

(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
2021 年 7 月 15 日 (15.07.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/139758 A1

(51) 国际专利分类号:

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

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/070832

(22) 国际申请日: 2021 年 1 月 8 日 (08.01.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010020878.7 2020年1月9日 (09.01.2020) CN

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

(72) 发明人: 应华 (YING, Hua); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。胡齐悦 (HU, Qiyue); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。张玲 (ZHANG, Ling); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。毛浪勇 (MAO, Langyong); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。石金平 (SHI, Jinping); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。黎婷婷 (LI, Tingting); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。赖炜明 (LAI, Weiming); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。覃千山 (QIN, Qianshan); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。金薪盛 (JIN, Xincheng); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区

(54) Title: NEW POLYPEPTIDE COMPLEX

(54) 发明名称: 新型多肽复合物

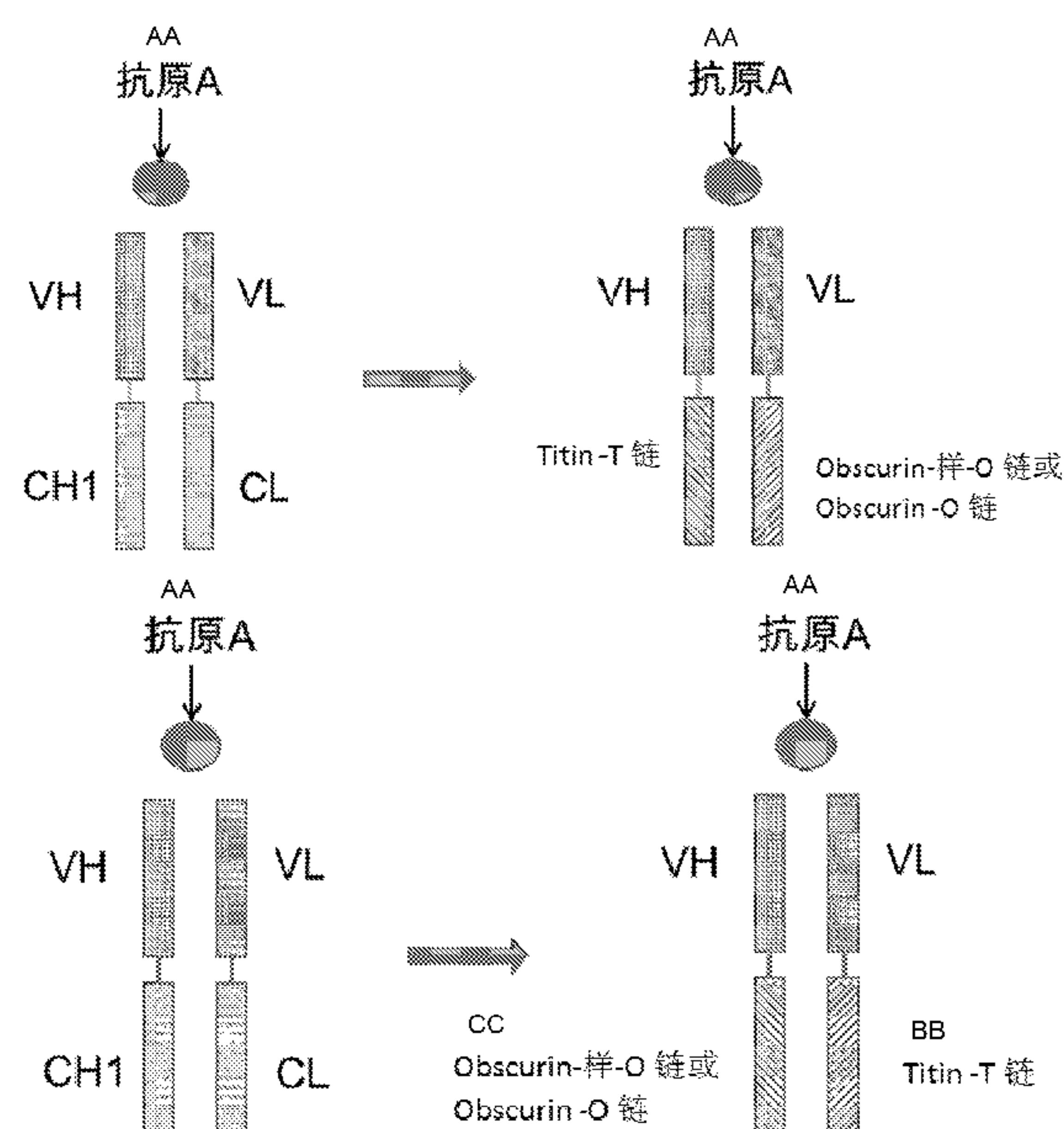


图 2

AA Antigen A
BB Titin-T chain
CC Obscurin-like-O chain or Obscurin-O chain

(57) Abstract: The present disclosure relates to a new polypeptide complex. Specifically, the present disclosure relates to a domain-engineered antibody. At least one of the constant region domains CH1 and/or CL of the antibody is replaced, and the domain CH1/CL is replaced by a Titin T chain/Ob-scurin-O chain or by a Titin T chain/Ob-scurin-like-O chain.

(57) 摘要: 本披露涉及新型多肽复合物。具体地, 本披露涉及一种结构域改造的抗体, 所述抗体的至少一个恒定区结构域CH1和/或CL被替代, 所述结构域CH1/CL被Titin T链/Ob-scurin-O链或被Titin T链/Ob-scurin-样-O链替代。

东长安街1号东方广场东三办公楼19层
程伟, Beijing 100738 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

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

新型多肽复合物

本申请要求 2020 年 01 月 09 日提交的中国专利申请的优先权（申请号 CN202010020878.7）。

5

技术领域

本披露涉及抗体药物领域。具体地包括 CH1 和 CL 结构被替代的新型抗体及其应用。

10 背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

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

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

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

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

35 发明内容

然而，在制备双特异性抗体过程中，不同的多肽链随机组合会产生多种不同

的产物，而仅有一种产物是所需的，这些副产物包括缺失一条轻链的抗体、半抗体、重链聚合物、轻链和重链错配等等，这给下游工艺开发提出了很大的挑战。为此，本披露提供了一种新的结构域改造的多肽复合物。

5 在一些实施方案中，本披露提供一种多肽复合物，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包括：

A) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的第一重链可变结构域 (VH1)，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含 Titin-T 链，和

10 第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的第一轻链可变结构域 (VL1)，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含能够与 Titin-T 链相互作用的结构域；

或

15 B) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VH1，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含能够与 Titin-T 链相互作用的结构域，和

第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VL1，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含 Titin-T 链；

或

20 C) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VH1，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链，和

第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VL1，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域；

25 或

D) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VH1，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域，和

30 第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VL1，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链；

其中，所述第一抗原结合部分与第一抗原特异性结合，所述第一结构域与第二结构域能够形成二聚体。

35 在一些实施方案中，前述的多肽复合物，所述能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域是 Titin-T 链，所述能够与 Titin-T 链相互作用的结构域是 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链。

在一些实施方案中，前述的多肽复合物，所述第一抗原结合部分的 VH1 和 VL1

形成与第一抗原特异性结合的第一抗原结合位点。

在一些实施方案中，所述 VH1 的 C 端与第一结构域的 N 端可操作地连接。

在一些实施方案中，所述 VL1 的 C 端与第二结构域的 N 端可操作地连接。

5 在一些实施方案中，前述的多肽复合物，所述第一结构域与第二结构域通过天然链间键和/或非天然链间键形成二聚体。

10 在一些实施方案中，所述第一结构域与第二结构域通过天然链间键形成二聚体；在一些实施方案中，所述 Titin-T 链上选自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的选自第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合，或者所述 Titin-T 链上的选自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的选自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合；所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

15 在一些实施方案中，前述任一项所述的多肽复合物，所述第一结构域与第二结构域通过至少一个非天然链间键形成二聚体。

在一些实施方案中，所述非天然链间键在第一结构域中的特定突变残基和第二结构域中的特定突变残基之间形成。在一些实施方案中，第一结构域中的特定突变残基和第二结构域中的特定突变残基中的至少一个是半胱氨酸残基。

20 在一些实施方案中，所述非天然链间键为二硫键；在一些实施方案中，其中所述二聚体包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个非天然链间键。

在一些实施方案中，前述的多肽复合物，所述第一结构域中的特定突变残基和第二结构域中的特定突变残基位于第一结构域与第二结构域的接触界面。

25 在一些实施方案中，前述第一结构域中的特定突变残基和第二结构域中的特定突变残基具有选自以下突变，所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变；或者 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

30 在一些具体的实施方案中，前述第一突变残基和第二突变残基具有选自以下突变：Titin-T 链具有选自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 3C、9C、25S、76S 和 88C 中的一个或多个氨基酸残基突变；或者所述 Titin-T 链具有选自 8C、20C、22C、25S、26C

和 39T 中的一个或多个氨基酸残基突变, 和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一个或多个氨基酸残基突变。在一些实施方式中, Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 88C 突变;

Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 3C 突变;

5 Titin-T 链具有 25S、39T 和 26C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 9C 突变;

Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 88C 突变;

Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 3C 突变;

10 Titin-T 链具有 25S、39T 和 26C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 9C 突变;

Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变, 且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 74C 突变;

Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变, 且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 84C 突变;

15 Titin-T 链具有 25S、39T 和 22C 突变, 且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 86C 突变;

Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变, 且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 74C 突变;

20 Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变, 且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 84C 突变; 或者

Titin-T 链具有 25S、39T 和 22C 突变, 且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 86C 突变;

Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点;

Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点;

25 Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些具体的实施方案中, 前述第一突变残基和第二突变残基具有选自以下突变: 所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变; 或者所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变, 和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点; Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点; Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

35 在一些实施方案中, 前述第一结构域中的特定突变残基和第二结构域中的特定突变残基具有选自以下突变: Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, Obscurin-O

链具有 A88C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-O 链具有 A3C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，Obscurin-O 链具有 R9C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A88C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A3C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 R9C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 V74C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 G84C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 A86C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号对应的位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号对应的位点；Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号对应的位点。

在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域为选自以下 Titin-T 链/Obscurin-O 链，或者 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链：所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽；或者所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽，和/或所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽。

在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域为选自以下：Titin-T 链/Obscurin-O 链，或者 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链。所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变；或者所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域为选自以下：Titin-T 链/Obseurin-O 链，或者 Titin-T 链/Obseurin-样-O 链。所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obseurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 A88C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，所述 Obseurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 A3C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，所述 Obseurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 R9C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，所述 Obseurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 C25S、C76S 和 A88C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，所述 Obseurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 C25S、C76S 和 A3C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，所述 Obseurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 C25S、C76S 和 R9C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，所述 Obseurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E 和 V74C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，所述 Obseurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E 和 G84C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，所述 Obseurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E 和 A86C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，所述 Obseurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，所述 Obseurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，所述 Obseurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号对应的位点；Obseurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号对应的位点；Obseurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号对应的位点。

在一些实施方案中，前述多肽复合物，所述 Obseurin-O 链具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变。在一些实施方案中，所述 Obseurin-O 链具有选自 7R 或 7K、62K 或 62H、和 11L 的一个或多个氨基酸残基突变；最优选地，所述 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obseurin-O 链具有 25S、76S、88C、7K 和 62K 突变；Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obseurin-O 链具有 25S、76S、88C、7K 和 62H 突变；Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obseurin-O 链具有 25S、76S、88C、11L 和 62K 突变；或者 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突

变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、11L 和 62H； Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点； Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

5 在一些实施方案中，所述 Obscurin-O 链具有选自 L7K 或 L7R、K11L、T62K 或 T62H 的一个或多个氨基酸残基突变；在一些实施方案中，Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变； Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突变； Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变； Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号对应的位点； Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号对应的位点。

15 在一些实施方案中，前述多肽复合物，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变的 Obscurin-O 链；在一些实施方案中，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有选自 L7K 或 L7R、K11L 和 T62K 或 T62H 的一个或多个氨基酸残基突变；在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变； Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突变； Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变； Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H 突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号对应的位点； Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号对应的位点。

30 在一些实施方案中，前述多肽复合物，所述第一结构域和第二结构域具有选自以下一个或多个氨基酸残基突变： Titin-T 链具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点； Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

35 在一些实施方案中，前述多肽复合物，所述第一结构域和第二结构域为选自

以下的 Titin-T 链/Obscurin-O 链：所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO：35 基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变的多肽，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO：50 基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变的多肽。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO：35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO：50 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域具有选自以下一个或多个残基突变：Titin-T 链具有选自 3W、11I、13L、22M、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S 或 66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链具有选自 2E、11K、12S、13Y、14T、17E、20L、22M 或 22S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E、67Q 或 67T、69S、89L、92E、94G 和 97G 中的一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有 66S 和 77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 11K、12S、13Y、14T 和 22S 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 66K、70R、79T 和 81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 2E、17E、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S 和 97G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 3W、11I、13L、22M 和 82M 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 20L、22M 和 53L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 11I、66K、79T 和 81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 41K、45T、67Q、69S 和 89L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 47E、49G、56S、58E 和 75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 56S、58E 和 75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；或者所述 Titin-T 链具有 56S、58E、66S 和 77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 12S、13Y、22S、42L、45T、67Q、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO：35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO：50 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域具有选自以下一个或多个残基突变：Titin-T 链具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、

Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

5 在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域为选自以下的 Titin-T 链/Obscurin-O 链：所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有选自 G2E、
10 L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

15 在一些实施方案中，前述 Titin-T 链具有 M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M
20 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 D20L、T22M 和 A53L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸
25 突变；所述 Titin-T 链具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；或者所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有
30 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变。所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述第一结构域和第二结构域为选自以下 Titin-T 链/Obscurin-O 链：所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 M66S 和 T77S
35 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序

列基础上具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 D20L、T22M 和 A53L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；或者所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述的多肽复合物，所述 VH1 通过第一连接域与第一结构域可操作地连接，VL1 通过第二连接域与第二结构域可操作地连接。

在一些实施方案中，前述第一和/或第二连接域选自：Titin-T 链的 N 末端片段，Obscurin-O 链的 N 末端片段或 Obscurin-样-O 链的 N 末端片段，和 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数（示例是 1、2、3、4、5），Y 选自 1-6 的整数（示例是 1、2、3、4、5、6）。

在一些实施方案中，前述第一和/或第二连接域选自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

在一些实施方案中，前述的多肽复合物，当所述第一结构域为 Titin-T 链时，所述第一连接域为 KAGIR 多肽；当所述第二结构域为 Obscurin-O 链时，所述第二连接域为 DQPQF 多肽。在另一些实施方案中，所述第二结构域为 Titin-T 链时，所述第二连接域为 KAGIR 多肽，所述第一结构域为 Obscurin-O 链时，所述第一连接域为 DQPQF 多肽。

在一些多肽复合物的实施方案中，其中：

(A) 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基

基础上还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、
5 N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；和/或

(B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、
10 22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、
15 Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变的序列；
20 优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；

上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些多肽复合物的实施方案中,其中:(A)所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突
25 变,优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变,所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点;更优选地,所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84
30 位中的一个或多个氨基酸突变,优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变;所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点,和/或

(B)所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、
35 76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变,优选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变,所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID

NO: 33 的自然顺序编号位点；优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；更优选地，

5 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G

10 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；或者

所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-样-O 链突变

15 位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些多肽复合物的实施方案中，其中：所述 Titin-T 链包含序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-O 链包含序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%

20 同一性的多肽；或者所述 Titin-T 链包含序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-样-O 链包含序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性多肽。其中所述具有至少 80%同一性：例如是具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、

25 89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性。

在一些实施方案中，前述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示多肽，Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示多肽。

在另一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示多肽，Obscurin-O

30 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示多肽。

在另一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 84 所示多肽。

在另一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽。

35 在另一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽。

在另一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示多肽，Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽。

在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为如 SEQ ID NO: 68 所示多肽，Obscurin-O 链为如 SEQ ID NO: 80 所示多肽；Titin-T 链为如 SEQ ID NO: 73 所示多肽，
5 Obscurin-O 链为如 SEQ ID NO: 83 所示多肽；Titin-T 链为如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，Obscurin-O 链为如 SEQ ID NO: 84 所示多肽；Titin-T 链为如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，Obscurin-O 链为如 SEQ ID NO: 86 所示多肽；Titin-T 链为如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，Obscurin-O 链为如 SEQ ID NO: 86 所示多肽；或者 Titin-T 链为如 SEQ ID NO: 75 所示多肽，Obscurin-O 链为如 SEQ ID NO: 86 所示多肽。

10 在一些实施方案中，前述的多肽复合物，其中第一抗原选自：外源抗原、内源抗原、自身抗原、新抗原、病毒抗原和肿瘤抗原。

在一些实施方案中，公开了一种多特异性多肽复合物，包括：

第一多肽复合物，其为前面任一项所述的多肽复合物，其与第一抗原特异性结合，和

15 第二多肽复合物，其包含第二抗原结合部分，其与第二抗原特异性结合。

在一些实施方案中，所述第一多肽复合物和第二多肽复合物结合两种不同的抗原。

在一些实施方案中，所述第一多肽复合物和第二多肽复合物结合同一种抗原上的两种不同表位。

20 在一些实施方案中，所述多特异性多肽复合物为多特异性多肽复合物，更优选地，所述多特异性多肽复合物为双特异性抗体。

在一些实施方案中，所述多特异性多肽复合物的第二多肽复合物包含第二重链可变结构域（VH2）和第二轻链可变结构域（VL2）。第一多肽复合物的 VH1 与第二多肽复合物的 VL2，和/或第二多肽复合物的 VH2 与第一多肽复合物的 VL1
25 之间不容易发生错配。在一些实施方案中，所述第二抗原结合部分的 VH2 和 VL2 形成与第二抗原特异性结合的第二抗原结合位点。

在一些实施方案中，前述的多特异性多肽复合物，所述第二多肽复合物的第二抗原结合部分包含：

第三多肽，其包含从 N 末端到 C 末端的 VH2，其可操作地连接至第三结构域，
30 所述第三结构域包含 CH1，和

第四多肽，其包含从 N 末端到 C 末端的 VL2，其可操作地连接至第四结构域，所述第四结构域包含 CL。

在一些实施方案中，所述 VH2 的 C 端与 CH1 的 N 端结合，所述 VL2 的 C 端与 CL 的 N 端结合。

35 在一些实施方案中，前述的多特异性多肽复合物，所述第一多肽复合物还包含可操作地连接的第一二聚化结构域，所述第二多肽复合物还包含可操作地连接

的第二二聚化结构域，所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域相结合。

在一些实施方案中，所述第一多肽复合物的第一结构域的 C 端与第一二聚化结构域的 N 端可操作地连接，所述第二多肽复合物的第三结构域的 C 端与第二二聚化结构域的 N 端可操作地连接。

5 在一些实施方案中，前述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域通过抗体铰链区或其部分、连接子、二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用或其组合的结合方式结合形成二聚体。

10 在一些实施方案中，前述所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域通过抗体铰链区或其部分结合形成二聚体，优选 IgG1、IgG2 或 IgG4 的铰链区或其部分结合形成二聚体。在一些实施方案中，优选 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的铰链区或其部分结合形成二聚体。

在一些实施方案中，前述的多特异性多肽复合物，所述第一二聚化结构域和/或第二二聚化结构域还包含抗体 CH2 结构域和/或抗体 CH3 结构域。

15 在一些实施方案中，前述多特异性多肽复合物，抗体 CH2 结构域和/或抗体 CH3 结构域源自 IgG1、IgG2 或 IgG4。在一些实施方案中，所述抗体 CH2 结构域和/或抗体 CH3 结构域源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

20 在一些实施方案中，前述多特异性多肽复合物，所述第一多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L1-T 链-L2-CH2-CH3，所述第二多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L3-O 链或 VL1-L4-OL 链，所述第三多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-CH2-CH3，所述第四多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-CL；或者，所述第一多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L2-O 链-L3-CH2-CH3，或 VH1-L4-OL 链-L5-CH2-CH3；所述第二多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L1-T 链，所述第三多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-CH2-CH3，所述第四多肽从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；所述 L1-L5 为间隔区（也称连接域），
25 间隔区可存在或不存在。优选的，所述间隔区选自：Titin-T 链的 N 末端片段，或 Obscurin-O 链的 N 末端片段，或 Obscurin-样-O 链的 N 末端片段、或连接子（例如 $(G_xS)_y$ 连接子），其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数。最优选地，所述间隔区选自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

30 在一些实施方案中，前述的多特异性多肽复合物，所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域不相同，并且以阻止同源二聚化和/或有利于异二聚化的方式结合。

在一些实施方案中，前述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域通过 knob-into-hole、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用或增加的柔韧性的方式结合形成二聚体。

35 在一些实施方案中，前述第一二聚化结构域具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基，所述第二二聚化结构域具有如 SEQ ID NO: 3 所示

的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基；或者所述第一二聚化结构域具有如 SEQ ID NO: 3 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基，所述第二二聚化结构域具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基。

5 在一些实施方案中，本披露提供一种结构域改造抗体，其至少一个恒定区结构域 CH1 和至少一个恒定区结构域 CL 被替代，其中：

所述结构域 CH1 被 Titin-T 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；

所述结构域 CL 被 Titin-T 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；

10 所述结构域 CH1 被 Obscurin-O 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；

所述结构域 CL 被 Obscurin-O 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；

15 所述结构域 CH1 被 Obscurin-样-O 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

所述结构域 CL 被 Obscurin-样-O 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代。

20 在一些实施方案中，前述结构域改造抗体，所述能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域是 Titin-T 链，所述能够与 Titin-T 链相互作用的结构域是 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链；

25 在一些实施方案中，所述抗体包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1，所述 VH1 和 VL1 形成与其抗原特异性结合的原结合位点；所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

在一些实施方案中，本披露提供一种结构域改造抗体的 Fab 片段，其中恒定区结构域 CH1 和恒定区结构域 CL 被替代，其中，

所述结构域 CH1 被 Titin-T 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

30 所述结构域 CL 被 Titin-T 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

所述结构域 CH1 被 Obscurin-O 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

35 所述结构域 CL 被 Obscurin-O 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

所述结构域 CH1 被 Obscurin-样-O 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Obscurin-

样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

所述结构域 CL 被 Obscurin-样-O 链替代,所述结构域 CH1 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代。

5 在一些实施方案中, 前述 Fab 片段, 所述与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链; 所述与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Titin-T 链。

10 在一些实施方案中, 所述 Fab 包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1, 所述 VH1 和 VL1 形成与其抗原特异性结合的原结合位点; 所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接, 所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接, 或者所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接, 所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

在一些实施方案中, 本披露提供一种包含前述 Fab 片段的结构域改造抗体。

15 在一些实施方案中, 本披露提供一种双特异性抗体, 其包含特异性结合第一抗原的第一重链和第一轻链, 还包含特异性结合第二抗原的第二重链和第二轻链, 其中,

所述第一重链的 CH1 结构域被 Titin-T 链替代, 第一轻链的 CL 结构域被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代; 或者

所述第一轻链的 CL 结构域被 Titin-T 链替代, 所述第一重链的 CH1 结构域被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代; 或者

20 所述第一重链的结构域 CH1 被 Obscurin-O 链替代, 所述第一轻链的结构域 CL 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代; 或者

所述第一轻链的结构域 CL 被 Obscurin-O 链替代, 所述第一重链的结构域 CH1 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代; 或者

25 所述第一重链的结构域 CH1 被 Obscurin-样-O 链替代, 所述第一轻链的结构域 CL 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代; 或者

所述第一轻链的结构域 CL 被 Obscurin-样-O 链替代, 所述第一重链的结构域 CH1 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代。

所述双特异性抗体结合的第一抗原和第二抗原不相同, 或是同一种抗原上的两种不同表位。

30 在具体的实施方案中, 第一重链和第二轻链之间, 第一轻链与第二重链之间不容易发生错配。

在一些实施方案中, 前述双特异性抗体, 其中所述与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链; 所述与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Titin-T 链。

35 在一些实施方案中, 其中所述第一重链包含第一重链可变区 (VH1), 所述第一轻链包含第一轻链可变区 (VL1), 所述 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性

结合的抗原结合位点，且所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

5 在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，其中所述第二重链包含从 N 末端到 C 末端的第二重链可变区（VH2），其可操作地连接至 CH1；所述第二轻链包含从 N 末端到 C 末端的第二轻链可变区（VL2），其可操作地连接至 CL。

10 在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，所述 VH2 和 VL2 形成与第二抗原特异性结合的抗原结合位点，所述 VH2 的 C 端与 CH1 的 N 端可操作地连接；所述 VL2 的 C 端与 CL 的 N 端可操作地连接。

15 在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体结构模型选自 F(ab)₂、scFv-Fab、(scFv)₂-Fab、KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、FcΔAdp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2:1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP- DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)₂- CrossMAb、IgG-(scFv)₂、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、(scFv)₄-Fc、CODV-Ig、mAb2、F(ab)₄- CrossMAb、IgG 和 Fab-IgG 等。

在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，所述第一重链和第二重链的 C 末端包含 CH2 和/或 CH3 结构域。

20 在一些实施方案中，前述 CH1、CH2 和 CH3 结构域源自 IgG1，IgG2 或 IgG4。在一些实施方案中，前述 CH1、CH2 和 CH3 结构域源自 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4。在一些实施方案中，前述第一重链和第二重链通过抗体铰链区或其部分、连接子、二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用或其组合的结合方式结合形成二聚体。

25 在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1- L1-T 链-L2-CH2-CH3，所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L3-O 链或 VL1-L4-OL 链，所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-CH2-CH3，所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；或者

30 所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L1-T 链，所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L2-O 链-L3-CH2-CH3，或 VH1-L4-OL 链-L5-CH2-CH3；所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-CH2-CH3，所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；

35 其中，所述 L1-L5 为间隔区，间隔区可存在或不存在，优选的，所述间隔区为 Titin-T 链的 N 末端片段，或 Obscurin-O 链 N 末端片段，或 Obscurin-样-O 链的 N 末端片段，或连接子，例如 (G_xS)_y 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数；优选地，所述间隔区选自：“KAGIR”，“DQPQF”，(G₄S)₁ 和 (G₄S)

2。

在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，所述第一重链的 CH2 和 CH3 与第二重链的 CH2 和 CH3 不相同，并且以阻止同源二聚化和/或有利于异二聚化的方式结合。

5 在一些实施方案中，前述第一重链和第二重链通过 knob-into-hole、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用或增加的柔韧性的方式结合形成二聚体。

10 在一些实施方案中，前述第一重链和第二重链通过 knob-into-hole 方式结合形成二聚体。在一些实施方案中，前述第一重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基，所述第二重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 3 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基；或者所述第一重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 3 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基，所述第二重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的第 104 至 330 位氨基酸残基。

15 在一些实施方案中，前述的双特异性抗体，所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L1-T 链-L2-knob-Fc，所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L3-O 链或 VL1-L4-OL 链，所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-hole-Fc，所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-CL；或者所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L1-T 链-L2-hole-Fc，所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L3-O 链或 VL1-L4-OL 链，所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-knob-Fc，所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；或者

25 所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L1-T 链，所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L2-O 链-L3-knob-Fc，或 VH1-L4-OL 链-L5-knob-Fc；所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-hole-Fc，所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L1-T 链，所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L2-O 链-L3-hole-Fc，或 VH1-L4-OL 链-L5-hole-Fc；所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-knob-Fc，所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；

30 所述 L1-L5 为间隔区，间隔区可存在或不存在，优选的，所述间隔区为 Titin-T 链的 N 末端片段，或 Obscurin-O 链 N 末端片段，或 Obscurin-样-O 链的 N 末端片段，或连接子，例如 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数；优选地，所述间隔区选自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

35 在一些实施方案中，前面任一项所述结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段，或双特异性抗体，其中所述与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链；所述与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Titin-T 链。前面任一项所述结构域改造抗体、或结

构域改造抗体的 Fab 片段，或双特异性抗体，所述可操作地连接是两条多肽序列通过间隔区连接或两条多肽直接连接。

5 在一些实施方案中，前述的结构域改造抗体、或双特异性抗体，或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中所述 Titin-T 链与 Obscurin-O 链，或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链通过天然链间键和/或非天然链间键结合形成二聚体。

在一些实施方案中，所述第一结构域与第二结构域通过天然链间键形成二聚体，所述 Titin-T 链上选自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的选自第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合，或者

10 所述 Titin-T 链上的选自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的选自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合。所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34
15 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体，或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链通过至少一个非天然链间键形成二聚体。在一些实施方案中，所述非天然链间键为二硫键；在一些实施方案中，其中所述二聚体包含 1，2，3，4，5，6，7，8，9
20 或 10 个非天然链间键。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变；或者
25

Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变。

30 在一些实施方案中，所述 Titin-T 链/Obscurin-O 链，或者 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链为：

所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽；或者

35 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽，和/或所述 Obscurin-样-O 链为

在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变的多肽。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

- 5 所述 Titin-T 链具有选自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 3C、9C、25S、76S 和 88C 中的一个或多个氨基酸残基突变；或者

- 所述 Titin-T 链具有选自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6E、26S、74C、77S、84C 和
10 86C 中的一个或多个氨基酸残基突变；

更优选地，所述非天然链间键位于选自以下的突变位点：

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 88C 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变，且 Obscurin-O 链具有 3C 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 26C 突变，且 Obscurin-O 链具有 9C 突变；

- 15 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 88C 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 3C 突变；

- Titin-T 链具有 25S、39T 和 26C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S 和 9C
20 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 74C 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 84C 突变；

- 25 Titin-T 链具有 25S、39T 和 22C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 6E 和 86C 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 74C 突变；

 Titin-T 链具有 25S、39T 和 20C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 84C 突变；或者

- 30 Titin-T 链具有 25S、39T 和 22C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 6E、26S、77S 和 86C 突变；

 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

 Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；

 Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

- 35 在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变；或者

5 所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变；所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序位点；Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序位点。

10 在一些实施方案中，前述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变；或者所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个
15 氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

20 在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

所述 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 A88C 突变；
Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-O 链具有 A3C 突变；
Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，Obscurin-O 链具有 R9C 突变；
25 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A88C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A3C 突变；

30 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 R9C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 V74C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 G84C 突变；

35 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 A86C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变;

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变, Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变;

5 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变, Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变;

所述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序位点; Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序位点; Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序位点。

10 在一些实施方案中, 在一些实施方案中, 前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段: 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 A88C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变, 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 A3C 突变;

15 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A26C 突变, 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 R9C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 C25S、C76S 和 A88C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变, 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 C25S、C76S 和 A3C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A26C 突变, 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 33 序列基础上具有 C25S、C76S 和 R9C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E 和 V74C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变, 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E 和 G84C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 T22C 突变, 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E 和 A86C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变;

25 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 V20C 突变, 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变; 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 序列基础上具有 C25S、C39T 和 T22C 突变, 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO: 34 序列基础上具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号对应的位点; Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号

30

35

对应的位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号对应的位点。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Obscurin-O 链还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变。在一些实施方案中，所述 Obscurin-O 链具有选自 7R 或 7K、62K 或 62H、和 11L 的一个或多个氨基酸残基突变；最优选地，所述 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、7K 和 62K 突变；Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、7K 和 62H 突变；Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、11L 和 62K 突变；或者 Titin-T 链具有 25S、39T 和 8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 25S、76S、88C、11L 和 62H。在一些实施方案中，所述 Obscurin-O 链具有选自 L7K 或 L7R、K11L、T62K 或 T62H 的一个或多个氨基酸残基突变；在一些实施方案中，Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变；或者 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H。上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序位点。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变的 Obscurin-O 链；在一些实施方案中，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有选自 L7K 或 L7R、K11L 和 T62K 或 T62H 的一个或多个氨基酸残基突变；在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变；Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突变；Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变；Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 32 基础上具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 45 基础上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H 突变。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号对应的位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号对应的位点。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Titin-T 链具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、

56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中，Titin-T 链具有选自 3W、11I、13L、22M、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S 或 66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链具有选自 2E、11K、12S、13Y、14T、17E、20L、22M 或 22S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E、67Q 或 67T、69S、89L、92E、94G 和 97G 中的一个或多个氨基酸突变。更优选地，所述 Titin-T 链具有 66S 和 77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 11K、12S、13Y、14T 和 22S 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 66K、70R、79T 和 81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 2E、17E、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S 和 97G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 3W、11I、13L、22M 和 82M 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 20L、22M 和 53L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 11I、66K、79T 和 81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 41K、45T、67Q、69S 和 89L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 47E、49G、56S、58E 和 75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 56S、58E 和 75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 氨基酸突变；或者所述 Titin-T 链具有 56S、58E、66S 和 77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 12S、13Y、22S、42L、45T、67Q、69S、92E 和 94G 氨基酸突变。上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有 M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 D20L、T22M 和 A53L 氨基酸突变；所

述 Titin-T 链具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；或者所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变。上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段：所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变的多肽，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变的多肽。所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 D20L、T22M 和 A53L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和

/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；或者所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO: 35 序列基础上具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO: 50 序列基础上具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Titin-T 链、Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端通过连接域与 VH 或 VL 可操作地连接。在一些实施方案中，所述连接域选自：Titin-T 链的 N 末端片段，Obscurin-O 链 N 末端片段或 Obscurin-样-O 链的 N 末端片段，和 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数。在一些实施方案中，所述连接域选自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

在一些实施方案中，所述 Titin-T 链通过 KAGIR 多肽与 VH 或 VL 连接，和/或所述 Obscurin-O 链通过 DQPQF 多肽与 VL 或 VH 连接。

在一些实施方案中，前述的多肽复合物，其中：

(A) 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基础上还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；和/或

(B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、

A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

- 5 所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变的序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；

- 10 上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点；

优选地，其中：

- 15 (A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、20 M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

- 25 (B) 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；更优选地，30 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 35 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；或者

所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

5

在一些实施方案中，前述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Titin-T 链包含序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-O 链包含序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性的多肽；或者所述 Titin-T 链包含序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-样-O 链包含序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性多肽。其中所述具有至少 80%同一性：例如是具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性。

在一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示多肽；Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示多肽；Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 84 所示多肽；Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽；Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽；Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽。

