G4S) 1 连接序列)

GGGGSDQQPQFSGAPRFLTRPLSYVVS VGK DASLSSQIVGNPTPQVSWEKD
QLPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLV

AEA (SEQ ID NO: 86)。

备注：上述序列中，双下滑线部分为连接子序列。

利用上述突变或结构改造的 Titin-T 链、Obscurin-O 链，构建 CH1/CL 被替换的抗体，并通过本披露的测试例 4 的方法对 CH1/CL 被替换的抗体进行抗原结合活性检测，实验结果见表 8 所示。结果显示，CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换后，抗体仍保持良好抗原结合活性。

表 8. 抗体与抗原结合实验结果

抗体		抗体 CH1/CL 及替换其的肽		与相应抗原结合实验 EC50 (nM)
		CH1	CL	
B0 系列	B0	CH1	CL	0.2
	B1	T.1	O.9	0.28
	B2	T.7	O.17	0.19
	B3	T.8	O.18	0.5
	B4	T.10	O.20	0.25
	B5	T.11	O.21	0.29
	B6	T.12	O.21	0.19
	B7	T.13	O.21	0.35
	B8	T.14	O.22	0.16
U0 系列	U0	CH1	CL	0.06
	U1	T.1	O.9	0.03
	U2	T.7	O.17	0.07
	U3	T.8	O.18	0.02
	U4	T.10	O.20	0.06
	U5	T.11	O.21	0.11
	U6	T.12	O.21	0.11
	U7	T.13	O.21	0.07
	U8	T.14	O.22	0.16
D0 系列	D0	CH1	CL	0.089
	D1	T.1	O.9	0.026
	D2	T.8	O.18	0.056
	D3	T.10	O.20	0.083
	D4	T.11	O.21	0.103
	D5	T.12	O.21	0.134
	D6	T.13	O.21	0.132
	D7	T.14	O.22	0.102
I0 系列	I0	CH1	CL	1.424
	I2	T.7	O.17	3.195
	I3	T.10	O.20	2.989
	I4	T.11	O.21	4.132
	I5	T.12	O.21	3.592
	I6	T.13	O.21	4.121
	I7	T.14	O.22	3.153

备注：表中例如抗体“B1”表示 B0 抗体的重链 CH1 被 T.1 链 (SEQ ID NO: 35) 替换，轻链 CL 被 O.9 链 (SEQ ID NO: 50) 替换，其它部分与 B0 相同，而获得的抗体，其它依此类推。

另外，通过本披露测试例 1 的方法对结构改造抗体的蛋白表达量进行检测，实验结果见表 9。结果显示，通过对 Titin-T 链/Obseurin-O 链的一些氨基酸突变，抗体的表达量获得了很大的提高。

表 9. CH1/CL 结构域改造后抗体表达量

抗体		替换 CH1/CL 的肽		抗体表达量 (mg/L)
		CH1	CL	
B0 系列	B1	T.1	O.9	9.4
	B2	T.7	O.17	25.6
	B3	T.8	O.18	13.9
	B4	T.10	O.20	21.4
D0 系列	D1	T.1	O.9	5.9
	D2	T.8	O.18	44.4
	D3	T.10	O.20	40.5
	D4	T.11	O.21	17.8
	D5	T.12	O.21	21.4
	D6	T.13	O.21	23.3
	D7	T.14	O.22	34.3
I0 系列	I1	T.1	O.9	2.1
	I2	T.7	O.17	11.0
	I3	T.10	O.20	10.4
	I4	T.11	O.21	4.0
	I5	T.12	O.21	4.6
	I6	T.13	O.21	8.2
	I7	T.14	O.22	6.9

备注：表中例如抗体“B1”表示 B0 抗体的重链 CH1 被 T.1 链（SEQ ID NO: 35）替换，轻链 CL 被 O.9 链（SEQ ID NO: 50）替换，其它部分与 B0 相同，而获得的抗体，其它依此类推。

三、新 Titin-T 链/Obseurin-O 链。

1、Titin-T 链/Obseurin-O 链的氨基酸突变设计

在 T.10/ O.20 的基础上对 Titin-T 链/Obseurin-O 链进行如下突变，具体氨基酸突变见表 10：

表 10. Titin-T 链/Obseurin-O 链的氨基酸突变设计

Titin-T 链		Obseurin-O 链	
名称	突变方式	名称	突变方式
T.16	T.10+ (L60S、I64T)	O.24	O.20+ (L11K、T32F、A48V)
T.17	T.10+ (V20C、L60S、I64T)	O.25	O.20+ (L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
T.18	T.10+ (A26C、L60S、I64T)	O.26	O.20+ (A3C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)

		O.27	O.20+ (R9C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
		O.28	O.20+ (S25C、S76C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
		O.29	O.20+ (A3C、S25C、S76C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
		O.30	O.20+ (R9C、S25C、S76C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
		O.31	O.20+ (L66C、V93C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
		O.32	O.20+ (A3C、L66C、V93C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)
		O.33	O.20+ (R9C、L66C、V93C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H)

备注：表中，例如 T.16 表示对 T.10 (SEQ ID NO: 68)进行 L60S、I64T 氨基酸残基取代而形成的 Titin-T 链，其它依此类推。

氨基酸残基取代后的 Titin-T 链/Obscurin-O 链序列如下：

>T.16 (T.10 具有 L60S 和 I64T 突变)

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHQSSEQGRFHI
ENTDDSTTLTIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 129)

> T.17 (T.10 具有 V20C、L60S 和 I64T 突变)

GIPPKIECLPIDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHQSSEQGRFHI
ENTDDSTTLTIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 130)

> T.18 (T.10 具有 A26C、L60S 和 I64T 突变)

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHQSSEQGRFHI
ENTDDSTTLTIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 131)

> O.24 (O.20 具有 L11K、T32F 和 A48V 突变)

SGAPRFLTRPKAFVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 132)

> O.25 (O.20 具有 L11K、F13S、T32F、A48V、I82H 突变)

SGAPRFLTRPKASVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 133)

> O.26 (O.20 具有 A3C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H 突变)

SGCPRFLTRPKASVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 134)

> O.27 (O.20 具有 R9C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H 突变)

SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 135)

> O.28 (O.20 具有 S25C、S76C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H 突变)

SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 136)

> O.29 (O.20 具有 A3C、S25C、S76C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H
突变)

SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 137)

> O.30 (O.20 具有 R9C、S25C、S76C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H
突变)

SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 138)

> O.31 (O.20 具有 L66C、V93C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H 突变)

SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQCDAEA (SEQ ID
NO: 139)

> O.32 (O.20 具有 A3C、L66C、V93C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H
突变)

SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQCDAEA (SEQ ID
NO: 140)

> O.33 (O.20 具有 R9C、L66C、V93C、L11K、F13S、T32F、A48V、I82H
突变)

SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
LAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQCDAEA (SEQ ID
NO: 141)

2、Titin-T 链/Obscurin-O 链构建的 DI 双特异性抗体及检测

构建抗 hNGF 和 hRANKL 的 DI 双特异性抗体：DI-2 至 DI-20，其包含如下所述的第一重链、第二重链、第一轻链和第二轻链：

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，和

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

其中，VH1 和 VL1 为 I0 的重链可变区和轻链可变区，VH2 和 VL2 为 D0 的重链可变区和轻链可变区，VH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示，VL1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示，VH2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示，VL2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示；Fc1 为包含 hole 突变的 IgG1 的 Fc 的第一亚基（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 177 所示），Fc2 为包含 knob 突变的 IgG1 的 Fc 的第二亚基（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 178 所示），CH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 179 所示；CL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；Obscurin-O 链的 N 端通过连接子 1 与 VH1 连接，Obscurin-O 链的 C 端通过键与 Fc1 连接（也即连接子 3 为键），Titin-T 链 N 端通过连接子 2 与 VL1 连接，本实施例中不同 DI 双特异性抗体中的 Obscurin-O 链/ Titin-T 链和连接子 1、连接子 2 结构见表 11。

表 11. DI 双特异性抗体中 Obscurin-O 链/ Titin-T 链和连接子对应表

双抗编号	第一重链		第一轻链	
	Obscurin-O 链	连接子 1	Titin-T 链	连接子 2
DI-2	O.20	GGGGS	T.10	GGGGS
DI-3	O.25	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-4	O.26	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-5	O.27	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-6	O.28	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-7	O.29	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-8	O.30	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-9	O.31	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-10	O.32	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-11	O.33	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-12	O.25	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-13	O.26	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-14	O.27	ASTKG	T.18	RTVAS
DI-15	O.28	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-16	O.29	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-17	O.30	ASTKG	T.18	RTVAS
DI-18	O.31	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-19	O.32	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-20	O.33	ASTKG	T.18	RTVAS

采用本披露的测试例 4 中的方法检测 DI-2 至 DI-20 双特异性抗体与其抗原的结合活性。并且对 DI-2、DI-4 至 DI-8、DI-10 至 DI-16、DI-20 进行热稳定性研究，研究方法：用 PBS 溶液将抗体的浓度稀释至 5 mg/mL，用 Unit 测定其热稳定性（上样量 9 μ L；参数设置：Start Temp 20 $^{\circ}$ C；Incubation 0s；Rate 0.3 $^{\circ}$ C/min；Plate Hold 5s；End Temp 95 $^{\circ}$ C）。实验结果见表 12 和表 13，实验结果表明，改造后的双特异性抗体对抗原的结合活性没有显著变化；并且，与 DI-2 相比，DI-4 至 DI-8、DI-10

至 DI-16、DI-20 的 T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$)、 T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)有明显的提升，双特异性抗体的热稳定性更优。

表 12. DI 双特异性抗体的结合活性检测

双抗编号	RANKL EC50(nM)	NGF EC50(nM)
DI-2	0.3832	6.633
DI-3	0.3613	5.7730
DI-4	0.3959	6.2930
DI-5	0.3290	6.1890
DI-6	0.2509	5.6720
DI-7	0.2557	6.6430
DI-8	0.3643	7.6250
DI-9	0.2944	8.4950
DI-10	0.3460	7.1660
DI-11	0.3721	10.9600
DI-12	0.4125	6.5156
DI-13	0.4440	5.5420
DI-14	0.4182	3.2610
DI-15	0.2206	5.2800
DI-16	0.1474	5.5140
DI-17	0.2329	6.7270
DI-18	0.2662	5.9080
DI-19	0.1843	5.9280
DI-20	0.3184	6.4250

表 13. DI 双特异性抗体的热稳定性实验结果

双抗编号	T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)
DI-2	55.6	48.3
DI-4	60.1	52.493
DI-5	61	51.967
DI-6	60.8	53.012
DI-7	60.34	52.003
DI-8	60.61	50.425
DI-10	60.2	52.766
DI-11	57.35	-
DI-12	59.9	51.726
DI-13	61	50.988
DI-14	61.2	52.191
DI-15	60.41	50.558
DI-16	61.5	50.691

DI-20	60.7	51.859
-------	------	--------

另外，采用含 10mM 乙酸 pH5.5、9%蔗糖的缓冲液配制 DI 双特异性抗体溶液（具体见表 14），将溶液置于 40℃恒温箱中孵育四周，第四周孵育结束后将双特异性抗体浓度浓缩至其孵育开始时浓度，观察溶液沉淀情况。实验结果见下表 14，实验结果表明，DI-2 双特异性抗体组溶液出现沉淀，DI-3 至 DI-7 相比 DI-2 具有更好的稳定性。

表 14. DI 双特异性抗体溶液沉淀情况

组别	双抗编号	开始浓度	第 4 周浓缩到浓度	溶液沉淀情况
1	DI-2	20 mg/ml	20 mg/ml	出现沉淀
2	DI-3	20 mg/ml	20 mg/ml	无沉淀
3	DI-4	60 mg/ml	60 mg/ml	无沉淀
4	DI-5	25 mg/ml	25 mg/ml	无沉淀
5	DI-6	60 mg/ml	60 mg/ml	无沉淀
6	DI-7	16 mg/ml	16 mg/ml	无沉淀

3、Titin-T 链/Obscurin-O 链构建的 PL 双特异性抗体及检测

构建抗 hPDL1 和 hCTLA4 的 PL 双特异性抗体：PL-1 至 PL-19，其包含如下所述的第一重链、第二重链、第一轻链和第二轻链：

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，和

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

其中，VH1 和 VL1 为 P0 抗体（也即 WO2020177733A1 中的 h1831K 抗体）的重链可变区和轻链可变区，VH2 和 VL2 为 L0 抗体的重链可变区和轻链可变区，VH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 156 所示，VL1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 155 所示，VH2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 169 所示，VL2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示；Fc1 为包含 knob 突变的 IgG1 的 Fc 的第一亚基（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 178 所示），Fc2 为包含 hole 突变的 IgG1 的 Fc 的第二亚基（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 177 所示），CH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 179 所示；CL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；Obscurin-O 链的 N 端通过连接子 1 与 VH1 连接，Obscurin-O 链的 C 端通过键直接与 Fc1 连接（也即连接子 3 为键），Titin-T 链 N 端通过连接子 2 与 VL1 连接，不同 PL 双特异性抗体中的 Obscurin-O 链/ Titin-T 链和连接子 1、连接子 2 结构见表 15。

表 15. PL 双特异性抗体中 Obscurin-O 链/ Titin-T 链和连接子对应表

双抗编号	第一重链	第一轻链
------	------	------

	Obscurin-O 链	连接子 1	Titin-T 链	连接子 2
PL-1	O.20	GGGGS	T.10	GGGGS
PL-2	O.25	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-3	O.26	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-4	O.27	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-5	O.28	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-6	O.29	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-7	O.30	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-8	O.31	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-9	O.32	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-10	O.33	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-11	O.25	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-12	O.26	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-13	O.27	ASTKG	T.18	RTVAS
PL-14	O.28	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-15	O.29	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-16	O.30	ASTKG	T.18	RTVAS
PL-17	O.31	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-18	O.32	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-19	O.33	ASTKG	T.18	RTVAS

抗 CTLA-4 抗体 Ipilimumab (简称 L0, 商品名 Yervoy) 的重链可变区和轻链可变区如下:

L0 的重链可变区:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVT
FISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLG
PFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 169)**

L0 的轻链可变区:

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG
AFSRATGIPDRFSGSGGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVE
IK (SEQ ID NO: 170)**

示例性地, PL-1 的四条链序列如下所示:

PL-1 第一重链氨基酸序列:

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE
WMGRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RGGSSYDYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSS
QIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRA
RNAIGEAFACLGLQVDAEADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 142)**

PL-1 第一轻链氨基酸序列:

**DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPK
LLIYAASKLESGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTF
GQGTKLEIKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGR
KIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI**
(SEQ ID NO: 143)

PL-1 第二重链氨基酸序列:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLE
WVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCA
RTGWLGPFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** (SEQ ID NO: 144)

PL-1 第二轻链氨基酸序列:

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLI
YGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHOGLSSPVTK
SFNRGEC** (SEQ ID NO: 145)

备注: 上述序列中, 其中粗体字部分为可变区, 点划线部分为 Fc 部分, 波浪线部分为 CH1, 虚下划线部分为 CL, 双下划线部分为连接子, 单下划线部分为 Obscurin-O 链/ Titin-T 链。

采用本披露的测试例 4 中的 ELISA 检测方法检测 PL 双特异性抗体的结合活性 (其中 hPDL1、hCTLA4 抗原购自: Sino biology)。另外, 使用高通量微分扫描荧光仪 (UNCHAINED, 规格型号: Unit) 对 PL 双特异性抗体热稳定性进行研究, 方法: 将 PBS (磷酸盐缓冲液) 溶液稀释好的样品 (PL 双特异性抗体浓度 1.4-3 mg/ml) 加样 9μL 至样品槽中, 参数设置: Start Temp 25°C、Incubation 180s、Rate 0.3°C/min、Plate Hold 3s、End Temp 95°C, 运行仪器, 利用 Uncle Analysis 软件分析实验结果。

实验结果见表 16 和表 17。实验结果表明, 新 Titin-T 链/Obscurin-O 链构建的的 PL 双特异性抗体对抗原仍具有良好的结合活性; 并且, 与 PL-1 相比, PL-2 至 PL-19 的 Tm1 (°C)、Tagg 266 (°C)、Tonset (°C)有明显的提升, 双特异性抗体的热稳定性更优。

表 16. PL 双特异性抗体与抗原结合实验结果

双抗编号	与 hPDL1 抗原结合 EC50(nM)	与 hCTLA4 抗原结合 EC50(nM)
------	-----------------------	------------------------

PL-1	1.6	16.5
PL-2	0.5	8.0
PL-3	0.6	7.9
PL-4	0.7	6.5
PL-5	0.7	6.7
PL-6	0.8	5.3
PL-7	0.5	7.3
PL-8	1.4	14.5
PL-9	0.6	5.5
PL-10	0.6	6.9
PL-11	0.6	5.6
PL-12	0.5	8.0
PL-13	0.5	4.4
PL-14	1.3	6.0
PL-15	1.4	3.2
PL-17	1.4	6.2
PL-18	1.6	6.7
PL-19	1.6	6.5

表 17. PL 双特异性抗体热稳定性实验结果

双抗编号	Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tonset (°C)
PL-1	61.64	64.82	52.566
PL-2	66.20	66.55	58.317
PL-3	64.07	68.28	57.661
PL-4	70.71	67.29	56.246
PL-5	74.56	68.11	58.407
PL-6	70.43	70.12	61.069
PL-7	68.46	67.41	63.031
PL-8	65.00	-	-
PL-9	69.24	67.83	58.597
PL-10	69.63	68.12	56.788
PL-11	65.88	-	57.976
PL-12	65.54	67.94	-
PL-13	71.85	68.17	58.581

PL-14	74.18	69.42	58.589
PL-15	70.96	69.91	58.622
PL-16	63.48	68.98	58.702
PL-17	70.15	69.86	56.193
PL-18	-	69.43	-
PL-19	-	69.52	57.766

4、Titin-T 链/Obscurin-O 链构建的 HJ 双特异性抗体及检测

构建抗 hIL5 和 hTSLP 的 HJ 双特异性抗体：HJ-3 至 HJ11，其包含如下所述的第一重链、第二重链、第一轻链和第二轻链：

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[Fc1]；

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链]；

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]；和

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；其中

其中，VH1 和 VL1 为 H0 抗体的重链可变区和轻链可变区，VH2 和 VL2 为 J1 抗体的重链可变区和轻链可变区，VH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示，VL1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，VH2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示，VL2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172 所示；Fc1 为包含 knob 突变的 IgG1 的 Fc 的第一亚基（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 178 所示），Fc2 为包含 hole 突变的 IgG1 的 Fc 的第二亚基（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 177 所示），CH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 179 所示；CL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；Titin-T 链的 N 端通过连接子 1 与 VH1 连接，Titin-T 链的 C 端通过键直接与 Fc1 连接（也即连接子 3 为键），Obscurin-O 链 N 端通过连接子 2 与 VL1 连接，构建的不同 HJ 双特异性抗体中的 Titin-T 链/Obscurin-O 链和连接子 1、连接子 2 的结构见表 18。

表 18. HJ 双特异性抗体中 Obscurin-O 链/ Titin-T 链和连接子对应表

双抗编号	第一重链		第一轻链	
	Titin-T 链	连接子 1	Obscurin-O 链	连接子 2
HJ-3	T.10	GGGGS	O.20	GGGGS
HJ-5	T.16	GGGGS	O.25	GGGGS
HJ-6	T.16	GGGGS	O.27	GGGGS
HJ-7	T.16	GGGGS	O.28	GGGGS
HJ-8	T.16	ASTKG	O.25	RTVAS
HJ-9	T.16	ASTKG	O.27	RTVAS
HJ-10	T.16	ASTKG	O.28	RTVAS
HJ-11	T.16	ASTKG	O.29	RTVAS

采用本披露的测试例 4 中的方法检测 HJ-3、HJ-5 至 HJ-11 双特异性抗体与 hIL5 和 hTSLP 抗原结合活性。并且对双特异性抗体的热稳定性进行研究,方法:用 10mM 乙酸 pH5.5、9%蔗糖的缓冲液配制 HJ 双特异性抗体稀释溶液,然后通过超滤浓缩的方法将双特异性抗体浓缩,获得不同浓度的 HJ 双特异性抗体溶液(HJ 双特异性抗体的浓度见表 19-2),然后将浓缩溶液置于 40℃恒温箱中孵育,第 0 天(也即 40℃孵育开始前, D0),第 7 天(40℃孵育第 7 天, D7),第 14 天(40℃孵育第 14 天, D14),第 21 天(40℃孵育第 21 天, D21)和第 28 天(40℃孵育第 28 天, D28)检测样品的 SEC 纯度,40℃孵育 28 天后,马上取样检测样品非还原 CE-SDS 纯度。

实验结果见下表 19-1 和 19-2,实验结果表明,本披露构建的 HJ 双特异性抗体对抗原的结合活性没有显著变化;并且,与 HJ-3 相比,HJ-5 至 HJ-11 双特异性抗体的热稳定性更优。

表 19-1. HJ 双特异性抗体的结合活性检测

双抗编号	hIL5	hTSLP	双抗编号	hIL5	hTSLP
	EC50(nM)			EC50(nM)	
HJ-3	17.38	3.234	HJ-8	18.74	3.332
HJ-5	15.96	2.639	HJ-9	10.86	3.184
HJ-6	37.05	2.884	HJ-10	20.81	3.173
HJ-7	17.69	2.182	HJ-11	9.464	3.005

表 19-2. HJ 双特异性抗体加速稳定性实验结果

双抗编号	D0 浓度 (mg/mL)	D0 SEC 纯度 (%)	D28 SEC 纯度 (%)	D28 Δ SEC 纯度 (%)	D28 非还原 CE-SDS 纯度 (%)
HJ-3	50	98	84	14	67
HJ-5	60.8	98.09	93.86	4.23	82.93
HJ-6	54	98.14	89.68	8.46	80.76
HJ-7	56.8	97.7	92.72	4.98	85.47
HJ-8	62.6	93.39	84.28	9.11	73.03
HJ-9	53.5	90.01	85.93	4.08	80.32
HJ-10	69.8	90.9	88.31	2.59	80.4
HJ-11	50.4	92.55	90.89	1.66	82.96

备注: $D28\Delta SEC$ 纯度 (%) = D0 SEC 纯度 (%) - D28 SEC 纯度 (%)

实施例 4、CH1/CL 结构域改造后抗体的半衰期

为了评价抗体的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obsecurin-O 链或 Titin-T 链/Obsecurin-样-O 链替换后,抗体在动物体内的稳定性是否受影响,我们检测了 CH1/CL 被替换前后抗体在大鼠体内的半衰期。示例性地,我们分别检测了 F0 抗体的 CH1/CL 被

T.1/O.9 替换后的抗体 F20, 以及 C0 抗体的 CH1/CL 被 T.1/O.9 替换后的抗体 C3 在大鼠体内的半衰期。具体方法如下:

将 3mpk 抗体以静脉注射的方式对大鼠给药, 并分别于给药后 5min, 8h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d, 10d, 14 d, 21 d, 28d 采集全血 0.3 mL, 不加抗凝, 取血后在 4°C 放置 30min, 1000g 离心 15 min, 取上清 (血清) 置于 EP 管中, 于 -80°C 保存。各个时间点抗体药物浓度的检测方法采取夹心 ELISA, 即将相应抗原包被在 ELISA 板, 4 度孵育过夜后, 用洗涤液清洗, 随后加入封闭缓冲液室温孵育 1-3 小时, 用洗涤液清洗, 然后加入 100 μ L 标准品或待测血清样品于 37°C 孵育 3 小时, 用洗涤液清洗, 加入二抗 Anti-Human IgG FC (HRP) mouse preadsorbed (Abcam, 货号 ab98624, 1:10000 稀释) 于 37°C 孵育 1-1.5h, 用缓冲液清洗后, 加入 TMB 室温避光孵育 10 分钟, 随后加入终止液, 读取 OD450 值。

