(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119604525 A
(43)申请公布日 2025.03.11

(21)申请号 202380055339.9
(22)申请日 2023.07.21
(66)本国优先权数据
202210915171.1 2022.07.22 CN
202310261507.1 2023.03.17 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/108651 2023.07.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/017371 ZH 2024.01.25
(71)申请人 信达生物制药(苏州)有限公司
地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号
(72)发明人 杨晓 哈桑·伊萨夫拉斯 高长寿 王奕
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 史文静 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61K 39/44(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(54)发明名称

促进多特异性抗体的重链和轻链同源配对的突变体

(57)摘要

本发明涉及一种多特异性抗体,例如双特异性抗体,其包含能够促进多特异性抗体的重链和轻链同源配对的突变氨基酸对。

CN 119604525 A

(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
2024 年 1 月 25 日 (25.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/017371 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/108651

(22) 国际申请日: 2023 年 7 月 21 日 (21.07.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210915171.1 2022年7月22日 (22.07.2022) CN
202310261507.1 2023年3月17日 (17.03.2023) CN

(71) 申请人: 信达生物制药(苏州)有限公司 **(INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人:杨晓**(YANG, Xiao)**; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。伊萨夫拉斯哈桑**(ISSAFRAS, Hassan)**; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。高长寿**(GAO, Changshou)**; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。王奕**(WANG, Yi)**; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人:北京市中咨律师事务所**(ZHONGZI LAW OFFICE)**; 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (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, CV, 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, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

WO 2024/017371 A1

(54) **Title:** MUTANT PROMOTING HOMOLOGOUS PAIRING OF HEAVY AND LIGHT CHAINS OF MULTISPECIFIC ANTIBODY

(54) 发明名称: 促进多特异性抗体的重链和轻链同源配对的突变体

(57) **Abstract:** The present invention relates to a multispecific antibody, such as a bispecific antibody, comprising a mutated amino acid pair capable of promoting homologous pairing of a heavy chain and a light chain of the multispecific antibody.

(57) 摘要: 本发明涉及一种多特异性抗体，例如双特异性抗体，其包含能够促进多特异性抗体的重链和轻链同源配对的突变氨基酸对。

促进多特异性抗体的重链和轻链同源配对的突变体

本发明涉及一种多特异性抗体，例如双特异性抗体，其包含能够促进多特异性抗体的重链和轻链同源配对的突变氨基酸对。

发明背景:

在当前的生物治疗市场中，抗体分子占主导地位。双特异性抗体（bsAbs）作为单个分子，同时结合两个不同的抗原或同一抗原上的两个不同的表位；它们不同于天然存在的免疫球蛋白 G（IgG）单特异性抗体 mAb。由于具有额外的靶向能力，bsAb 常常可提供改善的治疗复杂疾病（如癌症和免疫失调）的临床益处，所述疾病涉及多种细胞表面受体或配体。为了将 mAb 工程化为 bsAb，已经做出了许多努力，从而产生了 60 多种不同的 bsAb 形式。通过连接抗体片段，例如单链可变片段（scFv），抗原结合片段（Fab），重链（VH）和轻链（VL）可变结构域，可以工程化许多 bsAb。但是，这些不同于常规 IgG 结构的新形式通常具有较差的理化特性，例如溶解度低和易聚集，大规模生产困难，热稳定性差、药物动力学差以及潜在的免疫原性。双特异性抗体在数量，质量和稳定性方面的巨大生产挑战已阻碍了其更广泛的临床应用和接受度。

已经开发了异二聚 Fc 技术，来辅助双特异性抗体的生产。例如，Carter 等人用“Kih“（knobs-into-holes)模型改造抗体重链的部分氨基酸，比较成功的实现了双特异抗体(Ridgway, Presta et al. 1996; Carter 2001) 。他们在 Fc 第一条重链的 CH3 区域上通过将一个侧链小的氨基酸突变成了一个侧链大的氨基酸从而创造出了一个 “knob “(如 T366Y), 并将第二条重链上的 CH3 上的某些氨基酸突 变成了侧链小的氨基酸创造出了“hole”（Y407T 等），即利用空间构象互补来实现异二聚体的形成（WO9627011）。之后通过随机突变-噬菌体展示等方法进一步提高了异二聚体的比例（WO1998050431），同时引入了 CH3 区域内二硫键来提高异二聚体的，但阻碍同二聚体的形成的能力依然不够，整个异二聚体比例约 70-80%左右。

或者，链交换改造结构域（SEED）异质化代表另一种基于空间突变的设计策略，运用 IgG 与 IgA 的 CH3 结构域（AG SEED CH3 和 GA SEED CH3 ）之间可替换的氨基酸序列形成互补结构。IgG 和 IgA CH3 衍生物产生互补序列，因此两种互补的重链可以装配产生异二聚体，从而避免了缺乏互补作用产生同二聚体的可能(Muda, Met al. Therapeutic assessment of SEED: A new engineered antibody platform designed to generate mono- and bispecific antibodies. Protein Eng. Des. Sel. PEDS 2011, 24, 447–454.)。

除了早期提出的空间突变，静电引力相互作用也被广泛的用作促进重链形成异二聚体。该方法是将一条重链 CH3 结构域上的个别氨基酸突变为带正电荷的 Lys,将另一条重链的 CH3 中的个别氨基酸替换为带负电荷的 Asp 或 Glu。然后带电荷的氨基酸通过静电引力容易形成异二聚体。Gunasekaran et al 等人第一次引入带电的氨基酸形成 Fc 异源二聚体的双特异性抗体(Gunasekaran, K. et al. Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering eects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. J. Biol. Chem. 2010, 285, 19637–19646.)。

CN104011221B 提供了一种在可变区和恒定区包含二硫键重塑突变的具有修饰的多肽链的双特异性抗体，但是该突变仍不足促使单个细胞系表达的双特异性抗体达到 90%以上的完全正确配对。此专利中的二硫键重塑所选的氨基酸对不够优化，存在一部分未能形成二硫键的分子。

CN109475627A 提供了一种制备抗体混合物的方法，但是其涉及的是 2 种单特异性抗体混合物的制备，且电荷突变主要在恒定区中引入，这使得需要引入大量突变才能实现配对效果优化。

因此，本领域仍然需要新的双特异性抗体平台，其仅需要引入较少的突变，就能使得基于其获得双特异性抗体在表达时，具有较低的错配，且保持亲和力和表达量不变，同时，因所获得的双特异性抗体具有较少的突变而得以降低免疫原性，并且所述双特异性抗体平台的抗体的表达和重组能够在一个细胞系中进行。

发明简述

本发明提供了一种新的多特异性抗体（例如新的双特异性抗体）平台，其在双特异性抗体的可变区中引入电荷突变，同时在 CH1/CL 区引入二硫键重塑突变，从而获得的多特异性抗体

（1）错配少，正确配对的分子比例更高;

（2）具有与天然 IgG 相当的免疫原性风险;

（3）亲和力与引入突变前的抗体相似或保持不变;

（4）具有较高的表达量，例如与引入突变前的抗体或与单特异性抗体相当或更高的表达量;

（5）能够在一个细胞系中表达，避免了在不同细胞系中表达和体外重组。

同时，本发明的多特异性抗体平台中引入的突变位置和氨基酸均较为保守，因此适用于多种多特异性抗体(双特异性抗体)。

附图简述:

图 1 显示了示例性的双特异性抗体结构（单价 1+1 构型）以及其中可以包含的突变。

图 2 显示了用 LC-MS 分析的表 7 所示的突变组合的正确组装分子比例，其中 A: 抗体 1 重链; a: 抗体 1 轻链; B: 抗体 2 重链; b: 抗体 2 轻链; AaBb: 正确对配的双抗;

图 2A: 表 7 组合 1 的 LC-MS 结果;

图 2B: 表 7 组合 2 的 LC-MS 结果

图 2C: 表 7 组合 3 的 LC-MS 结果。

图 3 显示了表 8 所示的不同抗体对引入二硫键重塑结合电荷突变后，用 LC-MS 分析正确组装分子比例，其中 A: 抗体 1 重链; a: 抗体 1 轻链; B: 抗体 2 重链; b: 抗体 2 轻链; AaBb: 正确对配的双抗。

图 3A: 表 8 Her2/PD-1 组合的 LC-MS 结果。

图 3B: 表 8 Her2/CD47 组合的 LC-MS 结果。

图 3C: 表 8 Her2/cMET 组合的 LC-MS 结果。

图 4 显示了表 9 所示的不同抗体对引入不同电荷突变结合相同的二硫键重塑突变后，用

LC-MS 分析正确组装分子比例，其中 A：抗体 1 重链；a：抗体 1 轻链；B：抗体 2 重链；b：抗体 2 轻链；AaBb：正确对配的双抗。

图 4A：表 9 组合 1 的 LC-MS 结果。

图 4B：表 9 组合 2 的 LC-MS 结果。

图 4C：表 9 组合 3 的 LC-MS 结果。

图 4D：表 9 组合 4 的 LC-MS 结果。

图 4E：表 9 组合 5 的 LC-MS 结果。

图 5 显示了三种双特异性抗体的构型，其中图 5A 显示了 2+1N 端构型的双特异性抗体；图 5B 显示了 2+1C 端构型的双特异性抗体；图 5C 显示了 2+2C 端构型的双特异性抗体。

图 6 显示了表 11 所示的应用本发明构建的多价构型分子，用 LC-MS 分析正确组装分子比例，其中 HC1：抗体 1 重链；LC1：抗体 1 轻链；HC2：抗体 2 重链；LC2：抗体 2 轻链；Intact：正确配对的多价双抗。

图 6A：表 11 GPRC5D/CD3-1 的 LC-MS 结果。

图 6B：表 11 GPRC5D/CD3-2 的 LC-MS 结果。

图 6C：表 11 GPRC5D/CD3-3 的 LC-MS 结果。

图 6D：表 11 GPRC5D/CD3-4 的 LC-MS 结果。

图 6E：表 11 GPRC5D/CD3-5 的 LC-MS 结果。

图 6F：表 11 GPRC5D/CD3-6 的 LC-MS 结果。

图 7A 和图 7B 显示了 BCMA/GPRC5D/CD3 三抗引入电荷和二硫键重塑突变示例。

图 8 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用，其中图 8A 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 BCMA 阳性 H929 细胞的杀伤作用，图 8B 显示了示例抗体介导的 PBMC 对 GPRC5D 阳性 H929 细胞的杀伤作用。

图 9A-C 显示了不同突变体单抗纯化后进行非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果；图 9D-M 显示了形成了二硫键的抗体进行变性非还原毛细管电泳（nrCE-SDS）的结果。

定义：

应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

在本文中当提及“第一”“第二”时，仅为了区分两个结构域或两条链，而不以任何方式表明两个结构域的位置。

如本文所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

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

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

关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在 Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中给出。

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

术语“CH1 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 118 延伸至 EU 位置 220 的部分(EU 编号体系)。在一个实施方案中，CH1 结构域包含 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC(SEQ ID NO: 116)的氨基酸序列。在一个实施方案中，通过突变 CH1 中的半胱氨酸为非半胱氨酸来去除内部二硫键，或者通过将非半胱氨酸突变为半胱氨酸来重塑新的二硫键。

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

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:117)的氨基酸序列。

术语“CH3 区”指抗体重链多肽的从 EU 位置 341 延伸至 EU 位置 447 的部分。在一个实施方案中，CH3 结构域包含 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:118)的氨基酸序列。

术语“铰链区”指抗体重链多肽的部分，所述部分在野生型抗体重链中连接 CH1 区和 CH2 区，例如，IgG1 铰链区，例如根据 EU 编号，D221 到 P230 的序列。可以通过与 IgG1 亚类序列的铰链区半胱氨酸残基对齐，确定其他 IgG 亚类的铰链区。

铰链区通常情况下是由具有相同氨基酸序列的两条多肽组成的二聚体分子。在一个实施方案中，铰链区具有氨基酸序列 DKTHTCPXCP (SEQ ID NO: 119)，其中 X 是 S 或 P。在一个实施方案中，铰链区包含氨基酸序列 HTCPXCP (SEQ ID NO: 120)，其中 X 是 S 或 P。在一个实施方案中，铰链区包含氨基酸序列 CPXCP (SEQ ID NO: 121)，其中 X 是 S 或 P。在一个实施方案中，通过突变铰链区中的半胱氨酸为非半胱氨酸来去除铰链区的内部二硫键。

本发明的多特异性抗体可以包含接头。如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接多特异性抗体的不同部分的任何分子。在多特异性抗体不同部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中，根据本发明的术语“肽接头”是指氨基酸的序列，其中所述序列将多特异性抗体的各个部分的氨基酸序列连接在一起。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。肽接头可以主要包括或可以不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物，包括例如(GS)n、(GSGGS) n、(GGGGS) n、(GGGS)n 和(GGGGS)nG，其中 n 是至少 1(且优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10)的整数。有用的接头还包括甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interes，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系（也称作 EU 索引）进行编号。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。两个 Fc 区可以实现二聚化以构成二聚 Fc，两个不同的 Fc 异二聚化形成异二聚 Fc。在本文中，术语“Fc 区”、“Fc 部分”和“二聚 Fc（例如异二聚 Fc）”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的铰链区。在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Asp221 或从 Cys226 或从 Asp231 延伸至重链的羧基端。

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

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:122)。

人 IgG4 Fc 区多肽（包含铰链区）包含以下氨基酸序列：

PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:123)。

如本文所报道方法中产生的抗体包含 Fc 区，在一个实施方案中，Fc 区衍生自人源的 Fc 区。在一个实施方案中，该 Fc 区包含人类恒定区的全部部分。抗体 Fc 区直接参与补体激活、C1q 结合、C3 活化和 Fc 受体结合。在一个实施方案中，Fc 区是人 Fc 区。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG4 亚类。在一个实施方案中，Fc 区属于人 IgG1 亚类。

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

在氨基酸突变用（原始氨基酸,氨基酸位置,突变氨基酸）来表示。例如，当突变位点位于 V 区时，“A43D”是指，位于 Kabat 位置 43 的丙氨酸氨基酸被天冬氨酸(D)取代；当突变位点位于 C 区时，“Q124C”是指，位于 EU 位置 124 的谷氨酰胺被半胱氨酸（C）取代。当述及突变组合时，组合的突变之间用加号(+)连接。“A43D+Q124C”表示同时包含突变 A43D 和 Q124C。当在一个特定位置可以具有多种突变可能性时，在本文中，通过符号“/”来表示。例如，突变“K370T/S”表示 370 位的残基 K 可以替代为 T 或 S 残基。

在本发明提及氨基酸位置时，如无明确说明，是指根据 IgG1 重链或 kappa 轻链编号的氨基酸位置，即其涵盖基于 IgG1 重链或 Kappa 轻链编号的氨基酸位置，以及在其他重链或轻链上对应于所述氨基酸位置的氨基酸位置。例如，在提及 C220 时，其涵盖 IgG1 重链通过 EU 编号下的第 220 位氨基酸，以及在其他重链中对应的氨基酸，例如在 IgG2、IgG3 或 IgG4 中的第 131 位氨基酸。

应当注意，在描述突变时，在一个具体位置上的原始氨基酸可以是描述的氨基酸，或者也可以是在对应位置上的其他氨基酸。例如，当注意，在在描述突变时，包括将可变区第 43 位的丙氨酸突变为天冬氨酸，也包括在对应于第 43 位不是丙氨酸时，将对应的 43 位位置上的氨基酸突变为天冬氨酸，只要该原始氨基酸对应于该可变区的第 43 位即可。术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”互换使用并且指已经向其中引入外源核酸的细胞，包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从中衍生的子代，而无论传代次数是多少。后代可以在核酸含量方面不与亲本细胞完全相同，反而可以含有突变。本文中包括这样的突变子代，所述突变子代具有针对最初转化的细胞中所筛选或选择的相同的功能或生物活性。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

术语“结合分子”是指能够与靶标特异性结合的任何分子，例如抗体或其抗原结合片段或融合蛋白。

术语“靶标”是指结合分子所针对的被结合物。靶标可以是抗原，也可以是配体或受体。术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。如本文所用，术语“表位”指抗原中与抗体分子特异性相互作用的部分。在一些实施方案中，抗原为肿瘤相关抗原（即与肿瘤的发生进展有关的抗原）或 T 细胞衔接器。在本发明的结合分子涉及来源于抗体的靶标结合区时，“靶标”和“抗原”可以互换使用。

如本文所用的术语“靶标结合区”是指结合分子，例如多特异性结合分子或双特异性结合分子的结合特定靶标或抗原的部分。靶标结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片

段。这种靶标结合区可以具有或可以不具有独立于结合分子的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。靶标结合区还可以是受体或配体，或受体的能够结合配体的结构域。在多特异性抗体或双特异性抗体时，也将“靶标结合区”称为“抗原结合区”。

如本文所用的术语“抗原结合区”是指抗体或其抗原结合片段，例如多特异性抗体或双特异性抗体的结合特定靶标或抗原的任何部分。抗原结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种抗原结合区可以具有或可以不具有独立于多特异性抗体或双特异性抗体的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其抗原/表位。在本发明的结合分子涉及来源于抗体的靶标结合区时，“靶标结合区”和“抗原结合区”可以互换使用。

术语“多特异性结合分子”是指至少是双特异性的多特异性结合分子，例如双特异性结合分子，即所述分子包含至少第一靶标结合区和第二靶标结合区，其中所述第一靶标结合区结合一种靶标或抗原且所述第二靶标结合区结合另一抗原或靶标。根据本发明的多特异性结合分子也涵盖包含多个靶标结合区/结合位点的多特异性分子，诸如三特异性结合分子。在一些实施方案中，本发明的多特异性结合分子是多特异性抗体。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子是双特异性抗体。在一些实施方案中，本发明的多特异性结合分子是融合蛋白，其可以例如包含来自抗体的靶标结合区和来自受体或配体的靶标结合区。

如本文所用，术语“单特异性”指，具有一个或多个靶标结合位点的多肽/蛋白分子，所述位点中的每一个位点与相同靶标的相同位点或结构或相同抗原的相同表位结合。

如本文所用，术语“多特异性”结合分子例如抗体指具有至少两个靶标结合位点，所述至少两个靶标结合位点中的每一个靶标结合位点与相同靶标的不同位点/结构或与不同靶标结合。多特异性结合分子是对至少两个不同靶标或位点/结构具有结合特异性的结合分子。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性结合分子，其具有针对第一靶标和第二靶标的结合特异性。

如本文所用，术语“多特异性”抗体指具有至少两个抗原结合位点的抗体，所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。多特异性抗体是对至少两个不同抗原表位具有结合特异性的抗体。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性抗体，其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性。

当在多特异性抗体或双特异性抗体中提及“第一抗原结合区”时，是指结合第一抗原的结合区，而不意图限制抗体中所含的该抗原结合区的个数，例如多特异性抗体或双特异性抗体中可以包含 1 个或 1 个以上的第一抗原结合区。例如，双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，但是可以包含 1 个或 1 个以上的第一抗原结合区和 1 个或 1 个以上的第二抗原结合区。

当在结合分子中提及“第一靶标结合区”时，是指结合第一靶标的结合区，而不意图限制结合分子中所含的该靶标结合区的个数，例如多特异性结合分子或双特异性结合分子中可以包含 1 个或 1 个以上的第一靶标结合区。例如，双特异性结合分子包含第一靶标结合区和第二靶标结合区，可以包含 1 个或 1 个以上的第一靶标结合区和 1 个或 1 个以上的第二靶标结合区。

当在抗体中提及“第一抗原结合区”时，是指结合第一抗原的结合区，而不意图限制抗体中所含的该抗原结合区的个数，例如多特异性抗体或双特异性抗体中可以包含 1 个或 1 个以上的第一抗原结合区。例如，双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，但是可以包含 1 个或 1 个以上的第一抗原结合区和 1 个或 1 个以上的第二抗原结合区。

当提及“靶标或抗原结合区来源于抗体”时，是指构成该靶标/抗原结合区的结合结构域为或衍生自该抗体的特异性结合抗原的结合结构域，例如，抗原结合区的特异性结合抗原的

片段例如 Fab 为或衍生自该抗体的相应片段例如 Fab，或抗原结合区的重链可变区和/或轻链可变区为或衍生自该抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者该抗原结合区的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个 CDR 为该抗体的 CDR。

术语“衍生自”是指在抗原结合区中的片段与其所来源的抗体的片段基本相同，但是在一个或多个位点处具有突变，例如取代、缺失或添加。在一个具体的实施方案中，所述突变不在抗体的 CDR 中。

术语“全抗体”或“全长抗体”在本文中可互换使用，是指具有天然免疫球蛋白分子结构的抗体分子。在常规四链 IgG 抗体的情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。在仅具有重链而缺乏轻链的重链抗体情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)。对于常规四链 IgG 抗体，全长抗体重链通常由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成，其中重链恒定区至少包含 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3。全长抗体轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成，其中轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。每个重链可变区 VH 和每个轻链可变区都由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

术语抗体的“抗原结合片段”是与全长抗体不同的分子，其包含全长抗体的一部分，但其能结合全长抗体的抗原或与全长抗体(即与抗原结合片段所来源的全长抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、单链 Fv、双体抗体(diabody)、单域抗体(sdAb)、纳米抗体。例如，通过木瓜蛋白酶消化全长抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 F(ab')2，其为 Fab’的二聚体，是二价的抗体片段。F(ab')2 可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原，由此将 F(ab')2 二聚体转化为 Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区的 Fab 片段。Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 可以由独立的基因编码，但是也可以使用重组方法，使用合成性连接肽连接这两个结构域以使其作为单条蛋白链产生，并且在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv (scFv)。

“Fab 片段”或“Fab”在本文中可互换使用，用于指，由两条多肽链组成的、包含免疫球蛋白重链可变结构域 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变结构域 VL 和轻链恒定结构域 CL 的免疫球蛋白片段，其中，一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VH 和选自 CH1 和 CL 的一个恒定区，另一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VL 和选自 CL 和 CH1 的另一恒定区，其中所述 VH 结构域和 VL 结构域配对形成抗原结合位点。在本文中，包含重链恒定区 CH1 的 Fab 多肽链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 多肽链也称作“Fab 轻链”。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派方案的任一种或其组合确定，所述指派方案包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人. (1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health

(1987)), AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

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

发明详述

I.结合分子

本发明涉及一种结合分子，其包含第一靶标结合区和第二靶标结合区，以及任选地一个或多个其他靶标结合区，其中，所述靶标结合区中的一个或两个或多个包含有利于防止错配和/或促进异二聚化的一个或多个突变。在一些实施方案中所述结合分子还包含促进异二聚体纯化的一个或多个突变。在一些实施方案中，本发明的结合分子包含的突变选自二硫键重塑突变、电荷突变和/或其他有利于防止错配和/或促进异二聚化的一个或多个突变。在一些实施方案中，第一靶标结合区和第二靶标结合区结合相同的靶标或靶标上的位点/结构。在一些实施方案中，第一靶标结合区和第二靶标结合区结合不同的靶标或靶标上的位点/结构。

在一些实施方案中，所述结合分子是融合蛋白，其可以例如包含来自抗体的靶标结合区和来自受体或配体的靶标结合区。在一些实施方案中，所述配体或受体的示例性实例为颗粒相关细胞因子或其受体，如肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子(VEGF)或转化生长因子(TGF，例如 TGF-β)或其受体，以及其片段。

在一些实施方案中，所述结合分子是抗体。在一些实施方案中，本发明涉及一种包含突变的抗体，例如单特异性抗体或多特异性抗体，例如双特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，以及任选地一个或多个其他抗原结合区，其中，所述抗原结合区中的一个或两个或多个包含有利于防止错配和/或促进异二聚化的一个或多个突变。在一些实施方案中所述抗体还包含促进异二聚体纯化的一个或多个突变。在一些实施方案中，本发明的抗体包含的突变选自二硫键重塑突变、电荷突变和/或其他有利于防止错配和/或促进异二聚化的一个或多个突变。在一些实施方案中，第一抗原结合区和第二抗原结合区结合相同的抗原或表位。在一些实施方案中，第一抗原结合区和第二抗原结合区结合不同的抗原或表位。

在一些实施方案中，靶标结合区或抗原结合区包含重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中，靶标结合区或抗原结合区包含轻链恒定区 CL。在一些实施方案中，靶标结合区或抗原结合区包含重链恒定区 CH1。

在一些实施方案中，CH1 区为人的 IgG CH1，例如，人 IgG1 CH1，人 IgG2 CH1，人 IgG3 CH1 或人 IgG4 CH1。在一个实施方案中，CH1 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:116，或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或 100%的同一性的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，CL 区为人的 Kappa 轻链 CL 区或人的 Lamda 轻链 CL 区。在一些实施方案中，CL 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54 或 SEQ ID NO:55，或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或 100%的同一性的氨基酸序列或由其组成。

在本公开中，对抗原结合区的限定同样适用于靶标结合区。

I-1 二硫键重塑突变

二硫键重塑突变是一个可以有效强制同源轻重链配对从而避免结合分子或多特异性抗体的不同靶标结合区的轻重链之间错配的策略，对于其中一个或多个靶标结合区的轻重链连接的二硫键进行重塑，改变二硫键的位置，使得错误配对的轻重链不能有效形成二硫键。

因此，在一个实施方案中，本发明的结合分子例如抗体中，至少一个靶标结合区或抗原结合区区包含 CH1-CL，且所述 CH1-CL 的界面上的二硫键被重塑，例如在所述 CH1-CL1 界面上具有二硫键重塑突变。在一个实施方案中，本发明的结合分子例如抗体中，2 个或更多个靶标结合区包含在所述 CH1-CL1 界面上的二硫键重塑突变。

本文所述的“二硫键重塑突变”是指界面上一对氨基酸的位置上的突变，其中所述氨基酸对的位置上的非半胱氨酸被半胱氨酸取代，例如所述氨基酸对位置上的两个非半胱氨酸被半胱氨酸取代后允许链间二硫键的形成。

在一些实施方案中，本发明的二硫键重塑突变是在抗原结合区（例如包含 Fab 的抗原结合区）的 CH1-CL 界面上的氨基酸对的位置上的突变，其中所述氨基酸对的位置上的非半胱氨酸被半胱氨酸取代。在一些实施方案中，所述氨基酸对位置上的两个非半胱氨酸被半胱氨酸取代后允许链间二硫键的形成。

在一些实施方案中，所述突变为在所述 CH1-CL 界面上α碳原子之间的距离小于 8Å，更优选的小于 6Å 的非半胱氨酸的氨基酸对中的氨基酸均被突变为半胱氨酸。在一些实施方案中，所述氨基酸对中的氨基酸侧链指向彼此。在一些实施方案中，所述 CH1-CL 界面上α碳原子之间的距离小于 8Å，更优选的小于 6Å 的非半胱氨酸的氨基酸对中的氨基酸均被突变为半胱氨酸，且所述非半胱氨酸的氨基酸对中的氨基酸侧链指向彼此。

在一些实施方案中，所述抗原结合区中的（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的）重链 CH1 在位置 126、128、134、136、139、168、170、171 或 173 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。在一些实施方案中，所述抗原结合区中的轻链 CL 在位置 114、116、118、124、160、162 或 164 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 126 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 124 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 168 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取

代，且轻链 CL 在位置 164 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 170 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 162 或 164 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 173 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 160 或 162 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 128 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 118 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 134 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 116 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 136 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 114 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 171 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 162 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

在一些实施方案中，在所述抗原结合区的 CH1-CL 中，（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）重链 CH1 在位置 139 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 116 处（EU 编号）具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代。

非半胱氨酸氨基酸在一些方面包括天然存在的和/或非经典氨基酸。天然存在的非半胱氨酸氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸以及色氨酸。非经典氨基酸有时可以经由细胞表达系统(例如，原核细胞和/或真核细胞表达系统)来并入。非经典氨基酸的实例包括鸟氨酸、二氨基丁酸、正亮氨酸、吡啶丙氨酸(pyrylalanine)、噻吩丙氨酸、萘基丙氨酸以及苯基甘氨酸。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 F126C，且在 CL 中包含 Q124C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 H168C，且在 CL 中包含 T164C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 F170C，且在 CL 中包含 T164C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 F170C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 V173C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 V173C，且在 CL 中包含 Q160C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 L128C，且在 CL 中包含 F118C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 S134C，且在 CL 中包含 F116C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 S136C，且在 CL 中包含 S114C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 P171C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 T139C，且在 CL 中包含 F116C（EU 编号）。

因此，在本发明的一个实施方案中，本发明涉及一种结合分子，例如多特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区以及任选的其他抗原结合区，其中，在第一抗原结合区包含第一 CH1 和第一 CL，

(i) 所述第一 CH1 包含 F126C 突变，且所述第一 CL 中包含 Q124C 突变（EU 编号）；

(ii) 所述第一 CH1 包含 H168C 突变，且所述第一 CL 中包含 T164C 突变（EU 编号）；

(iii) 所述第一 CH1 包含 F170C 突变，且所述第一 CL 中包含 T164C 突变（EU 编号）；

(iv) 所述第一 CH1 包含 F170C 突变，且所述第一 CL 中包含 S162C 突变（EU 编号）；

(v) 所述第一 CH1 包含 V173C 突变，且所述第一 CL 中包含 S162C 突变（EU 编号）；

(vi) 所述第一 CH1 包含 V173C 突变，且所述第一 CL 中包含 Q160C 突变（EU 编号）；

(vii) 所述第一 CH1 包含 L128C 突变，且所述第一 CL 中包含 F118C 突变（EU 编号）；

(viii) 所述第一 CH1 包含 S134C 突变，且所述第一 CL 中包含 F116C 突变（EU 编号）；

(ix) 所述第一 CH1 包含 S136C 突变，且所述第一 CL 中包含 S114C 突变（EU 编号）；

(x) 所述第一 CH1 包含 P171C 突变，且所述第一 CL 中包含 S162C 突变（EU 编号）；或

(xi) 所述第一 CH1 包含 T139C 突变，且所述第一 CL 中包含 F116C 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，所述 CH1 来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，优选来自 IgG1 或 IgG4。在一些实施方案中，所述 CL 来自 kappa 轻链或 λ 轻链。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变还包括将天然半胱氨酸取代为非半胱氨酸。在

一些实施方案中，在一个或两个或多个抗原结合区中的重链恒定区-轻链恒定区界面内的链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代。在一些实施方案中，所述抗原结合区中的 CH1 在位置 220 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸被一个非半胱氨酸氨基酸的取代。在一些实施方案中，所述抗原结合区中的 IgG1 重链 CH1 在位置 220 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸被一个非半胱氨酸氨基酸的取代，或者所述抗原结合区中的 IgG2、IgG3 或 IgG4 重链 CH1 在位置 131 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸被一个非半胱氨酸的取代。在一些实施方案中，所述抗原结合区中的轻链 CL 在位置 214 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸至一个非半胱氨酸氨基酸的取代。在一些实施方案中，在所述抗原结合区中，IgG1 重链 CH1 在位置 220 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸至一个非半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 214 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸至一个非半胱氨酸氨基酸的取代，或者 IgG2、IgG3 或 IgG4 重链 CH1 区在位置 131 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸至一个非半胱氨酸氨基酸的取代，且轻链 CL 在位置 214 处（EU 编号）具有一个半胱氨酸氨基酸至一个非半胱氨酸氨基酸的取代。示例性的半胱氨酸至非半胱氨酸的突变还描述在例如 CN104011221B 中。在一些实施方案中，所述半胱氨酸被取代为丝氨酸、丙氨酸或缬氨酸，例如丝氨酸。

在一些实施方案中，所述二硫键重塑突变为在抗原结合区中的 CH1 中包含 C220S/A/V（IgG1 亚型，或在 IgG2、IgG3 或 IgG4 的对应的位置上包含 C131S/A/V），且在 CL 中包含 C214S/A/V（EU 编号）。

因此，在本发明的一个实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中，在第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，

(i) 所述第一 CH1 包含 F126C 突变，且所述第一 CL 中包含 Q124C 突变（EU 编号）；

(ii) 所述第一 CH1 包含 H168C 突变，且所述第一 CL 中包含 T164C 突变（EU 编号）；

(iii) 所述第一 CH1 包含 F170C 突变，且所述第一 CL 中包含 T164C 突变（EU 编号）；

(iv) 所述第一 CH1 包含 F170C 突变，且所述第一 CL 中包含 S162C 突变（EU 编号）；

(v) 所述第一 CH1 包含 V173C 突变，且所述第一 CL 中包含 S162C 突变（EU 编号）；

(vi) 所述第一 CH1 包含 V173C 突变，且所述第一 CL 中包含 Q160C 突变（EU 编号）；

(vii) 所述第一 CH1 包含 L128C 突变，且所述第一 CL 中包含 F118C 突变（EU 编号）；

(viii) 所述第一 CH1 包含 S134C 突变，且所述第一 CL 中包含 F116C 突变（EU 编号）；

(ix) 所述第一 CH1 包含 S136C 突变，且所述第一 CL 中包含 S114C 突变（EU 编号）；

(x) 所述第一 CH1 包含 P171C 突变，且所述第一 CL 中包含 S162C 突变（EU 编号）；或

(xi) 所述第一 CH1 包含 T139C 突变，且所述第一 CL 中包含 F116C 突变（EU 编号）

且所述 CH1 还包含 C220S/A/V 突变（或对应的 C131S/A/V），且所述 CL 中还包含 C214S/A/V 突变（EU 编号）；

优选地，所述 CH1 还包含 C220S（EU 编号），且所述 CL 中还包含 C214S（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 T139C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 F116C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 F126C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 Q124C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 H168C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 T164C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 F170C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 T164C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 F170C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 S162C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 V173C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 S162C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 V173C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 Q160C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 L128C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 F118C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 S134C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 F116C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 S136C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 S114C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含 CH1 和 CL，所述 CH1 包含 P171C 和 C220S 突变（或对应的 C131S），且所述 CL 中包含 S162C 和 C214S 突变（EU 编号）。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F126C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:129 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F126C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:129 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:132 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 H168C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:132 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:133 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 H168C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:133 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:134 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F170C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:134 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:135 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F170C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:135 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:136 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 V173C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:136 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:137 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 V173C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:137 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:138 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 L128C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:138 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:139 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 L128C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:139 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:140 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S134C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:140 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:141 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S134C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:141 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:142 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S136C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:142 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:143 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S136C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:143 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:144 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 P171C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:144 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:145 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 P171C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:145 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:146 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T139C。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:146 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CH1 包含与 SEQ ID NO:147 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T139C 和 C220S。在一些实施方案中，CH1 包含 SEQ ID NO:147 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q124C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:128 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q124C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:128 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:148 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T164C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:148 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:149 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T164C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:149 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:150 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S162C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:150 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:151 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S162C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:151 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:152 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q160C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:152 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q160C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F118C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F118C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F116C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F116C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:99 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S114C。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:99 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。在一些实施方案中，CL 包含与 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S114C 和 C124S。在一些实施方案中，CL 包含 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