25 在一些实施方案中，前述双特异性抗体，其为选自以下 A-G 任一项所述的双特异性抗体：

A、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 89 所示或与 SEQ ID NO: 89 具有至少 85%序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 90 所示或与 SEQ ID NO: 90 具有至少 85%序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 87 所示或与 SEQ ID NO: 87 具有至少 85%序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 88 所示或与 SEQ ID NO: 88 具有至少 85%序列同一性；

B、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 93 所示或与 SEQ ID NO: 93 具有至少 85%序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 94 所示或与 SEQ ID NO: 94 具有至少 85%序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 91 所示或与 SEQ ID NO: 91 具有至少 85%序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 92 所示或与 SEQ ID NO: 92 具有至少 85%序列同一性；

C、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 97 所示或与 SEQ ID NO: 97 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 98 所示或与 SEQ ID NO: 98 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 95 所示或与 SEQ ID NO: 95 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

D、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 99 所示或与 SEQ ID NO: 99 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 100 所示或与 SEQ ID NO: 100 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 101 所示或与 SEQ ID NO: 101 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

E、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 102 所示或与 SEQ ID NO: 102 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 100 所示或与 SEQ ID NO: 100 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 95 所示或与 SEQ ID NO: 95 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

F、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 103 所示或与 SEQ ID NO: 103 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 104 所示或与 SEQ ID NO: 104 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 95 所示或与 SEQ ID NO: 95 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

G、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 107 所示或与 SEQ ID NO: 107 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 108 所示或与 SEQ ID NO: 108 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 109 所示或与 SEQ ID NO: 109 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 110 所示或与 SEQ ID NO: 110 具有至少 85% 序列同一性；

H、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 122 所示或与 SEQ ID NO: 122 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 123 所示或与 SEQ ID NO: 123 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 116 所示或与 SEQ ID NO: 116 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 117 所示或与 SEQ ID NO: 117 具有至少 85% 序列同一性；

I、所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 118 所示或与 SEQ ID NO: 118 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 119 所示或与 SEQ ID NO: 119 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 124 所示或与 SEQ ID NO: 124 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 125 所示或与 SEQ ID NO: 125 具有至少 85% 序列同一性；

其中，前述具有至少 85% 同一性：例如是具有至少 85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

5 在一些实施方案中，本披露提供一种制备多特异性抗体的方法，所述方法包括用 Titin-T 链和 Obscurin-O 链、或者 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链替换抗体 CH1/CL。在一些制备多特异性抗体的方法的实施方案中，相较于 CH1/CL 未被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或者 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换的野生型，本披露的多特异性抗体具有减少的轻链与重链错配。

10 在一些实施方案中，本披露还提供前述制备多特异性抗体的方法制备获得的多特异性抗体。在一些实施方案中，所述多特异性抗体包含第一重链可变区（VH1）和第一轻链可变区（VL1），所述 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性结合的抗原结合位点，且所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

15 在一些实施方案中，所述制备多特异性抗体的方法，所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一条序列有至少 80%同一性的多肽；或者所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、20 65-76 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-样-O 链包含如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一条序列具有至少 80%同一性多肽。

25 在一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示多肽；在一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示多肽；在一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 84 所示多肽；在一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽；在一些实施方案中，Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示多肽，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 30 86 所示多肽。

在一些实施方案中，其中：

35 （A）所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基础上还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、

N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；和/或

(B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变的序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；

上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点；

20 优选地，其中，

(A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

(B) 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 的一个或多个氨基酸残基突变，所述

Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；更优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；或者

所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

在一些实施方案中，本披露提供一种缀合物，其包含前面任一项所述的多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段或双特异性抗体、或多特异性抗体。

在一些实施方案中，本披露提供一种多肽，其序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性；或者序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性；或者序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性；优选地，所述多肽可用于替换抗体 CH1 和/或 CL。更优选地，所述多肽为 Titin-T 链和 Obscurin-O 链、或 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链，双特异性抗体的单侧 CH1 和 CL 被 Titin-T 链和 Obscurin-O 链替换、或 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链替换后，第一重链与第二轻链之间、第一轻链与第二重链之间不容易发生错配。

在一些实施方案中，所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或是 SEQ ID NO:32 序列还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或是 SEQ ID NO:33 的序列还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、

T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或 SEQ ID NO:34 序列还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变序列。

一种用于替换抗体的 CH1 和/或 CL、替换抗原结合片段的 CH1 和/或 CL，或替换多肽复合物的 CH1 和/或 CL 的多肽，所述多肽的序列如 SEQ ID NO:32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性；或者序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性；或者序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性；优选地，所述多肽为 Titin-T 链和 Obscurin-O 链、或 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链。更优选地，所述多肽替换双特异性抗体的单侧 CH1 和 CL 后，双特异性抗体的第一重链与第二轻链之间、第一轻链与第二重链之间不容易发生错配。

在一些实施方案中，本披露提供一种 Titin-T 链、Obscurin-O 链和/或 Obscurin-样-O 链，其中所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性，Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性；Obscurin-样-O 链序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链/Obscurin-O 链，或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链可用于替换抗体 CH1 和/或 CL。

在一些实施方案中，所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或是 SEQ ID NO:32 序列还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变序列；所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或是 SEQ ID NO:33 的序列还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点

氨基酸突变序列；所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或 SEQ ID NO:34 序列还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变序列。

5 在一些实施方案中，本披露还公开 Titin-T 链和 Obscurin-O 链、或者 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链在减少多特异性抗体轻链/重链错配中的应用；在一些实施方案中，所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任条一序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一条序列所示或与 SEQ ID
10 NO: 33、42-58、77-86 任一条序列有至少 80%同一性的多肽；或者所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或所述 Obscurin-样-O 链包含如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一条序列具有至少 80%同一性多肽。

15 在一些实施方案中，前述 Titin-T 链和 Obscurin-O 链、或者 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链在减少多特异性抗体轻链/重链错配中的应用，所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或是 SEQ ID NO:32 序列还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变，和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR
20 的序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变序列，和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或是 SEQ ID NO:33 的序列还具有选自 3、9、25、
25 76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变序列，和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、
30 A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变序列，和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或 SEQ ID NO:34 序列还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变序列。

35 在一些实施方案中，所述多特异性抗体包含第一重链可变区（VH1）和第一轻链可变区（VL1），所述 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性结合的抗原结合位

点，且所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

5 在一些实施方案中，本披露提供一种核酸分子，其编码前面任一项所述的多肽复合物，或多特异性多肽复合物，或结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段、或双特异性抗体、或多肽、或多特异性抗体。

在一些实施方案中，本披露提供一种载体，其包含前述的核酸分子。

10 在一些实施方案中，本披露提供一种宿主细胞，其由前述的载体转化（或转导、转染）获得；所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。在一些实施方案中，所述宿主细胞不包括任何能够发育成整个体的动物或植物细胞，如人胚胎干细胞、受精卵、生殖细胞。

15 在一些实施方案中，所述宿主细胞为真核细胞，更优选哺乳动物细胞，其中所述的哺乳动物细胞包括但不限于 CHO、293、NSO，以及在哺乳动物细胞中进行基因编辑可改变抗体或其抗原结合片段的糖基化修饰，进而改变抗体或其抗原结合片段的 ADCC 功能的细胞，例如，敲除 FUT8 或 GnT-III 等基因。在一些实施方案中，所述哺乳动物细胞不包括人细胞。

20 在一些实施方案中，本披露提供一种制备前面任一项所述的多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、或多肽、或多特异性抗体的方法，所述方法包括以下步骤：

培养前述的宿主细胞，然后纯化并回收多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体或多肽、或多特异性抗体。

25 在一些实施方案中，本披露提供一种药物组合物，其含有前面任一项所述的多肽复合物、或多特异性多肽复合物、或结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段、或双特异性抗体、或核酸、或多特异性抗体、或缀合物，以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。优选地，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的前述多肽复合物、或多特异性多肽复合物、或结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段、或双特异性抗体、或多特异性抗体、或缀合物，或药物组合物单位剂量中含前述多肽复合物、或多特异性多肽复合物、或结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段、或双特异性抗体、或多特异性抗体、或缀合物的量优选为 0.1-2000mg，更优选为 1-1000mg。

35 在一些实施方案中，本披露提供前面任一项所述的多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、药物组合物、或核酸分子、或多特异性抗体，在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤、炎性疾病、自身免疫

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

35 在一些实施方案中，本披露提供一种治疗或预防疾病或病症方法，所述方法包括给予受试者预防有效量或治疗有效量的前面任一项所述的多肽复合物、多特

异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、药物组合物、或核酸分子、或多特异性抗体。在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤、炎性疾病、自身免疫性疾病或感染性疾病。在一些实施方案中，所述疾病或病症为骨相关性疾病，骨质疏松症、骨质减少或骨关节炎、类风湿性关节炎、牙周病或多发性骨髓瘤的疾病或障碍。在一些实施方案中，所述肿瘤选自癌

5 瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自：鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、

10 急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子

15 宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic

20 lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。在一些实施方案中，所述炎性疾病选自：类风湿关节炎、牛皮癣、克罗恩病、强硬性脊柱炎、多发性硬化症、I 型糖尿病、肝炎（例如乙肝、甲肝、丙肝）、心肌炎、Sjogren 综合征、移植排斥后的自体免疫性溶血性贫血、水疱性类天疱疮、格雷夫氏病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮（SLE）、

25 重症肌无力、天疱疮、恶性贫血。在一些实施方案中，所述免疫性疾病可选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病（IBD）、Crohn 病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、多发性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合

30 物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜）、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿关节炎（RA）、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多征、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征、

35 脉络视网膜炎（choreoretinitis）、以及病毒感染引起的免疫性疾病（如伊波病毒（EBV）感染 B 细胞引起或介导的疾病）。

在一些实施方案中，本披露提供一种用作药物的前面任一项所述的多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、药物组合物、或核酸分子、或多特异性抗体。在一些实施方案中，所述药物用于治疗或预防疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤、炎性疾病、自身免疫性疾病或感染性疾病。在一些实施方案中，所述疾病或病症为骨相关性疾病，骨质疏松症、骨质减少或骨关节炎、类风湿性关节炎、牙周病或多发性骨髓瘤的疾病或障碍。在一些实施方案中，所述肿瘤选自癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自：鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。在一些实施方案中，所述炎性疾病选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、克罗恩病、强硬性脊柱炎、多发性硬化症、I 型糖尿病、肝炎（例如乙肝、甲肝、丙肝）、心肌炎、Sjogren 综合征、移植排斥后的自体免疫性溶血性贫血、水疱性类天疱疮、格雷夫氏病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮（SLE）、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血。在一些实施方案中，所述免疫性疾病可选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病（IBD）、Crohn 病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、多发性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜）、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎（RA）、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多症、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征、

脉络视网膜炎（choreoretinitis）、以及病毒感染引起的免疫性疾病（如伊波病毒（EBV）感染 B 细胞引起或介导的疾病）。

5 在一些实施方案中，本披露提供一种检测方法，所述方法包括：使用前面任一项所述的多肽复合物，或多特异性多肽复合物，或结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段、或双特异性抗体、或多特异性抗体接触待测样本的步骤。

在一些实施方案中，本披露提供一种用于检测或测定的试剂，所述试剂包含：前面任一项所述的多肽复合物，或多特异性多肽复合物，或结构域改造抗体、或结构域改造抗体的 Fab 片段、或双特异性抗体、或多特异性抗体。

10 附图说明

图 1A 和图 1B：Titin-T 和 Obscurin-O 或 Titin-T 和 Obscurin-样-O 链结构域间相互作用界面结构图；

图 2：CH1 和 CL 被替换的 Fab 示意图；

图 3：双侧 CH1 和 CL 被替换的 IgG 单特异性抗体结构示意图；

15 图 4：单侧 CH1 和 CL 被替换 IgG 双特异性抗体结构示意图；

图 5：DI-1 双特异性抗体结构示意图；

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

图 7：抗体轻链/重链交叉错配分子结构示意图；

20 图 8：BU5 双特异性抗体结构示意图；

图 9A 至图 9C：BU5 质谱分析图；

图 10：DI-1 双特异性抗体破骨细胞分化实验结果图；

图 11：DI-1 双特异性抗体 TF1 细胞增殖实验结果图；

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

25 图 13A 至图 13D：双特异性抗体 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4 的四条链共表达的质谱分析图；

图 14A 至图 14B：双特异性抗体 HJ-1 的 HJ-1-H1、HJ-1-H2、HJ-1-L2 的三条链共表达的质谱分析图；

30 图 15 A 至图 15B：双特异性抗体 HJ-3 的 HJ-3-H1、HJ-3-H2、HJ-3-L2 的三条链共表达的质谱分析图；

图 16 A 至图 16B：残基之间的相互作用。

具体实施方式

35 为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

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

“抗体 (antibody, Ab)”一般是免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig), 一个天然完整抗体是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同, 故其抗原性也不同。据此, 可将免疫球蛋白分为五类 (class), 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链, 据此可以将抗体分为两型 (type)。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。根据 λ 链恒定区个别氨基酸的差异, 又可分为 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 和 $\lambda 4$ 四个亚型 (subtype)。

本披露所称抗体包括抗体或其抗原结合片段, 包括在免疫球蛋白基础上经过改造, 同时保留结合抗原的能力的抗体或其抗原结合片段; 包括单特异性抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体); 还包括一价抗体、或多价抗体 (例如二价抗体)。抗体的抗原结合片段, 例如可以是包含至少一个 VH-CH1 和至少一个 VL-CL 结构, 其中 VH 和 VL 结构能够基于链间相互作用而靠近, 并保留结合抗原的能力的抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述抗体的抗原结合片段为一价 Fab 片段 (Fab1 片段)、二价 Fab 片段 (F(ab)2)、三价 Fab 片段 (F(ab)3)、多价 (两个或以上) Fab 片段, 也可以是其它包含至少一个 Fab 片段的单特异性、双特异性或多特异性抗原结合片段。

本披露所述“结构域改造抗体”是指抗体的 CH1 和/或 CL 被其他结构域或肽片段替换后形成的抗体, 可用于替换抗体的 CH1/CL 结构域的结构域或肽片段通常具有分子间相互作用; 可选择的结构域组合包括但不限于: IL13RA1 Fibronectin type-III 3 结构域/IL4R Fibronectin type-III 结构域、IL6ST Fibronectin 型-III 2 结构域/IL6R Fibronectin 型-III 2 结构域、HFE Ig-样 C1-型结构域/B2M Ig-样 C1-型结构域、CD1B Ig-样结构域/B2M Ig-样 C1-型结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域/Titin Ig-样 152 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1/Titin Ig-样 152 结构域。在一些实施方案中, 所述结构改造抗体为单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体; 在一些实施方案中, 所述结构改造抗体为一价抗体、二价抗体或多价抗体; 在一些实施方案中, 所述结构改造抗体为完整抗体或其抗原结合片段; 在一些实施方案中, 所述抗体抗原结合片段是 Fab 片段, 可以是一价 Fab 片段 (Fab1 片段)、二价 Fab 片段 (F(ab)2)、三价 Fab 片段 (F(ab)3) 或多价 (两个或以上) Fab 片段。示例性地, 抗体 Fab 片段的 CH1 和 CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链或被 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换的结构示意图见附图 2; 抗体的 CH1 和 CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换结构示意图见附图 3; 双特异性抗体的一侧 CH1 和 CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换的结构示意

图见附图 4。至少一个 CH1 和至少一个 CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或被 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换的其它抗体：例如，二价抗体的一侧 CH1 和 CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换；双特异性抗体的两侧 CH1 和 CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换；F(ab)2 片段的 2 个 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换；F(ab)3 片段的 1 个或 2 个或 3 个 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链、或 Titin-T 链/Obscurin-样-O 链替换。

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

“Titin Ig-样 152 结构域”是 Titin 蛋白上一段命名为 Titin Ig-样 152 的 Ig 样结构域，该结构域能够与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域通过分子间相互作用结合形成二聚体复合物（可从 RCSB PDB 数据库获得）。

“Titin-T 链”、“T 链”是指 Titin 蛋白中一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Titin Ig-样 152 结构域的肽段或其功能变体，所述 Titin-T 链能够与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域通过分子间相互作用结合形成复合物。所述 T 链功能变体是对野生型 T 链的部分氨基酸进行突变，但依然具有与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 通过分子间相互作用结合形成复合物的肽段。本披露中，Titin-T 链可用于替换抗体的 CH1 或 CL 结构域，而不影响抗体 VH 和 VL 的结合及抗体与抗原表位的结合。可以对 Titin-T 链部分氨基酸进行突变，只要其仍能够与 Obscurin Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物。例如，在 Titin Ig-样 152 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸；例如，可增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基；例如，在 Titin Ig-样 152 结构域 N 端增加 5 个 Titin 蛋白中紧邻 Titin Ig-样 152 结构域 N 端的“KAGIR”这 5 个氨基酸，；也可在 Titin Ig-样 152 结构域的 N 端和/或 C 端添加适当长度的连接序列（例如，(G_xS)_y 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数，如“G₄S”、“(G₄S)₂”，使 Titin Ig-样 152 结构域的 N 端通过连接序列连接抗体的 VH/或 VL。还可对 Titin Ig-样 152 结构域氨基酸进行其它突变，例如，对某些氨基酸突变以便增加链间二硫键，提高复合物稳定性。本披露的一些实施方案中，所述 Titin-T 链为序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性的多肽，所述多肽能与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链彼此缔合形成复合物。

“Obscurin”（遮蔽蛋白），是一种由 OBSCN 基因编码的蛋白质，属于巨型肌氨酸信号蛋白家族。Obscurin 在心肌和骨骼肌中表达，并在肌节组装过程中在肌原纤维的组织中发挥重要作用。Obscurin 是肌浆网状蛋白 sANK1 的主要细胞质配体，

其可以阻止 sANK1 的降解 (Lange S 等. *Molecular Biology of the Cell*. 23 (13) : 2490–504); Obscurin 在肌浆网状结构域和肌浆网状结构域之间起着信号联系的作用 (Bagnato P 等, *The Journal of Cell Biology*. 160 (2) : 245–53.); Obscurin 在肌原纤维组装过程中参与新肌节的形成 (Borisov AB, 等, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 310 (3) : 910–918)。

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

“Obscurin-O 链”、“O 链”是指 Obscurin 蛋白上一段长度为 87-117 个氨基酸的包含 Obscurin Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体, 所述 Obscurin-O 链能够与 Titin Ig-样 152 结构域通过分子间相互作用形成复合物。所述的 Obscurin-O 链功能变体是对野生型 O 链的部分氨基酸进行突变, 但其依然具有与 Titin Ig-样 152 结构域通过分子间相互作用形成复合物的肽段。本披露中, Obscurin-O 链可替换抗体的 CH1 或 CL 结构域, 而不影响抗体 VH 和 VL 的结合及抗体与抗原表位的结合。可以对 Obscurin-O 链部分氨基酸进行突变, 只要其能够与 Titin Ig-样 152 结构域彼此缔合形成复合物。例如, 在 Obscurin-O 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸, 例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸; 例如在 Obscurin-O 结构域 N 端增加 5 个野生型 Obscurin 蛋白中紧邻 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端的 “DQPQF”这 5 个氨基酸。也可在 Obscurin-O 结构域的 N 端和/或 C 端添加适当长度的连接序列 (例如, $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, X 选自 1-5 的整数, Y 选自 1-6 的整数, 如 “G₄S”、“(G₄S)₂”), 使 Obscurin-O 结构域的 N 端通过连接序列连接抗体的 VH/或 VL。还可对 Obscurin Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行其它突变, 例如, 对某些氨基酸突变以便增加链间二硫键, 进一步提高抗体稳定性等。本披露的一些实施方案中, 所述 Obscurin-O 链为序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性的多肽, 所述多肽能与 Titin-T 链彼此缔合形成复合物。

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

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

“Obscurin-样-O 链”、“OL 链”是指 Obscurin-样 1 蛋白上一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体。所述 Obscurin-样-O 链能够与 Titin Ig-样 152 结构域通过分子间相互作用形成复合物。所述的 Obscurin-

样-O 链功能变体为对野生型 OL 链的部分氨基酸进行突变，但其依然具有与 Titin Ig-样 152 结构域相互作用形成复合物的肽。本披露中，Obscurin-样-O 链可替换抗体的 CH1 或 CL 结构域，而不影响抗体 VH 和 VL 的结合及抗体与抗原表位的结合。还可以对 Obscurin-样-O 链部分氨基酸进行突变，只要其能够与 Titin Ig-样 152 结构域彼此缔合形成复合物。在一些实施方案中，例如，在 Obscurin-O 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸，例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸。也可在 Obscurin-样-O 结构域的 N 端和/或 C 端添加适当长度的连接序列（例如， $(G_xS)_y$ 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数，如“G₄S”、“(G₄S)₂”，使 Obscurin-样-O 结构域的 N 端通过连接序列连接抗体的 VH 或 VL。还可对 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行其它突变，例如，对某些氨基酸突变以便增加链间二硫键、进一步提高抗体稳定性等。本披露的一些实施方案中，所述 Obscurin-样-O 链为序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示序列具有至少 80% 同一性多肽，所述多肽能与 Titin-T 链彼此缔合形成复合物。

另外，可对 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域上的部分氨基酸进行突变，只要其仍能够使 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin Ig-样 1 结构域，或 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物。在一些实施方案中，可以在 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸（例如紧邻结构域的野生型蛋白的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸），只要其仍能够使 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin Ig-样 1 结构域，或 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物。例如，在 Titin Ig-样 152 结构域 N 端增加 5 个野生型 Titin 蛋白中紧邻 Titin Ig-样 152 结构域 N 端的“KAGIR”这 5 个氨基酸；或在 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端增加 5 个野生型 Obscurin 蛋白中紧邻 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端的“DQPQF”这 5 个氨基酸。在一些实施方案中，可以在 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的 N 端和/或 C 端可添加适当长度的连接序列（例如， $(G_xS)_y$ 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数，如“G₄S”、“(G₄S)₂”，使 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域、Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的 N 端通过连接序列连接抗体的 VH 或 VL。在一些实施方案中，还可对 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域上的部分氨基酸进行其它突变，只要其仍能够使 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin Ig-样 1 结构域，或 Titin Ig-样 152 结构域与 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域彼此相互作用形成复合物，例如，对部分氨基酸突变以增加链间二硫键，进一步提高抗体稳定性等。

“Fab 片段”，是指可以通过酶处理单克隆抗体来生产获得的能够结合抗原的片段，该片段包含轻链（VL-CL）和重链的 VH-CH1 结构。

“结构域改造的 Fab 片段”是指抗体 Fab 片段中 CL 和/或 CH1 被其他结构域或肽片段替换后形成的多肽片段，结构域改造的 Fab 片段仍保留 VH 和 VL 间的相互作用，以及保留抗体与抗原的结合能力。在一些实施方案中，结构域改造的 Fab 片段可以作为多价抗体或多价多肽复合物的一部分。在另一些实施方案中，结构域改造的 Fab 片段作为一个单一的蛋白分子。Fab 片段可以是一价 Fab 片段（Fab 片段 1）、二价 Fab 片段（F（ab）₂）、三价 Fab 片段（F（ab）₃）或多价（两个或以上）Fab 片段。示范性地，Fab 片段的 CH1 和 CL 被替换的示意图见附图 2。

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

术语“一价”、“二价”、“三价”或“多价”是指抗体或多肽复合物中存在指定数量的抗原结合位点。例如“一价抗体”表示抗体中存在一个抗原结合位点，“一价多肽复合物”表示多肽复合物中存在一个抗原结合位点；“二价抗体”表示抗体中存在两个抗原结合位点，“二价多肽复合物”表示多肽复合物中存在两个抗原结合位点；“三

价抗体”表示抗体中存在三个抗原结合位点，“三价多肽复合物”表示多肽复合物中存在三个抗原结合位点；“多价抗体”表示抗体中存在多个（例如，存在三个或三个以上抗原结合位点）抗原结合位点，“多价多肽复合物”表示多肽复合物中存在多个（例如，存在两个或两个以上抗原结合位点）抗原结合位点。

5 术语“多肽”、“肽”或“蛋白”在本披露中可互换使用，其指氨基酸残基的聚合物，或多个氨基酸残基聚合物的集合体。这些术语应用于其中的一个或多个氨基酸残基为对应的天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。多肽序列通常记述为多肽序列的左手端为氨基末端（N 末端、N 端）；多肽序列的右手端为羧基末端（C 末端、C 端）。本披露的“多肽复合物”是指包含一个或多个与实现某些功能相关的多肽的复合物。 10 在一些实施方式中，所述多肽复合物为能与抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

术语针对抗原的“结合区”或“结合位点”、“结合结构域”是指在特异性蛋白分子（例如抗体分子）中，能够与抗原特异性结合的区域或部分，抗原结合区可以是 15 能直接与抗原结合的配体结合结构域部分，也可以是能直接与抗原结合的包含抗体可变区的结构域。

术语“可操作地连接”或“可操作的连接”或“可操作连接”是指两个或更多个生物学序列以使其处于以目的方式作用的方式连接，无论是否存在间隔区（也称接头、连接子、连接序列）。当用于多肽时，该术语表示多肽序列以使所连接的产物 20 具有目的生物学功能的方式连接，两条序列间可以存在或不存在间隔区。例如，可将抗体可变区可操作地连接至恒定区，以形成具有抗原结合活性的稳定产物。所述术语还可用于多核苷酸。例如，当编码多肽的多核苷酸可操作地连接至调控序列（例如启动子、增强子、沉默子序列等）时，该术语表示所述多核苷酸序列以允许所述多肽由所述多核苷酸调控表达的方式连接。

25 术语“二聚化结构域”是指能够促进彼此缔合以形成二聚体的多肽结构域。在一些实施方案中，第一二聚化结构域可以与第二二聚化结构域缔合。该缔合可以通过任何合适的方式进行结合或连接或键合；例如，通过连接子，二硫键，氢键，静电相互作用，盐桥，或疏水-亲水相互作用，或者其组合。示例性二聚化结构域包括但不限于抗体铰链区、抗体 CH2 结构域、抗体 CH3 结构域、和能够彼此二聚化和相互作用的其他合适的蛋白质单体或多肽。铰链区、CH2、CH3 可以衍生自 30 任何抗体同种型，例如 IgG1，IgG2、IgG3 和 IgG4。

术语“相互作用结构域”是指能够促进两个或更多个同源或异源多肽的相互作用或缔合的多肽的结构域。例如相互作用结构域为促进彼此缔合以形成二聚体的二聚化结构域。蛋白间相互作用的结构域是两个或更多个蛋白之间相互作用或缔合的多肽的结构域，例如，Obscurin-like 蛋白中的 Obscurin-like Ig-like 1 结构域， 35 能够与 Titin 蛋白的 Titin Ig-like 152 结构域通过分子间相互作用形成复合物。在一

些实施方案中，与 Titin-T 链相互作用的结构域是 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链。

术语“二聚体”是指两个分子（例如多肽或蛋白质）通过共价或非共价相互作用而形成的结构。同型二聚体或同型二聚化由两个相同的分子形成，异二聚体或异二聚化由两个不同的分子形成。两个分子可通过天然链间键形成二聚体，也可以通过非天然链间键形成二聚体。本披露的一些实施方案中，Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链可通过天然链间键形成二聚体。本领域技术人员公知，两个彼此缔合形成二聚体的结构域，其中第一结构域与第二结构域之间间距在 6 埃以内的接触界面残基（尤其是 4.5 埃以内的残基）对维持两个结构域的缔合起到关键作用（Yan, Changhui et al. “Characterization of protein-protein interfaces.” The protein journal vol. 27,1 (2008): 59-70）。通过 MOE(Molecular Operating Environment)系统分析 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链缔合形成的复合物（见附图 1A 和图 1B），发现 Titin-T 链上的第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相互作用，Titin-T 链上的第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相互作用（参见附图 16A 和图 16B），上述位点的接触界面残基间距在 4.5 埃以内，其对维持两个结构域的缔合起到重要作用。另外，在另外一些实施方案中，Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链可通过非天然链间键形成二聚体，其中所述二聚体包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个非天然链间键。可以通过对 Titin-T 链、Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链上的一些氨基酸进行突变，从而使 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链之间形成二硫键，从而稳定化二聚体。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变；或者 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变；或者所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变。在一些实施方案中，所述 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 A88C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-O 链具有 A3C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，Obscurin-O 链具有 R9C 突

变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A88C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A3C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 R9C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 V74C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 G84C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 A86C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变。在一些实施方案中，所述 Obscurin-O 链还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变；优选地，所述 Obscurin-O 链具有选自 L7K 或 L7R、K11L、T62K 或 T62H 的一个或多个氨基酸残基突变；最优选地，所述 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突变；Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变；或者 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H。上述 Titin-T 链突变位点为相对于 T.0 链（序列 SEQ ID NO: 32）的自然顺序位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于 O.0 链（序列 SEQ ID NO: 33）的自然顺序位点；Obscurin-样-O 链突变位点为相对于 OL.0 链（序列 SEQ ID NO: 34）的自然顺序位点。

本披露中，“错配”是指两个或更多个同源或异源多肽相互作用或缔合形成不期望的二聚体或多聚体配对。“不容易发生错配”意指，例如，当多肽 A1、B1 和 B2 共表达时，如果期望的 A1-B1 二聚体的表达量大于 A1-B 2 二聚体的量，则认为在 A1-B 1 之间发生优先配对，即 A1-B 2 之间不容易发生错配。本披露中，在一些实施例中，多特异性多肽复合物中，第一多肽复合物的 VH1 与第二多肽复合物的 VL2 之间不容易发生错配，和/或第一多肽复合物的 VL1 与第二多肽复合物的 VH2 之间不容易发生错配，而是 VH1-VL1 之间优先配对，VH2-VL2 之间优先配对。

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

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

或在第一链上的 Glu, Trp 和在第二链上的 Arg, Val 或 Thr 之间。

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

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

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

如本文所用, “旋钮进入孔”、“knob-into-hole”是指两条多肽之间的相互作用, 其中一条多肽由于存在具有庞大侧链的氨基酸残基 (例如酪氨酸或色氨酸) 而具有突起 (即“旋钮”、knob)。另一条多肽具有空腔 (即“孔”、hole), 其中存在小的侧链氨基酸残基 (例如丙氨酸或苏氨酸), 并且突起可定位在空腔中, 以促进两种多肽的相互作用以形成异二聚体或复合物。产生具有突起到孔的多肽的方法是本领域已知的, 可参见专利 US5731169、WO1996027011 等。

“非天然的链间键”是指在野生型多肽聚合物中未发现的链间键。例如, 非天然链间键可以在一条多肽的突变的氨基酸残基和另一条多肽的野生型氨基酸残基或突变氨基酸残基之间形成。在某些实施方案中, 至少一个非天然链间键为氨基酸突变后形成的“二硫键”。在本披露的一些实施方案中, Titin-T 链与 Obscurin-O 链、或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链之间的非天然的链间键是通过 Titin-T 链上选自第 8、20、22、25、26 和 39 位, 和/或 Obscurin-O 链上选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变而形成; 或者通过对 Titin-T 链选自第 8、20、22、25、26 和 39 位, 和/或 Obscurin-样-O 链上选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变而形成。

术语“接触界面”是指多肽上的特定区域, 其中多肽彼此接触或相互作用。接触界面包含一个或多个氨基酸残基, 相互作用发生时, 某多肽上的接触界面氨基酸

残基能够和与其接触的相应氨基酸残基相互作用。接触界面中的氨基酸残基可以是连续或不连续序列。例如，当界面是三维时，界面内的氨基酸残基可以在线性序列上的不同位置分开。

“连接结构域”或“连接域”或“间隔区”是指两条多肽序列融合或组合的边界或边界区域。例如，连接结构域可包含来自第一融合多肽的至少一部分 C 末端片段，其与来自第二融合多肽的 N 末端片段的至少一部分融合，其间具有或不具有其它间隔区。例如，间隔区可富含甘氨酸和脯氨酸残基。例如具有由苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸组成的单个或重复序列的间隔区，GGGGS、TGGGG、SGGGG、或其串联重复序列（例如 2, 3, 4, 5 或更多个重复）。在某些实施方案中，间隔区包含 GGGGS 或其 2 个或更多个串联重复序列。

天然完整抗体包含两条重链和两条轻链。每条重链由可变区（“HCVR”、VH）和第一，第二和第三恒定区（CH1，CH2 和 CH3）组成，抗体第二（CH2）和第三（CH3）恒定区组成“Fc”，CH2 的 N 端可含或不含抗体铰链区部分，铰链区部分富含脯氨酸，包括链间二硫键；而每条轻链由可变区（“LCVR”、VL）和恒定区组成（CL）。靠近重链和轻链 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（Fv 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括 3 个高变区（HVR）和 4 个序列相对保守的骨架区（FR）。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补决定区（CDR）。每条轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本披露的抗体，例如，可以是源自动物的抗体（如鼠、禽、兔、骆驼、猴等来源抗体）、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。本披露抗体除包括全长抗体外，还包括能结合抗原的抗原结合片段。

术语“鼠源抗体”在本披露中为根据本领域知识和技能制备的针对抗原的单克隆抗体。制备时用抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本披露一个优选的实施方案中，所述的鼠源抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将其它第一物种抗体的可变区与第二物种抗体的恒定区融合而成的抗体。例如，建立人鼠嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本披露一个优选的实施方案中，所述的嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的抗原嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、

IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变（例如 L234A 和/或 L235A 突变，和/或 S228P 突变）的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

术语“人源化抗体 (humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)，是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库获得，以及在 Kabat, E.A. 等人发表, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本披露的人源化抗体也包括进一步由酵母菌展示对 CDR 进行亲和力和成熟突变后的人源化抗体。

在本披露一个的实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，可进一步包含人源或鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含人源或鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区；优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变（例如 L234A 和/或 L235A 突变、和/或 S228P 突变）的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

本披露公开中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区包括其的“常规变体”是指，其为现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体，示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体，具体替换如现有技术已知的 YTE 突变，L234A 和/或 L235A 突变，S228P 突变，和/或获得 knob-into-hole 结构的突变（使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合），这些突变已被证实使得抗体具有新的性能，但不改变抗体可变区的功能。

