(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119546645 A
(43)申请公布日 2025.02.28

(21)申请号 202380051735.4
(22)申请日 2023.08.04
(66)本国优先权数据
202210937340.1 2022.08.05 CN
202310549681.6 2023.05.16 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/111149 2023.08.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/027815 ZH 2024.02.08
(71)申请人 江苏恒瑞医药股份有限公司
地址 222047 江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号
申请人 上海恒瑞医药有限公司
(72)发明人 叶鑫 陈雨潇 阿米娜·阿不拉 应华 陶维康
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C07K 16/40(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

(54)发明名称

特异性结合GUCY2C和CD3的抗原结合分子及其医药用途

(57)摘要

一种特异性结合GUCY2C和CD3的抗原结合分子及其医药用途。所述抗原结合分子可用于治疗肿瘤。

CN 119546645 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2024 年 2 月 8 日 (08.02.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/027815 A1

(51) 国际专利分类号:
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/111149

(22) 国际申请日: 2023 年 8 月 4 日 (04.08.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210937340.1 2022年8月5日 (05.08.2022) CN
202310549681.6 2023年5月16日 (16.05.2023) CN

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

(72) 发明人:叶鑫(**YE, Xin**); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陈雨潇(**CHEN, Yuxiao**); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。阿米娜·阿不拉(**AMINA, Abula**); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。应华(**YING, Hua**); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康(**TAO, Weikang**); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(**GE CHENG & CO., LTD.**); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

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

WO 2024/027815 A1

(54) **Title:** ANTIGEN-BINDING MOLECULE SPECIFICALLY BINDING TO GUCY2C AND CD3 AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: 特异性结合GUCY2C和CD3的抗原结合分子及其医药用途

(57) **Abstract:** Provided are an antigen-binding molecule specifically binding to GUCY2C and CD3 and pharmaceutical use thereof. The antigen-binding molecule can be used for treating tumor.

(57) 摘要: 一种特异性结合GUCY2C和CD3的抗原结合分子及其医药用途。所述抗原结合分子可用于治疗肿瘤。

特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子及其医药用途

技术领域

本披露属于生物技术领域，更具体地，本披露涉及特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子及其医药用途。

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。

GUCY2C（Guanylyl Cyclase C）属于跨膜的鸟苷酸环化酶家族，由胞外域、单次跨膜域和胞内催化域组成，以同源二聚体或者三聚体的方式锚定在细胞膜上。其主要功能是催化 GTP 形成 cGMP，以保持肠稳态等正常生理功能（Michaela Kuhn, Physiological Reviews: (2016), 96(2):751-804）。正常组织中，GUCY2C 只在肠上皮细胞中表达，在其他组织中不表达或极低表达。同时，GUCY2C 在胃肠道恶性肿瘤中表达，包括 90%以上的各期结直肠癌和 50%以上的胃或胃食管交界癌（Ruth Birbe MD., Human Pathology, (2005), 36(2):170-179; Hadi Danaee, PLoS One, (2017), 12(12): e0189953）。此外，由于细胞水平的表达极性和血管的富集程度在正常的肠组织与肠癌中有明显差异性，肠癌中的 GUCY2C 与血管接触的概率高于正常组织（Divya Mathur, Clinical Cancer Research, (2020),26(9):2188-2202），因此，GUCY2C 是胃肠癌尤其是肠癌较为特异且极具潜力的靶点。

靶向 CD3 和 TAA 的双特异性抗体是一种新型的免疫疗法，可以同时结合 T 细胞和肿瘤细胞，模拟 MHC 和 TCR 的相互作用，使 T 细胞形成裂解性 synapse 后，释放穿孔素和颗粒酶特异性杀伤肿瘤细胞。活化后的 T 细胞可以释放细胞因子，启动其他免疫细胞并扩大针对肿瘤的免疫反应，最终导致 T 细胞的增殖和杀伤肿瘤细胞的级联反应。

发明内容

本披露提供了一种特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子和特异性结合 GUCY2C 的抗体。

在一个方面，本披露提供了一种特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子，其包含至少一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和至少一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块包含重链可变区 GUCY2C-VH 和轻链可变区 GUCY2C-VL，所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块包含重链可变区 CD3-VH 和轻链可变区 CD3-VL。

在一些实施方式中，如前所述的抗原结合分子，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和

GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：25 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：54、26、50、51、52 或 53 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：37 或 15 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：16、34、35 或 36 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：42 或 17 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：41 或 18 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：273 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：274 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：275 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：276 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：277 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：278 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：279 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-

LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：280 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：330 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：331 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：332 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：333 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：334 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：335 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：336 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：337 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：338 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：339 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：340 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：341 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：342 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-

LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：343 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：344 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：345 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：346 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：347 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：348 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：349 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：350 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：351 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：352 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：353 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前所述的抗原结合分子，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：25 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：54 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列，或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：37 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-

HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：16 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列，或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：42 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：41 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2、GUCY2C-HCDR3、GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号规则定义。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 或 6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8、28、29 或 30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 或 12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 或 8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：250 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：251 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：252 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：253 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：254 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：255 的氨基

酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：256 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：257 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：258 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：259 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：260 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：262 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：263 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：266 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：267 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：268 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：269 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：270 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：271 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：272 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：281 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：282 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：283 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：284 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：285 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：288 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：289 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：290 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：291 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：292 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：293 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：294 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ

ID NO：295 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：296 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：297 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：298 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：301 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：303 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：304 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：305 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：306 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：128 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：307 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：308 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：309 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：310 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：311 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：312 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：313 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：314 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：315 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：316 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-

VL 具有：包含 SEQ ID NO：317 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：318 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：319 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：320 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：321 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：322 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：323 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：324 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：325 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：326 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：327 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：328 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：329 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-

HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：43 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：44 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨

基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：45 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：28 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，所述 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2、GUCY2C-HCDR3、GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 是根据 Kabat 编号规则定义的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 GUCY2C-VH 和 GUCY2C-VL 是人源化的，均包含人抗体的 FR 区。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、39L、43K、69L、71V 和 73K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 2V、3V、68R 和 74K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：27 或 6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、38K、66K 和 67A 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：8、28、29 或 30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 15P、16G、42S、43S、45K、46S、47W、49Y、58V、71Y 和 76S 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：40 或 12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、2F、28S、69L、71V、73Q 和 75S 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：39 或 8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 42S、43S、46P、47W、58V 和 71Y 组成的组中的一个或多个氨基酸取代。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、39L、43K、69L、71V 和 73K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 2V、3V、68R 和 74K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、38K、66K 和 67A 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 15P、16G、42S、43S、45K、46S、47W、49Y、58V、71Y 和 76S 组成的组中的一个或多个

氨基酸取代；或

(iii) 所述GUCY2C-VH具有：包含SEQ ID NO：10的氨基酸序列的GUCY2C-HCDR1、包含SEQ ID NO：11的氨基酸序列的GUCY2C-HCDR2和包含SEQ ID NO：40的氨基酸序列的GUCY2C-HCDR3，且所述GUCY2C-VH的FR区包含选自1E、2F、28S、69L、71V、73Q和75S组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述GUCY2C-VL具有：包含SEQ ID NO：13的氨基酸序列的GUCY2C-LCDR1、包含SEQ ID NO：39的氨基酸序列的GUCY2C-LCDR2和包含SEQ ID NO：14的氨基酸序列的GUCY2C-LCDR3，且所述GUCY2C-VL的FR区包含选自42S、43S、46P、47W、58V和71Y组成的组中的一个或多个氨基酸取代。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述CD3-VH具有：包含SEQ ID NO：71的氨基酸序列的CD3-HCDR1，包含SEQ ID NO：72的氨基酸序列的CD3-HCDR2，和包含SEQ ID NO：73或88的氨基酸序列的CD3-HCDR3；并且所述CD3-VL具有：包含SEQ ID NO：74的氨基酸序列的CD3-LCDR1，包含SEQ ID NO：75的氨基酸序列的CD3-LCDR2，和包含SEQ ID NO：76的氨基酸序列的CD3-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述CD3-VH具有：包含SEQ ID NO：71的氨基酸序列的CD3-HCDR1，包含SEQ ID NO：72的氨基酸序列的CD3-HCDR2，和包含SEQ ID NO：73的氨基酸序列的CD3-HCDR3；和所述CD3-VL具有：包含SEQ ID NO：74的氨基酸序列的CD3-LCDR1，包含SEQ ID NO：75的氨基酸序列的CD3-LCDR2，和包含SEQ ID NO：76的氨基酸序列的CD3-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述CD3-VH具有：包含SEQ ID NO：71的氨基酸序列的CD3-HCDR1，包含SEQ ID NO：72的氨基酸序列的CD3-HCDR2，和包含SEQ ID NO：88的氨基酸序列的CD3-HCDR3；和所述CD3-VL具有：包含SEQ ID NO：74的氨基酸序列的CD3-LCDR1，包含SEQ ID NO：75的氨基酸序列的CD3-LCDR2，和包含SEQ ID NO：76的氨基酸序列的CD3-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述GUCY2C-VH包含SEQ ID NO：56、25或57的氨基酸序列，和所述GUCY2C-VL包含SEQ ID NO：54、55、26、48、49、50、51、52或53的氨基酸序列；或

ii) 所述GUCY2C-VH包含SEQ ID NO：37、15或38的氨基酸序列，和所述GUCY2C-VL包含SEQ ID NO：33、16、31、32、34、35或36的氨基酸序列；或

iii) 所述GUCY2C-VH包含SEQ ID NO：42或17的氨基酸序列，和所述

GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 或 18 的氨基酸序列；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：273 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：274 的氨基酸序列；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：275 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：276 的氨基酸序列；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：277 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：278 的氨基酸序列；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：279 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：280 的氨基酸序列；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：330 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：331 的氨基酸序列；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：332 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：的氨基酸序列；333 或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：334 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：335 的氨基酸序列；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：336 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：337 的氨基酸序列；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：338 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：339 的氨基酸序列；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：340 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：341 的氨基酸序列；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：342 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：343 的氨基酸序列；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：344 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：345 的氨基酸序列；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：346 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：347 的氨基酸序列；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：348 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：349 的氨基酸序列；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：350 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：351 的氨基酸序列；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：352 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：353 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-