I-2 电荷突变

电荷突变是可以有效强制同源轻重链配对，避免两个靶标结合区的轻重链之间错配的策略，其中在重链和轻链的接触面上寻找氨基酸对，突变为带相反电荷的氨基酸，利用相反电荷互相吸引的原理促进同源配对。

在一个实施方案中，本发明的结合分子例如抗体（例如多特异性抗体，例如双特异性抗体）包含电荷突变。在一些实施方案中，所述电荷突变是在至少一个抗原结合区的重链和轻链的接触面上的氨基酸对的突变，其中所述氨基酸对中的两个氨基酸被突变为相反电荷。在一些实施方案中，所述氨基酸对具有如下一个或多个特征:

a. 所述氨基酸对是位于抗原结合区的重链可变区和轻链可变区交界面上保守的氨基酸对;

b. 所述氨基酸对的α碳原子之间距离小于 12Å; 和/或

c. 所述氨基酸对的侧链朝向彼此。

在一些实施方案中，所述电荷突变包括在选自以下位置的氨基酸对上将两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸：重链可变区的位置 39 和轻链可变区的位置 38、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 87、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 44、重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 43 或重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 44（kabat 编号）。

在一些实施方案中，所述电荷突变包括在选自以下位置的氨基酸对上将两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸：重链可变区的 Q39 和轻链可变区的 Q38、重链可变区的 L45 和轻链可变区的 Y87、重链可变区的 L45 和轻链可变区的 P44、重链可变区的 Y91 和轻链可变区的 A43 或重链可变区的 Y91 和轻链可变区的 P44（kabat 编号）。

在一些实施方案中，在结合不同抗原的抗原结合区中的 1 个或多个氨基酸对的位置上分别包含电荷突变。在一些实施方案中，结合不同抗原的抗原结合区中包含电荷突变的氨基酸位置可以相同或不同。在包含电荷突变的氨基酸位置相同时，在结合不同抗原的抗原结合区中的氨基酸对上的突变后的氨基酸不同。例如，在一些实施方案中，在第一抗原结合区和第二抗原结合区的 1 个或多个相同的氨基酸对的位置上包含电荷突变，但是在一个抗原结合区中的氨基酸对上的电荷突变与另一个抗原结合区中的氨基酸对上的电荷突变不同，例如在相同位置上，第一抗原结合区中突变的氨基酸所带电荷与第二抗原结合区中突变的氨基酸所带电荷相反。例如，在第一抗原结合区中，在位置 X1 上的重链氨基酸被突变带正电荷的氨基酸，且在位置 X2 上的轻链氨基酸被突变为带负电荷的氨基酸，同时在第二抗原结合区中，在位置 X1 上的重链氨基酸被突变带负电荷的氨基酸，且在位置 X2 上的轻链氨基酸被突变为带正电荷的氨基酸，其中在第一抗原结合区中的带正电荷的氨基酸与在第二抗原结合区中的带正电荷的氨基酸可以相同或不同，例如相同；且在第一抗原结合区中的带负电荷的氨基酸与在第二抗原结合区中的带负电荷的氨基酸可以相同或不同，例如相同。

在一些实施方案中，所述氨基酸对中的重链可变区的氨基酸由带正电荷的氨基酸取代，并且在轻链可变区的氨基酸由带负电荷的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述氨基酸对中的重链可变区的氨基酸由带负电荷的氨基酸取代，并且在轻链可变区的氨基酸由带正电荷的氨基酸取代。

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

在一些实施方案中，在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和/或在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

在一些实施方案中，在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和/或在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位

置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

在一些实施方案中，在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和/或在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

在一些实施方案中，在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和/或在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

在一些实施方案中，带正电荷的氨基酸选自 K、R 和 H，并且/或者带负电荷的氨基酸选自 E 或 D。在一些实施方案中，带正电荷的氨基酸选自 K 和 R，并且/或者带负电荷的氨基酸选自 E 或 D。在一些实施方案中，带正电荷的氨基酸是 K，并且/或者带负电荷的氨基酸是 D。

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

在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 D。在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 K。

在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D。在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 D。在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 K。

在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D。在一些实施方案中，在一个抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

在一些实施方案中，本发明的结合分子，例如抗体，如多特异性抗体，例如双特异性抗体包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，其包含选自如下的取代:

(i). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 K;

(ii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 K;

(iii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K;

(iv). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位

置 43 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 K;

(v). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

I-3 组合突变

在一些实施方案中，本发明的结合分子，例如抗体，例如多特异性抗体，例如双特异性抗体，包含第一靶标结合区（抗原结合区）和第二靶标结合区（抗原结合区），其包含二硫键重塑突变，以及电荷突变。

在一些实施方案中，本发明涉及一种抗体，例如多特异性抗体，例如双特异性抗体，包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中，第一抗原结合区包含重链可变区、重链恒定区 CH1、轻链可变区和轻链恒定区 CL，且第二抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含在 CH1-CL 界面包含二硫键重塑突变，且在 VH 和 VL 上包含电荷突变。

在一些实施方案中，第一抗原结合区包含在 CH1-CL 界面包含二硫键重塑突变，且在 VH 和 VL 上包含电荷突变；第二抗原结合区在 VH 和 VL 上包含电荷突变。

在一些实施方案中，在所述第一抗原结合区中，包含选自如下的突变组合:

	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S

组合 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S
组合 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S
组合 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S

	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S
组合 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S

在一些实施方案中，在所述第二抗原结合区中，包含选自如下的突变组合:

	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39D	Q38K
组合 2	L45D	Y87K
组合 3	L45D	P44K
组合 4	Y91D	A43K
组合 5	Y91D	P44K

在一些实施方案中个，本发明涉及一种抗体，例如多特异性抗体，例如双特异性抗体，包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中，第一抗原结合区包含重链可变区 VH、重链恒定区 CH1、轻链可变区 VL 和轻链恒定区 CL，且第二抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述抗体包含如下的突变组合:

	第一抗原结合区				第二抗原结合区	
	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
组合 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C,	Y87D	S162C,	L45D	Y87K

		C220S		C214S		
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
组合3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	L45D	P44K
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	L45D	P44K
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K

组合4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
组合5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	Y91D	P44K

	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K

在一些实施方案中，在所述抗体例如多特异性抗体（例如双特异性抗体）中，一个或多个或全部结合相同抗原的抗原结合区包含相同的突变。

在一些实施方案中，在所述抗体例如多特异性抗体（例如双特异性抗体）中，一个或多个或全部结合相同抗原的抗原结合区包含不同的突变。

I-4 轻链恒定区替换

在一些实施方案中，本发明的结合分子，例如抗体，如多特异性抗体包含第一靶标结合区（抗原结合区）和第二靶标结合区（抗原结合区），其中一个或多个或全部第一靶标结合区（抗原结合区）所包含的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区，且一个或多个或全部第二靶标结合区（抗原结合区）所包含的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，或者其中一个或多个或全部第一靶标结合区（抗原结合区）所包含的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，且一个或多个或全部第二靶标结合区（抗原结合区）所包含的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区。

I-5 Fc 区突变

在一些实施方案中，本发明的结合分子，例如抗体，如多特异性抗体（例如双特异性抗体）的一个或多个靶标结合区（抗原结合区）还包含 Fc 区，其中所包含的 Fc 区可以相同或不同。

在一些实施方案中，第一 Fc 区和第二 Fc 区不同，其能够二聚化形成异二聚体 Fc 支架。

在本文中，Fc 区是指含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的 C-端区域，并且可以包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然序列 F 区涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions，20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520)。在一些实施方案中，本发明的 Fc 区包含抗体 CH2 和 CH3。在一些实施方案中，抗体 Fc 区还可以在 N 端带有 IgG 铰链区或部分 IgG 铰链区，例如，IgG1 铰链区或部分 IgG1 铰链区，例如根据 EU 编号，D221 到 P230 的序列。在所述铰链区中可以含有突变。

除非本文中另外指出，Fc 区中的氨基酸残基的编号根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，如 Kabat，E.A.等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health

Service,National Institutes of Health，Bethesda，MD（1991），NIH Publication 91-3242 中所述。

在一些实施方案中， Fc 区为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，人 IgG3 Fc 或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:122 或 123 或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

如本领域技术人员理解的，为了促进本发明的多特异性抗体作为异二聚体的形成，本发明多特异性抗体所包含的 Fc 区可以包含利于第一 Fc 区与第二 Fc 区异二聚化的突变。在一个实施方案中，在两个 Fc 区的 CH3 区中引入突变。

本领域已知促进 Fc 区异二聚化的方法。例如，第一 Fc 区的 CH3 区和第二 Fc 区的 CH3 区以互补方式进行工程化改造使得每个 CH3 区(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它 CH3 区异二聚化(使得第一和第二 Fc 区的 CH3 区异二聚化且两个第一 CH3 区或两个第二 CH3 区之间不形成同二聚体)。

优选地，基于 Knob-in-Hole 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。此技术参见例如 US 5 ,731 ,168; US 7 ,695 ,936; Ridgway 等,Prot Eng 9 ,617-621(1996)和 Carter ,J Immunol Meth 248 ,7-15(2001)。

在一个特定的实施方案中,在一个 Fc 区的 CH3 区中,第 366 位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W) （knob 突变）; 而在另一个 Fc 区的 CH3 区中,第 407 位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)（hole 突变），任选地 366 位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第 407 位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V) (编号方式依照 EU 索引)。

在又一个实施方案中,在一个 Fc 区的 CH3 区中，第 366 位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W)且第 354 位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第 356 位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C) (特别是,第 354 位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换) ； 而在另一个 Fc 区的 CH3 区中，第 407 位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)（hole 突变），任选地 366 位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第 368 位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A) (编号方式依照 EU 索引),任选地第 349 位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C) (编号方式依照 EU 索引)。

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

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

还可以基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的突变。此技术参见例如 PCT/CN2021/143141。

在一个特定的实施方案中，

所述第一 CH3 区包含 S364R/K 突变(优选地 S364R)，以及任选的一个或多个其他突变。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V 突变（优选地 K370S），以及任选的一个或多个其他突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K 突变，且所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V 突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R 突变，且所述第二 CH3 区包含 K370S 突变。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R/K(优选地 S364R)和 D399K/R（优选地 D399K）突变。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V（优选地 K370S）突变和 K409D/E（优选地 K409D）突变。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含

S364R/K+D399K/R，且所述第二 CH3 区包含 K370S/T/A/V+Y349T/S/A/V。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R +D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S +Y349T。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E375N/Q(优选地 E375N)和/或 T350V/A (优选地 T350V)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 K409D/E（优选地 K409D）、Q347D/E（优选地 Q347D）和/或 T350V/A（优选地 T350V）。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E357N。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 E357N，且所述第二 CH3 区还包含 Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区和所述第二 CH3 区还分别包含 T350V，或都包含 T350V。

因此，在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D 。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K+E357N，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 S364R+D399K+E357N+T350V，且所述第二 CH3 区包含 K370S+Y349T+K409D+Q347D+T350V。

在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 K409E/D(优选地 K409E)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区包含 D399K/R（优选地 D399K）或 K370T/S/A/V（优选地 K370T）。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区包含 K409E/D(优选地 K409E)，且所述第二 CH3 区包含 D399K/R（优选地 D399K）。在一些实施方案中，所述第一 CH3 区还包含 T411R/K(优选地 T411R)。在一些实施方案中，所述第二 CH3 区还包含 K370T/S/A/V（优选地 K370T）。在一些实施方案中，所述 CH3 区包含 K409E/D+T411R/K，且所述第二 CH3 区包含 D399K/R+K370T/S/A/V。在一些实施方案中，所述 CH3 区包含 K409E+T411R，且所述第二 CH3 区包含 D399K+K370T。

在一些具体的实施方案中，所述第一和第二 CH3 区具有以下突变组合:

第一 CH3 区	第二 CH3 区
S364R, D399K, E357N, T350V	K370S, Y349T, Q347D, K409D, T350V
K409E, T411R	D399K, K370T
S364R, D399K, E357N	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, Q347D, K409D
S364R, D399K	K370S, Y349T, K409D

在一个实施方案中，一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

a） 一个 Fc 区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含 T366S ,L368A 和 Y407V，或

b） 一个 Fc-区多肽包含突变 S354C 和 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V，或

c） 一个 Fc-区多肽包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc-区多肽包含突变 Y349T、K370S 和 K409D。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

a) 一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列或由其组成

b) 一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列或由其组成；或

c) 一个 Fc 区包含 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列或由其组成。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

a) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列；或

b) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列；或

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

因此，在一个具体的实施方案中，本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化，其中

a) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 T366S ,L368A 和 Y407V；或

b) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S354C 和 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V；或

c) 一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有

至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D。

在一些实施方案中，Fc 区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。

还可以将本发明的结合分子例如抗体中的 Fc 区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对 Fc 区的突变。

在一个实施方案中，在 Fc 区的效应子功能（例如 Fc 区的补体激活功能）的特性上修饰 Fc 区。在一个实施方案中，所述效应子功能相对于野生同种型 Fc 区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：使用天然具有降低或消除的效应子功能的 Fc 同种型、和 Fc 区修饰。

在一个优选的实施方案中，Fc 区具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 或 ADCP 或 CDC 效应子功能，例如包含实现上述功能的突变。

如本领域技术人员理解的，根据本发明结合分子例如抗体分子的预期用途，本发明结合分子例如抗体分子也可以在 Fc 结构域中包含改变对一种或多种 Fc 受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述 Fc 受体是 Fcγ 受体，特别地是人 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变。例如，在一些实施方案中，用于本发明的 Fc 区具有降低与 Fcγ 受体结合的 L234A/L235A 突变。在再一优选的实施方案中，Fc 片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善 Fc 片段与 FcRn 结合的突变。

I-6. 双特异性抗体或多特异性抗体

在一些实施方案中，本发明的抗体是双特异性抗体。

术语“双特异性抗体”是指包含第一抗原结合区和第二抗原结合区的抗体，其中所述第一抗原结合区结合一种抗原或表位且所述第二抗原结合区结合另一抗原或另一表位。因此，根据本发明的双特异性抗体包含对于两种不同的抗原，或对一种抗原的两个不同的表位的特异性。双特异性抗体形式包含 IgG 样抗体(Fan 等人 (2015) Journal of Hematology & Oncology . 8: 130)。最常见的 IgG 样抗体类型包含两个 Fab 区域和两个 Fc 区域,每个 Fab 的重链和轻链可以来自单独的单克隆抗体。

可以使用本领域已知的双特异性抗体形式或技术来制备本发明的双特异性抗体。可以在本发明的背景下使用的具体示例性双特异性形式参见例如，Labrijn,et al.Bispecific antibodies:a mechanistic review of the pipeline.Nature Reviews Drug Discovery,2019, 18(8):1-24。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体具有以下模式： 2+1N 端构型的双特异性抗体（图 5A），2+1C 端构型的双特异性抗体(图 5B)，2+2C 端构型的双特异性抗体(图 5C)。在一些是实施方案中，本发明的双特异性抗体还包含 2+2N 构型或串联 Fab 构型。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）。在一个具体的实施方案，所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有

如图 1 所示的构型。在一个具体的实施方案中，第一 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变，第二 Fab 包含电荷突变，以及任选地，第一 Fc 区和第二 Fc 区包含 Innobody 突变或 Knob-into-hole 突变。优选地，第一 Fab 上包含的电荷突变与第二 Fab 上包含的电荷突变位置相同，但是相同位置上突变氨基酸所带电荷相反。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含:

重链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区)连接;
轻链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区;
重链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区)连接;
轻链 2: 从 N 端至 C 端包含后或下述组成: 第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 1 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中一个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），一个第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且另一个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fab 的重链可变区的 N 末端连接（通过或不通过接头）。在一个具体的实施方案，所述双特异性抗体是 2+1N 端构型，其具有如图 5A 所示的构型。在一个具体的实施方案中，1 个或 2 个第二 Fab 包含本发明所述的电荷突变，且第一 Fab 包含本发明所述的电荷突变和二硫键重塑突变，以及任选地，第一 Fc 区和第二 Fc 区基于 Innobody 或 Knob-into-hole 引入突变。优选地，2 个第二 Fab 包含相同的电荷突变。优选地，第二 Fab 上包含的电荷突变与第一 Fab 上包含的电荷突变位置相同，但是相同位置上突变氨基酸所带电荷相反。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含:

重链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中第一 Fab 重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接，且第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fab 的重链可变区的 N 末端连接（通过或不通过接头）;

轻链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区;

重链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区)连接;

轻链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条轻链 2。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 1 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中 2 个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端分别与第一 Fc 区 N 末端和第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与第二 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）。在一个具体的实施方案，所述双特异性抗体是 2+1C 端构型，其具有如图 5B 所示的构型。在一个具体的实施方案中，1 个或 2 个第二 Fab 包含本发明所述的电荷突变，且第一 Fab 包含本发明所述电荷突变和二硫键重塑突变，以及任选地，第一 Fc 区和第二 Fc 区包含 Innobody 突变或 Knob-into-hole 突变。优选地，2 个第二 Fab 包含相同的电荷突变。优选地，第一 Fab 上包含的电荷突变与第二 Fab 上

包含的电荷突变位置相同，但是相同位置上突变氨基酸所带电荷相反。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1，其中第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与第二 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条轻链 2。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 2 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中 2 个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端分别与两个 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）（所述 Fc 区可以相同或不同），且 2 个第一 Fab 在重链可变区的 N 末端分别与两个 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）。在一个具体的实施方案，所述双特异性抗体是 2+2C 端构型，其具有如图 5C 所示的构型。在一个具体的实施方案中，1 个或 2 个第二 Fab 包含本发明所述的电荷突变，且 1 个或 2 个第一 Fab 包含本发明所述电荷突变和二硫键重塑突变。在一个具体的实施方案中， 2 个第二 Fab 包含相同的本发明所述的电荷突变，和/或 2 个第一 Fab 包含相同的本发明所述的电荷突变和二硫键重塑突变。优选地，第一 Fab 上包含的电荷突变与第二 Fab 上包含的电荷突变位置相同，但是相同位置上突变氨基酸所带电荷相反。在一个实施方案中，所述双特异性抗体包含

重链：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1- Fc 区-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1，其中第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条重链。

在一些实施方案中，本发明的抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中，本发明的多特异性抗体是三特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的三特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一抗原结合区、特异性结合第二抗原的第二抗原结合区和特异性结合第三抗原的第三抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第三抗原结合区包含 scFv（例如 VH-VL，或 VL-VH），其经由或不经由接头在其 VH 或 VL 的 N 末端或 C 末端（例如 scFv 是 VL-VH，例如 VL 的 N 末端）与第二 Fc 区的 C 末端连接。在一个具体的实施方案中，三

特异性抗体的构型为 2+1C 端构型的（图 7A 或 B）。在一个具体的实施方案中，第一 Fab 包含电荷突变和二硫键重塑突变，第二 Fab 包含电荷突变，以及任选地，第一 Fc 区和第二 Fc 区包含 Innobody 突变或 Knob-into-hole 突变。优选地，第一 Fab 上包含的电荷突变与第二 Fab 上包含的电荷突变位置相同，但是相同位置上突变氨基酸所带电荷相反。在一个实施方案中，所述多特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区-scFv，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接，且 scFv 经由或不经由接头在其 VH 或 VL 的 N 末端或 C 末端（例如 scFv 是 VL-VH，例如 VL 的 N 末端）与第二 Fc 区的 C 末端连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

I-7. 抗原和抗原结合区

本发明的结合分子，如抗体，例如多特异性抗体，例如双特异性抗体，可以结合任何靶标，如适用于抗体的抗原，或配体或受体。

在一些实施方案中，抗原是肿瘤相关抗原（TA）。在一些实施方案中，肿瘤相关抗原是免疫检查点分子。

在一些实施方案中，所述靶标或抗原选自 FAP、CEA、p95 HER2、BCMA、EpCAM、MSLN、MCSP、HER-1、HER-2、HER-3、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52Flt3、EpCAM、IGF-1R、FOLR1、Trop-2、CA-12-5、HLA-DR、MUC-1(粘蛋白)、GD2、A33-抗原、PSMA、PSCA、转铁蛋白-受体、TNC(肌腱蛋白)、CA-IX、CD3、B7H3、EGFR、Hel、cMET、Axl、GPRC5D、PD-1、PD-L1、CD47、免疫激活分子如 4-1BB、CD40、OX40 等。

在一些实施方案中，所述靶标或抗原例如选自以下的一个或多个靶标/抗原：CD3、BCMA、CD20、Her2、Her3，B7H3、EGFR、Hel、cMET、Axl、GPRC5D、免疫检查点分子例如 PD-1、PD-L1、CD47、、4-1BB、CD40、OX40，或同一抗原的不同表位。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体结合一个抗原的两个不同的表位或结合两个抗原。

在一些具体的实施方案中，本发明的双特异性抗体结合选自如下的两个抗原：

CD3/BCMA，CD3/CD20，CD3/Her2，Her2/Her3，B7H3/EGFR, PD-L1/CD47, PD-L1/CD40, PD-L1/4-1BB, EGFR/Her3, Her2/Hel, Her2/PD-1, Her2/PD-L1, Her2/CD47, Her2/cMet, CD3/GPRC5D。

在一些具体的实施方案中，本发明的三特异性抗体结合 BCMA、GPRC5D 和 CD3。

本发明的结合分子例如抗体的靶标结合区或抗原结合区可以是来源于结合上述抗原的抗体。

- 特异性结合 Her2 的抗原结合区

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 Her2 的抗体，例如曲妥珠单抗。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 Her2 的抗体如曲妥珠单抗的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 Her2 的抗体如曲妥珠单抗的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 Her2 的抗体如曲妥珠单抗的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 Her2 的抗体如曲妥珠单抗的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 Her2 的抗体如曲妥珠单抗的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 Her2 的抗体如曲妥珠单抗的 Fab，以及本发明所述的突变。

- 特异性结合 PD-1 的抗原结合区

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 PD-1 的抗体，例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，例如 Sintilimab 单抗。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 PD-1 的抗体例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，如 Sintilimab 单抗的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 PD-1 的抗体例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，如 Sintilimab 单抗的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 PD-1 的抗体例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，如 Sintilimab 单抗的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 PD-1 的抗体例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，如 Sintilimab 单抗的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 PD-1 的抗体例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，如 Sintilimab 单抗的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 PD-1 的抗体例如 WO2017025016 中公开的 PD-1 抗体，如 Sintilimab 单抗的 Fab，以及本发明所述的突变。

- 特异性结合 CD47 的抗原结合区

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的特异性结合 CD47 的抗体，例如其中公开的 ADI26630。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的 CD47 抗体，例如其中公开的 ADI26630 的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的 CD47 抗体，例如其中公开的 ADI26630 的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的 CD47 抗体，例如其中公开的 ADI26630 的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的 CD47 抗体，例如其中公开的 ADI26630 的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的 CD47 抗体，例如其中公开的 ADI26630 的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD47 的抗体，例如 WO2019042285A1 中公开的特异性结合 CD47 的抗体，例如其中公开的 ADI26630 的 Fab，以及本发明所述的突变。

- 特异性结合 cMet 的抗原结合区

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab.

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab 的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab 的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab 的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab 的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab 的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些抗原结合区包含已知的特异性结合 cMet 的抗体，例如 Onartuzumab 的 Fab，以及本发明所述的突变。

- 特异性结合 GPRC5D 的抗原结合区

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 GPRC5D 的抗体，例如 PCT/CN2022/076832 中公开的特异性结合 GPRC5D 的抗体。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 抗体包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为如 SEQ ID NO:87 所示重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 抗体包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO:83 所示轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗体的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:84 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:85 的氨基酸序列或由其组成，和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:86 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:90 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:84 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:85 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:86 的氨基酸序列或由其组成。

在一些方面中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含重链可变区（VH），其中所述 VH

(i)包含与 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些方面中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含轻链可变区（VL），其中所述 VL

(i)包含与 SEQ ID NO:83 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:83 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO:83 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，特异性结合 GPRC5D 的抗体包含 VH 和 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:87 所示的序列或由所述序列组成；和/或 VL 包含 SEQ ID NO:83 所示的序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 3 个重

链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 GPRC5D 的抗体的 Fab，以及本发明所述的突变。

- 特异性结合 CD3 的抗原结合区

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

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

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

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

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

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

在一些抗原结合区包含已知的特异性结合 CD3 的抗体，例如 WO2022068809 中公开的 CD3 抗体，例如其中的 sp34.24 或 sp34.87 的 Fab，以及本发明所述的突变。

- 特异性结合 BCMA 的抗原结合区

在一些实施方案中，抗原结合区来源于特异性结合 BCMA 的抗体，例如 PCT/CN2022/076832 中公开的特异性结合 BCMA 的抗体。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 抗体包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 为如 SEQ ID NO:103 所示重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 抗体包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为具有如 SEQ ID NO:107 所示轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 抗体的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:104 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:105 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID

NO:106 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:108 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:109 的氨基酸序列或由其组成，和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 抗体包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:104 的氨基酸序列或由其组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:105 的氨基酸序列或由其组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:106 的氨基酸序列或由其组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO:108 的氨基酸序列或由其组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO:109 的氨基酸序列或由其组成，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列或由其组成。

在一些方面中，特异性结合 BCMA 抗体包含重链可变区（VH），其中所述 VH

(i)包含与 SEQ ID NO:103 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:103 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO:103 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些方面中，特异性结合 BCMA 抗体包含轻链可变区（VL），其中所述 VL

(i)包含与 SEQ ID NO: 107 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:107 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO:107 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，特异性结合 BCMA 抗体包含 VH 和 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:103 所示的序列或由所述序列组成；和/或 VL 包含 SEQ ID NO:107 所示的序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 BCMA 的抗体的 1、2、3、4、5、或 6 个 CDR。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 BCMA 的抗体的 1、2 和 3 个重链可变区 CDR，即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中个，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 BCMA 的抗体的 1、2 和 3 个轻链可变区 CDR，即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 BCMA 的抗体的 3 个重链可变区 CDR 和 3 个轻链可变区 CDR。

在一些实施方案中，抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 BCMA 的抗体的重链可变区和轻链可变区，以及本发明所述的突变。

在一些抗原结合区包含已知的或上述特异性结合 BCMA 的抗体的 Fab，以及本发明所述的突变。

I.8. 结合分子的结合片段

本发明还涉及本文所述的结合分子，例如抗体的片段，特别是特异性结合分子所结合靶标的片段，例如抗原结合片段。

在一些实施方案中，抗原结合片段是 Fab。

在一些实施方案中，抗原结合片段包含 1 个或多个 Fab，其中一个或多个 Fab 包含本公开所述的突变或突变组合。

I.9. 示例性的实施方案

1、抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和一个或多个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中所述的抗原结合区中的至少一个或多个包含重链 CH1 和轻链 CL，并且在所述 CH1-CL 的界面上包含二硫键重塑突变，和/或
所述抗原结合区中的至少一个或多个包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对包含电荷突变，所述电荷突变为将所述氨基酸对上的两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸;
其中所述第一抗原和第二抗原可以相同或不同;
优选地，二硫键重塑突变仅包含在一个抗原结合区的 CH1-CL 界面上。
2、实施方案 1 的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变包括
(i) 在重链 CH1 的位置 126 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 124 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(ii) 在重链 CH1 的位置 168 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 164 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(iii) 在重链 CH1 的位置 170 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 162 或 164 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(iv) 在重链 CH1 的位置 173 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 160 或 162 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(v) 在重链 CH1 的位置 128 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 118 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(vi) 在重链 CH1 的位置 134 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 116 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(vii) 在重链 CH1 的位置 136 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 114 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(viii) 在重链 CH1 的位置 171 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 162 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；

(ix) 在重链 CH1 的位置 139 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 116 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）。

3、实施方案 2 的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变包括

(i) 在 CH1 中包含 F126C，且在 CL 中包含 Q124C（EU 编号）；

(ii) 在 CH1 中包含 H168C，且在 CL 中包含 T164C（EU 编号）；

(iii) 在 CH1 中包含 F170C，且在 CL 中包含 T164C（EU 编号）；

(iv) 在 CH1 中包含 F170C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）；

(v) 在 CH1 中包含 V173C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）；

(vi) 在 CH1 中包含 V173C，且在 CL 中包含 Q160C（EU 编号）；

(vii) 在 CH1 中包含 L128C，且在 CL 中包含 F118C（EU 编号）；

(viii) 在 CH1 中包含 S134C，且在 CL 中包含 F116C（EU 编号）；

(ix) 在 CH1 中包含 S136C，且在 CL 中包含 S114C（EU 编号）；

(x) 在 CH1 中包含 P171C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）；

(xi) 在 CH1 中包含 T139C，且在 CL 中包含 F116C（EU 编号）。

4、抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和一个或多个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中所述的抗原结合区中的至少一个包含重链 CH1 和轻链 CL，并且在所述 CH1-CL 的界面上包含二硫键重塑突变，其中所述二硫键重塑突变为在 CH1 中包含 T139C，且在 CL 中包含 F116C，其中所述第一抗原结合区和第二抗原结合区可以相同或不同。

5、实施方案 2-4 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变还包含重链恒定区-轻链恒定区界面内的链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代。

6、实施方案 5 的抗体或其抗原结合片段，其中链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代包括在 CH1 中的第 220 位的半胱氨酸被非半胱氨酸取代，且在 CL 的第 214 位的半胱氨酸被非半胱氨酸取代。

7、实施方案 6 的抗体或其抗原结合片段，其中链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代包括在 CH1 中的 C220S/A/V，且在 CL 中包含 C214S/A/V（EU 编号）。

8、实施方案 6 的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变包括

(i) 在 CH1 中的 F126C 和 C220S，以及在 CL 中的 Q124C 和 C214S（EU 编号）；

(ii) 在 CH1 中包含 H168C 和 C220S，，且在 CL 中包含 T164C 和 C214S（EU 编号）；

(iii) 在 CH1 中包含 F170C 和 C220S，，且在 CL 中包含 T164C 和 C214S（EU 编号）；

(iv) 在 CH1 中包含 F170C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S162C 和 C214S（EU 编号）；

(v) 在 CH1 中包含 V173C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S162C 和 C214S（EU 编号）；

(vi) 在 CH1 中包含 V173C 和 C220S，，且在 CL 中包含 Q160C 和 C214S（EU 编号）；

(vii) 在 CH1 中包含 L128C 和 C220S，，且在 CL 中包含 F118C 和 C214S（EU 编号）；

(viii) 在 CH1 中包含 S134C 和 C220S，，且在 CL 中包含 F116C 和 C214S（EU 编号）；

(ix) 在 CH1 中包含 S136C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S114C 和 C214S（EU 编号）；

(x) 在 CH1 中包含 P171C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S162C 和 C214S（EU 编号）；

(xi) 在 CH1 中包含 T139C 和 C220S，，且在 CL 中包含 F116C 和 C214S（EU 编号）。

9、实施方案 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中 CH1 区为人的 IgG CH1，例如，人 IgG1 CH1，人 IgG2 CH1，人 IgG3 CH1 或人 IgG4 CH1，例如 CH1 区包含 SEQ ID NO:116 所示的氨基酸序列；

和/或 CL 区为人的 Kappa 轻链 CL 区或人的 Lambda 轻链 CL 区，例如 CL 区包含 SEQ ID NO:54 或 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列。

10、实施方案 8 或 9 的抗体或其抗原结合片段，其中 CH1

(i) 包含与 SEQ ID NO:129 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F126C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:129 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(ii) 包含与 SEQ ID NO:133 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 H168C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:133 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(iii)包含与 SEQ ID NO:135 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F170C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:135 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(iv)包含与 SEQ ID NO:137 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 V173C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:137 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(v) 包含与 SEQ ID NO:139 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 L128C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:139 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(vi)包含与 SEQ ID NO:141 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S134C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:141 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(vii)包含与 SEQ ID NO:143 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S136C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:143 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(viii)包含与 SEQ ID NO:145 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 P171C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:145 所示的氨基酸序列或由所述序列组成; 或
(ix)包含与 SEQ ID NO:147 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T139C 和 C220S; 或包含 SEQ ID NO:147 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。
11、实施方案 8-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中 CL
(i) 包含与 SEQ ID NO:128 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q124C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:128 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(ii)包含与 SEQ ID NO:149 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T164C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:149 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(iii)包含与 SEQ ID NO:151 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S162C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:151 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(iv)包含与 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q160C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(v)包含与 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F118C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列或由所述序列组成;
(vii)包含与 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F116C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成; 或
(viii)包含与 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S114C 和 C124S; 或包含 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

12、实施方案 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置选自：重链可变区的位置 39 和轻链可变区的位置 38、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 87、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 44、重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 43 或重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 44（kabat 编号）。

13、实施方案 1-12 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中至少一个第一抗原结合区中的重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置与至少一个第二抗原结合区的位置相同。

14、实施方案 13 中的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区的氨基酸对的位置上的突变后的氨基酸与第二抗原结合区相同位置上的突变后的氨基酸带有相反的电荷。

15、实施方案 14 的抗体或其抗原结合片段，其中

（1）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸; 和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸;

（2）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸; 和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸;

（3）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸; 和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸;

（4）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸; 和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸; 或者

（5）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸; 和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

16、实施方案 15 的抗体或其抗原结合片段，其中所述带正电荷的氨基酸选自 K、R 或 H，和/或所述带负电荷的氨基酸选自 E 或 D。

17、实施方案 16 的抗体或其抗原结合片段，其中

(i). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 K;

(ii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 K;

(iii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K;

(iv). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 K；

(v). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

18、实施方案 1-17 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体包含电荷突变和二硫键重塑突变。

19、实施方案 1-18 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中一个或多个或全部结合相同抗原的抗原结合区包含相同的突变。

20、实施方案 1-19 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中，第一抗原结合区包含重链可变区、重链恒定区 CH1、轻链可变区和轻链恒定区 CL，且第二抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

21、实施方案 20 的抗体或其抗原结合片段，其中

1）第一抗原结合区包含实施方案 1-17 中任一项所定义的二硫键重塑突变；或者

2）第一抗原结合区包含实施方案 1-17 中任一项所定义的电荷突变；

3）第一抗原结合区包含实施方案 1-17 中任一项所定义的二硫键重塑突变和电荷突变；或者

4）第一抗原结合区包含实施方案 1-17 中任一项所定义的二硫键重塑突变和电荷突变；且第二抗原结合区包含实施方案 1-17 中任一项所述的电荷突变。

22、实施方案 21 的抗体或其抗原结合片段，其中

1）第一抗原结合区包含实施方案 2-8 中任一项所定义的二硫键重塑突变；

2）第一抗原结合区包含如实施方案 12-17 中任一项所定义的电荷突变；

3）第一抗原结合区包含实施方案 2-8 中任一项所定义的二硫键重塑突变且包含如实施方案 12-17 中任一项所定义的电荷突变；或者

4）第一抗原结合区和第二抗原结合区包含如实施方案 12-17 中任一项所定义的电荷突变，并且第一抗原结合区还包含实施方案 2-8 中任一项所定义的二硫键重塑突变。