“人抗体” ((HuMAb))、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用，可以是源于人的抗体或者是从一种转基因生物体中获得的抗体，该转基因生物体经“改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人抗体并且可以通过本领域已知的任何方法产生。转基因生物可以合成人抗体，并且该生物可以用于产生人抗体-分泌杂交瘤。人抗体还可以是一种抗体，其中重链和轻链是由源于一个或更多个人 DNA 来源的核苷酸序列编码的。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建，或者由体外活化的 B 细胞构建，所有的这些都是本领域已知的。

术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体，与下文定义的抗原结合片段相区分。该术语特别指轻链和重链包含恒定区的抗体。本披露“抗体”包含“全长抗体”及其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本披露的全长抗体包括轻链可变区与轻链恒定区连接的轻链和重链可变区与重链恒定区连接的重链所形成的全长抗体。本领域技术人员可以根据实际需要选择不同的抗体来源的轻链恒定区、重链恒定区，例如人抗体来源的轻链恒定区和重链恒定区。

5 术语抗体的“抗原结合片段”是指抗体中保持抗原（例如，抗原）结合能力的一个或更多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括（i）Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；（ii）F（ab'）₂ 片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段，（iii）由 VH 和 CH1 结构域组成的
10 Fd 片段；（iv）由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；（v）dsFv，由 VH 和 VL 经链间二硫键形成的稳定的抗原结合片段；（vi）包含 scFv、dsFv、Fab 等片段的双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链（称为单链 Fv（scFv）；参见，例如，Bird 等人（1988）Science242 :423-426 ；和 Huston
15 等人（1988）Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883）。此类单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同
20 种型的抗体，例如，IgG（例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

F（ab'）₂ 是通过用酶消化 IgG 铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约 100,000 并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个 Fab 区的抗体片段。

25 Fab'是通过切割上述 F（ab'）₂ 的铰链区的二硫键而获得的分子量为约 50,000 并具有抗原结合活性的抗体片段。本披露的 Fab'可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理本披露的特异性识别抗原的 F（ab'）₂ 来生产。

此外，可以通过将编码抗体的 Fab'片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab'来生产所述
30 Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域（或区域；VH）和抗体轻链可变结构域（或区域；VL）的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成，例如使用 1-4 个重
35 复的变体（Holliger 等人（1993），Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448）。可用于本披露的其他接头由 Alfthan 等人（1995），Protein Eng.8:725-731，Choi 等人

(2001), Eur.J.Immunol.31:94-106, Hu 等人 (1996), Cancer Res.56:3055-3061, Kipriyanov 等人 (1999), J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人 (2001), Cancer Immunol. 描述。

5 双抗体是其中 scFv 或 Fab 被二聚体化的抗体片段,是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中,两个抗原可以是相同或不同的。

本披露的双抗体可以通过以下步骤来生产:获得本披露的抗体的 VH 和 VL 的编码 cDNA,构建编码 scFv 的 DNA,将所述 DNA 插入到表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双抗体。

10 dsFv 是通过将其中每个 VH 和 VL 中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) 基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

15 本披露的全长抗体或抗原结合片段或双特异性抗体或多特异性抗体、多肽、多肽复合物、多特异性多肽复合物,可以通过以下步骤来生产:获得本披露的抗体的编码 cDNA,构建编码 dsFv 的 DNA,将所述 DNA 插入到表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达 dsFv。

术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽,变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变,包括在原蛋白质或多肽的基础上发生 1 个、2 个、3 个或更多个氨基酸的插入、缺失或替换。

20 术语“抗体框架”或“FR 区”,是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环 (CDR) 的支架。从本质上讲,其是不具有 CDR 的可变结构域。术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常,每个重链可变区中存在三个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3),每个轻链可变区中存在三个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。
25 可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界,包括“Kabat”编号规则 (参见 Kabat 等 (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、 “Chothia”编号规则 (参见 Al-Lazikani 等人, (1997) JMB 273: 927-948) 和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则 (Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) 等。

30 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位 (例如,抗原分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见,例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed. (1996)。
35

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”或“特异性地结合”是指抗

体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于 10^{-7}M ，例如大约小于 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小的亲和力 (KD) 结合。

术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，本披露的抗体以小于大约 10^{-7}M ，例如小于大约 10^{-8}M 或 10^{-9}M 的解离平衡常数 (KD) 结合抗原，例如，在本披露中抗体与抗原的亲和力采用 FACS 法测定 KD 值。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：在所述测定法中，待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253)；固相直接生物素-亲和素 EIA (参见例如 Kirkland 等, 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press)；用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA (参见例如 Morel 等, 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15)；固相直接生物素-亲和素 EIA (参见例如 Cheung, 等, 1990, *Virology* 176: 546-552)；和直接标记的 RIA (Moldenhauer 等, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用结合荷有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括：结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白；和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或 75% 或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下，结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97% 或 97% 或更多本文中使用的术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选是双链 DNA 或单链 mRNA 或修饰的 mRNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的 DNA 区段连

接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制（例如，非附加型哺乳动物载体）。

5 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。例如，鼠可以用抗原免疫，所得到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或更多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种
10 系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics (IMGT) 的网站得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001ISBN012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌 (*enterobacteria*) 的成员，例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株；芽孢杆菌
15 (*Bacillus*) 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌 (*Pneumococcus*)；链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO (中国仓鼠卵巢细胞系)、293 细胞和 NS0 细胞。

本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码
20 重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用 A 或 G Sepharose FF
25 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

“施用”、“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官
30 或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处
35 理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，例如包含本披露的任一种结合化合物的组合物，所述受试者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代于下表“示例性氨基酸保守取代”中陈述。示例性氨基酸保守取代：

	原始残基	保守取代
	Ala (A)	Gly; Ser
	Arg (R)	Lys; His
	Asn (N)	Gln; His; Asp
25	Asp (D)	Glu; Asn
	Cys (C)	Ser; Ala; Val
	Gln (Q)	Asn; Glu
	Glu (E)	Asp; Gln
	Gly (G)	Ala
30	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
	Ile (I)	Leu; Val
	Leu (L)	Ile; Val
	Lys (K)	Arg; His
	Met (M)	Leu; Ile; Tyr
35	Phe (F)	Tyr; Met; Leu
	Pro (P)	Ala
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe
40	Tyr (Y)	Trp; Phe

Val (V) Ile; Leu。

“有效量”或“有效剂量”是指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途，有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作，包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，诸如减少各种本披露靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或更多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓受试者的本披露靶抗原相关病症的进展。

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。

10 “内源性”指根据情况在生物、细胞或人体内产生的物质。

“同源性”、“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个DNA分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的10个位置有6个匹配或同源，那么两个序列为60%同源；如果两个序列中的100个位置有95个匹配或同源，那么两个序列为95%同源。通常，当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如，可以通过BLAST算法执行比较，其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。以下参考文献涉及经常用于序列分析的BLAST算法：BLAST算法（BLAST ALGORITHMS）：Altschul, S.F.等人，（1990）J. Mol. Biol. 215:403-410；Gish, W.等人，（1993）Nature Genet. 3:266-272；Madden, T.L.等人，（1996）Meth. Enzymol. 266:131-141；Altschul, S.F.等人，（1997）Nucleic Acids Res. 25:3389-3402；Zhang, J.等人，（1997）Genome Res. 7:649-656。其他如NCBI BLAST提供的常规BLAST算法也为本领域技术人员所熟知。本披露中，例如“相对于XX序列的自然顺序编号位点”，既包括XX序列上的自然顺序编号相应的位点，也包括XX序列的突变序列中与XX序列等同位置的位点，等同位置可通过将XX序列的突变序列与XX序列进行比对以获得最高百分比同一性，此时XX序列的突变序列上与XX序列相对应的位点即为等同位点。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在DNA含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意旨不同名称的情况下，其由上下文清晰可见。

35 本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA和/或DNA如在例如美国专利US4683195中所述扩增的程序或技术。一般来说，

需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等 (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例，但不是唯一的实例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

术语“缀合物”、“药物偶联物”指配体通过稳定的连接单元与具有生物活性的药物相连而成的新型药物。例如，“抗体药物偶联物” (antibody drug conjugate, ADC)，其是将抗体或者抗体片段通过连接单元与具有生物活性的药物相连。抗体可直接地或经接头地偶联至药物。每个抗体的平均药物模块数，其范围可以是例如每个抗体约 0 到约 20 个药物模块，在一些实施方案中是每个抗体 1 个到约 10 个药物模块，在某些实施方案中是每个抗体 1 个到约 8 个药物模块。本披露的缀合物，其中每个抗体的平均药物载荷是约 2 个至约 5 个或约 3 个至约 4 个。

“分离的”指纯化状态，并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料，例如细胞碎片和生长培养基。通常，术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

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

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“药学上可接受的载体”指适合用于制剂中用于递送抗体或抗原结合片段的任何无活性物质。载体可以是抗粘附剂、粘合剂、包衣、崩解剂、充填剂或稀释剂、防腐剂（如抗氧化剂、抗菌剂或抗真菌剂）、增甜剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。合适的药学上可接受的载体的示例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）右旋糖、植物油（例如橄榄油）、盐水、缓冲液、缓冲的盐水和等渗剂例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

此外，本披露包括用于治疗疾病或病症的药物制剂，例如治疗与目标抗原阳性细胞相关的疾病的药剂，所述制剂包含本披露的多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、药物组合物、或核酸分子、或多特异性抗体，作为活性成分。

本披露中的疾病没有限制，例如利用本披露的分子诱导的治疗反应可通过结合人类抗原，然后阻遏抗原与其受体/配体的结合，或杀伤过表达抗原的肿瘤细胞。

此外，本披露涉及用于免疫检测或测定目标抗原的方法、用于免疫检测或测定目标抗原的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原的细胞的方法和用于诊断与目标抗原阳性细胞相关的疾病的诊断剂，其包含本披露的多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、药物组合物、或核酸分子、或多特异性抗体作为活性成分。

在本披露中，用于检测或测定目标抗原的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法（RIA）、酶免疫测定法（EIA 或 ELISA）、荧光免疫测定法（FIA）、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

上述与抗原阳性细胞相关的疾病可以通过用本披露的抗体检测或测定表达抗原的细胞来诊断。

为了检测表达多肽的细胞，可以使用已知的免疫检测方法，并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外，可以使用利用 FMAT8100HTS 系统（Applied Biosystem）的荧光抗体染色法等。

在本披露中，对用于检测或测定目标抗原的活体样品没有特别限制，只要它具有包含表达目标抗原的细胞的可能性即可，例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

根据所需的诊断方法，含有本披露的抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂，例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围。

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉

港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

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

实施例 1、抗体或多肽蛋白的制备方法

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

> IgG1 重链恒定区（简称 hIgG1）

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

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

> knob-IgG1 重链恒定区（简称 knob-IgG1）：

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

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

> hole-IgG1 重链恒定区（简称 hole-IgG1）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3);

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

> kappa 轻链恒定区（简称 kappa 或 hκ）

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC (SEQ ID NO: 4)。

10 > lambda 轻链恒定区（简称 lambda 或 hλ）

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
 GVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
 S (SEQ ID NO: 5)。

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

> F0 抗体 VH 氨基酸序列：

QVQLVQSGGGVVPQTSLRLSCAASGFISSAMHWVRQAPGKGLEWVAV
 ISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYA
 SFDYWGQGALVTVSS (SEQ ID NO: 6);

20 > F0 抗体 VL 氨基酸序列

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY
 NTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCAIHVDRDIWVFGGGT
 KLTVL (SEQ ID NO: 7);

> N0 抗体 VH 氨基酸序列

25 DVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTSSLSWMSWLRQAPGKGLEWVA
 NINQDGSEKNYVDSVKGRFTISRDNQNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGLWT
 FDSWGQGTLTVSP (SEQ ID NO: 8);

> N0 抗体 VL 氨基酸序列

30 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQNNRFLAWYQQRPQGAPRLLIYAA
 SSRATGVPDRFSGSGGTDFLTISRLEAEDFAMYHCQQYGSFPRTFGQGTMVDI
 K (SEQ ID NO: 9);

> S0 抗体 VH 氨基酸序列

35 EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYI
 SSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAVYYCAAHYFGSSG
 PFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 10);

> S0 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTR
 TLAEGVPSRFSGSGGTDFSLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 11);

>V0 抗体 VH 氨基酸序列

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYSFTSYTIHWVKQRPGQGLEWIG
YINPNSRNTDYNQKFKDETTLTADRSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARYSGSTP

5 YWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 12);

>V0 抗体 VL 氨基酸序列

QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKPGSSPKPWIYATSN
LASGVPARFSVSVSGTSHSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 13);

10 >J0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMHWVRQAPGKGLEWVG
HIKSKTDAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAREIY
YYAFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14);

>J0 抗体 VL 氨基酸序列

15 SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDN
ERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYVFGGGTKLT
VL (SEQ ID NO: 15);

>H0 抗体 VH 氨基酸序列

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYMAWVRQAPGKGLEWVT
SISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCASQTLRES
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16);

>H0 抗体 VL 氨基酸序列

25 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTS
NLEVGVPSPRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 17);

>R0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLTSNSVNWIRQAPGKGLEWVGLI
WSNGDTDYNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYGYFD
YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 18);

30 >R0 抗体 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICLASEGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGAN
SLQGTGVPSRFSRSGSATDYTLTISLQPEDFATYYCQQSYKFPNTFGQGKVEVK
(SEQ ID NO: 19);

>Bmab (简称 B0) 抗体 VH 氨基酸序列

35 QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWM
GGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDVAVYYCARSRDLL
LFPHHALSPWGRGTMVTVSS (SEQ ID NO: 20);

>Bmab (简称 B0) 抗体 VL 氨基酸序列

SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKN
NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFGGGTELT
VL (SEQ ID NO: 21);

>Umab (简称 U0) 抗体 VH 氨基酸序列

5 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWIGI
MSPVDSDIRYSPSFQGQVTMSVDKSITTAYLQWNSLKASDTAMYYCARRRPGQ
GYFDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22);

>Umab (简称 U0) 抗体 VL 氨基酸序列

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPYTFGQGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 23);

>Dmab (简称 D0) 抗体 VH 氨基酸序列

15 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTV
IMSWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24);

>Dmab (简称 D0) 抗体 VL 氨基酸序列

EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVRGRLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 25);

20 >Tmab (简称 I0) 抗体 VH 氨基酸序列

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW
GDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATS
YYFDYWQGQTLVTVSS (SEQ ID NO: 26);

>Tmab (简称 I0) 抗体 VL 氨基酸序列

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS
RFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 27);

>C0 抗体 VH 氨基酸序列

30 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDYHMNWVRQAPGQRLEWM
GDINPDIGGTSYNQNFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDFDS
FANWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28);

>C0 抗体 VL 氨基酸序列

35 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQPPKLLIY
HASNLETGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRKIPYTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO: 29);

>A0 抗体 VH 氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA
RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG

NFGNEYISYWAYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 105);

>A0 抗体 VL 氨基酸序列

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG
GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT

5 KLTVL (SEQ ID NO: 106);

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

10 另外, hB7H3 抗原蛋白的序列如下:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFA
EGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVARNPVLQQDAHSSVTITPQRS
15 PTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSF
TEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAV
SLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVARNPVLQQDAHGSVTITGQP
MT DYKDDDDDKHHHHHH (SEQ ID NO: 111);

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

FKIPIEELED RVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCN
GTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVASAENAQCEKELQALEKENAQL
WELQALEKELAQDYKDDDDDK (SEQ ID NO: 112);

25 hCD3 抗原的 ϵ 亚基序列:

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

30

实施例 2、抗体 CH1/CL 结构域的替换

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

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

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

- 5>IL6Ra.0 链序列为：
GILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERS
KTFTTWVMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGT
PW（SEQ ID NO： 30）；
> IL6Rb.0 链序列为：
- 10FDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDAS
TWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGIT
（SEQ ID NO： 31）；
>T.0 链序列为：
GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQGRFHI
15ENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI（SEQ ID NO： 32）；
> O.0 链序列为：
SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFR
LAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA （SEQ ID
NO： 33）；
- 20>OL.0 链序列为：
QGSPPCFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP（SEQ ID
NO： 34）；

构建多种 CH1/CL 被替换的抗体，按照测试例 2 和 4 的方法，检测待测的抗体的纯度和与相应抗原的结合活性。实验结果见下表 1，实验结果表明，F0、V0、S0、N0、J0、H0、R0、和 C0 等结合不同抗原的抗体，其 CH1/CL 同时被 T.0 链/ O.0 链或 T.0 链/ OL.0 链替换后，抗体仍保持良好的结合活性，且抗体纯度高。

表 1. CH1/CL 结构域替换后的抗体的纯度和亲和力

抗体名称		抗体结构域替换方式		抗体纯度 SEC（%）	与相应抗原结合实验 EC50（nM）
		重链 CH1 被替 换	轻链 CL 被 替换		
F0 的 CH1/CL 被替换	F0	CH1	CL	98	1.29
	F1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	47	71.6
	F2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	59.28
	F3	T.0	O.0	100	2.83
	F4	T.0	OL.0	100	2.17
V0 的 CH1/CL 被替换	V0	CH1	CL	86	1.8
	V1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	38	38.4
	V2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	-
	V3	T.0	O.0	99	3.6

	V4	T.0	OL.0	97	2.9
	V5	O.0	T.0	98	3.2
	V6	OL.0	T.0	97	4.7
S0 的 CH1/CL 被替换	S0	CH1	CL	97	1.01
	S1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	NA	-
	S2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	-
	S3	T.0	OL.0	83	3.5
	S4	OL.0	T.0	90	1.96
N0 的 CH1/CL 被替换	N0	CH1	CL	99	0.82
	N1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	100	1229
	N2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	766.5
	N3	T.0	O.0	90	6.45
	N4	T.0	OL.0	83	5.93
	N5	O.0	T.0	90	5.24
J0 的 CH1/CL 被替换	J0	CH1	CL	95	0.08
	J1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	NA	-
	J2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	179
	J3	OL.0	T.0	93	0.25
H0 的 CH1/CL 被替换	H0	CH1	CL	NA	1.74
	H1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	19.35
	H2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	80	24.38
	H3	T.0	O.0	95	2.753
	H4	T.0	OL.0	95	2.702
R0 的 CH1/CL 被替换	R0	CH1	CL	NA	1.75
	R1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	24.45
	R2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	60	18.4
	R3	O.0	T.0	98	1.576
	R4	OL.0	T.0	98	1.667
	R5	T.0	O.0	98	1.589
	R6	T.0	OL.0	97	2.016
C0 的 CH1/CL 被替换	C0	CH1	CL	96	5.81
	C1	O.0	T.0	95	17.7
	C2	OL.0	T.0	99	16.48

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

5

实施例 3、CH1/CL 结构域改造抗体的优化设计

对 Titin Ig-样 152 结构域（T.0 链）、Obscurin Ig-样 1 结构域（O.0 链）、Obscurin-样 Ig-样 1 结构域（OL.0 链）的个别氨基酸进行突变，包括氨基酸的插入、缺失或替换，验证结构域改造抗体的活性。

10

示例性地，首先，通过对 T.0 链、O.0 链以及 OL.0 链上的少量氨基酸进行突变，增加链间二硫键；其次，还对结构域中的其它个别氨基酸进行突变，例如对 Obscurin Ig-样 1 结构域的第 7、62、11 位进行氨基酸突变；在 Titin Ig-样 152 结构域 N 端增、减氨基酸（例如增加 5 个野生型 Titin 蛋白中紧邻 Titin Ig-样 152 结构域 N 端的 5 个氨基酸“KAGIR”）；在 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端增、减少氨

5 氨基酸（例如增加 5 个野生型 Obscurin 蛋白中紧邻 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端的 5 个氨基酸“DQPQF”）；此外，还在 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的 N 端或 C 端添加连接序列（例如在 N 端增加“G₄S”、“（G₄S）₂”连接序列），抗体 VH 或 VL 的 C 端通过连接序列与 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域连接。具体结构域优化设计见表 2。

表 2. T.0 链、O.0 链、OL.0 链的氨基酸突变

Titin-T 链		Obscurin-O 链		Obscurin-样-O 链	
名称	突变方式	名称	突变方式	名称	突变方式
T.0	野生型（SEQ ID NO: 32）	O.0	野生型（SEQ ID NO: 33）	OL.0	野生型（SEQ ID NO: 34）
T.1	C25S, C39T, A8C	O.1	A88C	OL.1	C6E, V74C
T.2	C25S, C39T, V20C	O.2	A3C	OL.2	C6E, G84C
T.3	C25S, C39T, A26C	O.3	R9C	OL.3	C6E, A86C
T.4	C25S , C39T , T22C	O.4	C25S, C76S, A88C	OL.4	C6E, C26S, C77S, V74C
T.5	C25S , C39T , A8C +Titin_KAGIR	O.5	C25S, C76S, A3C	OL.5	C6E, C26S, C77S, G84C
T.6	C25S, C39T, A8C +（G ₄ S） ₁ 连接序列	O.6	C25S, C76S, R9C	OL.6	C6E, C26S, C77S, A86C
T.7	C25S, C39T, A8C +（G ₄ S） ₂ 连接序列	O.7	C25S, C76S, A88C, L7K, T62K		
		O.8	C25S, C76S, A88C, L7K, T62H		
		O.9	C25S, C76S, A88C, K11L, T62K		
		O.10	C25S, C76S, A88C, K11L, T62H		
		O.11	C25S, C76S, A88C+Obscurin_DQPQF		
		O.12	C25S, C76S, A88C, L7K, T62K+Obscurin_DQPQF		

		O.13	C25S, C76S, A88C, L7K, T62H+Obscurin_DQPQF		
		O.14	C25S, C76S, A88C, L7R, T62K+Obscurin_DQPQF		
		O.15	C25S, C76S, A88C, L7R, T62H+Obscurin_DQPQF		
		O.16	C25S, C76S, A88C + (G ₄ S) ₁ 连接序列		
		O.17	C25S, C76S, A88C + (G ₄ S) ₂ 连接序列		

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

5 部分氨基酸突变后的 Titin-T 链、Obscurin-O 链、Obscurin-样-O 链序列如下：
 >T.1 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变)

 GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFH
IENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
35) ;

10 >T.2 (T.0 具有 C25S, C39T, V20C 的突变)
 GIPPKIEALPSDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFH
IENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
36) ;

 >T.3 (T.0 具有 C25S, C39T, A26C 的突变)
15 GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFH
IENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
37) ;

 >T.4 (T.0 具有 C25S, C39T, T22C 的突变)
 GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRF
20 HIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
38) ;

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

NO: 39) ;

>T.6 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变; N 端添加 (G₄S)₁ 连接子)

GGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQ
EQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ

5 ID NO: 40) ;

>T.7 (T.0 具有 C25S, C39T, A8C 的突变; N 端添加 (G₄S)₂ 连接子)

GGGGSGGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGR
KIHSQEQQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
(SEQ ID NO: 41) ;

10 >O.1 (O.0 具有 A88C 突变)

SGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFACVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 42) ;

>O.2 (O.0 具有 A3C 突变)

15 SGCP RFLTRPKAFVVS VGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 43) ;

>O.3 (O.0 具有 R9C 突变)

20 SGAPRFLTCPKAFVVS VGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 44) ;

>O.4 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变)

25 SGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 45) ;

>O.5 (O.0 具有 C25S, C76S, A3C 突变)

SGCP RFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 46) ;

30 >O.6 (O.0 具有 C25S, C76S, R9C 突变)

SGAPRFLTCPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 47) ;

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

35 SGAPRFBKTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAEA (SEQ ID
NO: 48) ;

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

SGAPRFKTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 49) ;

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

SGAPRFLTRPLAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 50) ;

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

10 SGAPRFLTRPLAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID
NO: 51) ;

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

15 DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 52) ;

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

20 DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 53) ;

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

DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 54) ;

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

DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 55) ;

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

30 DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 56) ;

>O.16 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变; N 端添加 (G₄S)₁ 连接子)

35 GGGGSSGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVA
AGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA
(SEQ ID NO: 57) ;

>O.17 (O.0 具有 C25S, C76S, A88C 突变; N 端添加 (G₄S)₂ 连接子)

GGGGSGGGGSSGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKD

QQPVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV
DAEA (SEQ ID NO: 58) ;

>OL.1 (OL.0 具有 C6E, V74C 突变)

5 QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVCRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 59) ;

>OL.2 (OL.0 具有 C6E, G84C 突变)

10 QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAACEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 60) ;

>OL.3 (OL.0 具有 C6E, A86C 突变)

15 QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGECYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 61) ;

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

20 QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVSRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 62) ;

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

25 QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAACEAYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 63) ;

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

30 QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASER
LSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAAGECYAAAAVTVLEPP (SEQ
ID NO: 64) 。

利用上述突变的或结构改造的 Titin-T 链、Obscurin-O 链、Obscurin-样-O 链
构建多种 CH1/CL 被替换的抗体，通过本披露的测试例 4 的方法，检测优化后各
30 突变抗体与相应抗原结合的结合活性，实验结果见表 3。结果表明，二硫键改造后
抗体保持良好抗原结合活性。

表 3. CH1/CL 结构域改造后的抗体亲和力

抗体名称		抗体结构域替换方式		与相应抗原结合实 验 EC50 (nM)
		重链 CH1 被替 换	轻链 CL 被替 换	
F0 的 CH1/CL 被替换	F3	T.0	O.0	2.64
	F5	T.1	O.1	1.21
	F6	T.2	O.2	2.71
	F7	T.3	O.3	3.38

	F8	T.1	O.4	3.14
	F9	T.2	O.5	3.52
	F10	T.3	O.6	3.94
	F4	T.0	OL.0	3.01
	F11	T.1	OL.1	6.15
	F12	T.2	OL.2	8.19
	F13	T.4	OL.3	6.08
	F14	T.1	OL.4	5.15
	F15	T.2	OL.5	4.44
H0 的 CH1/CL 被替换	H3	T.0	O.0	3.24
	H5	T.1	O.1	3.40
	H6	T.2	O.2	2.10
	H7	T.3	O.3	2.70
	H8	T.1	O.4	2.11
	H9	T.2	O.5	2.92
	H10	T.3	O.6	2.86
	H4	T.0	OL.0	3.28
	H11	T.1	OL.1	3.38
	H12	T.2	OL.2	4.34
	H13	T.4	OL.3	3.56
	H14	T.1	OL.4	2.61
	H15	T.4	OL.6	4.26
R0 的 CH1/CL 被替换	R5	T.0	O.0	4.13
	R7	T.1	O.1	4.89
	R8	T.2	O.2	3.84
	R9	T.3	O.3	3.95
	R10	T.1	O.4	3.20
	R11	T.2	O.5	3.30
	R12	T.3	O.6	4.36
N0 的 CH1/CL 被替换	N3	T.0	O.0	4.5
	N6	T.2	O.5	8.4
	N4	T.0	OL.0	4.6
	N7	T.5	OL.1	2.8
	N8	T.5	OL.4	2.6

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

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

表 4. CH1/CL 结构域改造后抗体的纯度及结合活性的检测结果

抗体名称		抗体结构域替换方式		抗体纯度 SEC（%）	与相应抗原结合 实验 EC50（nM）
		重链 CH1 被替换	轻链 CL 被替换		
F0 的	F16	T.5	O.4	65	2.0

CH1/CL 被替换	F17	T.5	O.7	72	4.8
	F18	T.1	O.8	70	3.9
	F19	T.5	O.8	68	2.2
	F20	T.1	O.9	71	1.9
	F21	T.5	O.9	68	3.4
	F22	T.1	O.10	74	2.4
	F23	T.5	O.10	73	4.1
	F24	T.1	O.12	71	2.4
	F25	T.5	O.12	66	2.6
	F26	T.1	O.13	73	2.6
	F27	T.5	O.13	71	1.2
	F28	T.1	O.14	75	2.4
	F29	T.5	O.14	68	3.6
	F30	T.1	O.15	75	3.4
	F31	T.5	O.15	69	2.4
	F32	T.6	O.17	72	3.69
	F33	T.7	O.16	69	1.92
	F34	T.7	O.17	73	2.38
N0 的 CH1/CL 被替换	N10	T.5	O.4	89	3.0
	N11	T.1	O.7	86	5.0
	N12	T.1	O.8	84	5.3
	N13	T.5	O.8	82	2.9
	N14	T.1	O.9	92	1.9
	N15	T.5	O.9	92	2.6
	N16	T.5	O.10	91	3.4
	N17	T.1	O.11	90	2.2
	N18	T.5	O.11	89	3.2
	N19	T.1	O.12	84	4.3
	N20	T.5	O.12	84	2.8
	N21	T.5	O.13	84	5.2
	N22	T.5	O.14	87	4.5
	N23	T.1	O.15	86	9.4
	N24	T.5	O.15	84	6.7
	N25	T.6	O.17	92	0.62
	N26	T.7	O.16	93	0.84
	N27	T.7	O.17	94	0.67
R0 的 CH1/CL 被替换	R10	T.1	O.4	84	0.37
	R13	T.5	O.4	76	0.4
	R14	T.5	O.7	78	0.2
	R15	T.5	O.8	82	0.3
	R16	T.5	O.9	80	0.33
	R17	T.5	O.10	77	0.4
	R18	T.5	O.11	71	0.44
	R19	T.5	O.12	78	0.36
	R20	T.5	O.13	75	0.39
	R21	T.5	O.14	77	0.37
	R22	T.5	O.15	74	0.39

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

另外，还对 Titin Ig-样 152 结构域、Obscurin Ig-样 1 结构域的其它氨基酸进行突变，具体氨基酸突变设计如表 5。

表 5. T.1 链/O.9 链的氨基酸突变设计

Titin-T 链		Obscurin-O 链	
名称	突变方式	名称	突变方式
T.1	T.1 (SEQ ID NO: 35)	O.9	O.9 (SEQ ID NO: 50)
T.8	T.1+ (M66S, T77S)	O.18	O.9+ (L11K, A12S, F13Y, V14T, T22S)
T.9	T.1+ (M66K, K70R, S79T, G81R)	O.19	O.9+ (G2E, V17E, N30D, T32P, Q34E, S36T, V44I, A45T, L58V, K62E, A67Q, G69S, A97G)
T.10	T.1+ (P3W, S11I, I13L, T22M, N82M)	O.20	O.9+ (D20L, T22M, A53L)
T.11	T.1+ (S11I, M66K, S79T, G81R)	O.21	O.9+ (Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L)
T.12	T.1+ (G40S, R42K, H45S, Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V, E83D, F84L)	O.22	O.9+ (Q42L, A45T, A67T, G69S, Q92E, D94G)
T.13	T.1+ (Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V)	O.23	O.9+ (A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G)
T.14	T.1+ (N56S, D58E, L75V)	O.24	O.9+ (Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L) + (G4S) ₁ 连接序列
T.15	T.1+ (N56S, D58E, M66S, T77S)	O.25	O.9+ (A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G), + (G4S) ₁ 连接序列
T.16	T.1+ (S11I, M66K, S79T, G81R), + (G4S) ₁ 连接序列	O.26	O.9+ (A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G), + DQPQF
T.17	T.1+ (N56S, D58E, M66S, T77S), + KAGIR	O.27	O.9+ (A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G), + DQPQF, + (G4S) ₁ 连接序列
T.18	T.1+ (N56S, D58E, M66S, T77S), + KAGIR, + (G4S) ₁ 连接序列		
T.19	T.1+ (N56S, D58E, M66S, T77S), + (G4S) ₁ 连接序列		

备注：表中，例如 T.8 表示对 T.1 (SEQ ID NO: 35) 序列进行 M66S、T77S 氨基酸突变后获得的 Titin-T 链；O.24 表示对 O.9 (SEQ ID NO: 50) 先进行 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变，然后在

N 末端添加“DQPQF”序列，最后在 N 末端添加“GGGGS”连接序列后获得的 Obscurin-O 链，其它依此类推。

T.1 链和 O.9 链的突变体序列如下：

> T.8 (T.1 具有 M66S, T77S 突变)

5 GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHI
ENTDDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 65);

> T.9 (T.1 具有 M66K, K70R, S79T, G81R 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHI
IENTDDLTTLIKDVQRQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 66);

10 > T.10 (T.1 具有 P3W, S11I, I13L, T22M, N82M 突变)

GIWPKIECLPIDLSIDEGKVLMTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHI
HIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
67);

> T.11 (T.1 具有 S11I, M66K, S79T, G81R 突变)

15 GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHI
ENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 68);

> T.12 (T.1 具有 G40S, R42K, H45S, Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V,
E83D, F84L 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTSGKKISSEEGGRFHI
20 ESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
69);

> T.13 (T.1 具有 Q47E, Q49G, N56S, D58E, L75V 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEGGRFHI
ESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 70);

25 > T.14 (T.1 具有 N56S, D58E, L75V 突变)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHI
IESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO:
71);

> T.15 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变)

30 GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHI
IESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 72);

> T.16 (T.1 具有 S11I, M66K, S79T, G81R 突变+ (G₄S)₁ 连接序列)

GGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE
QGRFHI
IENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID
35 NO: 73);

> T.17 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变, + KAGIR)

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE

QGRFHIEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 74);

> T.18 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变, + KAGIR, + (G₄S)₁ 连接序列)

5 GGGGSKAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGR
KIHSQEQGRFHIEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
(SEQ ID NO: 75);

> T.19 (T.1 具有 N56S, D58E, M66S, T77S 突变, + (G₄S)₁ 连接序列)

GGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI (SEQ ID NO: 76);

> O.18 (O.9 具有 L11K, A12S, F13Y, V14T, T22S 突变)

15 SGAPRFLTRPKSYTVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 77);

> O.19 (O.9 具有 G2E, V17E, N30D, T32P, Q34E, S36T, V44I, A45T, L58V, K62E, A67Q, G69S, A97G 突变)

20 SEAPRFLTRPLAFVVSEGKDATLSSQIVGDPPPEVTWEKDQQPITAGARFRL
AQDGDVYRLEILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEG (SEQ ID NO: 78);

> O.20 (O.9 具有 D20L, T22M, A53L 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKLAMLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARF
RLLQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 79);

25 > O.21 (O.9 具有 Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L 突变)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAGARF
RLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 80);

> O.22 (O.9 具有 Q42L, A45T, A67T, G69S, Q92E, D94G 突变)