实验结果见表 20, 结果显示, 抗体的 CH1/CL 被替换成 Titin-T 链/Obscurin-O 链后, 抗体在大鼠体内仍然保有原始抗体的半衰期, 提示 CH1/CL 被替换后的抗体和原始抗体一样, 在体内具有良好的稳定性。

表 20. CH1/CL 结构域被替换的抗体半衰期

抗体名称	大鼠体内半衰期 (3mpk) T1/2 (天)
F0	13.3 \pm 1.0
F20	12.8 \pm 0.3
C0	17.3 \pm 2.2
C3	15.4 \pm 4.1

实施例 5、双特异抗体的构建与检测

将结合第一抗原的抗体与结合第二抗原的抗体, 通过搭桥 PCR, 构建双特异性抗体。示例性地, 我们构建了多种双特异性抗体。

一、双特异抗体的构建

首先, 我们构建了 DI-1 双特异性抗体, DI-1 双特异性抗体包括: D0 抗体的一条重链 (Fc 区含 knob 修饰), D0 抗体的一条轻链, 结构改造的 I0 抗体 (CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换, Fc 区含 hole 修饰) 的一条重链和一条轻链, DI-1 双特异性抗体为 IgG 样双特异性抗体, 其结构示意图见附图 5, DI-1 的 4 条链序列如下所示:

DI-1 链 1 (DI-1-H1) 的氨基酸序列:

**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPG
TTVIMSWFDPWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ**

DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87);

备注：序列中，粗体字部分为 D0 的 VH，单下划线部分为 CH1，点划线部分为 CH2，斜体字部分为 CH3。

DI-1 链 2 (DI-1-L1) 的氨基酸序列：

EIVLTQSPGTLSLSPGERATL**SCRASQS**SVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDF**TLTISRLEPEDFAVFY**CQQY**GSSPRT**FGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE**AKVQWKVDNALQSGN**
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO: 88);

备注：序列中，粗体字部分为 D0 的 VL，单下划线部分为 D0 轻链恒定区 CL。

DI-1 链 3 (DI-1-H2) 的氨基酸序列：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHW
GDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYA
TSYYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTP
EVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTLIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDS
ATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 89);

备注：序列中，粗体字部分为 I0 的 VH，单下划线部分为 T.10，双下划线部分为连接子序列，点划线部分为 CH2，斜体字部分为 CH3；双下划线部分为连接子序列。

DI-1 链 4 (DI-1-L2) 的氨基酸序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIY
YTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGT
KLEIKGGGGSSGAPRFLTRPLAFVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPV
TAGARFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA
 (SEQ ID NO: 90);

备注：序列中，粗体字部分为 I0 的 VL，单下划线部分为 O.20，双下划线部分为连接子序列。

另外，构建了由 B0 或 B0 的结构改造抗体与 U0 或 U0 的结构改造抗体构建的 IgG 样 BU 双特异性抗体（其中，示例性的，BU5 结构示意图见附图 8），所得双特异性抗体的四条链序列如下表 21：

表 21. IgG 样 BU 双特异性抗体序列表

双抗编号	IgG 样双特异性抗体四条链序列			
	链 1	链 2	链 3	链 4
BU1	B0 的重链 (knob)	B0 的轻链	U0 的重链 (hole), 且 CH1 被 T.14-L1 替换	U0 的轻链, 且 CL 被 O.22-L1 替换
	<p>QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNA INWVRQAPGQGLEWM GGIIPMFGTAKYSQNFQ GRVAITADESTGTASME LSSLRSEDTAVYYCARSR DLLLFPHHALSPWGRG TMVTVSSASTKGPSVFPL <u>APSSKSTSGGTAALGCLV</u> <u>KDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICN</u> <u>VNHKPSNTKVDKKVEPK</u> <u>SCDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYTLPPCREEMTKN</u> <u>QVSLWCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTPPVL</u> <u>DSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 91)</p>	<p>SSELTQDP AVSVALGQ TVRVTCQ GDSLRSYY ASWYQQK PGQAPVL VIYGKNN RPSGIPDR FSGSSGN TASLTITG AQAEDA DYYCSSRD SSGNHWV FGGGTEL TVLGPQK <u>AAPSVTLF</u> <u>PPSSEELQ</u> <u>ANKATLVC</u> <u>LISDFYPGA</u> <u>VTVAWKA</u> <u>DSSPVKAG</u> <u>VETTPSK</u> <u>QSNNKYA</u> <u>ASSYLSLTP</u> <u>EQWKSHR</u> <u>SYSQVTH</u> <u>EGSTVEKT</u> <u>VAPTECS</u> (SEQ ID NO: 92)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTTY WLGWVRQMPGKGLD WIGIMSPVSDIRYSPS FQGQVTMSVDKSITTA YLQWNSLKASDTAMY YCARRRPGQGYFDWF GQGTLVTVSSGGGGSGI <u>PPKIECLPSDISIDEGKVL</u> <u>TVASAFTGEPTPEVTWS</u> <u>TGGRKIHSQEQRFHIES</u> <u>TEDLTTLIISDVQKQDGG</u> <u>LYLSLGNFEGSDSATV</u> <u>NIHIRSIDKTHCPPCPAP</u> <u>EAAGGPSVFLFPPKPKD</u> <u>TLMISRTPEVTCVVVDV</u> <u>SHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVC</u> <u>TLPPSREEMTKNQVSLSC</u> <u>AVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTPPVLDSDGS</u> <u>FFLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYT</u> <u>QKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 93)</p>	<p>DIQMTQS PSSLSASV GDRVITIT CRASQGIS SWLAWY QQKPEKA PKSLIYAA SSLQSGVP SRFSGSGS GTDFTLTI SSLQPEDF ATYYCQQ YNIYPYTF GQGTKLE IKGGGGSS <u>GAPRELTR</u> <u>PLSYVVSV</u> <u>GKDASLSS</u> <u>QIVGNPTP</u> <u>QVSWEKD</u> <u>QLPVTAGA</u> <u>RFRLAQD</u> <u>GDLYRLKI</u> <u>LDLQLSDS</u> <u>GOYVSRA</u> <u>RNAIGEAF</u> <u>ACVGLEV</u> <u>GAEA</u> (SEQ ID NO: 94)</p>
BU2	U0 的重链 (knob)	U0 的轻链	B0 的重链 (hole), 且 CH1 被 T.14-L1 替换	B0 的轻链, 且 CL 被 O.23-L1

	<p>EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWL GWVRQMPGKGLDWIGI MSPVSDIRYSPSFQGG VTMSVDKSITTAYLQWN SLKASDTAMYCARRRP GQGYFDFWGGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQ SGVPSRFS GSGSGTDF TLTISSLQP EDFATYYC QQYNIYPY TFGQGTK LEIKRTVA APSVFIAPP SDEQLKSG TASVCLL NNFYPREA KVQWKVD NALQSGNS QESVTEOD SKDSTYSL SSTLTLSKA DYEKHKV YACEVTHQ GLSSPVTK SENRGEC (SEQ ID NO: 96)</p>	<p>QVQLQQSGAEVKKPG SSVRVSCASGGTFNN NAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPMFGTAKYS QNFQGRVAITADESTG TASMELSSLRSEDTAVY YCARSRDLLLPFHAL SPWGRGTMVTVSSGG GGSGIPPKIECLPSDISD EGKVLTVASAFTGPEPTPE VTWSTGGRKIHSQEQR FHIESTEDLTLLISDVQK QDGGLYSLSLGNEFGSD SATVNIHIRSIDKTHTCP CPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSREEMTKNQV LSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 97)</p>	<p>SSELTQDP AVSVALG QTVRVTC QGDSLRS YYASWYQ QKPGQAP VLVIYGK NNRPSGIP DRFSGSSS GNTASLTI TGAQAED EADYYCS SRDSSGN HWVFGG GTELTVL GGGSDQ POFSGAPR FLTRPLSY VVSVGKD ASLSSQIV GNPTQVS WEKDQLP VTAGARFR LAQDGD YRLKILD QLSDSGQ YVSRARN AIGEAFA VGLEVGA EA (SEQ ID NO: 98)</p>
<p>B U 3</p>	<p>B0 的重链 (knob), 且 CHI 被 T.14-L1 替换</p>	<p>B0 的轻链, CL 被 O.23-L1 替换</p>	<p>U0 的重链 (hole)</p>	<p>U0 的轻链</p>

	<p>QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNA INWVRQAPGQGLEWM GGIIPMFGTAKYSQNFQ GRVAITADESTGTASME LSSLRSEDVAVYYCARSR DLLLFPHALSPWGRG TMVTVSSGGGGSGIPPKI <u>ECLPSDISIDEGKVLTVAS</u> <u>AFTGEPTPEVTWSTGGRK</u> <u>IHSOEQGRFHIEDLTT</u> <u>LIISDVQKQDGGYLSLGL</u> <u>NEFGSDSATVNIHIRSIDK</u> <u>THTCPPEAAGGPSV</u> <u>FLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFN</u> <u>WYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVYTLPPCREEMTKNQV</u> <u>LWCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPVLDS</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 99)</p>	<p>SSELTQDP AVSVALGQ TVRVTCQ GDSLRSYY ASWYQQK PGQAPVL VIYGKNN RPSGIPDR FSGSSGN TASLTITG AQAEDEA DYICSSRD SSGNHWV FGGTEL TVLGGGG SDQPFSG <u>APRFLTRPL</u> <u>SYVVSVGK</u> <u>DASLSSQI</u> <u>VGNPTPOV</u> <u>SWEKDQLP</u> <u>VTAGARFR</u> <u>LAQDGDLY</u> <u>RLKILDLQ</u> <u>LSDSGQYV</u> <u>SRARNAIG</u> <u>EAFACVGL</u> <u>EVGAEA</u> (SEQ ID NO: 100)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTTY WLGWVRQMPGKGLD WIGIMSPVDSDIRYSPS FQGQVTMSVDKSITTA YLQWNSLKASDTAMY YCARRRPGQGYDFDFW GQGTLVTVSSASTKGPS <u>VFPLAPSSKSTSGGTAAL</u> <u>GCLVKDYFPEPVTVSW</u> <u>NSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTK</u> <u>VDKKVEPKSCDKTHTCP</u> <u>PCPAPEAAGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVCTLPPSREEMTKNQV</u> <u>SLSCAVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTTTPVLDS</u> <u>DGSFFLVSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 101)</p>	<p>DIQMTQS PSSLSASV GDRVTIT CRASQGIS SWLAWY QQKPEKA PKSLIYAA SSLQSGVP SRFSGSGS GDFTLTI SSLQPEDF ATYYCQQ YNIYPYTF GQGTKLE <u>IKRTVAAP</u> <u>SVFIFPPSD</u> <u>EQLKSGTA</u> <u>SVVCLLN</u> <u>NEFYPREAK</u> <u>VOWKVDN</u> <u>ALQSGNS</u> <u>QESVTEOD</u> <u>SKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSK</u> <u>ADYEKHK</u> <u>VYACEVT</u> <u>HQGLSSPV</u> <u>TKSENRGE</u> <u>C</u> (SEQ ID NO: 96)</p>
<p>B U 4</p>	<p>U0 的重链 (knob)</p>	<p>U0 的轻链</p>	<p>B0 的重链 (hole), 且 CHI 被 T.15-L1 替换</p>	<p>B0 的轻链, 且 CL 被 O.23-L1 替 换</p>

	<p>EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWL GWVRQMPGKGLDWIGI MSPVSDIRYSPSFQGG VTMSVDKSITTAYLQWN SLKASDTAMYICARRRP GQGYFDFWGGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVV SSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGFSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQ SGVPSRFS GSGSGTDF TLTISSLQP EDFATYYC QQYNIYPY TFGQGTK LEIKRTVA APSVFIAPP SDEQLKSG TASVVCCLL NNFYPREA KVQWKVD NALQSGNS QESVTEOD SKDSTYSL SSTLTLSKA DYEKHKV YACEVTHQ GLSSPVTK SENRGEC (SEQ ID NO: 96)</p>	<p>QVQLQQSGAEVKKPG SSVRVSCKASGGTFNN NAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPMFGTAKYS QNFQGRVAITADESTG TASMELSSLRSEDVAVY YCARSRDLLLPFHAL SPWGRGTMVTVSSGG GGSKAGIRGIPPKEICLP SDISIDEGKVLTVASFT GEPTPEVTWSTGGRKIH SQEQGRFHIEDLTLTL IISDVQKQDGGYLSLSLG NEFGSDSATVNIHRSID KTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNQKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGFSFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO: 102)</p>	<p>SSELTQDP AVSVALG QTVRVTC QGDSLRS YYASWYQ QKPGQAP VLVIYGK NNRPSGIP DRFSGSSS GNTASLTI TGAQAE EADYYCS SRDSSGN HWVFGG GTELTVL GGGSDQ POFSGAPR FLTRPLSY VVSVGKD ASLSSQIV GNPTQVS WEKDQLP VTAGARFR LAQDGD YRLKILD QLSDSGQ YVSRARN AIGEFAC VGLVGA EA (SEQ ID NO: 100)</p>
<p>B U 5</p>	<p>B0 重链 (hole), 且 CH1 被 T.14-L1 替换</p>	<p>B0 轻链, 且 CL O.20-L1 被替换</p>	<p>U0 的重链 (knob)</p>	<p>U0 的轻链</p>

<p>QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNA INWVRQAPGQGLEWM GGIHPMFGTAKYSQNFQ GRVAITADESTGTASME LSSLRSEDVAVYYCARSR DLLLPFHHLSPWGRG TMVTVSSGGGGSGIPPKI <u>ECLPIDISIDEGKVLTVAS</u> <u>AFTGEPTPEVTWSTGGRK</u> <u>IHSQEQGRFHIENTDDLTT</u> <u>LIKDVQKQDGGLYTLTL</u> <u>RNEFGSDSATVNIHIRSID</u> <u>KTHTCPPCPAPEAAGGPS</u> <u>VFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <u>VTCVVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYRVVSVLTVL</u> <u>HQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVCTLPPSREEMTKNQ</u> <u>VLSCAVKGFYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNYKTPPVLDS</u> <u>DGSFFLVSKLTVDKSRWQQ</u> <u>GNVFSCSVMHEALHNHYT</u> <u>QKLSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 103)</p>	<p>SSELTQDP AVSVALGQ TVRVTCQ GDSLRSYY ASWYQQK PGQAPVL VIYGKNN RPSGIPDR FSGSSGN TASLTITG AQAEDEA DYYCSSRD SSGNHWV FGGGTEL TVLGGGG SSGAPFLT <u>RPLAFVVS</u> <u>VGKDATLS</u> <u>SOIVGNPT</u> <u>POVSWEK</u> <u>DKQPVTAG</u> <u>ARFRLAQD</u> <u>GDLYRLKI</u> <u>LDLQLSDS</u> <u>GQYVSRA</u> <u>RNAIGEAF</u> <u>ACLGLOV</u> <u>DAEA</u> (SEQ ID NO: 104)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTTY WLGWVRQMPGKGLD WIGIMSPVDSDIRYSPS FQGQVTMSVDKSITTA YLQWNSLKASDTAMY YCARRRPGQGYDFDFW GQGTLVTVSSASTKGPS <u>VFPLAPSSKSTSGGTAAL</u> <u>GCLVKDYFPEPVTVSW</u> <u>NSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVTVPPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTK</u> <u>VDKKVEPKSCDKTHTCP</u> <u>PCPAPEAAGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVYTLPPCREEMTKNQ</u> <u>VSLWCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTPPVLD</u> <u>DSDGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMHEALH</u> <u>NHYTQKLSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 95)</p>	<p>DIQMTQS PSSLSASV GDRVITIT CRASQGIS SWLAWY QOKPEKA PKSLIYAA SSLQSGVP SRFSGSGS GTDFTLTI SSLQPEDF ATYYCQQ YNIYPYTF GQGTKLE IKRTVAAP <u>SVFIFPPSD</u> <u>EQLKSGTA</u> <u>SVVCLLN</u> <u>NEYPREAK</u> <u>VOWKVDN</u> <u>ALQSGNS</u> <u>QESVTEQD</u> <u>SKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSK</u> <u>ADYEKHK</u> <u>VYACEVT</u> <u>HQGLSSPV</u> <u>TKSFNRGE</u> <u>C</u> (SEQ ID NO: 96)</p>
--	---	--	--

备注：序列中，粗体字部分为可变区序列，单下划线部分为 CH1 或 Titin-T 链，点划线部分为 CH2，斜体字部分为 CH3，双下划线部分为 CL 或 Obscurin-O 链，虚下划线部分为连接子 L1。

此外，还构建了 FA-1 双特异性抗体，FA-1 双特异性抗体是由 A0 抗体的一条重链（Fc 区进行 knob 修饰）和一条轻链，与 F0 结构改造抗体的一条重链（Fc 区进行 hole 修饰，CH1 被 T.10-L1 替换）和一条轻链（CL 被 O.20-L1 替换）构成的 IgG 样 FA-1 双特异性抗体。FA-1 的四条链序列如下表 22。

FA-1 的链 1（F0 的重链 CH1 被 T.10-L1 替换，且 Fc 区含 knob 修饰）：

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RSARLYASFDYWGGALVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFT
GEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLLIKDVQKQDGGLYTLTLRNE
FGSDSATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVLSCAV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 107)

FA-1 的链 2 (F0 的轻链 CL 被 O.20-L1 替换) :

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRM
LIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCAIHVDRDIWV
FGGGTKLTVLGGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPOVSWE
KDKQPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFAACLGL
QVDAEA (SEQ ID NO: 108)

FA-1 的链 3 (A0 重链含 knob 修饰) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLE
WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY
CVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE
MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 109)

FA-1 的链 4 (A0 的轻链) :

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR
GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR
WVFGGGTKLTVLRTVAAPSVEFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHOGL
SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 110)

备注: 上述序列中, 粗体字部分为可变区序列, 单下划线部分为 CH1 或 Titin-T 链, 点划线部分为 CH2, 斜体字部分为 CH3, 双下划线部分为 CL 或 Obscurin-O 链, 虚下划线部分为连接子 L1。

二、双特异抗体的检测

通过本披露测试例 3 方法检测 DI-1, 将 DI-1 的四条链共同转染细胞进行表达, 然后进行质谱分析, 实验结果见表 22 和附图 6A-图 6C, 质谱分析结果未检测到同型二聚体和错配分子, DI-1 正确组装。

表 22. DI-1 质谱数据

DI-1 链	链 1 (DI-1-H1)	链 2 (DI-1-L1)	链 3 (DI-1-H2)	链 4 (DI-1-L2)	DI-1-L1+DI-1-L2+ DI-1-H1+DI-1-H2	MS 结果
分子 量	49983.82	23487.38	50450.05	22567.45	146488.70	未检测到同 型二聚体和 错配分子

另外, 通过本披露测试例 3 和测试例 2 方法检测 BU5 表达。首先将 BU5 的四条链共同转染细胞表达双特异性抗体, 另外使用 B0、U0 做为对照。然后对表达产物进行纯度及质谱分析, 实验结果见表 23 及附图 9A 至图 9C, 实验结果表明, 双

特异性抗体 BU5 被成功表达，BU5 四条链成功组装成目标分子，且无错配出现。且双特异性抗体 BU5 纯度高，SEC%达 88%。

表 23. BU5 质谱分析结果

抗体名称	质谱分析
对照 B0	✓
对照 U0	✓
BU5	✓

备注：表中，“✓”表示正确配对

此外，通过本披露的测试例 2 和测试例 4 的方法检测构建的 BU1- BU4 双特异性抗体的纯度以及抗原结合活性，实验结果见表 24，实验结果表明，CH1/CL 被替换的双特异性抗体，仍保持良好的抗原结合活性，且抗体纯度高。

表 24. 抗体与抗原结合活性及纯度检测实验结果

抗体名称	抗体纯度 SEC (%)	抗原结合 EC50 (nM)	
		抗原 BAFF	抗原 P40
B0	99.05	0.2193	-
U0	99.63	-	0.08881
BU1	95.23	0.3561	0.08397
BU2	91.09	0.4693	0.05674
BU3	83.45	0.4131	0.2238
BU4	91.85	0.5057	0.04429

测试例

测试例 1、抗体的表达量测试方法

使用单克隆抗体或双特异性抗体的表达质粒转染 HEK293E 细胞，6 天后收集表达上清，高速离心去除杂质。上清用 Protein A 柱（GE Healthcare）进行纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线，再用 100mM 乙酸缓冲液（pH3.5）冲洗层析柱，用 1M Tris-HCl，pH8.0 中和。抗体的表达量由最终纯化得到的抗体量/表达体积来定量。

测试例 2、抗体的纯度检测方法

使用 SEC-HPLC 进行抗体纯度监控。检测根据仪器操作说明书进行，使用 Waters e2695 色谱仪，色谱柱为 Waters Xbridge BEH 200A SEC，流动相为 PBS（用稀盐酸调节 pH 至 6.8），进样 100 μ g 蛋白，等度洗脱，流速为 0.5mL/min。抗体纯度为主峰的峰面积占总出峰面积的百分比（SEC (%)）。

测试例 3、抗体质谱检测方法

（一）样品准备：

1. 脱糖完整分子量测定: 取所表达抗体 30 μg , 冻干后加入 10 μL 8M Gua-HCl, 70°C 水浴变性 10 min。加入 90 μL 蒸馏水, 取 30 μL 加入 0.8 μL PNG 酶 F (肽 N-糖苷酶 F), 放入 37°C 水浴中孵育 2h, 取 0.5 μg 进行脱糖完整分子量测定。

2. 脱糖还原分子量测定: 取所表达抗体 30 μg , 冻干后加入 10 μL 8 M Gua-HCl, 70°C 水浴变性 10 min。加入 90 μL 蒸馏水, 取 30 μL 加入 0.8 μL PNG 酶 F (肽 N-糖苷酶 F), 放入 37°C 水浴中孵育 2h。再加入 2 μL 0.025M DTT, 70°C 水浴中还原 10 min, 取 0.5 μg 进行脱糖还原分子量测定。

(二) 色谱-质谱条件:

色谱条件:

色谱柱: Poroshell 300SB-C8 5 μm 2.1*75mm

流动相: A: 0.1% HCOOH/H₂O B: 0.1% HCOOH/CAN

柱温: 75°C

梯度: 见表 25。

表 25. 色谱梯度表

时间 (分)	0	5	8	12	12.1	15
B%	5	5	95	95	5	5

质谱条件:

质谱: Agilent 6530 Q-TOF LC-MS

电离模式 ESI

采集模式: 1 GHz (质量范围 500–5000 m/z)