23、实施方案 22 的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体的第一抗原结合区包含选自如下的突变组合：

	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S

	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S
组合 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S
组合 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S
组合 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S

	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S
组合 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S

任选地，所述第二抗原结合区还包含选自如下的突变组合:

	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39D	Q38K
组合 2	L45D	Y87K
组合 3	L45D	P44K
组合 4	Y91D	A43K
组合 5	Y91D	P44K

。

24、实施方案 23 的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体的所述第一抗原结合区和第二抗原结合区分别包含如下的突变组合:

	第一抗原结合区				第二抗原结合区	
	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
组合 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C,	Y87D	S162C,	L45D	Y87K

		C220S		C214S		
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
组合3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	L45D	P44K
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	L45D	P44K
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K

组合4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
组合5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	Y91D	P44K

	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K

。

25、抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和一个或多个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中所述抗原结合区中的至少一个包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对包含电荷突变，所述电荷突变为将所述氨基酸对上的两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸，其中所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置选自：重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 87、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 44、重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 43 或重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 44（kabat 编号）。

26、实施方案 25 的抗体或其抗原结合片段，其中至少一个第一抗原结合区中的重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置与至少一个第二抗原结合区的位置相同，其中第一抗原和第二抗原相同或不同。

27、实施方案 26 中的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区的氨基酸对的位置上的突变后的氨基酸与第二抗原结合区相同位置上的突变后的氨基酸带有相反的电荷。

28、实施方案 27 的抗体或其抗原结合片段，其中

（1）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；

（2）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；

（3）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；或者

（4）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

29、实施方案 28 的抗体或其抗原结合片段，其中所述带正电荷的氨基酸选自 K、R 或 H，和/或所述带负电荷的氨基酸选自 E 或 D。

30、实施方案 29 的抗体或其抗原结合片段，其中

(i). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 K;

(ii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K;

(iii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 K；或

(iv). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

31、实施方案 1-30 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所有第一抗原结合区包含相同的突变，且所有第二抗原结合区包含相同的突变。

32、实施方案 1-31 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区为抗体的 Fab 片段，和/或第二抗原结合区为抗体的 Fab 片段。

33、实施方案 1-32 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体一个或多个或全部第一抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区，且一个或多个或全部第二抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，或者其中一个或多个或全部第一抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，且一个或多个或全部第二抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区。

34、实施方案 1-33 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体还包含第一 Fc 区和第二 Fc 区，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区相同或不同。

35、实施方案 34 的抗体或其抗原结合片段，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区分别为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc, 人 IgG2 Fc, 人 IgG3 Fc，或人 IgG4 Fc，例如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:122 或 123 或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

36、实施方案 34 或 35 的多特异性抗体，其中基于 Knob-in-Hole 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。

37、实施方案 36 的抗体或其抗原结合片段，其中

a)一个 Fc 区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含 T366S, L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)，或

b) 一个 Fc 区包含氨基酸替代 S354C 和 T366W ,且另一个 Fc 区包含氨基酸替代 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。

38、实施方案 36 的多特异性抗体，其中

a)一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列或由其组成;

b) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列;

c)一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S354C 和 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V;
d)一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列或由其组成;
e) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列；或
f)一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 T366S ,L368A 和 Y407V。
39、实施方案 34 或 35 的抗体或其抗原结合片段，其中基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入突变，促进第一 Fc 区和第二 Fc 区的异二聚化。
40、实施方案 39 的抗体或其抗原结合片段，其中一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。
41、实施方案 40 的抗体或其抗原结合片段，其中
a)一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列或由其组成;
b) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列；或
c)一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D。
42、实施方案 34-41 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变。
43、实施方案 1-42 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段所结合的抗原选自以下的一个或多个: CD3、BCMA、CD20、Her2、Her3，B7H3、EGFR、Hel、cMET、Axl、GPRC5D、免疫检查点分子例如 PD-1、PD-L1、CD47、免疫激活分子如 4-1BB、CD40、OX40。
44、实施方案 1-43 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原和第二抗原不同且所述抗体是双特异性抗体。
45、实施方案 44 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体结合选自如下的两个抗原: CD3/BCMA，CD3/CD20，CD3/Her2，Her2/Her3，B7H3/EGFR, PD-L1/CD47, PD-L1/CD40，PD-L1/4-1BB, EGFR/Her3, Her2/Hel，Her2/PD-1，Her2/PD-L1, Her2/CD47, Her2/cMet，或 CD3/GPRC5D。
46、实施方案 44 或 45 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）。
47、实施方案 46 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 1 所示的构型。
48、实施方案 46 或 47 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含

重链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区)连接;
轻链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区;
重链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区)连接;
轻链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

49、实施方案 48 的抗体或其抗原结合片段; 其中

(1)第一抗原结合区特异性结合 Her2，其中重链 1 和轻链 1 分别包含如下的 SEQ ID NO: 所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成:

i) SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO:45;

ii) SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO:49;

iii) SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO:22;

iv) SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO:26;

v) SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO:29;

vi) SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO:32;或

vii) SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO:29;

和/或

(2) 第二抗原结合区特异性结合 Hel，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO:所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成:

i) SEQ ID NO:41 和 SEQ ID NO:42;

ii) SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24;

iii) SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28;

iv) SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:30;

v) SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34; 或

vi) SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:30;

(2) -1 第二抗原结合区特异性结合 PD-1，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO: 所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成: SEQ ID NO:46 和 SEQ ID NO:47;

(2) -2 第二抗原结合区特异性结合 CD47，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO: 所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成: SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:51;

(3) -2 第二抗原结合区特异性结合 c-Met，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO:

所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成: SEQ ID NO:52 和 SEQ ID NO:53。

50、实施方案 44 或 45 的多特异性抗体，其中所述双特异性抗体包含 1 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中一个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），一个第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且另一个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fab 的重链可变区的 N 末端连接（通过或不通过接头）。

51、实施方案 50 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 2+1N 端构型，其具有如图 5A 所示的构型。

52、实施方案 51 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中第一 Fab 重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接，且第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fab 的重链可变区的 N 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条轻链 2。

53、实施方案 52 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区结合 CD3，且第二抗原结合区结合 GPRC5D，例如其中，

1）重链 1 包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

2）重链 1 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

54、实施方案 44 或 45 的多抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含 1 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中 2 个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端分别与第一 Fc 区 N 末端和第二 Fc 区 N 末端连接(经由或不经由接头，例如铰链区)，且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与第二 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）。

55、实施方案 54 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 2+1C 端构型，其具有如图 5B 所示的构型。

56、实施方案 55 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1，其中第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与第二 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头(例如铰链区)连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条轻链 2。

57、实施方案 56 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区结合 CD3，且第二抗原结合区结合 GPRC5D，例如其中，

1）重链 1 包含 SEQ ID NO:64 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:64 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

2）重链 1 包含 SEQ ID NO:65 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:65 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

58、实施方案 44 或 45 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含 2 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中 2 个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端分别与两个 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）（所述 Fc 区可以相同或不同），且 2 个第一 Fab 在重链可变区的 N 末端分别与 2 个 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）

59、实施方案 58 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 2+2C 端构型，其具有如图 5C 所示的构型。

60、实施方案 59 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含

重链：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1- Fc 区-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1，其中第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条重链。

61、实施方案 60 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区结合 CD3，且第二抗原结合区结合 GPRC5D，例如其中，

1）重链包含 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

2）重链包含 SEQ ID NO:67 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:67 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

62、实施方案 1-43 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述第一抗原和第二抗原不同，且所述抗体还包含特异性结合一个或多个其他抗原的抗原结合区。

63、实施方案 62 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是三特异性抗体。

64、实施方案 63 的抗体或其抗原结合片段，其中所述三特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一抗原结合区、特异性结合第二抗原的第二抗原结合区和特异性结合第三抗原的第三抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第三抗原结合区包含 scFv（例如 VH-VL 或 VL-VH），其经由或不经由接头在其 VH 或 VL 的 N 末端或 C 末端（例如 scFv 是 VL-VH，例如 VL 的 N 末端）与第二 Fc 区的 C 末端连接。

65、实施方案 64 的抗体或其抗原结合片段，其中所述三特异性抗体的构型为 2+1C 端构型，如图 7A 或 B 所示。

66、实施方案 65 的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区-scFv，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接，且 scFv 经由或不经由接头在其 VH 或 VL 的 N 末端或 C 末端（例如 scFv 是 VL-VH，例如 VL 的 N 末端）与第二 Fc 区的 C 末端连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

67、实施方案 66 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区特异性结合 GPRC5D，第二抗原结合区特异性结合 CD3，和/或第三抗原结合区特异性结合 BCMA，例如其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:71 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:71 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

68、核酸，其编码实施方案 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段，或其任一条或多条链。

69、表达载体，其包含实施方案 68 的核酸。

70、宿主细胞，其包含实施方案 68 的核酸或实施方案 69 的表达载体。

71、制备实施方案 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括

a) 将编码抗体或其抗原结合片段的各条链的核酸引入宿主细胞中；

b) 在宿主细胞体内表达并组装所述抗体或其抗原结合片段；

任选地，所述抗体或其抗原结合片段被纯化，例如被 Protein A 纯化。

72、免疫缀合物，其包含实施方案 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

73、融合蛋白，其包含实施方案 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

74、T 细胞受体，其包含实施方案 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

II. 结合分子的制备

本发明还提供了产生结合分子例如抗体的体外方法，在一些实施方案中，所述结合分子为抗体或融合蛋白。在一些实施方案中，所述抗体为多特异性抗体，例如双特异性抗体。

在一个方面，本发明的结合分子例如抗体的制备方法包括：

a) 将编码结合分子例如抗体的各条链的核酸引入宿主细胞中；

b) 在宿主细胞体内表达并组装结合分子例如抗体；

任选地，所述结合分子例如抗体被纯化，例如被 Protein A 纯化。

在又一个实施方案中，在结合分子例如抗体产生期间向培养基中加入化合物，例如 L-精氨酸。在一个实施方案中，所述精氨酸用于稳定蛋白。

在一些实施方案中，本发明的产物具有与维持突变前的结合分子例如抗体的表达量和亲和力。

在一些实施方案中，本发明的方法以高收率获得稳定的结合分子例如抗体如多特异性抗

体（例如双特异性抗体）。

在一些实施方案中，本发明的方法能够实现在一个细胞系中表达结合分子例如抗体如多特异性抗体（例如双特异性抗体）的各条链并组装，优选地避免了两个细胞系表达和体外重组。

III 核酸和宿主细胞

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

本发明也提供包含本发明核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是 pCNDA 载体，例如 pCNDA3.1 表达载体。

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

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞，例如 Expi293 细胞)。可用的哺乳动物宿主细胞系的例子是由 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚胎肾系(293 或 293T 细胞，如例如记载于 Graham 等,JGenVirol36,59(1977))、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4 细胞，如例如记载于 Mather,BiolReprod23,243-251(1980))、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)，buffalo 大鼠肝细胞(BRL3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(HepG2)、小鼠乳房肿瘤细胞(MMT060562)、TRI 细胞(如例如记载于 Mather 等,AnnalsN.Y.AcadSci383,44-68(1982))、MRC5 细胞和 FS4 细胞。其它可用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括 dhfr-CHO 细胞(Urlaub 等,ProcNatlAcadSciUSA77,4216(1980))；和骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0。在一个实施方案中，宿主细胞是真核生物细胞，优选为哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞或淋巴细胞(例如 Y0、NS0、Sp20 细胞)。

IV. 包含本发明结合分子或其片段的其他分子

在一些实施方案中，本发明的结合分子中的第一和／或第二靶标结合区可以与药物、前药或毒素缀合或者含有药物、前药或毒素的受体基团。此类受体基团可以是例如非天然氨基酸。

因此，本发明还涉及包含本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体（例如双特异性抗体）的免疫缀合物（ADC）。

在一些实施方案中，本发明的结合分子或其片段还可以被构建到 T 细胞受体（TCR）中。在 一些实施方案中，TCR 的可变区包含本公开所述的突变或突变组合，例如二硫键重塑突变，和/或电荷突变。

在一些实施方案中，本发明的结合分子或其片段可以与其他蛋白质融合构成融合蛋白。在一些实施方案中，其他蛋白的实例包括例如配体或受体，例如颗粒相关细胞因子或其受体，如肿瘤坏死因子(TNF)、血管内皮生长因子(VEGF)或转化生长因子(TGF，例如 TGF-β)或其受体，以及其片段。

V. 产品和用途

在一些实施方案中，本发明还涉及包含所述结合分子例如抗体如多特异性抗体例如双特异性抗体的组合物（例如药物组合物）。

在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，组合物，例如，药物组合物，包含本发明的结合分子，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明的组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂或吸收延迟剂等。对于药用辅料的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第八版, R.C.Rowe,P.J.Seskey和S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。可以通过将具有所需纯度的本发明的结合分子与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的结合分子的药物，例如以冻干制剂或水溶液的形式。

在一些实施方案中，本发明涉及利用所述的结合分子例如抗体如多特异性抗体例如双特异性抗体治疗疾病，例如肿瘤例如癌症的方法，或用于所述治疗的用途，或用于制备用于所述治疗的药物的用途。

取决于其治疗用途，本发明的结合分子例如抗体如多特异性抗体例如双特异性抗体还可以与其他治疗剂组合。例如，当所述结合分子用于治疗肿瘤时，所述治疗剂例如用于治疗肿瘤的各种治疗剂，例如化疗剂、血管生成抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫检查点抑制剂或激动剂）。

在一些实施方案中，本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的结合分子，以及一种或多种其它治疗剂等。

本发明的另一个目的是提供一种成套药盒，其包含本发明的药物组合，优选地所述药盒为药物剂量单元形式。由此可以依据给药方案或药物施用间隔提供剂量单元。

在一个实施方案中，本发明的成套药盒在同一包装内包含:

- 含有包含本发明的结合分子的药物组合物的第一容器;
- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

实施例

实施例 1. 突变体抗体的设计

二硫键重塑

一个可以有效强制同源轻重链配对，避免两个抗体的轻重链之间错配的策略是，对于其

中一个抗体的轻重链连接的二硫键进行重塑，改变二硫键的位置，使得错误配对的轻重链不能有效形成二硫键。我们对于重链和轻链接触面的氨基酸对进行筛选，选择两个α碳原子之间距离小于8Å，更优的小于6Å的氨基酸对，并且氨基酸的侧链指向彼此。被选中的氨基酸对如表1所示（EU编号）：

表1：二硫键重塑的位置选择

重链位置	示例CH1	轻链位置	示例CL
F126C	SEQ ID NO:1	Q124C	SEQ ID NO:2
H168C	SEQ ID NO:132	T164C	SEQ ID NO:148
F170C	SEQ ID NO:134	T164C	SEQ ID NO:148
F170C	SEQ ID NO:134	S162C	SEQ ID NO:150
V173C	SEQ ID NO:136	S162C	SEQ ID NO:150
V173C	SEQ ID NO:136	Q160C	SEQ ID NO:152
L128C	SEQ ID NO:138	F118C	SEQ ID NO:36
S134C	SEQ ID NO:140	F116C	SEQ ID NO:38
S136C	SEQ ID NO:142	S114C	SEQ ID NO:99
P171C	SEQ ID NO:144	S162C	SEQ ID NO:150
T139C	SEQ ID NO:146	F116C	SEQ ID NO:38

电荷突变

另一个可以有效强制同源轻重链配对，避免两个抗体的轻重链之间错配的策略是，在重链和轻链的接触面上寻找氨基酸对，突变为带相反电荷的氨基酸，利用相反电荷互相吸引的原理促进同源配对。选择标准为，重链可变区和轻链可变区交界面上保守的氨基酸对，氨基酸对的α碳原子之间距离小于12Å，侧链朝向彼此。被选中的氨基酸对如表2所示（Kabat编码）：

表2：电荷突变组合

	抗体1 重链突变	示例VH	抗体1 轻链突变	示例VL	抗体2 重链突变	示例VH	抗体2 轻链突变	示例VL
组合1	Q39K	SEQ ID NO:3	Q38D	SEQ ID NO:4	Q39D	SEQ ID NO:5	Q38K	SEQ ID NO:6
组合2	L45K	SEQ ID NO:7	Y87D	SEQ ID NO:8	L45D	SEQ ID NO:9	Y87K	SEQ ID NO:10
组合3	L45K	SEQ ID	P44D	SEQ ID	L45D	SEQ ID	P44K	SEQ ID

		NO:7		NO:11		NO:9		NO:12
组合 4	Y91K	SEQ ID NO:13	A43D	SEQ ID NO:14	Y91D	SEQ ID NO:15	A43K	SEQ ID NO:16
组合 5	Y91K	SEQ ID NO:13	P44D	SEQ ID NO:11	Y91D	SEQ ID NO:15	P44K	SEQ ID NO:12

在一个细胞系中表达双特异性抗体所采用的最终突变为二硫键重塑与电荷突变的组合，如表 3 所示：

表 3: V 区电荷突变与二硫键重塑突变组合

	抗体 1				抗体 2	
	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
组合 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
组合 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K
组合 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
组合 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
组合 6	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
组合 7	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
组合 8	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
组合 9	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
组合 10	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
组合 11	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
组合	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C,	Q39D	Q38K

12				C214S		
组合13	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
组合14	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K

当抗体 1 是抗 Her2 单抗，抗体 2 是抗 Hel 单抗时，示例性的双特异性抗体全长链的序列见序列表中的表 3 组合 1-组合 5，即表 9 中的组合 1-组合 5 的抗体。

轻链恒定区的替换

为了进一步方便下游纯化，除去微量错配抗体，可选择对于其中一个抗体的轻链恒定区进行替换，从 C Kappa 替换为 C Lambda（若其中一个抗体本身为 Lambda 轻链则不用替换）。使两个抗体 Fab 为一个 Kappa 型，一个 Lambda 型，用对 Kappa 和 Lambda 型轻链有选择性的亲和介质进行下游纯化。

实施例 2. HEK293 细胞表达突变体以及突变体的纯化

将本发明的各个抗体的各条链均送金唯智基因合成，并分别构建到 pCDNA3.1 模板质粒上，并制备一定量的质粒。实施例中用到的各个抗体的链的序列总结见表 4。

表 4 构建的二硫键重塑的双特异性抗体

抗体名称	Her2/Hel_WT	Her2/Hel_126C_121C	Her2/Hel_126C_124C	Her2/PD-1_WT	Her2/PD-1_126C_121C	Her2/PD-1_126C_124C
重链位置突变	WT	F126C	F126C	WT	F126C	F126C
轻链位置突变	WT	S121C	Q124C	WT	S121C	Q124C
第一抗体重链	SEQ ID NO:39 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 knob 突变	SEQ ID NO:43 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 knob 突变 斜体为包含 F126C 的 CH1 (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:43
第一抗体重链 VH	SEQ ID NO:75 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链 VH,无突变					
第一抗体轻链	SEQ ID NO:40 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链	SEQ ID NO:44 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 S121C	SEQ ID NO:45 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 Q124C	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:45
第一抗体轻链 VL	SEQ ID NO:76 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链 VL，无突变					
第二抗体重链	SEQ ID NO:41 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链，其包含 hole 突变			SEQ ID NO:46 Sintilimab（抗 PD-1）重链，其包含 AA 突变 和 hole 突变		

第二抗体重链 VH	SEQ ID NO:77 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链 VH	SEQ ID NO:79 Sintilimab（抗 PD-1）重链 VH
第二抗体轻链	SEQ ID NO:42 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链	SEQ ID NO:47 Sintilimab（抗 PD-1）轻链，其包含 kappa 轻链恒定区？
第二抗体轻链 VL	SEQ ID NO:78 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL	SEQ ID NO:80 Sintilimab（抗 PD-1）轻链 VL

	表 7 组合 1 即 Her2 _126C_124C/Hel	表 7 组合 2	表 7 组合 3
第一抗体重链	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:48 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 C220S	SEQ ID NO:21 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
第一抗体重链 VH	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:75 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链 VH，无突变	SEQ ID NO:3 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 Q39K
第一抗体轻链	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:49 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 Q124C 和 C214S	SEQ ID NO:22 曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变
第一抗体轻链 VL	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:76 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链 VL，无突变	SEQ ID NO:4 曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 Q38D

第二抗体重链	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:41
第二抗体重链 VH	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:77
第二抗体轻链	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:42
第二抗体轻链 VL	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:78

	表 8Her2/PD-1	表 8Her2/CD47	表 8Her2/cMET	
第一抗体重链	SEQ ID NO:21 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变			
第一抗体重链 VH	SEQ ID NO:3 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 Q39K			
第一抗体轻链	SEQ ID NO:22 曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变			
第一抗体轻链 VL	SEQ ID NO:4 曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 Q38D			
第二抗体重链	SEQ ID NO:46 Sintilimab（抗 PD-1）重链（IgG1 亚型），其包含 AA 突变 和 hole 突变	SEQ ID NO:50 ADI26630 重链	SEQ ID NO:52 Onartuzumab 重链	
第二抗体重链 VH	SEQ ID NO:79 Sintilimab（抗 PD-1）重链 VH，无突变	SEQ ID NO:81 ADI26630 重链 VH	SEQ ID NO:18 Onartuzumab 重链 VH	
第二抗体轻链	SEQ ID NO:47 Sintilimab（抗 PD-1）轻链，其包含 kappa 轻链恒定区	SEQ ID NO:51 ADI26630 轻链	SEQ ID NO:53 Onartuzumab 轻链	

第二抗体轻链 VL	SEQ ID NO:80 Sintilimab（抗 PD-1）轻链 VL，无突变	SEQ ID NO:82 ADI26630 轻链 VL	SEQ ID NO:17 Onartuzumab 轻链 VL	

	表 9 或表 10 组合 1	表 9 或表 10 组合 2	表 9 或表 10 组合 3	表 9 或表 10 组合 4	表 9 或表 10 组合 5
第一抗体重链	SEQ ID NO:21 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链 包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变	SEQ ID NO:25 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 L45K、F126C、C220S 突变和 knob 突变	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:31 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 Y91K_F126C_C220S 和 knob 突变	SEQ ID NO:31
第一抗体重链 VH	SEQ ID NO:3 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 Q39K	SEQ ID NO:7 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 L45K	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:13 曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 Y91K	SEQ ID NO:13
第一抗体轻链	SEQ ID NO:22 曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变	SEQ ID NO:26 曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Y87D_Q124C_C214S	SEQ ID NO:29 曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 P44D、Q124C、C214S	SEQ ID NO:32 曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 A43D_Q124C_C214S	SEQ ID NO:29
第一抗体轻链 VL	SEQ ID NO:4 曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含	SEQ ID NO:8 曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含	SEQ ID NO:11 曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含	SEQ ID NO:14 曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含	SEQ ID NO:11

	Q38D	Y87D	P44D	A43D	
第二抗体重链	SEQ ID NO:23 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 Q39D 和 Hole 突变	SEQ ID NO:27 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 L45D 和 hole 突变	SEQ ID NO:27	SE QID NO:33 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 Y91D 和 hole 突变	SEQ ID NO:33
第二抗体重链 VH	SEQ ID NO:5 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 Q39D	SEQ ID NO:9 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 L45D	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:15 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 Y91D	SEQ ID NO:15
第二抗体轻链	SEQ ID NO;24 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 Q38K 突变	SEQ ID NO:28 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 Y87K 突变	SEQ ID NO:30 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 P44K 突变	SEQ ID NO:34 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 A43K 突变	SEQ ID NO:30
第二抗体轻链 VL	SEQ ID NO:6 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 Q38K	SEQ ID NO:10 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 Y87K	SEQ ID NO:12 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 P44K	SEQ ID NO:16 抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 A43K	SEQ ID NO:12

	表 11 GPRC5D/CD3-1	表 11-GPRC5D/CD3-2	表 11 GPRC5D/CD3-3	表 11-GPRC5D/CD3-4	表 11 GPRC5D/CD3-5	表 11-GPRC5D/CD3-6
轻链 2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 60
轻链 2 可变区	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 93
重链 2	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 61	NA	NA
重链 2	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 94	NA	NA

可变区						
轻链 1	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 63
轻链 1 可变区	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97
重链 1	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67
重链 1 可变区 1	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 95
重链 1 重链可变区 2	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 96

用 0.22 μm 的滤头过滤，用于细胞的瞬转表达。根据所需转染体积传代 Expi293 细胞（Invitrogen），转染前一天将细胞密度调整至 3×10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度再次调整为 3×10^6 个细胞/ml。取终体积 1/10 (v/v)的 Opti-MEM 培养基（Gibco 货号：31985-070）作为转染缓冲液，按照抗体 A 重链：抗体 A 轻链：抗体 B 重链：抗体 B 轻链=1：1：1：1 或其它更适合的比例，加入表达质粒，混匀。加合适的聚乙烯亚胺(PEI)（Polysciences，23966）到上一步的质粒中(质粒与 PEI 的质量比例为 1:3)，混匀后室温孵育 10 min，获得 DNA/PEI 混合物。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 HEK293 细胞并混匀，在 37 ℃，8% CO2 的条件下培养 24 h 后，补加 VPA（Sigma，货号：P4543-100G）使终浓度至 2 mM 及 2%（v/v）Feed（1 g/L Phytone Peptone + 1g/L Difco Select Phytone），继续培养 6 天。收集培养物，以 4000 转／分钟离心 30 分钟，取细胞上清用 0.45 μM 滤膜过滤，通过 ProteinA 亲和层析进行纯化，特殊需求的样品进一步通过离子交换层析、KappaSelect 亲和层析和 LambdaFabSelect 亲和层析进行纯化。

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

具体的离子交换层析纯化操作步骤为：使用超滤浓缩管（MILLIPORE，货号：UFC901096）交换到 pH6.0 低盐 PB 缓冲液（10 mM 磷酸盐，pH6.0）中，并用 Capto HiRes S 10/100（GE，货号 29275879）进行精细纯化。纯化前用 5 倍柱体积的 pH6.0 低盐 PB 缓冲液平衡填料柱；将换液后的样品通过柱子，再用 10 倍柱体积的 pH6.0 低盐 PB 缓冲液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；洗脱时，线性增加 pH6.0 高盐 PB 缓冲液（10 mM 磷酸盐，pH 6.0，1 M NaCl）的浓度（线性梯度：30 个柱体积内将 pH6.0 高盐 PB 缓冲液比例从 30%增加到 100%），收集洗脱主峰。使用超滤浓缩管（MILLIPORE，货号：UFC901096）交换到 PBS 缓冲液（Gibco，货号：70011-044）中。用液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）对纯化后的双特异性抗体进行正确配对比例定量测定。

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

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

配对比例定量测定。

实施例 3 本发明中突变氨基酸的筛选

筛选能正确形成二硫键的突变位点

以曲妥珠单抗为模型抗体，突变去除天然重链和轻链之间的二硫键（重链 C220S，轻链 C214S），然后按照表 1 所选的氨基酸对，突变为半胱氨酸。将突变体单抗在 HEK293 系统中进行表达，用 protein A 纯化后进行非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳，如图 9A-图 9C。可以看到，这些突变体单抗在非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳中能够维持完整分子，只有很少的轻链掉落成分，所选二硫键突变位点基本都正常形成了二硫键。

进一步的，将这些形成了二硫键的抗体进行变性非还原毛细管电泳（nrCE-SDS）（图 9D-图 9M），对于二硫键形成的完整性进行量化测量。可以看到，二硫键重塑抗体的完整分子均在 98%以上，进一步证明了重塑的二硫键都能正确形成。

二硫键重塑突变对正确配对比例的影响

按照表 1 中的 F126C/Q124C 二硫键重塑突变为例测试二硫键重塑突变对正确配对比例的影响，应用本发明的突变的抗体和作为对照的野生型抗体序列。在 HEK293 细胞中表达后，只用 protein A 亲和层析纯化，避免其它纯化方式对于错配分子的去除作用。用 LC-MS 测试 anti-Her2/anti-Hel 抗体对和 anti-Her2/anti-PD-1 抗体对组成双特异性抗体时的正确配对比例。重链之间通过 Knob into hole 促进异源配对。

表 5 二硫键重塑的双特异性抗体以及正确配对比例

抗体名称	正确配对分子比例
Her2/Hel_WT	30.27%
Her2/Hel_126C_121C	58.18%
Her2/Hel_126C_124C	65.10%
Her2/PD-1_WT	55.60%
Her2/PD-1_126C_121C	70.78%
Her2/PD-1_126C_124C	76.93%

由上表可以看出，F126C/Q124C 突变能够显著提高双特异性抗体的正确配对比例，例如 Her2/PD-1 抗体对的野生型抗体对的正确配对比例已达 55.60%。加上 F126C/Q124C 突变后，正确配对比例可进一步达到 76.93%。

可见，F126C/Q124C 突变形成的正确配对分子比例最高，明显高于野生型

抗体序列，也一定程度高于 CN104011221B 中公布的突变 F126C/S121C。

此外，如果突变的半胱氨酸对之间没有正确形成二硫键，具有完整巯基的半胱氨酸往往会和细胞或者溶液中的游离半胱氨酸反应形成二硫键，导致蛋白分子被半胱氨酸化修饰。此修饰可以被 LC-MS 检测到。

表 6 二硫键重塑的双特异性抗体的半胱氨酸修饰测试

抗体名称	半胱氨酸修饰比例
Her2/Hel_WT	N/A
Her2/Hel_126C_121C	N/A
Her2/Hel_126C_124C	N/A
Her2/PD-1_WT	N/A
Her2/PD-1_126C_121C	10%
Her2/PD-1_126C_124C	N/A

无论是在 Her2/Hel 双抗中，还是在 Her2/PD-1 双抗中，F126C/Q124C 突变几乎检测不到游离半胱氨酸被修饰的成分，进一步说明二硫键正确形成的比例很高。相对的，引入了 CN104011221B 中公布的突变 F126C/S121C 的 Her2/PD-1 双特异性抗体还是存在约 10%游离半胱氨酸被修饰的成分，意味着部分 F126C/S121C 二硫键未能完全正确形成。

二硫键重塑突变结合 V 区电荷突变

在二硫键重塑突变（F126C/Q124C）的基础上结合电荷突变（Q39K/Q38D）突变，在 HEK293 细胞中表达后，只用 protein A 亲和层析纯化，避免其它纯化方式对于错配分子的去除作用。用 LC-MS 测试 anti-Her2/anti-Hel 抗体对组成双特异性抗体时的正确配对比例（图 2）。重链之间通过 Knob into hole 促进异源配对。

表 7 二硫键重塑结合电荷突变的双特异性抗体正确配对比例

	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变	正确配对分子比例
组合 1	N/A	F126C	N/A	Q124C	47.4%
组合 2	N/A	F126C, C220S	N/A	Q124C, C214S	65.6%
组合 3	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	96.3%

可以看到，二硫键重塑后，双特异性抗体正确配对率显著提高。在移除抗体天然的二硫键之后（表 7 组合 2，图 2B），比仅仅添加二硫键（表 7 组合 1，图 2A）的正确配对率进一步提高。进一步的，在 V 区加入电荷突变后（表 7 组合 3，图 2C），正确配对率还会进一步提高。

用 4 对不同的抗体对组合双抗，在 HEK293 细胞中表达后，只用 protein A 亲和层析纯化，避免其它纯化方式对于错配分子的去除作用。用 LC-MS 测试组成双特异性抗体时的正确配对比例（图 3）。验证二硫键重塑结合电荷突变对于不同的抗体具备通用性。同时，观察抗体表达量水平。

表 8-1 不同抗体对引入二硫键重塑结合电荷突变后的抗体序列以及正确配对比例

抗体对	突变	正确配对分子比例	表达量（mg/L）
Her2/PD-1	Q39K,F126C,C220S/ Q38D,Q124C,C214S	86.1%	199.6
Her2/CD47		89.1%	234.8
Her2/cMET		94.6%	222.9

4 组不同的抗体组合都维持了 90%左右的正确配对比例，说明二硫键重塑结合电荷突变对于不同的抗体具备通用性。从表达量看，4 组不同的抗体组合都可以达到 200mg/L 左右的水平，达到了较高的表达量，水平与单抗相当。

二硫键重塑突变结合不同位置电荷突变对正确配对比例的影响

IgG 在细胞中组装分泌的天然过程是：重链在细胞内表达后，CH1 与分子伴侣 BiP 结合，在遇到轻链之前都保持不完全折叠状态。遇到轻链后，轻链首先通过 VL 与 VH 结合，然后 CL 替换掉 BiP 并与 CH1 结合，在 CL 的帮助下，CH1 完全折叠，轻重链装配完成。（Matthias J. Feige, An Unfolded CH1 Domain Controls the Assembly and Secretion of IgG Antibodies, Molecular Cell. 2009 Jun 12;34(5):569-79）。由此生物学过程可知，VH 和 VL 的相互识别是驱动轻重链装配的第一过程，所以，本发明的电荷突变主要设计在 VH 和 VL 的区域。为了进一步证明我们的设计优效性，我们也同时在 CH1 和 CL 之间引入电荷，来对比电荷突变位于 V 区和 C 区对于正确配对比例的影响。包含表 8-2 中任一项突变的 Her2/Hel 双特异性抗体与包含表 7 组合 3 的抗体在序列上的区别仅在于所列出的突变组合的区别，其他序列不变。

表 8-2 二硫键重塑突变结合不同位置电荷突变对于轻重链正确配对比例的影响

电荷突变	二硫键重塑突变	正确配对分子比例
Q39K/Q38D（V 区）	F126/Q124	96.34%

H171K+T190K/N137D（C 区）	F126/Q124	77.89%
K216E/E123R（C 区）	F126/Q124	55.87%

可以看到，在相同的二硫键重塑突变基础上，组合位于 V 区的 Q39K/Q38D 电荷突变和位于 C 区的 H171K+T190K/N137D 和 K216E/E123R 电荷突变，位于 V 区的电荷突变会带来高的正确配对分子比例。证明电荷位于 V 区的设计优效性。

其它的 V 区电荷突变与二硫键重塑的组合

除了 Q39K 和 Q38D 之外，将其它发现的 V 区电荷突变与二硫键重塑突变 F126C/Q124C 进行组合，形成表 3 中的组合 1-组合 5。在 HEK293 细胞中表达后，只用 protein A 亲和层析纯化，避免其它纯化方式对于错配分子的去除作用。用 LC-MS 测试组成双特异性抗体时的正确配对比例(图 4)。重链之间通过 Knob into hole 促进异源配对。同时，观察抗体表达量水平。