30 SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFR
LAQDGDLYRLKILDLTLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 81);

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

35 SGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFR
LAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA (SEQ ID NO: 82);

> O.24 (O.9 具有 Q41K, A45T, A67Q, G69S, V89L 突变; + (G4S) 1 连接序列)

GGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVT
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA
5 (SEQ ID NO: 83);

> O.25 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G 突变, + (G4S) 1 连接序列)

GGGGSSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVT
AGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLGVGAEA
10 (SEQ ID NO: 84);

> O.26 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G 突变; + DQPQF)

DQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTA
GARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLGVGAEA
15 (SEQ ID NO: 85);

> O.27 (O.9 具有 A12S, F13Y, T22S, Q42L, A45T, A67Q, G69S, Q92E, D94G 突变; + DQPQF; 和+ (G4S) 1 连接序列)

GGGGSDQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKD
QLPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLGVG
20 AEA (SEQ ID NO: 86)。

利用上述突变或结构改造的 Titin-T 链、Obscurin-O 链, 构建 CH1/CL 被替换的抗体, 并通过本披露的测试例 4 的方法对 CH1/CL 被替换的抗体进行检测, 实验结果见表 6 所示。结果显示, CH1/CL 被优化后的 Titin-T 链、Obscurin-O 链
25 替换后, 抗体仍保持良好抗原结合活性。

表 6. CH1/CL 被替换后抗体与相应抗原结合实验结果

抗体		抗体结构域替换方式		与相应抗原结合实验 EC50 (nM)
		重链 CH1 被替换	轻链 CL 被替换	
B0 的 CH1/CL 被 替换	B0	CH1	CL	0.2
	B1	T.1	O.9	0.28
	B2	T.8	O.18	0.19
	B3	T.9	O.19	0.5
	B4	T.11	O.21	0.25
	B5	T.12	O.22	0.29
	B6	T.13	O.22	0.19
	B7	T.14	O.22	0.35
	B8	T.15	O.23	0.16
U0 的	U0	CH1	CL	0.06
	U1	T.1	O.9	0.03

CH1/CL 被 替换	U2	T.8	O.18	0.07
	U3	T.9	O.19	0.02
	U4	T.11	O.21	0.06
	U5	T.12	O.22	0.11
	U6	T.13	O.22	0.11
	U7	T.14	O.22	0.07
	U8	T.15	O.23	0.16
D0 的 CH1/CL 被 替换	D0	CH1	CL	0.089
	D1	T.1	O.9	0.026
	D2	T.9	O.19	0.056
	D3	T.11	O.21	0.083
	D4	T.12	O.22	0.103
	D5	T.13	O.22	0.134
	D6	T.14	O.22	0.132
	D7	T.15	O.23	0.102
I0 的 CH1/CL 被 替换	I0	CH1	CL	1.424
	I2	T.8	O.18	3.195
	I3	T.11	O.21	2.989
	I4	T.12	O.22	4.132
	I5	T.13	O.22	3.592
	I6	T.14	O.22	4.121
	I7	T.15	O.23	3.153

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

另外，通过本披露测试例 1 的方法对 CH1/CL 被替换后的抗体的蛋白表达量进行检测，实验结果见表 7。结果显示，Titin Ig-样 152 结构域和 Obscurin Ig-样 1 结构域的一些氨基酸突变后，抗体的表达量获得了很大的提高。

表 7. CH1/CL 结构域改造后抗体表达量

抗体		抗体结构域替换方式		抗体表达量 (mg/L)
		重链 CH1 被 替换	轻链 CL 被替 换	
B0 的 CH1/CL 被替换	B1	T.1	O.9	9.4
	B2	T.8	O.18	25.6
	B3	T.9	O.19	13.9
	B4	T.11	O.21	21.4
D0 的 CH1/CL 被替换	D1	T.1	O.9	5.9
	D2	T.9	O.19	44.4
	D3	T.11	O.21	40.5
	D4	T.12	O.22	17.8
	D5	T.13	O.22	21.4
	D6	T.14	O.22	23.3
	D7	T.15	O.23	34.3
I0 的	I1	T.1	O.9	2.1

CH1/CL 被替换	I2	T.8	O.18	11.0
	I3	T.11	O.21	10.4
	I4	T.12	O.22	4.0
	I5	T.13	O.22	4.6
	I6	T.14	O.22	8.2
	I7	T.15	O.23	6.9

实施例 4、CH1/CL 结构域改造后抗体的半衰期

为了评价抗体的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链或 Titin-T 链/ Obscurin-样-O 链替换后，抗体在动物体内的稳定性是否受影响，我们检测了替换前后抗体在大鼠体内的半衰期。示例性地，我们分别检测了 F0 抗体的 CH1/CL 被 T.1/O.9 替换后的抗体 F20，以及 C0 抗体的 CH1/CL 被 T.1/O.9 替换后的抗体 C3 在大鼠体内的半衰期。具体方法如下：

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

实验结果见表 8，结果显示，抗体的 CH1/CL 被替换成 Titin-T 链/Obscurin-O 链后，抗体在大鼠体内仍然保有原始抗体的半衰期，提示 CH1/CL 被替换后的抗体和原始抗体一样，在体内具有良好的稳定性。

表 8. CH1/CL 结构域被替换的抗体半衰期

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

实施例 5、双特异抗体的构建与检测

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

一、双特异抗体的构建

首先，我们构建了 DI-1 双特异性抗体，DI-1 双特异性抗体是由 D0 抗体的一条重链（Fc 区进行 knob 修饰）和一条轻链，与 I0 抗体的 CH1/CL 被 Titin-T 链

/Obscurin-O 链替换后的改造抗体的一条重链（Fc 区进行 hole 修饰）和一条轻链所构成的 IgG 样双特异性抗体，其结构示意图见附图 5，其序列如下所示：

DI-1 链 1（DI-1-H1）的氨基酸序列：

5 **EVQLLES**GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSG
ITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPG**
TTVIMSWFDPWGQGTLTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY**
FPEPVT**SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**TV**PSSSLGTQTYICNVNH**
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 10 **TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ**
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK*GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL*
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 87）；

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

DI-1 链 2（DI-1-L1）的氨基酸序列：

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 20 SQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO: 88）；

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

DI-1 链 3（DI-1-H2）的氨基酸序列：

25 **QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIW**
GDGTTDYNSAVKSRV**TISKDT**SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYA
TSYYFDYWQGTLTVSS**GGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTP**
EVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDS
ATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 30 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAK*GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP*
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 89）；

35 备注：序列中，粗体字部分为 I0 的 VH，单下划线部分为 T.16，点划线部分为 CH2，斜体字部分为 CH3；

DI-1 链 4（DI-1-L2）的氨基酸序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIY
YTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGT
 40 KLEIKGGGGSSGAPRFLTRPLAFVSVSGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQP
VTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA
 （SEQ ID NO: 90）；

备注：序列中，粗体字部分为 I0 的 VL，单下划线部分为 O.24。

45 另外，构建了由 B0 或 B0 的 CH1/CL 结构改造抗体与 U0 或 U0 的 CH1/CL 结构改造抗体构建的 IgG 样双特异性抗体（示例性的，BU5 结构示意图见附图 8），

所得双特异性抗体的四条链序列如下表 9:

表 9. IgG 样双特异性抗体序列表

双 抗 名 称	IgG 样双特异性抗体四条链序列			
	链 1	链 2	链 3	链 4
B U 1	B0 的重链（knob）	B0 的轻链	U0 的重链（hole），且 CH1 被 T.19 替换	U0 的轻链，且 CL 被 O.25 替换
	QVQLQQSGAEVKKPGSS VRVSCKASGGTFNNNAIN WVRQAPGQGLEWMGGI IPMFGTAKYSQNFQGRVA ITADESTGTASMESSLRS EDTAVYYCARSRDLLLP HHALSPWGRGTMVTVSS <u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPVTV</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVVTVPSSSLGT</u> <u>QTYICNVNHKPSNTKVDK</u> <u>KVEPKSCDKTHTCPPCPAP</u> <u>EAAGGPSVFLFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPCREEMTKNQ</u> <u>VSLWCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSV</u>MHEALHNHYTQK <u>SLSLSPGK</u>（SEQ ID NO: 91）	SSELTQDPA VSVALGQT VRVTCQG DSLRSYYA SWYQQKP GQAPVLVI YGKNNRPS GIPDRFSGS SSGNTASLT ITGAQAED EADYYCSS RDSSGNH WVFGGGT ELTVLGOP KAAPSVTL FPPSSELO ANKATLVC LISDFYPGA VTVAWKAD SSPVKAGV ETTPSKQS NNKYAASS YLSLTPEQ WKSHRSYS CQVTHEGS TVEKTVAP TECS（SEQ ID NO: 92）	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWL GWVRQMPGKGLDWIGI MSPVDSDIRYSPSFQQQ VTMSVDKSITTAYLQWN SLKASDTAMYYCARRR PGQGYFDFWGQGTLVT <u>VSSGGGGSGIPPKIECLPS</u> <u>DISIDEGKVLTVASAFTGE</u> <u>PTPEVTWSTGGRKIHSQE</u> <u>QGRFHIEDLTTLIISDV</u> <u>QKQDGGGLYSLSLGNEFGS</u> <u>DSATVNIHIRSIDKTHTCP</u> <u>PCPAPEAAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVV</u> <u>DVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVCTL</u> <u>PPSREEMTKNQVSLSCAVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPEN</u> <u>NYKTTPPVLDSDGSFFLV</u> <u>SLTVDKSRWQQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>（SEQ ID NO: 93）	DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQS GVPSRFSG SGSGTDFT LTISSLQPE DFATYYCQ QYNIYPYT FGQGTKL EIKGGGGS SGAPRFLTR PLSYVVSV GKDASLSS QIVGNPTP QVSWEKD QLPVTAGA RFRLAQDG DLYRLKIL DLQLSDSG QYVSRARN AIGEAFAC VGLEVGAE A（SEQ ID NO: 94）
B	U0 的重链（knob）	U0 的轻链	B0 的重链(hole), 且 CH1 被 T.19 替换	B0 的轻链，且 CL 被 O.27

U 2	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWLG WVRQMPGKGLDWIGIM SPVDSDIRYSPSFQGQVT MSVDKSITTAYLQWNSLK ASDTAMYYCARRRPGQG YFDFWGQGTLVTVSS<u>AST</u> <u>KGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> <u>AALGCLVKDYFPEPTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQS</u> <u>SGLYSLSVVTVPSSSLGTQ</u> <u>TYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKTHTCPPCPAPE</u> <u>AAGGPSVFLFPPKPKDTLM</u> <u>ISRTPEVTCVVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHODWLNKGKEYCKVS</u> <u>NKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPCREEMTKNQ</u> <u>VSLWCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 95)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQS GVPSRFSG SGSGTDFT LTISSLQPE DFATYYCQ QYNIYPYT FGQGTKLE IKRTVAAPS VFIFPPSDE QLKSGTAS VVCLLNNF YPREAKVQ WKVDNAL QSGNSQES VTEQDSKD STYSLSSL TLSKADYE KHKVYACE VTHQGLSS PVTKSENR <u>GEC</u> (SEQ ID NO: 96)	QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNNA INWVRQAPGQGLEWM GGIIPMFGTAKYSQNFQ GRVAITADESTGTASME LSSLRSEDNAVYYCARS RDLLLFPHHALSPWGR GTMVTVSSGGGGSGIPP KIECLPSDISIDEGKVLTV ASAFTGEPTPEVTWSTGG RKIHSQEQGRFHIEDL TTLISDVQKQDGGGLYSLS LGNEFGSDSATVNIHIRSI DKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTV LHODWLNKGKEYCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 97)	SSELTQDP AVSVALGQ TVRVTCQ GDSLRSYY ASWYQQK PGQAPVLV IYGKNNRP SGIPDRFS GSSSGNTA SLTITGAQ AEDEADY YCSSRDSS GNHWVFG GGTELTVL GGGGSDQP QFSGAPRFL TRPLSYVV SVGKDASL SSQIVGNPT POVSWEKD QLPVTAGA RFRLAQDG DLYRLKIL DLQLSDSG QYVSRARN AIGEAFAC VGLEVGAE <u>A</u> (SEQ ID NO: 98)
B	B0 的重链 (knob), 且 CH1 被 T.19 替换	B0 的轻链, CL 被 O.27 替换	U0 的重链 (hole)	U0 的轻链

U 3	QVQLQQSGAEVKKPGSS VRVSCKASGGTFNNNAIN WVRQAPGQGLEWMGGI IPMFGTAKYSQNFQGRVA ITADESTGTASMESSLRS EDTAVYYCARSRDLLLP HHALSPWGRGTMVTVSS <u>GGGGSGIPPKIECLPSDISID</u> <u>EGKVLTVASAFTGEPTPEV</u> <u>TWSTGGRKIHSQEQGRFHI</u> <u>ESTEDLTTLISDVOKQDGG</u> <u>LYSLSLGNEFGSDSATVNIH</u> <u>IRSIDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPCREEMTKNQVSLW</u> <u>CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTTTPVLDSGGSFFL</u> <u>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u> (SEQ ID NO: 99)	SSELTQDPA VSVALGQT VRVTCQG DSLRSYYA SWYQQKP GQAPVLVI YGKNNRPS GIPDRFSGS SSGNTASLT ITGAQAED EADYYCSS RDSSGNH WVFGGGT ELTVLGGG <u>GSDQPQFS</u> <u>GAPRFLTRP</u> <u>LSYVVSVG</u> <u>KDASLSSQI</u> <u>VGNPTPOV</u> <u>SWEKDQLP</u> <u>VTAGARFR</u> <u>LAQDGDLY</u> <u>RLKILDLQL</u> <u>SDSGQYVS</u> <u>RARNAIGE</u> <u>AFACVGLE</u> <u>VGAEA</u> (SEQ ID NO: 100)	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWL GWVRQMPGKGLDWIGI MSPVDSDIRYSPSFQQQ VTMSVDKSITTAYLQWN SLKASDTAMYICARRR PGQGYFDFWGQGTILT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSREEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 101)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQS GVPSRFSG SGSGTDFT LTISSLQPE DFATYYCQ QYNIYPYT FGQGTKL EIKRTVAA PSVFIFPPS DEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAK VQWKVDN ALQSGNSQ ESVTEQDS KDSTYSLS STLTLSKA DYEKHKVY ACEVTHQG LSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 96)
B U	U0 的重链 (knob)	U0 的轻链	B0 的重链(hole), 且 CH1 被 T.18 替换	B0 的轻链, 且 CL 被 O.27 替换

4	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWLG WVRQMPGKGLDWIGIM SPVDSDIRYSPSFQGQVT MSVDKSITTAYLQWNSLK ASDTAMYYCARRRPGQG YFDFWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHODWLNNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 95)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQS GVPSRFSG SGSGTDFT LTISSLOPE DFATYYCQ QYNIYPYT FGQGTKLE IKRTVAAPS VFIFPPSDE QLKSGTAS VVCLLNNF YPREAKVQ WKVDNAL QSGNSQES VTEQDSKD STYLSSTL TLSKADYE KHKVYACE VTHOGLSS PVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 96)	QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNA INWVRQAPGGGLEWM GGIIPMFGTAKYSQNFQ GRVAITADESTGTASME LSSLRSED TAVYYCARS RDLLLFPHHALSPWGR GTMVTVSSGGGGGSKAGI RGIPPKIECLPSDISIDEGK VLTVASAFTGEPTPEVTW STGGRKIHSEQEGRFHIES TEDLTTLIISDVQKQDGGL YSLSLGNEFGSDSATVNI HIRSIDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHODWLNNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTP PVLDS DGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 102)	SSELTQDP AVSVALGQ TVRVTCQ GDSLRSYY ASWYQQK PGQAPVLV IYGKNNRP SGIPDRFS GSSSGNTA SLTITGAQ AEDEADY YCSSRDSS GNHWVFG GGTELTVL GGGGSDQP QFSGAPRFL TRPLSYVV SVGKDASL SSQIVGNPT POVSWEKD QLPVTAGA RFRLAQDG DLYRLKIL DLQLSDSG QYVSRARN AIGEAFA VGLEVGAE A (SEQ ID NO: 100)
B U 5	B0 重链 (hole), 且 CH1 被 T16 替换 QVQLQQSGAEVKKPGSSV RVSCKASGGTFNNA INW VRQAPGGGLEWMGGIIPM FGTAKYSQNFQGRVAITAD ESTGTASME LSSLRSED TA VYYCARS RDLLLFPHHALS PWGRGTMTVTVSSGGGGSG IPPKIECLPIDISIDEGK VLT V ASAFTGEPTPEVTWSTGGRK IHSEQEGRFHIENTDDLTTLII KDVQKQDGGLYTLTLRNEF GSDSATVNIHIRSIDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHODWLNNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDS DGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 103)	B0 轻链, 且 CL 被 O.24 替换 SSELTQDPA VSVALGQT VRVTCQGD SLRSYYAS WYQQKPG QAPVLVIYG KNNRPSGIP DRFSGSSSG NTASLTITG AQAEDEAD YYCSSRDSS GNHWVFG GGTELTVL GGGGSSGA PRFLTRPLAF VVSVGKDA TLSSQIVGN PTPQVSWEK DKQPVTAG ARFRLAQD GDLYRLKIL DLQLSDSGO YVSRARNAI GEAFA CLGL QVDAEA (SEQ ID NO: 104)	U0 的重链 (knob) EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWLG WVRQMPGKGLDWIGIM SPVDSDIRYSPSFQGQVT MSVDKSITTAYLQWNSLK ASDTAMYYCARRRPGQG YFDFWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHODWLNNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 95)	U0 的轻链 DIQMTQSP SSLSASVGD RVTITCRAS QGISSWLA WYQQKPE KAPKSLIYA ASSLQSGV PSRFSGSGS GTDFTLTIS SLQPEDFAT YYCQQYNI YPYTFGQG TKLEIKRTV AAPSVEIFPP SDEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAK VQWKVDN ALQSGNSQ ESVTEQDSK DSTYLSST LTLKADYE KHKVYACE VTHOGLSSP VTKSFN RG EC (SEQ ID NO: 96)

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

此外，还构建了 FA-1 双特异性抗体，FA-1 双特异性抗体是由 A0 抗体的一条重链（Fc 区进行 knob 修饰）和一条轻链，与 F0 抗体的一条重链（Fc 区进行 hole 修饰，CH1 被 T.16 替换）和一条轻链（CL 被 O.24 替换）构成的 IgG 样双特异性抗体。FA-1 的四条链序列如下表 10：

表 10. FA-1 双特异性抗体序列表

双抗名称	IgG 样双特异性抗体四条链序列			
	链 1	链 2	链 3	链 4
FA-1	F0 的重链（hole），且 CH1 被 T.16 替换	F0 的轻链，且 CL 被 O.24 替换	A0 的重链（knob）	A0 的轻链
	QVQLVQSGGGVVQPGTS LRLSCAASGFIFSSAMH WVRQAPGKGLEWVAVIS YDGSNKYYVDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSARLYAS FDYWGQGALVTVSSGGG <u>GSGIPPKIECLPIDISIDEGK</u> <u>VLTVASAFTGEPTPEVTWS</u> <u>TGGRKIHSQEQGRFHIENT</u> <u>DDLTTLIKDVQKQDGGGLY</u> <u>TLTLRNEFGSDSATVNIHIR</u> <u>SIDKTHTCPPCPAPEAAGG</u> <u>PSVFLFPPKPKDTLMIS RTP</u> <u>EVTCVVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAKGQPREPQVC</u> <u>TLPPSREEMTKNQVSLSCAV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESNGQPEN</u> <u>NYKTTTPVLDS DGSFFLVSK</u> <u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVM</u> <u>HEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 107)	DTVVTQEP SFSVSPGG TVTLTCL SSGSVSTSH YPSWYQQ TPGQAPR MLIYNTNT RSSGVPDR FSGSILGN KAALTITG AQADDES YYCAIHVD RDIWVFGG GTKLTVLG GGGSSGAP RFLTRPLAF VVSVGKDA TLSSQIVGN PTPQVSWE KDKQPVT GARFRLAQ DGDLYRLKI LDLQLSDS GQYVSRAR NAIGEAFAC LGLQVDAE A (SEQ ID NO: 108)	EVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNEYISYWAYW GQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 109)	QTVVTQE PSLTVSPG GTVTLTCL SSTGAVTS GNYPNWV QQKPGQA PRGLIGGT KFLAPGTP ARFSGSLL GGKAALT LSGVQPED EAEYYCVL WYSNRWV FGGGTKL TVLRTVAA PSVFIFPPS DEQLKSGT ASVVCLLN NFYPREAK VQWKVDN ALQSGNSQ ESVTEQDS KDSTYSLS STLTLSKA DYEKHKVY ACEVTHQG LSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 110)

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

二、双特异抗体的检测

通过本披露测试例 3 方法检测 DI-1，将 DI-1 的四条链共同转染细胞进行表达，然后进行质谱分析，实验结果见表 11 和附图 6A-图 6C，质谱分析结果未检测到同

型二聚体和错配分子，DI-1 正确组装。

表 11. DI-1 质谱数据

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

另外，通过本披露测试例 3 和测试例 2 方法检测 BU5 表达。首先将 BU5 的四
5 条链共同转染细胞表达双特异性抗体，另外 B0、U0 做为对照。然后对表达产物进
行纯度及质谱分析，实验结果见表 12 及附图 9A 至图 9C，实验结果表明，双特异
性抗体 BU5 被成功表达，BU5 四条链成功组装成目标分子，且无错配出现。且双
特异性分子 BU5 纯度高，SEC%达 88%。

表 12. BU5 质谱分析结果

抗体	质谱分析
对照 B0	✓
对照 U0	✓
BU5	✓

10 备注：表中，“✓”表示正确配对

此外，通过本披露的测试例 2 和测试例 4 的方法检测构建的 BU1- BU4 双特
异性抗体的抗体纯度以及抗原结合活性，实验结果见表 13，实验结果表明，CH1/CL
被替换后的双特异性抗体，仍保持良好的抗原结合活性，且抗体纯度高。

15 表 13、双特异性抗体抗原结合活性及纯度实验结果

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

测试例

测试例 1、抗体的表达量测试方法

使用单克隆抗体或双特异性抗体的表达质粒转染 HEK293E 细胞，6 天后收集
20 表达上清，高速离心去除杂质。上清用 Protein A 柱（GE Healthcare）进行纯化。

用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线，再用 100mM 乙酸缓冲液（pH3.5）冲洗层析柱，用 1M Tris-HCl，pH8.0 中和。抗体的表达量由最终纯化得到的抗体量/表达体积来定量。

5 **测试例 2、抗体的纯度检测方法**

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

10

测试例 3、抗体质谱检测方法

（一）样品准备：

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

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

（二）色谱-质谱条件：

色谱条件：

色谱柱： Poroshell 300SB-C8 5um 2.1*75mm

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

25 柱温： 75℃

梯度：

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

质谱条件：

质谱： Agilent 6530 Q-TOF LC-MS

电离模式 ESI

30 采集模式： 1 GHz（质量范围 500–5000 m/z）

干燥气温度： 325℃

干燥气流量： 10 L/min

雾化器： 40psi

鞘气温度： 350℃

鞘气流速：12L/min

喷雾电压：500V

毛细管电压：3，500 V

裂解电压：200 V

5 Skimmer 电压：65V

Rf 电压：7500V

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

10 测试例 4、抗体结合活性检测方法

对膜蛋白靶点的抗体，其与抗原结合活性检测可采用 FACS 的方法。例如，C0、N0、F0、V0、S0，及其 CH1/CL 结构改造抗体，可通过 FACS 的方法进行检测。在 96 孔 U 型底板（corning, 3795）中加入 FACS 缓冲液（98% PBS，2% FBS）重悬的细胞（ 2×10^6 细胞/ml，90 μ l），并加入 10 μ l 梯度稀释的抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育 1h，15 FACS 缓冲液清洗 2 次，随后每孔加入 Alexa Fluor 488 羊抗-人 IgG（H+L）（invitrogen, Cat# 2015982，1:1000 稀释），4 $^{\circ}$ C 孵育一小时，清洗 2 次后用 FACS 缓冲液重悬细胞，最后用 FACS CantoII（BD）读取荧光信号值。最后用 FlowJo 7.6 和 Graphpad Prism 5 对数据进行处理分析。

对于靶点为可溶性蛋白的抗体，用 ELISA 的方法检测抗体与可溶性蛋白的结合活性，例如，D0、I0、B0、U0、H0、R0、J0，及其 CH1/CL 结构改造抗体，可通过 ELISA 的方法检测。方法如下：用 pH7.4 的 PBS（源培生物，B320）缓冲液将蛋白稀释至 1 μ g/ml，以 100 μ l/孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning, 9018）中，4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 300 μ l 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶（BD，232100）进行封闭，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（PH7.4 PBS 含 0.1% tween-20）洗板 3 次后，每孔加入 100 μ l 梯度稀释的抗体溶液，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μ l 鼠抗-人 IgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch, 209-035-088，1:8000 稀释），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 100 μ l TMB 显色底物（KPL, 5120-0077），室温孵育 10-15 min，每孔加入 50 μ l 1 M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 20 处的吸收值，用软件拟合出抗体与抗原的结合曲线，计算出 EC₅₀ 值。30

本测试例中抗体相应抗原如下：D0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hRANKL（购自 Sino biological, 11682-HNCH）；I0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hNGF（购自 Sino biological, 11050-HNAC）；B0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hBAFF（购自 Sino biological, 10056-HNCH）；U0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hP40（购自 Sino biological, 10052-H08H）；H0、R0，及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hIL-5（购自 R&D systems，35

205-IL-025/CF); J0 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 hTSLP (购自 Sino biological, 16135-H08H); C0、N0, 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 CEA (过表达 CEA 细胞 MKN45 (购自南京科佰, CBP60488)); F0、V0、S0, 及其 CH1/CL 结构改造抗体结合的抗原为 B7H3 (过表达 B7H3 重组细胞系 CT26-B7H3 (CT26 来源于中科院细胞库, B7H3 序列参见 ID: XP_005254757.1))。

测试例 5、CH1/CL 结构改造抗体减少错配实验方法

一、不同抗体轻/重链交叉错配分子的表达检测方法

本实验通过分析不同轻/重链抗体配对表达来验证 CH1/CL 被 Titin-T 链 /Obscurin-O 链或 Titin-T 链/ Obscurin-样-O 链替换后能有效减少重/轻链错配的发生。具体地, 在转染细胞表达抗体时, 将 D0 和 I0 的重/轻链分别交换 (即 I/D-1 (D0 重链+I0 轻链); I/D-2 (I0 重链+D0 轻链) 来检测野生型 CH1 和 CL 是否会形成交叉错配分子; 同时, 将 D0 和 I0 的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换后的结构改造的抗体 D3 (D0 的重链 CH1 被 T.11 替换, 轻链 CL 被 O.21 替换)、 I3 (I0 的重链 CH1 被 T.11 替换, 轻链 CL 被 O.21 替换) 的重轻链分别交换, 构建错配分子: I/D-3 (D0 重链+I3 轻链)、I/D-4 (D3 重链+I0 轻链)、I/D-5 (I0 重链+I3 轻链)、I/D-6 (I3 重链+D0 轻链), 构建的抗体结构示意图见附图 7。

通过测试例 1 方法检测抗体表达量, 通过测试例 3 方法对表达产物进行质谱分析, 检测是否会形成错配分子。实验结果见表 14, 实验结果表明, D0 重链+I0 轻链, 或 I0 重链+D0 轻链, 共同表达时, 均可形成完整 IgG 分子 (150kDa), 表达量很高, 分别达到 74.4mg/L 和 73.8mg/L, 且 LC-MS 结果证明所得蛋白为错配后的 IgG 分子, 这说明如果不对 CH1-CL 进行改造或替换, 双特异性抗体的四条不同重轻链共同表达, 将会形成大量轻/重链错配分子。而经 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换 CH1/CL 后, I/D-3 (D0 重链+I3 轻链)、I/D-4 (D3 重链+I0 轻链)、I/D-5 (I0 重链+I3 轻链)、I/D-6 (I3 重链+D0 轻链) 四种形式交叉错配表达均无目的分子产生 (150kDa), 除 D3 重链+I0 轻链组合形成有少量两条重链的错误分子外 (分子量为 100kDa,), 其他三种形式无错配分子产生, 这说明改造后的非同源配对不会形成 IgG 结构形式的错配分子。因此, 用 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换 CH1-CL 后将有效避免或减少 IgG 样的双特异性抗体的轻/重链间的非同源交叉配对分子的形成。

表 14. 不同轻/重链交叉配对的抗体表达量和质谱分析

错 配 名称	重链	轻链	抗体表达 量 (mg/L)	质谱分析
I/D-1	D0 重链	I0 轻链	74.4	√
I/D-2	I0 重链	D0 轻链	73.8	√
I/D-3	D0 重链	I3 轻链	0.04	×
I/D-4	D3 重链	I0 轻链	12.75	只有重链, 无轻链

I/D-5	I0 重链	D3 轻链	0.04	×
I/D-6	I3 重链	D0 轻链	0.25	×

备注：表中，“√”表示检测到该错配分子，“×”表示未检测到该错配分子。

二、双特异性抗体轻/重链错配表达检测方法

为验证 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换后将不会发生错配或减少错配，

5 本测试例设计了三种形式的轻/重链交叉配对表达，即用两条不同的重链和一条相同的 VL-CL 轻链来做双特异性抗体表达，或两条不同的重链和一条相同的 Obscurin-O 链替换 CL 的轻链来做表达，或用两条不同的重链和两条不同的轻链的正常表达做对照（具体配对见表 15）。

然后对表达产物进行质谱分析(方法见本披露测试例 3)，并检测抗体纯度 SEC

10 （方法见本披露测试 2）。实验结果见表 15，结果表明，Obscurin-O 链替换的轻链和未进行 CL 替换的轻链共同加入时才会形成正确的分子，而只加一条未进行 CL 替换的轻链或只加一条 Obscurin-O 链替换 CL 的轻链的交叉配对中没有找到正确的目标分子。这说明被 Obscurin-O 链替换 CL 的轻链会更容易与 CH1 被 Titin-T 链替换的重链配对结合形成分子，而不会与 CH1 未被 Titin-T 链替换的重链发生交叉
15 错配；CL 未被 Obscurin-O 链替换的轻链更容易与 CH1 未进行 Titin-T 链替换的重链配对结合，而不会与 CH1 被 Titin-T 链替换的重链结合。

表 15. 双特异性抗体轻/重链错配的检测结果

错配名称	第一重链 (B-H1)	第二重链 (B-H2)	第一轻链 (B-L1)	第二轻链 (B-L2)	质谱分析				抗体纯度 SEC (%)	抗体表达量 (mg/L)
					B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H1 B-H2 B-L1 B-L1	B-H1 B-H2 B-L2 B-L2	B-H2 B-H2 B-L2 B-L2		
B/U-1	B0 重链 CH1 被 T11 替换 (含 hole 修饰) 形成的链	U0 重链 (含 knob 修饰)	B0 轻链的 CL 被 O.21 替换 后形成的链	U0 轻链	√	--	--	--	91	25.6

B/U-2	B0 重链 (含 hole 修饰)	U0 重链 (含 knob 修饰)	B0 轻链的 CL 被 O.21 替换后形成的链	B0 轻链的 CL 被 O.21 替换后形成的链	--	--	--	--	--	0.5
B/U-3	B0 重链 CH1 被 T11 替换 (含 hole 修饰) 形成的链	U0 重链 (含 knob 修饰)	U0 轻链	U0 轻链	--	--	--	✓	33	15.6

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

测试例 6、双特异性抗体与抗原的亲合力检测

5 用 Biacore T200（GE）仪器测定待测抗体与抗原蛋白的亲合力。按照人抗捕获试剂盒（GE，Cat# BR-1008-39）说明书中的方法，用 Protein A 生物传感芯片（Cat. # 29127556，GE）亲和捕获待测抗体，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度的可溶性抗原，用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用甘氨酸-盐酸再生溶液（pH 1.5 Cat. # BR-1003-54，
10 GE）将生物传感芯片洗净再生。实验得到的数据用 BIAevaluation version 4.1，GE 软件以（1:1）Langmuir 模型拟合数据，得出亲和力数值，实验结果见表 16。

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

表 16. 双特异性抗体亲和力检测结果

抗体	抗原	ka（1/Ms）	kd（1/s）	KD（M）
B0	hBAFF	1.77E+05	1.52E-04	8.55E-10

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

测试例 7、CH1-CL 结构改造后的双抗同时结合两个靶抗原实验

通过用 Biacore T200（GE）仪器测定待测抗体与抗原蛋白的亲和力，验证本披露的 CH1-CL 结构改造的双特异性抗体可以同时结合两个靶抗原。具体实验步骤为：用 Protein A 生物传感芯片（Cat. # 29127556，GE）亲和捕获抗体 BU5，然后于芯片表面流经双特异性抗体的第一抗原分子 hP40（购自 Sino biological，10052-H08H）至饱和，再进样一定浓度的第二抗原分子 hBAFF（购自 Sino biological，10056-HNCH），用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用甘氨酸-盐酸再生溶液（pH 1.5 Cat. # BR-1003-54，GE）将生物传感芯片洗净再生，数据拟合模型采用 BIAevaluation version 4.1，GE 软件以（1:1）Langmuir 模型拟合。然后，再用 Protein A 生物传感芯片（Cat. # 29127556，GE）亲和捕获抗体 BU5，然后于芯片表面流经双特异性抗体的第一抗原分子 hP40（购自 Sino biological，10052-H08H）至饱和，再进样一定浓度的第二抗原分子 hBAFF（购自 Sino biological，10056-HNCH），用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线在每个实验循环解离完成后，用甘氨酸-盐酸再生溶液（pH 1.5 Cat. # BR-1003-54，GE）将生物传感芯片洗净再生，数据拟合模型采用 BIAevaluation version 4.1，GE 软件以（1:1）Langmuir 模型拟合。