VL 包含 SEQ ID NO：54、55、48、49、50、51 或 52 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列，或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、32、34 或 36 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列，或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：55 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：37 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：33 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：42 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：41 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 或 89 的氨基酸序列，和所述 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：89 所示，和所述 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块或所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Titin 链包含选自由 SEQ ID NO：182 至 SEQ ID NO：200 组成的组的氨基酸序列，所述 Obscurin 链包含选自由 SEQ ID NO：201 至 SEQ ID NO：241 组成的组的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Titin 链包含 SEQ ID NO：198 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Obscurin 链包含 SEQ ID NO：236 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 IgG Fc 区。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 IgG1 Fc 区。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含一个或多个能够减少 Fc 区与 Fcγ 受体结合的氨基酸取代。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区是人 IgG1 Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸为 A，编号依据为 EU 索引。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少 Fc 区同源二聚化的氨基酸取代。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构，所述 Fc1 在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 366 位置的氨基酸为 S、在 368 位置的氨基酸为 A、和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，其中，所述 Fc1 包含 SEQ ID NO：79 或 85 的氨基酸序列；和所述 Fc2 包含 SEQ ID NO：80 或 86 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构，其中，所述 Fc1 在 354 位置的氨基酸为 C 和在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 349 位置的氨基酸为 C、在 366 位置的氨基酸为 S、在 368 位置的氨基酸为 A、和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，其中，所述 Fc1 包含 SEQ ID NO：85 的氨基酸序列；和所述 Fc2 包含 SEQ ID NO：86 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构，其中，所述 Fc1 在 237 位置的氨基酸为 A、349 位置的氨基酸为 C 和在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 237 位置的氨基酸为 A、354 位置的氨基酸为 C、在 366 位置的氨基酸为 S、在 368 位置的氨基酸为 A、和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，其中，所述 Fc1 包含 SEQ ID NO：79 的氨基酸序列；和所述 Fc2 包含 SEQ ID NO：

80 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合模块均是 scFv。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，所述抗原结合分子包含

一条具有式(a)所示结构的第一链和一条具有式(b)所示结构的第二链，

(a) [GUCY2C-VL]-[连接子 1]-[CD3-VH]-[连接子 2]- [Fc1]，

(b) [CD3-VL]-[连接子 3]-[GUCY2C-VH]-[连接子 2]-[Fc2]，

其中：所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 是相同或不同的肽连接子；或连接子 1、连接子 2 和连接子 3 不存在；

式(a)和(b)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

ii) 所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

iii) 所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示；并且所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID

NO：78 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：55 所示；并且所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：15 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：16 所示；并且所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的连接子 1 和连接子 2 均为本领域已知的肽连接子，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是具有 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方式中，所述的肽连接子各自独立地具有 L_1-(GGGGS)n-L_2 的结构，其中，L_1 是键、A、G(SEQ ID NO：82)、GS、GGG(SEQ ID NO：96)、GGS(SEQ ID NO：245)、GGGS(SEQ ID NO：246)或 GGGG(SEQ ID NO：247)，n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10，L2 是键、G(SEQ ID NO：82)、GG、GGG(SEQ ID NO：96)或 GGGG(SEQ ID NO：247)，并且所述肽连接子不是键。在一些实施方案中，所述连接子 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：81 所示，连接子 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：82 所示，连接子 3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：83 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：79 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：80 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：

i) 一条包含 SEQ ID NO：99 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：100 的氨基酸序列的第二链；或

一条包含 SEQ ID NO：101 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：100 的氨基酸序列的第二链；或

ii) 一条包含 SEQ ID NO：102 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：103 的氨基酸序列的第二链；或

iii) 一条包含 SEQ ID NO：104 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：105 的氨基酸序列的第二链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：99 所示的第一链和一条氨基酸序列如

SEQ ID NO：100 所示的第二链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：101 所示的第一链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：100 所示的第二链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：102 所示的第一链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：103 所示的第二链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块和一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块是 Fab；所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一条具有式(c)所示结构的第一链、一条具有式(d)所示结构的第二链、一条具有式(e)所示结构的第三链和一条具有式(f)所示结构的第四链，

(c) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

(e) [GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(f) [GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 4 是肽连接子；或连接子 4 不存在；

式(c)、(d)、(e)和(f)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：89 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包

含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：31 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：32 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：34 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：35 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：36 的氨基酸序列；或

ii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

iii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；并且所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：37 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：33 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：89 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；并且所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：37 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：33 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；并且所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：42 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：41 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链和 Obscurin 链为本披露中表 3-1 和表 3-2 中任意可以形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链包含如 SEQ ID NO：198 的氨基酸序列。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Obscurin 链包含如 SEQ ID NO：236 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的连接子 4 均为本领域已知的肽连接子，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是包含 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽连接子各自独立地具有(GGGGS)n 的结构，其中 n 是 1、2 或 3。在一些实施方案中，所述的连接子 4 的序列为 GGGGS（SEQ ID NO：90）。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CH1 为 IgG 的 CH1 序列。在一些实施方案中，所述的 CH1 为 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述的 CH1 包含 SEQ ID NO：84 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为抗体的轻链恒定区。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为 kappa 或 lamada 的轻链恒定区。在一些实施方式中，其中所述的 CL 包含 SEQ ID NO：87 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：85 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：

i) 一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和

一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：242 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：108 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：109 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：111 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：112 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：114 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：115 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：116 的氨基酸序列的第四链；或

ii) 一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：106 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：107 的氨基酸序列的第四链；或

iii) 一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：119 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：120 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：117 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：118 的氨基酸序列的第四链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：91 所示的第一链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：92 所示的第二链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：110 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：113 所示的第四链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：242 所示的第一链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：92 所示的第二链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：110 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：113 所示的第四链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：91 所示的第一链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：92 所示的第二链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：119 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：120 所示的第四链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块是 Fab。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一条具有式(g)所示结构的第一链、一条具有式(f)所示结构的第二链、一条具有式(h)所示结构的第三链和一条具有式(d)所示结构的第四链，

(g) [GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc1]，

(f) [GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

(h) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc2]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

其中：所述连接子 4 是肽连接子；或连接子 4 不存在；

式(g)、(f)、(h)和(d)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

ii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：31 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：32 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：34 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：35 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：36 的氨基酸序列；或

iii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；并且所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链和 Obscurin 链为本披露中表 3-1 和表 3-2 中任意可以形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链包含如 SEQ ID NO：198 的氨基酸序列。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Obscurin 链包含如 SEQ ID NO：236 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的连接子 4 均为本领域已知的肽连接子，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是包含 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽连接子各自独立地具有(GGGGS)n 的结构，其中 n 是 1、2 或 3。在一些实施方案

中，所述的连接子 4 的序列为 GGGGS（SEQ ID NO：90）。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CH1 为 IgG 的 CH1 序列。在一些实施方案中，所述的 CH1 为 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述的 CH1 包含 SEQ ID NO：84 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为抗体的轻链恒定区。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为 kappa 或 lamada 的轻链恒定区。在一些实施方式中，其中所述的 CL 包含 SEQ ID NO：87 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：85 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：

i) 一条包含 SEQ ID NO：121 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：107 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

ii) 一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：111 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：112 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：114 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：115 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：116 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

iii) 一条包含 SEQ ID NO：123 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：120 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第

三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：121 所示的第一链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：107 所示的第二链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：93 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：92 所示的第四链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含两个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和两个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合模块均是 scFv。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含两条具有式(i)所示结构的第一链和两条具有式(j)所示结构的第二链，

(i) [GUCY2C-VH]-[CH1]-[CD3-VH]-[连接子 5]-[CD3-VL]-[连接子 6]-[Fc 区的一个亚基]，

(j) [GUCY2C-VL]-[CL]，

其中：所述连接子 5 和连接子 6 是肽连接子；或连接子 5 和连接子 6 不存在；

式(i)和(j)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；并且所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的连接子 5 和连接子 6 均为本领域已知的肽连接子，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是包含 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方式中，所述的肽连接子各自独立地具有 L_1-(GGGGS)n-L_2 的结构，其中，L_1 是键、A、G、GS、GGG(SEQ ID NO：96)、GGS(SEQ ID NO：245)、GGGS(SEQ ID NO：246)或 GGGG(SEQ ID NO：247)，n 是 0、1、2、3、4、5、