干燥气温度: 325°C

干燥气流量: 10 L/min

雾化器: 40psi

鞘气温度: 350°C

鞘气流速: 12L/min

喷雾电压: 500V

毛细管电压: 3, 500 V

裂解电压: 200 V

Skimmer 电压: 65V

Rf 电压: 7500V

将待测抗体进行质谱分析, 实验结果表明 CH1/CL 被 Titin-T/Obseurin-O 替换后, 抗体保持正确组装。

测试例 4、抗体结合活性检测方法

对膜蛋白靶点的抗体, 其与抗原结合活性检测可采用 FACS 的方法。例如,

C0、N0、F0、V0、S0，及其 CH1/CL 结构改造抗体，可通过 FACS 的方法进行检测。在 96 孔 U 型底板 (corning, 3795) 中加入 FACS 缓冲液 (98% PBS, 2% FBS) 重悬的细胞 (2×10^6 细胞/ml, 90 μ l)，并加入 10 μ l 梯度稀释的抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育 1h，FACS 缓冲液清洗 2 次，随后每孔加入 Alexa Fluor 488 羊抗-人 IgG (H+L) (invitrogen, Cat# 2015982, 1:1000 稀释)，4 $^{\circ}$ C 孵育一小时，清洗 2 次后用 FACS 缓冲液重悬细胞，最后用 FACS CantoII (BD) 读取荧光信号值。最后用 FlowJo 7.6 和 Graphpad Prism 5 对数据进行处理分析。

对于靶点为可溶性蛋白的抗体，用 ELISA 的方法检测抗体与可溶性蛋白的结合活性，例如，D0、I0、B0、U0、H0、R0、J0，及其 CH1/CL 结构改造抗体，可通过 ELISA 的方法检测。方法如下：用 pH7.4 的 PBS (源培生物, B320) 缓冲液将蛋白稀释至 1 μ g/mL，以 100 μ L/孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, 9018) 中，4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 300 μ L 用 PBS 稀释的 5% 脱脂牛奶 (BD, 232100) 进行封闭，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液 (pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20) 洗板 3 次后，每孔加入 100 μ L 梯度稀释的抗体溶液，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μ L 鼠抗-人 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 209-035-088, 1:8000 稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 100 μ L TMB 显色底物 (KPL, 5120-0077)，室温孵育 10-15 min，每孔加入 50 μ L 1 M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用软件拟合出抗体与抗原的结合曲线，计算出 EC50 值。

本测试例中抗体相应抗原如下：D0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hRANKL (购自 Sino biological, 11682-HNCH)；I0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hNGF (购自 Sino biological, 11050-HNAC)；B0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hBAFF (购自 Sino biological, 10056-HNCH)；U0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hP40 (购自 Sino biological, 10052-H08H)；H0、R0，及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hIL-5 (购自 R&D systems, 205-IL-025/CF)；J0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hTSLP (购自 Sino biological, 16135-H08H)；C0、N0，及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 CEA (过表达 CEA 细胞 MKN45 (购自南京科佰, CBP60488))；F0、V0、S0，及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 B7H3 (过表达 B7H3 重组细胞系 CT26-B7H3 (CT26 来源于中科院细胞库, B7H3 序列参见 ID: XP_005254757.1))。

测试例 5、CH1/CL 结构改造抗体错配实验检测

一、不同抗体轻/重链交叉错配分子的表达检测方法

本实验通过分析不同轻/重链抗体配对表达来验证 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obseurin-O 链或 Titin-T 链/Obseurin-样-O 链替换后能有效减少重/轻链错配的发生。具体地，在转染细胞表达抗体时，将 D0 和 I0 的重/轻链分别交换 (即 I/D-1 (D0

重链+I0 轻链); I/D-2 (I0 重链+D0 轻链) 来检测野生型 CH1 和 CL 是否会形成交叉错配分子; 同时, 将 D0 和 I0 的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换后的结构改造的抗体 D3 (D0 的重链 CH1 被 T.10 替换, 轻链 CL 被 O.20 替换)、I3 (I0 的重链 CH1 被 T.10 替换, 轻链 CL 被 O.20 替换) 的重轻链分别交换, 构建错配分子: I/D-3 (D0 重链+I3 轻链)、I/D-4 (D3 重链+I0 轻链)、I/D-5 (I0 重链+I3 轻链)、I/D-6 (I3 重链+D0 轻链), 构建的抗体结构示意图见附图 7。

通过测试例 1 方法检测抗体表达量, 通过测试例 3 方法对表达产物进行质谱分析, 检测是否会形成错配分子。实验结果见表 26, 实验结果表明, D0 重链+I0 轻链, 或 I0 重链+D0 轻链, 共同表达时, 均可形成完整 IgG 分子 (150kDa), 表达量很高, 分别达到 74.4mg/L 和 73.8mg/L, 且 LC-MS 结果证明所得蛋白为错配后的 IgG 分子, 这说明如果不对 CH1-CL 进行改造或替换, 双特异性抗体的四条不同重轻链共同表达, 将会形成大量轻/重链错配分子。而经 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换 CH1/CL 后, I/D-3 (D0 重链+I3 轻链)、I/D-4 (D3 重链+I0 轻链)、I/D-5 (I0 重链+I3 轻链)、I/D-6 (I3 重链+D0 轻链) 四种形式交叉错配表达均无目的分子产生 (150kDa), 除 D3 重链+I0 轻链组合形成有少量两条重链的错误分子外 (分子量为 100kDa), 其他三种形式无错配分子产生, 这说明改造后的非同源配对不会形成 IgG 结构形式的错配分子。因此, 用 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换 CH1-CL 后将有效避免或减少 IgG 样的双特异性抗体的轻/重链间的非同源交叉配对分子的形成。

表 26. 不同轻/重链交叉配对的抗体表达量和质谱分析

错配名称	重链	轻链	抗体表达量 (mg/L)	质谱分析
I/D-1	D0 重链	I0 轻链	74.4	√
I/D-2	I0 重链	D0 轻链	73.8	√
I/D-3	D0 重链	I3 轻链	0.04	×
I/D-4	D3 重链	I0 轻链	12.75	只有重链, 无轻链
I/D-5	I0 重链	D3 轻链	0.04	×
I/D-6	I3 重链	D0 轻链	0.25	×

备注: 表中, “√”表示检测到该错配分子, “×”表示未检测到该错配分子。

二、双特异性抗体轻/重链错配表达检测方法

为验证 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换后将不会发生错配或减少错配, 本测试例设计了三种形式的轻/重链交叉配对表达, 即将两条不同的重链和一条相同的 VL-CL 轻链共同转染细胞表达抗体, 或将两条不同的重链和一条相同的 Obscurin-O 链替换 CL 的轻链共同转染细胞表达抗体, 或将两条不同的重链和两条不同的轻链共同转染细胞表达抗体 (具体配对见表 27)。

然后对表达产物进行质谱分析 (方法见本披露测试例 3), 并检测所得抗体纯度 SEC (方法见本披露测试 2)。实验结果见表 27, 结果表明, Obscurin-O 链替换

的轻链和未进行 CL 替换的轻链共同加入时才会形成正确的分子，而只加一条未进行 CL 替换的轻链或只加一条 Obscurin-O 链替换 CL 的轻链的交叉配对中没有找到正确的目标分子。这说明被 Obscurin-O 链替换 CL 的轻链会更容易与 CH1 被 Titin-T 链替换的重链配对结合形成分子，而不会与 CH1 未被 Titin-T 链替换的重链发生交叉错配；CL 未被 Obscurin-O 链替换的轻链更容易与 CH1 未进行 Titin-T 链替换的重链配对结合，而不会与 CH1 被 Titin-T 链替换的重链结合。

表 27. 双特异性抗体轻/重链错配的检测结果

配对名称	第一重链 (B-H1)	第二重链 (B-H2)	第一轻链 (B-L1)	第二轻链 (B-L2)	质谱分析				抗体纯度 SEC (%)	抗体表达量 (mg/L)
					B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H2 B-H2 B-L2 B-L2		
B/U-1	B0 重链 CH1 被 T.10 替换 (含 hole 修饰) 形成的链	U0 重链 (含 knob 修饰)	B0 轻链的 CL 被 O.20 替换后形成的链	U0 轻链	✓	--	--	--	91	25.6
B/U-2	B0 重链 (含 hole 修饰)	U0 重链 (含 knob 修饰)	B0 轻链的 CL 被 O.20 替换后形成的链	B0 轻链的 CL 被 O.20 替换后形成的链	--	--	--	--	--	0.5
B/U-3	B0 重链 CH1 被 T.10 替换 (含 hole 修饰) 形成的链	U0 重链 (含 knob 修饰)	U0 轻链	U0 轻链	--	--	--	✓	33	15.6

备注 (表中, “✓”表示检测到该四条链配对分子, “--”表示未检测到该四条链

配对分子)。

测试例 6、双特异性抗体与抗原的亲合力检测

用 Biacore T200 (GE) 仪器测定待测抗体与抗原蛋白的亲合力。按照人抗捕获试剂盒 (GE, Cat# BR-1008-39) 说明书中的方法, 用 Protein A 生物传感芯片 (Cat. # 29127556, GE) 亲和捕获待测抗体, 然后于芯片表面流经一系列浓度梯度的可溶性抗原, 用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后, 用甘氨酸-盐酸再生溶液 (pH 1.5 Cat. # BR-1003-54, GE) 将生物传感芯片洗净再生。实验得到的数据用 BIAevaluation version 4.1, GE 软件以 (1:1) Langmuir 模型拟合数据, 得出亲合力数值, 实验结果见表 28。

实验结果表明, 本披露的结构改造的双特异性抗体完全保留了两个母源单克隆抗体对其抗原的亲合力。本实验中, 抗原 hRANKL (购自 Sino biological, 11682-HNCH), hNGF (购自 Sino biological, 11050-HNAC), hBAFF (购自 Sino biological, 10056-HNCH), hP40 (购自 Sino biological, 10052-H08H), hB7H3 (实验室制备, 序列参见 SEQ ID NO: 111), hCD3 抗原 (实验室制备, 为 hCD3 的 δ 亚基 (序列参见 SEQ ID NO: 112) 和 ϵ 亚基 (序列参见 SEQ ID NO: 113) 组成的异源二聚体)。

表 28. 双特异性抗体亲合力检测结果

抗体	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
B0	hBAFF	1.77E+05	1.52E-04	8.55E-10
U0	hP40	1.44E+06	1.14E-04	7.93E-11
BU5	hBAFF	1.94E+05	7.62E-05	3.93E-10
	hP40	1.54E+06	1.02E-04	6.64E-11
BU1	hBAFF	3.38E+05	1.69E-04	4.99E-10
	hP40	1.38E+06	4.81E-05	3.49E-11
D0	hRANKL	2.36E+04	2.10E-04	8.89E-09
I0	hNGF	1.92E+06	1.19E-04	6.21E-11
DI-1	hRANKL	3.05E+04	9.36E-05	3.06E-09
	hNGF	2.56E+06	8.95E-05	3.50E-11
A0	hCD3	8.01E+04	4.92E-03	6.14E-08
F0	hB7H3	1.57E+05	2.06E-03	1.31E-08
FA-1	hCD3	7.06E+04	4.25E-03	6.02E-08
	hB7H3	1.58E+05	7.12E-03	4.50E-08

测试例 7、CH1/CL 结构改造双抗结合抗原实验

通过用 Biacore T200 (GE) 仪器测定待测抗体与抗原蛋白的亲合力, 验证本披露的 CH1-CL 结构改造的双特异性抗体可以同时结合两个靶抗原。具体实验步骤为: 用 Protein A 生物传感芯片 (Cat. # 29127556, GE) 亲和捕获抗体 BU5, 然后于芯片表面流经双特异性抗体的第一抗原分子 hP40 (购自 Sino biological, 10052-H08H) 至饱和, 再进样一定浓度的第二抗原分子 hBAFF (购自 Sino biological, 10056-HNCH), 用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在

每个实验循环解离完成后，用甘氨酸-盐酸再生溶液（pH 1.5 Cat. # BR-1003-54，GE）将生物传感芯片洗净再生，数据拟合模型采用 BIAevaluation version 4.1，GE 软件以（1:1）Langmuir 模型拟合。然后，再用 Protein A 生物传感芯片（Cat. # 29127556，GE）亲和捕获抗体 BU5，然后于芯片表面流经双特异性抗体的第一抗原分子 hP40（购自 Sino biological，10052-H08H）至饱和，再进样一定浓度的第二抗原分子 hBAFF（购自 Sino biological，10056-HNCH），用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线在每个实验循环解离完成后，用甘氨酸-盐酸再生溶液（pH 1.5 Cat. # BR-1003-54，GE）将生物传感芯片洗净再生，数据拟合模型采用 BIAevaluation version 4.1，GE 软件以（1:1）Langmuir 模型拟合。

实验结果见表 29，实验结果表明，双特异性抗体 BU5 在结合抗原 hP40 达到饱和后，可继续结合抗原 hBAFF，且再结合 hBAFF 的能力和单抗 B0 相当。同样地，双特异性抗体 BU5 在结合抗原 hBAFF 达到饱和后，可继续结合抗原 hP40，且再结合 hP40 的能力和 U0 相当。这说明本披露的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obseurin-O 链替换的双特异性抗体，可同时结合两个靶抗原。

表 29. 抗体亲和力检测结果

抗体	芯片表面流经抗原	亲和力检测数据			
		抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Bmab	hBAFF	hBAFF	1.77E+05	1.53E-04	8.64E-10
Umab	hP40	hP40	1.59E+06	1.09E-04	6.89E-11
BU5	hBAFF 进样至饱和结合，再进样 hP40 抗原	hP40	1.57E+06	1.04E-04	6.61E-11
	hP40 至饱和结合，再进样 hBAFF 抗原	hBAFF	1.57E+05	8.44E-05	5.37E-10

测试例 8、DI-1 双特异性抗体破骨细胞分化实验

消化 Raw264.7 细胞（中科院细胞库，SCSP-5036）并重悬计数，铺在 24 孔细胞培养板（Corning，3524）中，37℃ 细胞培养箱中过夜培养。次日将抗体溶液按不同浓度进行稀释并与 RANKL（Sino biological，11682-HNCH）混合均匀加入细胞培养板中，RANKL 终浓度为 50 ng/ml，37℃ 继续培养。96 h 后除去 24 孔板中的溶液，每孔加入 100 μL 细胞裂解液（碧云天，P0013J），吹打混匀，将裂解液转移到 EP 管中，12000 g 离心 5 min，取上清液用抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒（碧云天，P0332）按说明书的方法进行检测，用酶标仪读取 405 nm 处的吸收值。将检测值用软件拟合成曲线，计算 IC50 值。实验结果见附图 10，实验结果表明 CH1/CL 被替换后的双特异性抗体 DI-1 保持良好的活性，有效抑制破骨细胞分化。

测试例 9、DI-1 双特异性抗体 TF1 细胞增殖实验

通过 NGF 诱导的 TF-1 细胞 (ATCC, CRL-2003) 增殖实验来评价抗体在细胞水平的活性。实验方法如下:消化收集 TF1 细胞,重悬后计数,铺在 96 孔板(Corning, 3903)中, 37°C 培养箱中过夜培养。次日将抗体溶液按不同浓度进行稀释并与 NGF (Sino biological, 11050-HNAC) 混合均匀加入细胞培养板中, NGF 的终浓度为 10 ng/mL, 细胞放入培养箱中继续培养。72 h 后取出细胞培养板, 每孔加入 50 μ L Cell-titer Glo (Promega, G755B) 检测液, 放在摇床上孵育 10 min, 室温静置 10 min。用酶标仪 (PerkinElmer, Victor3) 检测发光信号。将检测的信号值用软件拟合出曲线图, 计算 IC50 值。实验结果见附图 11, 实验结果表明 CH1/CL 被替换后的双特异性抗体 DI-1 具有良好的活性。

测试例 10、双特异性抗体 CH1/CL 被替换后轻重链错配检测

以下通过实验分析 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换或被 TCR α /TCR β 替换对双特异性抗体的轻重链错配情况, 具体实验如下:

一、双特异性抗体四条链共表达时轻重链错配实验

用 TCR α /TCR β 替换 H0 或 J1 的 CH1/CL, 构建由四条链组成的双特异性抗体 HJ-1 和 HJ-2; 用 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换 H0 或 J1 的 CH1/CL, 构建由四条链组成的双特异性抗体 HJ-3 和 HJ-4, 双特异性抗体的结构示意图参见附图 12, 双特异性抗体的全长序列参见表 30:

表 30. 双特异性抗体序列表

双抗编号	HJ 双特异性抗体四条链序列			
	链 1	链 3	链 2	链 4
HJ-1	H0 的重链 (knob), 且 CH1 被 TCR β 替换	H0 的轻链, 且 CL 被 TCR α 替换	J1 的重链 (hole)	J1 的轻链
	HJ-1-H1: <u>EVQLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSIS</u> <u>YEGDITYYGDSVKGRFTI</u> <u>SRDNSKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTATYYCASQTLRESF</u> <u>DYWGQGTLVTVSSLEDL</u> <u>KNVFPPEVAVFEPSEAEI</u> <u>SHTQKATLVCLATGFYP</u> <u>DHVELSWWVNGKEVHS</u> <u>GVCTDPQPLKEQPALQD</u> <u>SRYALSSRLRVSATFWQ</u> <u>NPRNHFRQCQVQFYGLSE</u> <u>NDEWTQDRAKPVTVQIV</u> <u>SAEAWGRASDKTHTCPP</u> <u>CPAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVD</u>	HJ-1-L1: <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVITTCR</u> <u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQQK</u> <u>PGKSPKLLI</u> <u>YGTSNLEV</u> <u>GVPSRFSG</u> <u>SRSQTDFT</u> <u>LTISLQPE</u> <u>DFATYYCL</u> <u>QDKEFPRT</u> <u>EGGGTKVE</u> <u>IKKPDIQN</u> <u>PDPAVYQL</u> <u>RDSKSSDK</u> <u>SVCLFTDF</u>	HJ-1-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLI</u> <u>EWVRQAPGQGLEWIGV</u> <u>IDPGVGDNTYNYNENFKGR</u> <u>ATLTADKSTSTAYIELSSL</u> <u>RSEDTAVYYCAREDNTG</u> <u>TAFDYWGQGTITVTVSS</u> <u>ASTKGPSVFPLAPSSKST</u> <u>SGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHT</u> <u>FPAVLQSSGLYSLSSVVT</u> <u>VPSSSLGTQTYICNVNH</u> <u>KPSNTKVDKKVEPKSCD</u> <u>KTHTCPPCPAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNAK</u>	HJ-1-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u> <u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGQSPQLL</u> <u>IYYVSEHY</u> <u>TGVPDRFS</u> <u>GSYGTD</u> <u>FTLKISRVE</u> <u>AEDVGVY</u> <u>YCQQHHR</u> <u>FPLTFGQG</u> <u>TKLEIKRT</u> <u>VAAPSVFIF</u> <u>PPSDEQLK</u> <u>SGTASVVC</u>

	<u>VSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEK</u> <u>TISKAKGQPREPQVYITLP</u> <u>PCREEMTKNQVSLWCLV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTTTPVLDSDGSFF</u> <u>LYSKLTVDKSRWQOQNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGKHHHHH (SEQ</u> <u>ID NO: 114)</u>	<u>DSQTQVS</u> <u>QSKDSDV</u> <u>YITDKCVL</u> <u>DMRSMDF</u> <u>KSNSAVAW</u> <u>SQKSDFAC</u> <u>ANAFQNSI</u> <u>IPEDTFFPS</u> <u>PSS (SEQ</u> <u>ID NO: 115)</u>	<u>TKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVCTLPSPRE</u> <u>EMTKNQVSLSCAVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNGQPN</u> <u>NYKTTTPVLDSDGSFFL</u> <u>VSKLTVDKSRWQOQNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGKDYKDDDD</u> <u>K (SEQ ID NO: 116)</u>	<u>LLNNFYPR</u> <u>EAKVQWK</u> <u>VDNALQS</u> <u>GNSQESVT</u> <u>EQDSKDST</u> <u>YLSSTLT</u> <u>LSKADYE</u> <u>KHKVYAC</u> <u>EVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFN</u> <u>RGEC (SEQ</u> <u>ID NO: 117)</u>
H J - 2	H0 的重链 (hole)	H0 的轻链	J1 的重链 (knob), 且 CH1 被 TCRβ 替换	J1 的轻链, 且 CL 被 TCRα 替换
	HJ-2-H1: <u>EVQLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSIS</u> <u>YEGDITYGDSVKGRFTI</u> <u>SRDNSKNTLYLQMNLSR</u> <u>AEDTATYYCASQTLRESE</u> <u>DYWGQGTLLVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVTVPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KKVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APEAAGGPSVFLFPPKPK</u> <u>DTLMISRTPEVTCVVVDV</u> <u>SHEDPEVKFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGK</u> <u>EYKCKVSNKALPAPIEKTI</u> <u>SKAKGQPREPQVCTLPSP</u> <u>REEMTKNQVSLSCAVKG</u> <u>FYPSDIAVEWESNGQPN</u> <u>NYKTTTPVLDSDGSFFLV</u> <u>SKLTVDKSRWQOQNVFS</u> <u>CVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGKDYKDDDDK (SEQ</u> <u>ID NO: 118)</u>	HJ-2-L1: <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVTITCR</u> <u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQOK</u> <u>PGKSPKLLI</u> <u>YGTSNLEV</u> <u>GVPSRFSG</u> <u>SRSQTDFT</u> <u>LTISLQPE</u> <u>DFATYYCL</u> <u>QDKEFPRT</u> <u>FGGGTKVE</u> <u>IKRTVAAPS</u> <u>VFIFPPSDE</u> <u>QLKSGTAS</u> <u>VVCLLNNF</u> <u>YPREAKVQ</u> <u>WKVDNAL</u> <u>QSGNSQES</u> <u>VTEQDSKD</u> <u>STYLSSTL</u> <u>TLISKADYE</u> <u>KHKVYAC</u> <u>EVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFN</u> <u>RGEC (SEQ</u> <u>ID NO: 119)</u>	HJ-1-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLI</u> <u>EWVRQAPGQGLEWIGV</u> <u>IDPGVGDNTYENFKGR</u> <u>ATLTADKSTSTAYIELSSL</u> <u>RSEDTAVYYCAREDTG</u> <u>TAFDYWGQGTITVTVSS</u> <u>LEDLKNVFPPEVAVFEP</u> <u>SEAEISHTQKATLVCLA</u> <u>TGFYPDHVELSWWN</u> <u>GKEVHSGVCTDPQPLK</u> <u>EQPALQDSRYALSSRLR</u> <u>VSATFWQNPRNHFR</u> <u>QVQFYGLSENDEWTQ</u> <u>DRAKPVTQIVSAEAWG</u> <u>RASDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSH</u> <u>EDPEVKFNWYVDGVEV</u> <u>HNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQDWLNGK</u> <u>EYKCKVSNKALPAPIEK</u> <u>TISKAKGQPREPQVYITL</u> <u>PPCREEMTKNQVSLWCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>QPENNYKTTTPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQ</u> <u>GNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGKHHHHH</u> <u>H (SEQ ID NO: 120)</u>	HJ-2-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u> <u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGOSPQLL</u> <u>IYYVSEHY</u> <u>TGVPDRFS</u> <u>GSYGTD</u> <u>FTLKISRVE</u> <u>AEDVGVY</u> <u>YCOQHHR</u> <u>FPLTFGQG</u> <u>TKLEIKKP</u> <u>DIQNPDA</u> <u>VYQLRDS</u> <u>KSSDKSV</u> <u>CLFTDFDS</u> <u>QTQVSQS</u> <u>KDSVDYIT</u> <u>DKCVLDM</u> <u>RSMDFKS</u> <u>NSAVAWS</u> <u>QKSDFAC</u> <u>ANAFQNSI</u> <u>IPEDTFFP</u> <u>SPSS</u> <u>(SEQ ID</u> <u>NO: 121)</u>
H J - 3	H0 的重链 (knob), 且 CH1 被 T.10-L1 替换	H0 的轻链, 且 CL 被 O.20-L1 替换	J1 的重链 (hole)	J1 的轻链
	HJ-3-H1: <u>EVQLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSIS</u>	HJ-3-L1: <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVTITCR</u>	HJ-3-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLI</u> <u>EWVRQAPGQGLEWIGV</u>	HJ-3-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u>