实验结果见表 17，实验结果表明双特异性抗体 BU5 在结合抗原 hP40 达到饱和后，可继续结合抗原 hBAFF，且再结合 hBaFF 的能力和单抗 B0 相当。同样地，双特异性抗体 BU5 在结合抗原 hBAFF 达到饱和后，可继续结合抗原 hP40，且再结合 hP40 的能力和 U0 相当。这说明本披露的 CH1/CL 被 Titin-T 链/Obscurin-O 链替换的双特异性抗体具备双靶性特点，可同时结合两个靶抗原。

表 17. 抗体亲和力检测结果

抗体	芯片表面流经抗原	亲和力检测数据			
		抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Bmab	hBAFF	hBAFF	1.77E+05	1.53E-04	8.64E-10
Umab	hP40	hP40	1.59E+06	1.09E-04	6.89E-11

BU5	hBAFF 进样至饱和结合， 再进样 hP40 抗原	hP40	1.57E+06	1.04E-04	6.61E-11
	hP40 至饱和结合， 再进样 hBAFF 抗原	hBAFF	1.57E+05	8.44E-05	5.37E-10

测试例 8、DI-1 双特异性抗体破骨细胞分化实验

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

测试例 9、DI-1 双特异性抗体 TF1 细胞增殖实验

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

测试例 10、双特异性抗体 CH1/CL 被不同结构域替换后轻重链错配检测

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

一、双特异性抗体四条链共表达时轻重链错配实验

用 TCRα/TCRβ 替换 H0 或 J1 的 CH1/CL，构建由四条链组成的双特异性抗体 HJ-1 和 HJ-2；用 Titin-T 链/Obseurin-O 链替换 H0 或 J1 的 CH1/CL，构建由四条链组成的双特异性抗体 HJ-3 和 HJ-4，双特异性抗体的结构示意图参见附图 12，双特异性抗体的全长序列参见表 18：

表 18. 双特异性抗体序列表

双	IgG 样双特异性抗体四条链序列
---	------------------

抗名称	链 1	链 3	链 2	链 4
HJ-1	H0 的重链 (knob) ,且 CH1 被 TCR β 替换	H0 的轻链, 且 CL 被 TCR α 替换	J1 的重链 (hole)	J1 的轻链
	HJ-1-H1: <u>EVQLVESGGGLVQPGGSLR</u> <u>LSCAASGFTFSHYMAWV</u> <u>RQAPGKGLEWVTSISYEG</u> <u>DITYYGDSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAT</u> <u>YYCASQTLRESFDYWGQG</u> <u>TLVTVSSLEDLKNVFPPEVA</u> <u>VFEPSEAEISHTQKATLVCL</u> <u>ATGFYPDHVELSWWVNGK</u> <u>EVHSGVCTDPQPLKEQPAL</u> <u>QDSRYALSSRLRVSATFWQ</u> <u>NPRNHFRCQVQFYGLSEN</u> <u>DEWTQDRAKPVTQIVSAE</u> <u>AWGRASDKTHTCPPCPAPE</u> <u>AAGGPSVFLFPPKPKDTLM</u> <u>ISRTPEVTCVVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHODWLNGKEYKCKVS</u> <u>NKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPCREEMTKN</u> <u>QVSLWCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTPPVL</u> <u>DSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGKHHHHHH</u> (SEQ ID NO: 114)	HJ-1-L1: <u>DIQMTQSPS</u> <u>SVSASVGD</u> <u>RVTITCRAS</u> <u>ODIANYLS</u> <u>WYQQKPG</u> <u>KSPKLLIYG</u> <u>TSNLEVG</u> <u>PSRFGSRS</u> <u>GTDFTLTIS</u> <u>SLQPEDFAT</u> <u>YYCLODKE</u> <u>FPRTFGGGT</u> <u>KVEIKKPD</u> <u>QNPDP</u> <u>AVYQLRDSKSS</u> <u>DKSVCLFT</u> <u>DFDSQTQV</u> <u>SQSKDSDV</u> <u>YITDKCVL</u> <u>DMRSMDFK</u> <u>SNSAVAWS</u> <u>QKSDFACA</u> <u>NAFQNSIIP</u> <u>EDTFFPSPE</u> <u>SS (SEQ ID</u> <u>NO: 115)</u>	HJ-1-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLRS</u> <u>EDTAVYYCAREDNTGTAF</u> <u>DYWGQGT</u> <u>TVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVTVPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKV</u> <u>DKKVEPKSCDKTHTCPPC</u> <u>PAPEAAGGPSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHODWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEK</u> <u>TISKAKGQPREPQVCTLP</u> <u>PSREEMTKNQVSLSCAVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTPPVLDSDGSFFL</u> <u>VSKLTVDKSRWQQGNVF</u> <u>SCSVMHEALHNHYTQKS</u> <u>LSLSPGKDYKDDDDK</u> (SEQ ID NO: 116)	HJ-1-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCKA</u> <u>SQSVSSDV</u> <u>TWYLQKP</u> <u>GQSPQLLIY</u> <u>YVSEHYTG</u> <u>VPDRFSGS</u> <u>GYGTDFTL</u> <u>KISRVEAE</u> <u>DVGVIYC</u> <u>QQHHRFPL</u> <u>TFGQGTKL</u> <u>EIKRTVAAP</u> <u>SVFIFFPSD</u> <u>EQLKSGTA</u> <u>SVVCLLNN</u> <u>FYPREAKV</u> <u>QWKVDNA</u> <u>LSGNSQE</u> <u>SVTEQDSK</u> <u>DSTYSLSST</u> <u>LTLSKADY</u> <u>EKKHVVYAC</u> <u>EVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFN</u> <u>RGEC (SEQ</u> <u>ID NO: 117)</u>
HJ-2	H0 的重链 (hole)	H0 的轻链	J1 的重链 (knob) ,且 CH1 被 TCR β 替换	J1 的轻链, 且 CL 被 TCR α 替换
	HJ-2-H1: <u>EVQLVESGGGLVQPGGSLR</u> <u>LSCAASGFTFSHYMAWV</u> <u>RQAPGKGLEWVTSISYEG</u> <u>DITYYGDSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAT</u> <u>YYCASQTLRESFDYWGQG</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAP</u> <u>SSKSTSGGTAALGCLVKDY</u> <u>FPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u> <u>PSSSLGTQTYICNVNHKPS</u> <u>NTKVDKKVEPKSCDKTHT</u> <u>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVV</u> <u>DVSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHODWLNGKE</u>	HJ-2-L1: <u>DIQMTQSPS</u> <u>SVSASVGD</u> <u>RVTITCRAS</u> <u>ODIANYLS</u> <u>WYQQKPG</u> <u>KSPKLLIYG</u> <u>TSNLEVG</u> <u>PSRFGSRS</u> <u>GTDFTLTIS</u> <u>SLQPEDFAT</u> <u>YYCLODKE</u> <u>FPRTFGGGT</u> <u>KVEIKRTVA</u> <u>APSVFIFFPS</u> <u>DEQLKSGT</u> <u>ASVVCLLN</u> <u>NFYPREAK</u>	HJ-1-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLRS</u> <u>EDTAVYYCAREDNTGTAF</u> <u>DYWGQGT</u> <u>TVTVSSLEDL</u> <u>KNVFPPEVAVFEPSEAEI</u> <u>SHTQKATLVCLATGFYP</u> <u>DHVELSWWVNGKEVHS</u> <u>GVCTDPQPLKEQPALQ</u> <u>DSRYALSSRLRVSATFW</u> <u>QNPRNHFRCQVQFYGL</u> <u>SENDEWTQDRAKPVTQ</u> <u>IVSAEAWGRASDKTHTC</u> <u>PPCPAPEAAGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVV</u>	HJ-2-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCKA</u> <u>SQSVSSDV</u> <u>TWYLQKP</u> <u>GQSPQLLIY</u> <u>YVSEHYTG</u> <u>VPDRFSGS</u> <u>GYGTDFTL</u> <u>KISRVEAE</u> <u>DVGVIYC</u> <u>QQHHRFPL</u> <u>TFGQGTKL</u> <u>EIKKPD</u> <u>IQNPDP</u> <u>AVYQLRDSKSSD</u> <u>KSVCLFTD</u>

	<u>YKCKVSNKALPAPIEKTIS</u> <u>KAKGQPREPOVCTLPPSRE</u> <u>EMTKNQVSLSCAVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESNGOPENNYKT</u> <u>TPPVLDSDGSFFLVSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGKD</u> YKDDDDK (SEQ ID NO: 118)	<u>VQWKVDN</u> <u>ALQSGNSQ</u> <u>ESVTEQDS</u> <u>KDSTYSLSS</u> <u>TLTLSKAD</u> <u>YEKHKVYA</u> <u>CEVTHQGL</u> <u>SSPVTKSFN</u> RGEC (SEQ ID NO: 119)	<u>VDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYN</u> <u>STYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPOVYT</u> <u>LPPCREEMTKNQVSLWC</u> <u>LVKGFYPSDIAVEWESNG</u> <u>OPENNYKTTPPVLDSDGS</u> <u>FFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCSVMHEALHNHYT</u> <u>QKSLSLSPGKHHHHHH</u> (SEQ ID NO: 120)	FDSQTQVS QSKDSDVY ITDKCVLD MRSMDFK SNSAVAWS QKSDFACA NAFQNSIIP EDTFFPSP ESS (SEQ ID NO: 121)
H J - 3	H0 的重链 (knob), 且 CH1 被 T.11 替换	H0 的轻链, 且 CL 被 O.21 替换	J1 的重链 (hole)	J1 的轻链
	HJ-3-H1: <u>EVOLVESGGGLVQPGGSLR</u> <u>LSCAASGFTFSHYMAWV</u> <u>RQAPGKGLEWVTSISYEG</u> <u>DITYYGDSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAT</u> <u>YYCASQTLRESFDYWGOQ</u> <u>TLVTVSSGGGGSGIPPKIE</u> CLPIDISIDE GKVLTVASA FTGEPTPEVTWSTGGRKI HSQEQGRFHIENTDDLTT LIKDVQKQDGGGLYTLTL RNEFGSDSATVNIHRSID <u>KTHTCPPCPAPEAAGGPSV</u> <u>FLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQY</u> <u>NSTYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPOVYTL</u> <u>PCREEMTKNQVSLWCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGOPEN</u> <u>NYKTTPPVLDSDGSFFLYS</u> <u>KLTVDKSRWQQGNVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>PGKHHHHHH</u> (SEQ ID NO: 122)	HJ-3-L1: <u>DIQMTQSPS</u> <u>SVSASVGD</u> <u>RVTITCRAS</u> <u>QDIANYLS</u> <u>WYQQKPG</u> <u>KSPKLLIYG</u> <u>TSNLEVG</u> <u>PSRFSGRS</u> <u>GTDFLTIS</u> <u>SLQPEDFAT</u> <u>YYCLQDKE</u> <u>FPRTFGGGT</u> KVEIKGGG GSSGAPRF LTRPLAFV VSVGKDAT LSSQIVGN PTPQVSWE KDKQPVT GARFRLAQ DGDLYRLK ILDQLSDS GQYVSRAR NAIGEAF CLGLQVD AEA (SEQ ID NO: 123)	HJ-3-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLRS</u> <u>EDTAVYYCAREDNTGTAF</u> <u>DYWGQGTTVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> <u>AALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVL</u> <u>QSSGLYSLSSVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTK</u> <u>VDKKVEPKSCDKTHTCP</u> <u>PCPAPEAAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCVVV</u> <u>DVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNS</u> <u>TYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPOVCTL</u> <u>PPSREEMTKNQVSLSCAV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESNGOP</u> <u>ENNYKTTPPVLDSDGSFF</u> <u>LVSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGKDYKDDDDK</u> (SEQ ID NO: 116)	HJ-3-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCKA</u> <u>SQSVSSDV</u> <u>TWYLQKP</u> <u>GQSPQLLIY</u> <u>YVSEHYTG</u> <u>VPDRFSGS</u> <u>GYGTDFTL</u> <u>KISRVEAE</u> <u>DVGVIYC</u> <u>QQHHRFPL</u> <u>TFGQGTKL</u> <u>EIKRTVAAP</u> <u>SVFIFPPSD</u> <u>EQLKSGTA</u> <u>SVVCLNN</u> <u>FYPREAKV</u> <u>QWKVDNA</u> <u>LQSGNSQE</u> <u>SVTEQDSK</u> <u>DSTYSLST</u> <u>LTLSKADY</u> <u>EKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLS</u> <u>SPVTKSFN</u> RGEC (SEQ ID NO: 117)
H J - 4	H0 的重链 (hole)	H0 的轻链	J1 的重链 (knob), 且 CH1 被 T.11 替换	J1 的轻链, 且 CL 被 O.21 替换
	HJ-4-H1: <u>EVOLVESGGGLVQPGGSLR</u> <u>LSCAASGFTFSHYMAWV</u> <u>RQAPGKGLEWVTSISYEG</u> <u>DITYYGDSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAT</u> <u>YYCASQTLRESFDYWGOQ</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAP</u> <u>SSKSTSGGTAALGCLVKDY</u> <u>FPEPVTVSWNSGALTSGVH</u>	HJ-4-L1: <u>DIQMTQSPS</u> <u>SVSASVGD</u> <u>RVTITCRAS</u> <u>QDIANYLS</u> <u>WYQQKPG</u> <u>KSPKLLIYG</u> <u>TSNLEVG</u> <u>PSRFSGRS</u> <u>GTDFLTIS</u>	HJ-4-H2: <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLRS</u> <u>EDTAVYYCAREDNTGTAF</u> <u>DYWGQGTTVTVSSGGG</u> GSGIPPKIE CLPIDISIDE GKVLTVASA FTEPTPE	HJ-4-L2: <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCKA</u> <u>SQSVSSDV</u> <u>TWYLQKP</u> <u>GQSPQLLIY</u> <u>YVSEHYTG</u> <u>VPDRFSGS</u> <u>GYGTDFTL</u>

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGDKDYKDDDDK (SEQ ID NO: 118)	SLOPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 119)	VTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIHKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHH (SEQ ID NO: 124)	KISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGOGTKLEIKGGGSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSQIVGNPTPOVSWEKDKQPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFAACLGLQVDAEA (SEQ ID NO: 125)
--	---	--	---

备注：序列中，粗体字部分为被替换部分，点划线部分为恒定区部分，单下划线部分为可变区。

J1 重链:

5

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVIDP
GVGDTNYNENFKGRATLTADKSTSTAYIELSSLRSEDTAVYYCAREDNTGTAF
DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
10 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 126);

J1 轻链:

15

SIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVSSDVTWYLYLQKPGQSPQLLIYYVS
EHYTGVPDRFSGSGYGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGOGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 117);

20

分别将 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4 的四条链共转染表达，然后对表达产物进行质谱分析（方法见本披露测试例 3），检测是否有轻重链错配分子。实验结果见附图 13A 至图 13D 及表 19。

表 19. 双特异性抗体表达质谱分析实验结果

双抗名称	共转染的链	质谱分析结果		
		HJ (1+2+3+4)	错配分子 1 (1+2+3+3)	错配分子 2 (1+2+4+4)
HJ-1	1: HJ-1-H1	√	X	√

	2: HJ-1-H2			
	3: HJ-1-L1			
	4: HJ-1-L2			
HJ-2	1: HJ-2-H2	√	X	√
	2: HJ-2-H1			
	3: HJ-2-L2			
	4: HJ-2-L1			
HJ-3	1: HJ-3-H1	√	X	X
	2: HJ-3-H2			
	3: HJ-3-L1			
	4: HJ-3-L2			
HJ-4	1: HJ-4-H2	√	X	X
	2: HJ-4-H1			
	3: HJ-4-L2			
	4: HJ-4-L1			

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

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

10

二、三条链共表达双特异性抗体实验

本测试用三条链（1 条 CH1 被 TCRβ 或 Titin-T 链替换的重链，1 条 CH1 未被替换的重链，1 条 CL 未被替换的野生型轻链（VL-CL），具体序列参见表 18）共转染表达，然后对表达产物进行质谱分析（方法见本披露测试例 3），检测抗体纯度 SEC（方法见本披露测试 2），验证野生型轻链（VL-CL）是否会与 CH1 被 TCRβ 或 Titin-T 链替换的重链组合形成错配分子。实验结果见附图 14A、图 14B、图 15A、图 15B 和表 20。

15

表 20. 三条链共表达双特异性抗体实验结果

组别	共转染的链	抗体纯度 SEC（%）	质谱分析结果	
			分子（1+2+3）	错配分子（1+2+3+3）
1	1: HJ-1-H1	75.85	√	√
	2 : HJ-1-H2			
	3 : HJ-1-L2			
2	1: HJ-3-H1	96.82	√	X

	2 : HJ-3-H2			
	3 : HJ-3-L2			

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

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

10

权利要求书

1. 一种多肽复合物，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包括：
- 5 A) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的第一重链可变结构域（VH1），所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含 Titin-T 链，和
- 第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的第一轻链可变结构域（VL1），所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含能够与 Titin-T 链相互作用的结构域；
- 10 或
- B) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VH1，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含能够与 Titin-T 链相互作用的结构域，和
- 第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VL1，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含 Titin-T 链；
- 15 或
- C) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VH1，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链，和
- 20 第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VL1，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域；
- 或
- D) 第一多肽，所述第一多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VH1，所述 VH1 可操作地连接至第一结构域，所述第一结构域包含能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域，和
- 25 第二多肽，所述第二多肽包含从 N 末端到 C 末端的 VL1，所述 VL1 可操作地连接至第二结构域，所述第二结构域包含 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链；
- 其中，所述第一抗原结合部分与第一抗原特异性结合，所述第一结构域与第二结构域能够形成二聚体。
- 30

2. 如权利要求 1 所述的多肽复合物，其中：
- 所述能够与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链相互作用的结构域是 Titin-T 链，
- 所述能够与 Titin-T 链相互作用的结构域是 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链。
- 35

3. 如权利要求 1 或 2 所述的多肽复合物，所述第一抗原结合部分的 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性结合的第一抗原结合位点；所述 VH1 的 C 端与第一结

构域的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与第二结构域的 N 端可操作地连接。

4. 如权利要求 1 至 3 任一项所述的多肽复合物，所述第一结构域与第二结构域通过天然链间键和/或非天然链间键形成二聚体；

5 优选地，所述第一结构域与第二结构域通过天然链间键形成二聚体；

更优选地，所述 Titin-T 链上选自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的选自第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合；或者

10 所述 Titin-T 链上的选自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的选自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合；

所述 Titin-T 链中残基位点为相对于序列 SEQ ID NO:32 的自然顺序编号位点；
所述 Obscurin-O 链中残基位点为相对于序列 SEQ ID NO:33 的自然顺序编号位点；
所述 Obscurin-样-O 链中残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号
15 位点。

5. 如权利要求 1 至 4 任一项所述的多肽复合物，所述第一结构域与第二结构域通过至少一个非天然链间键形成二聚体；

20 优选地，所述非天然链间键在第一结构域的特定突变残基和第二结构域的特定突变残基之间形成，

更选地，所述突变残基中的至少一对是半胱氨酸残基；

最优选地，所述非天然链间键为二硫键；

更优选地，其中所述二聚体包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个非天然链间键。

25

6. 如权利要求 5 所述的多肽复合物，所述第一结构域的特定突变残基和第二结构域的特定突变残基选自以下突变：

30 (A) 所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变；或者

(B) 所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变；

35 优选地，所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 中的一个或多个氨基酸残基突变；或者

所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个氨基酸残基突变；

更优选地，所述第一结构域的突变残基和第二结构域的突变残基选自如下突变：

5 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 A88C 突变；
Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-O 链具有 A3C 突变；
Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，且 Obscurin-O 链具有 R9C 突变；
Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S

10 和 A88C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A3C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 R9C 突变；

15 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 V74C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 G84C 突变；

20 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 A86C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变；或者

25 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变；

Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；
Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；
Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

30

7. 如权利要求 6 所述的多肽复合物，所述 Obscurin-O 链还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变；

优选地，所述 Obscurin-O 链具有选自 L7R 或 L7K、T62K 或 T62H、和 K11L 的一个或多个氨基酸残基突变；

35 最优选地，所述 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突变;

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变; 或者

- 5 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变, 且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H;

Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点; Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

- 10 8. 如权利要求 1 至 7 任一项所述的多肽复合物, 所述第一结构域和第二结构域具有选自以下一个或多个氨基酸残基突变:

Titin-T 链具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变, 和/或 Obscurin-O 链具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、
15 45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变;

优选地, 所述第一结构域和第二结构域具有选自以下一个或多个残基突变:

Titin-T 链具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变, 和/或 Obscurin-O 链具有选自 G2E、
20 L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变;

更优选地, 所述 Titin-T 链具有 M66S 和 T77S 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 氨基酸突变;

- 25 所述 Titin-T 链具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 氨基酸突变;

所述 Titin-T 链具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 D20L、T22M 和 A53L 氨基酸突变;

- 30 所述 Titin-T 链具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 氨基酸突变;

所述 Titin-T 链具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变;

- 35 所述 Titin-T 链具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变;

所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；或者

所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变；

上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

9. 如权利要求 1 至 8 任一项所述的多肽复合物，所述 VH1 通过第一连接域与第一结构域可操作地连接，所述 VL1 通过第二连接域与第二结构域可操作地连接；

优选地，所述第一连接域和/或所述第二连接域选自：Titin-T 链的 N 末端片段，Obscurin-O 链 N 末端片段、Obscurin-样-O 链的 N 末端片段，和 $(G_xS)_y$ 连接子，其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数；

更优选地，所述第一连接域和/或所述第二连接域选自以下多肽片段：
“KAGIR”、“DQPQF”、 $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ ，

最优选地，所述第一结构域为 Titin-T 链，所述第一连接域为 KAGIR 多肽，所述第二结构域为 Obscurin-O 链，所述第二连接域为 DQPQF 多肽；或者

所述第二结构域为 Titin-T 链，所述第二连接域为 KAGIR 多肽，所述第一结构域为 Obscurin-O 链，所述第一连接域为 DQPQF 多肽。

20

10. 如权利要求 1 至 9 任一项所述的多肽复合物，其中，

(A) 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基础上还具有选自 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；

优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；和/或

(B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、

D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变的序列；

5 优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；

上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点；

10 优选地，其中，

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

15 更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链
20 突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；

25 更优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；

最优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、
30 11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突
35 变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；

或者

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

5 更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链
10 突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

15

11. 如权利要求 1 至 10 任一项所述的多肽复合物，所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80% 同一性的序列，和/或所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列
20 具有至少 80% 同一性的序列；或者

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80% 同一性的序列，和/或所述 Obscurin-样-O 链包含如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一序列具有至少 80% 同一性的序列；

25 更优选地，所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示序列，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示序列；

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示序列，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示序列；

30 所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示序列，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 84 所示序列；

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示序列，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示序列；或者

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示序列，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示序列。

35

12. 如权利要求 1 至 11 任一项所述的多肽复合物，其中所述第一抗原选自：

外源抗原、内源抗原、自身抗原、新抗原、病毒抗原和肿瘤抗原。

13. 一种多特异性多肽复合物，其包括：

5 第一多肽复合物，其为如权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物，其与第一抗原特异性结合，和

第二多肽复合物，其包含第二抗原结合部分，其与第二抗原特异性结合，

所述第一多肽复合物和第二多肽复合物结合两种不同的抗原，或结合同一种抗原上的两种不同表位；

10 优选地，所述第二多肽复合物包含第二重链可变结构域（VH2）和第二轻链可变结构域（VL2），所述第一多肽复合物的 VH1 与第二多肽复合物的 VL2，和/或第二多肽复合物的 VH2 与第一多肽复合物的 VL1 之间不容易发生错配；更优选地，所述多特异性多肽复合物为双特异性多肽复合物；最优选地，所述第二抗原结合部分的 VH2 和 VL2 形成与第二抗原特异性结合的第二抗原结合位点。

15 14. 如权利要求 13 所述的多特异性多肽复合物，所述第二多肽复合物的第二抗原结合部分包含：

第三多肽，其包含从 N 末端到 C 末端的 VH2，其可操作地连接至第三结构域，所述第三结构域包含 CH1，和

20 第四多肽，其包含从 N 末端到 C 末端的 VL2，其可操作地连接至第四结构域，所述第四结构域包含 CL；

优选地，所述 VH2 的 C 端与 CH1 的 N 端可操作地连接，所述 VL2 的 C 端与 CL 的 N 端可操作地连接。

25 15. 如权利要求 13 或 14 所述的多特异性多肽复合物，所述第一多肽复合物还包含第一二聚化结构域，所述第二多肽复合物还包含第二二聚化结构域，所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域相结合；

优选地，所述第一多肽复合物的第一结构域的 C 端与第一二聚化结构域的 N 端可操作地连接，所述第二多肽复合物的第三结构域的 C 端与第二二聚化结构域的 N 端可操作地连接；

30 更优选地，所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域通过选自以下的方式相结合：抗体铰链区或其部分、连接子、二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用、或其组合；

35 最优选地，所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域通过选自以下的方式相结合：抗体铰链区或其部分结合；优选 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的铰链区或其部分。

16. 如权利要求 15 所述的多特异性多肽复合物，所述第一二聚化结构域包含

抗体CH2结构域和/或抗体CH3结构域,和/或所述第二二聚化结构域包含抗体CH2结构域和/或抗体CH3结构域;

优选地,所述抗体CH2结构域和/或抗体CH3结构域源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

5

17. 如权利要求15或16所述的多特异性多肽复合物,所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域不相同,并且以阻止同源二聚化和/或有利于异二聚化的方式结合;

10 优选地,所述第一二聚化结构域和第二二聚化结构域通过选自以下的方式相结合: knob-into-hole、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用、或增加柔韧性的方式;

更优选地,所述第一二聚化结构域具有如SEQ ID NO: 2所示序列中的第104至330位氨基酸残基,且所述第二二聚化结构域具有如SEQ ID NO: 3所示序列中的第104至330位氨基酸残基;或者

15 所述第一二聚化结构域具有如SEQ ID NO: 3所示序列中的第104至330位氨基酸残基,且所述第二二聚化结构域具有如SEQ ID NO: 2所示序列中的第104至330位氨基酸残基。

20 18. 一种结构域改造抗体,所述抗体的至少一个重链恒定区结构域CH1和至少一个轻链恒定区结构域CL被替代,其中:

A) 所述结构域CH1被Titin-T链替代,所述结构域CL被能够与Titin-T链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

B) 所述结构域CL被Titin-T链替代,所述结构域CH1被能够与Titin-T链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

25 C) 所述结构域CH1被Obscurin-O链替代,所述结构域CL被能够与Obscurin-O链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

D) 所述结构域CL被Obscurin-O链替代,所述结构域CH1被能够与Obscurin-O链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

30 E) 所述结构域CH1被Obscurin-样-O链替代,所述结构域CL被能够与Obscurin-样-O链具有蛋白间相互作用的结构域替代;或者

F) 所述结构域CL被Obscurin-样-O链替代,所述结构域CH1被能够与Obscurin-样-O链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

优选地,所述能够与Obscurin-O链或Obscurin-样-O链具有蛋白间相互作用的结构域是Titin-T链,

35 所述能够与Titin-T链具有蛋白间相互作用的结构域是Obscurin-O链或Obscurin-样-O链;

更优选地，所述抗体包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1；所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者

所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与
5 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

19. 一种结构域改造抗体的 Fab 片段，其中所述 Fab 片段的恒定区结构域 CH1 和恒定区结构域 CL 被替代，其中，

所述结构域 CH1 被 Titin-T 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；
10

所述结构域 CL 被 Titin-T 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；

所述结构域 CH1 被 Obscurin-O 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；

所述结构域 CL 被 Obscurin-O 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；
15

所述结构域 CH1 被 Obscurin-样-O 链替代，所述结构域 CL 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；或者

所述结构域 CL 被 Obscurin-样-O 链替代，所述结构域 CH1 被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；
20

优选地，所述与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链；

所述与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Titin-T 链；

更优选地，所述 Fab 包含重链可变区 VH1 和轻链可变区 VL1，所述 VH1 和 VL1 形成抗原结合位点；所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者

所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。
30

20. 一种结构域改造抗体，所述抗体包含如权利要求 19 所述 Fab 片段。

21. 一种双特异性抗体，其包含特异性结合第一抗原的第一重链和第一轻链，和还包含特异性结合第二抗原的第二重链和第二轻链，其中，

所述第一重链的 CH1 结构域被 Titin-T 链替代，第一轻链的 CL 结构域被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代；
35

所述第一轻链的 CL 结构域被 Titin-T 链替代, 所述第一重链的 CH1 结构域被能够与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

所述第一重链的 CH1 结构域被 Obscurin-O 链替代, 所述第一轻链的 CL 结构域被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

5 所述第一轻链的 CL 结构域被 Obscurin-O 链替代, 所述第一重链的 CH1 结构域被能够与 Obscurin-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

所述第一重链的 CH1 结构域被 Obscurin-样-O 链替代, 所述第一轻链的 CL 结构域被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代; 或者

10 所述第一轻链的 CL 结构域被 Obscurin-样-O 链替代, 所述第一重链的 CH1 结构域被能够与 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域替代;

所述第一抗原和第二抗原不相同, 或所述第一抗原和第二抗原是同一种抗原上的两种不同表位;

15 优选地, 所述第一重链与第二轻链之间、第一轻链与第二重链之间不容易发生错配; 更优选地, 所述与 Titin-T 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链;

所述与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链具有蛋白间相互作用的结构域为 Titin-T 链。

22. 如权利要求 21 所述的双特异性抗体, 其中所述第一重链包含第一重链可变区 (VH1), 所述第一轻链包含第一轻链可变区 (VL1), 所述 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性结合的抗原结合位点, 且

所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接, 所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接, 或者

25 所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接, 所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的双特异性抗体, 其中所述第二重链包含从 N 末端到 C 末端的第二重链可变区 (VH2), 其可操作地连接至 CH1; 所述第二轻链包含从 N 末端到 C 末端的第二轻链可变区 (VL2), 其可操作地连接至 CL;

30 优选地, 所述 VH2 和 VL2 形成与第二抗原特异性结合的抗原结合位点, 所述 VH2 的 C 端与 CH1 的 N 端可操作地连接; 所述 VL2 的 C 端与 CL 的 N 端可操作地连接。

24. 如权利要求 21-23 任一项所述的双特异性抗体, 所述第一重链和第二重链的 C 末端包含 CH2 和/或 CH3 结构域;

优选地, 所述 CH1、CH2 和 CH3 结构域源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4;

更优选地，所述第一重链和第二重链通过选自以下的方式结合：抗体铰链区或其部分、连接子、二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用或其组合。

5 25. 如权利要求 24 所述的双特异性抗体，其中：

所述第一重链从 N 末端到 C 末端依次为：VH1-L1-Titin-T 链-L2-CH2-CH3，

所述第一轻链从 N 末端到 C 末端依次为：VL1-L3-Obscurin-O 链或 VL1-L4-Obscurin-样-O 链；

所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-CH2-CH3，

10 所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；

或者，

所述第一轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL1-L1-Titin-T 链，

所述第一重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH1-L2-Obscurin-O 链-L3-CH2-CH3，或 VH1-L4-Obscurin-样-O 链-L5-CH2-CH3；

15 所述第二重链从 N 末端到 C 末端的依次为：VH2-CH1-CH2-CH3，

所述第二轻链从 N 末端到 C 末端的依次为：VL2-CL；

所述 L1 至 L5 为间隔区，间隔区可存在或不存在；

20 优选的，所述间隔区选自：Titin-T 链的 N 末端片段，Obscurin-O 链的 N 末端片段，Obscurin-样-O 链的 N 末端片段，或 $(G_xS)_y$ 连接子；其中，X 选自 1-5 的整数，Y 选自 1-6 的整数；

最优选地，所述间隔区选自：“KAGIR”、“DQPQF”、 $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

26. 如权利要求 25 所述的双特异性抗体，所述第一重链的 CH2 和 CH3 与第二重链的 CH2 和 CH3 不相同，并且以阻止同源二聚化和/或有利于异二聚化的方式结合；

优选地，所述第一重链和第二重链通过选自以下的方式结合：knob-into-hole、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用或增加的柔韧性的方式；

更优选地，所述第一重链和第二重链包括通过 knob-into-hole 的方式结合；

30 最优选地，所述第一重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列中的第 104 至 330 位氨基酸残基，所述第二重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 3 所示序列中的第 104 至 330 位氨基酸残基；或者

所述第一重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 3 所示序列中的第 104 至 330 位氨基酸残基，所述第二重链 CH2-CH3 结构域具有如 SEQ ID NO: 2 所示序列中的第 104 至 330 位氨基酸残基。

35

27. 如权利要求 18 或 20 所述结构域改造抗体、或如权利要求 19 所述结构域

改造抗体的 Fab 片段，或如权利要求 21-26 任一项所述的双特异性抗体，所述可操作地连接是两条多肽序列通过连接域连接或两条多肽直接连接。

28. 如权利要求 27 所述的结构域改造抗体、或双特异性抗体，或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

所述 Titin-T 链与 Obscurin-O 链，或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链通过天然链间键结合和/或非天然链间键形成二聚体；

优选地，所述 Titin-T 链与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链通过天然链间键形成二聚体，所述 Titin-T 链上选自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一个或多个残基与 Obscurin-O 链上的选自第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一个或多个残基彼此相结合，或者

所述 Titin-T 链上的选自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一个或多个残基与 Obscurin-样-O 链上的选自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一个或多个残基彼此相结合；

所述 Titin-T 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链残基位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

29. 如权利要求 27 或 28 所述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，所述 Titin-T 链与 Obscurin-O 链，或 Titin-T 链与 Obscurin-样-O 链通过至少一个非天然链间键形成二聚体；

优选地，所述非天然链间键为二硫键；

更优选地，其中所述二聚体包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个非天然链间键。

25

30. 如权利要求 27 至 29 任一项所述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变；或者

所述 Titin-T 链具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或所述 Obscurin-样-O 链具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变；

优选地，所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或

所述 Obscurin-O 链具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的中一个或多

个氨基酸残基突变；或者

所述 Titin-T 链具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，和/或

5 所述 Obscurin-样-O 链具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个氨基酸残基突变；

更优选地，所述 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 A88C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-O 链具有 A3C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，且 Obscurin-O 链具有 R9C 突变；