6、7、8、9 或 10，L2 是键、G、GG、GGG(SEQ ID NO：96)或 GGGG(SEQ ID NO：247)，并且所述肽连接子不是键。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽连接子各自独立地具有(GGGGS)n 的结构，其中 n 是 1、2 或 3。在一些实施方案中，连接子 5 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：95 所示，连接子 6 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：96 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CH1 为 IgG 的 CH1 序列。在一些实施方案中，所述的 CH1 为 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述的 CH1 包含 SEQ ID NO：84 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为抗体的轻链恒定区。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为 kappa 或 lamada 的轻链恒定区。在一些实施方式中，其中所述的 CL 包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 Fc 区的一个亚基的氨基酸序列如 SEQ ID NO：94 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：

两条包含 SEQ ID NO：124 的氨基酸序列的第一链和两条包含 SEQ ID NO：65 的氨基酸序列的第二链；或

两条包含 SEQ ID NO：124 的氨基酸序列的第一链和两条包含 SEQ ID NO：66 的氨基酸序列的第二链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：两条氨基酸序列如 SEQ ID NO：124 所示的第一链和两条氨基酸序列如 SEQ ID NO：65 所示的第二链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含两个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和两个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块是 Fab；所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含两条具有式(k)所示结构的第一链、两条具有式(j)所示结构的第二链和两条具有式(l)所示结构的第三链，

(k) [GUCY2C-VH]-[CH1]-[连接子 7]-[CD3-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc 区的一个亚基]，

(j) [GUCY2C-VL]-[CL]，

(l) [CD3-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 4 和连接子 7 是肽连接子；或连接子 4 和连接子 7 不存在；

式(k)、(j)和(l)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述的 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述的 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；并且所述的 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述的 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的连接子 4 和连接子 7 均为本领域已知的肽连接子，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽连接子各自独立地具有(GGGGS)n 的结构，其中 n 是 1、2 或 3。在一些实施方案中，连接子 4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：90 所示，连接子 7 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：97 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链和 Obscurin 链为本披露中表 3-1 和表 3-2 中任意可以形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链包含如 SEQ ID NO：198 的氨基酸序列。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Obscurin 链包含如 SEQ ID NO：236 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CH1 为 IgG 的 CH1 序列。在一些实施方案中，所述的 CH1 为 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述的 CH1 包含 SEQ ID NO：84 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为抗体的轻链恒定区。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为 kappa 或 lamada 的轻链恒定区。在一些实施方式中，其中所述的 CL 包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述的 Fc 区的一个亚基的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：

两条包含 SEQ ID NO：125 的氨基酸序列的第一链，两条包含 SEQ ID NO：65 的氨基酸序列的第二链和两条包含 SEQ ID NO：98 的氨基酸序列的第三链；或

两条包含 SEQ ID NO：125 的氨基酸序列的第一链，两条包含 SEQ ID NO：66 的氨基酸序列的第二链和两条包含 SEQ ID NO：98 的氨基酸序列的第三链。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子具有：两条氨基酸序列如 SEQ ID NO：125 所示的第一链，两条氨基酸序列如 SEQ ID NO：65 所示的第二链和两条氨基酸序列如 SEQ ID NO：98 所示的第三链。

在另一方面，本披露还提供一种抗 GUCY2C 抗体，其能够特异性结合 GUCY2C，所述的抗体包含重链可变区 GUCY2C-VH 和轻链可变区 GUCY2C-VL，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：25 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：54、26、50、51、52 或 53 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：37 或 15 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：16、34、35 或 36 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：42 或 17 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：41 或 18 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和

GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：273 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：274 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：275 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：276 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：277 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：278 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：279 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：280 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：330 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：331 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：332 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：333 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：334 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：335 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和

GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：336 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：337 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：338 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：339 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：340 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：341 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：342 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：343 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：344 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：345 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：346 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：347 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：348 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：349 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和

GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：350 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：351 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：352 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：353 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：25 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：54 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列，或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：37 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：16 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列，或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：42 中的 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：41 中的 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2、GUCY2C-HCDR3、GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号规则定义。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 或 6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8、28、29 或 30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 或 12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 或 8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：250 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：251 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：252 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：253 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：254 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：255 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：256 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：257 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：258 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：259 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：260 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：262 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：263 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：266 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：267 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：268 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：269 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：270 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：271 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：272 的氨基

酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：281 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：282 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：283 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：284 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：285 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：288 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：289 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：290 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：291 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：292 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：293 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：294 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：295 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：296 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：297 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：298 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：301 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：303 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：304 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：305 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：306 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：

23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：128 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：307 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：308 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：309 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：310 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：311 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：312 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：313 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：314 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：315 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：316 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：317 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：318 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：319 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：320 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：321 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：322 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：323 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：324 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：325 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：326 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：327 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：328 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-

VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：329 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：43 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：44 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：45 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：28 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：30 的氨基

酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，所述 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2、GUCY2C-HCDR3、GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3 是根据 Kabat 编号规则定义的。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体；优选人源化抗体。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区为人 IgG1 恒定区，轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区；更优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO：58 的氨基酸序列，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的 GUCY2C-VH 和 GUCY2C-VL 是人源化的，均包含人抗体的 FR 区。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、39L、43K、69L、71V 和 73K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 2V、3V、68R 和 74K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：27 或 6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、38K、66K 和 67A 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：8、28、29 或 30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 15P、16G、42S、43S、45K、46S、47W、49Y、58V、71Y 和 76S 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID

NO：40 或 12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、2F、28S、69L、71V、73Q 和 75S 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：39 或 8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 42S、43S、46P、47W、58V 和 71Y 组成的组中的一个或多个氨基酸取代。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、39L、43K、69L、71V 和 73K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 2V、3V、68R 和 74K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、38K、66K 和 67A 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 15P、16G、42S、43S、45K、46S、47W、49Y、58V、71Y 和 76S 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；或

(iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1、包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3，且所述 GUCY2C-VH 的 FR 区包含选自 1E、2F、28S、69L、71V、73Q 和 75S 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1、包含 SEQ ID NO：39 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2 和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3，且所述 GUCY2C-VL 的 FR 区包含选自 42S、43S、46P、47W、58V 和 71Y 组成的组中的一个或多个氨基酸取代。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56、25 或 57 的氨基酸序列，和所

述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、26、48、49、50、51、52 或 53 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37、15 或 38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、16、31、32、34、35 或 36 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 或 17 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 或 18 的氨基酸序列；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：273 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：274 的氨基酸序列；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：275 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：276 的氨基酸序列；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：277 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：278 的氨基酸序列；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：279 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：280 的氨基酸序列；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：330 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：331 的氨基酸序列；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：332 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：的氨基酸序列；333 或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：334 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：335 的氨基酸序列；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：336 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：337 的氨基酸序列；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：338 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：339 的氨基酸序列；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：340 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：341 的氨基酸序列；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：342 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：343 的氨基酸序列；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：344 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：345 的氨基酸序列；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：346 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：347 的氨基酸序列；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：348 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：349 的氨基酸序列；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：350 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：351 的氨基酸序列；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：352 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：353 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、48、49、50、51 或 52 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列，或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、32、34 或 36 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列，或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：55 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-

VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：37 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：33 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：42 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：41 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO：64 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：65 或 66 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列；或

所述重链包含与 SEQ ID NO：60 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：61 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列；或

所述重链包含与 SEQ ID NO：62 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：63 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO：64 的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：65 或 66 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO：60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO：61 的氨基酸序列；或

所述重链包含与 SEQ ID NO：62 的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：63 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：64 所示，和所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：65 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：64 所示，和所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：66 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：60 所示，和所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：61 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：62 所示，和所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：63 所示。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗

GUCY2C 抗体是抗体片段，其中所述的抗体片段为 Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv、scFv、dsFv 或 dAb。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体是双特异性抗体。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体是双特异性抗体，所述双特异性抗体特异性结合 GUCY2C 和 CD3。

在另一个方面，本披露提供了一种药物组合物，其含有：治疗有效量的前述任一项所述的抗原结合分子或前述任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，以及一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

在另一个方面，本披露还提供分离的核酸，其编码前述任一项所述的抗原结合分子或前述任一项所述的抗 GUCY2C 抗体。

在另一个方面，本披露还提供载体，其包含前述分离的核酸。

在另一个方面，本披露还提供一种宿主细胞，其包含前述分离的核酸。

在另一个方面，本披露还提供一种治疗疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的前述任一项所述的抗原结合分子或前述任一项所述的抗 GUCY2C 抗体或如前任一项所述的组合物。

在另一个方面，本披露还提供前述任一项所述的抗原结合分子或前述任一项所述的抗体或其组合物在制备治疗疾病的药物中的用途。

在另一个方面，本披露还提供用作药物的前述任一项所述的抗原结合分子或前述任一项所述的抗 GUCY2C 抗体或如前任一项所述的组合物。在一些实施方式中，所述药物用于治疗疾病。