表 9-1 V 区突变结合二硫键重塑后正确配对的分子比例

抗体对	突变	正确配对的分子比例	表达量（mg/L）
Her2/Hel	组合 1	92.17%	305.6
	组合 2	98.88%	221.0
	组合 3	99.11%	183.5
	组合 4	98.47%	83.8
	组合 5	99.47%	104.6

组合 1 到组合 5 的突变方式均能达到超过 90%的正确配对率。组合 1 到组合 3 可以达到与单抗相近的表达量（200-300 mg/L）。组合 4 与组合 5 的表达量略低，但也可以达到 100 mg/L 左右。因此，包含本发明的突变组合的双特异性抗体能达到较好的表达水平。

V 区电荷突变与其它二硫键重塑突变的组合

除了 F126C/Q124C 之外，将其它发现的二硫键重塑突变与 V 区电荷突变 Q39K 和 Q38D 进行组合，形成表 3 中的组合 6-组合 14。包含表 3 中组合 6-组合 14 中任一项突变的 Her2/Hel 双特异性抗体与包含表 3 中组合 1-5 中任一项在序列上的区别仅在于所列出的突变组合的区别，其他序列不变。

在 HEK293 细胞中表达后，只用 protein A 亲和层析纯化，避免其它纯化方式对于错配分子的去除作用。用 LC-MS 测试组成双特异性抗体时的正确配对比例。重链之间通过 Knob into hole 促进异源配对。同时，观察抗体表达量水平。

表 9-2 V 区电荷突变结合二硫键重塑突变后正确配对的分子比例

抗体对	突变	正确配对的分子比例	表达量（mg/L）
Her2/Hel	组合 6	83.90%	199.6
	组合 7	97.50%	229.5
	组合 8	98.90%	243.2
	组合 9	91.90%	252.9
	组合 10	80.52%	253.2
	组合 11	79.46%	264.1
	组合 12	86.86%	262.2
	组合 13	93.16%	224.0
	组合 14	83.82%	246.1

组合 6 到组合 14 的突变方式能使得双抗达到 79.46%~98.90%的正确配对率，表达量均能达到与单抗相似的水平（200-300 mg/L）。因此，包含本发明的突变组合的双特异性抗体均能达到较好的正确配对比例和表达水平。

实施例 4. 本发明中抗体的亲和力测定实验

采用生物膜薄层干涉(BiolayerInterferometry，BLI)技术测定本发明中的双特异性抗体结合各自抗原的平衡解离常数（KD）。BLI 法亲和力测定按照现有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页）进行。

实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 ProA（ForteBio，18-5010）传感器浸泡于 SD buffer（PBS 1×，BSA 0.1%，Tween-20 0.05%）中。取 100 μl 的 SD 缓冲液、抗原融合蛋白分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板（Greiner，675076）中。根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation； 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度，转速为 400 rpm，温度为 30 度。使用 ForteBio 分析软件分析 KD 值。

以抗-Her2 抗体作为模板，引入表 3 中的组合 1-组合 5 突变后，与其抗原 Her2 的亲和力数据见下表。

表 10. 示例抗体与人 Her2 的亲和力检测

Name	Antigen	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)
WT	人 Her2	2.68E+05	2.00E-04	7.46E-10
组合 1		2.49E+05	2.00E-04	8.05E-10
组合 2		2.68E+05	2.00E-04	7.48E-10
组合 3		2.64E+05	2.00E-04	7.58E-10

组合 4		2.62E+05	2.00E-04	7.64E-10
组合 5		2.78E+05	2.00E-04	7.20E-10

由以上图表结果可见，各突变体与野生型抗体在亲和力上没有明显差异。本发明所述在 V 区的轻重链结合面上引入的突变和二硫键的改变不会影响抗体亲和力。

实施例 5. 多价构型拓展

应用本发明的双特异性抗体除了单价 1+1 构型（图 1）外，还可以拓展出多价的 2+1N 端构型（图 5A），2+1C 端构型（图 5B），2+2C 端构型（图 5C），等多种模式。除串联 Fab 构型无需重链异源配对外，重链之间通过本公司的 Innobody 突变促进异源配对。

按照实施例 2 的方法表达和纯化多价的 2+1N 端构型，2+1C 端构型，2+2C 端构型并用质谱检测正确配对比例（图 6），结果总结参见表 11。

表 11 多价构型分子的正确配对比例

抗体编号	抗体对	构型	突变	正确配对的分子比例
GPRC5D/CD3-1	GPRC5D/CD3	2+1N 端构型	仅二硫键重塑	37.80%
GPRC5D/CD3-2	GPRC5D/CD3	2+1N 端构型	二硫键重塑结合电荷突变	99.32%
GPRC5D/CD3-3	GPRC5D/CD3	2+1C 端构型	仅二硫键重塑	59.10%
GPRC5D/CD3-4	GPRC5D/CD3	2+1C 端构型	二硫键重塑结合电荷突变	98.58%
GPRC5D/CD3-5	GPRC5D/CD3	2+2C 端构型	仅二硫键重塑	42.60%
GPRC5D/CD3-6	GPRC5D/CD3	2+2C 端构型	二硫键重塑结合电荷突变	98.89%

由上表中结果所示，本专利所声明的突变应用于多价构型的分子时，仍能保持很高的正确配对比例。且在应用于多价构型分子时，同样可以看到，二硫键重塑结合电荷突变，比仅二硫键重塑突变，正确配对比例提高的更高。

实施例 6. 细胞杀伤实验

BCMA/GPRC5D/CD3 三抗(野生型和引入本专利所声明的突变，构型见图 7，序列参见序列表)同时与 H929 细胞表面的 BCMA 或 GPRC5D 和原代 PBMC 中的 T 细胞表面的 CD3 结合，激活 T 细胞，介导 T 细胞对 BCMA 或 GPRC5D 阳性肿瘤细胞的杀伤。本研究利用乳酸脱氢酶（LDH）法检测 PBMC 与 BCMA 阳性的 H929 细胞以及 GPRC5D 阳性的 H929 细胞共培养条件下，加入示例抗体 24 小时后收集的上清中死细胞释放的 LDH 的水平，从而评估抗体介导的 T 细胞对 BCMA 肿瘤细胞以及 GPRC5D 肿瘤细胞的杀伤能力。通过未引入本发明电荷突变和二硫键重塑突变的 BCMA/GPRC5D/CD3 三抗（图 7A）和引入本专利所声明的突变的 BCMA/GPRC5D/CD3 三抗（图 7B），评估本专利声明的突变对于该三抗分子的影响。

从液氮罐中取出 PBMC（赛笠生物， SLB-HP100A）于 37 ℃快速融化，滴加入预热的 1640 培养基（Gibco， 22400-071）(含 0.1% DNA 酶)中，得混合液 10 ml。400 g 离心 5 分钟，用 10 ml 的 1640 培养基重悬，并加入 10 μl DNA 酶，37 ℃、5 % CO2、贴壁培养过夜。吸取悬浮细胞 400 g 离心 5 分钟，用 1640 培养基重悬，计数，并将细胞密度调整为 4×106 cell/ml，作为效应细胞。BCMA 或 GPRC5D 阳性 H929 细胞（ ATCC, CRL-9068）作为靶细胞，400 g 离心 5 分钟，用 1640 培养基重悬，计数，并将细胞密度调整为 2×105 cell/ml。将调整好细胞密度的靶细胞加到 96 孔板中，每孔 100 μl; 将梯度稀释好的抗体加到 96 孔板中，每孔 50 μl; 再将效应细胞 PBMC 加到 96 孔板中，每孔 50 μl。最终效靶比为 10:1。将上述 96 孔板置于 37 ℃、5% CO2 培养箱中培养 24 小时后取上清，按照 LDH 检测试剂盒（CytoTox96 non-radioacitive cytotoxicity kit，Promega）说明书检测死细胞释放到上清中的 LDH 的含量，然后计算示例抗体对 MM 细胞的杀伤比例。

在如以上测定法所述进行的实验中，示例抗体能够剂量依赖性地诱导人 PBMC 对 H929 细胞的杀伤作用（见图 8）。

在如以上测定法所述进行的实验中，比较了示例抗体在诱导同一供者来源的 PBMC 对 BCMA 或 GPRC5D 阳性的 H929 细胞系的杀伤作用，是否引入本专利所声明的突变，对于示例抗体的杀伤能力没有影响。但引入本专利所声明的突变后，示例抗体可以在一个细胞系中表达制备，节省了在两个细胞系中表达制备和体外重组的麻烦。

说明书中	SEQ ID NO	注释	序列 （突变位点下划线标记）	描述
表 1	1	F126C	ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	CH1（IgG1 的 CH1），含有 126C 突变
	2	Q124C	RTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	CL (Kappa) ，含有 124C 突变
表 2: 组合 1	3	抗体 1, 重链, 突变 Q39K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR**K**APGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 Q39K
	4	抗体 1, 轻链, 突变 Q38D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ**D**KPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 Q38D
	5	抗体 2, 重链, 突变 Q39D	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVR**D**APGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSS	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 Q39D
	6	抗体 2 轻链突变 Q38K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ**K**KPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 Q38K
表 2: 组合 2	7	抗体 1, 重链, 突变 L45K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG**K**EWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 L45K
	8	抗体 1, 轻链, 突变 Y87D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY**D**CQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 Y87D
	9	抗体 2, 重链, 突变 L45D	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKG**D**EWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSS	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 L45D
	10	抗体 2, 轻链, 突变 Y87K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY**K**CQQADLPAFAFGGGTKVEIK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 Y87K
表 2: 组合 3	7	抗体 1, 重链,	SEQ ID NO:7	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

		突变 L45K		
	11	抗体 1， 轻链， 突变 P44D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA**D**KLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 P44D
	9	抗体 2， 重链， 突变 L45D	SEQ ID NO:9	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 L45D
	12	抗体 2， 轻链， 突变 P44K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA**K**KLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 P44K
表 2： 组合 4	13	抗体 1， 重链， 突变 Y91K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY**K**CSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH
	14	抗体 1， 轻链， 突变 A43D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK**D**PKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 A43D
	15	抗体 2， 重链， 突变 Y91D	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVY**D**CARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSS	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 Y91D
	16	抗体 2， 轻链， 突变 A43K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK**K**PKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 A43K
表 2： 组合 5	13	抗体 1， 重链， 突变 Y91K	SEQ ID NO:13	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，其包含 Y91K
	11	抗体 1， 轻链， 突变 P44D	SEQ ID NO:11	曲妥珠单抗 TZB-VL
	15	抗体 2， 重链， 突变 Y91D	SEQ ID NO:15	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH
	12	抗体 2，	SEQ ID NO:12	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

		轻链， 突变 P44K		
表 3: 组合 1	21	抗体 1， 重链， Q39K_F126C_C220S_knob	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR**K**APGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL **W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
	3	抗体 1， 重链 VH	SEQ ID NO:3	
	22	抗体 1， 轻链， Q38D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ**D**KPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变
	4	抗体 1， 轻链 VL,其包含 Q38D	SEQ ID NO:4	
	23	抗体 2， 重链， Q39D_hole	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVR**D**APGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL **S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 Q39D 和 Hole 突变
	5	抗体 2， 重链， Q39D_hole VH	SEQ ID NO:5	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 Q39D
	24	抗体 2， 轻链， Q38K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQK**K**PGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 Q38K 突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

			SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	6	抗体 2, 轻链, Q38K VL	SEQ ID NO:6	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 Q38K
表 3: 组合 2	25	抗体 1, 重链, L45K_F126C_C220S_knob	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG**K**EWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL **W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 L45K、F126C、C220S 突变和 knob 突变
	7	抗体 1, 重链 VH	SEQ ID NO:7	
	26	抗体 1, 轻链, Y87D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY**D**CQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Y87D_Q124C_C214S
	8	抗体 1, 轻链 VL	SEQ ID NO:8	
	27	抗体 2, 重链, L45D_hole	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKG**D**EWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL **S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 L45D 和 hole 突变
	9		SEQ ID NO:9	
	28	抗体 2, 轻链, Y87K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY**K**CQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 Y87K 突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	10	抗体 2， 轻链 VL Y87K	SEQ ID NO:10	
表 3: 组合 3	25	抗体 1， 重链， L45K_F126C_C220S_knob	SEQ ID NO:25	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 L45K、F126C、C220S 突变和 knob 突变
	29	抗体 1， 轻链， P44D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA**D**KLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 P44D、Q124C、C214S
	11		SEQ ID NO:11	曲妥珠单抗 TZB-VL， 包含 P44D
	27	抗体 2， 重链， L45D_hole	SEQ ID NO:27	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链
	9		SEQ ID NO:9	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VH，其包含 L45D
	30	抗体 2， 轻链， P44K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA**K**KLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 P44K 突变
	12		SEQ ID NO:12	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL，其包含 P44K
表 3: 组合 4	31	抗体 1， 重链， Y91K_F126C_C220S_knob	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY**K**CSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL **W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 Y91K_F126C_C220S 和 knob 突变
		13	SEQ ID NO:13	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-VH，

				其包含 Y91K
	32	抗体 1， 轻链， A43D_Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK**D**PKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 A43D_Q124C_C214S
	14		SEQ ID NO:14	曲妥珠单抗 TZB-VL，其包含 A43D
	33	抗体 2， 重链， Y91D_hole	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVY**D**CARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL **S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 Y91D 和 hole 突变
			SEQ ID NO:15	
	34	抗体 2， 轻链， A43K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK**K**PKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 A43K 突变
			SEQ ID NO:16	
表 3： 组合 5	31	抗体 1， 重链， Y91K_F126C_C220S_knob	SEQ ID NO:31	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 Y91K_F126C_C220S 和 knob 突变
	13		SEQ ID NO:13	
	29	抗体 1， 轻链， P44D_Q124C_C214S	SEQ ID NO:29	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 P44D、Q124C 和 C214S
	33	抗体 2， 重链， Y91D_hole	SEQ ID NO:33	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-重链，其包含 Y91D 和 hole 突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	30	抗体 2， 轻链， P44K	SEQ ID NO:30	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-轻链，其包含 P44K 突变
表 4: Her2/Hel_WT	39	TZB_HC_WT_knob	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL **W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 knob 突变
	75	TZB_HC_WT_knob 的 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链 VH
	40	TZB_LC_WT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链
	76	可变区 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链 VL
	41	Hel_HC_hole	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL **S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链，其包含 hole 突变
	77	Hel_HC_hole VH	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGW YAADVWGQGTTVTVSS	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链 VH
	42	Hel_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKR	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链

			TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	78	Hel_LC VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIK	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)-VL
表 4: Her2/Hel_126C_121C	43	TZB_HC_F126C_knob	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF YAMDYWGQGTLVTVSS*ASTKGPSV***C***PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 knob 突变斜体为包含 F126C 的 CH1 (SEQ ID NO:1)
	75	TZB_HC_WT_knob 的 VH	SEQ ID NO:75	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链 VH
	44	TZB_LC_S121C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPP**C**DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 S121C
	76	可变区 VL	SEQ ID NO:76	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链 VL
	41	Hel_HC_hole	SEQ ID NO:41	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链，其包含 hole 突变
	42	Hel_LC	SEQ ID NO:42	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链
表 4: Her2/Hel_126C_124C	43	TZB_HC_F126C_knob	SEQ ID NO:43	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 knob 突变
	45	TZB_LC_Q124C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK*R TVAAPSVFIFPPSDE***C***LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 Q124C 斜体为包含 Q124C 的 CL (SEQ ID NO:2)
	76	可变区 VL	SEQ ID NO:76	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链 VL
	41	Hel_HC_hole	SEQ ID NO:41	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链，其包含 hole 突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	42	Hel_LC	SEQ ID NO:42	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链
表 4: Her2/PD-1_WT	39	TZB_HC_WT_knob	SEQ ID NO:39	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 knob 突变
	40	TZB_LC_WT	SEQ ID NO:40	曲妥珠单抗 TZB-轻链
	46	Sintilimab -VH-inIgG1AA-hole	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIP MFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTG TFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A** VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Sintilimab（抗 PD-1）重链，其包含 AA 突变和 hole 突变
	79	Sintilimab -VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIP MFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTG TFDYWGQGTLVTVSS	Sintilimab（抗 PD-1）重链 VH
	47	Sintilimab -VL in pcDNA3.1-SP-IgKCL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Sintilimab（抗 PD-1）轻链，其包含 kappa 轻链恒定区
	80	Sintilimab -VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIK	Sintilimab（抗 PD-1）轻链 VL
表 4: Her2/PD-1_126C_121C	43	TZB_HC_F126C_knob	SEQ ID NO:43	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 knob 突变
	44	TZB_LC_S121C	SEQ ID NO:44	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 S121C
	46	Sintilimab -VH-inIgG1AA-hole	SEQ ID NO:46	Sintilimab（抗 PD-1）重链，其包含 AA 突变和 hole 突变
	47	Sintilimab -VL in pcDNA3.1-SP-IgKCL	SEQ ID NO:47	Sintilimab（抗 PD-1）轻链，其包含 kappa 轻链恒定区
表 4: Her2/PD-1_12	43	TZB_HC_F126C_knob	SEQ ID NO:43	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 knob 突变
	45	TZB_LC_Q124C	SEQ ID NO:45	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

6C_124C				链，其包含 Q124C
	46	Sintilimab -VH-in IgG1AA-hole	SEQ ID NO:46	Sintilimab（抗 PD-1）重链，其包含 AA 突变和 hole 突变
	47	Sintilimab -VL in pcDNA3.1-SP-IgKCL	SEQ ID NO:47	Sintilimab（抗 PD-1）轻链，其包含 kappa 轻链恒定区
表 7: 组合 1	43	抗体 1, 重链, F126C_knob	SEQ ID NO:43	
	45	抗体 1, 轻链, Q124C	SEQ ID NO:45	
	41	抗体 2, 重链, hole	SEQ ID NO:41	
	42	抗体 2, 轻链	SEQ ID NO:42	
表 7: 组合 2	48	抗体 1, 重链, F126C_C220S_knob	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链，其包含 F126C 和 C220S
	75	TZB_HC_WT_knob 的 VH	SEQ ID NO:75	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链 VH
	49	抗体 1, 轻链, Q124C_C214S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE**S**	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链，其包含 Q124C 和 C214S
	76	可变区 VL	SEQ ID NO:76	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-轻链 VL

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	41	抗体 2 重链 hole	SEQ ID NO:41	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链，其包含 hole 突变
	42	抗体 2 轻链	SEQ ID NO:42	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链
表 7: 组合 3	21	抗体 1, 重链, Q39K_F126C_C220S_knob	SEQ ID NO:21	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
	22	抗体 1 轻链 Q38D_Q124C_C214S	SEQ ID NO:22	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变
	41	抗体 2 重链 hole	SEQ ID NO:41	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)重链，其包含 hole 突变
	42	抗体 2 轻链	SEQ ID NO:42	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链
表 8: Her2/PD-1	21	TZB_HC_Q39K_F126C_C220S_knob	SEQ ID NO:21	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
	22	TZB_LC_Q38D_Q124C_C214S	SEQ ID NO:22	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变
	46	Sintilimab VH in IgG1AA-hole	SEQ ID NO:46	Sintilimab 重链
	47	Sintilimab VL in pcDNA3.1-SP-IgKCL	SEQ ID NO:47	Sintilimab 轻链
表 8: Her2/CD47	21	TZB_HC_Q39K_F126C_C220S_knob	SEQ ID NO:21	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
	22	TZB_LC_Q38D_Q124C_C214S	SEQ ID NO:22	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变
	50	CD47_HC_hole	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSAAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE	ADI26630 重链

			DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	81		QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYS GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGKTGSAAWG QGTLVTVSS	ADI26630 重链 VH
	51	CD47_LC	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVSFPITFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	ADI26630 轻链
	82		DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTVSFPITFGGGTKVEIK	ADI26630 轻链 VL
表 8: Her2/c MET	21	TZB_HC_Q39K_ F126C_C220S_kn ob	SEQ ID NO:21	曲妥珠单抗 TZB(抗-Her2)-重链包含 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
	22	TZB_LC_Q38D_ Q124C_C214S	SEQ ID NO:22	曲妥珠单抗 TZB-轻链，其包含 Q38D、Q124C 和 Q214S 突变
	52	cMet_HC_hole	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMI DPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVT PLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A** VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Onartuzumab 重链
	18		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMI DPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVT PLDYWGQGTLVTVSS	Onartuzumab 重链 VH
	53	cMet_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLI YWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	Onartuzumab 轻链

	17		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIK	Onartuzumab 轻链 VL
表 10: WT	39	TZB_HC_WT_knob	SEQ ID NO:39	曲妥珠单抗 TZB-重链
	40	TZB_LC_WT	SEQ ID NO:40	曲妥珠单抗 TZB-轻链
	41	Hel_HC_hole	SEQ ID NO:41	鸡蛋溶菌酶抗体 Hel 重链
	42	Hel_LC	SEQ ID NO:42	抗 Hel 抗体(抗鸡蛋溶菌酶)轻链
表 10: 组合 1-组合 5 与表 3 完全一致				
表 11: 2+1N 端构型：仅二硫键重塑	56	5E_LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	GPRC5D 抗体轻链
	83		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK	GPRC5D 抗体轻链 VL，无突变
	84		RASESVDSYGITFMN	GPRC5D 抗体轻链 VL-CDR1
	85		AASNQGS	GPRC5D 抗体轻链 VL-CDR2
	86		QQSKEVPWT	GPRC5D 抗体轻链 VL-CDR3
	57	5E_HC_InnoA Innobody 突变（S364R+D399K）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV**R**L	GPRC5D 抗体重链

			TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	87		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSS	GPRC5D 抗体重链 VH，无突变
	88		GYVMH	GPRC5D 抗体重链 VH-CDR1
	89		YINPYNDVSQHQGKFKG	GPRC5D 抗体重链 VH-CDR2
	90		EGRLGLRVLAY	GPRC5D 抗体重链 VH-CDR3
	58	5E_sp34.24_CS_ HC_InnoB(F126C +C220S+Y349T+ K370S+K409D)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKST LYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGP SV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSLTCLV**S**GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	GPRC5D VH+sp34.24 VH+Fc
	87		SEQ ID NO:87	GPRC5D VH 无突变
	91		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	sp34.24 VH，无突变
	59	SP34Vk_CS_LC (Q124C+C214S)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGE**S**	sp34.24 轻链
	92		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIK	sp34.24VL，无突变
表 11:	60	5E_K_LC (Q38K)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**K**KPGQPPKLLIY	GPRC5D 抗体轻链，其包含

2+1N 端构型：二硫键重塑结合电荷突变			AASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	Q38K 突变
	93		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**K**KPGQPPKLLIY AASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGT KLEIK	GPRC5D 抗体轻链-VL,其包含 Q38K 突变
	61	5E_D_HC_InnoA Innobody 突变（S364R+D399K）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV**R**L TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GPRC5D 抗体重链，其包含 Q39D 突变
	94		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSS	GPRC5D 抗体 VH，其包含 Q39D 突变
	62	5E_D_SP34.24_KCS_HC_InnoB Inno 突变 (GPRC5D:Q39D) (sp34.24: Q39K+F126C+C220S+Y349T+K370S+K409D)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKST LYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGP SV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSLTCLV**S**GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	GPRC5D VH+sp34.24 VH+Fc，GPRC5D VH 包含 Q39D 突变，sp34.24 VH 包含 Q39K 突变
	95		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSS	GPRC5D 抗体-VH，其包含 Q39D 突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	96		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	sp34.24 VH，其包含 Q39K 突变
	63	SP34Vk_DCS_LC (Q38D+Q124C+C214S)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQ**D**KPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGE**S**	sp34.24 轻链,其中 sp34.24 VL 包含 Q38D 突变
	97		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSTGAVTTSNYANWVQ**D**KPGKAPKGLIGG TNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTK VEIK	sp34.24 VL，其包含 Q38D 突变
表 11：2+1C 端构型：仅二硫键重塑	56	5E_LC	SEQ ID NO:56	GPRC5D 抗体轻链
	57	5E_HC_InnoA Innobody 突变（S364R+D399K）	SEQ ID NO:57	GPRC5D 抗体重链
	64	5E_HC_InnoB_sp34.24_CS (Y349T+K370S+K409D+126C+220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSL TCLV**S**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH，两个 VH 都没有突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

			ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**S**	
	87		SEQ ID NO:87	GPRC5D VH，无突变
	91		SEQ ID NO:91	sp34.24 VH，无突变
	59	SP34Vk_CS_LC(Q124C+C214S)	SEQ ID NO:59	sp34.24 的改造过的轻链
表 11：2+1C 端构型：二硫键重塑结合电荷突变	60	5E_K_LC(Q38K)	SEQ ID NO:60	GPRC5D 抗体轻链
	61	5E_D_HC_InnoA Innobody 突变（Q39D+S364R+D399K）	SEQ ID NO:61	GPRC5D 抗体重链
	65	5E_D_HC_InnoB_sp34.24_KCS Innobody 突变 (Q39D+Y349T+K370S+K409D)+(Q39K+F126C+C220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSL TCLV**S**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**S**	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH，GPRC5D VH 包含 Q39D 突变，sp34.24 VH 包含 Q39K 突变
	95		SEQ ID NO:95	GPRC5D 抗体-VH，其包含 Q39D 突变
	96		SEQ ID NO:96	sp34.24 VH，其包含 Q39K 突变
	63	SP34Vk_DCS_LC(Q38D+Q124C+C214S)	SEQ ID NO:63	sp34.24 的改造过的轻链
表 11：2+2C 端构	56	5E_LC	SEQ ID NO:56	GPRC5D 抗体轻链
	66	5E_HC_sp34.24_CS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH，

型：仅二硫键重塑		(F126C+C220S)	LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**S**	GPRC5D VH 和 sp34.24 VH 无突变
	87		SEQ ID NO:87	GPRC5D VH，无突变
	91		SEQ ID NO:91	sp34.24 VH，无突变
	59	SP34Vk_CS_LC	SEQ IDNO:59	sp34.24 的改造过的轻链
表 11：2+2C 端构型：二硫键重塑结合电荷突变	60	5E_K_LC	SEQ ID NO:60	GPRC5D 抗体 LC，其中 VL 含有 Q38K 突变
	67	5E_D_HC_sp34.24_KCS (Q39D)+(Q39K+F126C+C220S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**D**APGQGLEWMGYI NPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLG LRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**K**ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWG QGTTVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKS**S**	GPRC5D VH+Fc+sp34.24 VH，GPRC5D VH 包含 Q39D 突变，sp34.24 VH 包含 Q39K 突变
	95		SEQ ID NO:95	GPRC5D 抗体重链-VH，其包含 Q39D 突变
	96		SEQ ID NO:96	sp34.24VH,其包含 Q39K 突变

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	63	SP34Vk_DCS_LC	SEQ ID NO:63	sp34.24 的改造过的轻链
Figure 7A: BCMA/GPRC5D/CD3	68	GPRC5D_HC_knob (T366W)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GPRC5D 抗体重链
	87		SEQ ID NO:87	GPRC5D VH，无突变
	56	GPRC5D_LC	SEQ ID NO:56	GPRC5D 抗体轻链
	69	CD3_HC_hole_BCMAscFv (T366S+L368A+Y407V)+(G100C+G44C)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS	sp34.87 VH + Fc + 38497 scFv
	102		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	sp34.87VH
	103	G44C	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS	BCMA-38497 VH，无突变
	104		SSSYYWT	BCMA-38497 VH-CDR1
	105		SISIAGSTYYNPSLKS	BCMA-38497 VH-CDR2

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

	106		DRGDQILDV	BCMA-38497 VH-CDR3
	107	G100C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIK	BCMA-38497 VL
	108		RASQSISRYLN	BCMA-38497 VL-CDR1
	109		AASSLQS	BCMA-38497 VL-CDR2
	110		QQKYFDIT	BCMA-38497 VL-CDR3
	111	(G100C+G44C)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQP PGK**C**LEWIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARDRGDQILDVWSQGTMVTVSS	BCMA-38497VL-VH scFv
	70	CD3_LC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	sp34.87 轻链
	112		QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGT KLTVL	sp34.87 轻链可变区，无突变
图 7B: BCMA /GPRC 5D/CD 3 with Charge and cystein e mutatio n	71	GPRC5D_KCS_ HC_knob (Q39K+F126C+C 220S+T366W)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**K**APGQGLEWMGY INPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRL GLRVLAYWGQGTLVTVSSASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS**S**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS L**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GPRC5D 抗体重链，其包含突变 Q39K、F126C 和 C220S，以及 Knob 突变
	113	Q39K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYVMHWVR**K**APGQGLEWMGY INPYNDVSQHQGKFKGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRL GLRVLAYWGQGTLVTVSS	GPRC5D 抗体重链 VH，其包含突变 Q39K
	72	GPRC5D_DCS_L C Q39K+F126C+C220S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**D**KPGQPPKLLIYA ASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF	GPRC5D 抗体轻链，其包含突变 Q38D、Q124C 和 C214S

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

			NRGE**S**	
	19	Q38D	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGITFMNWYQ**D**KPGQPPKLLIYA ASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTK LEIK	GPRC5D 抗体轻链 VL，其包含突变 Q38D
	73	CD3_D_HC_hole _BCMAscFv (Q39D+T366S+L 368A+Y407V)+(G100C+G44C)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**D**ASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYFDITFG**C**GTKVEIKGGGGSGGGGS GGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIVSSSYYWTWIRQPPGK**C**LE WIGSISIAGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRG DQILDVWSQGTMVTVSS	sp34.87 VH + Fc + 38497 scFv 38497 是 BCMA 抗体
	103		SEQ ID NO:103	BCMA-38497 VH，无突变
	107		SEQ ID NO:107	BCMA-38497 VL
	111	G100C+G44C	SEQ ID NO:111	BCMA-38497VL-VH scFv
	114	Q39D	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR**D**ASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYN FGQSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	sp34.87VH，其包含突变 Q39D
	74	CD3_K_LC Q39K	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ**K**KPGQAPRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS	sp34.87 轻链，其包含突变 Q38K
	115	Q39K	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ**K**KPGQAPRGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQG TKLTVL	sp34.87 轻链 VL，其包含突变 Q38K
	116	野生型 IgG1 CH1 结构域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC	
	117	野生型 IgG1 CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE	

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

		结构域	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	
	118	野生型 IgG1 CH3 结构域	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	119		DKTHTCPXCP，其中 X 是 S 或 P。	
	120		HTCPXCP，其中 X 是 S 或 P	
	121		CPXCP，其中 X 是 S 或 P	
	122	人 IgG1 Fc 区多肽	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	123	人 IgG4 Fc 区多肽	PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAvLHNHYTQKSLSLSLGK	
	124	人 IgG1 Fc 区，包含 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	125	人 IgG1 Fc 区，包含 S354C 和 T366W	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	126	人 IgG1 Fc 区，包含突变 S364R 和 D399K	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV**R**LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**K**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	127	人 IgG1 Fc 区，包含突变 Y349T、K370S 和 K409D	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**T**TLPPSREEMTKNQVSLTCLV**S**GFYPSDIAV	

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

			EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**D**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
	128	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 Q124C 和 C214S）	RTVAAPSVFIFPPSDE**C**LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE **S**	
	54	人 Kappa 轻链 CL 区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
	55	人 Lambda 轻链 CL 区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
	129	人 IgG1 CH1（包含 F126C 和 C220S）	ASTKGPSV**C**PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS**S**	
	130	人 IgG1 Fc 区，包含 T366S ,L368A 和 Y407V 和 LALA 突变	DKTHTCPPCPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV**Y**TLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	131	人 IgG1 Fc 区，包含 T366W 和 LALA 突变	DKTHTCPPCPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**S**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	132	人 IgG1 CH1 (包含 H168C)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<u>C</u>TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	133	人 IgG1 CH1 (包含 H168C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<u>C</u>TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<u>S</u>	
	134	人 IgG1 CH1 (包含 F170C)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<u>C</u> PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	135	人 IgG1 CH1 (包含 F170C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<u>C</u> PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<u>S</u>	
	136	人 IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP A<u>C</u>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

		(包含 V173C)		
	137	人 IgG1 CH1 (包含 V173C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AC̲LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS̲	
	138	人 IgG1 CH1 (包含 L128C)	ASTKGPSVFPC̲APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	139	人 IgG1 CH1 (包含 L128C+C220S)	ASTKGPSVFPC̲APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS̲	
	140	人 IgG1 CH1 (包含 S134C)	ASTKGPSVFPLAPSSKC̲TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	141	人 IgG1 CH1 (包含 S134C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKC̲TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS̲	
	142	人 IgG1 CH1 (包含 S136C)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTC̲GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	143	人 IgG1 CH1 (包含 S136C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTC̲GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS̲	
	144	人 IgG1 CH1 (包含 P171C)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF C̲AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	145	人 IgG1 CH1 (包含 P171C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF C̲AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS̲	
	146	人 IgG1 CH1 (包含 T139C)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGC̲AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
	147	人 IgG1 CH1 (包含 T139C+C220S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGC̲AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS̲	
	148	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 T164C）	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVC̲EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	149	人 Kappa 轻链 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ	

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

		区（包含 T164C 和 C214S）	ESVCEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	150	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 S162C）	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ECVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	151	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 S162C 和 C214S）	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ECVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	152	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 Q160C）	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSC ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	35	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 Q160C 和 C214S）	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSC ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	36	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 F118C）	RTVAAPSVFICPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	37	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 F118C 和 C214S）	RTVAAPSVFICPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	38	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 F116C）	RTVAAPSVCIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	98	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 F116C 和 C214S）	RTVAAPSVCIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	99	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 S114C）	RTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
	100	人 Kappa 轻链 CL 区（包含 S114C 和 C214S）	RTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE S	
	101	人 IgG1 Fc 区，包含 T366S ,L368A	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS	

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

		和 Y407V	NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
	20	人 IgG1 Fc 区，包含 T366W	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	