10 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A88C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 A3C 突变；

15 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A26C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S 和 R9C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 V74C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 G84C 突变；

20 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E 和 A86C 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突变；

25 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 V20C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突变；或者

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 T22C 突变，且 Obscurin-样-O 链具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突变；

30 上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序位点；Obscurin-样-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序位点。

31. 如权利要求 29 或 30 所述的结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

35 所述 Obscurin-O 链还具有选自第 7、11 和 62 位中的一个或多个氨基酸残基突变；

优选地，所述 Obscurin-O 链具有选自 L7K 或 L7R、K11L、和 T62K 或 T62H

中的一个或多个氨基酸残基突变；

最优选地，所述 Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、
5 A88C、L7K 和 T62H 突变；

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突变；或者

Titin-T 链具有 C25S、C39T 和 A8C 突变，且 Obscurin-O 链具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H；

10 上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点。

32. 如权利要求 27 至 31 任一项所述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段，其中：

15 所述 Titin-T 链具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，和/或

Obscurin-O 链具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变；

20 优选地，所述 Titin-T 链具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变，和/或

Obscurin-O 链具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、
25 L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变；

更优选地，所述 Titin-T 链具有 M66S 和 T77S 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 氨基酸突变；

所述 Titin-T 链具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述
30 Obscurin-O 链具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 氨基酸突变；

所述 Titin-T 链具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 氨基酸突变，和/或所述 Obscurin-O 链具有 D20L、T22M 和 A53L 氨基酸突变；

所述 Titin-T 链具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 氨基酸突变，和/或所述
35 Obscurin-O 链具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 氨基酸突变；

所述 Titin-T 链具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、

E83D 和 F84L 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变;

所述 Titin-T 链具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变;

5 所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E 和 L75V 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变; 或者

所述 Titin-T 链具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 氨基酸突变, 和/或所述 Obscurin-O 链具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 氨基酸突变;

10 上述 Titin-T 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点; Obscurin-O 链突变位点为相对于序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点。

33. 如权利要求 27 至 32 任一项所述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段, 所述 Titin-T 链、Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端
15 通过连接域与 VH1 或 VL1 可操作地连接;

优选地, 所述连接域选自: Titin-T 链的 N 末端片段、Obscurin-O 链的 N 末端片段、Obscurin-样-O 链的 N 末端片段, 和 $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, X 选自 1-5 的整数, Y 选自 1-6 的整数;

更优选地, 所述连接域选自: “KAGIR”、“DQPQF”、 $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$;

20 最优选地, 所述 Titin-T 链通过 KAGIR 多肽与 VH1 或 VL1 连接, 和/或所述 Obscurin-O 链通过 DQPQF 多肽与 VL1 或 VH1 连接。

34. 如权利要求 27 至 33 任一项所述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域改造抗体的 Fab 片段, 其中:

25 A) 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示; 或在 SEQ ID NO:32 序列基础上还具有选自 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列; 优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、
30 N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列; 和/或

B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、
35 34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 中一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列; 优选具有

选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中一个或多个位点氨基酸突变的序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；

10 上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点；

优选地，其中，

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、15 26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 20 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、25 76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；

优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或 30 T62H、和 K11L 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、35 L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、

V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；

或者

5 A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84
10 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、
15 77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

35. 如权利要求 27 至 34 任一项所述结构域改造抗体、双特异性抗体或结构域
20 改造抗体的 Fab 片段，其中：

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80%同一性的序列，和/或

所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性的序列；或者

25 所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80%同一性的序列，和/或

所述 Obscurin-样-O 链包含如 SEQ ID NO:34、59-64 任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一序列具有至少 80%同一性序列；

更优选地，

30 所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示多肽，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示多肽；

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示多肽，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示多肽；

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且所述 Obscurin-O 链包含
35 如 SEQ ID NO: 84 所示多肽；

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示多肽，且所述 Obscurin-O 链包含

如 SEQ ID NO: 86 所示多肽；

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示多肽，且所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示多肽。

5 36. 如权利要求 21-35 任一项所述双特异性抗体，所述双特异性抗体为选自以下 A-G 任一项所述的双特异性抗体：

 A) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 89 所示或与 SEQ ID NO: 89 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 90 所示或与 SEQ ID NO: 90 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 87 所示或与 SEQ ID NO: 87 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 88 所示或与 SEQ ID NO: 88 具有至少 85% 序列同一性；

 B) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 93 所示或与 SEQ ID NO: 93 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 94 所示或与 SEQ ID NO: 94 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 91 所示或与 SEQ ID NO: 91 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 92 所示或与 SEQ ID NO: 92 具有至少 85% 序列同一性；

 C) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 97 所示或与 SEQ ID NO: 97 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 98 所示或与 SEQ ID NO: 98 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 95 所示或与 SEQ ID NO: 95 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

 D) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 99 所示或与 SEQ ID NO: 99 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 100 所示或与 SEQ ID NO: 100 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 101 所示或与 SEQ ID NO: 101 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

 E) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 102 所示或与 SEQ ID NO: 102 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 100 所示或与 SEQ ID NO: 100 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 95 所示或与 SEQ ID NO: 95 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；

 F) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 103 所示或与 SEQ ID NO: 103 具有至少 85% 序列同一性，第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 104 所示或与 SEQ ID NO: 104 具有至少 85% 序列同一性，第二重链的序列如 SEQ ID NO: 95 所示或与 SEQ ID NO: 95 具有至少 85% 序列同一性，第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 96 所示或与 SEQ ID NO: 96 具有至少 85% 序列同一性；和

G) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 107 所示或与 SEQ ID NO: 107 具有至少 85% 序列同一性, 第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 108 所示或与 SEQ ID NO: 108 具有至少 85% 序列同一性, 第二重链的序列如 SEQ ID NO: 109 所示或与 SEQ ID NO: 109 具有至少 85% 序列同一性, 第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 110 所示或与 SEQ ID NO: 110 具有至少 85% 序列同一性;

H) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 122 所示或与 SEQ ID NO: 122 具有至少 85% 序列同一性, 第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 123 所示或与 SEQ ID NO: 123 具有至少 85% 序列同一性, 第二重链的序列如 SEQ ID NO: 116 所示或与 SEQ ID NO: 116 具有至少 85% 序列同一性, 第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 117 所示或与 SEQ ID NO: 117 具有至少 85% 序列同一性;

I) 所述双特异性抗体的第一重链的序列如 SEQ ID NO: 118 所示或与 SEQ ID NO: 118 具有至少 85% 序列同一性, 第一轻链的序列如 SEQ ID NO: 119 所示或与 SEQ ID NO: 119 具有至少 85% 序列同一性, 第二重链的序列如 SEQ ID NO: 124 所示或与 SEQ ID NO: 124 具有至少 85% 序列同一性, 第二轻链的序列如 SEQ ID NO: 125 所示或与 SEQ ID NO: 125 具有至少 85% 序列同一性。

37. 一种制备多特异性抗体的方法, 所述方法包括用 Titin-T 链和 Obscurin-O 链、或者 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链替换抗体的 CH1/CL 的步骤;

更优选地, 所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一序列具有至少 80% 同一性的序列, 和/或

所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 中任一条序列有至少 80% 同一性的序列; 或者

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一条序列具有至少 80% 同一性的序列, 和/或

所述 Obscurin-样-O 链包含如 SEQ ID NO: 34、59-64 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 34、59-64 中任一条序列具有至少 80% 同一性序列;

最优选地,

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示序列, 且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示序列;

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示序列, 且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示序列;

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示序列, 且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 84 所示序列;

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示序列, 且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID

NO: 86 所示序列；或者

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示序列，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示序列。

5 38. 一种多特异性抗体，其是根据权利要求 37 所述的方法制备获得的；其中：所述多特异性抗体包含第一重链可变区（VH1）和第一轻链可变区（VL1），所述 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性结合的抗原结合位点，且

所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者

10 所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接。

39. 如权利要求 38 所述的多特异性抗体，其中，

15 A) 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基础上还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中的一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、
20 E83D 和 F84L 中的一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；和/或

B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中的一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加
30 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；

35 上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin 样

-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点；

优选地，其中，

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、
5 C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84
10 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和
15 A88C 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；

优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为
20 序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、
25 S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；

或者

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、
30 C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84
35 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、

S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

5 B) 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin 样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

40. 一种缀合物，其包含选自以下的 (A) - (F) 任一项：

- 10 A) 权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物；
B) 权利要求 13-17 任一项所述的多特异性多肽复合物；
C) 权利要求 18、20、27-35 任一项所述的结构域改造抗体；
D) 权利要求 19、27-35 任一项所述的结构域改造抗体的 Fab 片段；
E) 权利要求 21-36 任一项所述的双特异性抗体；和
F) 权利要求 38 或 39 所述的多特异性抗体。

15

41. 一种多肽，其序列如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一序列所示或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 任一条序列有至少 80% 同一性；或者

序列如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 任一条序列有至少 80% 同一性；或者

20 序列如 SEQ ID NO: 34、59-64 任一条序列所示或与 SEQ ID NO: 34、59-64 任一条序列具有至少 80% 同一性；

优选地，所述多肽可用于替换抗体 CH1 和/或 CL。

25 42. Titin-T 链和 Obscurin-O 链的组合、或者 Titin-T 链和 Obscurin-样-O 链的组合在减少多特异性抗体轻链/重链错配中的用途；

优选地，所述多特异性抗体包含第一重链可变区 (VH1) 和第一轻链可变区 (VL1)，所述 VH1 和 VL1 形成与第一抗原特异性结合的抗原结合位点，且

所述 VH1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VL1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接，或者

30 所述 VL1 的 C 端与 Titin-T 链的 N 端可操作地连接，所述 VH1 的 C 端与 Obscurin-O 链或 Obscurin-样-O 链的 N 端可操作地连接；

更优选地，所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一序列具有至少 80% 同一性的序列，和/或所述 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 中任一所示的
35 序列或与 SEQ ID NO: 33、42-58、77-86 中任一条序列有至少 80% 同一性的序列；或者

所述 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 32、35-41、65-76 中任一条序列具有至少 80% 同一性的序列，和/或所述 Obscurin-样-O 链包含如 SEQ ID NO: 34、59-64 中任一所示的序列或与 SEQ ID NO: 34、59-64 中任一条序列具有至少 80% 同一性序列；

5 最优选地，

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 68 所示序列，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 80 所示序列；

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 73 所示序列，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 83 所示序列；

10 Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示序列，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 84 所示序列；Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 76 所示序列，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示序列；或者

Titin-T 链包含如 SEQ ID NO: 75 所示序列，且 Obscurin-O 链包含如 SEQ ID NO: 86 所示序列。

15

43. 如权利要求 42 所述的用途，其中，

A) 所述 Titin-T 链的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基础上还具有选自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中的一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 5 个氨基酸残基 KAGIR 的序列；优选具有选自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 KAGIR 氨基酸残基的序列；和/或

25 B) 所述 Obscurin-O 链的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基础上还具有选自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中的一个或多个位点的氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；优选具有选自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个位点氨基酸突变和/或 N 端增加 DQPQF 氨基酸残基的序列；或者

35 所述 Obscurin-样-O 链的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基础上还具有选自 6、26、74、77、84 和 86 中的一个或多个位点氨基酸突变的序列；优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个位点氨

基酸突变的序列；

上述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；
Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 33 的自然顺序编号位点；Obscurin-样
-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点；

5 优选地，其中，

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、
26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、
C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点
为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

10 更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、
13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84
位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、
R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、
S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链
15 突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:33 序列基础上具有选自第 3、9、25、
76 和 88 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选自 A3C、R9C、C25S、C76S 和
A88C 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为序列 SEQ ID
NO: 33 的自然顺序编号位点；

20 优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:45 序列基础上还具有选自第 7、
11、62 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 L7K 或 L7R、T62K 或
T62H、和 K11L 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-O 链突变位点为
序列 SEQ ID NO: 45 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Obscurin-O 链为在 SEQ ID NO:50 序列基础上具有选自第 2、
25 11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、
67、69、89、92、94 和 97 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 G2E、
L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、
S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、
V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一个或多个氨基酸突变，所述 Obscurin-O 链突
30 变位点为序列 SEQ ID NO: 50 的自然顺序编号位点；

或者

A) 所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:32 序列基础上具有选自第 8、20、22、25、
26 和 39 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 A8C、V20C、T22C、
C25S、A26C 和 C39T 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Titin-T 链突变位点
35 为序列 SEQ ID NO: 32 的自然顺序编号位点；

更优选地，所述 Titin-T 链为在 SEQ ID NO:35 序列基础上具有选自第 3、11、

13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一个或多个氨基酸突变，优选具有选自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一个或多个氨基酸突变；所述 Titin-T 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 35 的自然顺序编号位点，和/或

B) 所述 Obscurin-样-O 链为在 SEQ ID NO:34 序列基础上具有选自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一个或多个氨基酸残基突变，优选具有选自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一个或多个氨基酸残基突变，所述 Obscurin-样-O 链突变位点为序列 SEQ ID NO: 34 的自然顺序编号位点。

10

44. 一种核酸分子，其编码选自以下 (A) - (G) 的任一项：

A) 如权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物，

B) 如权利要求 13-17 任一项所述的多特异性多肽复合物，

C) 如权利要求 18、20、27-35 任一项所述的结构域改造抗体，

15 D) 如权利要求 19、27-35 任一项所述的结构域改造抗体的 Fab 片段，

E) 如权利要求 21-36 任一项所述的双特异性抗体，

F) 如权利要求 41 所述的多肽，和

G) 如权利要求 38 或 39 所述的多特异性抗体。

20

45. 一种载体，其包含如权利要求 44 所述的核酸分子。

46. 一种宿主细胞，其由权利要求 45 所述的载体转化获得；所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。

25

47. 一种制备方法，其制备选自以下的任一项：

如权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物，或权利要求 13-17 任一项所述的多特异性多肽复合物，或权利要求 18、20、27-35 任一项所述的结构域改造抗体、或权利要求 19、27-35 任一项所述的结构域改造抗体的 Fab 片段、或权利要求 21-36 任一项所述的双特异性抗体、或权利要求 41 所述的多肽，或权利要求 38 或 39 所述的多特异性抗体；

30

所述方法包括以下步骤：

培养权利要求 46 所述的宿主细胞，然后纯化并回收多肽复合物、多特异性多肽复合物、结构域改造抗体、结构域改造抗体的 Fab 片段、双特异性抗体、多肽或多特异性抗体。

35

48. 一种药物组合物，其包含一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂，以及选自以下的任一项：

如权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物，或如权利要求 13-17 任一项所述的多特异性多肽复合物，或如权利要求 18、20、27-35 任一项所述的结构域改造抗体、或如权利要求 19、27-35 任一项所述的结构域改造抗体的 Fab 片段、或如权利要求 21-36 任一项所述的双特异性抗体、或如权利要求 38 或 39 所述的多特异性抗体、或如权利要求 40 所述的缀合物。

49. 选自以下的任一项在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途：如权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物，或如权利要求 13-17 任一项所述的多特异性多肽复合物，或如权利要求 18、20、27-35 任一项所述的结构域改造抗体、或如权利要求 19、27-35 任一项所述的结构域改造抗体的 Fab 片段、或如权利要求 21-36 任一项所述的双特异性抗体、或如权利要求 48 所述的药物组合物、或如权利要求 38 或 39 所述的多特异性抗体、或如权利要求 40 所述的缀合物。

50. 一种检测方法，所述方法包括使选自以下的任一项接触待测样本：
如权利要求 1-12 任一项所述的多肽复合物，或如权利要求 13-17 任一项所述的多特异性多肽复合物，或如权利要求 18、20、27-35 任一项所述的结构域改造抗体、或权利要求 19、27-35 任一项所述的结构域改造抗体的 Fab 片段、或权利要求 21-36 任一项所述的双特异性抗体、或如权利要求 38 或 39 所述的多特异性抗体。