在一些实施方式中，如前任一项所述的疾病是增殖性疾病或肿瘤。在一些实施方式中，如前任一项所述的疾病是肿瘤，所述的肿瘤为胃肠癌（胃癌（胃腺癌）和肠癌（小肠癌、结直肠癌（结肠癌和直肠癌））、食道癌（即食管癌）、肛门癌、肝癌（肝细胞癌）、胆囊癌、胆管癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌（肾细胞癌）、尿道上皮癌、乳腺癌、膀胱癌、胸腺癌、黑色素瘤、胶质瘤（胶质母细胞瘤）、肉瘤（骨肉瘤）、卵巢癌、甲状腺癌、宫颈鳞状细胞癌、子宫内膜癌、肺癌（非小细胞肺癌（肺鳞状细胞癌、肺腺癌）和小细胞肺癌）、皮肤癌、头颈癌（头颈部鳞状细胞癌）、脑癌、多形性胶质母细胞瘤、胃食管癌（胃食管腺癌）、肝脏转移性腺癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤（霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或 B 细胞淋巴瘤）或白血病（如急性髓样白血病(AML)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL) ）。

在一些实施方式中，如前所述的肿瘤的细胞或靠近该肿瘤的血管内皮细胞表达 GUCY2C。

在一些实施方式中，如前所述的肿瘤是实体瘤。

在一些实施方式中，如前所述的肿瘤是实体瘤，所述实体瘤为胃肠癌（胃癌（胃腺癌）和肠癌（小肠癌和结直肠癌（结肠癌和直肠癌））、食道癌（即食管癌）、肛门癌、肝癌（肝细胞癌）、胆囊癌、胆管癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌（肾细胞癌）、尿道上皮癌、乳腺癌、膀胱癌、胸腺癌、黑色素瘤、胶质瘤（胶质母细胞瘤）、肉瘤（骨肉瘤）、卵巢癌、甲状腺癌、宫颈鳞状细胞癌、子宫内膜腺癌、肺癌（非小细胞肺癌（肺鳞状细胞癌、肺腺癌）和小细胞肺癌）、皮肤癌、头颈癌（头颈部鳞状细胞癌）、脑癌、多形性胶质母细胞瘤、胃食管癌（胃食管腺癌）或肝脏转移性腺癌。

在一些实施方式中，如前所述的肿瘤是胃肠癌；优选为胃癌或肠癌；更优选为胃腺癌、小肠癌或结直肠癌。

在一些实施方式中，如前所述的肿瘤是非实体瘤。

在一些实施方式中，如前所述的肿瘤是非实体瘤，所述非实体瘤为多发性骨髓瘤、淋巴瘤（霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤）或白血病（急性髓样白血病(AML)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)）。

在一些实施方案中，前述的疾病为与 GUCY2C 相关的疾病；在一些实施方案中，前述的疾病为表达 GUCY2C 的疾病。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其进一步包括使用第二治疗剂。在一些实施方案中，所述所述第二治疗剂包括抗肿瘤药剂、放射疗法、抗体药物缀合物、双特异性抗体、与抗肿瘤药剂缀合的双特异性抗体、免疫检查点抑制剂或其组合。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，所述的第二治疗剂与本披露所任一项所述的抗原结合分子同时施用、序贯施用或分开施用。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，所述的第二治疗剂是特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，所述的第二治疗剂是特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体，其包含至少一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和至少一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，所述的第二治疗剂是特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体，其包含至少一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和至少一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD28 的抗原结合模块包含重链可变区 CD28-VH 和轻链可变区 CD28-VL，所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块包含重链可变区 EGFR-VH 和轻链可变区 EGFR-VL。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中：

i) 所述 CD28-VH 具有：包含 SEQ ID NO：146 的氨基酸序列的 CD28-HCDR1，

包含 SEQ ID NO：147 的氨基酸序列的 CD28-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：148 的氨基酸序列的 CD28-HCDR3；并且所述 CD28-VL 具有：包含 SEQ ID NO：149 的氨基酸序列的 CD28-LCDR1，包含 SEQ ID NO：150 的氨基酸序列的 CD28-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：151 的氨基酸序列的 CD28-LCDR3；或

ii) 所述 CD28-VH 具有：包含 SEQ ID NO：160 的氨基酸序列的 CD28-HCDR1，包含 SEQ ID NO：161 的氨基酸序列的 CD28-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：162 的氨基酸序列的 CD28-HCDR3；并且所述 CD28-VL 具有：包含 SEQ ID NO：149 的氨基酸序列的 CD28-LCDR1，包含 SEQ ID NO：150 的氨基酸序列的 CD28-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：163 的氨基酸序列的 CD28-LCDR3；或

iii) 所述 CD28-VH 具有：包含 SEQ ID NO：168 的氨基酸序列的 CD28-HCDR1，包含 SEQ ID NO：169 的氨基酸序列的 CD28-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：170 的氨基酸序列的 CD28-HCDR3；并且所述 CD28-VL 具有：包含 SEQ ID NO：171 的氨基酸序列的 CD28-LCDR1，包含 SEQ ID NO：172 的氨基酸序列的 CD28-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：173 的氨基酸序列的 CD28-LCDR3。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中：

i) 所述 CD28-VH 包含 SEQ ID NO：154 的氨基酸序列，和所述 CD28-VL 包含 SEQ ID NO：155 的氨基酸序列；或

ii) 所述 CD28-VH 包含 SEQ ID NO：164 的氨基酸序列，和所述 CD28-VL 包含 SEQ ID NO：165 的氨基酸序列；或

iii) 所述 CD28-VH 包含 SEQ ID NO：174 的氨基酸序列，和所述 CD28-VL 包含 SEQ ID NO：175 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块包含重链可变区 EGFR-VH 和轻链可变区 EGFR-VL，其中：

所述 EGFR-VH 具有：包含 SEQ ID NO：140 的氨基酸序列的 EGFR-HCDR1，包含 SEQ ID NO：141 的氨基酸序列的 EGFR-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：142 的氨基酸序列的 EGFR-HCDR3；并且所述 EGFR-VL 具有：包含 SEQ ID NO：143 的氨基酸序列的 EGFR-LCDR1，包含 SEQ ID NO：144 的氨基酸序列的 EGFR-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：145 的氨基酸序列的 EGFR-LCDR3。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，所述 EGFR-VH 包含 SEQ ID NO：152 的氨基酸序列，和所述 EGFR-VL 包含 SEQ ID NO：153 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含 Fc 区。在一些实施方案中，所述 Fc 区为 IgG Fc 区。在一些实施方案中，所述 Fc 区为 IgG1 Fc 区。在一些实施方案中，所述 Fc 区所述 Fc 区包含一个或多个能够减少 Fc 区与 Fcγ 受体结合的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1 Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸为

A，编号依据为 EU 索引。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少 Fc 区同源二聚化的氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构。在一些实施方案中，所述 Fc1 在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 366 位置的氨基酸为 S、在 368 位置的氨基酸为 A、和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引。在一些实施方案中，所述 Fc1 在 354 位置的氨基酸为 C 和在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 349 位置的氨基酸为 C、在 366 位置的氨基酸为 S、在 368 位置的氨基酸为 A、和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引。在一些实施方案中，所述 Fc1 包含 SEQ ID NO：248 的氨基酸序列；所述 Fc2 包含 SEQ ID NO：249 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链和 Obscurin 链为本披露中表 3-1 和表 3-2 中任意可以形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Titin 链包含如 SEQ ID NO：198 的氨基酸序列。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 Obscurin 链包含如 SEQ ID NO：236 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的连接子 8 均为本领域已知的肽连接子，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是包含 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽连接子各自独立地具有(GGGGS)n 的结构，其中 n 是 1、2 或 3。在一些实施方案中，所述的连接子 8 的序列为 GGGGS（SEQ ID NO：90）。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CH1 为 IgG 的 CH1 序列。在一些实施方案中，所述的 CH1 为 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述的 CH1 包含 SEQ ID NO：84 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为抗体的轻链恒定区。在一些实施方式中，如前任一项所述的抗原结合分子，其中所述的 CL 为 kappa 或 lamada 的轻链恒定区。在一些实施方式中，其中所述的 CL 包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD28 的抗原结合模块是经替

换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块是 Fab。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一条具有式(m)所示结构的第一链、一条具有式(n)所示结构的第二链、一条具有式(o)所示结构的第三链和一条具有式(p)所示结构的第四链，

(m) [CD28-VH]-[连接子 8]-[Titin 链]-[Fc1]，

(n) [CD28-VL]-[连接子 8]-[Obscurin 链]，

(o) [EGFR-VH]-[CH1]-[Fc2]，

(p) [EGFR-VL]-[CL]，

其中：所述连接子 8 是肽连接子；或所述连接子 8 不存在；

式(m)、(n)、(o)和(p)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条包含 SEQ ID NO：156 的氨基酸序列的第一链，一条包含 SEQ ID NO：157 的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO：158 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：159 的氨基酸序列的第四链；或

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条包含 SEQ ID NO：166 的氨基酸序列的第一链，一条包含 SEQ ID NO：167 的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO：158 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：159 的氨基酸序列的第四链。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：156 所示的第一链，一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：157 所示的第二链，一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：158 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：159 所示的第四链。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：166 所示的第一链，一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：167 所示的第二链，一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：158 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：159 所示的第四链。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD28 的抗原结合模块是 Fab；所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一条具有式(q)所示结构的第一链、一条具有式(r)所示结构的第二链、一条具有式(s)所示结构的第三链和一条具有式(t)所示结构的第四链，