WO 2024/017371 PCT/CN2023/108651

权利要求

1、抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和一个或多个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中所述的抗原结合区中的至少一个或多个包含重链 CH1 和轻链 CL，并且在所述 CH1-CL 的界面上包含二硫键重塑突变，和/或
所述抗原结合区中的至少一个或多个包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对包含电荷突变，所述电荷突变为将所述氨基酸对上的两个氨基酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸；
其中所述第一抗原和第二抗原可以相同或不同；
优选地，二硫键重塑突变仅包含在一个抗原结合区的 CH1-CL 界面上。
2、权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变包括
(x) 在重链 CH1 的位置 126 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 124 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xi) 在重链 CH1 的位置 168 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 164 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xii) 在重链 CH1 的位置 170 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 162 或 164 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xiii) 在重链 CH1 的位置 173 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 160 或 162 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xiv) 在重链 CH1 的位置 128 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 118 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xv) 在重链 CH1 的位置 134 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 116 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xvi) 在重链 CH1 的位置 136 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 114 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xvii) 在重链 CH1 的位置 171 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 162 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）；
(xviii) 在重链 CH1 的位置 139 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号），且轻链 CL 的位置 116 处具有一个非半胱氨酸氨基酸至一个半胱氨酸氨基酸的取代（EU 编号）。
3、权利要求 2 的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变包括
(xii) 在 CH1 中包含 F126C，且在 CL 中包含 Q124C（EU 编号）；
(xiii) 在 CH1 中包含 H168C，且在 CL 中包含 T164C（EU 编号）；
(xiv) 在 CH1 中包含 F170C，且在 CL 中包含 T164C（EU 编号）；
(xv) 在 CH1 中包含 F170C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）；

(xvi) 在 CH1 中包含 V173C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）；
(xvii) 在 CH1 中包含 V173C，且在 CL 中包含 Q160C（EU 编号）；
(xviii) 在 CH1 中包含 L128C，且在 CL 中包含 F118C（EU 编号）；
(xix) 在 CH1 中包含 S134C，且在 CL 中包含 F116C（EU 编号）；
(xx) 在 CH1 中包含 S136C，且在 CL 中包含 S114C（EU 编号）；
(xxi) 在 CH1 中包含 P171C，且在 CL 中包含 S162C（EU 编号）；
(xxii) 在 CH1 中包含 T139C，且在 CL 中包含 F116C（EU 编号）。

4、抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和一个或多个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中所述的抗原结合区中的至少一个包含重链 CH1 和轻链 CL，并且在所述 CH1-CL 的界面上包含二硫键重塑突变，其中所述二硫键重塑突变为在 CH1 中包含 T139C，且在 CL 中包含 F116C，其中所述第一抗原结合区和第二抗原结合区可以相同或不同。

5、权利要求 2-4 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变还包含重链恒定区-轻链恒定区界面内的链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代。

6、权利要求 5 的抗体或其抗原结合片段，其中链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代包括在 CH1 中的第 220 位的半胱氨酸被非半胱氨酸取代，且在 CL 的第 214 位的半胱氨酸被非半胱氨酸取代。

7、权利要求 6 的抗体或其抗原结合片段，其中链间半胱氨酸被非半胱氨酸取代包括在 CH1 中的 C220S/A/V，且在 CL 中包含 C214S/A/V（EU 编号）。

8、权利要求 6 的抗体或其抗原结合片段，其中二硫键重塑突变包括
(xii) 在 CH1 中的 F126C 和 C220S，以及在 CL 中的 Q124C 和 C214S（EU 编号）；
(xiii) 在 CH1 中包含 H168C 和 C220S，，且在 CL 中包含 T164C 和 C214S（EU 编号）；
(xiv) 在 CH1 中包含 F170C 和 C220S，，且在 CL 中包含 T164C 和 C214S（EU 编号）；
(xv) 在 CH1 中包含 F170C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S162C 和 C214S（EU 编号）；
(xvi) 在 CH1 中包含 V173C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S162C 和 C214S（EU 编号）；
(xvii) 在 CH1 中包含 V173C 和 C220S，，且在 CL 中包含 Q160C 和 C214S（EU 编号）；
(xviii) 在 CH1 中包含 L128C 和 C220S，，且在 CL 中包含 F118C 和 C214S（EU 编号）；
(xix) 在 CH1 中包含 S134C 和 C220S，，且在 CL 中包含 F116C 和 C214S（EU 编号）；
(xx) 在 CH1 中包含 S136C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S114C 和 C214S（EU 编号）；
(xxi) 在 CH1 中包含 P171C 和 C220S，，且在 CL 中包含 S162C 和 C214S（EU 编号）；
(xxii) 在 CH1 中包含 T139C 和 C220S，，且在 CL 中包含 F116C 和 C214S（EU 编号）。

9、权利要求 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中 CH1 区为人的 IgG CH1，例如，人 IgG1 CH1，人 IgG2 CH1，人 IgG3 CH1 或人 IgG4 CH1，例如 CH1 区包含 SEQ ID NO:116 所示的氨基酸序列；

和/或 CL 区为人的 Kappa 轻链 CL 区或人的 Lambda 轻链 CL 区，例如 CL 区包含 SEQ ID NO:54 或 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列。

10、权利要求 8 或 9 的抗体或其抗原结合片段，其中 CH1

(i) 包含与 SEQ ID NO:129 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F126C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:129 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(ii) 包含与 SEQ ID NO:133 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 H168C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:133 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(iii)包含与 SEQ ID NO:135 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F170C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:135 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(iv)包含与 SEQ ID NO:137 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 V173C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:137 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(v) 包含与 SEQ ID NO:139 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 L128C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:139 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(vi)包含与 SEQ ID NO:141 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S134C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:141 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(vii)包含与 SEQ ID NO:143 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S136C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:143 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(viii)包含与 SEQ ID NO:145 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 P171C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:145 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；或

(ix)包含与 SEQ ID NO:147 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T139C 和 C220S；或包含 SEQ ID NO:147 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

11、权利要求 8-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中 CL

(i) 包含与 SEQ ID NO:128 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q124C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:128 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(ii)包含与 SEQ ID NO:149 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 T164C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:149 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(iii)包含与 SEQ ID NO:151 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S162C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:151 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(iv)包含与 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 Q160C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；

(v)包含与 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F118C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；
(vii)包含与 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 F116C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列或由所述序列组成；或
(viii)包含与 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且包含 S114C 和 C124S；或包含 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

12、权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置选自：重链可变区的位置 39 和轻链可变区的位置 38、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 87、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 44、重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 43 或重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 44（kabat 编号）。

13、权利要求 1-12 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中至少一个第一抗原结合区中的重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置与至少一个第二抗原结合区的位置相同。

14、权利要求 13 中的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区的氨基酸对的位置上的突变后的氨基酸与第二抗原结合区相同位置上的突变后的氨基酸带有相反的电荷。

15、权利要求 14 的抗体或其抗原结合片段，其中
（1）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；
（2）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；
（3）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；
（4）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；或者
（5）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

16、权利要求 15 的抗体或其抗原结合片段，其中所述带正电荷的氨基酸选自 K、R 或 H，和/或所述带负电荷的氨基酸选自 E 或 D。

17、权利要求 16 的抗体或其抗原结合片段，其中
(vi). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 K，且

轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 39 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 38 处的氨基酸被取代为 K;

(vii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 K;

(viii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K;

(ix). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 K;

(x). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

18、权利要求 1-17 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体包含电荷突变和二硫键重塑突变。

19、权利要求 1-18 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中一个或多个或全部结合相同抗原的抗原结合区包含相同的突变。

20、权利要求 1-19 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中，第一抗原结合区包含重链可变区、重链恒定区 CH1、轻链可变区和轻链恒定区 CL，且第二抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

21、权利要求 20 的抗体或其抗原结合片段，其中

1）第一抗原结合区包含权利要求 1-17 中任一项所定义的二硫键重塑突变；或者

2）第一抗原结合区包含权利要求 1-17 中任一项所定义的电荷突变;

3）第一抗原结合区包含权利要求 1-17 中任一项所定义的二硫键重塑突变和电荷突变；或者

4）第一抗原结合区包含权利要求 1-17 中任一项所定义的二硫键重塑突变和电荷突变；且第二抗原结合区包含权利要求 1-17 中任一项所述的电荷突变。

22、权利要求 21 的抗体或其抗原结合片段，其中

1）第一抗原结合区包含权利要求 2-8 中任一项所定义的二硫键重塑突变;

2）第一抗原结合区包含如权利要求 12-17 中任一项所定义的电荷突变;

3）第一抗原结合区包含权利要求 2-8 中任一项所定义的二硫键重塑突变且包含如权利要求 12-17 中任一项所定义的电荷突变；或者

4）第一抗原结合区和第二抗原结合区包含如权利要求 12-17 中任一项所定义的电荷突变，并且第一抗原结合区还包含权利要求 2-8 中任一项所定义的二硫键重塑突变。

23、权利要求 22 的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体的第一抗原

结合区包含选自如下的突变组合:

	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S
	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S
组合 2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S
组合 3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S

	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S
组合 4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S
组合 5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S

	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S

任选地，所述第二抗原结合区还包含选自如下的突变组合:

	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39D	Q38K
组合 2	L45D	Y87K
组合 3	L45D	P44K
组合 4	Y91D	A43K
组合 5	Y91D	P44K

。

24、权利要求 23 的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体的所述第一抗原结合区和第二抗原结合区分别包含如下的突变组合:

	第一抗原结合区				第二抗原结合区	
	重链 VH 突变	重链 CH1 突变	轻链 VL 突变	轻链 CL 突变	重链 VH 突变	轻链 VL 突变
组合 1	Q39K	F126C, C220S	Q38D	Q124C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	H168C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	T164C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	F170C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	V173C, C220S	Q38D	Q160C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	L128C, C220S	Q38D	F118C, C214S	Q39D	Q38K

	Q39K	S134C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	S136C, C220S	Q38D	S114C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	P171C, C220S	Q38D	S162C, C214S	Q39D	Q38K
	Q39K	T139C, C220S	Q38D	F116C, C214S	Q39D	Q38K
组合2	L45K	F126C, C220S	Y87D	Q124C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	H168C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	T164C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	F170C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	V173C, C220S	Y87D	Q160C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	L128C, C220S	Y87D	F118C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S134C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	S136C, C220S	Y87D	S114C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	P171C, C220S	Y87D	S162C, C214S	L45D	Y87K
	L45K	T139C, C220S	Y87D	F116C, C214S	L45D	Y87K
组合3	L45K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	L45D	P44K

	L45K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	L45D	P44K
	L45K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	L45D	P44K
	L45K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
	L45K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	L45D	P44K
	L45K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	L45D	P44K
	L45K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	L45D	P44K
组合4	Y91K	F126C, C220S	A43D	Q124C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	H168C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	T164C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	F170C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	V173C, C220S	A43D	Q160C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	L128C, C220S	A43D	F118C, C214S	Y91D	A43K

	Y91K	S134C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	S136C, C220S	A43D	S114C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	P171C, C220S	A43D	S162C, C214S	Y91D	A43K
	Y91K	T139C, C220S	A43D	F116C, C214S	Y91D	A43K
组合5	Y91K	F126C, C220S	P44D	Q124C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	H168C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	T164C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	F170C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	V173C, C220S	P44D	Q160C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	L128C, C220S	P44D	F118C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S134C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	S136C, C220S	P44D	S114C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	P171C, C220S	P44D	S162C, C214S	Y91D	P44K
	Y91K	T139C, C220S	P44D	F116C, C214S	Y91D	P44K

。

25、抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和一个或多个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中所述抗原结合区中的至少一个包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对包含电荷突变，所述电荷突变为将所述氨基酸对上的两个氨基

酸分别突变为带有相反电荷的氨基酸，其中所述重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置选自：重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 87、重链可变区的位置 45 和轻链可变区的位置 44、重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 43 或重链可变区的位置 91 和轻链可变区的位置 44（kabat 编号）。

26、权利要求 25 的抗体或其抗原结合片段，其中至少一个第一抗原结合区中的重链可变区和轻链可变区交界面上的氨基酸对的位置与至少一个第二抗原结合区的位置相同，其中第一抗原和第二抗原相同或不同。

27、权利要求 26 中的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区的氨基酸对的位置上的突变后的氨基酸与第二抗原结合区相同位置上的突变后的氨基酸带有相反的电荷。

28、权利要求 27 的抗体或其抗原结合片段，其中

（1）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；

（2）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；

（3）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸；或者

（4）在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸；和在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为带负电荷的氨基酸，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为带正电荷的氨基酸。

29、权利要求 28 的抗体或其抗原结合片段，其中所述带正电荷的氨基酸选自 K、R 或 H，和/或所述带负电荷的氨基酸选自 E 或 D。

30、权利要求 29 的抗体或其抗原结合片段，其中

(v). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 87 处的氨基酸被取代为 K；

(vi). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 45 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K；

(vii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 43 处的氨基酸被取代为 K；或

(viii). 在第一抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 K，且

轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 D，同时，在第二抗原结合区中，重链可变区位置 91 处的氨基酸被取代为 D，且轻链可变区位置 44 处的氨基酸被取代为 K。

31、权利要求 1-30 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所有第一抗原结合区包含相同的突变，且所有第二抗原结合区包含相同的突变。
32、权利要求 1-31 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区为抗体的 Fab 片段，和/或第二抗原结合区为抗体的 Fab 片段。
33、权利要求 1-32 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体一个或多个或全部第一抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区，且一个或多个或全部第二抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，或者其中一个或多个或全部第一抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Lambda 轻链恒定区，且一个或多个或全部第二抗原结合区所包含的轻链恒定区为 Kappa 轻链恒定区。
34、权利要求 1-33 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体还包含第一 Fc 区和第二 Fc 区，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区相同或不同。
35、权利要求 34 的抗体或其抗原结合片段，其中第一 Fc 区和第二 Fc 区分别为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc, 人 IgG2 Fc, 人 IgG3 Fc，或人 IgG4 Fc，例如包含氨基酸序列 SEQ ID NO:122 或 123 或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。
36、权利要求 34 或 35 的多特异性抗体，其中基于 Knob-in-Hole 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。
37、权利要求 36 的抗体或其抗原结合片段，其中
a)一个 Fc 区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含 T366S, L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)，或
b) 一个 Fc 区包含氨基酸替代 S354C 和 T366W ,且另一个 Fc 区包含氨基酸替代 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V(编号方式依照 EU 索引)。
38、权利要求 36 的多特异性抗体，其中
a)一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列或由其组成;
b) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列;
c)一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:125 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S354C 和 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:124 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V;
d)一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列或由其组成;
e) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列；或
f)一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:20 或 131 所示的氨基酸序列具有至少 85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 T366W，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:101 或 130 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列包含突变 T366S ,L368A 和 Y407V。

39、权利要求 34 或 35 的抗体或其抗原结合片段，其中基于 Innobody 技术，在第一 Fc 区和第二 Fc 区中引入突变，促进第一 Fc 区和第二 Fc 区的异二聚化。

40、权利要求 39 的抗体或其抗原结合片段，其中一个 Fc 区的 CH3 包含 S364R 和 D399K 突变，且另一个 Fc 区的 CH3 突变包含 Y349T、K370S 和 K409D 突变。

41、权利要求 40 的抗体或其抗原结合片段，其中

a)一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列或由其组成，而另一个 Fc 区多肽包含 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列或由其组成;

b) 一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列；或

c)一个 Fc 区包含与 SEQ ID NO:126 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 S364R 和 D399K，而另一个 Fc 区多肽包含与 SEQ ID NO:127 所示的氨基酸序列所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且包含突变 Y349T、K370S 和 K409D。

42、权利要求 34-41 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述第一和/或第二 Fc 区包含 L234A/L235A 突变。

43、权利要求 1-42 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段所结合的抗原选自以下的一个或多个：CD3、BCMA、CD20、Her2、Her3，B7H3、EGFR、Hel、cMET、Axl、GPRC5D、免疫检查点分子例如 PD-1、PD-L1、CD47、免疫激活分子如 4-1BB、CD40、OX40。

44、权利要求 1-43 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原和第二抗原不同且所述抗体是双特异性抗体。

45、权利要求 44 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体结合选自如下的两个抗原： CD3/BCMA，CD3/CD20，CD3/Her2，Her2/Her3，B7H3/EGFR, PD-L1/CD47, PD-L1/CD40，PD-L1/4-1BB, EGFR/Her3, Her2/Hel，Her2/PD-1，Her2/PD-L1, Her2/CD47, Her2/cMet，或 CD3/GPRC5D。

46、权利要求 44 或 45 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）。

47、权利要求 46 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 IgG 样抗体，其具有如图 1 所示的构型。

48、权利要求 46 或 47 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含

重链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接;

轻链 1: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区;
重链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接;
轻链 2: 从 N 端至 C 端包含或由下述组成: 第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

49、权利要求 48 的抗体或其抗原结合片段; 其中

（1）第一抗原结合区特异性结合 Her2，其中重链 1 和轻链 1 分别包含如下的 SEQ ID NO:所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成:

i) SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO:45;

ii) SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO:49;

iii) SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO:22;

iv) SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO:26;

v) SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO:29;

vi) SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO:32;或

vii) SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO:29;

和/或

（2）第二抗原结合区特异性结合 Hel，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO:所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成:

i) SEQ ID NO:41 和 SEQ ID NO:42;

ii) SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24;

iii) SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28;

iv) SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:30;

v) SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34; 或

vi) SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:30;

（2）-1 第二抗原结合区特异性结合 PD-1，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO:所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成: SEQ ID NO:46 和 SEQ ID NO:47;

（2）-2 第二抗原结合区特异性结合 CD47，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO:所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO

所示的序列组成：SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:51；

（3）-2 第二抗原结合区特异性结合 c-Met，重链 2 和轻链 2 分别包含如下的 SEQ ID NO:所示的氨基酸序列，或包含与所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由如下 SEQ ID NO 所示的序列组成：SEQ ID NO:52 和 SEQ ID NO:53。

50、权利要求 44 或 45 的多特异性抗体，其中所述双特异性抗体包含 1 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中一个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接(经由或不经由接头，例如铰链区），一个第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且另一个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fab 的重链可变区的 N 末端连接（通过或不通过接头）。

51、权利要求 50 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 2+1N 端构型，其具有如图 5A 所示的构型。

52、权利要求 51 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区，其中第一 Fab 重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接，且第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fab 的重链可变区的 N 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条轻链 2。

53、权利要求 52 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区结合 CD3，且第二抗原结合区结合 GPRC5D，例如其中，

1）重链 1 包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的

氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

2）重链 1 包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

54、权利要求 44 或 45 的多抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含 1 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中 2 个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端分别与第一 Fc 区 N 末端和第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与第二 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）。

55、权利要求 54 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 2+1C 端构型，其具有如图 5B 所示的构型。

56、权利要求 55 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1，其中第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重链可变区的 N 末端与第二 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第一 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条轻链 2。

57、权利要求 56 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区结合 CD3，且第二抗原结合区结合 GPRC5D，例如其中，

1）重链 1 包含 SEQ ID NO:64 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:64 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

2）重链 1 包含 SEQ ID NO:65 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:65 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

58、权利要求 44 或 45 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含 2 个特异性结合第一抗原的第一抗原结合区和 2 个特异性结合第二抗原的第二抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中 2 个第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端分别与两个 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）（所述 Fc 区可以相同或不同），且 2 个第一 Fab 在重链可变区的 N 末端分别与 2 个 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）

59、权利要求 58 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体是 2+2C 端构型，其具有如图 5C 所示的构型。

60、权利要求 59 的抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含

重链：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1- Fc 区-第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1，其中第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），且第一 Fab 在重

链可变区的 N 末端与 Fc 区的 C 末端连接（通过或不通过接头）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区，

其中所述双特异性抗体包含 2 条重链。

61、权利要求 60 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区结合 CD3，且第二抗原结合区结合 GPRC5D，例如其中，

1）重链包含 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；或者

2）重链包含 SEQ ID NO:67 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:67 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

62、权利要求 1-43 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述第一抗原和第二抗原不同，且所述抗体还包含特异性结合一个或多个其他抗原的抗原结合区。

63、权利要求 62 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是三特异性抗体。

64、权利要求 63 的抗体或其抗原结合片段，其中所述三特异性抗体包含特异性结合第一抗原的第一抗原结合区、特异性结合第二抗原的第二抗原结合区和特异性结合第三抗原的第三抗原结合区，其中第一抗原结合区包含第一 Fab，第二抗原结合区包含第二 Fab，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第二 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第二 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区），第三抗原结合区包含 scFv（例如 VH-VL 或 VL-VH），其经由或不经由接头在其 VH 或 VL 的 N 末端或 C 末端（例如 scFv 是 VL-VH，例如 VL 的 N 末端）与第二 Fc 区的 C 末端连

接。

65、权利要求 64 的抗体或其抗原结合片段，其中所述三特异性抗体的构型为 2+1C 端构型，如图 7A 或 B 所示。

66、权利要求 65 的抗体或其抗原结合片段，其中所述多特异性抗体包含

重链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第一 Fc 区，其中第一 Fab 在其 CH1 的 C 末端与第一 Fc 区 N 末端连接（经由或不经由接头，例如铰链区）；

轻链 1：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第一 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区；

重链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 重链可变区-重链恒定区 CH1-第二 Fc 区-scFv，其中重链恒定区 CH1 在其 C 末端与第二 Fc 区 N 末端经由或不经由接头（例如铰链区）连接，且 scFv 经由或不经由接头在其 VH 或 VL 的 N 末端或 C 末端（例如 scFv 是 VL-VH，例如 VL 的 N 末端）与第二 Fc 区的 C 末端连接；

轻链 2：从 N 端至 C 端包含或由下述组成：第二 Fab 的轻链可变区-轻链恒定区。

67、权利要求 66 的抗体或其抗原结合片段，其中第一抗原结合区特异性结合 GPRC5D，第二抗原结合区特异性结合 CD3，和/或第三抗原结合区特异性结合 BCMA，例如其中

重链 1 包含 SEQ ID NO:71 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:71 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

轻链 1 包含 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

重链 2 包含 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或

轻链 2 包含 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

68、核酸，其编码权利要求 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段，或其任一条或多条链。

69、表达载体，其包含权利要求 68 的核酸。

70、宿主细胞，其包含权利要求 68 的核酸或权利要求 69 的表达载体。

71、制备权利要求 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括

a) 将编码抗体或其抗原结合片段的各条链的核酸引入宿主细胞中；

b) 在宿主细胞体内表达并组装所述抗体或其抗原结合片段；

任选地，所述抗体或其抗原结合片段被纯化，例如被 Protein A 纯化。

72、免疫缀合物，其包含权利要求 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

73、融合蛋白，其包含权利要求 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

74、T 细胞受体，其包含权利要求 1-67 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

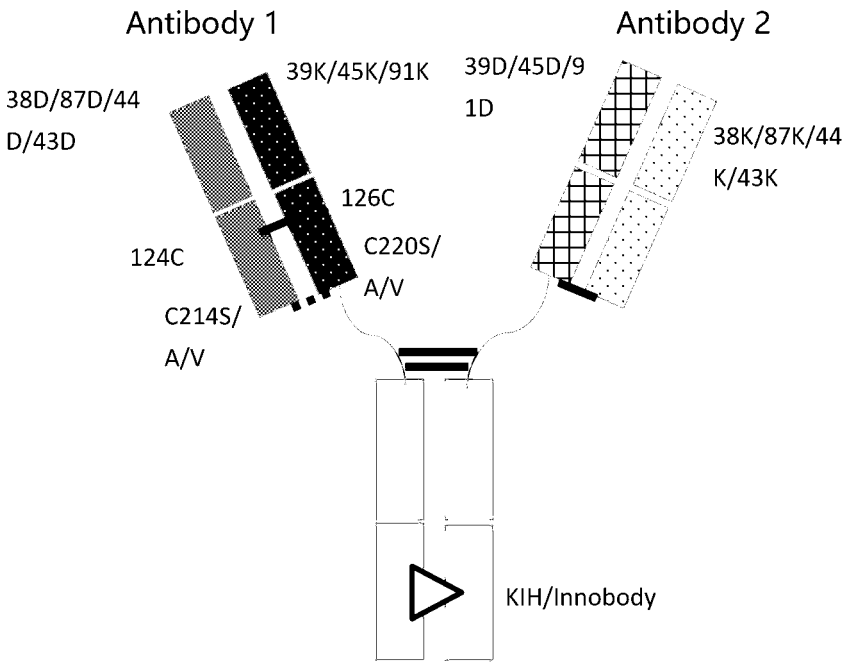
Antibody 1
Antibody 2
39K/45K/91K
38D/87D/44
D/43D
126C
124C
C220S/
A/V
C214S/
A/V
39D/45D/9
1D
38K/87K/44
K/43K
KIH/Innobody

图 1

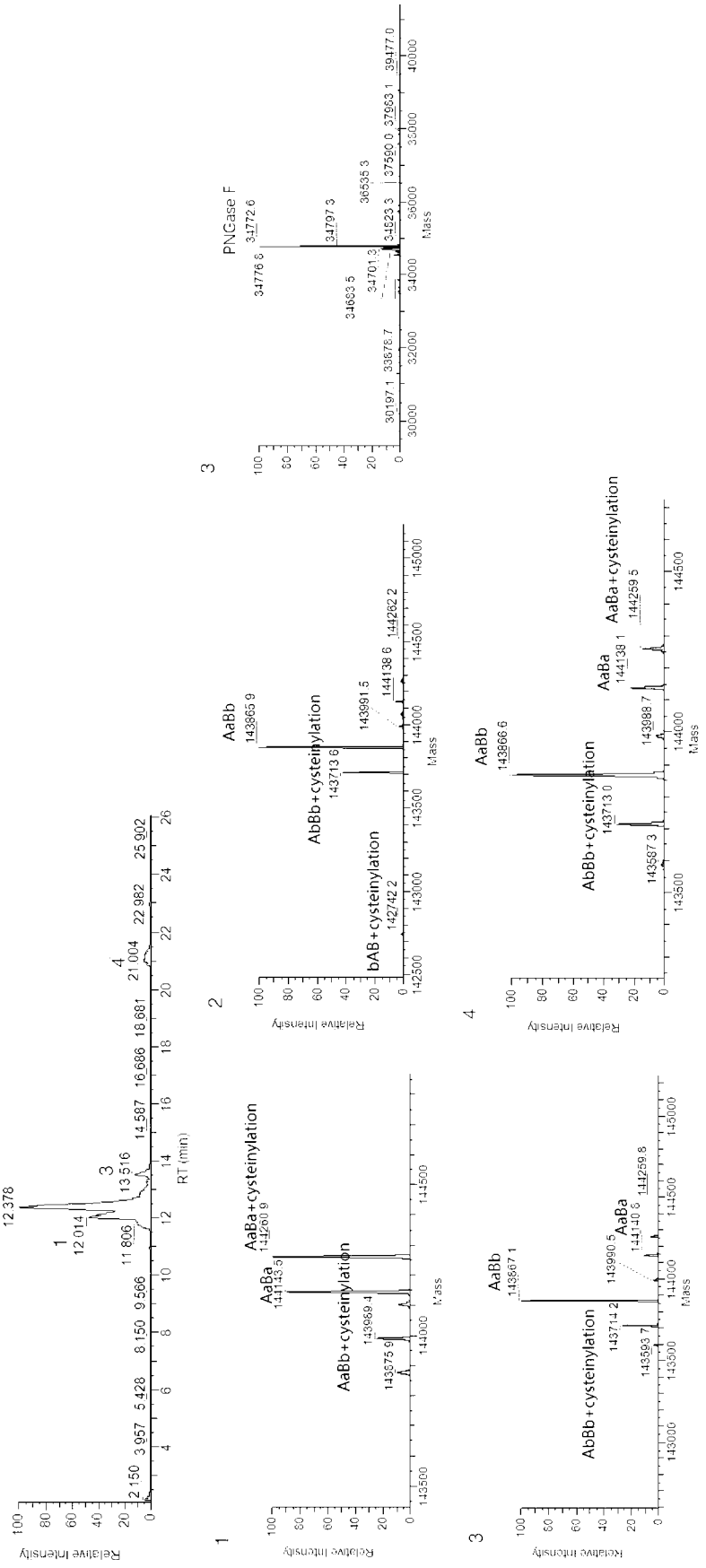
Relative Intensity
RT (min)
2
12.378
1
12.014
3
13.516
11.806
14.587
16.686
18.881
4
21.004
22.982
25.902
2.150
3.957
5.428
8.150
9.566
1
AaBa+cysteinylation
AaBa
AaBb+cysteinylation
Mass
2
AaBb
AbBb+cysteinylation
bAB+cysteinylation
3
PNGase F
34776.6
34772.6
34797.3
34683.5
34701.3
36535.3
4
AaBb
AbBb+cysteinylation
AaBa
AaBa+cysteinylation

图 2A

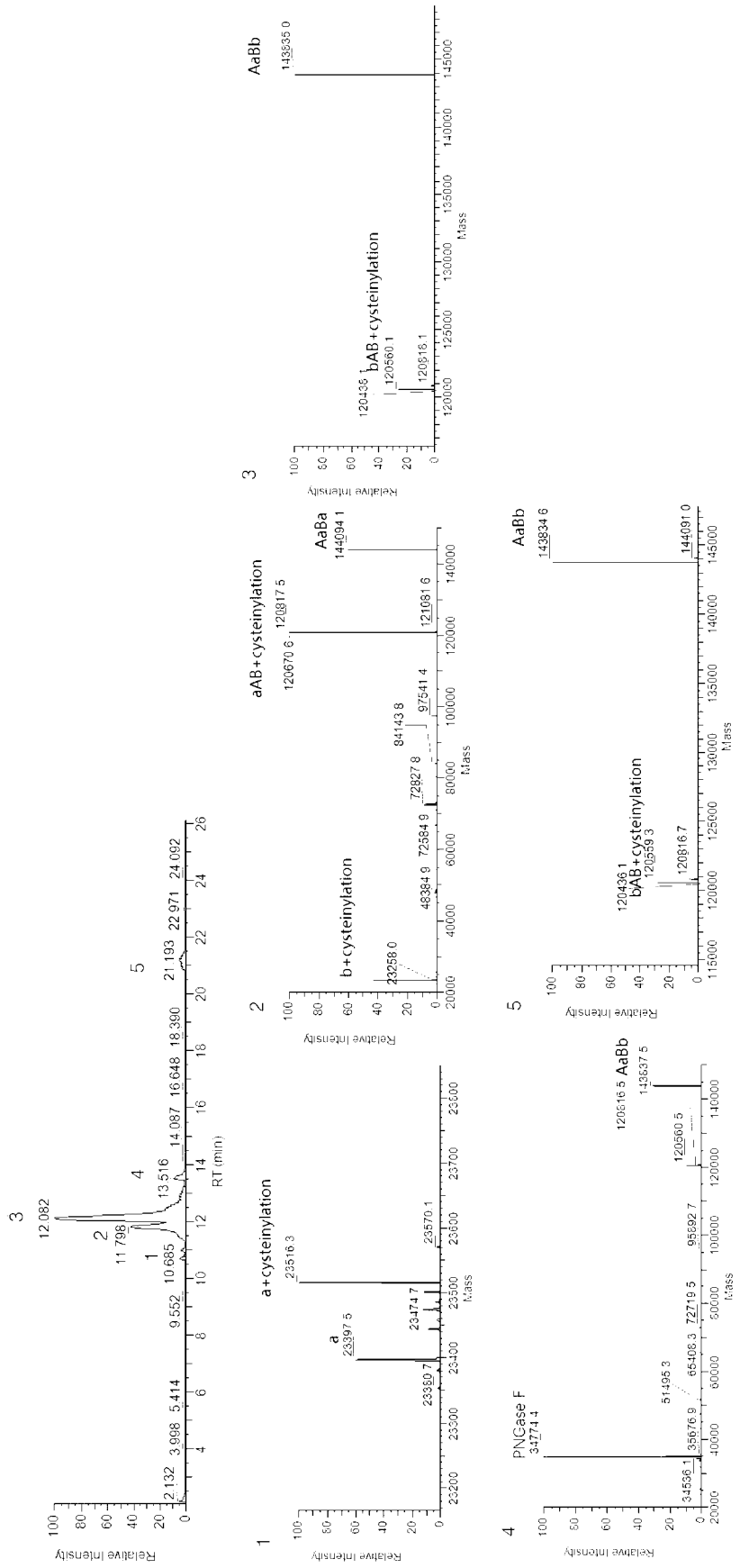
RT (min)
Relative Intensity
Mass
a+cysteinylation
b+cysteinylation
aAB+cysteinylation
bAB+cysteinylation
PNGase F
AaBa
AaBb

图 2B

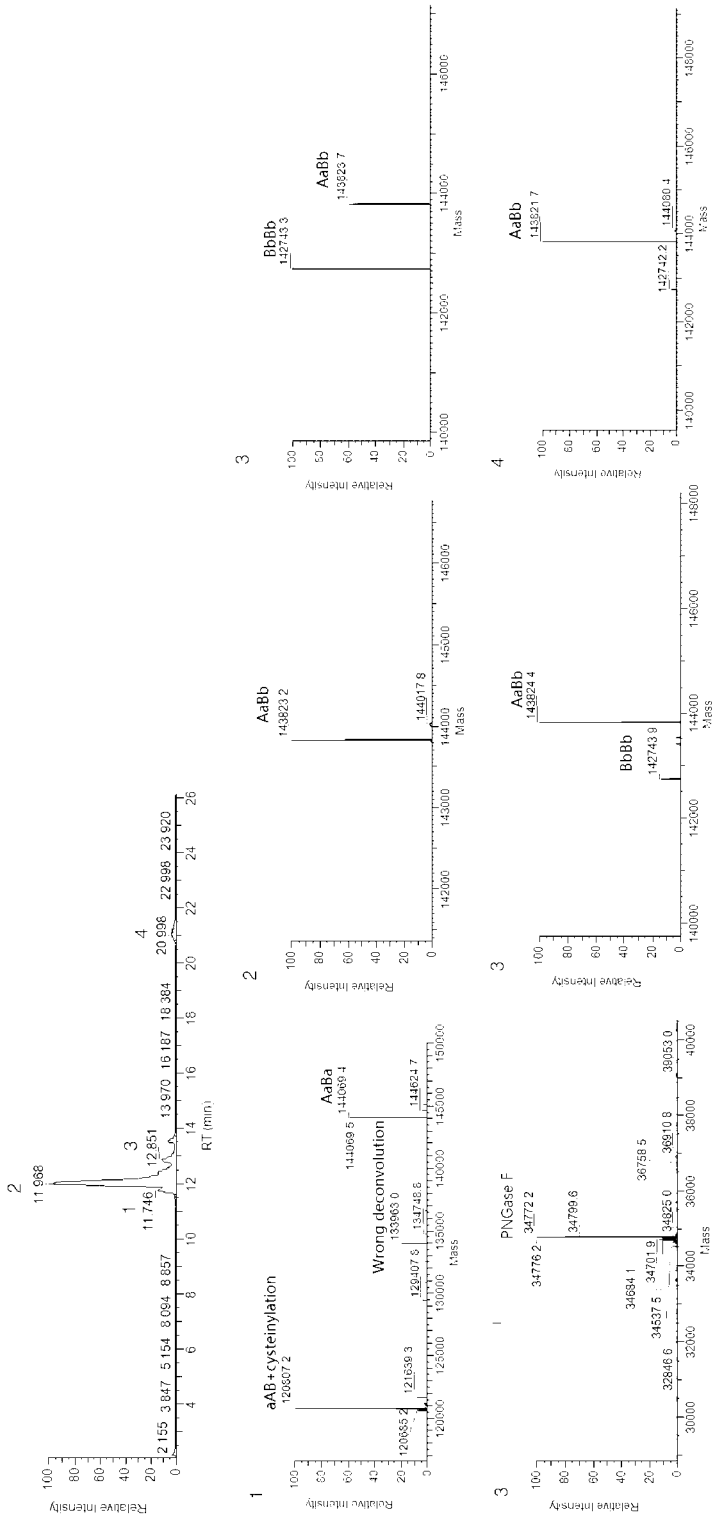
RT (min)
Relative Intensity
Mass
aAB+cysteinylation
Wrong deconvolution
AaBa
AaBb
BbBb
PNGase F