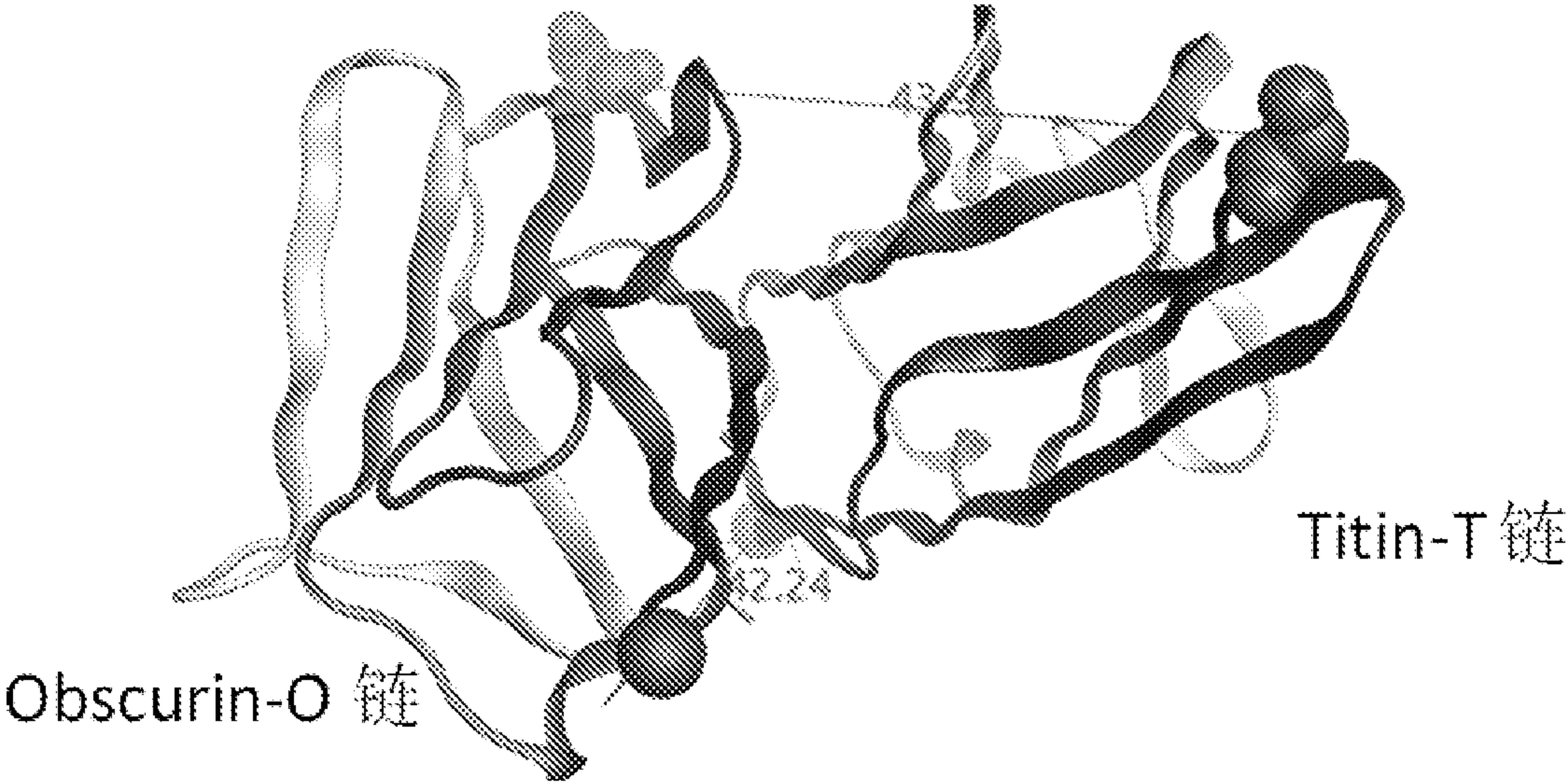


图 1A

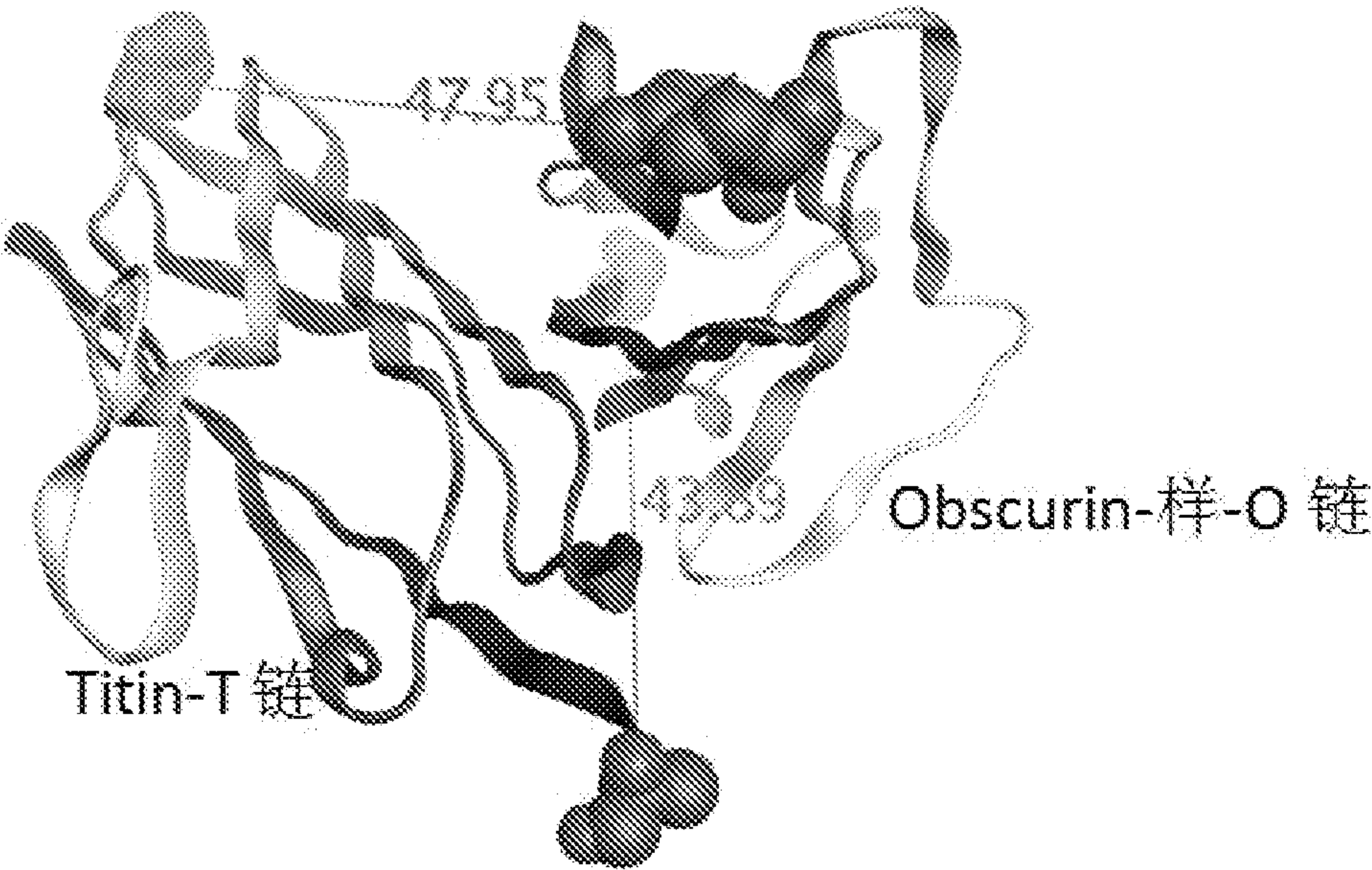


图 1B

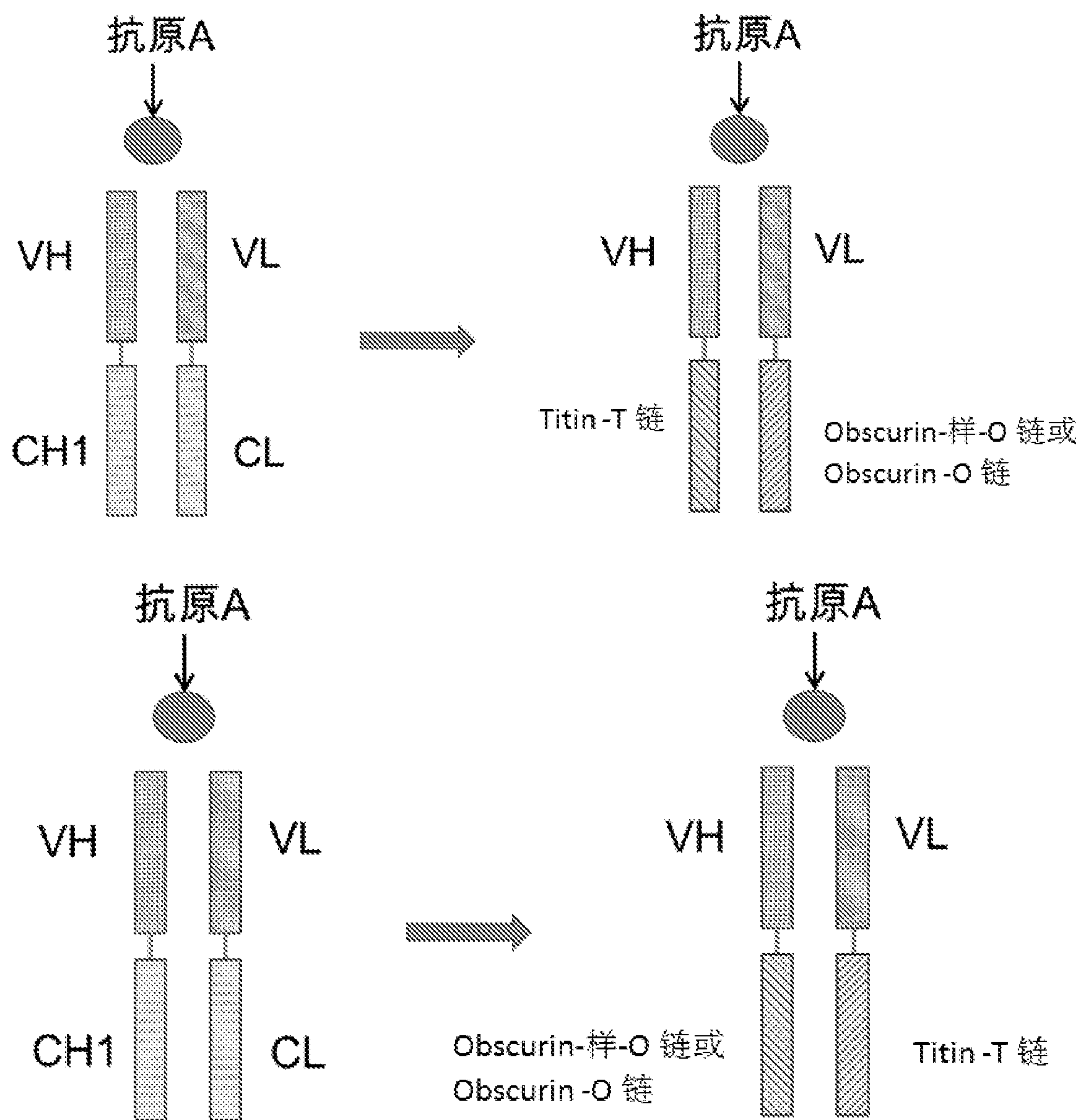


图 2

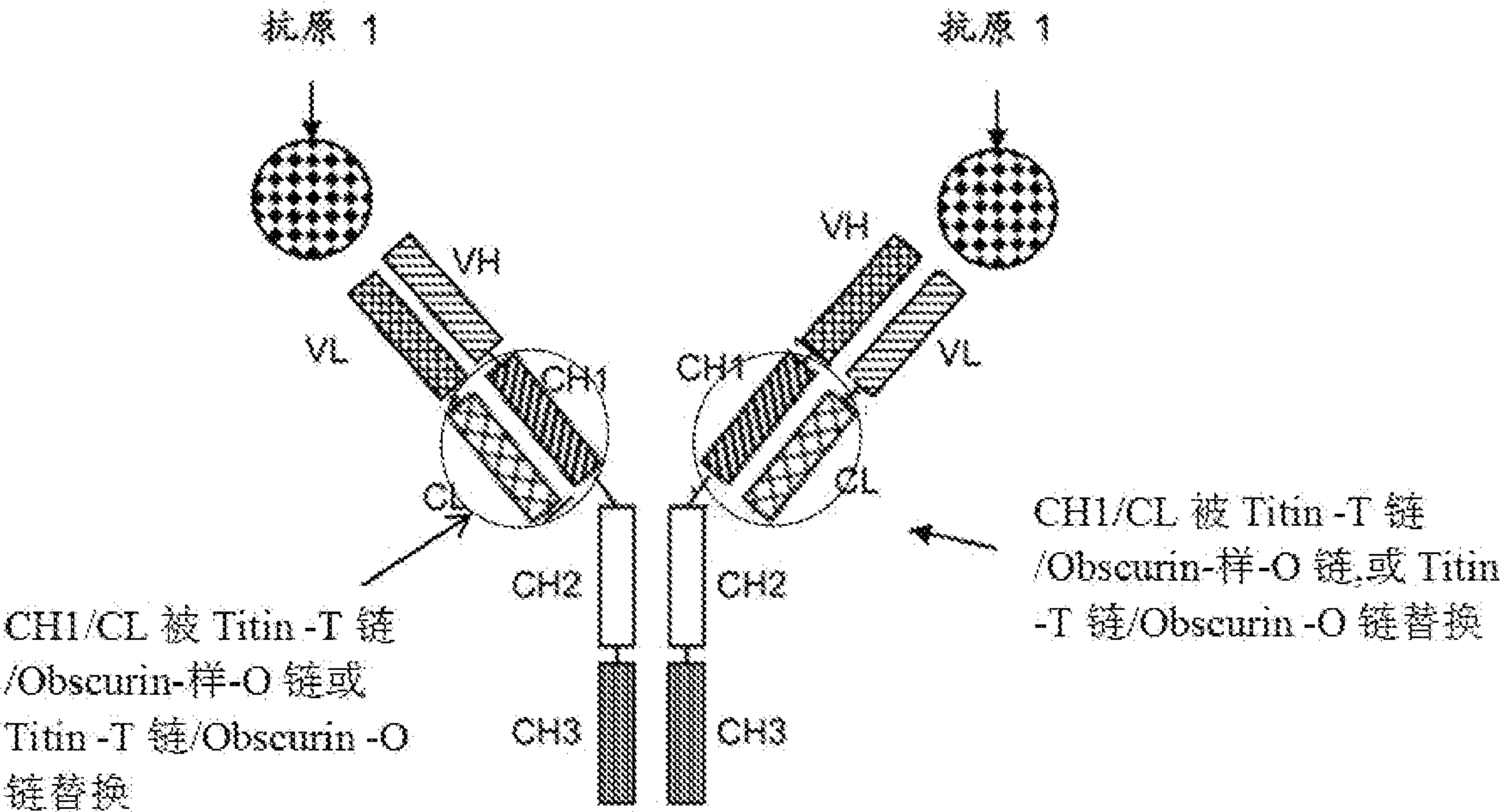


图 3

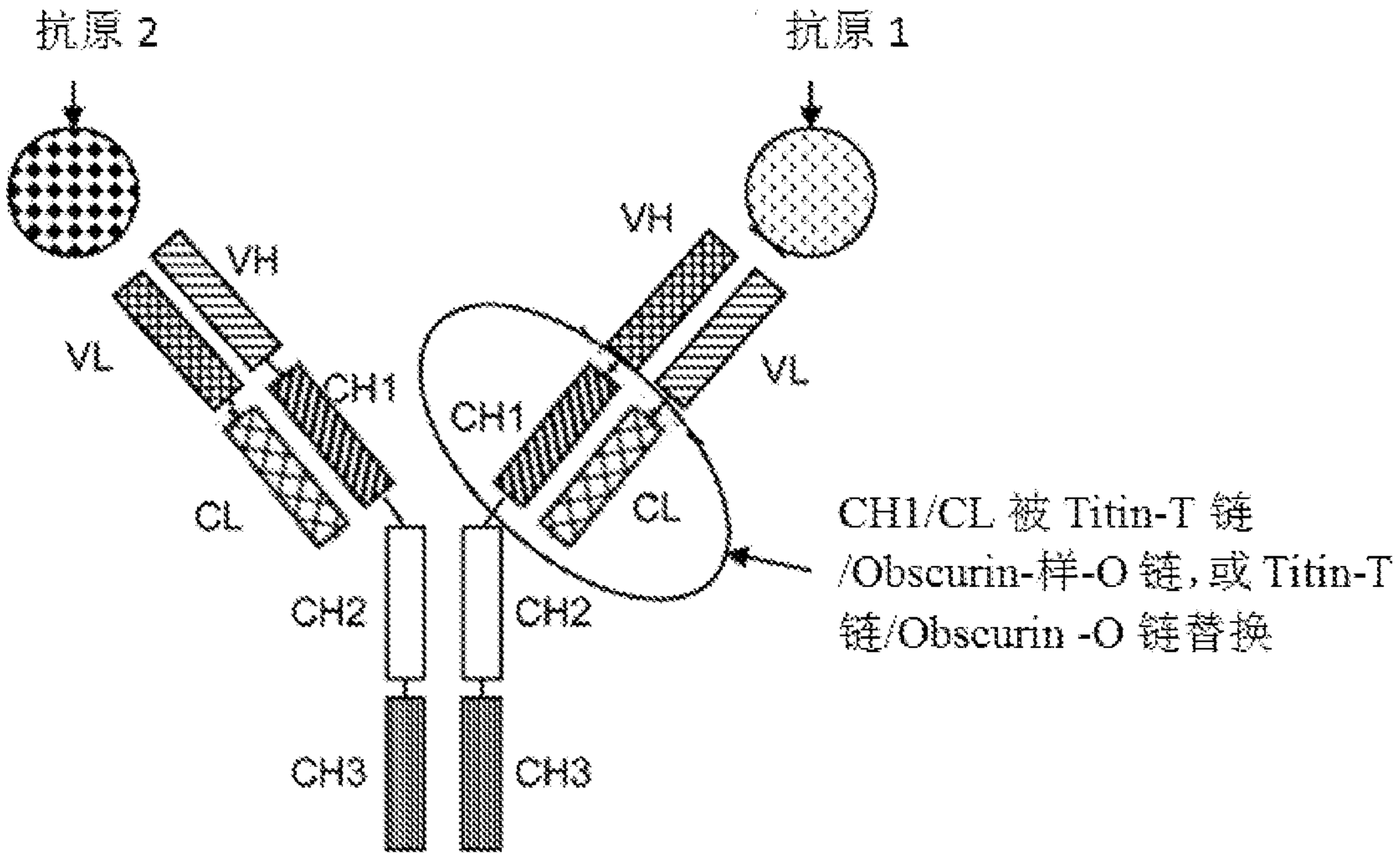


图 4

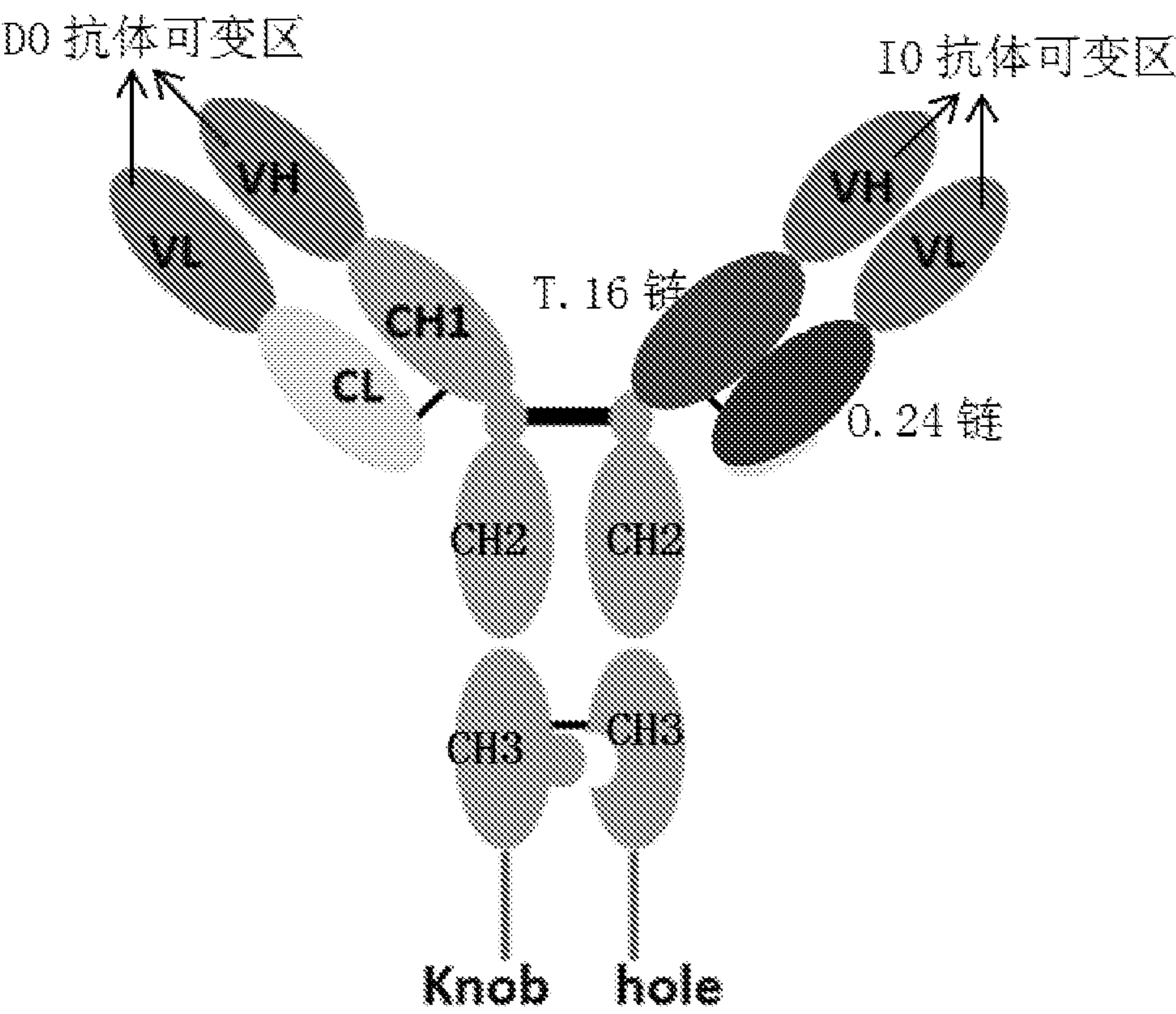


图 5

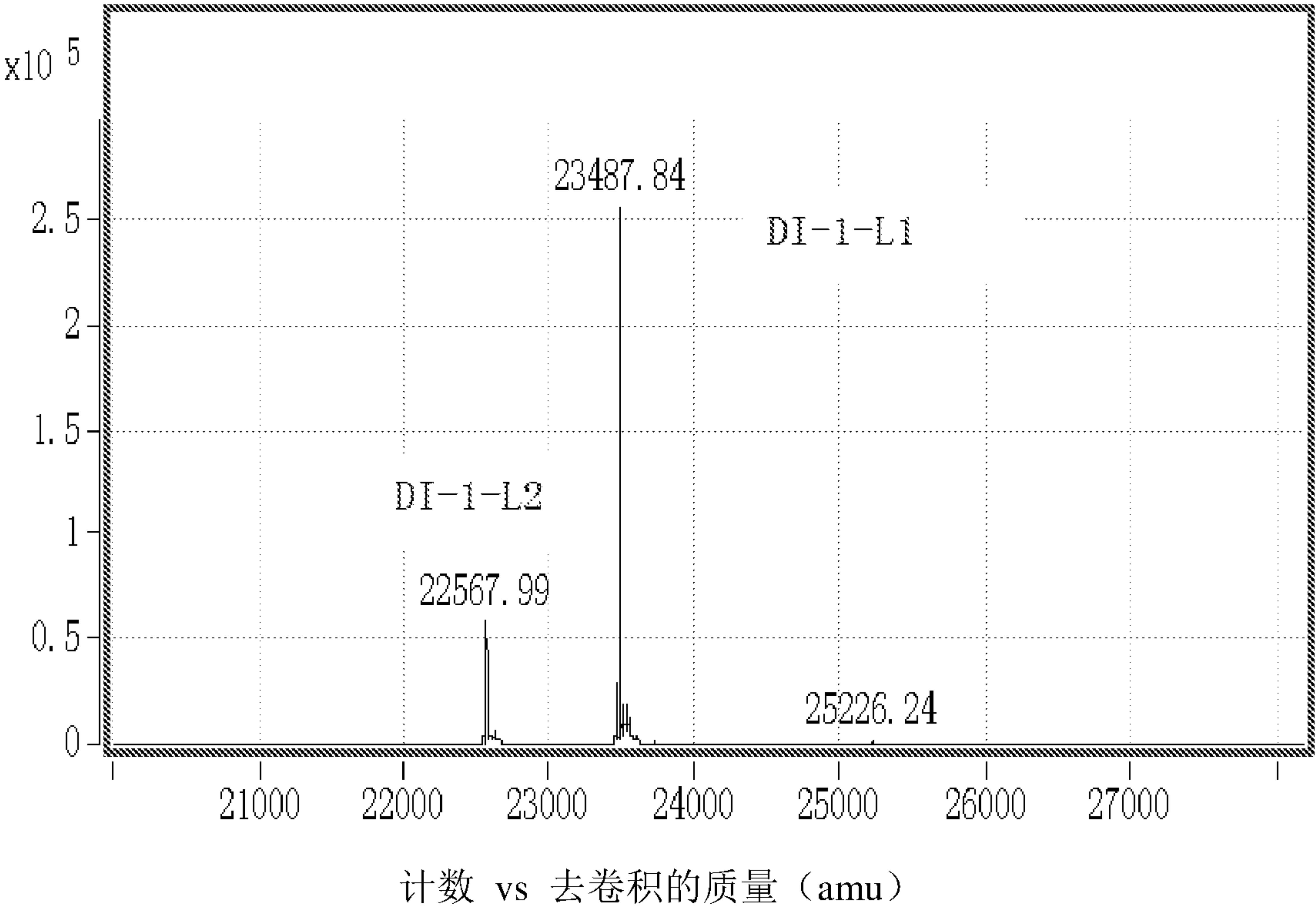


图 6A

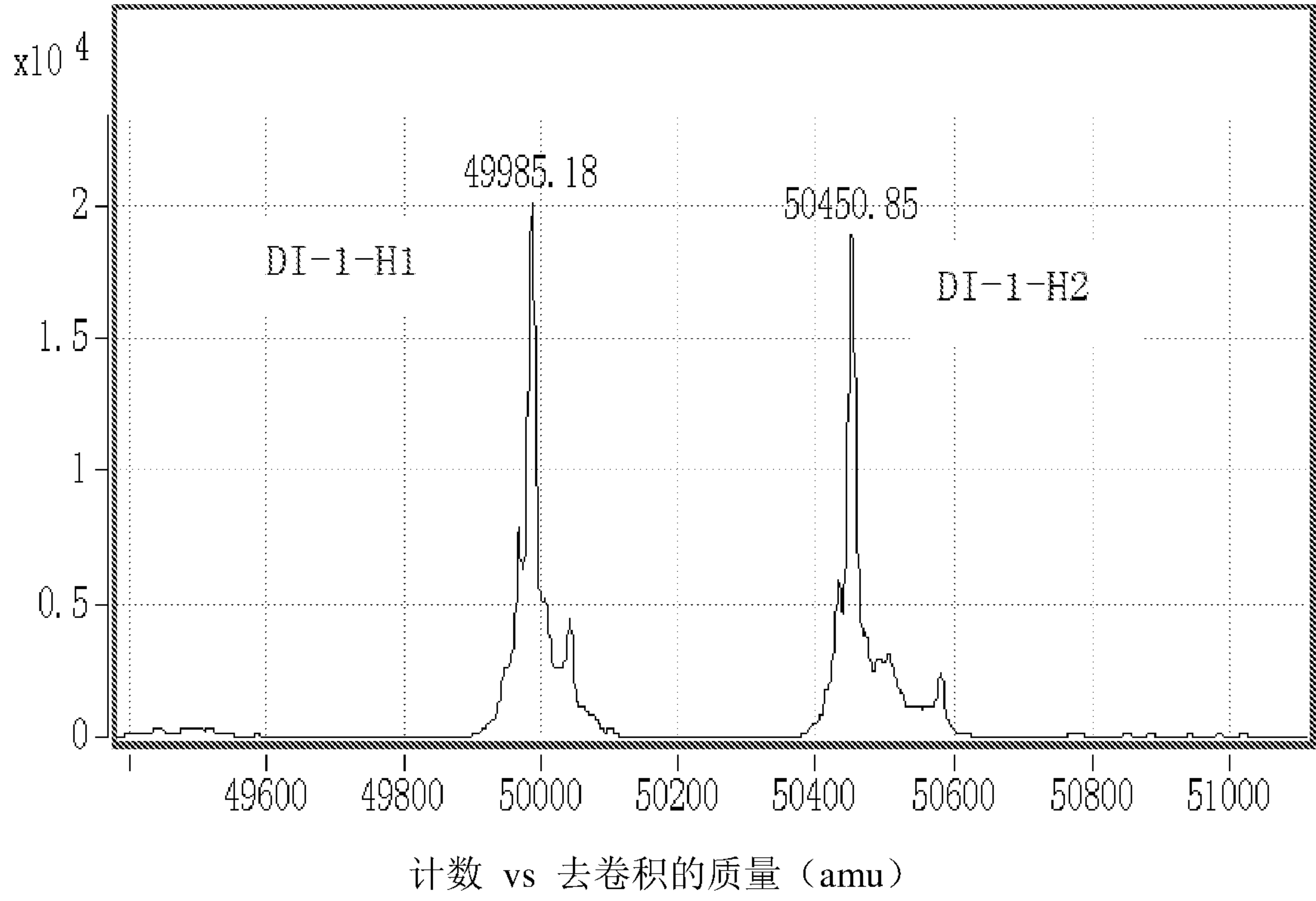


图 6B

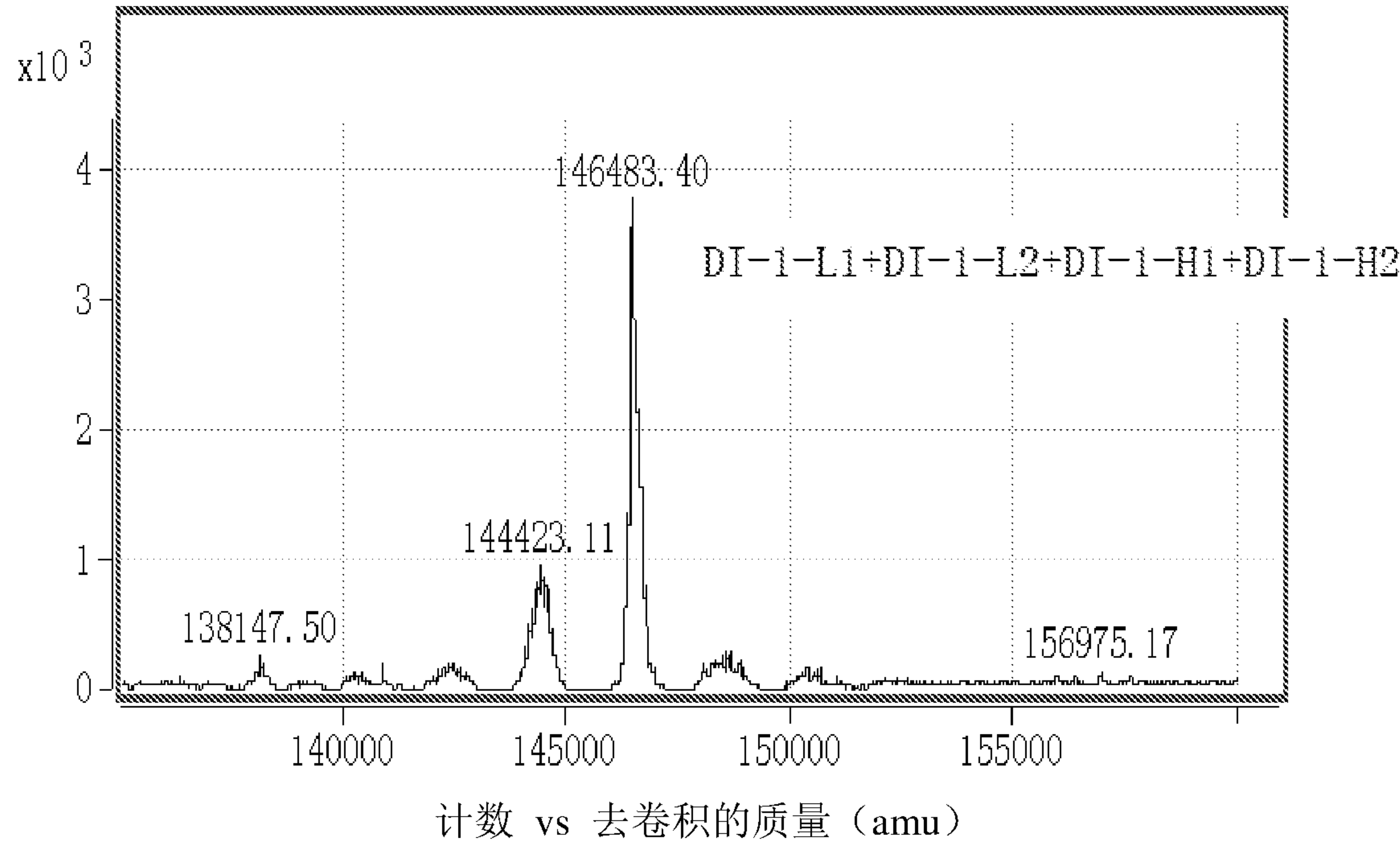


图 6C

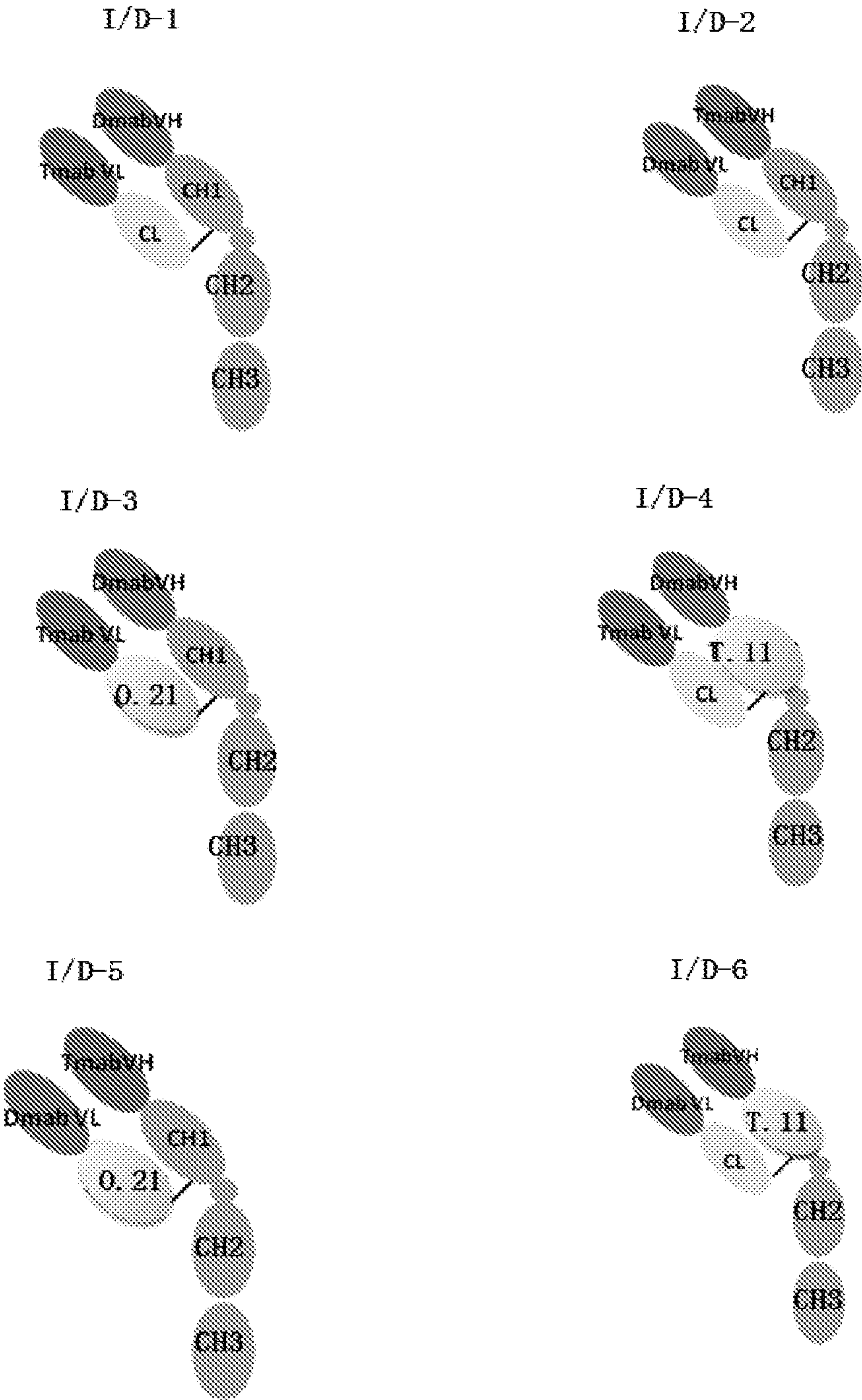


图 7

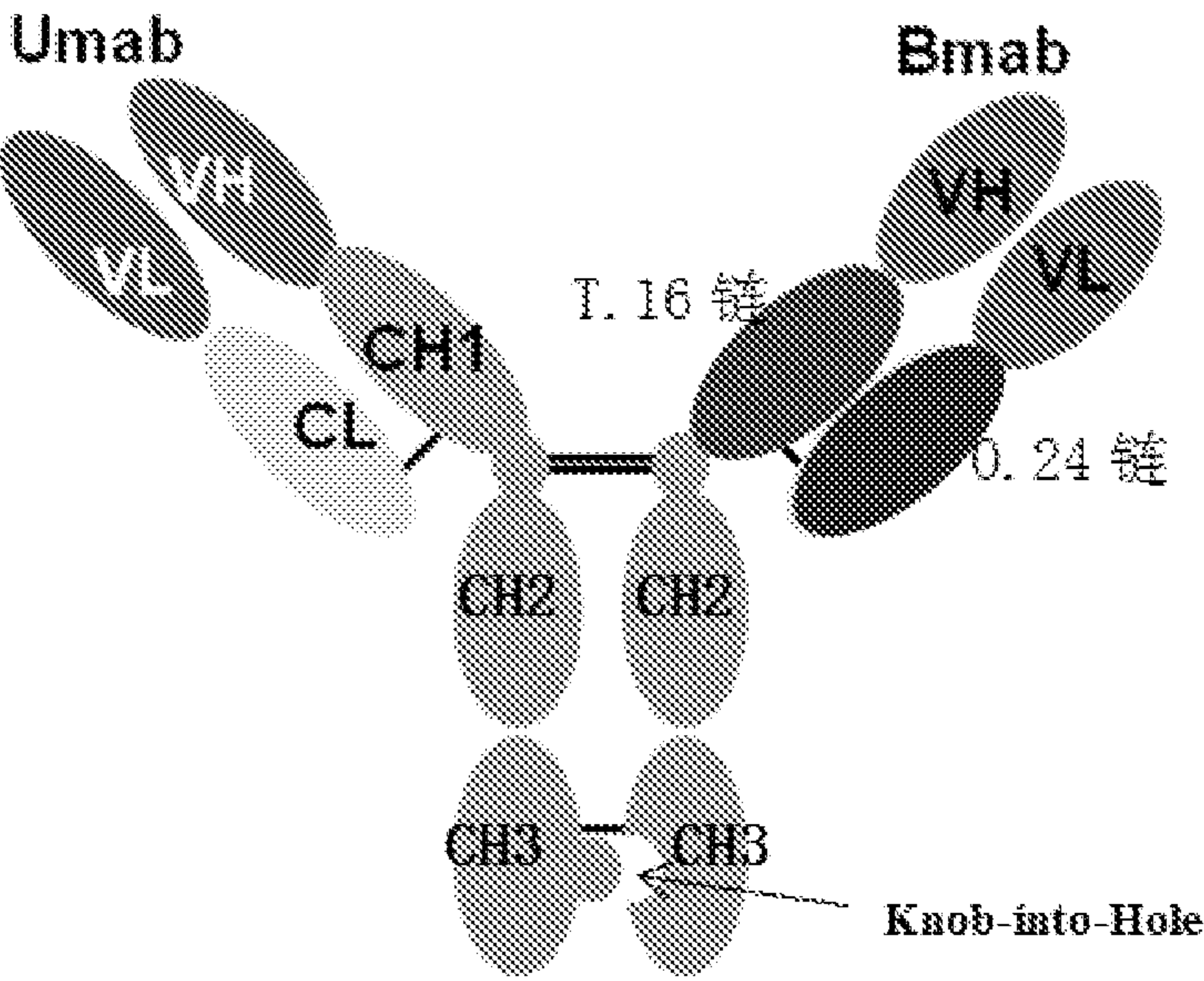


图 8

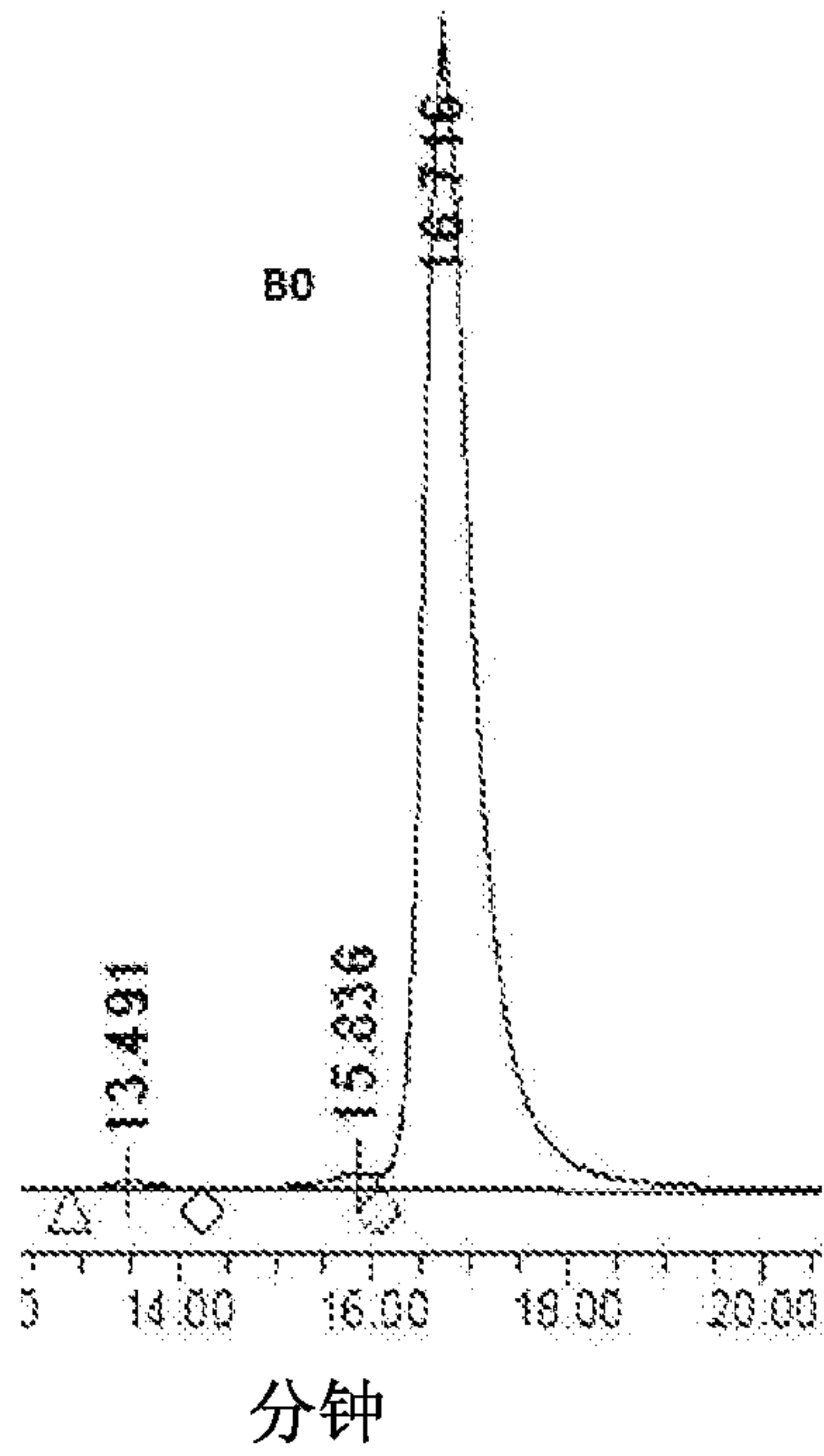


图 9A

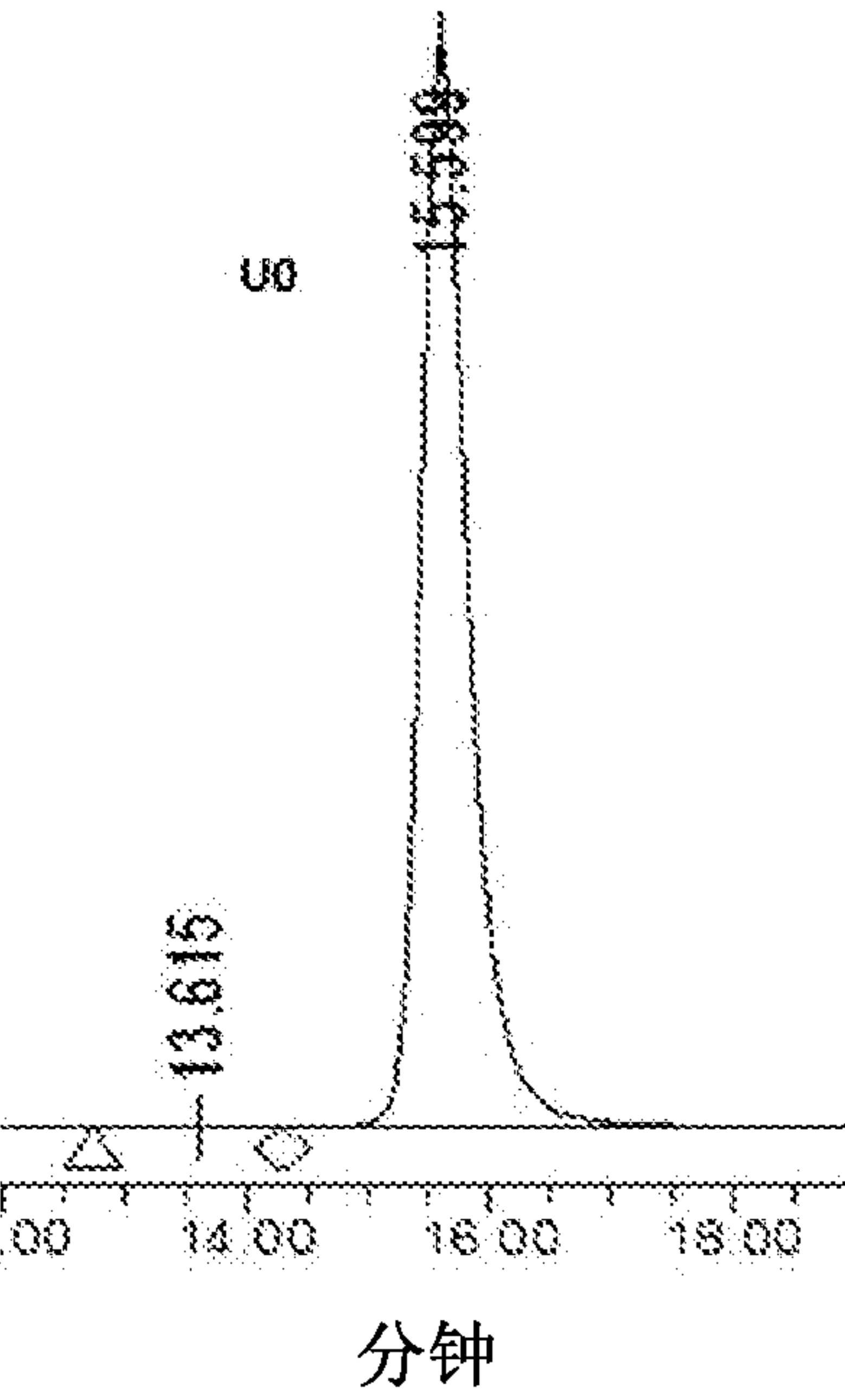


图 9B

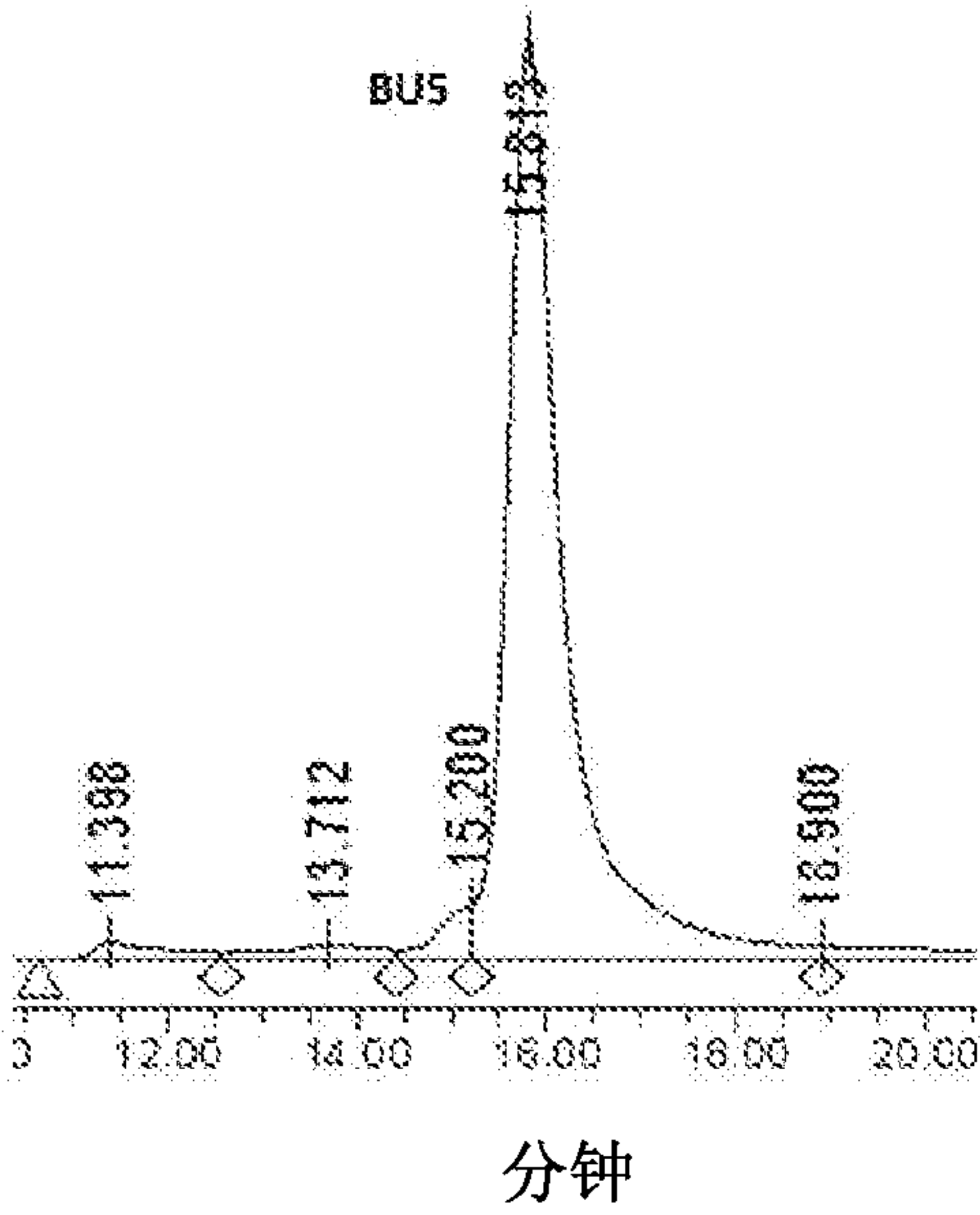


图 9C

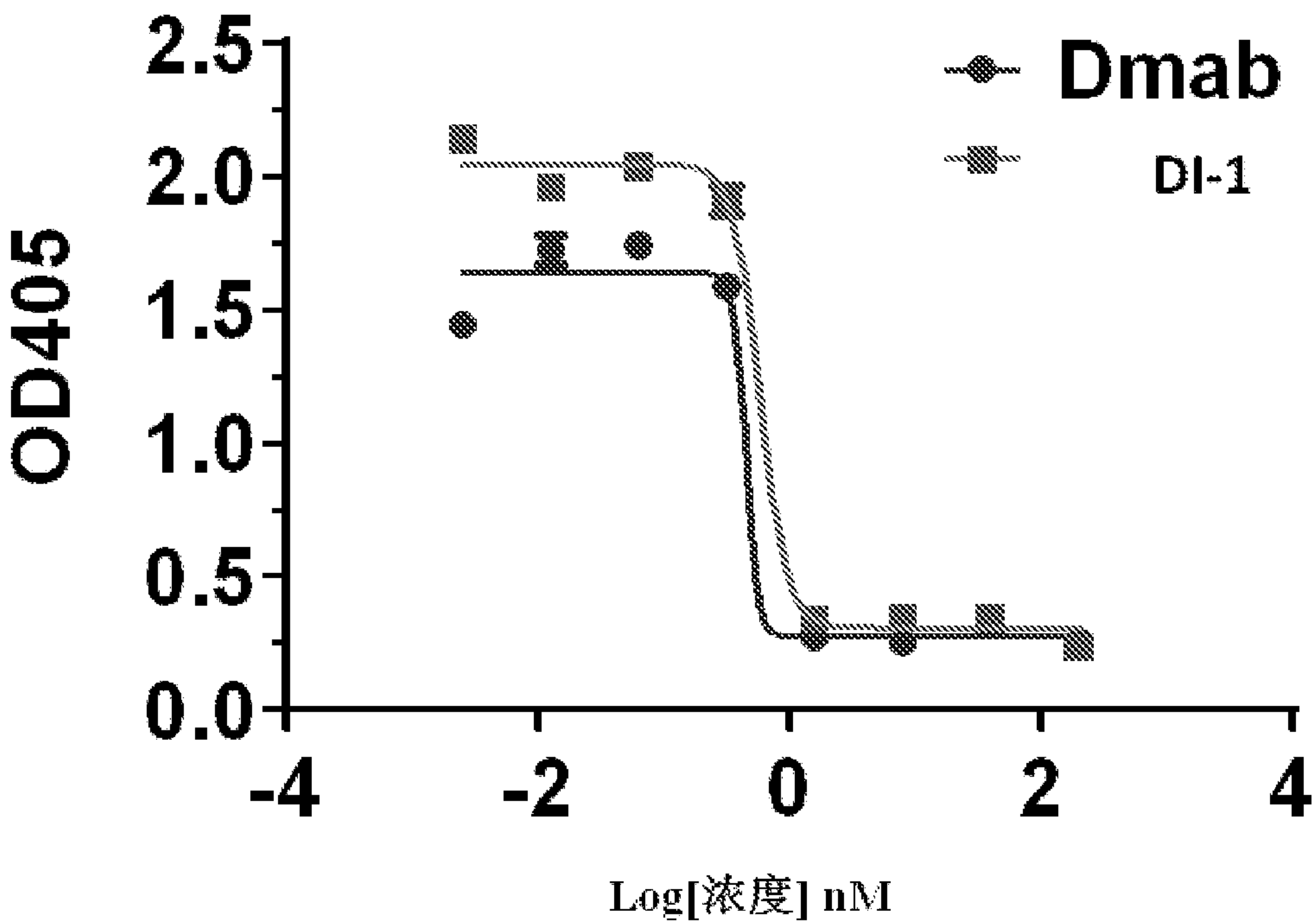


图 10

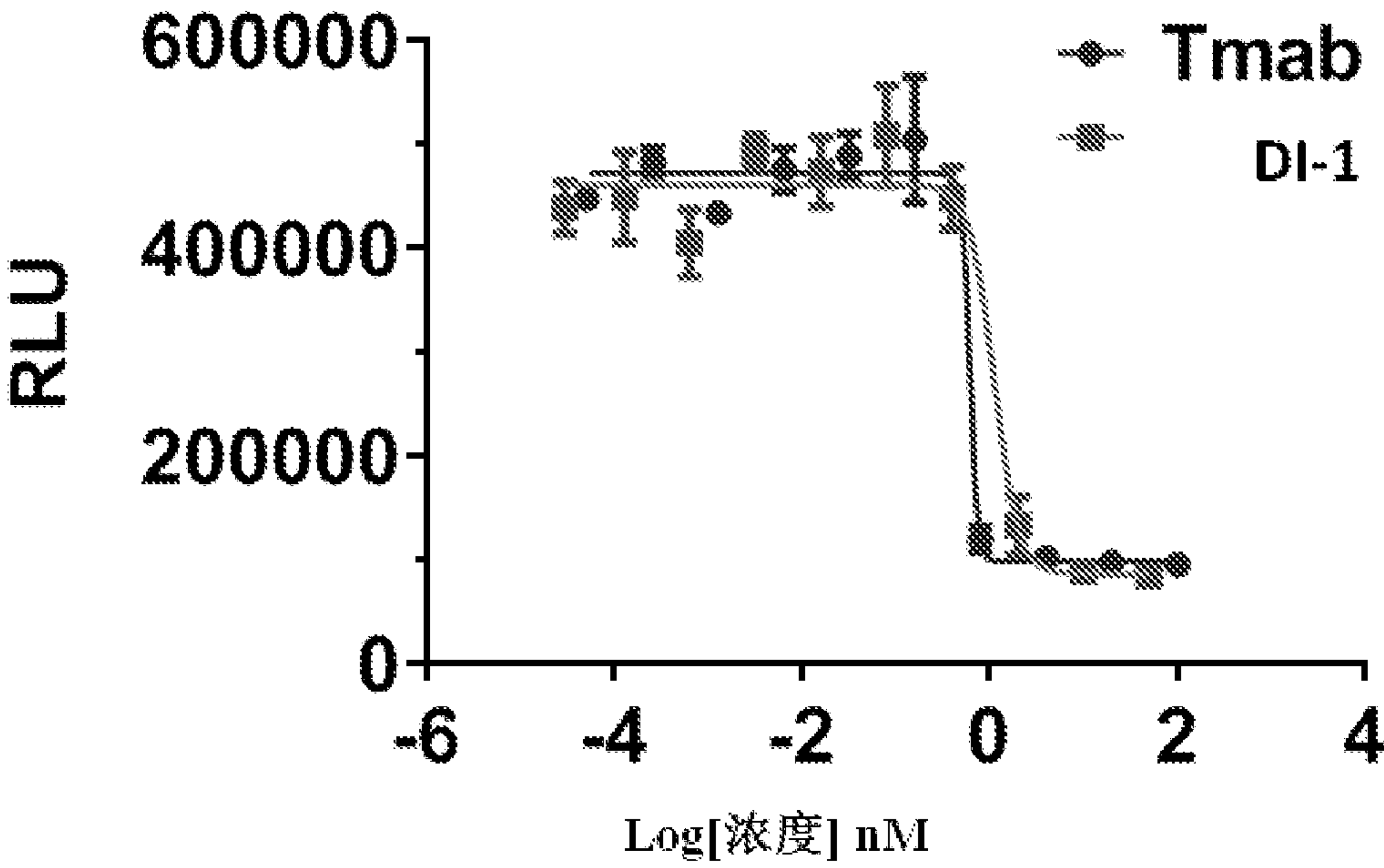


图 11

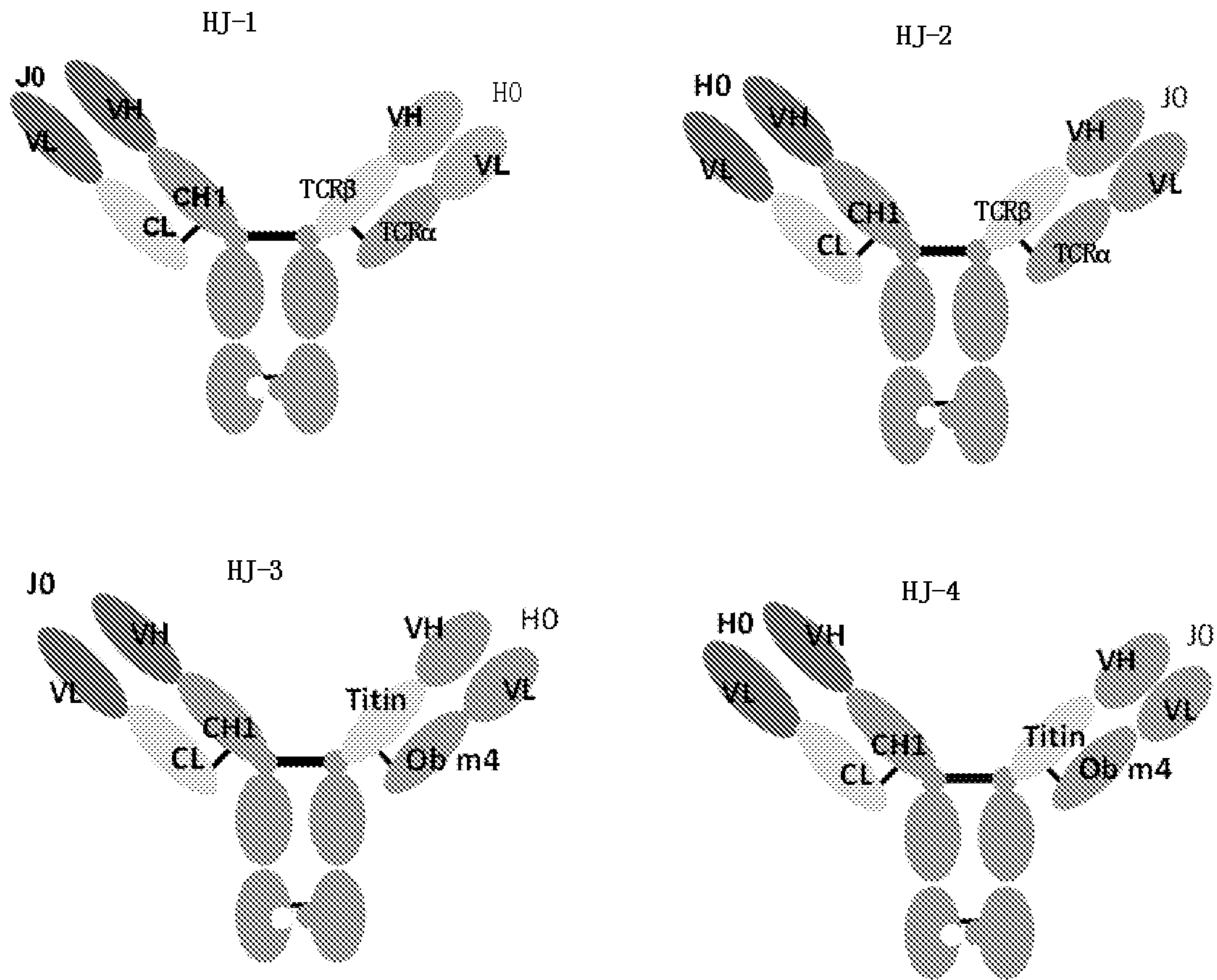


图 12

HJ-1

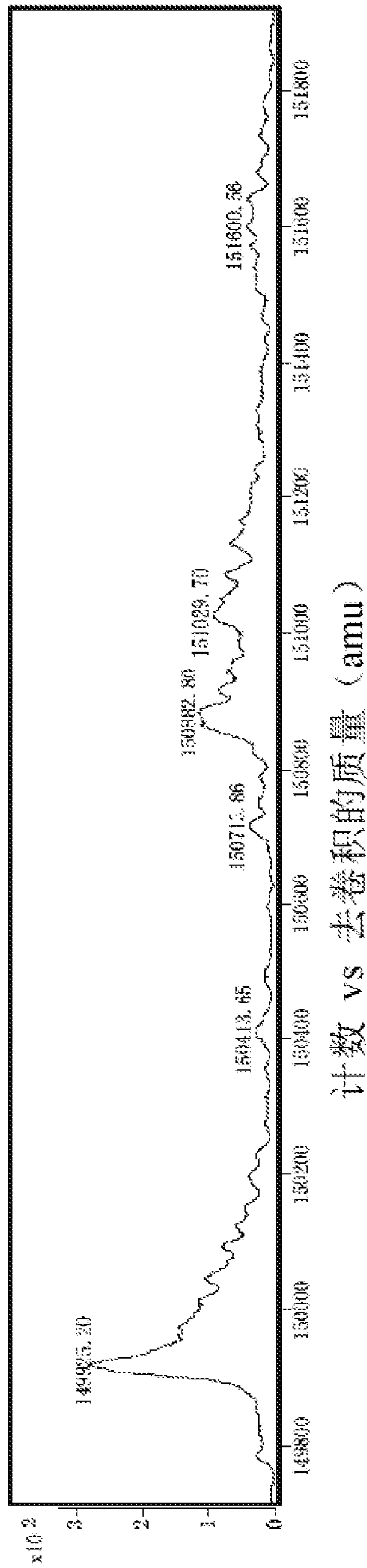


图 13A

HJ-2

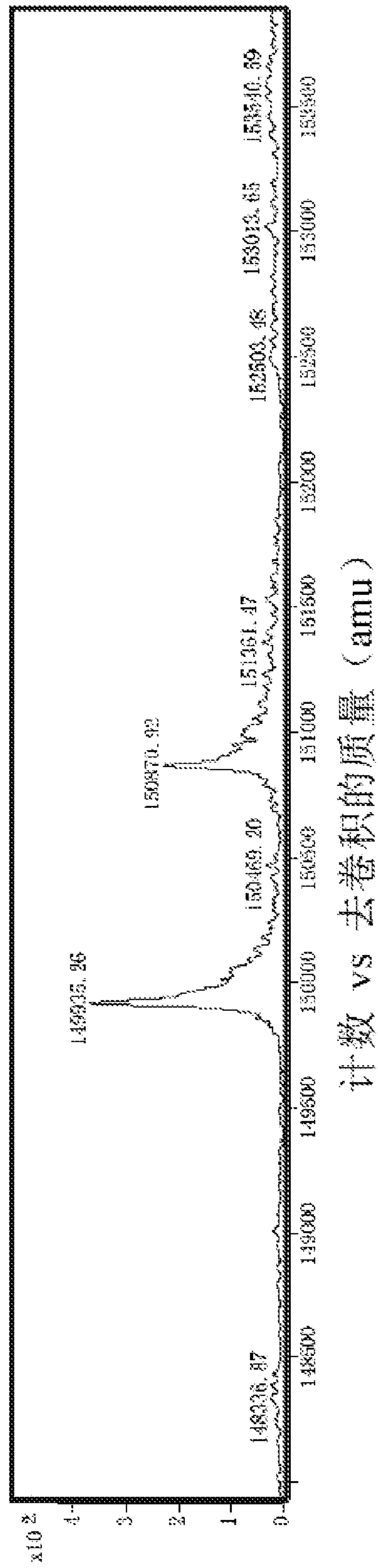
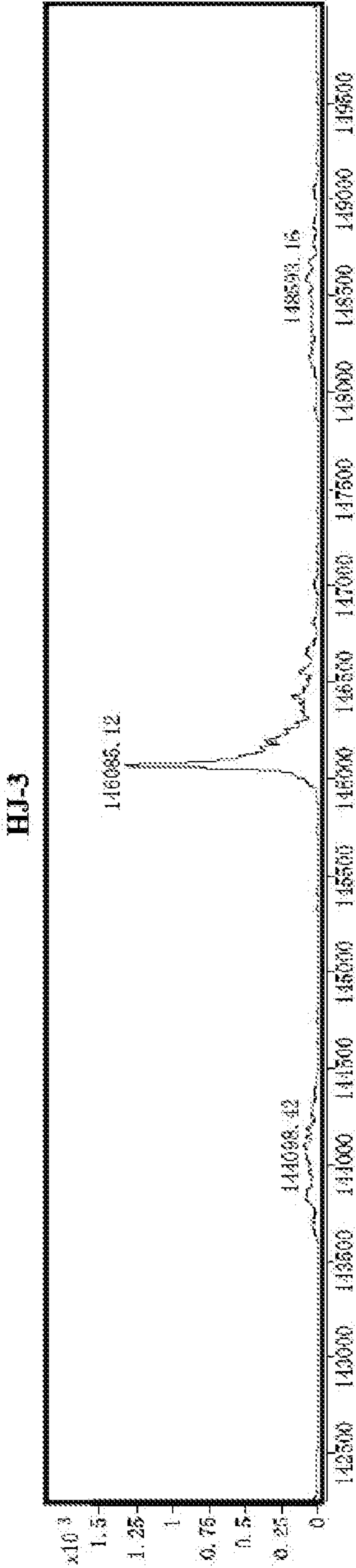
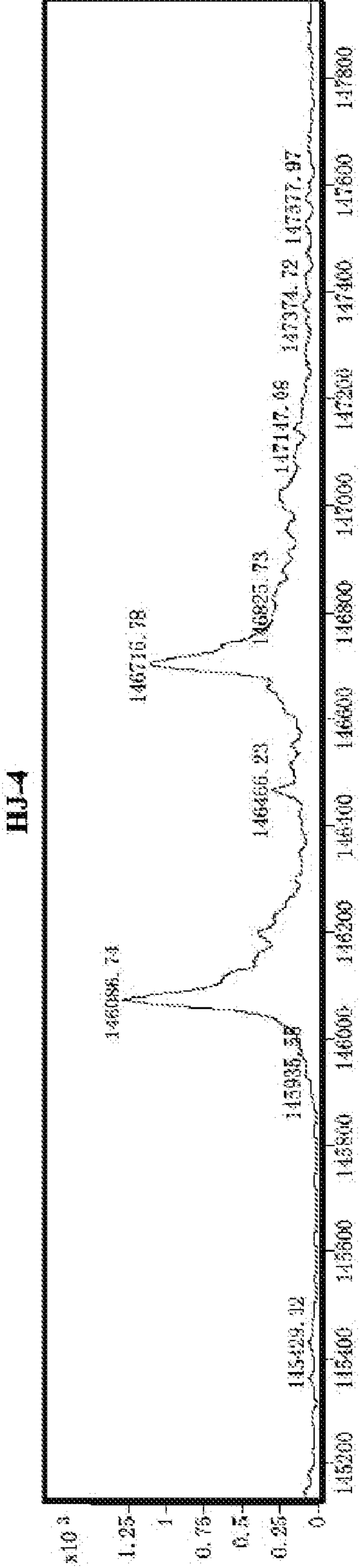


图 13B



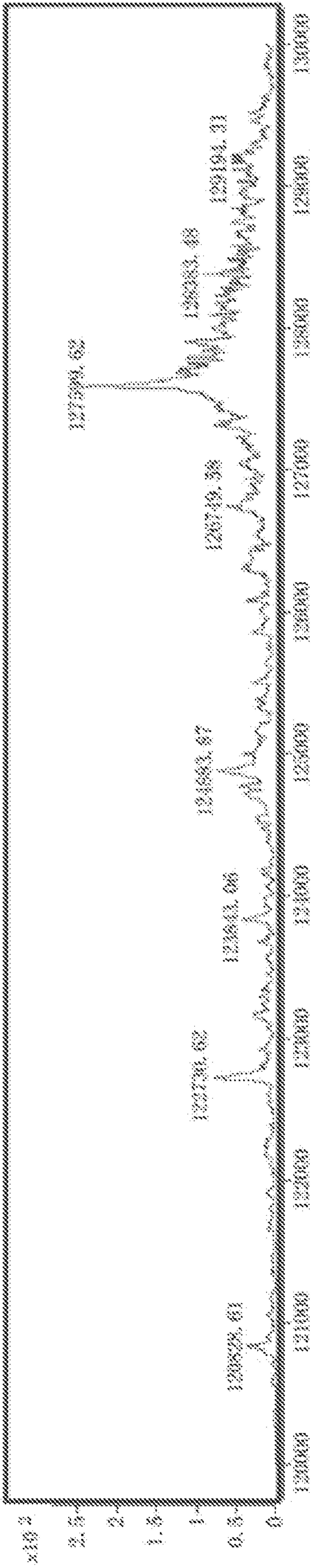
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 13C



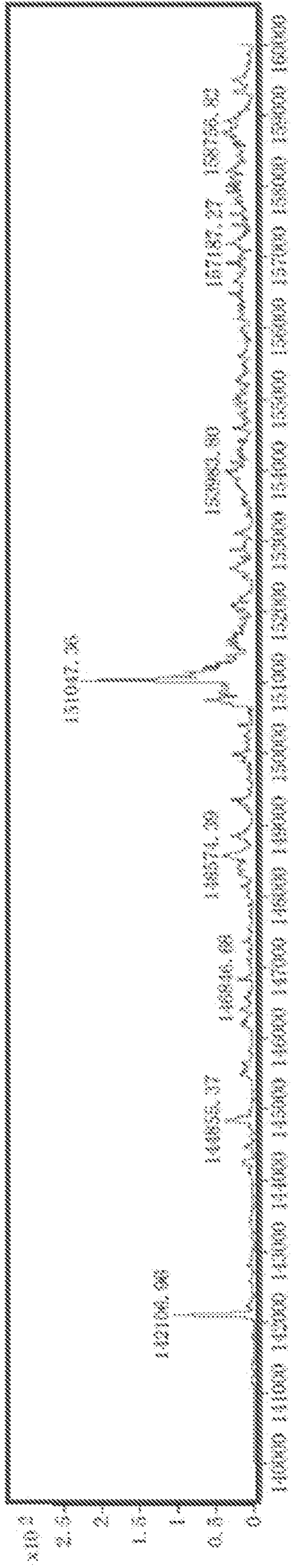
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 13D



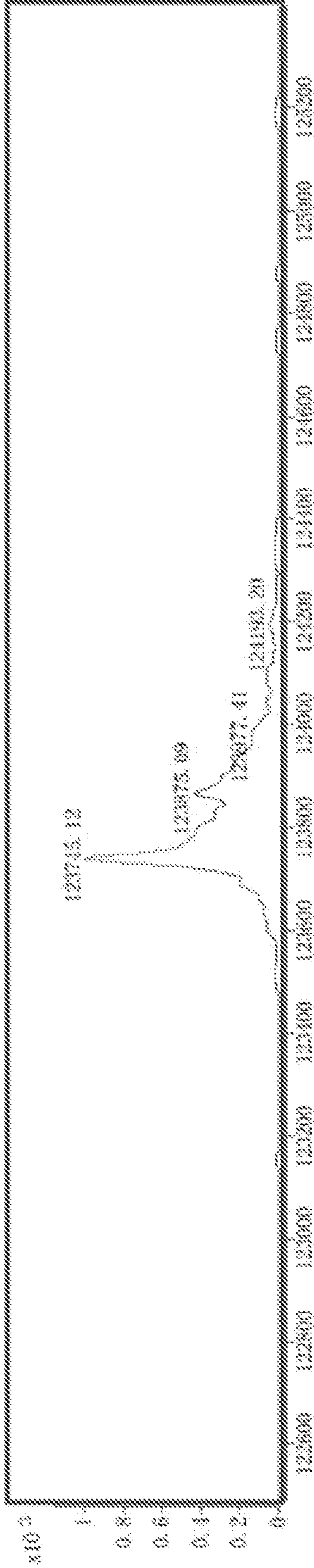
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 14A



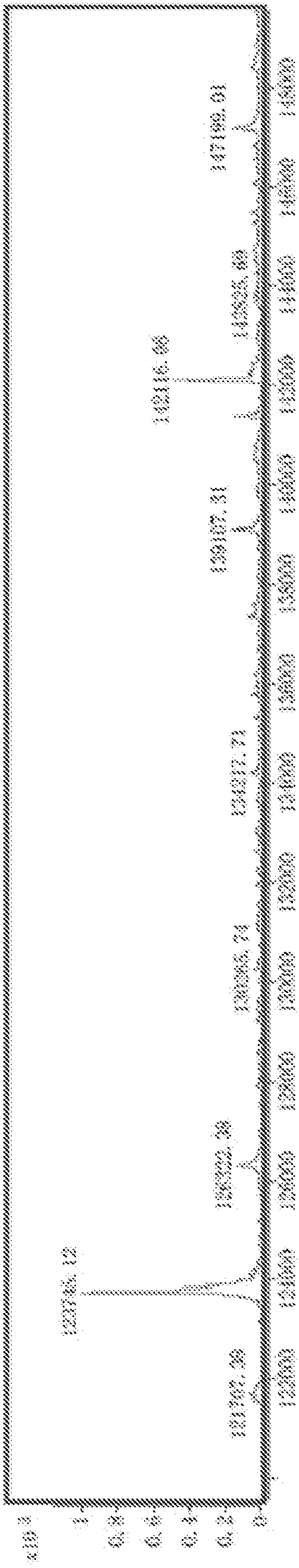
计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 14B



计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 15A



计数 vs 去卷积的质量 (amu)

图 15 B

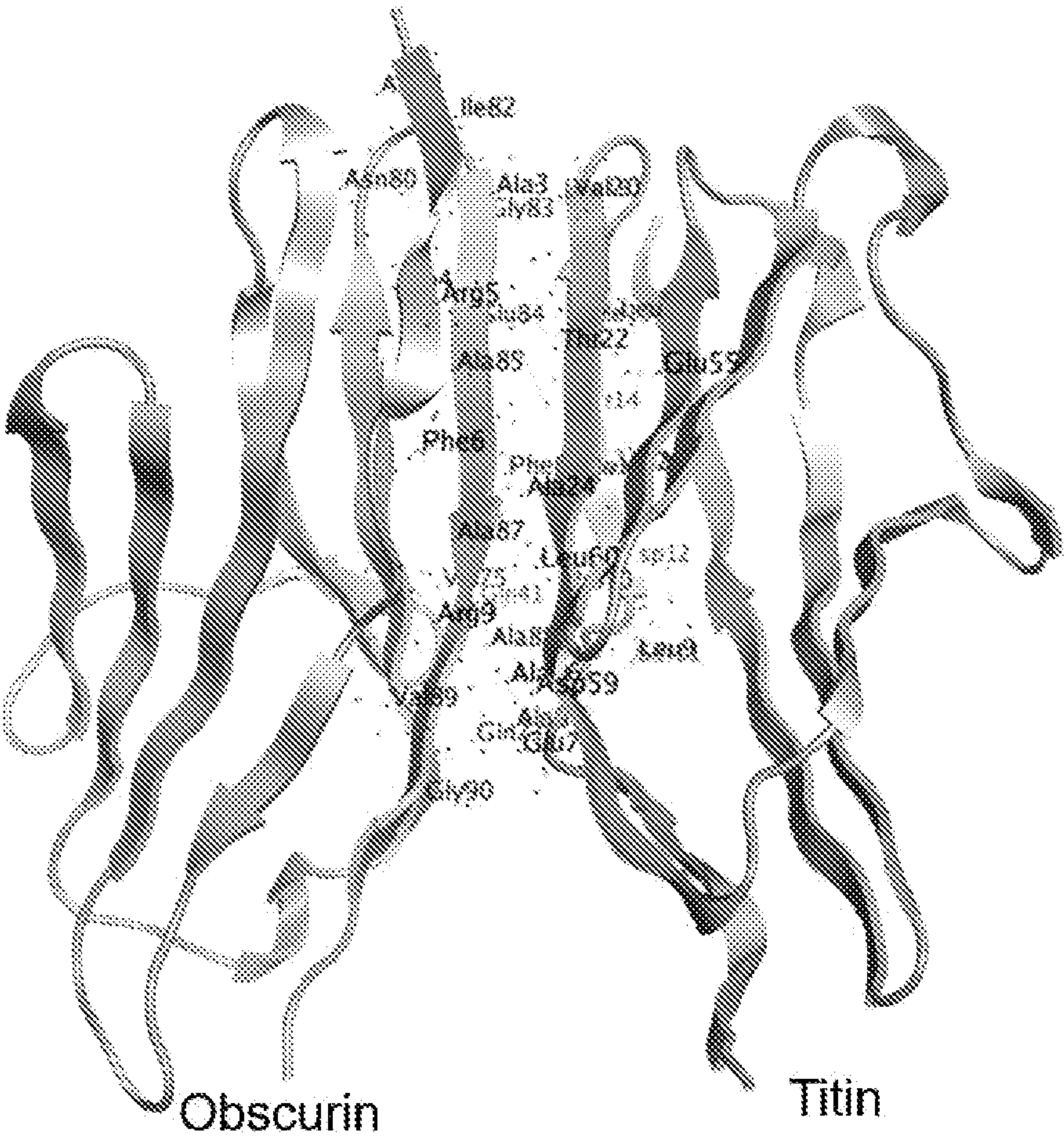


图 16A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/070832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; C12N; G01N

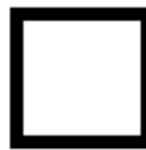
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; ISI Web of Science; 中国专利生物序列检索系统; GenBank; EMBL; DDBJ; STN; 江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司, 应华, 抗体, 重链恒定区, 轻链恒定区, 重链可变区, 轻链可变区, 替代, 替换, 肌联蛋白, 遮蔽蛋白, 类遮蔽蛋白1, 结构域, 免疫球蛋白, 复合物, 结合, 错配, search based on sequences 32-86, Obscurin-样1, antibody, CH1, CL, VH1, VL1, replace, titin, obscurin, obscurin-like-1, region, domain, Ig, complex, bind, mispair

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 108601830 A (BIOGEN IDEC INC) 28 September 2018 (2018-09-28) description paragraphs [0006], [0092], [0094], [0187]	1-50
Y	WU, Xiufeng et al. "Protein Design of IgG/TCR Chimeras for the Co-Expression of Fab-Like Moieties within Bispecific Antibodies" <i>mAbs</i> , Vol. 7, No. 2, 30 April 2015 (2015-04-30), abstract, page 365 figure 1	1-50
Y	Stefano Pernigo et al. "The Crystal Structure of the Human Titin: Obscurin Complex Reveals a Conserved yet Specific Muscle M-Band Zipper Module" <i>Journal of Molecular Biology</i> , Vol. volume 427, 06 December 2014 (2014-12-06), abstract, page 730 table 2, page 730 right-hand column paragraph 1- page 732 left-hand column paragraph 1, page 733 left-hand column paragraph 1, page 733 figure 2	1-50