(q) [CD28-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(r) [CD28-VL]-[CL]，

(s) [EGFR-VH]-[连接子 8]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(t) [EGFR-VL]-[连接子 8]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 8 是肽连接子；或所述连接子 8 不存在；

式(q)、(r)、(s)和(t)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条包含 SEQ ID NO：176 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：177 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：178 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：179 的氨基酸序列的第四链。

在一些实施方案中，如前所述治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：176 所示的第一链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：177 所示的第二链、一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：178 所示的第三链和一条氨基酸序列如 SEQ ID NO：179 所示的第四链。

本披露提供的抗原结合分子，具有治疗活性、安全性、药物代谢动力学特性和成药性（如稳定性）好的特点。

附图说明

图 1A：GUCY2C-CD3 双特异性抗体的 Format 1 的结构示意图；图 1B: GUCY2C-CD3 双特异性抗体的 Format 2 的结构示意图，其中 Ob 代表 Obscurin；图 1C: GUCY2C-CD3 双特异性抗体的 Format 3 的结构示意图，其中 Ob 代表 Obscurin；图 1D: GUCY2C-CD3 双特异性抗体的 Format 4 的结构示意图；图 1E: GUCY2C-CD3 双特异性抗体的 Format 5 的结构示意图，其中 Ob 代表 Obscurin。

图 2A-2C: GUCY2C 单抗对 HCT116/hGUCY2C 细胞的结合能力；图 2D: GUCY2C 单抗对 HT-55 细胞的结合能力；图 2E: GUCY2C 单抗对 T84 细胞的结合能力。

图 3A: GUCY2C-CD3 双特异性抗体对 HCT116/hGUCY2C 细胞的结合能力；图 3B: GUCY2C-CD3 双特异性抗体对 HT55 细胞的结合能力；图 3C: GUCY2C-CD3 双特异性抗体对 Jurkat 细胞的结合能力。

图 4A: HCT116/hGUCY2C 作为靶细胞测试抗体对 Jurkat/NFAT 细胞的激活能力；图 4B: LS1034 作为靶细胞测试抗体对 Jurkat/NFAT 细胞的激活能力。

图 5A：GUCY2C-CD3 双特异性抗体与 LS1034 细胞共同作用的 IFN-γ 释放

结果；图 5B 和图 5C：GUCY2C-CD3 双特异性抗体与 LS174T 细胞共同作用的 IFN-γ 释放结果。

图 6A：GUCY2C-CD3 双特异性抗体与 LS1034 细胞共同作用的 IL-6 释放结果；图 6B 和图 6C：GUCY2C-CD3 双特异性抗体与 LS174T 细胞共同作用的 IL-6 释放结果。

具体实施方式

术语

本文所用的术语只是为了描述实施方案的目的，并非旨在进行限制。除非另外定义，本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不仅限于”的意义。除非另有说明，“包含”包括了“由……组成”。例如，对于包含 SEQ ID NO：1 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，其明确的涵盖氨基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示的 GUCY2C-HCDR1。

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

术语“和/或”，例如“X 和/或 Y”应当理解为意指“X 和 Y”或“X 或 Y”并且应当被用来提供对两种含义或任一含义的明确支持。

术语“CD28”(分化簇 28，Tp44)是指来自任何脊椎动物来源的任何 CD28 蛋白，该脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如，人)、非人灵长类动物(例如，食蟹猕猴)和啮齿动物(例如，小鼠和大鼠)。CD28 在 T 细胞上表达，并提供 T 细胞活化和存活所需的共刺激信号。除 T 细胞受体(TCR)外，通过 CD28 刺激 T 细胞也可以为产生各种白介素提供有效的信号。CD28 是 CD80(B7.1)蛋白和 CD86(B7.2)蛋白的受体，并且是在幼稚 T 细胞上组成性表达的唯一 B7 受体。人 CD28 的氨基酸序列显示在 UniProt(www.uniprot.org)登录号 P10747 中。

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

天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

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

术语“抗原结合分子”以最广义使用，涵盖各种特异性结合抗原的分子，包括但不限于抗体、其他具有抗原结合活性的多肽以及两者融合而成的抗体融合蛋白，只要它们展现出期望的抗原结合活性。本文的抗原结合分子包含可变区（VH）和可变区（VL），其共同构成抗原结合域。示例性的，本文中的抗原结合分子是双特异性抗原结合分子（例如：双特异性抗体）。

术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH），又称作可变重域、重链可变区，接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL），又称作可变轻域，或轻链可变域，接着是一个恒定轻域（轻链恒定区、CL）。

术语“双特异性抗体”指能够与两个不同抗原或同一抗原的至少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可分为二价、三价、四价或更多价的双特异性抗体，根据结构是否对称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；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（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“可变区”或“可变域”指抗原结合分子中结合抗原的域。本文中，特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块中的重链可变区标示为 GUCY2C-VH，轻链可变区标示为 GUCY2C-VL；特异性结合 CD3 的抗原结合模块中的重链可变区标示为 CD3-VH，轻链可变区标示为 CD3-VL。VH 和 VL 各包含四个保守的框架区（FR）和三个互补决定区（CDR）。其中，术语“互补决定区”或“CDR”指可变结构域内主要促成与抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。本文中，GUCY2C-VH 中的 3 个 CDR 区分别标示为 GUCY2C-HCDR1、GUCY2C-HCDR2 和 GUCY2C-HCDR3；GUCY2C-VL 中的 3 个 CDR 区分别标示为 GUCY2C-LCDR1、GUCY2C-LCDR2 和 GUCY2C-LCDR3；CD3-VH 中的 3 个 CDR 区分别标示为 CD3-HCDR1、CD3-HCDR2 和 CD3-HCDR3；CD3-VL 中的 3 个 CDR 区分别标示为 CD3-LCDR1、CD3-LCDR2 和 CD3-LCDR3。每个 VH 和 VL 从 N 端到 C 端依次为：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。单个 VH 或 VL 可能足以赋予抗原结合特异性。

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

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact

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

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

术语“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分保留了完整抗体的抗原结合能力。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab′、Fab′-SH、$F(ab')_2$、单域抗体、单链 Fab（scFab）、双抗体、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv）；以及由抗体片段形成的多特异性抗体（例如双特异性抗体）。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。在一些实施方式中，Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3 和 IgG4。除非另有说明，Fc 区的编号规则为 EU 索引。

术语“Titin 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 链能够与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域结合形成二聚化复合物。术语“Obscurin 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，或 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 链能够与 Titin Ig-样 152 结构域结合形成二聚化复合物。本披露的 Titin 链与 Obscurin 链可用于替换 Fab 中的 CH1 和 CL，形成经替换的 Fab（Fab-S），该替换不影响抗原结合分子与抗原的结合。

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

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

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，“结合亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员

之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由平衡解离常数（KD）表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些）测量。术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，而如本文所使用的术语“kdis”或“kd”意在是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所使用的，术语“KD”指平衡解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka）并且表示为摩尔浓度（M）。可以使用本领域已知的方法测定抗体的 KD 值，例如表面等离子体共振法、ELISA 或溶液平衡滴定法（SET）。

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

术语“抗原”是指能够由抗原结合蛋白（例如抗体）的选择性结合剂所结合的分子或分子部分。抗原可具有一个或多个能够与不同的抗原结合蛋白（例如抗体）相互作用的表位。

术语“表位”指能够与抗体或其抗原结合片段特异性结合的抗原上的区域（area 或 region）。表位可以由连续氨基酸（线性表位）形成或包含非连续氨基酸（构象表位），例如因抗原的折叠（即通过蛋白质性质的抗原的三级折叠）而使得非连续的氨基酸在空间上得以接近。构象表位和线性表位的差别在于：在变性溶剂的存在下，抗体对构象表位的结合丧失。表位包含处于独特空间构象的至少 3，至少 4，至少 5，至少 6，至少 7，或 8-10 个氨基酸。筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的）可以使用本领域例行方法来进行，例如但不限于丙氨酸扫描，肽印迹（见 Meth. Mol. Biol. 248（2004）443-463），肽切割分析，表位切除，表位提取，抗原的化学修饰（见 *Prot. Sci.* 9（2000）487-496），和交叉阻断（见“Antibodies”，Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)）。

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

cyno）、黑猩猩（Pan troglodytes）（chimpanzee，chimp））或狨猴（Callithrix jacchus）（commonmarmoset，marmoset）的相应抗原具有交叉反应性。

术语“不结合”是指抗体不能够以上述特异性结合的方式结合至某个抗原或该抗原内的表位。例如，当抗体以约 1×10^{-6}M 或更大的平衡解离常数（KD）结合抗原或抗原内的表位。

术语“抗原结合模块”指特异性结合目标抗原的多肽分子。具体的抗原结合模块包括抗体的抗原结合域，例如包含重链可变区和轻链可变区。术语“特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块”是指能够以足够的亲和力结合 GUCY2C 的模块，使得含有该模块的分子可用作靶向 GUCY2C 的诊断剂和/或治疗剂。例如，特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块具有以下的平衡解离常数（KD）：<约 10nM，其是通过表面等离子体共振测定法测量的。抗原结合模块包括如本文定义的抗体片段，例如 Fab，经替换的 Fab 或 scFv。