	<p><u>YEGDITYYGDSVKGRFTI</u> <u>SRDNSKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTATYYCASQTLRESF</u> <u>DYWGQGLTVTVSSGGGG</u> <u>SGIPPKIECLPIDISIDEG</u> <u>KVLTVASAFTGEPTPEV</u> <u>TWSTGGRKIHSQEQGR</u> <u>FHIENTDDLTTLIKDVQ</u> <u>KQDGGLYTLTLRNEFG</u> <u>SDSATVNIHIRSIDKTHT</u> <u>CPPCAPEAAAGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VVDVSHEDPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQY</u> <u>NSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKALPA</u> <u>PIEKTISKAKGQPREPOVY</u> <u>TLPPCREEMTKNQVSLW</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTPPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQ</u> <u>GNVFSCSVMHEALHNHY</u> <u>TQKSLSLSPGKHHHHH</u> (SEQ ID NO: 122)</p>	<p><u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQQK</u> <u>PGKSPKLLI</u> <u>YGTSNLEV</u> <u>GVPSRFSG</u> <u>SRS GTDFT</u> <u>LTSSLOPE</u> <u>DFATYYCL</u> <u>QDKEFPRT</u> <u>FGGGTKVE</u> <u>IKGGGGSS</u> <u>GAPRFLTR</u> <u>PLAFVVSV</u> <u>GKDATLSS</u> <u>QIVGNPTP</u> <u>QVSWEKD</u> <u>KQPVTAG</u> <u>ARFRLAQ</u> <u>DGDLYRL</u> <u>KILDQLS</u> <u>DSGQYVS</u> <u>RARNAIGE</u> <u>AFACLGL</u> <u>QVDAEA</u> (SEQ ID NO: 123)</p>	<p><u>IDPGVGDNTYNNENFKGR</u> <u>ATLTADKSTSTAYIELSSL</u> <u>RSEDTAVYYCAREDNTG</u> <u>TAFDYWGOGTTVTVSS</u> <u>ASTKGPSVFPLAPSSKST</u> <u>SGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSVGH</u> <u>TFPVLOSSGLYSLSSV</u> <u>VTVPSSSLGTQTYICNV</u> <u>NHKPSNTKVDKKEPK</u> <u>SCDKTHTCPPCAPEAA</u> <u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVV</u> <u>SVLTVLHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKALPAPIEKTIS</u> <u>KAKGQPREPOVCTLPSS</u> <u>REEMTKNQVSLSCAVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLVSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHY</u> <u>TQKSLSLSPGKDYKDDD</u> DK (SEQ ID NO: 116)</p>	<p><u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGOSPQLL</u> <u>IYYVSEHY</u> <u>TGVPDRFS</u> <u>GSYGTD</u> <u>FTLKISRVE</u> <u>AEDVGVY</u> <u>YCQQHHR</u> <u>FPLTFGQG</u> <u>TKLEIKRT</u> <u>VAAPSVFIF</u> <u>PPSDEQLK</u> <u>SGTASVVC</u> <u>LLNNFYPR</u> <u>EAKVQWK</u> <u>VDNALQS</u> <u>GNSQESVT</u> <u>EODSKDST</u> <u>YLSSTLT</u> <u>LSKADYE</u> <u>KHKVYAC</u> <u>EVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFN</u> <u>RGEC</u> (SEQ ID NO: 117)</p>
<p>H J - 4</p>	<p>H0 的重链 (hole)</p>	<p>H0 的轻链</p>	<p>J1 的重链 (knob), 且 CH1 被 T.10-L1 替换</p>	<p>J1 的轻链, 且 CL 被 O.20-L1 替换</p>
	<p>HJ-4-H1: <u>EVOLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSIS</u> <u>YEGDITYYGDSVKGRFTI</u> <u>SRDNSKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTATYYCASQTLRESF</u> <u>DYWGQGLTVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSVGHVTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVVTVPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHNKPSNTKVD</u> <u>KKVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APEAAAGGPSVFLFPPKPK</u> <u>DTLMISRTPEVTCVVVDV</u> <u>SHEDPEVKFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGK</u> <u>EYKCKVSNKALPAPIEKTI</u> <u>SKAKGQPREPOVCTLPSS</u> <u>REEMTKNQVSLSCAVKG</u> <u>FYPSDIAVEWESNGQEN</u> <u>NYKTPPVLDSDGSFFLV</u></p>	<p>HJ-4-L1: <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVTITCR</u> <u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQQK</u> <u>PGKSPKLLI</u> <u>YGTSNLEV</u> <u>GVPSRFSG</u> <u>SRS GTDFT</u> <u>LTSSLOPE</u> <u>DFATYYCL</u> <u>QDKEFPRT</u> <u>FGGGTKVE</u> <u>IKRTVAAPS</u> <u>VFIFPPSDE</u> <u>QLKSGTAS</u> <u>VVCLLNNF</u> <u>YPREAKVQ</u> <u>WKVDNAL</u> <u>QSGNSQES</u> <u>VTEQSKD</u> <u>STYLSSTL</u> <u>TLISKADYE</u></p>	<p>HJ-4-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVCKASGYTFSNYLI</u> <u>EWVRQAPGQGLEWIGV</u> <u>IDPGVGDNTYNNENFKGR</u> <u>ATLTADKSTSTAYIELSSL</u> <u>RSEDTAVYYCAREDNTG</u> <u>TAFDYWGOGTTVTVSS</u> <u>GGGGSGIPPKIECLPIDI</u> <u>SIDEGKVLTVASAFTGE</u> <u>PTPEVTWSTGGRKIHS</u> <u>QEQRFHIENTDDLTT</u> <u>LIKDVQKQDGGLYTL</u> <u>TLRNEFGSDSATVNIHI</u> <u>RSIDKTHTCPPCAPEAA</u> <u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHN</u> <u>AKTKPREEQYNSTYRVV</u> <u>SVLTVLHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKALPAPIEKTIS</u> <u>KAKGQPREPOVYTLPPC</u> <u>REEMTKNQVSLWCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQP</u></p>	<p>HJ-4-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u> <u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGOSPQLL</u> <u>IYYVSEHY</u> <u>TGVPDRFS</u> <u>GSYGTD</u> <u>FTLKISRVE</u> <u>AEDVGVY</u> <u>YCQQHHR</u> <u>FPLTFGQG</u> <u>TKLEIKGG</u> <u>GGSSGAP</u> <u>RFLTRPLA</u> <u>FVVSVGK</u> <u>DATLSSQI</u> <u>VGNPTPQ</u> <u>VSWEKDK</u> <u>QPVTAGA</u> <u>RFRLAQD</u> <u>GDLYRLK</u></p>

<p><u>SKLTVDKSRWQOQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGKDYKDDDDK</u> (SEQ ID NO: 118)</p>	<p><u>KHKVYAC</u> <u>EVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFN</u> <u>RGEC</u> (SEQ ID NO: 119)</p>	<p><u>ENNYKTTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQOQ</u> <u>NVFSCVMHEALHNHY</u> <u>TQKSLSLSPGKHHHHH</u> (SEQ ID NO: 124)</p>	<p><u>ILDQLQSD</u> <u>SGOYVSR</u> <u>ARNAIGE</u> <u>AFACLGL</u> <u>QVDAEA</u> (SEQ ID NO: 125)</p>
---	--	---	--

备注：序列中，粗体字部分为 TCR 序列中，粗体或 Titin-T 链/Obscurin-O 链部分，点划线部分为 Fc 或 CL 恒定区部分，单下划线部分为可变区部分，虚下划线部分为连接子 L1。

J1 重链:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVIDP
GVGDTNYNENFKGRATLTADKSTSTAYIELSSLRSEDAVYYCAREDNTGTAF
DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 126);

J1 轻链:

SIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVSSDVTWYLOKPGQSPQLLIYYVS
EHYTGVPDRFSGSGYGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGQGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 117);

J1 重链可变区:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVIDP
GVGDTNYNENFKGRATLTADKSTSTAYIELSSLRSEDAVYYCAREDNTGTAF
DYWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 171);

J1 轻链可变区:

SIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVSSDVTWYLOKPGQSPQLLIYYVS
EHYTGVPDRFSGSGYGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGQGTKLEI
K

(SEQ ID NO: 172);

分别将 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4 的四条链共转染细胞表达，然后对表达产物进行质谱分析（方法见本披露测试例 3），检测是否有轻重链错配分子。实验结果见附图 13A 至图 13D 及表 31。

表 31. 双特异性抗体表达产物的质谱分析实验结果

双抗编号	共转染的链	质谱分析结果		
		HJ (1+2+3+4)	错配分子 1 (1+2+3+3)	错配分子 2 (1+2+4+4)
HJ-1	1: HJ-1-H1	√	×	√
	2: HJ-1-H2			
	3: HJ-1-L1			
	4: HJ-1-L2			
HJ-2	1: HJ-2-H2	√	×	√
	2: HJ-2-H1			
	3: HJ-2-L2			
	4: HJ-2-L1			
HJ-3	1: HJ-3-H1	√	×	×
	2: HJ-3-H2			
	3: HJ-3-L1			
	4: HJ-3-L2			
HJ-4	1: HJ-4-H2	√	×	×
	2: HJ-4-H1			
	3: HJ-4-L2			
	4: HJ-4-L1			

备注：表中“√”表示检测到该分子，“×”表示未检测到该分子，“HJ (1+2+3+4)”表示由其左侧对应的编号为 1、2、3 和 4 这四条链形成的双特异性抗体，“错配分子 1 (1+2+3+3)”表示由其左侧对应的编号为 1、2、3 和 3 这四条链形成的错配分子 1；“错配分子 2 (1+2+4+4)”表示由其左侧对应的编号为 1、2、4 和 4 这四条链形成的错配分子 2。

实验结果表明，以 TCRβ/TCRα 替换 CH1/CL 的双特异性抗体，当其四条链共转染表达时，其轻重链会发生错配。而 Titin-T 链/Obsecurin-O 链替换 CH1/CL 的双特异性抗体，均没有出现轻重链的错配。这说明本披露的 Titin-T 链/Obsecurin-O 链替换 CH1/CL 的双特异性抗体具有出色的减少轻重链错配的能力。

二、3 条链共表达双特异性抗体实验

本测试用三条链（1 条 CH1 被 TCRβ 或 Titin-T 链替换的重链，1 条 CH1 未被替换的重链，1 条 CL 未被替换的野生型轻链（VL-CL），具体序列参见表 30）共转染细胞表达，然后对表达产物进行质谱分析（方法见本披露测试例 3），检测抗体纯度 SEC（方法见本披露测试 2），验证野生型轻链（VL-CL）是否会与 CH1 被 TCRβ 或 Titin-T 链替换的重链组合形成错配分子。实验结果见附图 14A、图 14B、图 15A、图 15B 和表 32。

表 32. 三条链共表达双特异性抗体实验结果

组别	共转染的链	抗体纯度 SEC (%)	质谱分析结果	
			分子 (1+2+3)	错配分子 (1+2+3+3)
1	1: HJ-1-H1	75.85	√	√

	2: HJ-1-H2			
	3: HJ-1-L2			
2	1: HJ-3-H1	96.82	√	×
	2: HJ-3-H2			
	3: HJ-3-L2			

备注：表中“√”表示检测到该分子，“×”表示未检测到该分子，“分子（1+2+3）”表示由其左侧对应的编号为 1、2、3 这三条链形成的分子，“错配分子（1+2+3+3）”表示由其左侧对应的编号为 1、2、3、3 这四条链形成的错配分子。

实验结果表明：VL-CL 很容易与 CH1 被 TCR β 替换的重链结合从而表达出有两条相同轻链的错配分子。但是 VL-CL 轻链并未与 CH1 被 Titin-T 链替换的重链结合形成两条相同轻链的错配分子，这也间接说明相比重链 CH1 被 TCR β 替换的双特异性抗体，本披露的 Titin-T 链替换重链 CH1 的双特异性抗体具有更出色的减少轻重链错配的能力。

测试例 11、CH1/CL 被替换的(FabV)2-IgG 双特异性抗体

一、CH1/CL 被替换的 PDL1-TIGIT 双特异性抗体的构建

使用国际专利申请 WO2019062832A1 公开的抗 TIGIT 抗体（抗体名称：h1708-04），国际专利申请 WO2020177733A1 公开的抗 PDL1 抗体（抗体名称：h1831K），构建一对 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链（T.10/O.24）替换的 (FabV)2-IgG 模式的抗 PDL1-TIGIT 双特异性抗体 P-O-T（其结构示意图见附图 17），P-O-T 包含 2 条相同的轻链 1，2 条相同的轻链 2，2 条相同的重链，P-O-T 的多肽链的氨基酸序列如下所示：

P-O-T 的轻链 1：

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQOKPGQPCKLLIY
AASKLESGVPARFSGSGGTDFLTINPVEAEDTANYCQQSFEDPLTFGQGTKL
EIKGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEQ
GRFHIENTDDLTTLLIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI（SEQ ID NO: 146）

（备注：单下划线标注部分为轻链可变区 VL1 部分（同 h1831K 的 VL），虚划线标注部分为连接子部分，点划线部分为 T.10 部分）

P-O-T 的轻链 2：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQOKPGKSPKLLIYNAR
TLAEGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（SEQ ID NO: 147）

（备注：单下划线标注部分为轻链可变区 VL2 部分（同 h1708-04 的 VL），波浪线部分为轻链恒定区（同 h1708-04 的 CL））

P-O-T 重链:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWM
GRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSS
YDYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPF
PQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAODGDLYRLKILDLQLSDSGOYVSRARNAIGEA
FACLGLOVDAEAGGGGSEVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWM
HWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSL
RSEDTAVYYCAREGAYGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQOQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 148)

(备注: 单下划线标注部分为重链可变区 VH1 部分(同 h1831K 的 VH), 双下划线标注部分为重链可变区 VH2 部分(同 h1708-04 的 VH), 点划线部分为 O.24 部分, 虚划线部分为连接子部分, 波浪线部分为重链恒定区部分(同 h1708-04 的重链恒定区))

h1831K(简称 P-IgG1)、h1708-04(简称 T-IgG1)的序列如下:

h1708-04 的轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLIYNAR
TLAEGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

(SEQ ID NO: 149)

h1708-04 的重链:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEW
MGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGA
YGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNV
FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 150)

h1831K 的轻链:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASEVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIY
AASKLESVPARFRSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKL

EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEODSKDSTYSLSSLTTLKADYEEKHKVYACEVTHOQLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO: 151)

h1831K 的重链:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWM
GRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSS
YDYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 152)

备注: 上述序列中, 单下划线标注部分为可变区, 波浪线标注部分为恒定区。

另外, h1708-04、h1831K 的可变区及 CDR (见表 33) 序列如下:

h1708-04 的轻链可变区:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQOKPGKSPKLLIYNAR
TLAEGVPSRFRSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCOYHSGSPLPFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 153)

h1708-04 的重链可变区:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEW
MGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGA
YGYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 154)

h1831K 的轻链可变区:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASEVSIHGTHLMHWYQOKPGOPPCLLIY
AASKLESGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEAEDTANYYCQOSFEDPLTFGQGTKL
EIK (SEQ ID NO: 155)

h1831K 的重链可变区:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWM
GRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSS
YDYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 156)

表 33. 抗体重链及轻链 CDR 区序列

抗体	重链		轻链	
h1708-04	HCDR1	NYWMH SEQ ID NO: 157	LCDR1	RASENIYSYLA SEQ ID NO: 160
	HCDR2	RIDPDSTGSKYNEKFKT SEQ ID NO: 158	LCDR2	NARTLAE SEQ ID NO: 161
	HCDR3	EGAYGYFDY SEQ ID NO: 159	LCDR3	QYHSGSPLP SEQ ID NO: 162
h1831K	HCDR1	SYWMH SEQ ID NO: 163	LCDR1	RASEVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 166

	HCDR2	RITPSSGFAMYNEKFKN SEQ ID NO: 164	LCDR2	AASKLES SEQ ID NO: 167
	HCDR3	GGSSYDYFDY SEQ ID NO: 165	LCDR3	QGSFEDPLT SEQ ID NO: 168

备注：根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 区序列

二、CH1/CL 被替换的 PDL1-TIGIT 双特异性抗体对 PDL1 和 TIGIT 的结合能力检测

用 Biacore T200 测定本披露双抗分子 P-O-T 和人 PDL1-his (hPDL1, Cat.No.10084-H08H, S.B) 及人 TIGIT-his (hTIGIT, Cat.No.10917-H08H, S.B) 的亲合力, 用 Protein A 生物传感芯片(Cat.No.29127556, GE)亲和捕获 IgG, 然后于芯片表面流经高浓度的抗原 1 (hPDL1 100 nM 或 hTIGIT 100 nM) 180s 将抗体上针对抗原 1 的位点饱和, 再进抗原 2 (hTIGIT 或者 hPDL1)用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后, 用 10 mM Gly-HCl pH 1.5 将生物传感芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 Model。结果如下表 34:

表 34.待测抗体同 hPDL1 及 hTIGIT 亲和力检测结果

抗体	抗原 1	抗原 2 (被分析的抗原)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
P-O-T		hPDL1	3.71E+06	9.53E-05	2.57E-11
P-O-T	TIGIT	hPDL1	2.68E+06	8.12E-05	3.03E-11
P-O-T		TIGIT	1.27E+06	1.23E-04	9.70E-11
P-O-T	hPDL1	TIGIT	1.26E+06	1.20E-04	9.54E-11
P-IgG1		hPDL1	2.08E+06	8.67E-05	4.17E-11
T-IgG1		TIGIT	2.14E+06	1.39E-04	6.51E-11

检测结果显示 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obseurin-O 链替换替换的(FabV)₂-IgG 双抗 P-O-T 对 hPDL1 和 hTIGIT 具有很好的结合能力, 同时 P-O-T 结合一个抗原不影响其与另外一个抗原的结合。

三、CH1/CL 被替换的 PDL1-TIGIT 双特异性抗体对 PD-L1 与 PD-1 结合以及 TIGIT 与 CD155 结合的阻断作用检测

以下所述的体外细胞实验可测定受试抗体对 PD-L1 与 PD-1 结合以及 TIGIT 与 CD155 结合的阻断作用, 其活性可用 EC₅₀ 值来表示。实验第一天, 使用含 10% FBS (Gibco, 10099-141) 和抗生素的 F-12 Nutrient Mixture (Gibco, 11765-054) 完全培养基将稳定表达了人 CD155 的 CHOK1/PD-L1 细胞 (Promega, CS187108) 以每孔 4000 个细胞的密度种于 96 孔板, 每孔 100 μL 细胞悬液, 放置 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜。第二天, 将培养板中的培养基吸掉, 每孔加入 40 μL 用含 2% FBS (Gibco, 10099-141) 的 RPMI (Gibco, 11875119) 配制的梯度稀释待测抗体, 以及 40 μL 用相同培养基重悬的稳定表达人 TIGIT 和人 CD226 的

Jurkat/PD-1/NFAT-luc2 细胞 (Promega, CS187102), 每孔 50000 个细胞。抗体的终浓度是从 100 nM 开始进行 3 倍梯度稀释的 9 个浓度点, 设置不含抗体对照细胞孔和无细胞对照孔, 放置 37°C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 6 小时。6 小时后, 取出 96 孔细胞培养板, 每孔加入 40 μL Bio-Glo™ Luciferase Assay (Promega, G7573) 中的底物, 室温放置 10 分钟后, 使用酶标仪 (PerkinElmer, VICTOR 3) 读取发光信号值。通过对照孔计算抗体各浓度的相对激活水平, 使用 GraphPad Prism 根据抗体的对数浓度和相对激活水平进行曲线拟合并计算 EC₅₀ 值。

结果见附图 18, 实验结果显示 CH1/CL 被替换的 PDL1-TIGIT 双特异性抗体相比其 PDL1 单抗及 TIGIT 单抗具有叠加的阻断活性。

四、抗体对结核菌素刺激的外周血单个核细胞的激活作用

以下所述的体外细胞实验可测定受试抗体对结核菌素刺激的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 分泌 IFN-γ 的激活作用, 其活性可用 EC₅₀ 值来表示。实验第一天, 使用 SepMate™-50 分离管 (STEMCELL, 86450) 按照使用说明书从新鲜的健康人血液中分离出 PBMC, 使用含 10% FBS (Gibco, 10099-141) 和 800 倍稀释的结核菌素 (Synbiotics, 97-8800) 的 RPMI 培养基 (Gibco, 11875119) 将细胞以每孔 4×10⁶ 个细胞的密度种于 6 孔板, 每孔 2 mL 细胞悬液, 放置 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 5 天。第四天, 将 Human CD155 / PVR 蛋白 (Acro, CD5-H5223) 用 PBS 稀释至 2.5 μg/mL 后以每孔 100 μL 加到 96 孔细胞培养板中, 将孔板置于 4°C 冰箱包被过夜。第五天, 将蛋白包被的 96 孔细胞培养板用 PBS 洗两遍, 收集结合菌素刺激的 PBMC 并用含 10% FBS 的 RPMI 培养基将细胞以每孔 1×10⁵ 个细胞的密度种于 96 孔板中, 每孔 90 μL 细胞悬液。之后每孔加入 10 μL 用 PBS 梯度稀释的待测抗体, 抗体的终浓度是从 200 nM 开始进行 3 倍梯度稀释的 9 个浓度点, 设置不含抗体的对照细胞孔, 孔板放置 37°C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 3 天。第八天, 将 96 孔细胞培养板在 250 g 离心 5 分钟, 转移上清到新的 96 孔板中, 使用 Human IFN-γ ELISA kit (欣博盛, EHC102g.96.10) 将上清稀释 20 倍后检测上清中 IFN-γ 的含量。通过对照孔计算抗体处理组的相对激活水平, 使用 Graphpad Prism 5 软件根据抗体浓度和相应的相对激活水平进行曲线拟合并计算 EC₅₀ 值。

实验结果见附图 19, 实验结果表明 CH1/CL 被替换的 PDL1-TIGIT 双特异性抗体相比单抗可更好的阻断免疫抑制, 促进 IFN-γ 的分泌。

五、CH1/CL 被替换的 PDL1-TIGIT 双特异性抗体内药效检测

本实验采用人 PD-1-TIGIT 双转基因小鼠接种稳转人 PD-L1 的 MC38-HL1 细胞, 待成瘤后分组, 比较 PD-L1 和 TIGIT 联合给药与 PDL1-TIGIT 双特异性抗体的药效。

PD-1-TIGIT 双转基因小鼠购自百奥赛图，6-8 周龄，82 只，雌性，体重 16-18 g 左右，5 只/笼饲养于 SPF 级环境，温度 20-25 °C；湿度 40-60%，许可证号 SCXK（京）2015-0008。适应环境约 10 天。将 MC38-HL1 细胞（ 2.0×10^5 个）100 μ L 接种于 82 只 hPD-1/TIGIT 双转基因小鼠右肋部皮下，待成瘤后（ $\sim 110 \text{ mm}^3$ ）后去除肿瘤过大和过小的鼠，按肿瘤体积将小鼠随机分为 5 组：阴性对照 C25-IgG1（无关靶点 IgG1 蛋白）组、P-IgG1+T-IgG1 组、P-O-T 组、P-IgG1 组、T-IgG1 组，每组 8 只，具体见表 35 所示。实验开始当天通过腹腔注射抗体，每周给药 1 次，给药 3 周。每周测 2 次瘤体积，称体重，记录数据。