Y	WO 2014014796 A1 (LILLY CO ELI) 23 January 2014 (2014-01-23) description, page 2 line 1 - page 7 line 13	1-50



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2021

Date of mailing of the international search report

02 April 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/070832

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/070832

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108601830	A	28 September 2018	WO	2017106462	A1	22 June 2017
				JP	2019502694	A	31 January 2019
				CA	3008840	A1	22 June 2017
				AU	2016370821	A1	12 July 2018
				EP	3389710	A1	24 October 2018
				KR	20180100136	A	07 September 2018
				US	2019048098	A1	14 February 2019
				HK	1259784	A0	06 December 2019
WO	2014014796	A1	23 January 2014	US	2015183877	A1	02 July 2015

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/070832
A. 主题的分类 C07K 16/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; A61K; C12N; G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; ISI Web of Science; 中国专利生物序列检索系统; GenBank; EMBL; DDBJ; STN; 江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司, 应华, 抗体, 重链恒定区, 轻链恒定区, 重链可变区, 轻链可变区, 替代, 替换, 肌联蛋白, 遮蔽蛋白, 类遮蔽蛋白1, 结构域, 免疫球蛋白, 复合物, 结合, 错配, 基于序列32-86的检索, Obscurin-样1, antibody, CH1, CL, VH1, VL1, replace, titin, obscurin, obscurin-like-1, region, domain, Ig, complex, bind, mispair		
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
Y	CN 108601830 A (比奥根MA公司) 2018年 9月 28日 (2018 - 09 - 28) 说明书第[0006]、[0092]、[0094]、[0187]段	1-50
Y	WU, Xiufeng 等. "Protein Design of IgG/TCR Chimeras for the Co-Expression of Fab-Like Moieties within Bispecific Antibodies" mAbs, 第7卷, 第2期, 2015年 4月 30日 (2015 - 04 - 30), 摘要、第365页图1	1-50
Y	Stefano Pernigo 等. "The Crystal Structure of the Human Titin: Obscurin Complex Reveals a Conserved yet Specific Muscle M-Band Zipper Module" J. Mol. Biol., 第427卷, 2014年 12月 6日 (2014 - 12 - 06), 摘要、第730页表2、第730页右栏第1段-第732页左栏第1段、第733页左栏第1段、第733页图2	1-50
Y	W0 2014014796 A1 (LILLY CO ELI) 2014年 1月 23日 (2014 - 01 - 23) 说明书第2页第1行-第7页第13行	1-50
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了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 2021年 3月 15日		国际检索报告邮寄日期 2021年 4月 2日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 王炜晨 电话号码 (86-512) 88996454

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2021/070832			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
公布日 (年/月/日)							
CN	108601830	A	2018年 9月 28日	WO	2017106462	A1	2017年 6月 22日
				JP	2019502694	A	2019年 1月 31日
				CA	3008840	A1	2017年 6月 22日
				AU	2016370821	A1	2018年 7月 12日
				EP	3389710	A1	2018年 10月 24日
				KR	20180100136	A	2018年 9月 7日
				US	2019048098	A1	2019年 2月 14日
				HK	1259784	A0	2019年 12月 6日
WO	2014014796	A1	2014年 1月 23日	US	2015183877	A1	2015年 7月 2日