图 2C

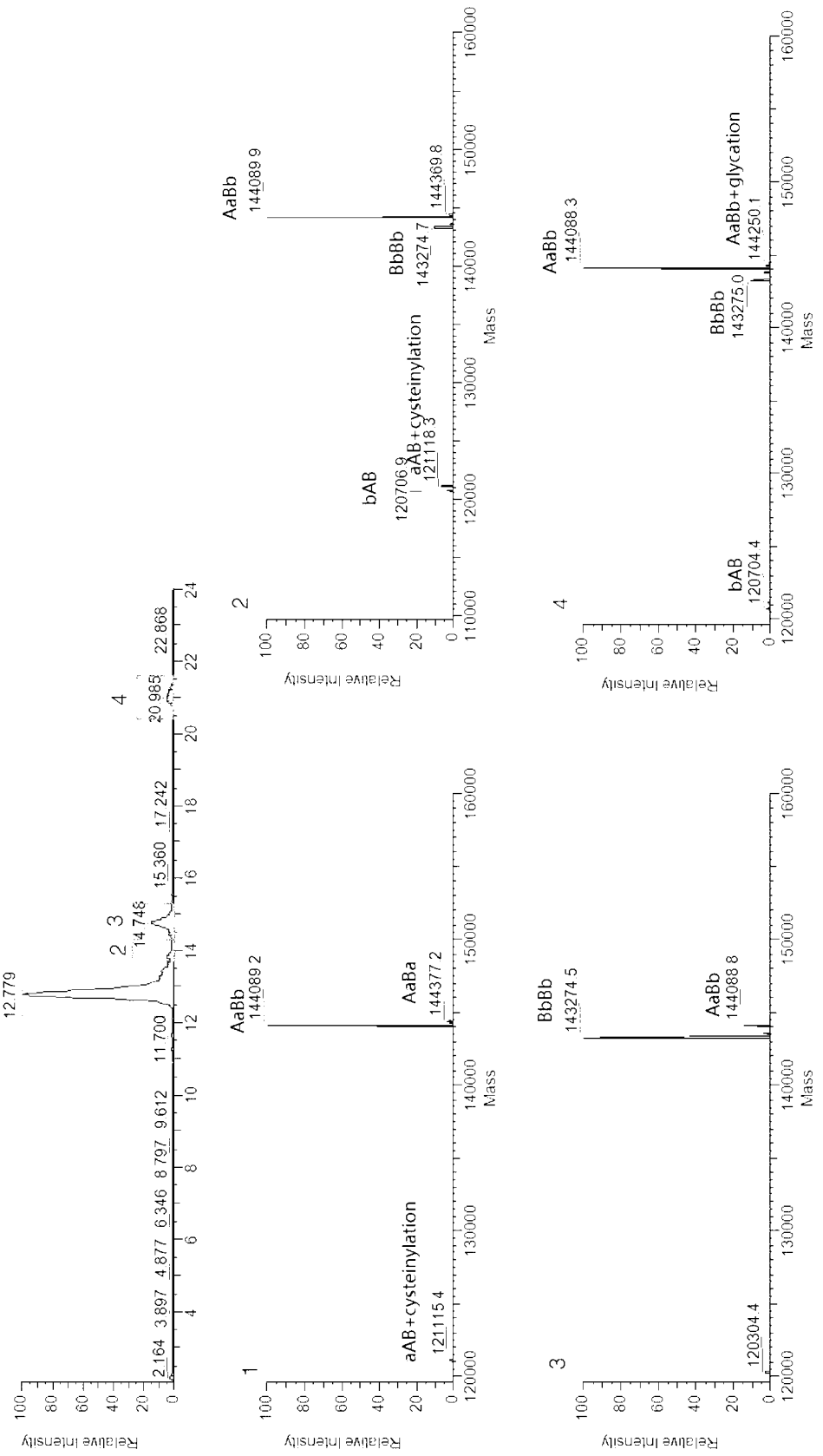
1
12.779
2
3
14.746
15.360
17.242
4
20.985
22.868
2.164
3.897
4.877
6.346
8.797
9.612
11.700
Relative Intensity
AaBb
144089.2
AaBa
144377.2
aAB+cysteinylation
121115.4
Mass
AaBb
144089.9
bAB
120706.9
aAB+cysteinylation
121118.3
BbBb
143274.7
144369.8
BbBb
143274.5
AaBb
144088.8
120304.4
AaBb
144088.3
BbBb
143275.0
AaBb+glycation
144250.1
bAB
120704.4

图 3A

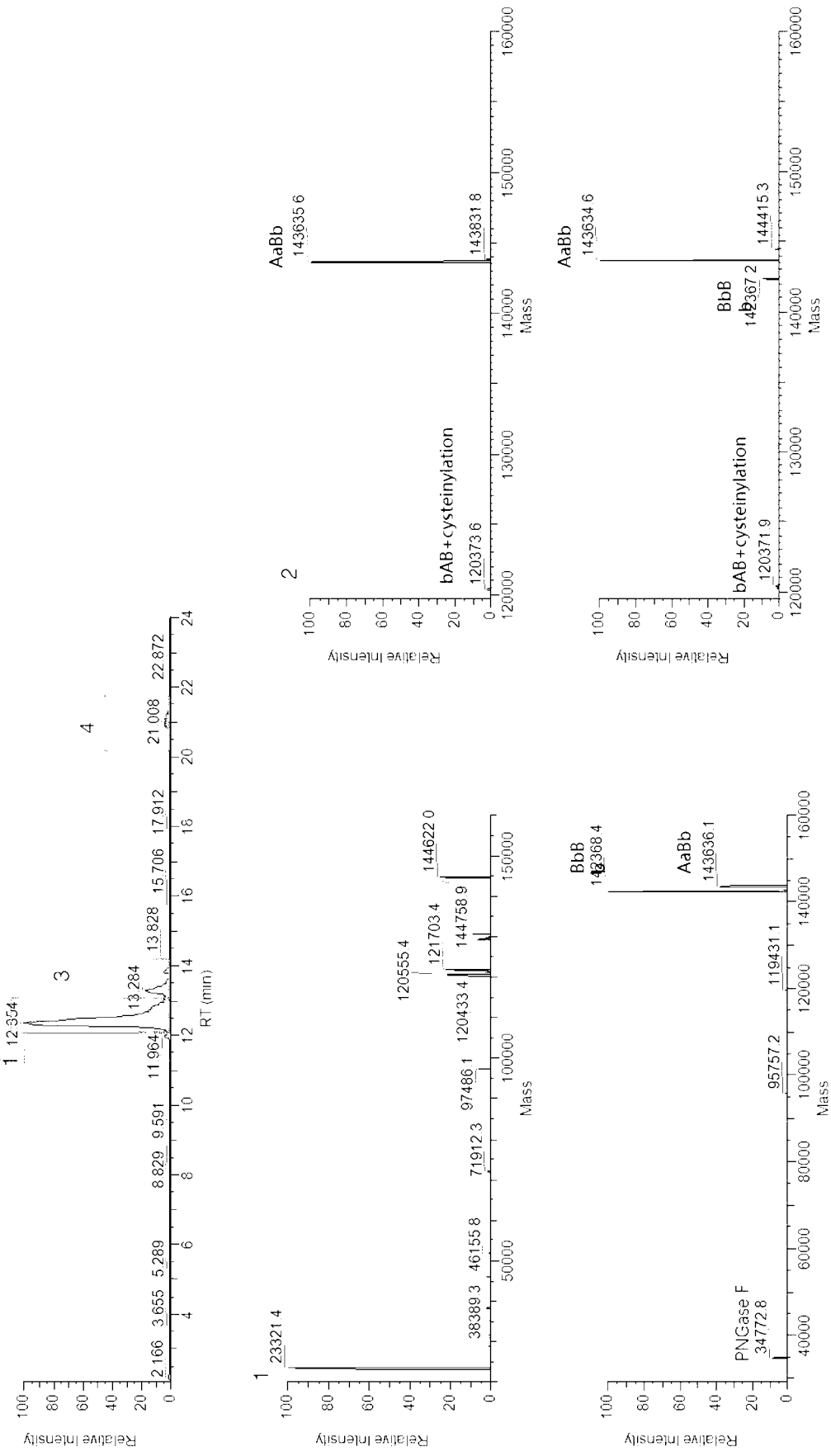
Relative Intensity
RT (min)
Mass
bAB+cysteinylation
AaBb
BbB
PNGase F

图 3B

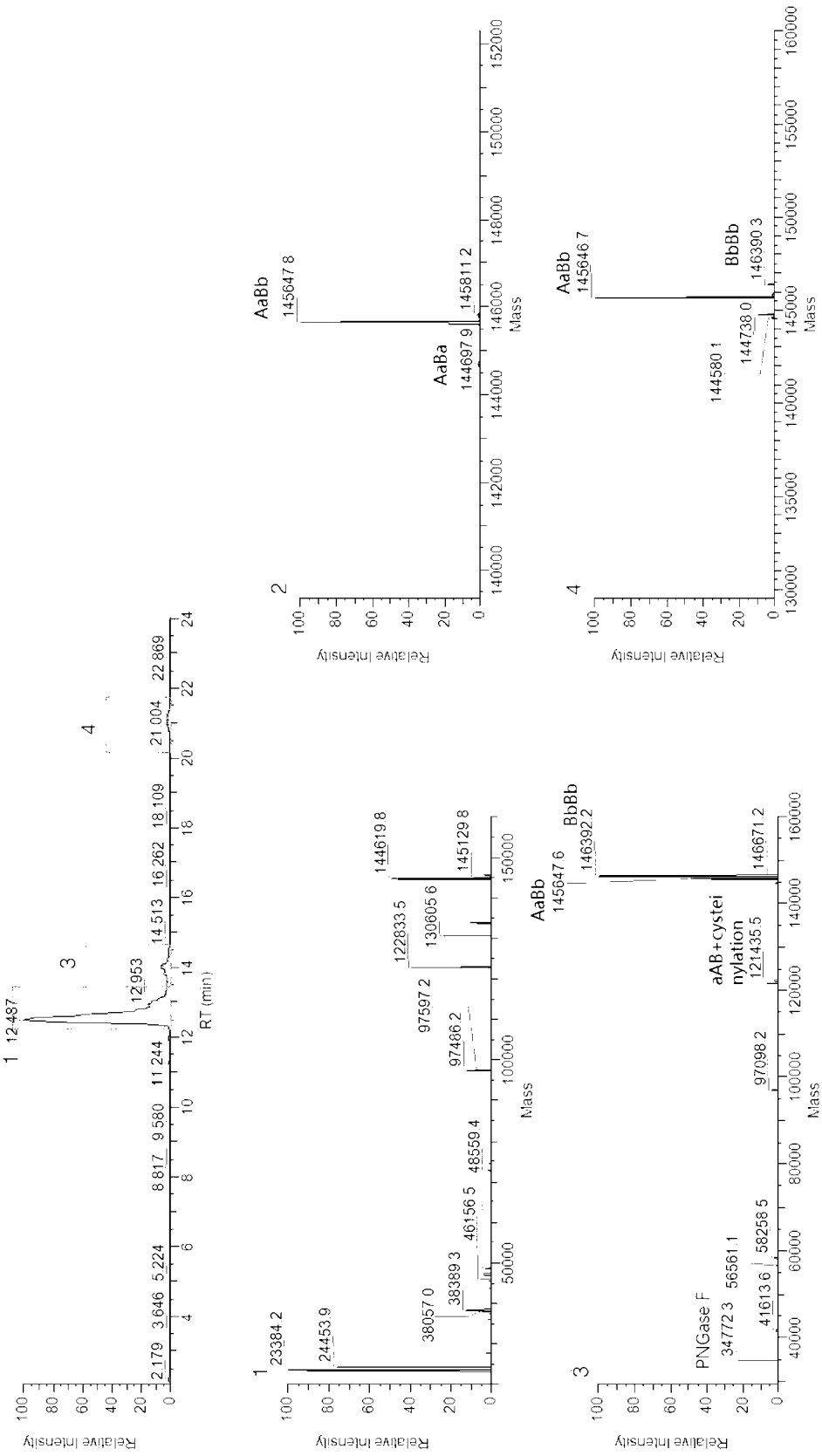
1
2
3
4
12.487
12.953
14.513
16.262
18.109
21.004
22.869
RT (min)
Relative Intensity
AaBb
145647.8
AaBa
144697.9
145811.2
Mass
BbBb
146390.3
144580.1
144738.0
145646.7
23384.2
24453.9
38057.0
38389.3
46156.5
48559.4
97597.2
97486.2
122833.5
130605.6
144619.8
145129.8
PNGase F
34772.3
56561.1
41613.6
58258.5
97098.2
aAB+cysteinylation
121435.5
146392.2
146671.2

图 3C

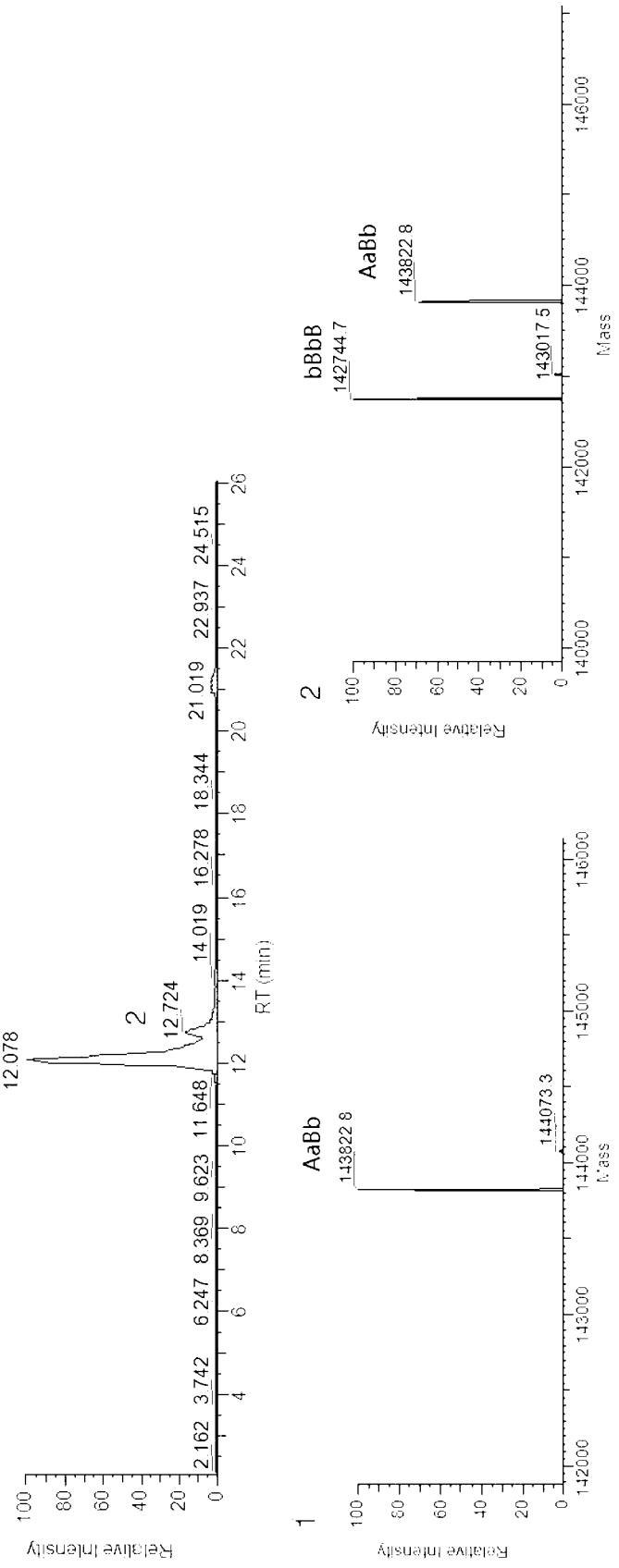
1
12.078
2
12.724
14.019
16.278
18.344
21.019
22.937
24.515
2.162
3.742
6.247
8.369
9.623
11.648
RT (min)
Relative Intensity
AaBb
143822.8
144073.3
Mass
2
bBbB
142744.7
AaBb
143822.8
143017.5
Mass

图 4A

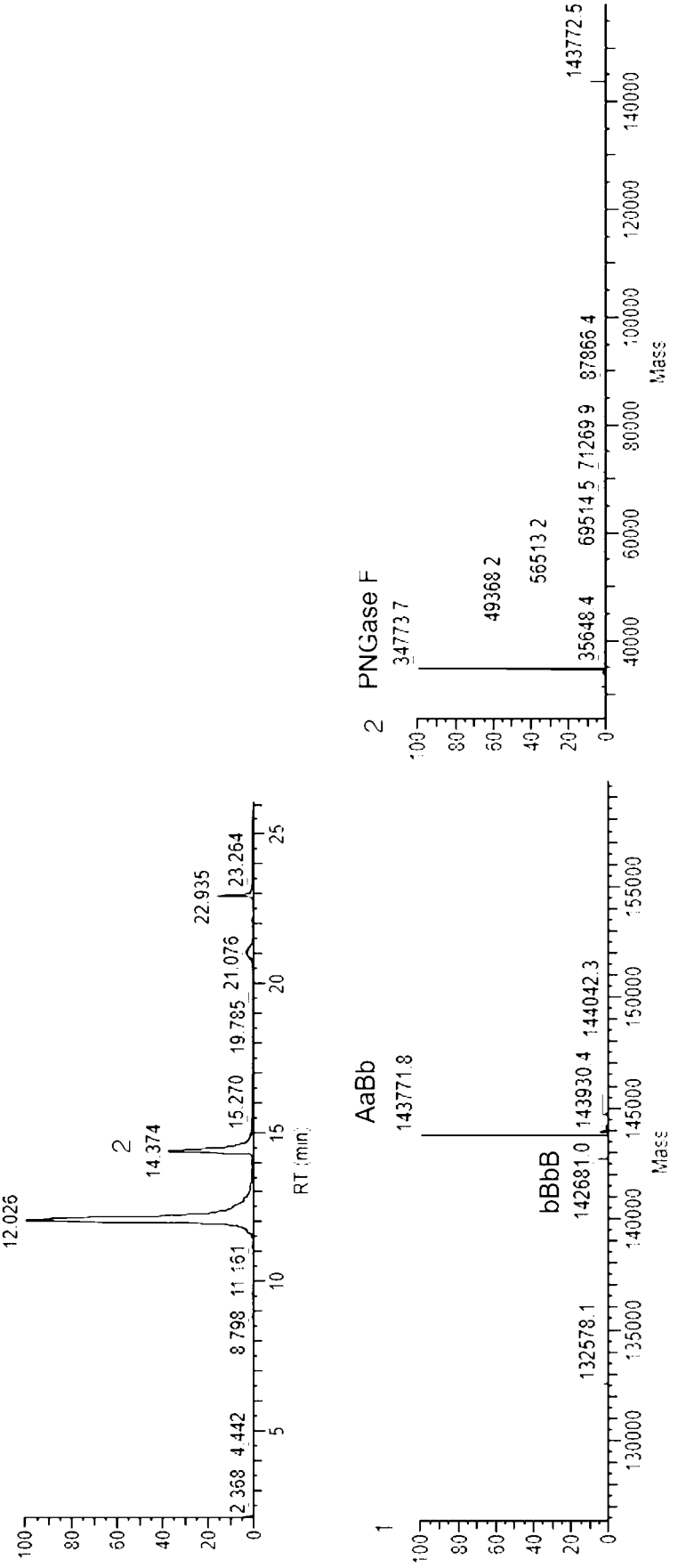
1
12.026
2
14.374
15.270
19.785
21.076
22.935
23.264
2.368
4.442
8.798
11.161
RT (min)
AaBb
143771.8
bBbB
142681.0
143930.4
144042.3
132578.1
Mass
2 PNGase F
34773.7
49368.2
56513.2
35648.4
69514.5
71269.9
87866.4
143772.5
Mass

图 4B

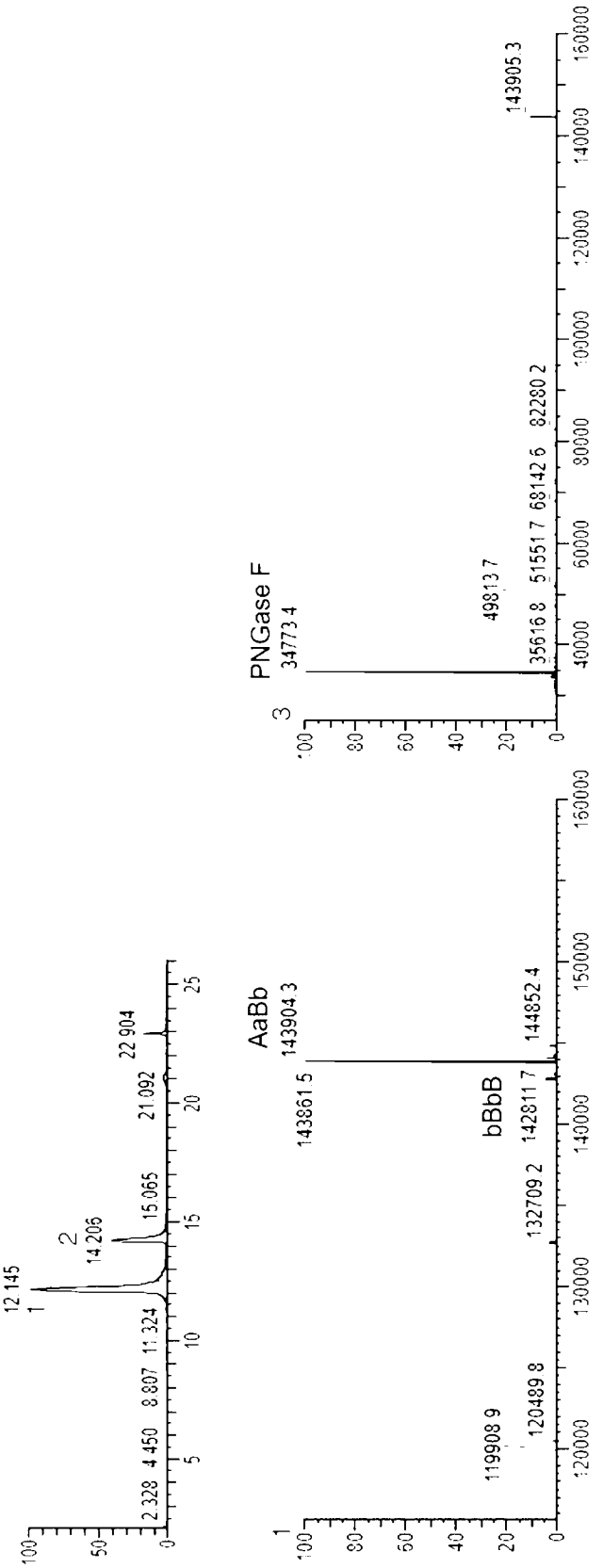
PNGase F
AaBb
bBbB
12.145
14.206
15.065
21.092
22.904
2.328
4.450
8.807
11.324
119908.9
120489.8
132709.2
143615.5
143904.3
144852.4
34773.4
35616.8
49813.7
515517
68142.6
82280.2
143905.3

图 4C

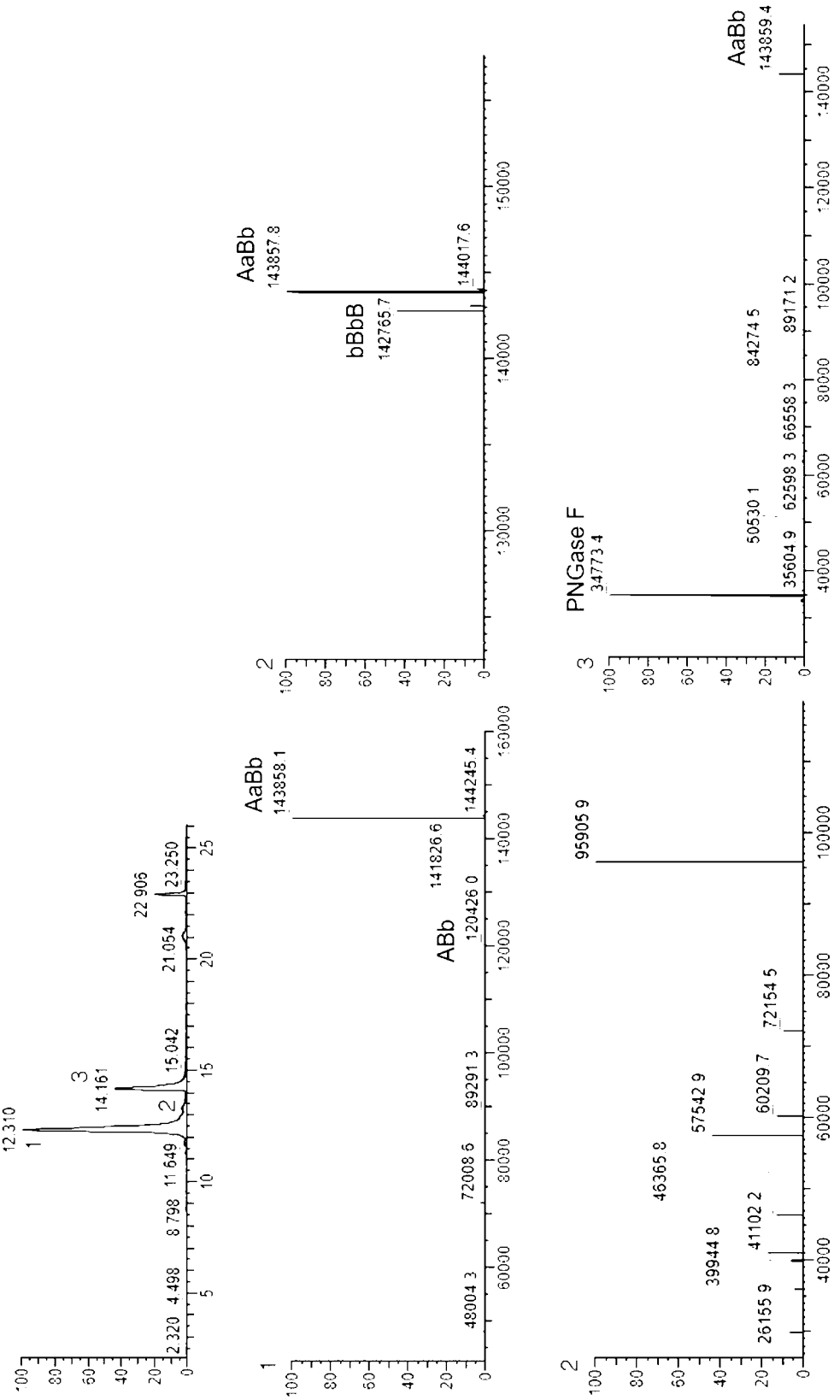
AaBb
143857.8
bBbB
142765.7
144017.6
AaBb
143858.1
ABb
141826.6
144245.4
PNGase F
34773.4
50530.1
62598.3
66558.3
84274.5
89171.2
35604.9
AaBb
143859.4
95905.9
46365.8
57542.9
60209.7
72154.5
39944.8
41102.2
26155.9
12.310
14.161
15.042
21.054
22.906
23.250
2.320
4.498
8.798
11.649
72008.6
89291.3
48004.3

图 4D

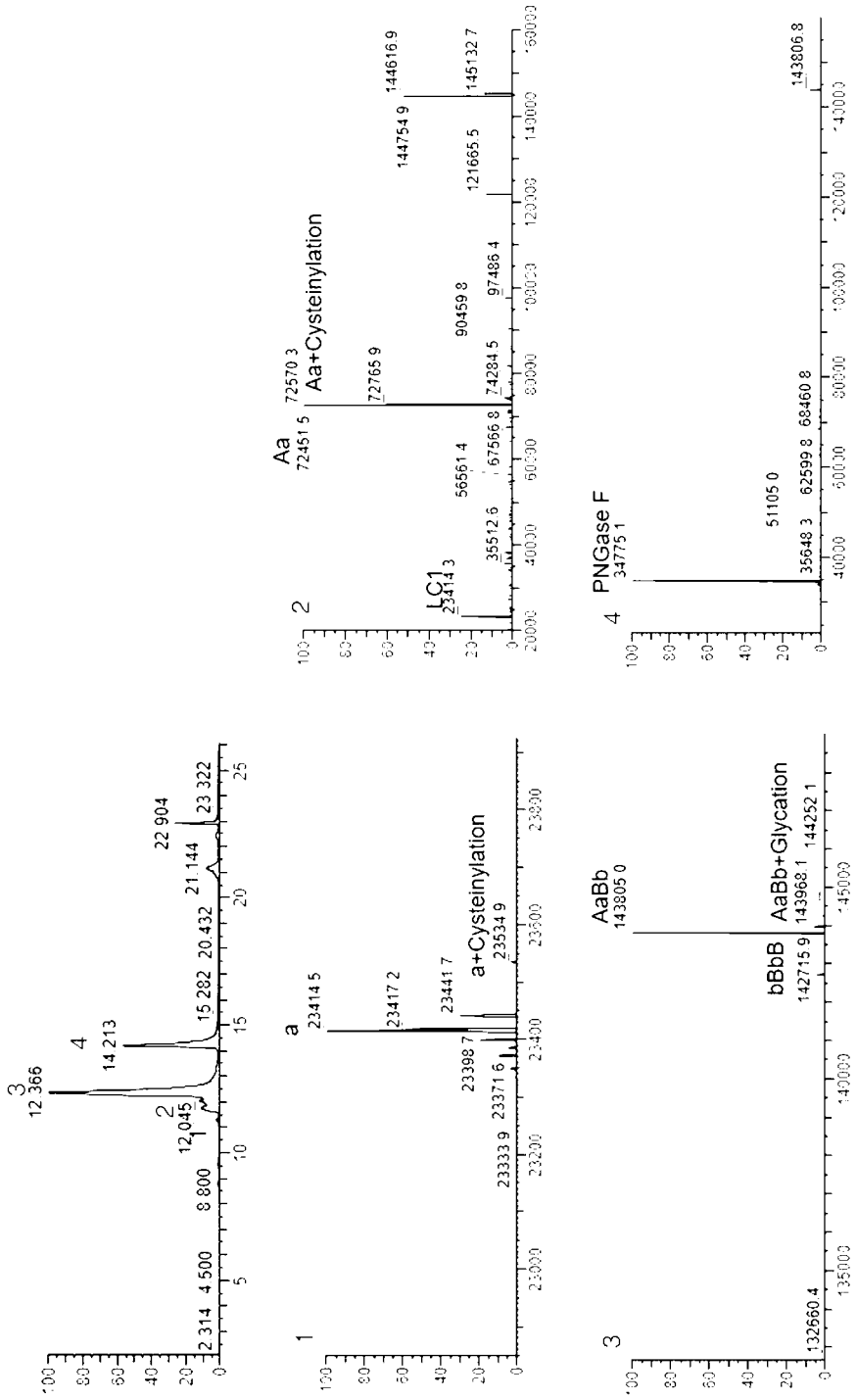
1
2
3
4
LC1
Aa
Aa+Cysteinylation
a
a+Cysteinylation
AaBb
bBbB
AaBb+Glycation
PNGase F