表 35. MC38-HL1 小鼠移植瘤的抑瘤实验分组

组别	给药剂量 (mg/kg)	给药方式		给药周期
C25-IgG1	9 mg/kg	i.p	qw	21 天
P-IgG1+T-IgG1	P-IgG1 9mg/kg +T-IgG1 9mg/kg	i.p	qw	21 天
P-O-T	5 mg/kg	i.p	qw	21 天
P-IgG1	9 mg/kg	i.p	qw	21 天
T-IgG1	9 mg/kg	i.p	qw	21 天

备注：表中，i.p 表示腹腔注射，qw 表示每周给药 1 次

使用 Excel 统计软件记录数据：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用 GraphPad Prism 软件作图，采用 Two-way ANOVA、One-way ANOVA、t-test 对数据进行统计学分析。

肿瘤体积（V）计算公式为： $V = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$

相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$ ，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积； T_0 、 C_0 为实验开始时的肿瘤体积。

实验结果见表 36 及附图 20。

表 36. 抗体对 MC38-HL1 小鼠移植瘤的抑瘤率 (%)

组别	抑瘤率 (TGI)
C25-IgG1	/
P-IgG1 + T-IgG1	43%
P-O-T	55%
P-IgG1	3%
T-IgG1	-39%

实验结果显示，第 22 天时，与阴性对照 C25-IgG1 组相比，9 mg/kg 的 P-IgG1 9 mg/kg 和 9 mg/kg 的 T-IgG1 的联合给药组抑瘤率为 43%，5 mg/kg 的 P-O-T 的给药组抑瘤率达到 55%，能够明显抑制 MC38-HL1 肿瘤的生长，抑瘤效果明显优于 P-IgG1、T-IgG1 单独给药组。

权利要求书:

1. 一种二聚化多肽, 其包含 Titin-T 链和 Obscurin-O 链, 或 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链, 其中,

5 i) 所述 Titin-T 链为 SEQ ID NO: 32 的变体, 所述变体与 SEQ ID NO: 32 相比, 在选自第 60 和 64 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代, 和/或

ii) 所述 Obscurin-O 链为 SEQ ID NO: 33 的变体, 所述变体与 SEQ ID NO: 33 相比, 在选自 13、32、48、66、82 和 93 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代;

并且其条件是:

10 a) 当所述变体在第 13、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代, 且在第 32 位上具有氨基酸残基取代时, 所述第 32 位的氨基酸取代不是 32P;

b) 当所述变体在第 32、48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代, 且在第 13 位上具有氨基酸残基取代时, 所述第 13 位的氨基酸取代不是 13Y; 和

15 c) 当所述变体在 48、66、82 或 93 位上不具有氨基酸残基取代, 且在第 13 和 32 位上具有氨基酸残基取代时, 所述第 13 位的氨基酸残基取代不是 13Y, 且所述第 32 位的氨基酸残基取代不是 32P。

2. 如权利要求 1 所述的二聚化多肽, 其中, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代, 和/或所述 SEQ ID NO: 33 的变体具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代;

优选地, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体具有 60S 和 64T 的氨基酸残基取代, 和/或所述 SEQ ID NO: 33 的变体具有选自 a) 至 c) 中任一项的氨基酸残基取代:

25 a) 32F 和 48V,

b) 13S、32F、48V 和 82H, 和

c) 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的二聚化多肽, 其中, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体与 SEQ ID NO: 32 相比, 还在选自第 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、30 42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个位点上具有氨基酸残基取代;

优选地, 所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比, 还包含选自 3W、8C、11I、13L、20C、22M/22C、25S、26C、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S/66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一个或 35 更多个氨基酸残基取代;

更优选地, 所述 SEQ ID NO: 32 变体与 SEQ ID NO: 32 相比, 还包含选自 a)

至 1) 中任一项的氨基酸残基取代:

- a) 8C、25S 和 39T,
- b) 20C、25S 和 39T,
- c) 25S、26C 和 39T,
- 5 d) 22C、25S 和 39T,
- e) 8C、25S、39T、66S 和 77S,
- f) 8C、25S、39T、66K、70R、79T 和 81R,
- g) 3W、8C、11I、13L、22M、25S、39T 和 82M,
- h) 8C、11I、25S、39T、66K、79T 和 81R,
- 10 i) 8C、25S、39T、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L,
- j) 8C、25S、39T、47E、49G、56S、58E 和 75V,
- k) 8C、25S、39T、56S、58E 和 75V, 和
- l) 8C、25S、39T、56S、58E、66S 和 77S;

最优选地, 所述 SEQ ID NO: 32 的变体与 SEQ ID NO: 32 相比, 具有选自 A)

15 至 C) 中任一项的氨基酸残基取代:

- A) 8C、11I、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R,
- B) 8C、11I、20C、25S、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R,
- C) 8C、11I、25S、26C、39T、60S、64T、66K、79T 和 81R。

20 4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的二聚化多肽, 其中, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比, 还在选自第 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 位中的一个或更多个位点上具有氨基酸残基取代;

优选地,

25 所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比, 还具有选自 2E、3C、7K/7R、9C、11L、12S、13Y、14T、17E、20L、22M/22S、25S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E/62K/62H、67Q/67T、69S、76S、88C、89L、92E、94G 和 97G 中的一个或更多个氨基酸残基取代;

更优选地, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比, 还具有选自

30 A) - R) 中任一项的氨基酸残基取代:

- A) 88C,
- B) 3C,
- C) 9C,
- D) 25S、76S 和 88C,
- 35 E) 25S、76S 和 3C,
- F) 25S、76S 和 9C,

- G) 7K、25S、62K、76S 和 88C,
 H) 7K、25S、62H、76S 和 88C,
 I) 7R、25S、62K、76S 和 88C,
 J) 7R、25S、62H、76S 和 88C,
 5 K) 11L、25S、62K、76S 和 88C,
 L) 11L、25S、62H、76S 和 88C,
 M) 12S、13Y、14T、22S、25S、62K、76S 和 88C,
 N) 2E、11L、17E、25S、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、
 69S、76S、88C 和 97G,
 10 O) 11L、20L、22M、25S、53L、62K、76S 和 88C,
 P) 11L、25S、41K、45T、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L,
 Q) 11L、25S、42L、45T、62K、67T、69S、76S、88C、92E 和 94G,
 R) 11L、12S、13Y、22S、25S、42L、45T、62K、67Q、69S、76S、88C、
 92E 和 94G;
 15 最优选地, 所述 SEQ ID NO: 33 的变体与 SEQ ID NO: 33 相比, 具有选自 a) 至 j) 中任一项的氨基酸残基取代:
 a) 25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、88C 和 89L,
 b) 13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C 和
 89L,
 20 c) 3C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C
 和 89L,
 d) 9C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、76S、82H、88C
 和 89L,
 e) 13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L,
 25 f) 3C、13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L,
 g) 9C、13S、32F、41K、45T、48V、62K、67Q、69S、82H、88C 和 89L,
 h) 13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、
 88C、89L 和 93C,
 i) 3C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、
 30 88C、89L 和 93C, 和
 j) 9C、13S、25S、32F、41K、45T、48V、62K、66C、67Q、69S、76S、82H、
 88C、89L 和 93C。

5. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的二聚化多肽, 其中, 所述 Obscurin-样-O
 35 链为 SEQ ID NO: 34 或其变体, 所述 SEQ ID NO: 34 的变体在选自第 6、26、74、
 77、84 和 86 位中的一个或更多个位点上具有氨基酸残基取代;

优选地，所述 SEQ ID NO: 34 的变体具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一个或多个氨基酸残基取代；

更优选地，所述 SEQ ID NO: 34 的变体具有选自 A) 至 F) 中任一项的氨基酸残基取代：

- 5 A) 6E 和 74C，
 B) 6E 和 84C，
 C) 6E 和 86C，
 D) 6E、26S、77S 和 74C，
 E) 6E、26S、77S 和 84C，和
10 F) 6E、26S、77S 和 86C。

6. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的二聚化多肽，其中，

所述 Titin-T 链是 SEQ ID NO: 32、68 或 127 的变体，所述变体具有选自 60S 和 64T 中的一个或多个氨基酸残基取代，所述 Obscurin-O 链是 SEQ ID NO: 33、
15 80 或 128 的变体，所述变体具有选自 13S、32F、48V、66C、82H 和 93C 中的一个或多个氨基酸残基取代；

优选的，所述 Titin-T 链与 SEQ ID NO: 129 至 SEQ ID NO: 131 中任一氨基酸序列具有至少 85% 的序列同一性，所述 Obscurin-O 链与 SEQ ID NO: 132 至 SEQ ID NO: 141 中任一氨基酸序列具有至少 85% 的序列同一性；

20 更优选的，所述 Titin-T 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 至 SEQ ID NO: 131 中任一所示，所述 Obscurin-O 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 132 至 SEQ ID NO: 141 中任一所示。

7. 一种抗原结合分子，其包含权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽。

25

8. 如权利要求 7 所述的抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含结构域改造的 Fab，所述结构域改造的 Fab 包含重链可变区 VH1、轻链可变区 VL1 和所述的二聚化多肽，但不包含轻链恒定区 CL 与重链恒定区 CH1，所述 VH1 与 VL1 分别通过连接子与二聚化多肽中的任一条肽链连接；

30 优选地，所述 VH1 的 C 端通过连接子融合至如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽的 Titin-T 链的 N 端，所述 VL1 的 C 端通过连接子融合至如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽的 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端；
或者

所述 VL1 的 C 端通过连接子融合至如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化
35 多肽的 Titin-T 链的 N 端，所述 VH1 的 C 端通过连接子融合至如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽的 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端。

9. 如权利要求 7 或 8 中所述的抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含：

a. 从 N 端到 C 端依次为[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]的肽链和从 N 端到 C 端依次为[VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]的肽链；或

5 b. 从 N 端到 C 端依次为[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]的肽链和从 N 端到 C 端依次为[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]的肽链；

所述连接子 1 与连接子 2 相同或不相同；

所述 Titin-T 链和 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链如权利要求 1 至 6 中任一项所定义；

10 优选地，

A) 连接子 1 和连接子 2 均为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 0-6 的整数，或

B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列，连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列；更优选地，

15 A) 连接子 1 如 SEQ ID NO: 173 所示；连接子 2 如 SEQ ID NO: 174 所示；或

B) 连接子 1 和连接子 2 均如 SEQ ID NO: 175 所示；或

C) 连接子 1 和连接子 2 均如 SEQ ID NO: 176 所示。

20 10. 如权利要求 7 至 9 中任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子还包含 Fc 区；所述 Fc 区包含能够彼此缔合的第一亚基 Fc1 与第二亚基 Fc2；

优选地，所述 Fc 区具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代；和/或所述 Fc 区具有一个或多个能够减少 Fc 区与 Fc 受体结合的氨基酸取代；

25 更优选地，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构；或者所述 Fc2 具有根据杵臼技术的凸起结构，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的孔结构；

最优选地，所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示，所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示；或者所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示，所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示。

30

11. 如权利要求 7 至 10 中任一项所述的抗原结合分子，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，其中所述第二抗原结合部分包含重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2，并且所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分结合不同的抗原或者结合同一种抗原上的不同的表位；

35 优选地，所述第二抗原结合部分包含 Fab。

12. 如权利要求 11 所述的抗原结合分子，其包含第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链；其中

a. 所述第一重链从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

5 所述第一轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]，

所述第二重链从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，

所述第二轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；或

b. 所述第一重链从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或
10 Obscurin-样-O 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

所述第一轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，

所述第二重链从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，

所述第二轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 相同或不相同；

15 优选地，所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代；

更优选地，

A) 连接子 1、连接子 2 和连接子 3 均为 $(G_xS)_y$ ，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 0-6 的整数，或

20 B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列，连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列，连接子 3 为 $(G_xS)_y$ ，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 0-6 的整数；

最优选地，

A) 连接子 1 如 SEQ ID NO: 173 所示；连接子 2 如 SEQ ID NO: 174 所示；连接子 3 为键；或

25 B) 连接子 1 和连接子 2 均如 SEQ ID NO: 175 所示；连接子 3 为键；或

C) 连接子 1 和连接子 2 均如 SEQ ID NO: 176 所示；连接子 3 为键。

13. 如权利要求 12 所述的抗原结合分子，其中：

(I) 所述抗原结合分子能够结合 NGF 和 RANKL；

30 优选地，

所述抗原结合分子包含第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中：

第一重链从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

第一轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，

35 第二重链从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，和

第二轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

其中：VH1 与 VL1 形成结合 NGF 的第一抗原结合部分，和 VH2 与 VL2 形成结合 RANKL 的第二抗原结合部分；或

VH1 与 VL1 形成结合 RANKL 的第一抗原结合部分，和 VH2 与 VL2 形成结合 NGF 的第二抗原结合部分；

5 更优选地，

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 26 所示，所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 27 所示，所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 24 所示，所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 25 所示，或者

10 所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 24 所示，所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 25 所示，所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 26 所示，所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 27 所示；

并且，所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 132 至 141 中任一所示，所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 129 至 131 中任一所示；

最优选地，

15 所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示；所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示；所述 CH1 的序列如 SEQ ID NO: 179 所示；所述 CL 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示；所述连接子 3 是键，所述连接子 1 和连接子 2 选自：a) 连接子 1 和连接子 2 均如 SEQ ID NO: 175 所示；或 b) 连接子 1 如 SEQ ID NO: 173 所示，和连接子 2 如 SEQ ID NO: 174 所示；

20 (II) 所述抗原结合分子能够结合 PDL1 和 CTLA4；

优选地，

所述抗原结合分子包含第一重链、第一轻链、第二重链、和第二轻链，其中：第一重链从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 3]-[Fc1]，

25 第一轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]，

第二重链从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[CH1]-[Fc2]，和

第二轻链从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；其中：

VH1 与 VL1 形成结合 PDL1 的第一抗原结合部分，和 VH2 与 VL2 形成结合 CTLA4 的第二抗原结合部分；或

30 VH1 与 VL1 形成结合 CTLA4 的第一抗原结合部分，和 VH2 与 VL2 形成结合 PDL1 的第二抗原结合部分；

更优选地，

35 所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示，所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示，所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 169 所示，所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 170 所示；或者

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 169 所示，所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO:

170 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示;

并且, 其中所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 132 至 141 中任一所示, 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 129 至 131 中任一所示;

5 最优选地,

所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示; 所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示; 所述 CH1 的序列如 SEQ ID NO: 179 所示; 所述 CL 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述连接子 3 是键, 所述连接子 1 和连接子 2 选自: a) 连接子 1 和连接子 2 均如 SEQ ID NO: 175 所示; 或 b) 连接子 1 如 SEQ ID NO: 173 所示, 和连接子 2 如 SEQ ID NO: 174 所示; 或

(III) 所述抗原结合分子能够结合 IL5 和 TSLP;

优选地,

所述抗原结合分子包含第一重链、第一轻链、第二重链、和第二轻链, 其中: 第一重链从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[Fc1]; 15 第一轻链从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链]; 第二重链从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[CH1]-[Fc2]; 和 第二轻链从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[CL]; 其中:

VH1 与 VL1 形成结合 IL5 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 TSLP 的第二抗原结合部分; 或

20 VH1 与 VL1 形成结合 TSLP 的第一抗原结合部分, 和 VH2 与 VL2 形成结合 IL5 的第二抗原结合部分;

更优选地,

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 16 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 171 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 25 172 所示, 或者

所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 171 所示, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 172 所示, 所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 16 所示, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

30 并且, 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 132 至 141 中任一所示, 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 129 至 131 中任一所示;

最优选地,

所述 Fc1 的序列如 SEQ ID NO: 178 所示; 所述 Fc2 的序列如 SEQ ID NO: 177 所示; 所述 CH1 的序列如 SEQ ID NO: 179 所示; 所述 CL 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 所述连接子 3 是键; 所述连接子 1 和连接子 2 选自: a) 连接子 1 和连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 175 所示; 或 b) 连接子 1, 其序列如 SEQ ID NO: 35 173 所示, 和连接子 2, 其序列如 SEQ ID NO: 174 所示。

14. 如权利要求 11 所述的抗原结合分子，其包含：

a. 第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1]；

5 第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Titin-T 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2]；

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]；和

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；或者

10 b. 第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc1]；

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链]-[连接子 3]-[VH2]-[CH1]-[Fc2]

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 2]-[Titin-T 链]；和

15 第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[CL]；

所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 相同或不相同；

优选地，所述 Fc1 和 Fc2 相同，或者所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或更多个减少同源二聚化的氨基酸取代；

更优选地，

20 A) 连接子 1、连接子 2 和连接子 3 均为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 0-6 的整数；优选均如 SEQ ID NO: 175 或 SEQ ID NO: 176 所示，或

B) 连接子 1 为 CH1 的 C 端截短的序列，优选如 SEQ ID NO: 173 所示；连接子 2 为 CL 的 C 端截短的序列，优选如 SEQ ID NO: 174 所示；连接子 3 为 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 0-6 的整数，优选如 SEQ ID NO: 175 或 SEQ ID NO: 176 所示；

最优选地，

所述抗原结合分子能够结合 PDL1 和 TIGIT。

30 15. 一种抗原结合分子，其包含能与 PDL1 特异性结合的第一抗原结合部分和能与 TIGIT 特异性结合第二抗原结合部分，其中所述第一抗原结合部分包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1，第二抗原结合部分包含重链可变区 VH2 和轻链可变区 VL2；其中，

35 所述 VH1 包含分别如 SEQ ID NO: 163、SEQ ID NO: 164 和 SEQ ID NO: 165 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL1 包含分别如 SEQ ID NO: 166、SEQ ID NO: 167、SEQ ID NO: 168 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；和/或

所述 VH2 包含分别如 SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158 和 SEQ ID NO: 159 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL2 包含分别如 SEQ ID NO: 160、SEQ ID NO: 161、SEQ ID NO: 162 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

优选地,

5 所述 VH1 的序列如 SEQ ID NO: 156 所示或与 SEQ ID NO: 156 具有至少 90% 序列同一性, 所述 VL1 的序列如 SEQ ID NO: 155 所示或与 SEQ ID NO: 155 具有至少 90% 序列同一性; 和/或

所述 VH2 的序列如 SEQ ID NO: 154 所示或与 SEQ ID NO: 154 具有至少 90% 序列同一性, 所述 VL2 的序列如 SEQ ID NO: 153 所示或与 SEQ ID NO: 153 具有至少 90% 序列同一性;

更优选地, 所述抗原结合分子具有:

重链, 其序列如 SEQ ID NO: 148 所示或与 SEQ ID NO: 148 具有至少 90% 序列同一性;

15 第一轻链, 其序列如 SEQ ID NO: 146 所示或与 SEQ ID NO: 146 具有至少 90% 序列同一性; 和

第二轻链, 其序列如 SEQ ID NO: 147 所示或与 SEQ ID NO: 147 具有至少 90% 序列同一性。

16. 一种结构改造的抗体, 其为重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL 被权利要求 20 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽替代的抗体;

优选地, 所述重链恒定区 CH1 被 Titin-T 链替代, 所述轻链恒定区 CL 被 Obscurin-O 链替代; 或者所述轻链恒定区 CL 被 Titin-T 链替代, 所述重链恒定区 CH1 被 Obscurin-O 链替代。

25 17. 一种药物组合物, 其包含如权利要求 7 至 15 中任一项所述的抗原结合分子或如权利要求 16 所述结构改造的抗体, 以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

18. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽在减少多特异性抗体制备过程 30 中轻链/重链错配中的用途;

优选的, 在减少双特异性抗体制备过程中轻链/重链错配中的用途。

19. 一种核酸分子, 其编码如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽、如 35 权利要求 7 至 15 中任一项所述的抗原结合分子或如权利要求 16 所述的结构改造的抗体。

20. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 19 所述的核酸分子。

21. 一种制备如权利要求 1 至 6 中任一项所述的二聚化多肽、如权利要求 7 至 15 中任一项所述的抗原结合分子或如权利要求 16 所述的结构改造的抗体的方法，其包含步骤：培养权利要求 20 所述的宿主细胞，然后纯化并回收二聚化多肽、抗原结合分子或结构改造的抗体。

5

22. 如权利要求 7 至 15 中任一项所述的抗原结合分子、如权利要求 16 所述的结构改造的抗体或如权利要求 17 所述药物组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。