术语“连接子”指连接两个多肽片段的连接单元。在本文中，同一结构式中出现的连接子可以是相同或不同的。连接子可以是肽连接子，其包含一个或多个氨基酸，典型的约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸。应用于本文的连接子可以是相同或不同的。当“-”出现在结构式中，其表示两侧的单元直接通过共价键连接。

“Tm”是溶解变性温度（内源荧光）。当蛋白质变性（加热或变性剂作用）时，三级结构打开，芳香族氨基酸微环境发生变化，导致发射荧光光谱改变。本披露中，Tm1 是指荧光变化到最大值的一半时的温度。

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

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

术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用，并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考核酸相似的结合特性，并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸（PNA）。

“分离的核酸”指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。编码所述抗原结合分子的分离的核酸指编码抗体重链和轻链（或其片段）的一个或更多个核

酸分子，包括在单一载体或分开的载体中的这样的一个或更多个核酸分子，和存在于宿主细胞中一个或更多个位置的这样的一个或更多个核酸分子。除非另有说明，否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体（例如，简并密码子取代）和互补序列以及明确指明的序列。具体地，如下详述，简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得，在这些序列中，一个或多个所选的（或全部）密码子的第三位被简并碱基和/或脱氧肌苷残基取代。

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

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

术语“融合”或“连接”是指部件（例如抗原结合模块和 Fc 结构域）直接地或经由连接子共价连接。

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

术语“宿主细胞”，“宿主细胞系”，和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且指已经导入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代，而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同，而是可以含有突变。本文中，该术语包括突变体后代，其与在原代转化细胞中筛选或选择的细胞

具有相同的功能或生物学活性。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞，其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、犬、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞，包括但不限于中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞癌细胞（例如，Hep G2）、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞。真菌细胞包括酵母和丝状真菌细胞，包括例如巴氏毕赤酵母（*Pichiapastoris*）、芬兰毕赤酵母（*Pichia finlandica*）、海藻毕赤酵母（*Pichia trehalophila*）、科克拉马毕赤酵母（*Pichia koclamae*）、膜状毕赤酵母（*Pichia membranaefaciens*）、小毕赤酵母（*Pichia minuta*）（*Ogataea minuta*、*Pichia lindneri*）、仙人掌毕赤酵母（*Pichiaopuntiae*）、耐热毕赤酵母（*Pichia thermotolerans*）、柳毕赤酵母（*Pichia salictaria*）、*Pichia guercuum*、皮杰普毕赤酵母（*Pichia pijperi*）、具柄毕赤酵母（*Pichia stiptis*）、甲醇毕赤酵母（*Pichia methanolica*）、毕赤酵母属、酿酒酵母（*Saccharomycescerevisiae*）、酿酒酵母属、多形汉逊酵母（*Hansenula polymorpha*）、克鲁维酵母属、乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）、白色念珠菌（*Candida albicans*）、构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）、黑曲霉（*Aspergillus niger*）、米曲霉（*Aspergillus oryzae*）、里氏木霉（*Trichoderma reesei*）、勒克氏菌（*Chrysosporium lucknowense*）、镰刀菌属（*Fusarium* sp.）、禾谷镰刀菌（*Fusarium gramineum*）、菜镰刀菌（*Fusarium venenatum*）、小立碗藓（*Physcomitrella patens*）和粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）。毕赤酵母属、任何酿酒酵母属、多形汉逊酵母（*Hansenula polymorpha*）、任何克鲁维酵母属、白色念珠菌（*Candida albicans*）、任何曲霉属、里氏木霉（*Trichoderma reesei*）、勒克霉菌（*Chrysosporium lucknowense*）、任何镰刀菌属、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）和粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）。本专利的宿主细胞不包括在专利法中不授权的客体。

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

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

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

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

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

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

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

“治疗（treatment 或 treat）”和“处理”（及其语法变型）指试图施加至所治疗个体的临床干预，并且可以为了预防目的、或者在临床病理学的过程期间进行实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发，减轻症状，减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果，预防转移，降低疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和消退或改善的预后。在一些实施方案中，使用本披露的分子来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

术语“复发(recurrence)”、“复发(relapse)”“复发(relapsed)”是指癌症或疾病在疾病消失的临床评估之后的恢复。远处癌转移或局部复发的诊断可视为复发。

术语“难治性”或“抵抗性”是指对治疗无反应的癌症或疾病。

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度及/或频率、消除这些症状及/或潜在病因、预防症状及/或其潜在病因出现及/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤（例如肺病）的量。在一些实施例中，有效量是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状的发作（或复发）可能性的量。完全治疗或预防效未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”

可取决于多种因素变化：诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如患者改善的健康状况。

术语“免疫检查点”意指在 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞的细胞表面上的一组分子。这些分子可以有效地充当下调或抑制抗肿瘤免疫应答的“刹车”。免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡 1(PD-1)、细胞毒 T 淋巴细胞抗原 4(CTLA-4)、B7H1、B7H4、OX-40、CD137、CD40 和 LAG-3，它们直接抑制免疫细胞。

用于本披露的免疫检查点抑制剂为抑制免疫检查点分子的功能的物质。对免疫检查点抑制剂没有特别限制，只要抑制剂为可抑制免疫检查点分子的功能(信号)的物质即可。可以作为可用于本披露方法中的免疫检查点抑制剂包括但不限于 PD-1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CEACAM(例如，CEACAM-1、CEACAM-3 和/或 CEACAM-5)和/或 TGFRβ 的抑制剂。对抑制性分子的抑制可以通过在 DNA、RNA 或蛋白质水平抑制而实施。在实施方案中，抑制性核酸(例如，dsRNA、siRNA 或 shRNA)可以用来抑制抑制性分子的表达。在其他实施方案中，抑制性信号的抑制剂是与抑制性分子结合的多肽，例如，可溶性配体或抗体。本披露中使用的免疫检查点抑制剂的实例可以包括但不特别限于抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体和抗 CTLA-4 抗体，并且可以优选抗 PD-1 抗体和抗 PD-L1 抗体。

本披露的抗原结合分子

本披露提供了抗原结合分子，其具有诸多有利的特性，例如良好的体外杀伤活性、治疗活性、安全性、药物代谢动力学特性和成药性（如产率、纯度和稳定性等）。

示例性的抗原结合分子

本披露的抗原结合分子，包括特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子（例如双特异性抗体）和抗 GUCY2C 抗体。特别的，本披露的抗原结合分子具有如下任一的性质：

a．对 GUCY2C 的高亲和力。在一些实施方式中，所述 GUCY2C 单抗以小于 100nM（例如小于 80nM、小于 50nM、小于 10nM、小于 8nM、小于 1nM、小于 0.5nM）的 KD 值结合人 GUCY2C，所述 KD 值是通过 Biacore 测量的。

b．对细胞表面的 GUCY2C 有较好的特异性结合。在一些实施方案中，GUCY2C 单抗结合活性优于 1608。在一些实施方案中，本批露 GUCY2C-CD3 双特异性抗体对表达 GUCY2C 不同水平的细胞均有较好的特异性结合活性，结合活性优于 1608-BsAb；本批露 GUCY2C-CD3 双特异性抗体对表达 Jurkat 的细胞

有较好的特异性结合活性，结合活性优于 1608-BsAb。

c．对非靶细胞（例如 T 细胞）的非特异性结合作用。在一些实施方案中，GUCY2C 单抗与无 GUCY2C 表达的 Jurkat 细胞无非特异性结合；1608 与 Jurkat 细胞有明显结合。在一些实施方案中，本批露 GUCY2C 单抗与无 GUCY2C 表达的 PBMC 以及 T 细胞无非特异性结合，对照抗体 1608 与 PBMC 以及 T 细胞有明显非特异性结合。本批露 GUCY2C 单抗的靶点特异性优于 1608。

d．GUCY2C 单抗所结合的抗原表位与 1608 相差较大，不能与其竞争性地结合 GUCY2C 抗原。

e. 与人 GUCY2C 蛋白有良好结合作用。在一些实施方式中，所述 GUCY2C-CD3 双抗以小于 1nM（例如小于 0.5nM、小于 0.2nM、小于 0.1nM）的 KD 值结合人 GUCY2C，所述 EC_{50} 值是通过 ELISA 测量的。

f. GUCY2C-CD3 双特异性抗体对不同表达量的靶细胞均有较好的细胞毒活性。

g. GUCY2C-CD3 双特异性抗体能够有效诱导与细胞毒活性相关的 IFN-γ 的释放，且与炎症相关的细胞因子 IL-6 的释放水平相对较低。

h. 更强的体内治疗活性。在一些实施方案中，GUCY2C-CD3 双特异性抗体，或者 GUCY2C-CD3 双特异性抗体与 EGFR-CD28 双特异性抗体联用具有很好的体内治疗活性。与 EGFR-CD28 双特异性抗体联用，能有效提高各自单药的药效。

本披露提供了一种抗原结合分子，其包含至少一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和至少一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块包含重链可变区 GUCY2C-VH 和轻链可变区 GUCY2C-VL，所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块包含重链可变区 CD3-VH 和轻链可变区 CD3-VL。