图 4E

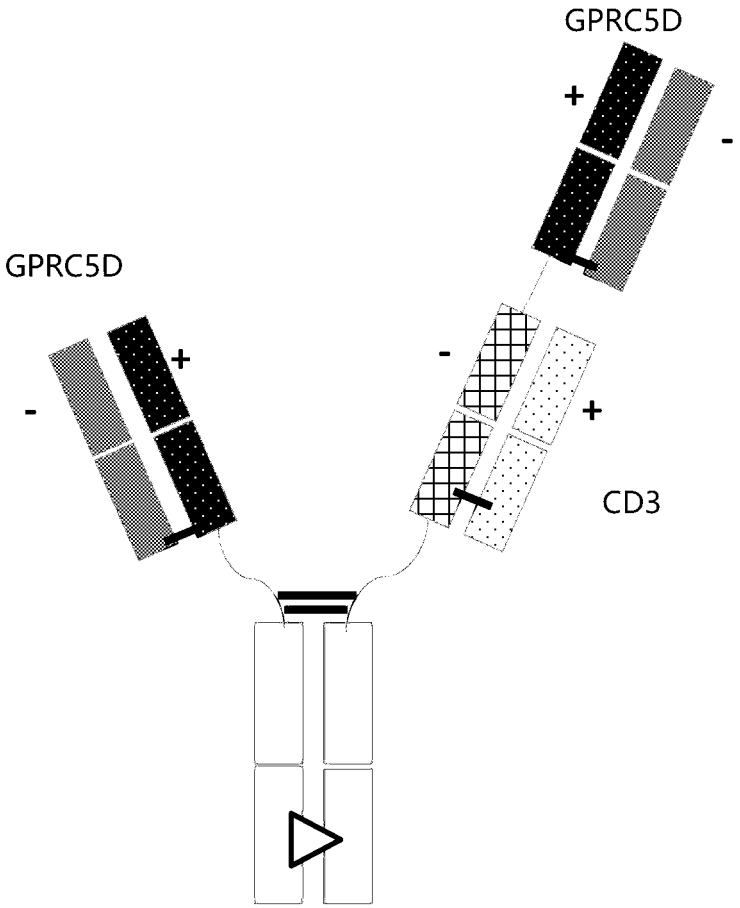

图 5A

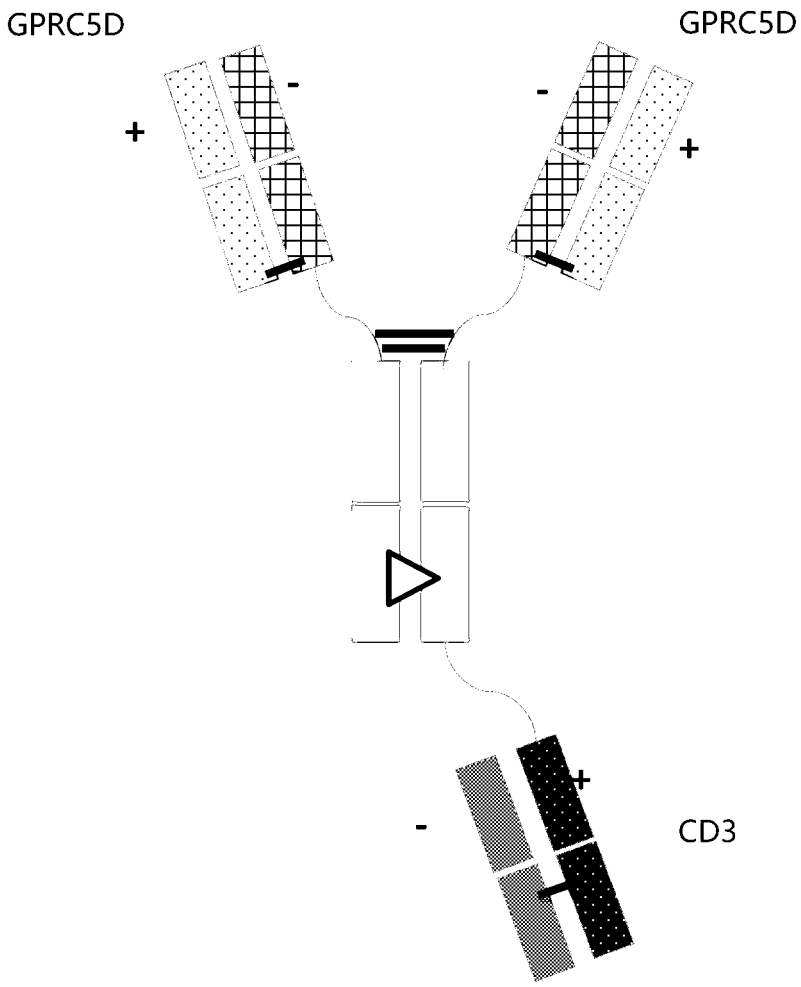

图 5B

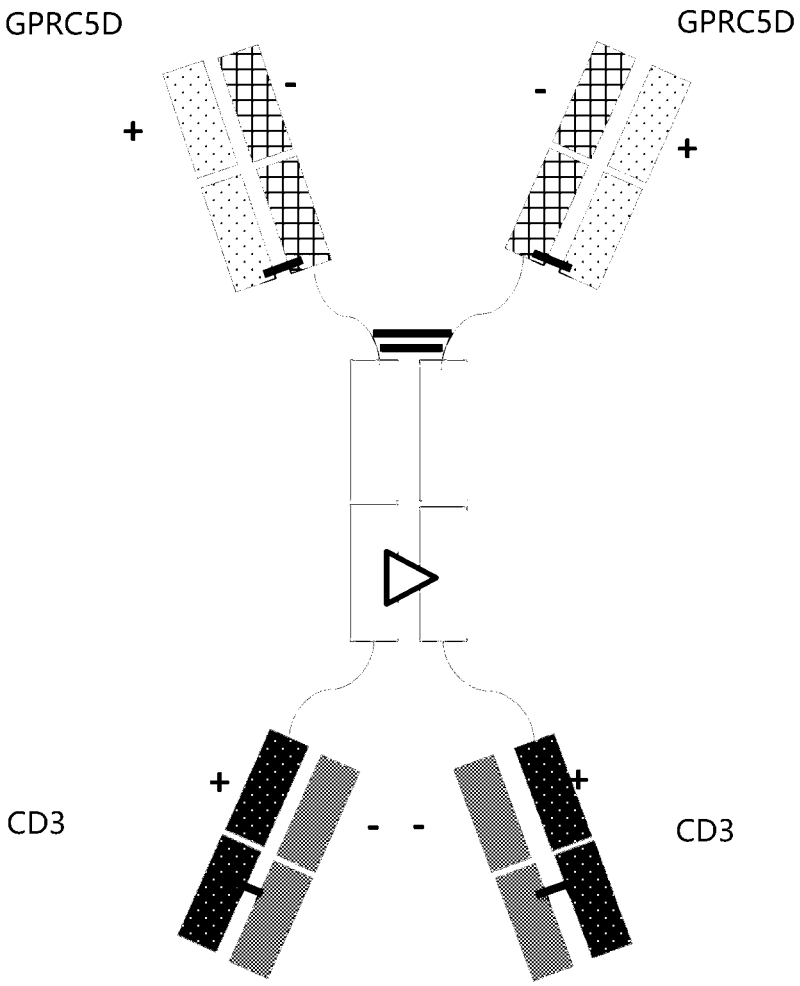

图 5C

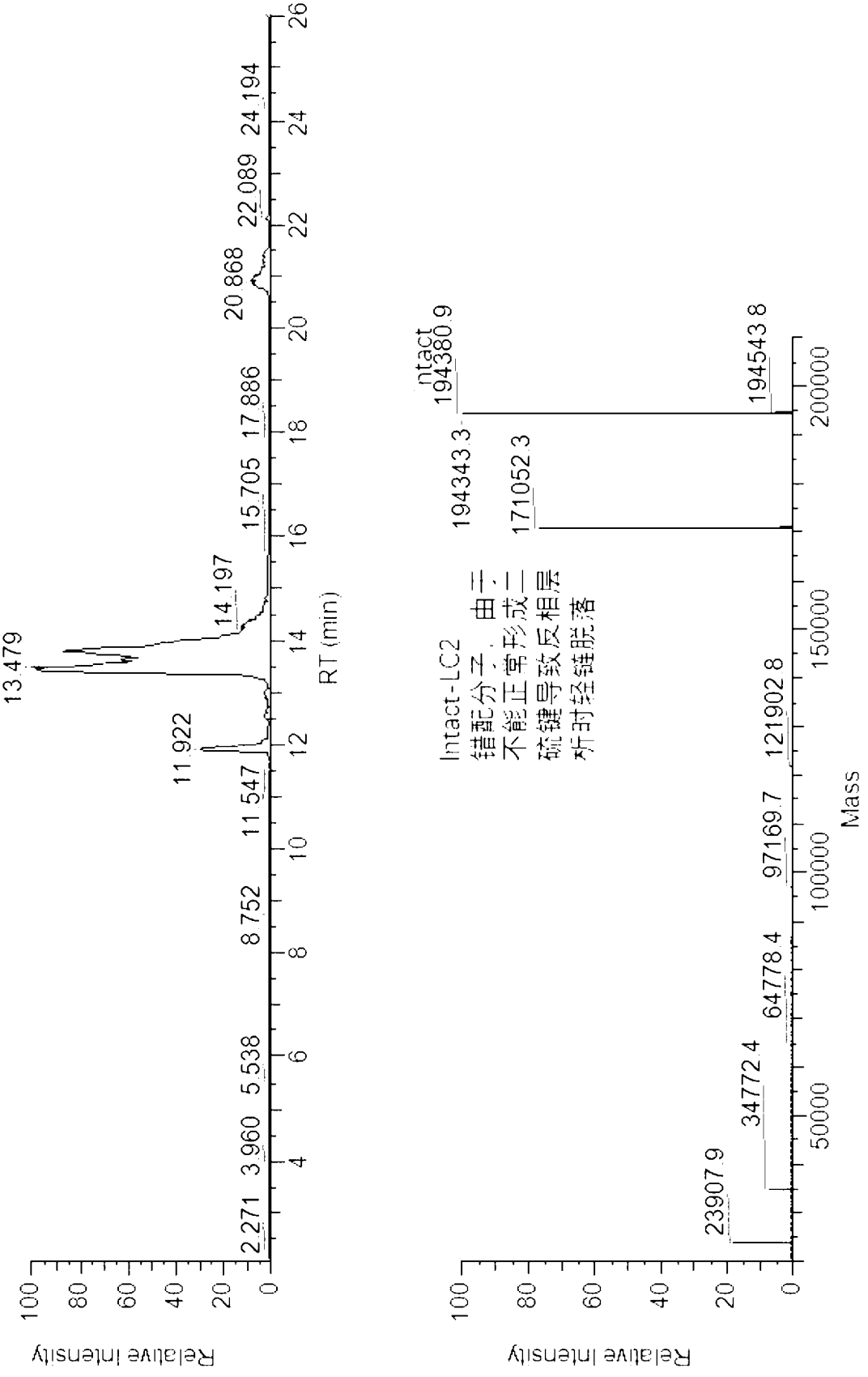
Relative Intensity
RT (min)
2.271
3.960
5.538
8.752
11.547
11.922
13.479
14.197
15.705
17.886
20.868
22.089
24.194
Intact-LC2
错配分子，由二
不能正常形成二
硫键导致反相层
析时经链脱落
Intact
194380.9
194343.3
171052.3
194543.8
121902.8
97169.7
64778.4
34772.4
23907.9
Mass

图 6A

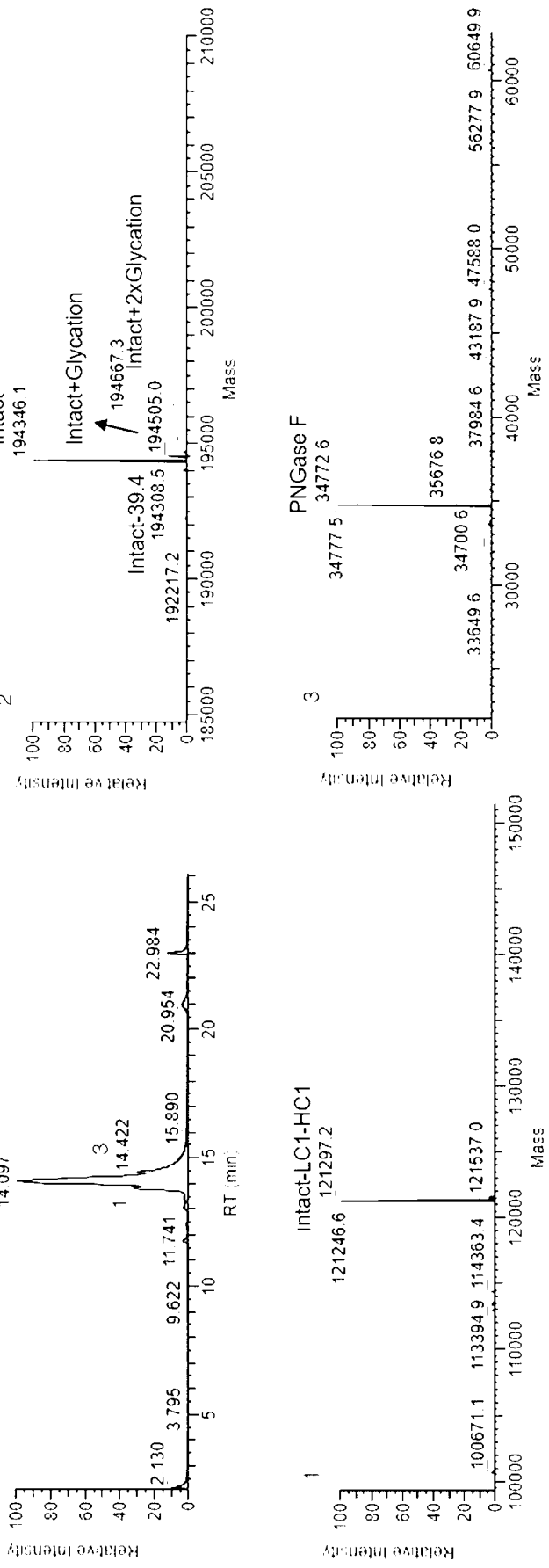
Intact
194346.1
Intact+Glycation
194667.3
Intact+2xGlycation
194505.0
Intact-39.4
194308.5
192217.2
PNGase F
34772.6
34777.5
35676.8
33649.6
34700.6
37984.6
43187.9
47588.0
56277.9
60649.9
Intact-LC1-HC1
121297.2
121246.6
121537.0
100671.1
113394.9
114363.4
2.130
3.795
9.622
11.741
14.097
14.422
15.890
20.954
22.984
RT (min)
Mass
Relative Intensity

图 6B

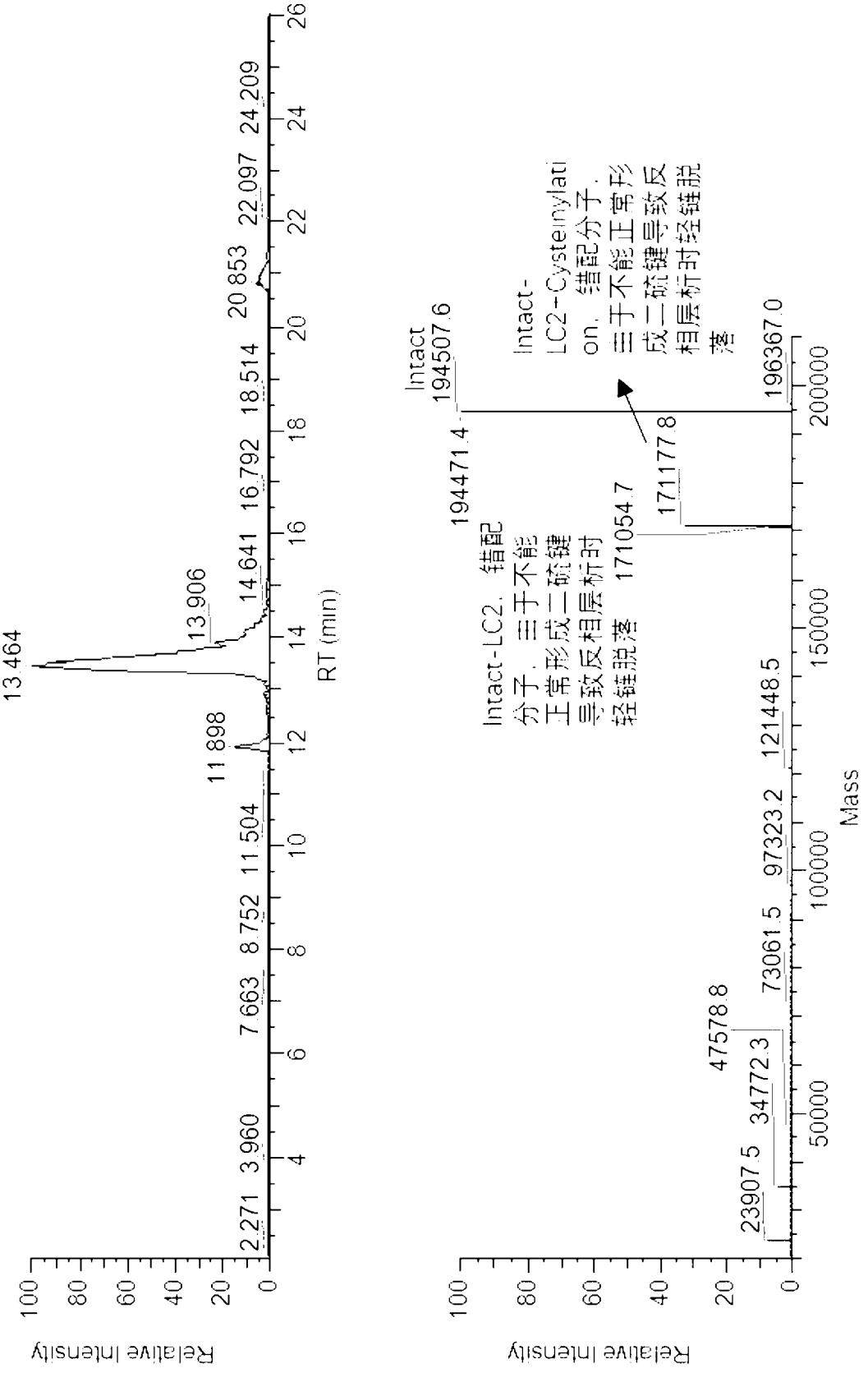
Relative Intensity
RT (min)
2.271
3.960
7.663
8.752
11.504
11.898
13.464
13.906
14.641
16.792
18.514
20.853
22.097
24.209
Intact-LC2. 错配分子，三于不能正常形成二硫键导致反相层析时轻链脱落
Intact
194507.6
194471.4
171054.7
171177.8
196367.0
47578.8
23907.5
34772.3
73061.5
97323.2
121448.5
Mass

图 6C

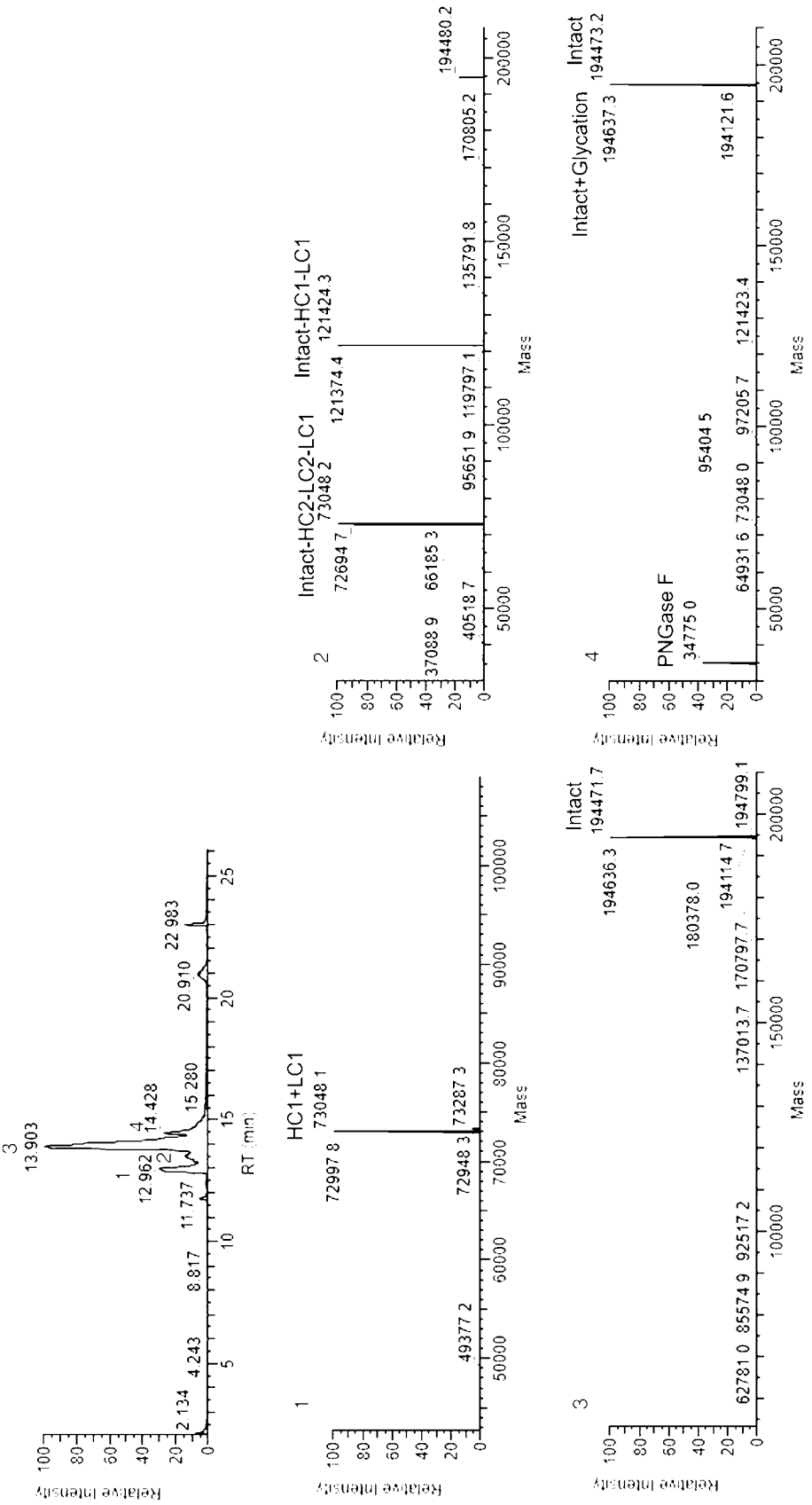
RT (min)
Relative Intensity
Mass
HC1+LC1
Intact-HC2-LC2-LC1
Intact-HC1-LC1
PNGase F
Intact+Glycation
Intact

图 6D

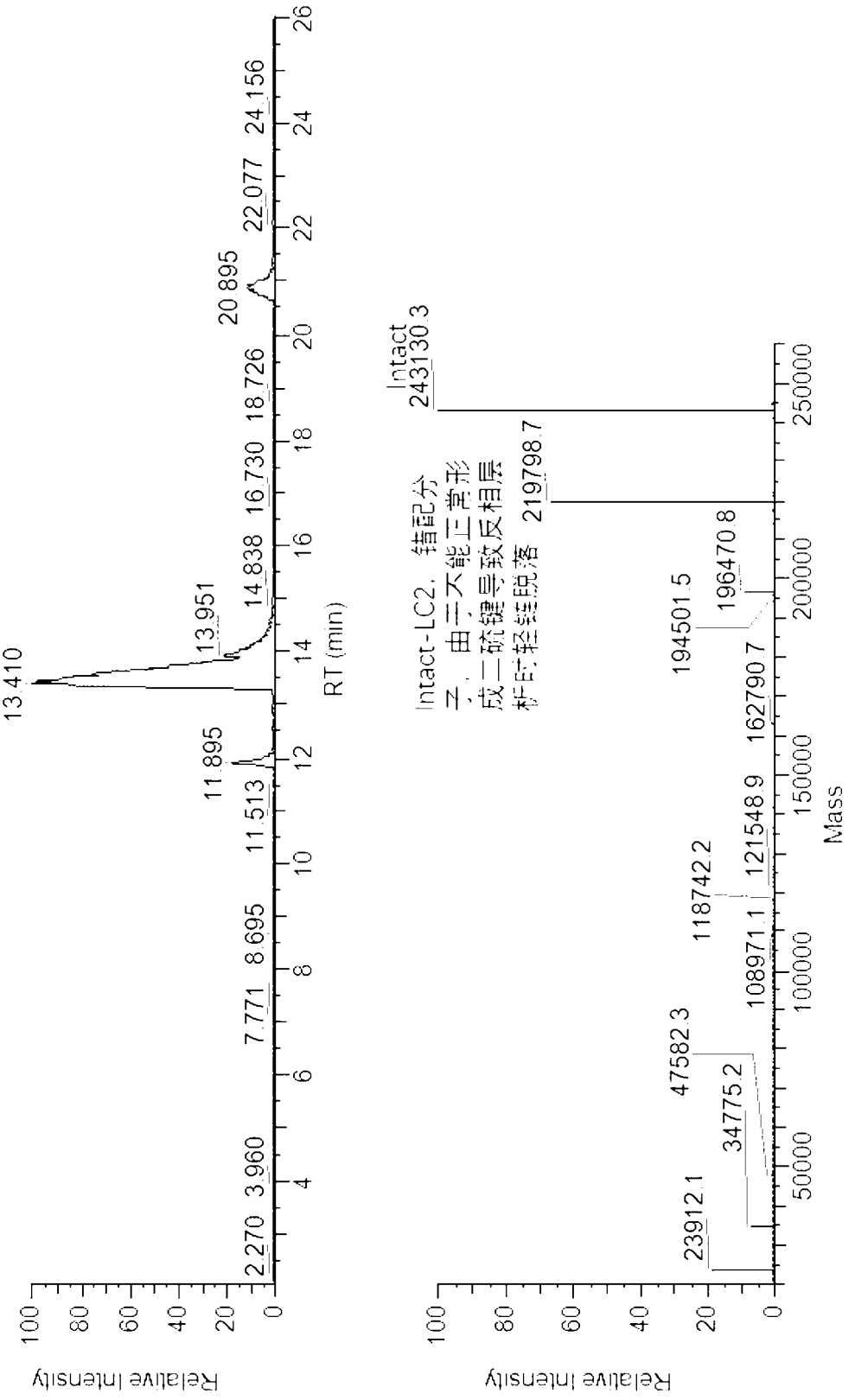
Relative Intensity
RT (min)
2.270
3.960
7.771
8.695
11.513
11.895
13.410
13.951
14.838
16.730
18.726
20.895
22.077
24.156
Intact-LC2，错配分子，由二次能正常形成二硫键导致反相层析柱轻链脱落
Intact
243130.3
219798.7
194501.5
196470.8
162790.7
121548.9
118742.2
108971.1
47582.3
34775.2
23912.1
Mass

图 6E

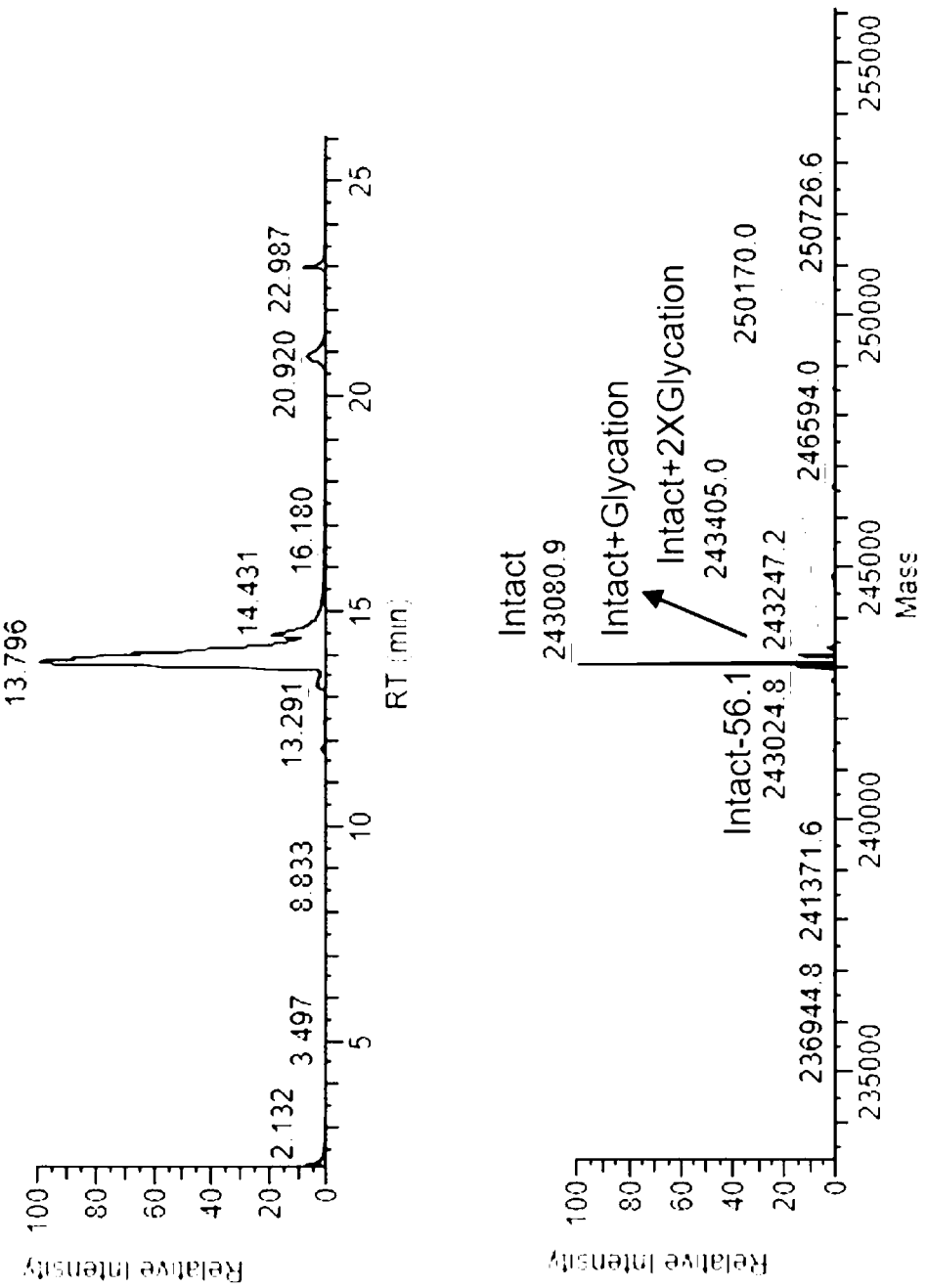
13.796
14.431
16.180
20.920
22.987
2.132
3.497
8.833
13.291
RT (min)
Relative Intensity
Intact
243080.9
Intact+Glycation
Intact+2XGlycation
243405.0
250170.0
Intact-56.1
243024.8
243247.2
236944.8
241371.6
246594.0
250726.6
Mass
Relative Intensity

图 6F

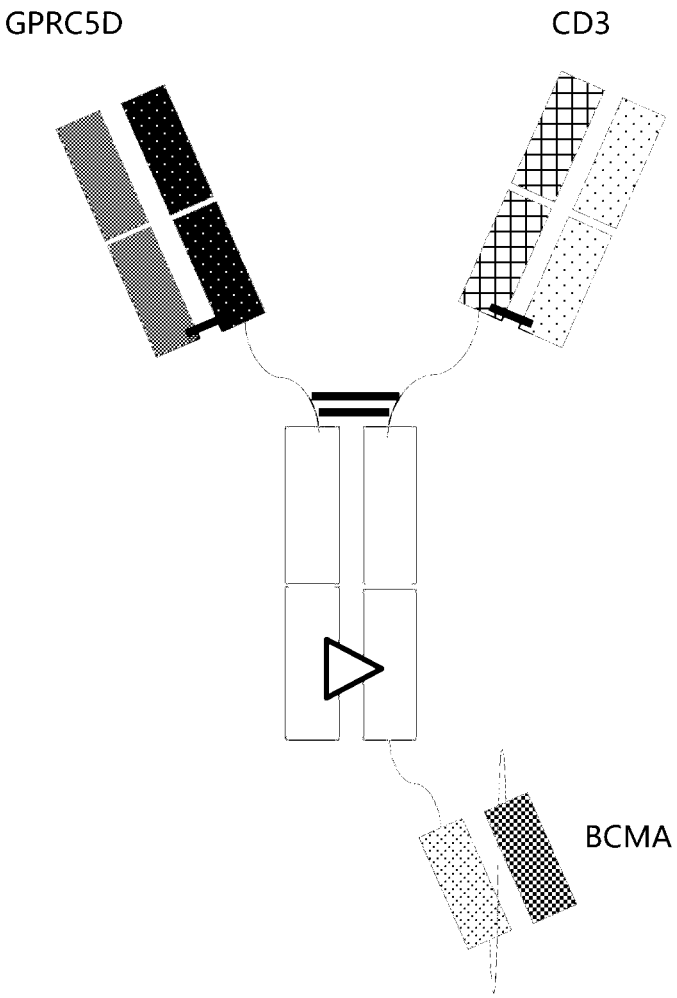

图 7A BCMA/GPRC5D/CD3

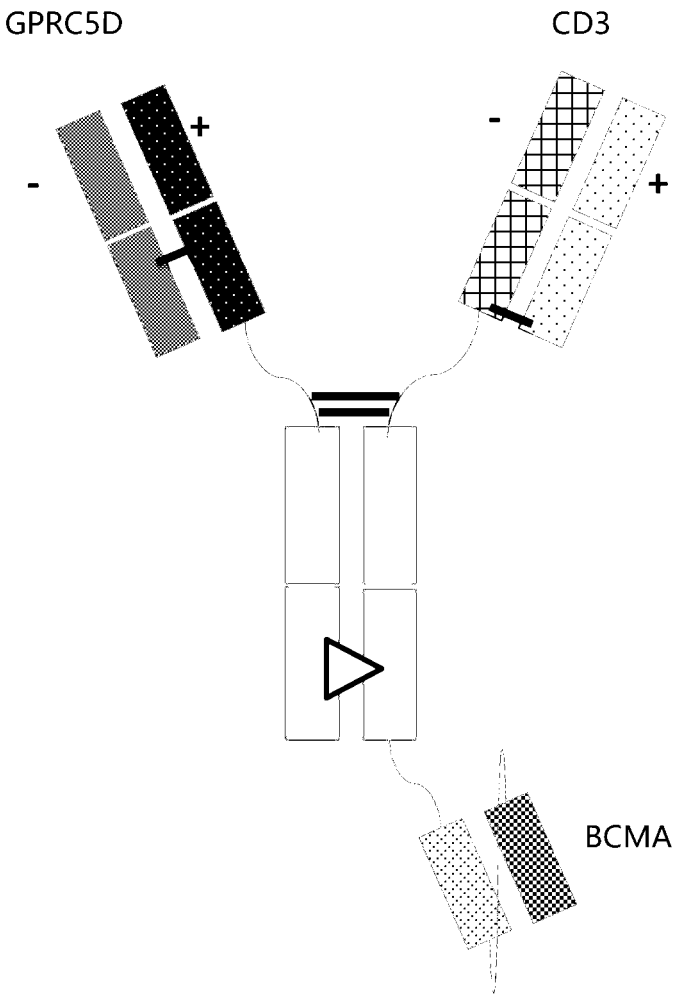

图 7B BCMA/GPRC5D/CD3 with Charge and cysteine mutation

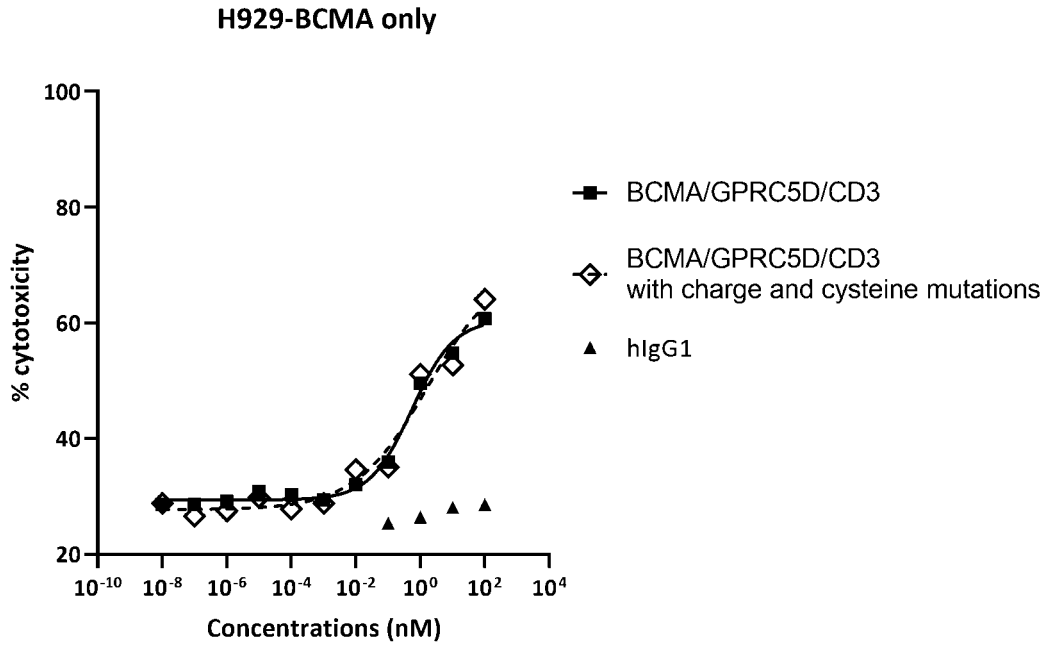
H929-BCMA only
% cytotoxicity
100
80
60
40
20
10^{-10} 10^{-8} 10^{-6} 10^{-4} 10^{-2} 10^{0} 10^{2} 10^{4}
Concentrations (nM)
BCMA/GPRC5D/CD3
BCMA/GPRC5D/CD3
with charge and cysteine mutations
hIgG1