10

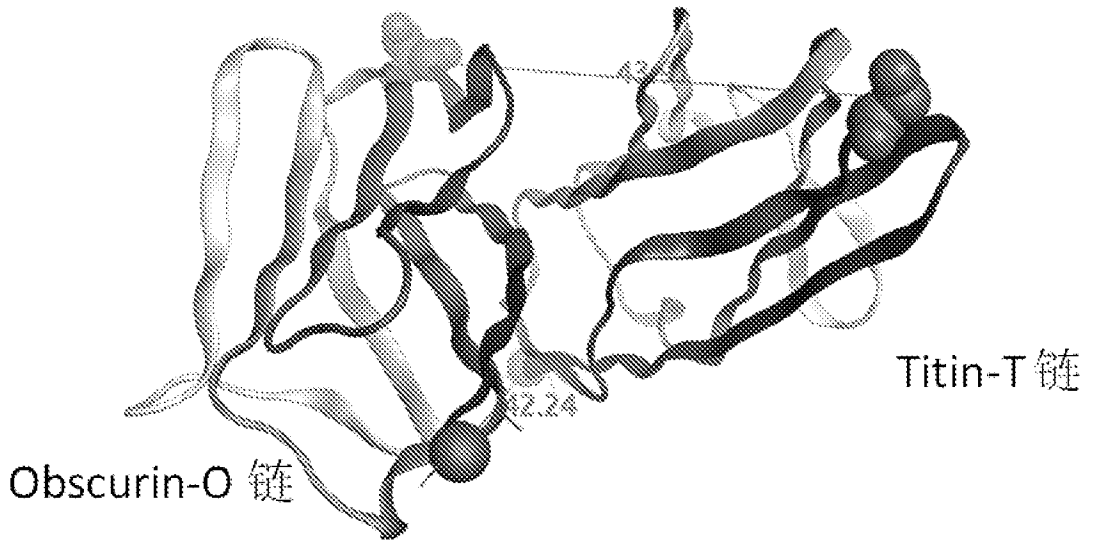


图 1A

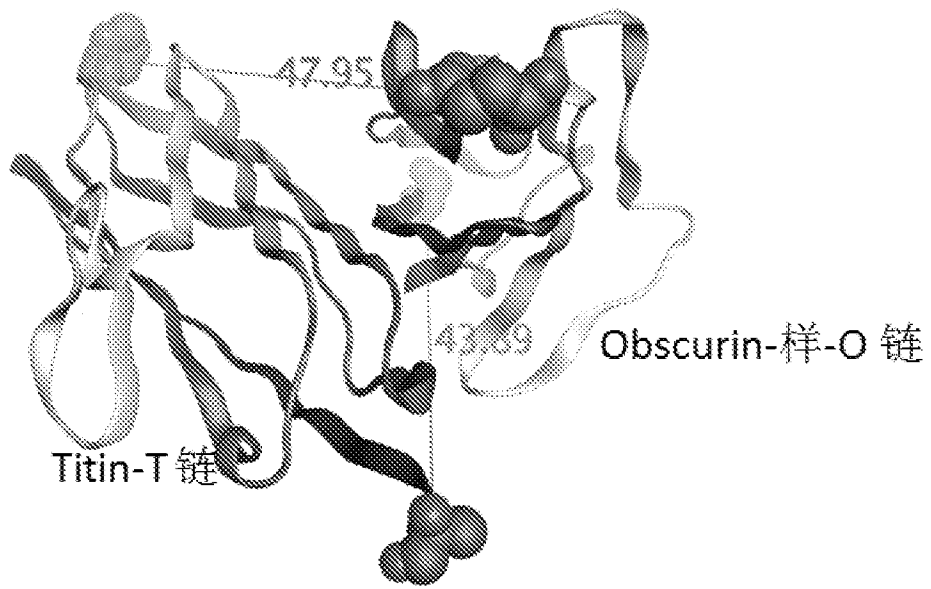


图 1B

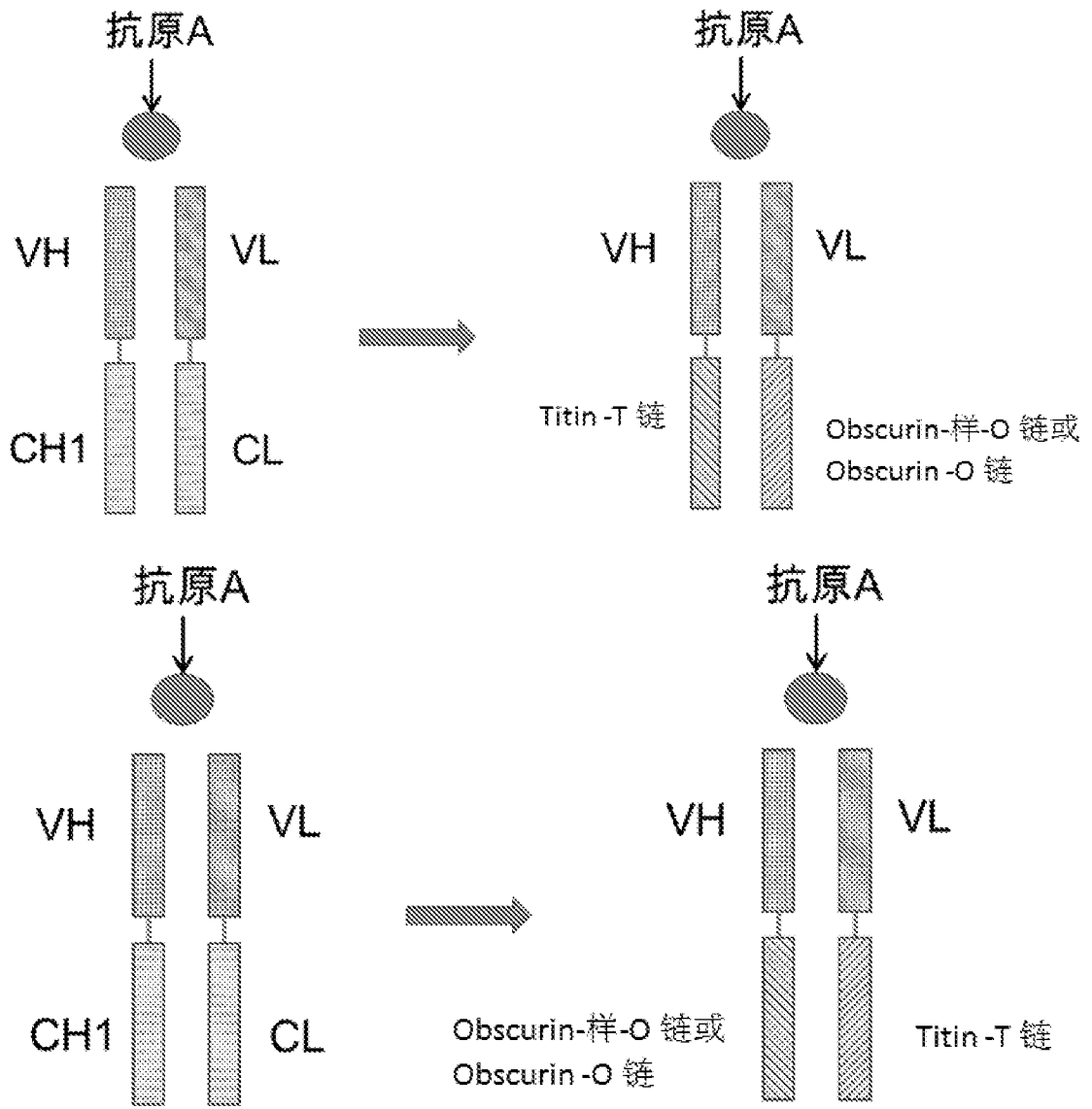


图 2

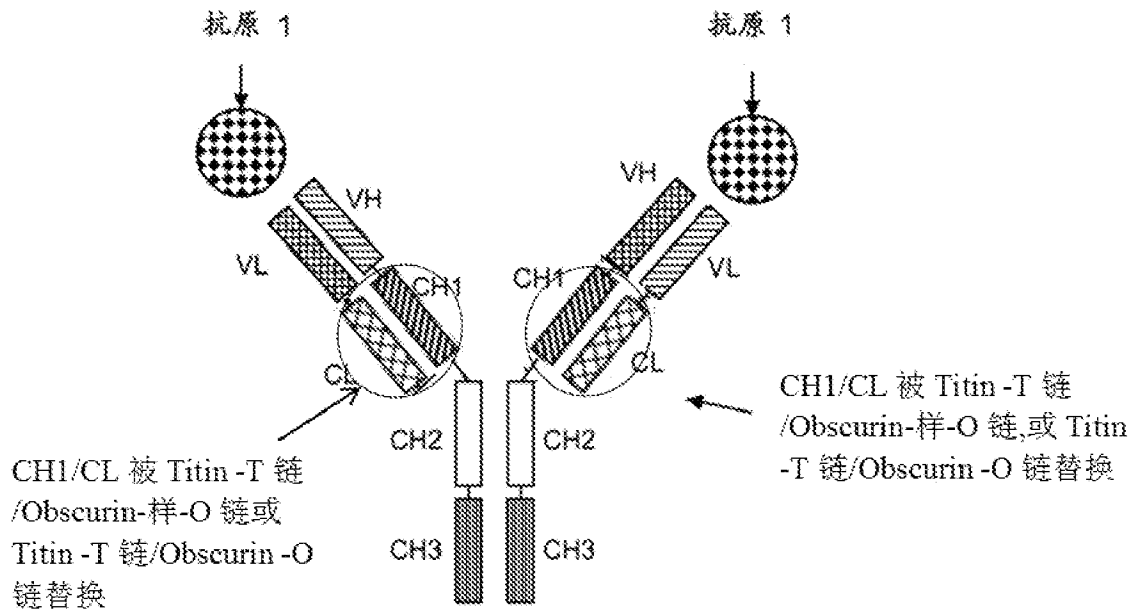


图 3

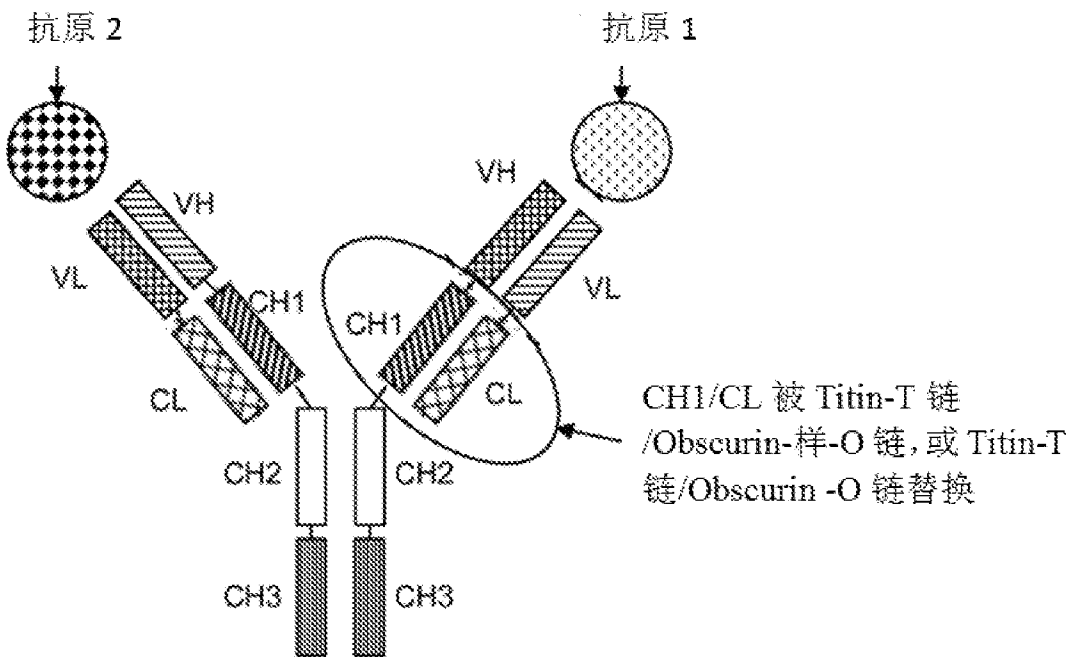


图 4

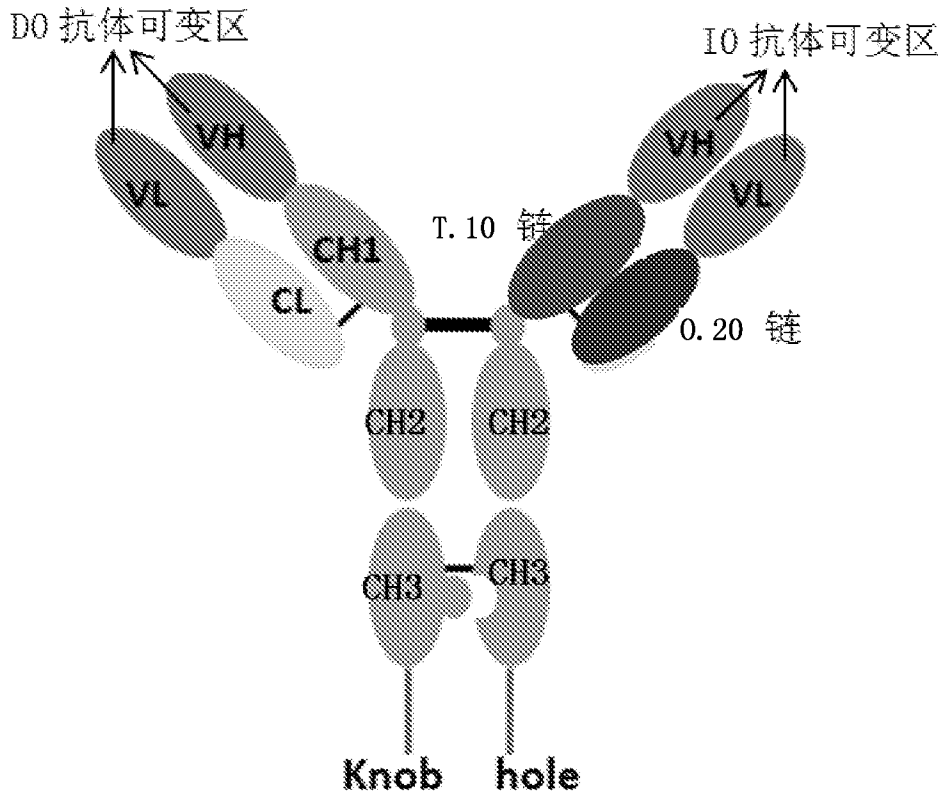
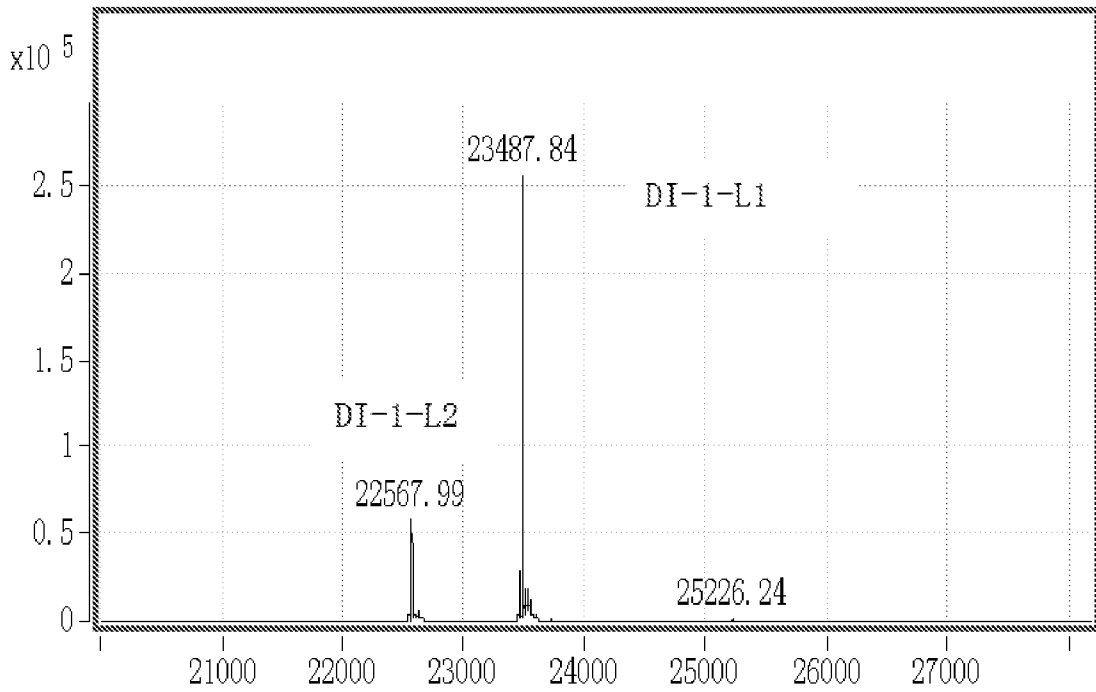


图 5



计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 6A

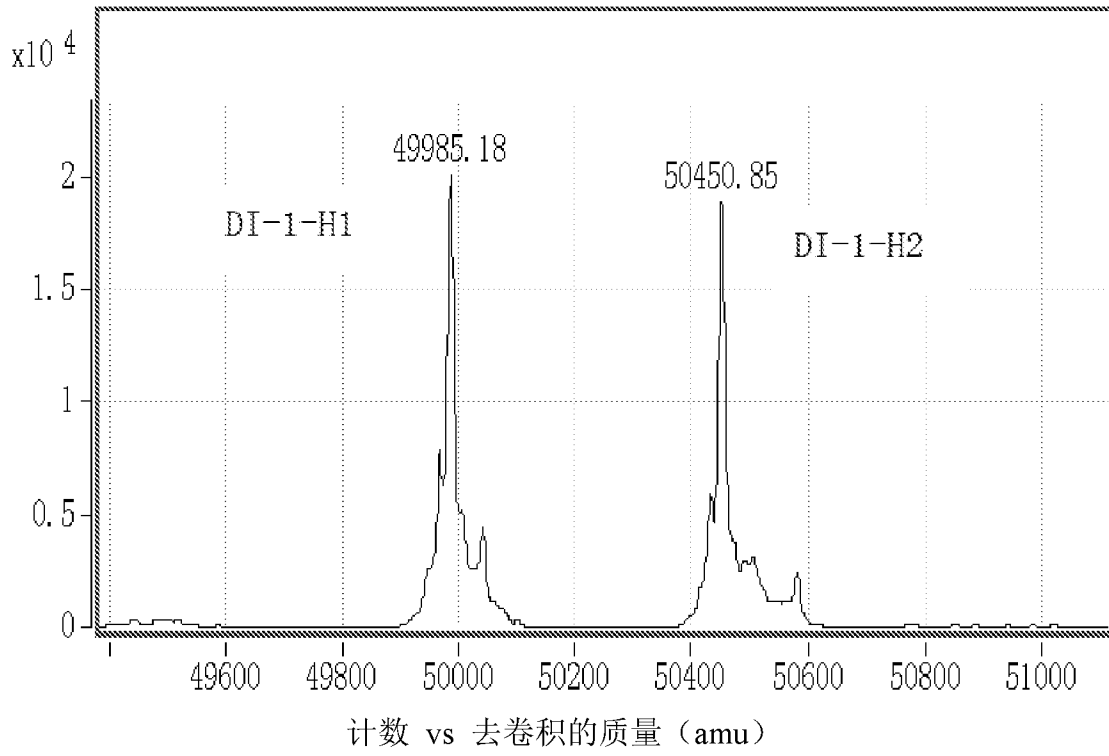


图 6B

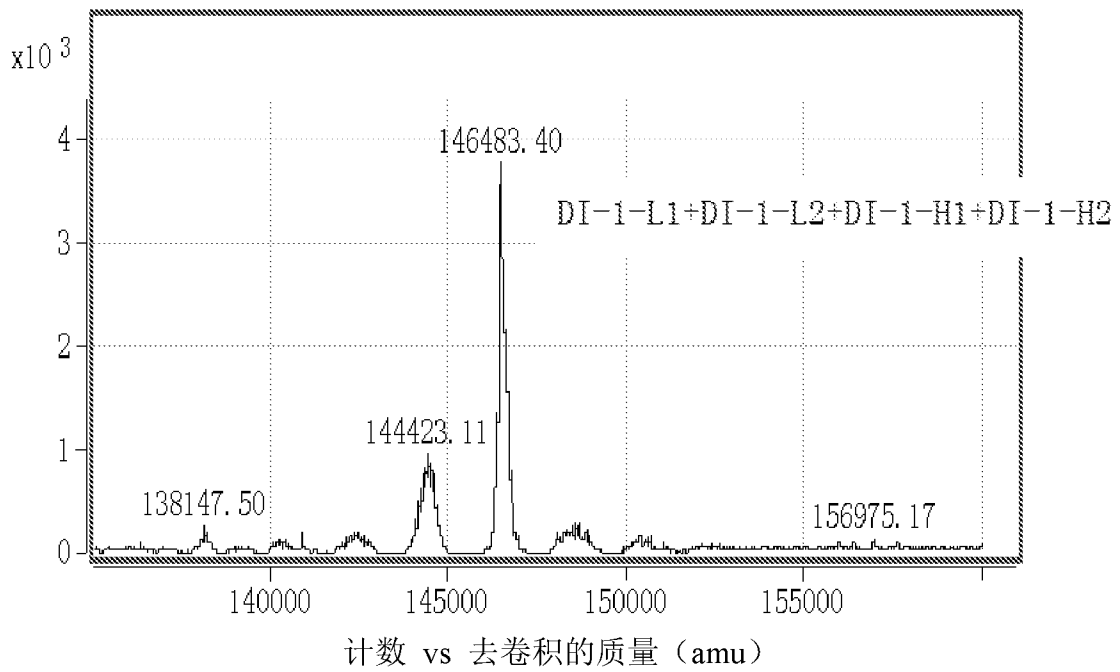


图 6C

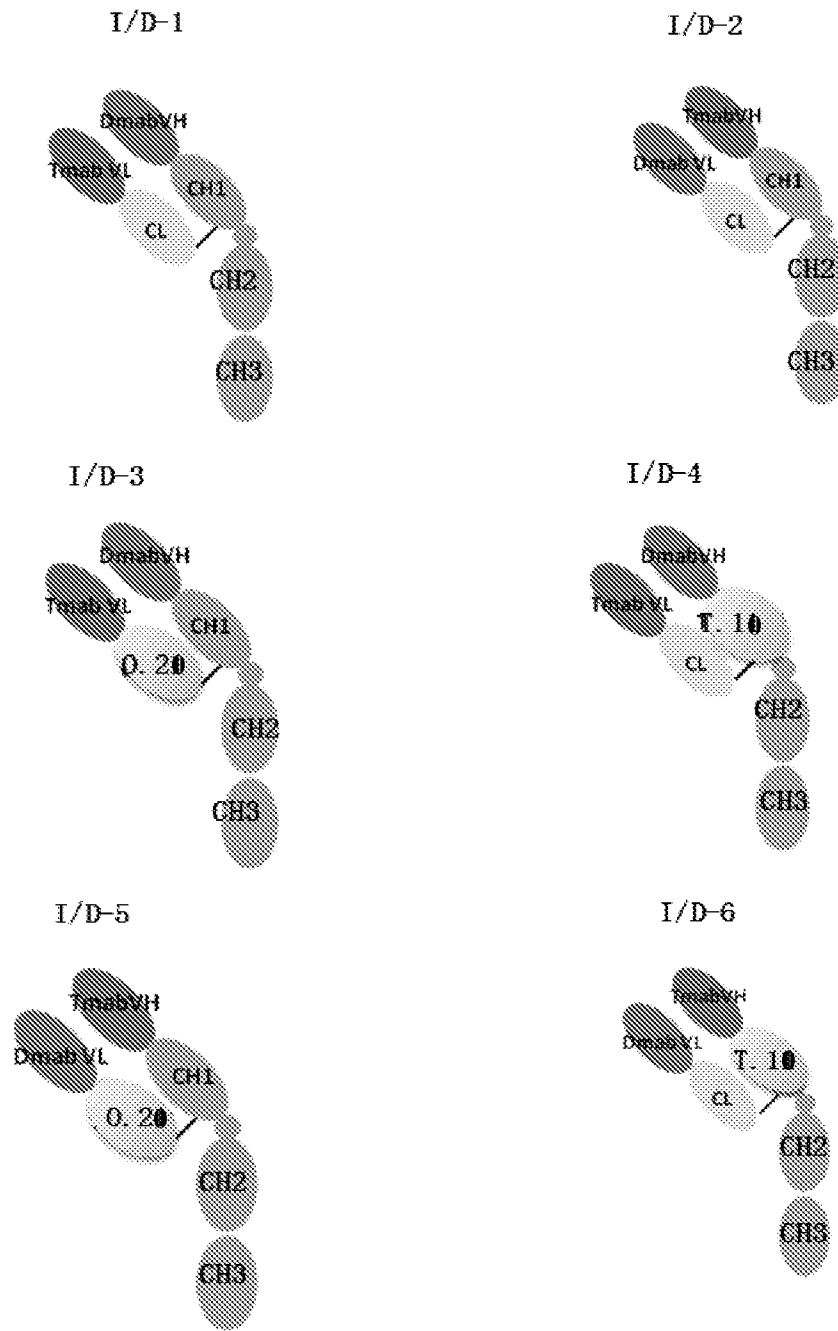


图 7

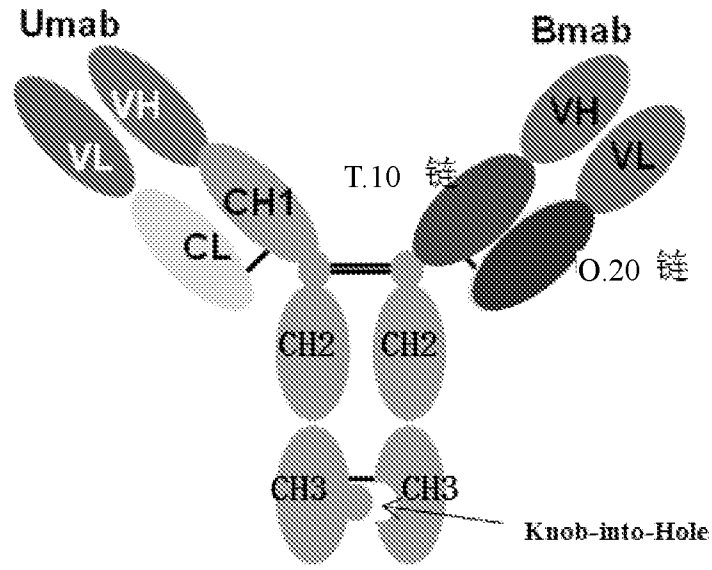
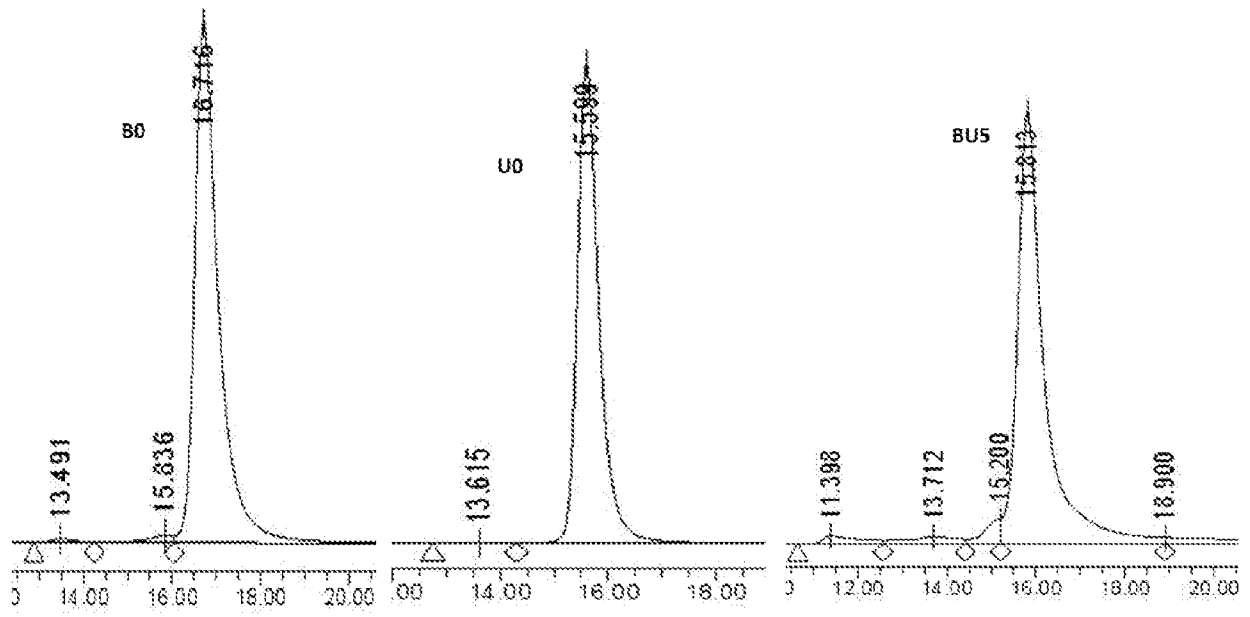