具体地，本文的实施例披露了抗体系列 P3-C7、81 和 146。以下以抗体 P3-C7 为例描述本文的抗体。

特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子或抗 GUCY2C 抗体，其中：

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子或抗 GUCY2C 抗体，其中：

所述 GUCY2C-VH 具有：氨基酸序列如 SEQ ID NO：19 所示的 GUCY2C-HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO：20 所示的 GUCY2C-HCDR2，和氨基酸序

列如 SEQ ID NO：21 所示的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：氨基酸序列如 SEQ ID NO：47 所示的 GUCY2C-LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO：23 所示的 GUCY2C-LCDR2，和氨基酸序列如 SEQ ID NO：24 所示的 GUCY2C-LCDR3。

在一些实施方案中，如前所述的抗原结合分子或抗 GUCY2C 抗体，所述 GUCY2C-VH 和/或所述 GUCY2C-VL 是鼠源的或人源化的。在一些实施方案中，所述 GUCY2C-VH 和/或所述 GUCY2C-VL 是人源化的。

在一些实施方案中，所述人源化的 GUCY2C-VH 具有来源于 IGHV1-46*01 的 FR1、FR2、FR3 和来源于 IGHJ6*01 的 FR4，并且其是未被取代的或具有选自 1E、39L、43K、69L、71V 和 73K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代；和/或所述人源化的 GUCY2C-VL 具有来源于 IGKV2-40*01 或 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 和来源于 IGKJ4*01 的 FR4，并且其是未被取代的或具有选自 2V、3V、68R 和 74K 组成的组中的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，上述可变区中的氨基酸位置是根据 Kabat 编号规则定义的。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗原结合分子或抗 GUCY2C 抗体，其中：所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56、25 或 57 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、26、48、49、50、51、52 或 53 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗原结合分子或抗 GUCY2C 抗体，其中：

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、48、49、50、51 或 52 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗原结合分子或抗 GUCY2C 抗体，其中：

所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示；或

所述 GUCY2C-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：56 所示，和所述 GUCY2C-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：55 所示。

在一些实施方案中，如前所述的抗原结合分子，所述 CD3-VH 具有：包含 SEQ ID NO：71 的氨基酸序列的 CD3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：72 的氨基酸序列的 CD3-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：73 或 88 的氨基酸序列的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：74 的氨基酸序列的 CD3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：75 的氨基酸序列的 CD3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：76 的氨基酸

序列的 CD3-LCDR3。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗原结合分子，所述 CD3-VH 和/或所述 CD3-VL 是鼠源的或人源化的。

在一些实施方案中，所述 CD3-VH 和/或所述 CD3-VL 是人源化的。

在一些实施方案中，所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 或 89 的氨基酸序列，和所述 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 CD3-VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示，和所述 CD3-VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示。

在一些实施方案中，上述可变区和 CDR 是根据 Kabat 编号规则定义的。

根据本文实施例所披露的抗体系列 81 和 146 与以上所描述的抗体系列 P3-C7 具有类似的技术方案范围。

抗原结合分子的结构

本披露的双特异性抗原结合分子并不受限于特定的分子结构，只要其具有所期望的抗原结合功能。例如，本文的双特异性抗原结合分子可以是双价（1+1）的、三价（2+1）的或 4 价（2+2）的。抗原结合分子中的抗原结合模块可以是任意的具有抗原结合活性的抗体片段，其通过肽连接子融合。本披露的肽连接子（例如连接子 1 至 11）可以是任意适宜的肽链，只要抗原结合分子能够展现出期望的抗原结合活性。例如，肽连接子可以是包含 1-50 或 3-20 个氨基酸残基的柔性肽。在一些实施方式中，所述的肽连接子各自独立地具有 L_1-(GGGGS)n-L_2 的结构，其中，L_1 是键、A、G(SEQ ID NO：82)、GS、GGG(SEQ ID NO：96)、GGS(SEQ ID NO：245)、GGGS(SEQ ID NO：246)或 GGGG(SEQ ID NO：247)，n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10，L2 是键、G(SEQ ID NO：82)、GG、GGG(SEQ ID NO：96)或 GGGG(SEQ ID NO：247)，并且所述肽连接子不是键。在一些实施方案中，所述肽连接子的长度为 3-15 个氨基酸残基。在一些实施方案中，所述肽连接子各自独立地具有(GGGGS)n 的结构，其中 n 是 1、2 或 3。在一些实施方案中，所述连接子 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：81 所示，连接子 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：82 所示，连接子 3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：83 所示，连接子 4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：90 所示，连接子 5 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：95 所示，连接子 6 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：96 所示，连接子 7 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：97 所示。

示例性的，本披露的所述抗原结合分子具有一条具有式(a)所示结构的第一链和一条具有式(b)所示结构的第二链，

(a) [GUCY2C-VL]-[连接子 1]-[CD3-VH]-[连接子 2]-[Fc1]，

(b) [CD3-VL]-[连接子 3]-[GUCY2C-VH]-[连接子 2]-[Fc2]，

其中：所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 是相同或不同的肽连接子；或连接子 1、连接子 2 和连接子 3 不存在；

式(a)和(b)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的，本披露的所述抗原结合分子具有一条具有式(a)所示结构的第一链和一条具有式(b)所示结构的第二链，

(a) [GUCY2C-VL]-[连接子 1]-[CD3-VH]-[连接子 2]-[Fc1]，

(b) [CD3-VL]-[连接子 3]-[GUCY2C-VH]-[连接子 2]-[Fc2]，

其中：

所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；

所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 是相同或不同的肽连接子；或连接子 1、连接子 2 和连接子 3 不存在；

所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：79 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：80 所示；

式(a)和(b)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的，本披露的所述抗原结合分子具有一条具有式(a)所示结构的第一链和一条具有式(b)所示结构的第二链，

(a) [GUCY2C-VL]-[GGGSGGGG]-[CD3-VH]-[G]-[Fc1]，

(b) [CD3-VL]-[GGGGSGGGG]-[GUCY2C-VH]-[G]-[Fc2]，

其中：式(a)和(b)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的，本披露的所述抗原结合分子具有一条具有式(a)所示结构的第一链和一条具有式(b)所示结构的第二链，

(a) [GUCY2C-VL]-[GGGSGGGG]-[CD3-VH]-[G]-[Fc1]，

(b) [CD3-VL]-[GGGGSGGGG]-[GUCY2C-VH]-[G]-[Fc2]，

其中：

所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；

所述 CD3-VH 具有：如 SEQ ID NO：71 所示的 CD3-HCDR1，如 SEQ ID NO：72 所示的 CD3-HCDR2，和如 SEQ ID NO：73 所示的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：如 SEQ ID NO：74 所示的 CD3-LCDR1，如 SEQ ID NO：75 所示的 CD3-LCDR2，和如 SEQ ID NO：76 所示的 CD3-LCDR3；

所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：79 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：80 所示；

式(a)和(b)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的抗原结合分子具有：

一条包含 SEQ ID NO：99 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：100 的氨基酸序列的第二链；或

一条包含 SEQ ID NO：101 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：100 的氨基酸序列的第二链。

示例性的，所述抗原结合分子包含一条具有式(c)所示结构的第一链、一条具有式(d)所示结构的第二链、一条具有式(e)所示结构的第三链和一条具有式(f)所示结构的第四链，

(c) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

(e) [GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(f) [GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 4 是肽连接子；或连接子 4 不存在；

式(c)、(d)、(e)和(f)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的，所述抗原结合分子包含一条具有式(c)所示结构的第一链、一条具有式(d)所示结构的第二链、一条具有式(e)所示结构的第三链和一条具有式(f)所示结构的第四链，

(c) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

(e) [GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(f) [GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

其中：

所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；

所述连接子 4 是肽连接子；或连接子 4 不存在；

所述 Obscurin 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：236 所示，Titin 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：198 所示；

所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：85 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示；

所述 CH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：84 所示，所述 CL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：87 所示；

式(c)、(d)、(e)和(f)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的，所述抗原结合分子包含一条具有式(c)所示结构的第一链、一条具有式(d)所示结构的第二链、一条具有式(e)所示结构的第三链和一条具有式(f)所示结构的第四链，

(c) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

(e) [GUCY2C-VH]-[GGGGS]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(f) [GUCY2C-VL]-[GGGGS]-[Titin 链]，

其中：式(c)、(d)、(e)和(f)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的，所述抗原结合分子包含一条具有式(c)所示结构的第一链、一条具有式(d)所示结构的第二链、一条具有式(e)所示结构的第三链和一条具有式(f)所示结构的第四链，

(c) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

(e) [GUCY2C-VH]-[GGGGS]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(f) [GUCY2C-VL]-[GGGGS]-[Titin 链]，

其中：

所述 GUCY2C-VH 具有：如 SEQ ID NO：4 所示的 GUCY2C-HCDR1，如 SEQ ID NO：5 所示的 GUCY2C-HCDR2，和如 SEQ ID NO：27 所示的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：如 SEQ ID NO：7 所示的 GUCY2C-LCDR1，如 SEQ ID NO：8 所示的 GUCY2C-LCDR2，和如 SEQ ID NO：9 所示的 GUCY2C-LCDR3；

所述 CD3-VH 具有：如 SEQ ID NO：71 所示的 CD3-HCDR1，如 SEQ ID NO：72 所示的 CD3-HCDR2，和如 SEQ ID NO：73 所示的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：如 SEQ ID NO：74 所示的 CD3-LCDR1，如 SEQ ID NO：75 所示的 CD3-LCDR2，和如 SEQ ID NO：76 所示的 CD3-LCDR3；