图 8A

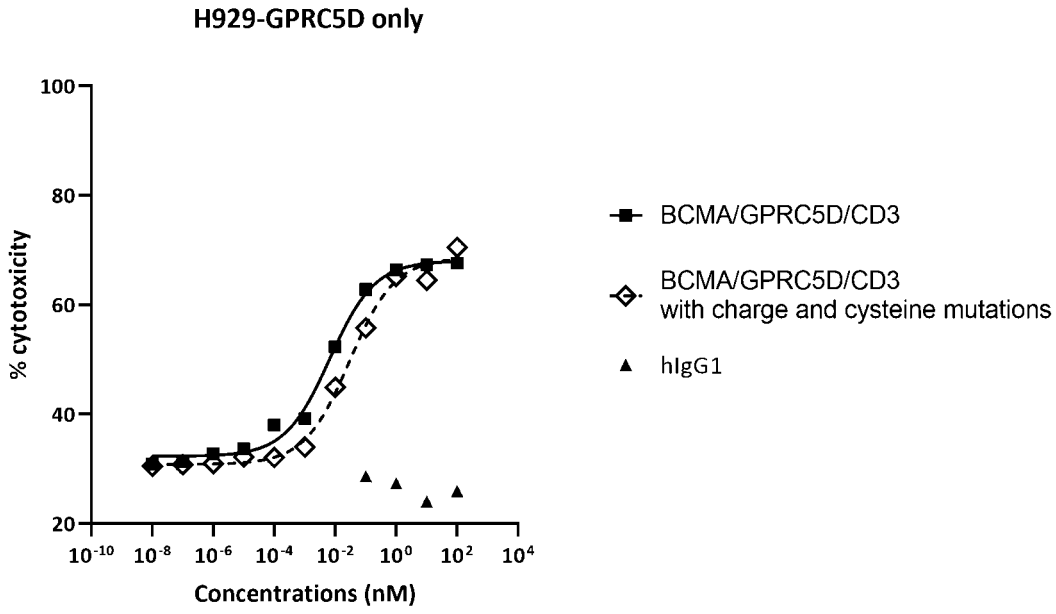
H929-GPRC5D only
% cytotoxicity
100
80
60
40
20
10^{-10} 10^{-8} 10^{-6} 10^{-4} 10^{-2} 10^{0} 10^{2} 10^{4}
Concentrations (nM)
BCMA/GPRC5D/CD3
BCMA/GPRC5D/CD3
with charge and cysteine mutations
hIgG1

图 8B

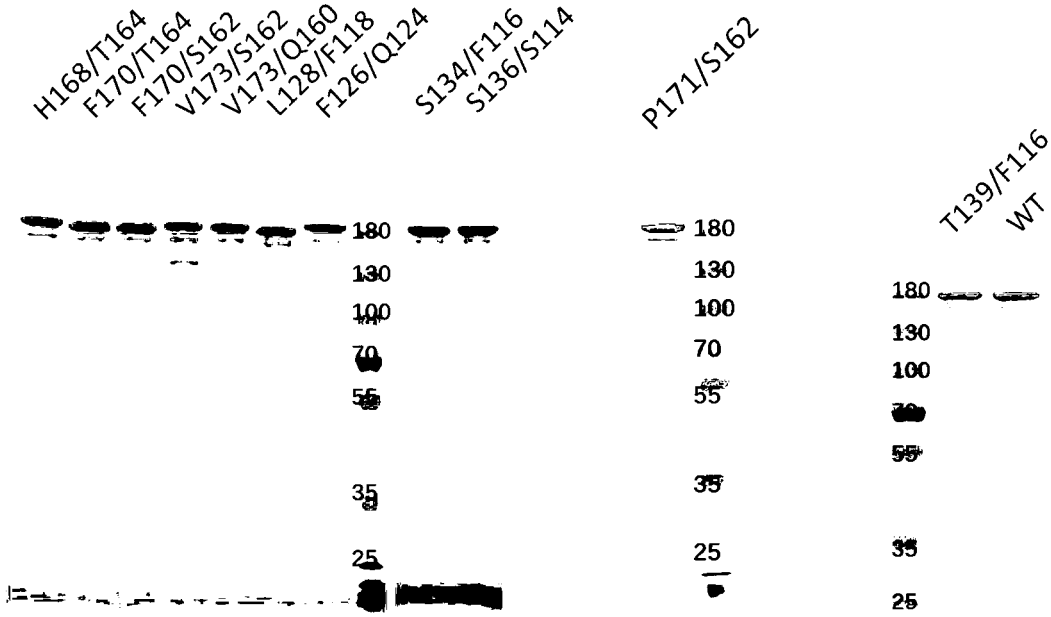
H168/T164
F170/T164
F170/S162
V173/S162
V173/Q160
L128/F118
F126/Q124
S134/F116
S136/S114
180
130
100
70
55
35
25
P171/S162
180
130
100
70
55
35
25
T139/F116
WT
180
130
100
55
35
25

图 9A 9B 9C

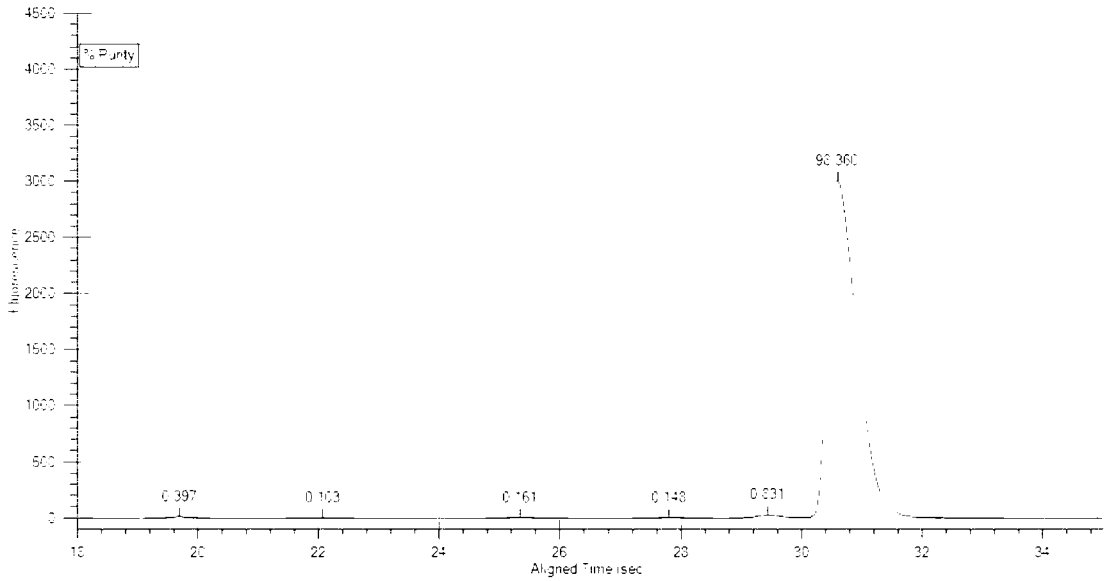

图 9D F126C/Q124C 二硫键重塑抗体

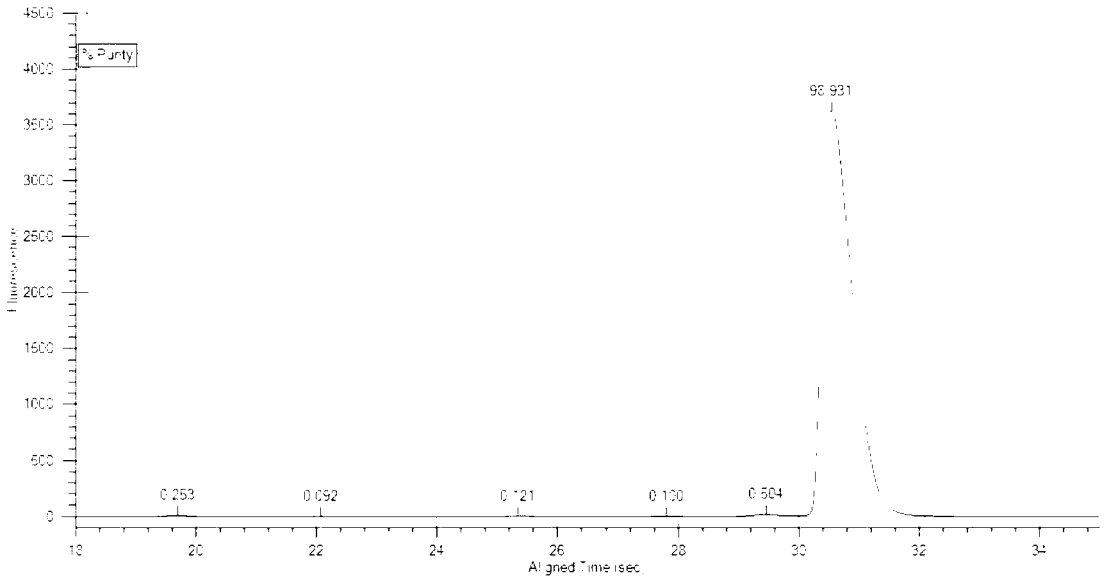

图 9E H168C/T164C 二硫键重塑抗体

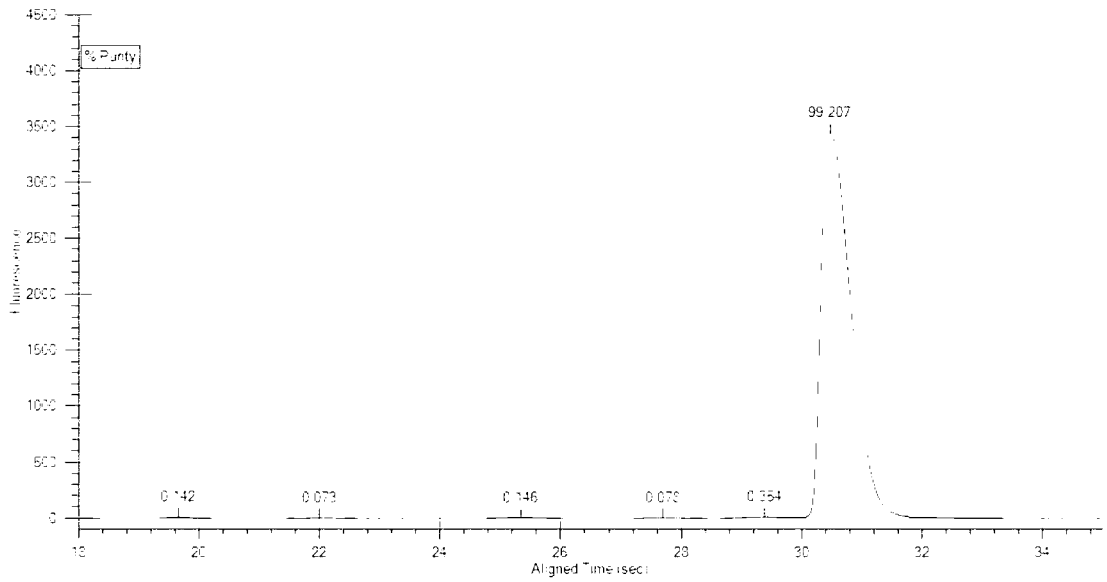

图 9F F170C/T164C 二硫键重塑抗体

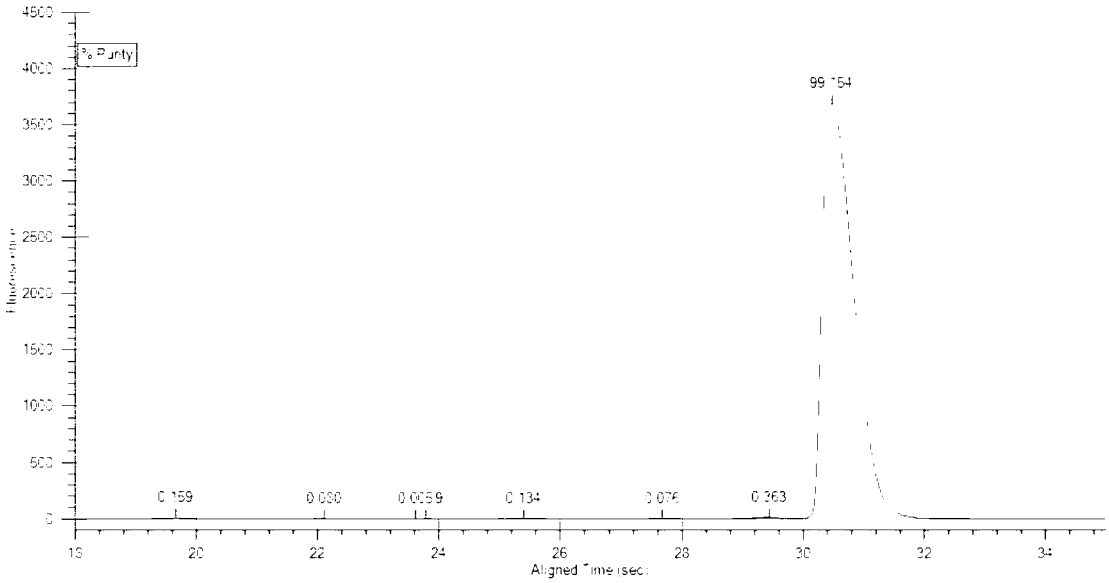

图 9G F170C/S162C 二硫键重塑抗体

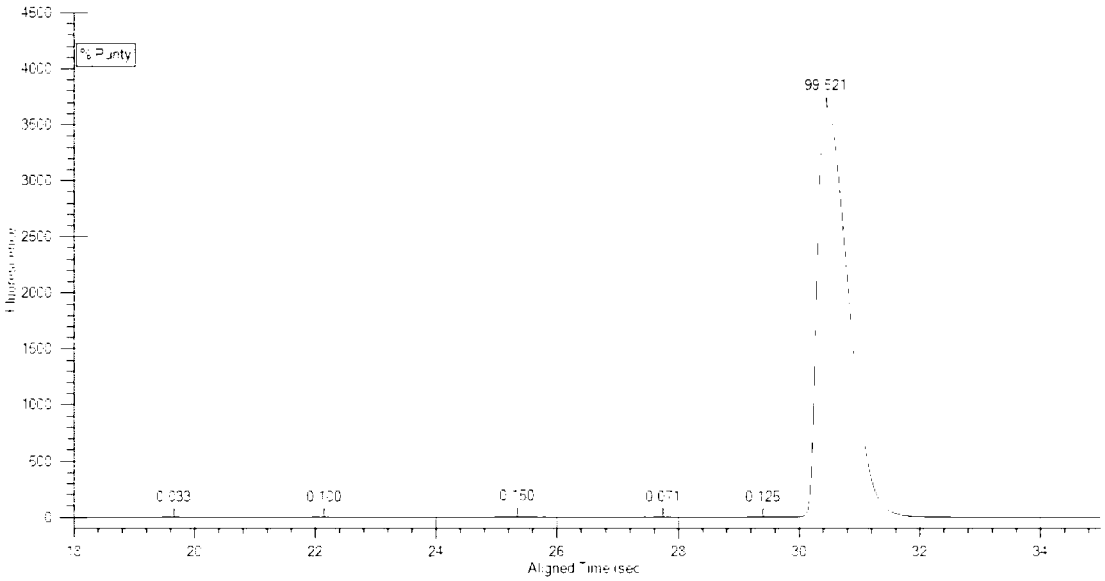

图 9H V173C/S162C 二硫键重塑抗体

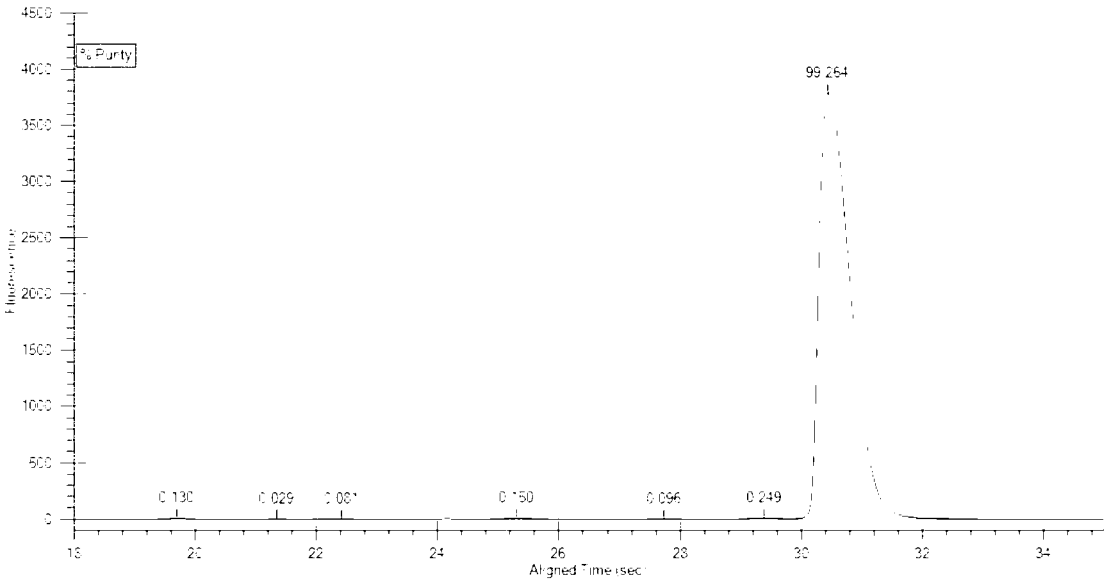

图 9I V173C/Q160C 二硫键重塑抗体

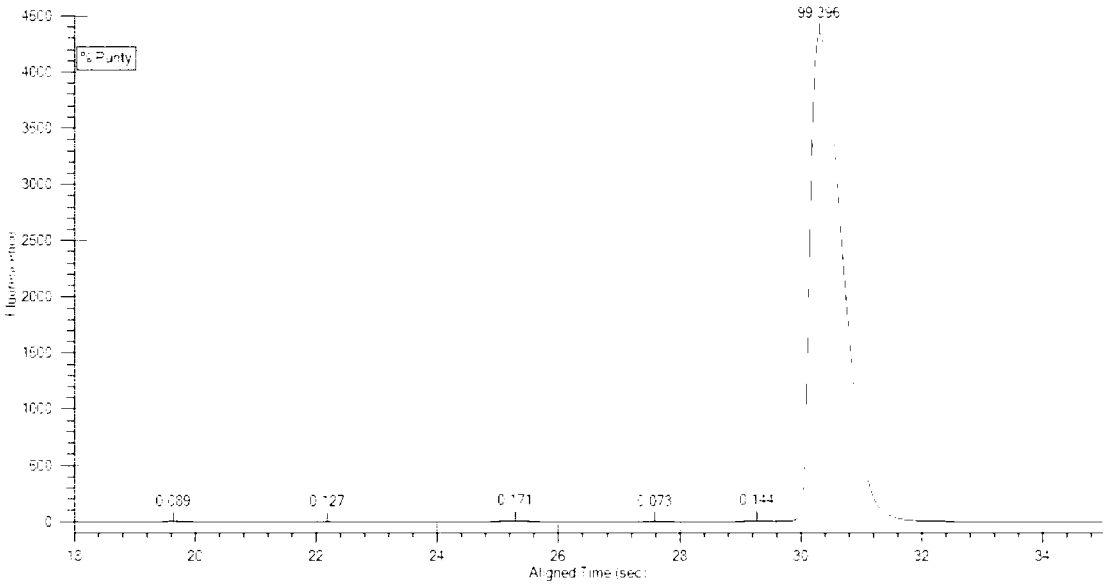

图 9J S134C/F116C 二硫键重塑抗体

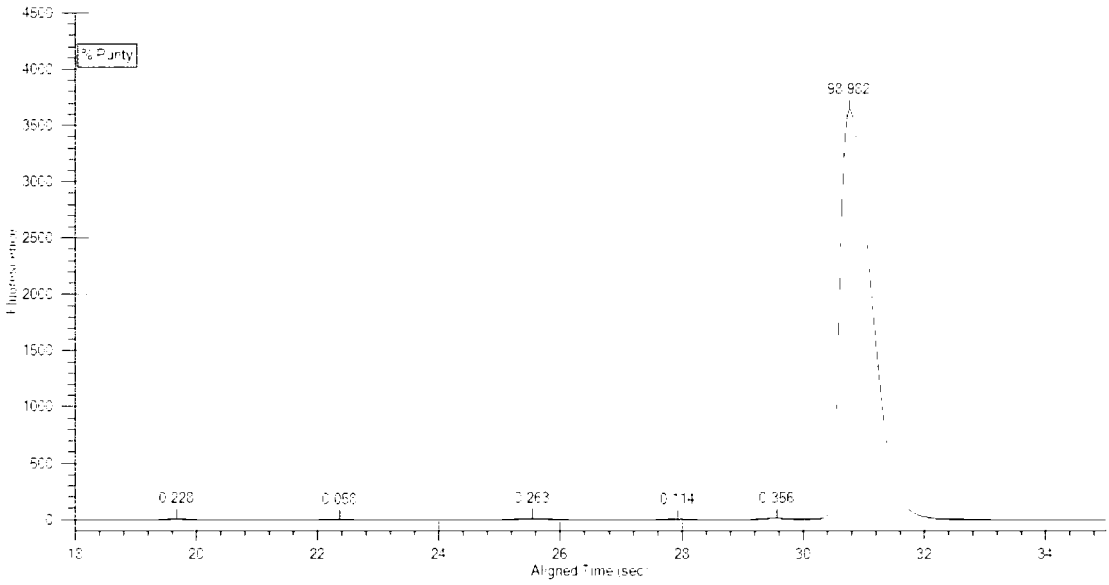

图 9K S136C/S114C 二硫键重塑抗体

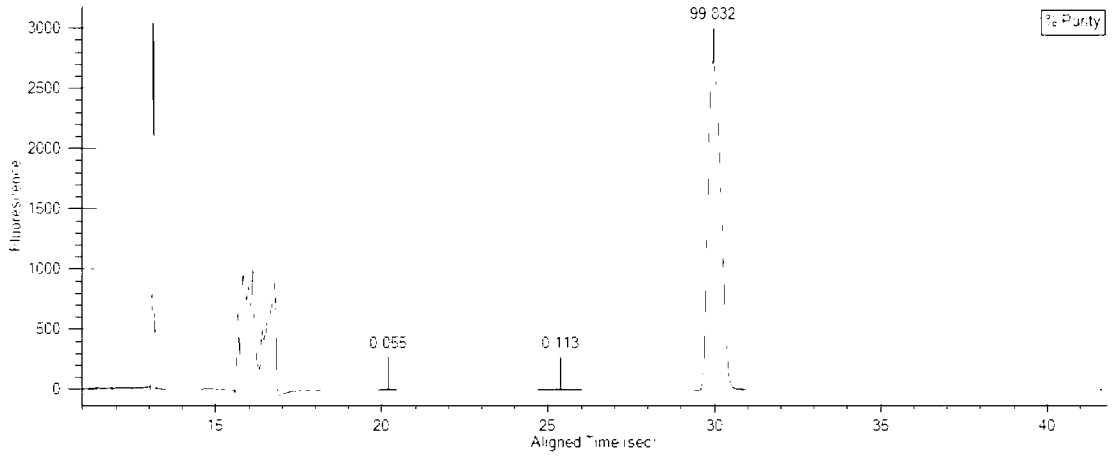

图 9L P171/S162 二硫键重塑抗体

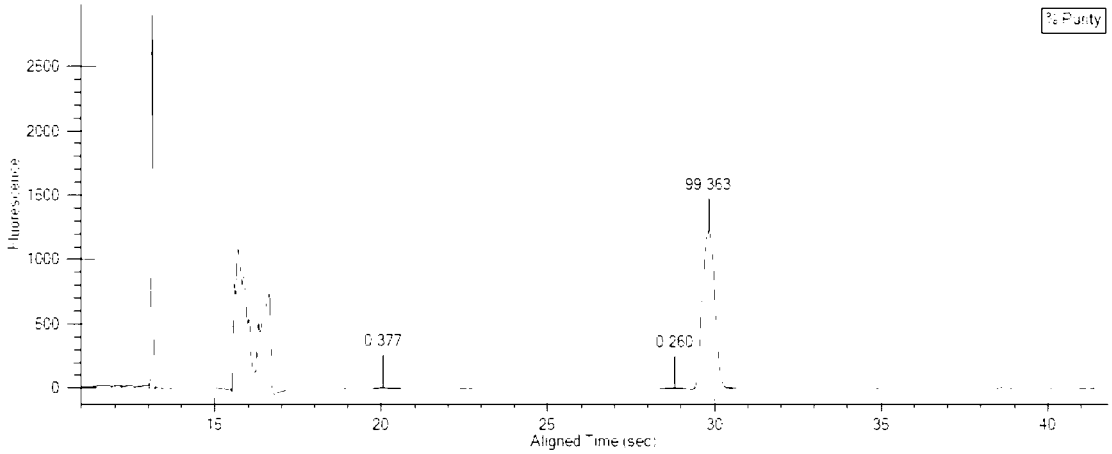

图 9M T139/F116 二硫键重塑抗体

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/108651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; A61K9/00(2006.01)i; A61K39/44(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C07K16; A61K9; A61K39; C12N5; C12N1; C12N15; A61P35

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, ENTXTC, ENTXT, OETXT, VEN, CJFD, PubMed, ISI web of knowledge, GenBank, EMBL, STN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 抗体, 免疫球蛋白, 取代, 突变, 二硫键, 电荷, 修饰, 重链, 轻链, 可变区, antibody, modification, disulfide bond, mutant, CH1, CL, VH, VL, Q39+, Q38+, C220+, C214+, L45+, Y91+, A43+, Y87+, P44+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021126538 A1 (PHANES THERAPEUTICS, INC.) 24 June 2021 (2021-06-24) embodiment 1, and claims 1-17	1-74
Y	US 2014348839 A1 (MEDIMMUNE, LLC) 27 November 2014 (2014-11-27) embodiments 1-3, and claims 1-75	1-74
Y	WO 2019196522 A1 (EXCELMAB INC.) 17 October 2019 (2019-10-17) embodiment 1, and claims 1-55	1-74
Y	CN 113795508 A (SANOFI SA) 14 December 2021 (2021-12-14) embodiments 3-4, and claims 1-30	1-74
A	CN 114174344 A (AMGEN INC.) 11 March 2022 (2022-03-11) claims 1-15	1-74

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 October 2023	**21 October 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/108651

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.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/108651

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021126538	A1	24 June 2021	JP	2023511652	A	22 March 2023
				US	2022411497	A1	29 December 2022
				CA	3160436	A1	24 June 2021
				MX	2022007513	A	05 July 2022
				KR	20220113991	A	17 August 2022
				BR	112022010361	A2	16 August 2022
				IL	293868	A	01 August 2022
				EP	4077377	A1	26 October 2022
				AU	2020404817	A1	02 June 2022
				CN	114929739	A	19 August 2022
				IN	202247039045	A	15 July 2022
US	2014348839	A1	27 November 2014	HUE	049457	T2	28 September 2020
				JP	2015502409	A	22 January 2015
				JP	6541974	B2	10 July 2019
				ES	2816078	T3	31 March 2021
				AU	2012355415	A1	17 July 2014
				AU	2012355415	B2	06 July 2017
				PT	2794905	T	30 June 2020
				SI	2794905	T1	31 August 2020
				DK	2794905	T3	06 July 2020
				PL	2794905	T3	02 November 2020
				RS	60499	B1	31 August 2020
				CA	2859667	A1	27 June 2013
				CA	2859667	C	24 May 2022
				US	9527927	B2	27 December 2016
				HK	1203560	A1	30 October 2015
				WO	2013096291	A2	27 June 2013
				LT	2794905	T	10 July 2020
				EP	2794905	A2	29 October 2014
				EP	2794905	B1	01 April 2020
				HRP	20201004	T1	16 October 2020
WO	2019196522	A1	17 October 2019	CN	110357960	A	22 October 2019
CN	113795508	A	14 December 2021	US	2020262926	A1	20 August 2020
				KR	20210108421	A	02 September 2021
				EP	3902823	A1	03 November 2021
				SG	11202106525	TA	29 July 2021
				JP	2022515424	A	18 February 2022
				BR	112021012338	A2	14 September 2021
				IL	284140	A	31 August 2021
				MX	2021007672	A	30 September 2021
				CO	2021008995	A2	30 July 2021
				CA	3124796	A1	02 July 2020
				WO	2020136566	A1	02 July 2020
				TW	202104257	A	01 February 2021
				AU	2019412561	A1	12 August 2021
				AU	2019412561	A2	02 September 2021
				IN	202117032668	A	29 October 2021
CN	114174344	A	11 March 2022	KR	20220016139	A	08 February 2022
				MX	2021014534	A	11 February 2022
				SG	11202112926	YA	30 December 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/108651

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		TW	202110877	A	16 March 2021
		US	2022235148	A1	28 July 2022
		EP	3976643	A2	06 April 2022
		CA	3141690	A1	03 December 2020
		EA	202193322	A1	10 March 2022
		WO	2020243477	A2	03 December 2020
		JP	2022534901	A	04 August 2022
		AU	2020283890	A1	16 December 2021

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/108651

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/108651

A. 主题的分类

C07K16/18(2006.01)i；C07K16/28(2006.01)i；A61K9/00(2006.01)i；A61K39/44(2006.01)i；C12N5/10(2006.01)i；C12N1/21(2006.01)i；C12N15/13(2006.01)i；A61K39/395(2006.01)i；A61P35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C07K16; A61K9; A61K39; C12N5; C12N1; C12N15; A61P35

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNTXT,ENTXTC,ENTXT,OETXT,VEN,CJFD,PubMed,ISI web of knowledge,GenBank， EMBL,STN,CNKI,万方,百度,百度学术,中国专利生物序列检索系统:抗体,免疫球蛋白,取代,突变,二硫键，电荷，修饰，重链，轻链，可变区，antibody,modification，disulfide bond，mutant，CH1，CL，VH，VL，Q39+,Q38+,C220+,C214+,L45+,Y91+,A43+,Y87+,P44+

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
X	WO 2021126538 A1 (PHANES THERAPEUTICS INC) 2021年6月24日 (2021 - 06 - 24) 实施例1,权利要求1-17	1-74
Y	US 2014348839 A1 (MEDIMMUNE LLC) 2014年11月27日 (2014 - 11 - 27) 实施例1-3，权利要求1-75	1-74
Y	WO 2019196522 A1 (EXCELMAB INC) 2019年10月17日 (2019 - 10 - 17) 实施例1，权利要求1-55	1-74
Y	CN 113795508 A (赛诺菲) 2021年12月14日 (2021 - 12 - 14) 实施例3-4，权利要求1-30	1-74
A	CN 114174344 A (美国安进公司) 2022年3月11日 (2022 - 03 - 11) 权利要求1-15	1-74

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年10月18日	2023年10月21日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	段珊 电话号码 (+86) 020-28950756

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/108651

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)
WO	2021126538	A1	2021年6月24日	JP	2023511652	A	2023年3月22日
				US	2022411497	A1	2022年12月29日
				CA	3160436	A1	2021年6月24日
				MX	2022007513	A	2022年7月5日
				KR	20220113991	A	2022年8月17日
				BR	112022010361	A2	2022年8月16日
				IL	293868	A	2022年8月1日
				EP	4077377	A1	2022年10月26日
				AU	2020404817	A1	2022年6月2日
				CN	114929739	A	2022年8月19日
				IN	202247039045	A	2022年7月15日
US	2014348839	A1	2014年11月27日	HUE	049457	T2	2020年9月28日
				JP	2015502409	A	2015年1月22日
				JP	6541974	B2	2019年7月10日
				ES	2816078	T3	2021年3月31日
				AU	2012355415	A1	2014年7月17日
				AU	2012355415	B2	2017年7月6日
				PT	2794905	T	2020年6月30日
				SI	2794905	T1	2020年8月31日
				DK	2794905	T3	2020年7月6日
				PL	2794905	T3	2020年11月2日
				RS	60499	B1	2020年8月31日
				CA	2859667	A1	2013年6月27日
				CA	2859667	C	2022年5月24日
				US	9527927	B2	2016年12月27日
				HK	1203560	A1	2015年10月30日
				WO	2013096291	A2	2013年6月27日
				LT	2794905	T	2020年7月10日
				EP	2794905	A2	2014年10月29日
				EP	2794905	B1	2020年4月1日
				HRP	20201004	T1	2020年10月16日
WO	2019196522	A1	2019年10月17日	CN	110357960	A	2019年10月22日
CN	113795508	A	2021年12月14日	US	2020262926	A1	2020年8月20日
				KR	20210108421	A	2021年9月2日
				EP	3902823	A1	2021年11月3日
				SG	11202106525	TA	2021年7月29日
				JP	2022515424	A	2022年2月18日
				BR	112021012338	A2	2021年9月14日
				IL	284140	A	2021年8月31日
				MX	2021007672	A	2021年9月30日
				CO	2021008995	A2	2021年7月30日
				CA	3124796	A1	2020年7月2日
				WO	2020136566	A1	2020年7月2日
				TW	202104257	A	2021年2月1日
				AU	2019412561	A1	2021年8月12日
				AU	2019412561	A2	2021年9月2日
				IN	202117032668	A	2021年10月29日
CN	114174344	A	2022年3月11日	KR	20220016139	A	2022年2月8日
				MX	2021014534	A	2022年2月11日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/108651

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)
		SG	11202112926	YA	2021年12月30日
		TW	202110877	A	2021年3月16日
		US	2022235148	A1	2022年7月28日
		EP	3976643	A2	2022年4月6日
		CA	3141690	A1	2020年12月3日
		EA	202193322	A1	2022年3月10日
		WO	2020243477	A2	2020年12月3日
		JP	2022534901	A	2022年8月4日
		AU	2020283890	A1	2021年12月16日