图 8



分钟
图 9A

分钟
图 9B

分钟
图 9C

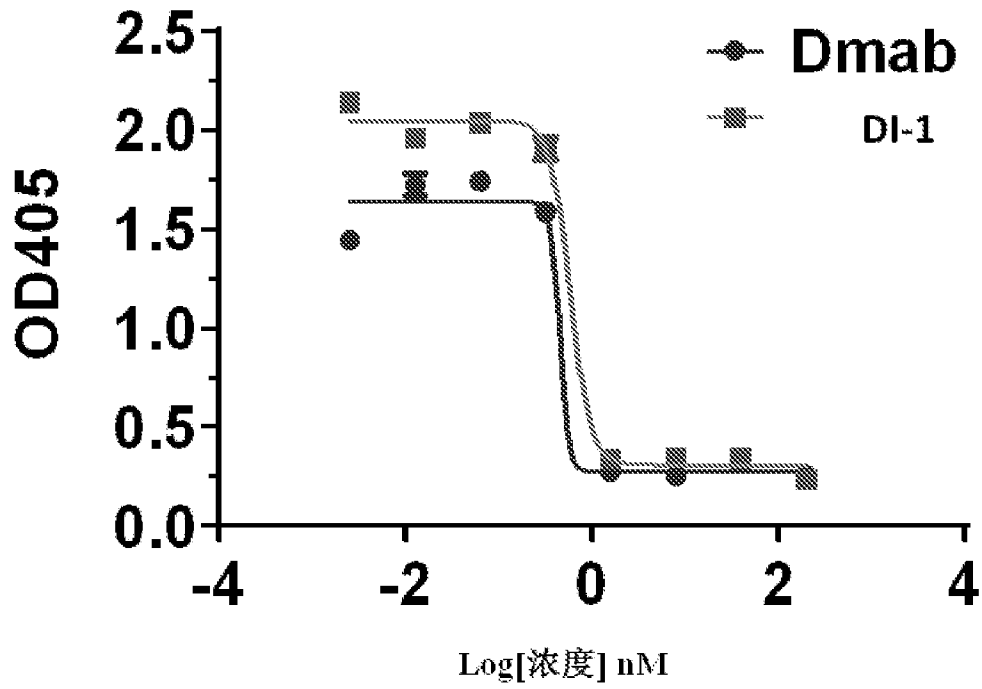


图 10

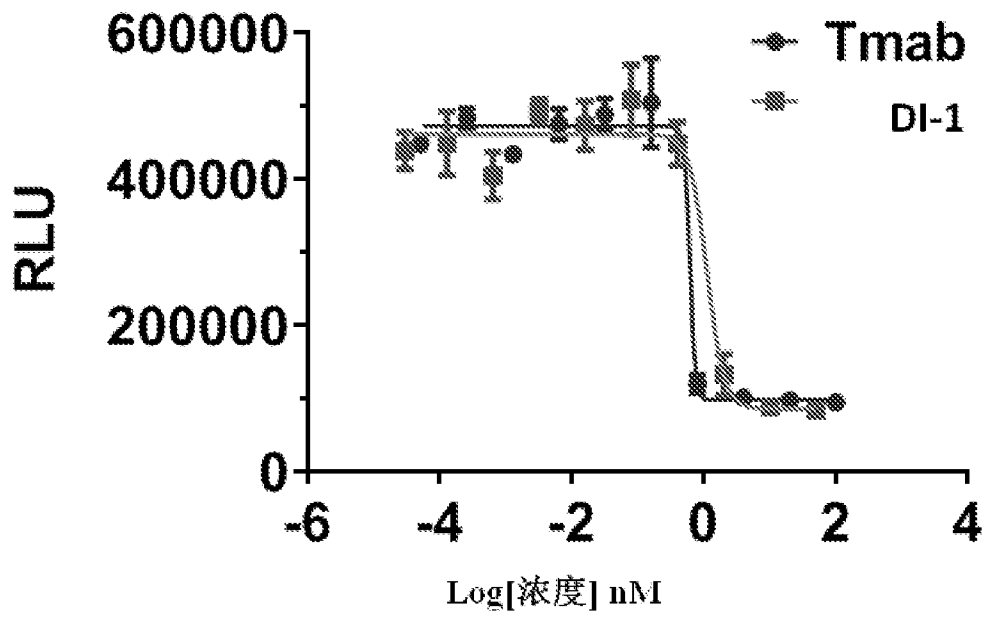


图 11

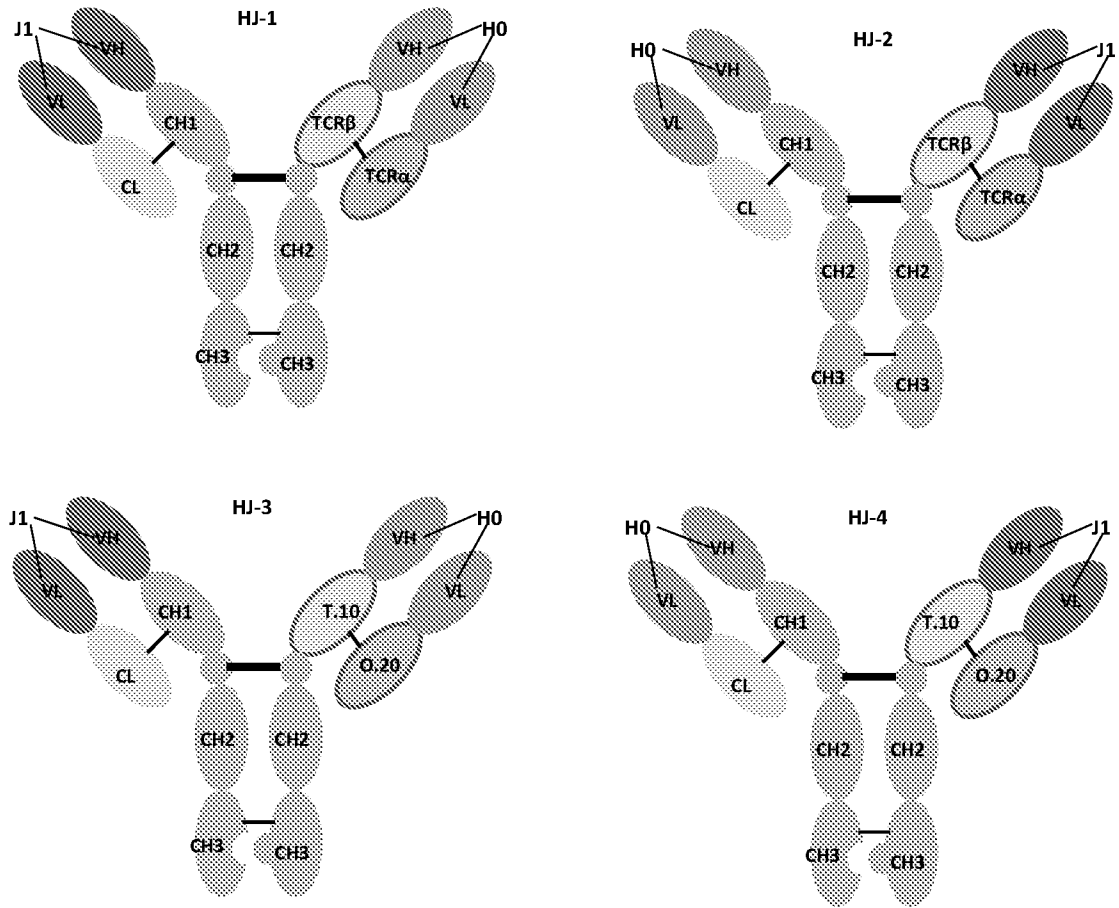
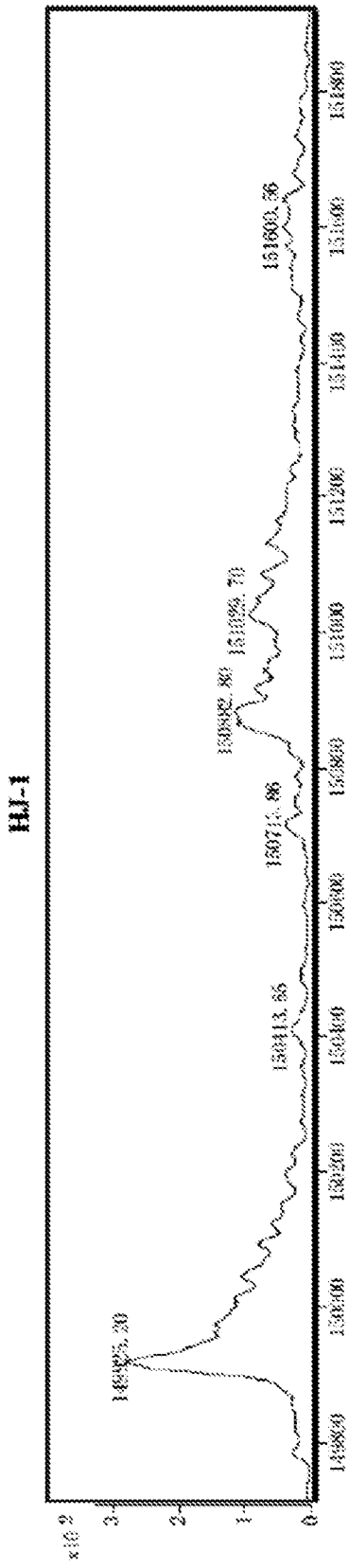
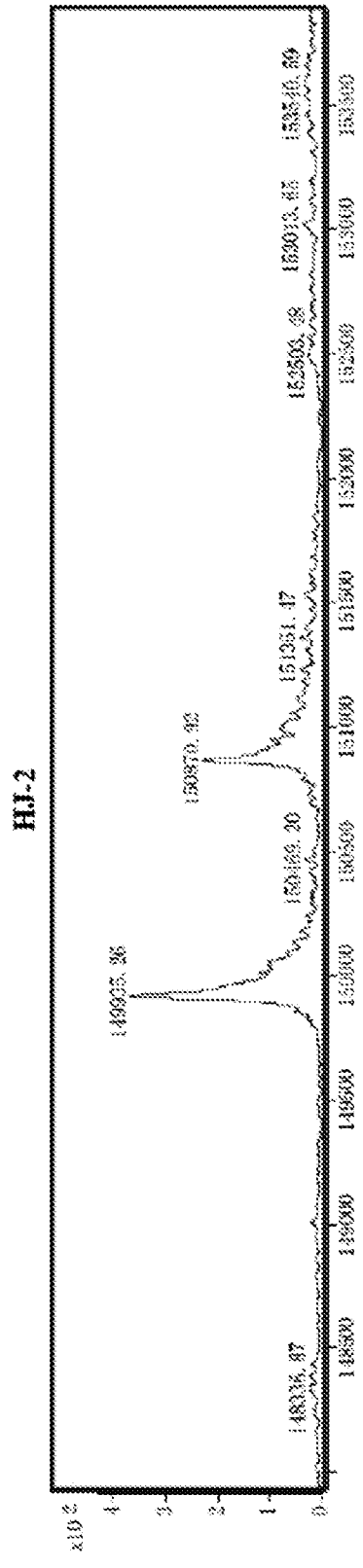


图 12



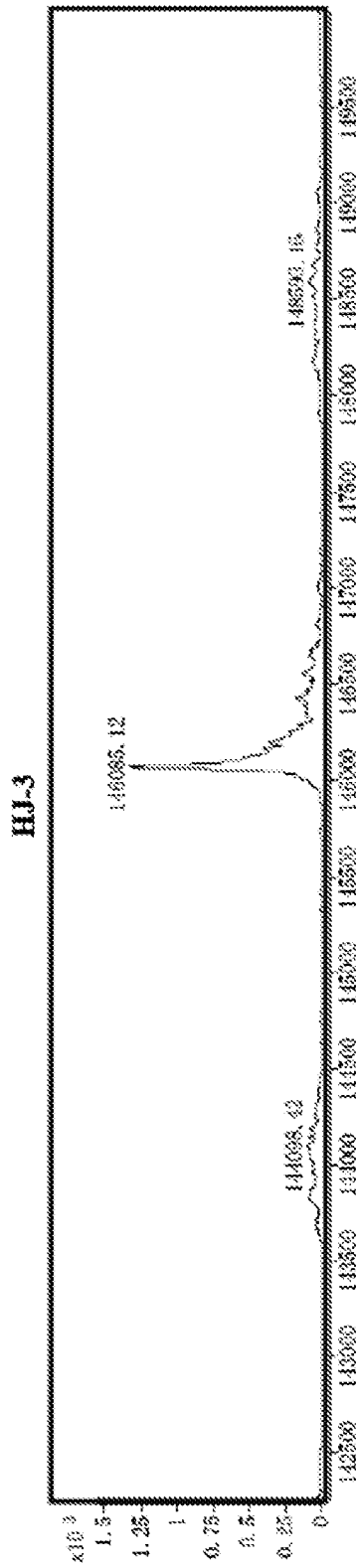
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 13A



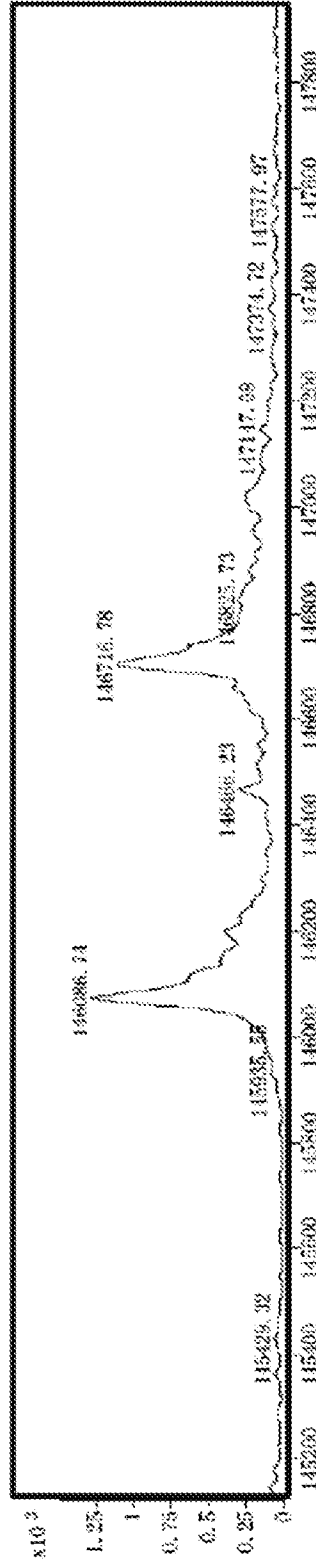
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 13B



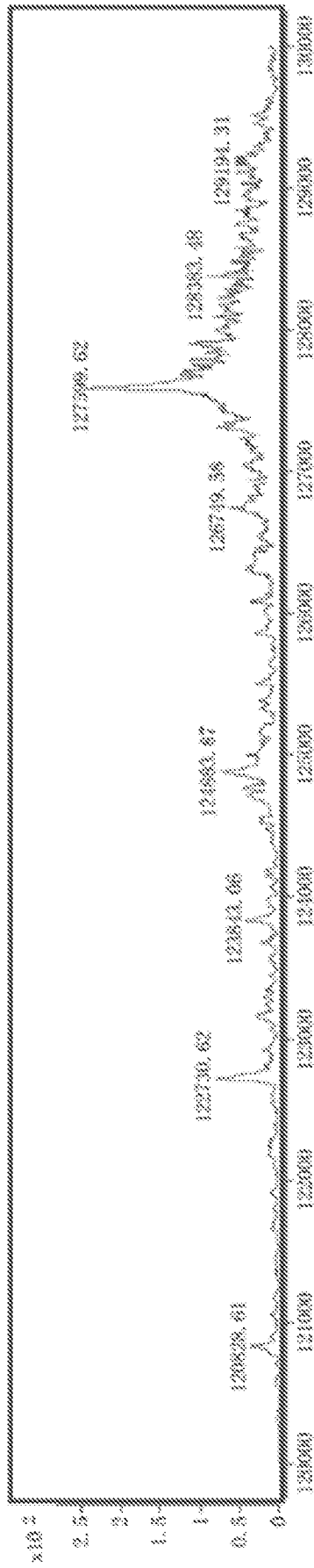
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 13C



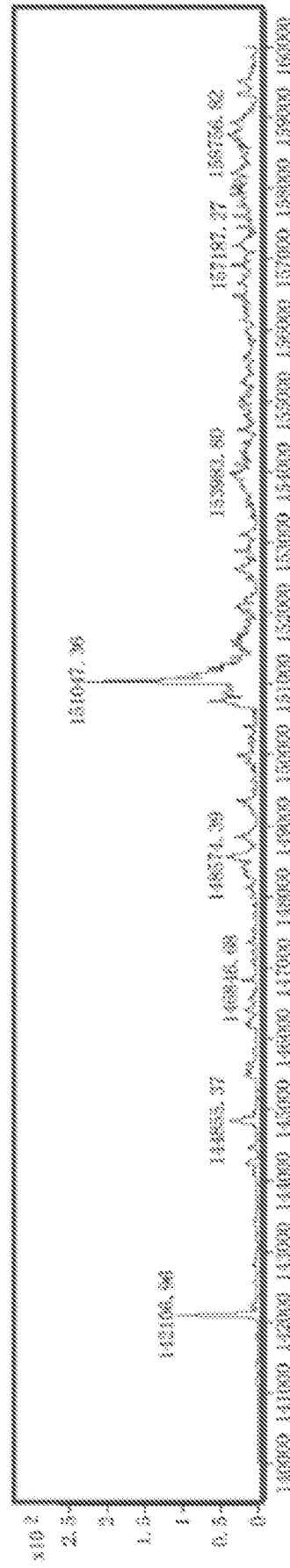
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 13D



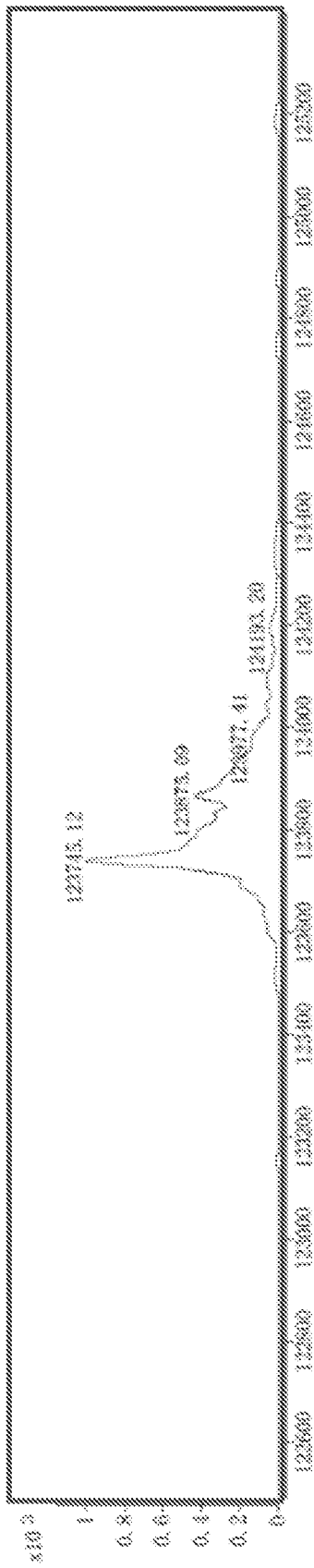
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 14A



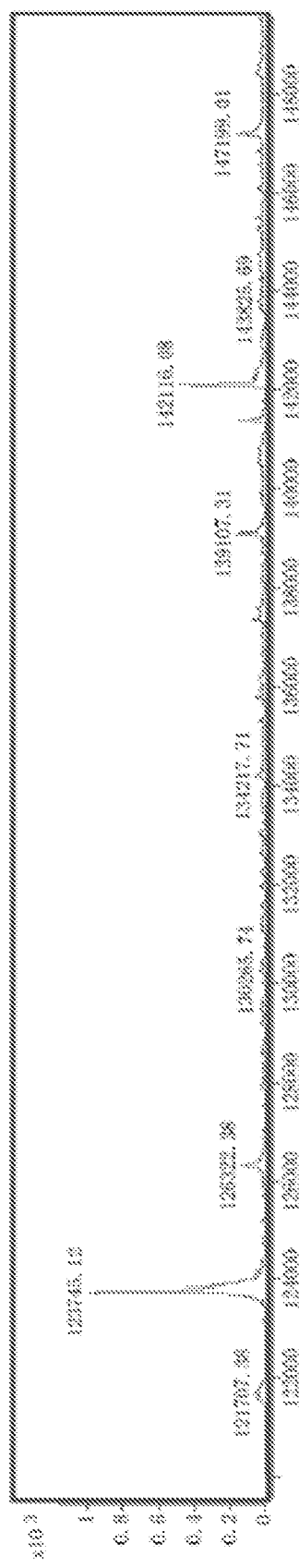
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 14B



计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 15A



计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 15 B

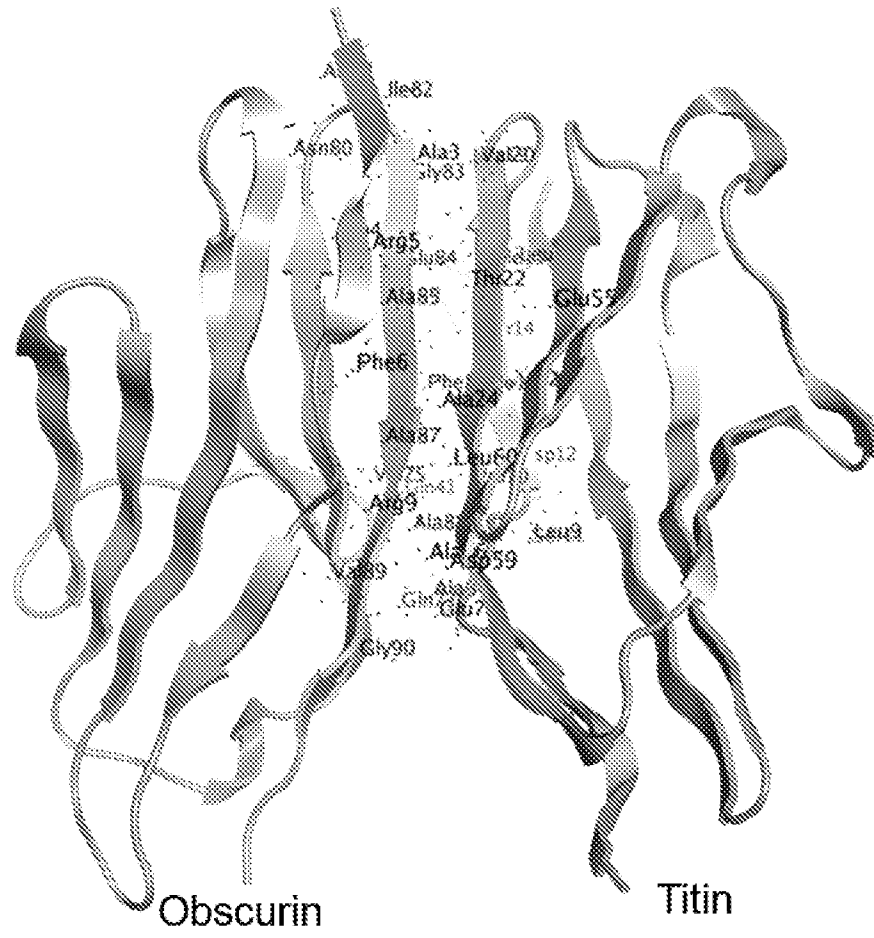


图 16A

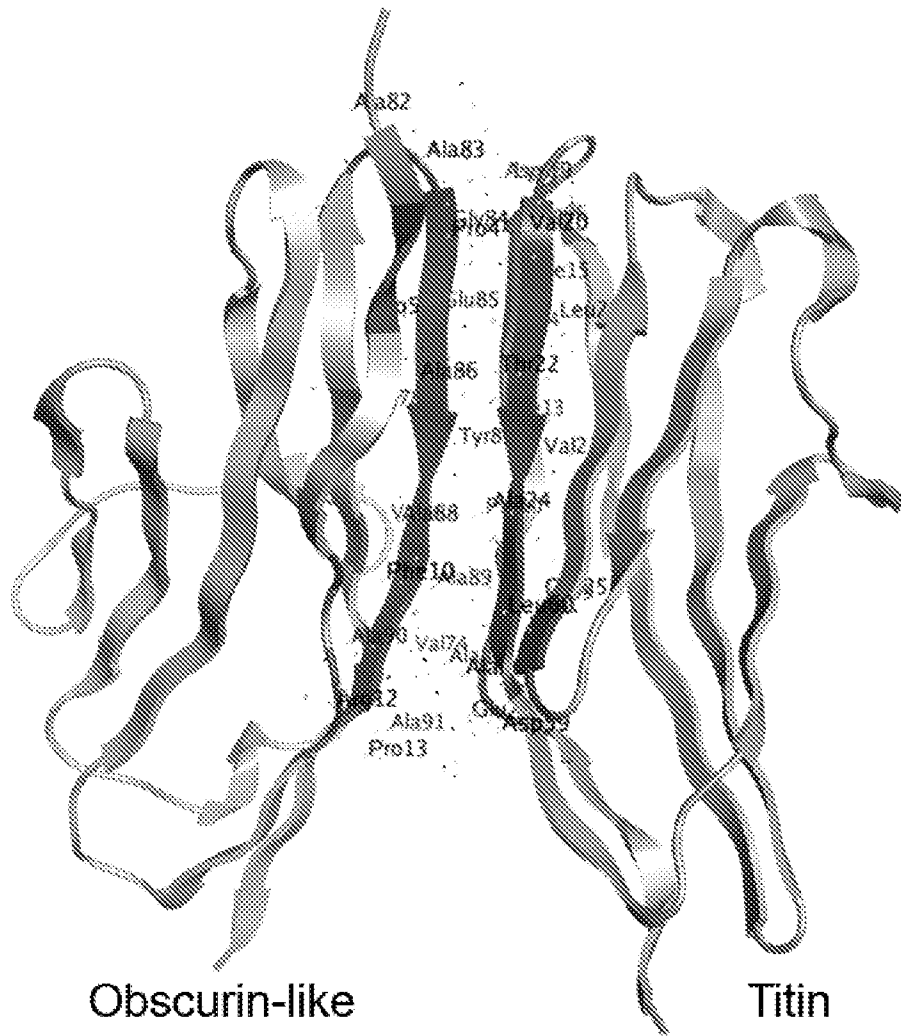


图 16B

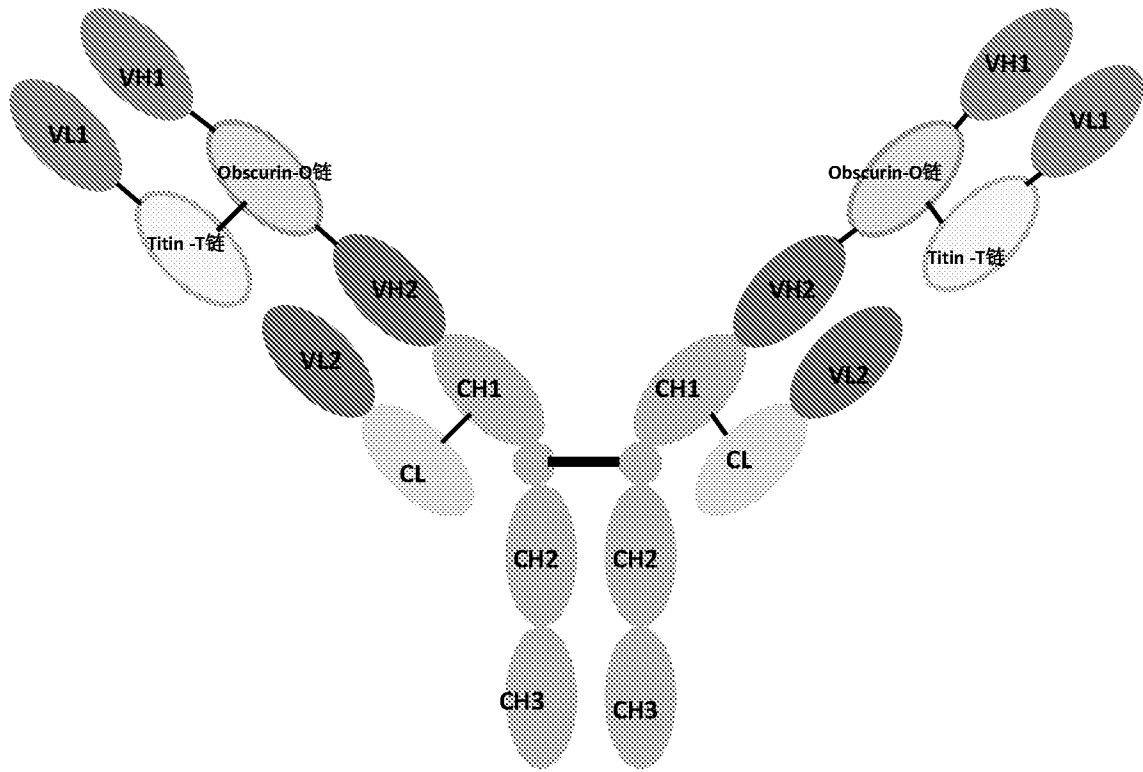


图 17

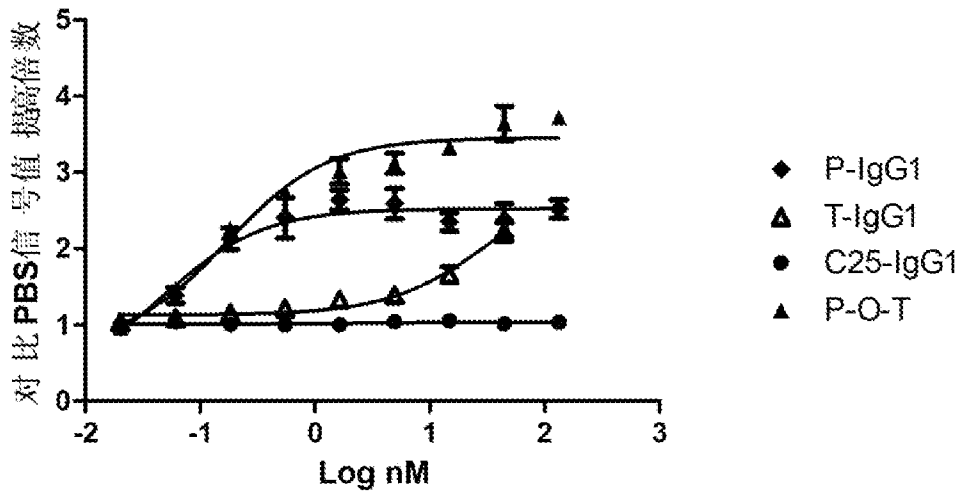


图 18

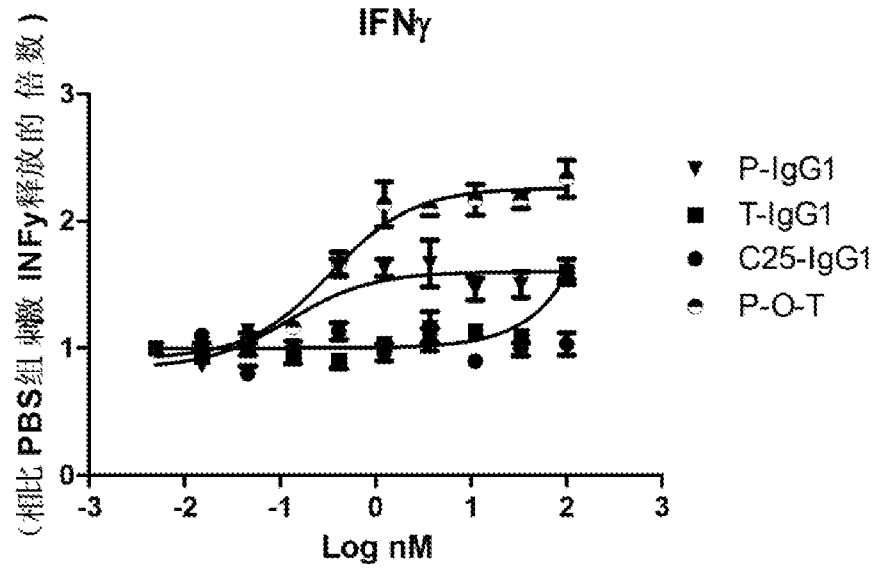


图 19

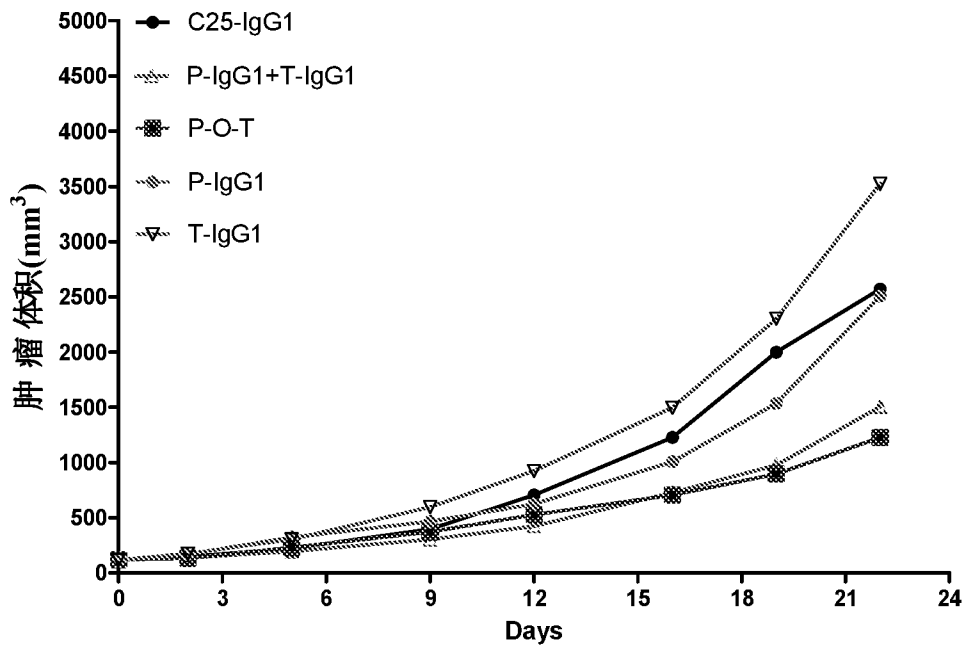


图 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/092529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C12N 15/12(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; C12N; G01N		
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) CNTXT, CNABS, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PUBMED, BAIDU, ISI Web of knowledge, CNKI, GENBANK, SNT: 二聚化, 二聚体, Titin, T链, Obscurin, O链, SEQ ID NO: 32-33, 60, 64, 8, 11, 13, 20, 22, 25, 26, 39, 40, 42, 45, 47, 49, 53, 56, 58, 62, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S, 66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D, 84L, 13, 32, 48, 66, 82, 93, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 14, 17, 20, 22, 30, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 76, 88, 89, 92, 94, 97, 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M, 22S, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 67Q/67T, 69S, 76S, 88C, 89L, 92E, 94G, 97G, 抗体, 抗原结合, antibody, Fab, CH1, CL, 突变, 变体, 双特异性, 肌联蛋白, 模糊蛋白, mutation.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108601830 A (BIOGEN IDEC INC.) 28 September 2018 (2018-09-28) entire document	1-22
A	PERNIGO, S. et al. "The Crystal Structure of the Human Titin:Obscurin Complex Reveals a Conserved yet Specific Muscle M-Band Zipper Module" <i>Journal of Molecular Biology</i> , Vol. volume 427, 06 December 2014 (2014-12-06), pages 718-736	1-22
A	RUDLOFF, M. W. et al. "Biophysical characterization of naturally occurring titin M10 mutations" <i>PROTEIN SCIENCE</i> , Vol. 24, 02 April 2015 (2015-04-02), pages 946-955	1-22
A	US 2018/0177873 A1 (GENENTECH, INC.) 28 June 2018 (2018-06-28) entire document	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 August 2022		Date of mailing of the international search report 10 August 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/092529

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/0232541 A1 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 20 August 2015 (2015-08-20) entire document	1-22
A	CN 104080909 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 01 October 2014 (2014-10-01) entire document	1-22

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/092529

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108601830	A	28 September 2018	US	2019048098	A1	14 February 2019
				MA	44054	A	24 October 2018
				JP	2019502694	A	31 January 2019
				AU	2016370821	A1	12 July 2018
				WO	2017106462	A1	22 June 2017
				JP	2021121642	A	26 August 2021
				CA	3008840	A1	22 June 2017
				KR	20180100136	A	07 September 2018
				EP	3389710	A1	24 October 2018
				US	2018/0177873	A1	28 June 2018
				EP	3286227	A2	28 February 2018
				HK	1250722	A1	11 January 2019
				IL	285366	A	30 September 2021
				KR	20170140331	A	20 December 2017
				CN	107787332	A	09 March 2018
				JP	2018516546	A	28 June 2018
				WO	2016172485	A2	27 October 2016
				JP	2020184996	A	19 November 2020
				MX	2017013482	A	01 March 2018
				IL	254738	D0	30 November 2017
				CA	2980189	A1	27 October 2016
US	2015/0232541	A1	20 August 2015	BR	112014028368	A2	14 November 2017
				JP	2015527982	A	24 September 2015
				HK	1208234	A1	26 February 2016
				RU	2015100656	A	20 August 2016
				MX	2014014804	A	12 February 2015
				WO	2014001325	A1	03 January 2014
				EP	2867254	A1	06 May 2015
				CN	104411718	A	11 March 2015
				CA	2871882	A1	03 January 2014
				KR	20150030744	A	20 March 2015
				CN	104080909	A	01 October 2014
				SG	11201402750 S	A	30 October 2014
				CN	113416256	A	21 September 2021
				WO	2013081143	A1	06 June 2013
				MX	2014006558	A	24 October 2014
				JP	2017171660	A	28 September 2017
				CN	113416257	A	21 September 2021
				HK	1198771	A1	05 June 2015
				US	2015056182	A1	26 February 2015
				BR	112014013081	A2	20 October 2020
				EP	2787081	A1	08 October 2014
				KR	20140100532	A	14 August 2014
				CA	2857159	A1	06 June 2013
				RU	2739792	C1	28 December 2020
				KR	20210074395	A	21 June 2021
				SG	10201609301 Q	A	29 December 2016
				US	2019218309	A1	18 July 2019
				JP	2020055872	A	09 April 2020
				JP	WO2013081143	A1	27 April 2015

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; A61P; C12N; G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXTX, CNABS, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PUBMED, BAIDU, ISI Web of knowledge, CNKI, GENBANK, SNT: 二聚化, 二聚体, Titin, T链, Obscurin, O链, SEQ ID NO: 32-33, 60, 64, 8, 11, 13, 20, 22, 25, 26, 39, 40, 42, 45, 47, 49, 53, 56, 58, 62, 66, 70, 75, 77, 79, 81, 82, 83, 84, 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 66S, 66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D, 84L, 13, 32, 48, 66, 82, 93, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 14, 17, 20, 22, 30, 34, 36, 41, 42, 44, 45, 53, 58, 62, 67, 69, 76, 88, 89, 92, 94, 97, 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y, 14T, 17E, 20L, 22M, 22S, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 67Q/67T, 69S, 76S, 88C, 89L, 92E, 94G, 97G, 抗体, 抗原结合, antibody, Fab, CH1, CL, 突变, 变体, 双特异性, 肌联蛋白, 模糊蛋白, mutation.</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 108601830 A (比奥根MA公司) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PERNIGO, S.等. "The Crystal Structure of the Human Titin:Obscurin Complex Reveals a Conserved yet Specific Muscle M-Band Zipper Module" J.Mol.Biol., 第427卷, 2014年12月6日 (2014 - 12 - 06), 第718-736页</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RUDLOFF, M.W.等. "Biophysical characterization of naturally occurring titin M10 mutations" PROTEIN SCIENCE, 第24卷, 2015年4月2日 (2015 - 04 - 02), 第946-955页</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 108601830 A (比奥根MA公司) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 全文	1-22	A	PERNIGO, S.等. "The Crystal Structure of the Human Titin:Obscurin Complex Reveals a Conserved yet Specific Muscle M-Band Zipper Module" J.Mol.Biol., 第427卷, 2014年12月6日 (2014 - 12 - 06), 第718-736页	1-22	A	RUDLOFF, M.W.等. "Biophysical characterization of naturally occurring titin M10 mutations" PROTEIN SCIENCE, 第24卷, 2015年4月2日 (2015 - 04 - 02), 第946-955页	1-22
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	CN 108601830 A (比奥根MA公司) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 全文	1-22												
A	PERNIGO, S.等. "The Crystal Structure of the Human Titin:Obscurin Complex Reveals a Conserved yet Specific Muscle M-Band Zipper Module" J.Mol.Biol., 第427卷, 2014年12月6日 (2014 - 12 - 06), 第718-736页	1-22												
A	RUDLOFF, M.W.等. "Biophysical characterization of naturally occurring titin M10 mutations" PROTEIN SCIENCE, 第24卷, 2015年4月2日 (2015 - 04 - 02), 第946-955页	1-22												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年8月1日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年8月10日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>刘苗</p> <p>电话号码 86-(10)-53961924</p>												

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2018/0177873 A1 (GENENTECH INC.) 2018年6月28日 (2018 - 06 - 28) 全文	1-22
A	US 2015/0232541 A1 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 2015年8月20日 (2015 - 08 - 20) 全文	1-22
A	CN 104080909 A (中外制药株式会社) 2014年10月1日 (2014 - 10 - 01) 全文	1-22

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/092529

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	108601830	A	2018年9月28日	US	2019048098	A1	2019年2月14日
				MA	44054	A	2018年10月24日
				JP	2019502694	A	2019年1月31日
				AU	2016370821	A1	2018年7月12日
				WO	2017106462	A1	2017年6月22日
				JP	2021121642	A	2021年8月26日
				CA	3008840	A1	2017年6月22日
				KR	20180100136	A	2018年9月7日
				EP	3389710	A1	2018年10月24日
				US	2018/0177873	A1	2018年6月28日
EP	3286227	A2	2018年2月28日				
HK	1250722	A1	2019年1月11日				
IL	285366	A	2021年9月30日				
KR	20170140331	A	2017年12月20日				
CN	107787332	A	2018年3月9日				
JP	2018516546	A	2018年6月28日				
WO	2016172485	A2	2016年10月27日				
JP	2020184996	A	2020年11月19日				
MX	2017013482	A	2018年3月1日				
IL	254738	D0	2017年11月30日				
CA	2980189	A1	2016年10月27日				
US	2015/0232541	A1	2015年8月20日				
				JP	2015527982	A	2015年9月24日
				HK	1208234	A1	2016年2月26日
				RU	2015100656	A	2016年8月20日
				MX	2014014804	A	2015年2月12日
				WO	2014001325	A1	2014年1月3日
				EP	2867254	A1	2015年5月6日
				CN	104411718	A	2015年3月11日
				CA	2871882	A1	2014年1月3日
				KR	20150030744	A	2015年3月20日
				CN	104080909	A	2014年10月1日
SG	11201402750S	A	2014年10月30日				
CN	113416256	A	2021年9月21日				
WO	2013081143	A1	2013年6月6日				
MX	2014006558	A	2014年10月24日				
JP	2017171660	A	2017年9月28日				
CN	113416257	A	2021年9月21日				
HK	1198771	A1	2015年6月5日				
US	2015056182	A1	2015年2月26日				
BR	112014013081	A2	2020年10月20日				
EP	2787081	A1	2014年10月8日				
KR	20140100532	A	2014年8月14日				
CA	2857159	A1	2013年6月6日				
RU	2739792	C1	2020年12月28日				
KR	20210074395	A	2021年6月21日				
SG	10201609301Q	A	2016年12月29日				
US	2019218309	A1	2019年7月18日				
JP	2020055872	A	2020年4月9日				
JP	W02013081143	A1	2015年4月27日				

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/092529

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)