所述 Obscurin 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：236 所示，Titin 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：198 所示；

所述 Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：85 所示，Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示；

所述 CH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：84 所示，所述 CL 的氨基酸序列如

SEQ ID NO：87 所示；

式(c)、(d)、(e)和(f)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的。

示例性的抗原结合分子具有：

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第四链。

抗原结合分子的变体

在某些实施方案中，涵盖本文中提供的抗原结合分子的氨基酸序列变体。例如，可以期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将合适的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中，或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗原结合分子的氨基酸序列内的残基的删除、和/或插入、和/或取代。可以进行删除、插入、和取代的任何组合以得到最终的构建体，只要最终的构建体拥有期望的特征，例如抗原结合特性。

取代、插入、和删除变体

在某些实施方案中，提供了具有一处或多处氨基酸取代的抗原结合分子变体。可以在 CDR 和 FR 进行取代。保守取代在表 2 中在“优选的取代”的标题下显示。更实质的变化在表 2 中在“示例性取代”的标题下提供，并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸取代引入感兴趣的抗体中，并且对产物筛选期望的活性，例如保留/改善的抗原结合，降低的免疫原性，或改善的 ADCC 或 CDC。

表 2. 氨基酸的取代

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala(A)	Val；Leu；Ile	Val
Arg(R)	Lys；Gln；Asn	Lys
Asn(N)	Gln；His；Asp,Lys；Arg	Gln
Asp(D)	Glu；Asn	Glu
Cys(C)	Ser；Ala	Ser
Gln(Q)	Asn；Glu	Asn
Glu(E)	Asp；Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn；Gln；Lys；Arg	Arg
Ile(I)	Leu；Val；Met；Ala；Phe；正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸；Ile；Val；Met；Ala；Phe	Ile
Lys(K)	Arg；Gln；Asn	Arg
Met(M)	Leu；Phe；Ile	Leu
Phe(F)	Trp；Leu；Val；Ile；Ala；Tyr	Tyr

Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr；Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp；Phe；Thr；Ser	Phe
Val(V)	Ile；Leu；Met；Phe；Ala；正亮氨酸	Leu

依照常见的侧链特性，氨基酸可以如下分组:

(1) 疏水性的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

(2) 中性，亲水性的：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；

(3) 酸性的：Asp，Glu；

(4) 碱性的：His，Lys，Arg；

(5) 影响链取向的残基：Gly，Pro；

(6) 芳香族的：Trp，Tyr，Phe。

非保守取代会是指用一个类别的成员替换另一个类别的成员。

一类取代变体涉及取代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个 CDR 残基。一般地，经选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性（例如升高的亲和力，降低的免疫原性）的改变（例如改善），和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种例示性的取代变体是亲和力成熟的抗体，可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(如本文所述的那些技术)，便利地产生所述抗体。简言之，将一个或多个 CDR 残基突变，并将变体抗体在噬菌体上展示，并对其筛选特定的生物学活性（例如结合亲和力）。可以对 CDR 做出改变（例如取代），例如以改善抗体亲和力。可以对 CDR“热点”，即在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基，和/或接触抗原的残基做出此类改变，同时对所得的变体 VH 或 VL 测试结合亲和力。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法（例如易错 PCR、链改组、或寡核苷酸指导的诱变）的任一种，将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。然后，创建次级文库。然后，筛选文库以鉴定具有期望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及 CDR 定向的方法，其中将几个 CDR 残基（例如一次 4-6 个残基）随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定涉及抗原结合的 CDR 残基。

在某些实施方案中，取代、插入或缺失可以在一个或多个 CDR 内发生，只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如，可以对 CDR 做出保守变化（例如保守取代，如本文中提供的），其不实质性降低结合亲和力。在上文提供的变体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中，每个 CDR 是未改变的，或者含有不超过 1、2 或 3 处氨基酸取代。

一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”。在这种方法中，鉴定一个残基或残基组（例如带电荷的残基，诸如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu），并且替换为中性或带负电荷的氨基酸（例如，Ala 或聚丙氨酸)，以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的取代。此外，可通过研究抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原间的接触点。这些接触残基及邻近残基可以作为取代候选物被打靶或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

氨基酸序列插入包括：在氨基和/或羧基端融合 1 个残基或长度为 100 或更多个残基的多肽；和单个或多个氨基酸残基的序列内插入。在末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括，在抗体的 N 或 C 端融合有酶（或延长抗体的血清半衰期的多肽）的融合物。

Fab 的改造

在一个方面，本披露的抗原结合分子中，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块两者之一是经替换的 Fab，所述经替换的 Fab 包含重链可变区、轻链可变区、Titin 链和 Obscurin 链。在经替换的 Fab 中，Fab 原有的 CH1 和 CL 被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。示例性的，Titin 链和 Obscurin 链的序列如表 3-1 和表 3-2 所示。

表 3-1. Titin 链的氨基酸序列

编号	SEQ ID NO	氨基酸序列
T.0	182	GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.1	183	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.2	184	GIPPKIEALPSDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.3	185	GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.4	186	GIPPKIEALPSDISIDEGKVLCVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.5	187	KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.6	188	KAGIRGIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.7	189	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.8	190	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIKDVQRQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.9	191	GIWPKIECLPIDLSIDEGKVLMVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGMEFGSDSATVNIHIRSI
T.10	192	GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG

		RFHIENTDDLTTLIIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.11	193	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTSGKKISSEEGG RFHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLSLGNDLGSDSATVNIHIRSI
T.12	194	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEGG RFHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.13	195	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.14	196	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIESTEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.15	197	KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIH SQEQGRFHIESTEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHI RSI
T.16	198	GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.17	199	GIPPKIECLPIDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.18	200	GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

表 3-2. Obscurin 链的氨基酸序列

编号	SEQ ID NO	氨基酸序列
O.0	201	SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQV DAEA
OL.0	202	QGSPPCFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGEAYAAAAVT VLEPP
O.1	203	SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.2	204	SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQV DAEA
O.3	205	SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQV DAEA
O.4	206	SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD AEA
O.5	207	SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVD AEA
O.6	208	SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVD AEA
O.7	209	SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.8	210	SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.9	211	SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG

		ARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.10	212	SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.11	213	DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLQVDAEA
O.12	214	DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLQVDAEA
O.13	215	DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLQVDAEA
O.14	216	DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLQVDAEA
O.15	217	DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLQVDAEA
O.16	218	DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAA VGLQVDAEA
OL.1	219	QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVCRARNAAGEAYAAAAVT VLEPP
OL.2	220	QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAACEAYAAAAVT VLEPP
OL.3	221	QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGECYAAAAVT VLEPP
OL.4	222	QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVSRARNAAGEAYAAAAVT VLEPP
OL.5	223	QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAACEAYAAAAVT VLEPP
OL.6	224	QGSPPEFLRFPRPVRVVSGAEAELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAA SERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAAGECYAAAAVT VLEPP
O.17	225	SGAPRFLTRPKSYTVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.18	226	SEAPRFLTRPLAFVVSEGKDATLSSQIVGDPPPEVTWEKDQQPITAGA RFRLAQDGDVYRLEILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDA EG
O.19	227	SGAPRFLTRPLAFVVSVGKLAMLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLLQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD AEA
O.20	228	SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVD AEA
O.21	229	SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAG

		ARFRLAQDGDLYRLKILDLTLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLEVG AEA
O.22	230	SGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLEVG AEA
O.23	231	DQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLP VTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVG LEVGAEA
O.24	232	SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVD AEA
O.25	233	SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.26	234	SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.27	235	SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.28	236	SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.29	237	SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.30	238	SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.31	239	SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQC DAEA
O.32	240	SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQC DAEA
O.33	241	SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQC DAEA

Fc 区的改造

在一个方面，本披露的抗原结合分子的 Fc 区包含一个或多个氨基酸取代，所述一个或多个氨基酸取代减少其与 Fc 受体的结合，例如其与 Fcγ 受体的结合，并且降低或消除效应子功能。天然 IgG Fc 区，具体地是 IgG_1 Fc 区或 IgG_4 Fc 区，可能导致本披露的抗原结合分子靶向表达 Fc 受体的细胞，而不是表达抗原的细胞。本披露改造的 Fc 区表现出降低的对 Fc 受体的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对 Fc 受体的结合亲和力下降 50%、80%、90%或 95%以上。在一些实施方案中，所述的 Fc 受体是 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 受体是人 Fcγ 受体，例如 FcγRI、FcγRIIa、

FcγRIIB、FcγRIIIa。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对补体，如 C1q 的结合亲和力也降低。在一些实施方案中，改造的 Fc 区与天然 Fc 区相比，对新生儿 Fc 受体（FcRn）的结合亲和力不降低。在一些实施例中，改造的 Fc 区具有降低的效应子功能，所述降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个：降低的补体依赖性细胞毒性（CDC）、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、降低的抗体依赖性细胞吞噬（ADCP）、减少的细胞因子分泌、减少的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、减少的与 NK 细胞的结合、减少的与巨噬细胞的结合、减少的与单核细胞的结合、减少的与多形核细胞的结合、减少的直接信号传导诱导性细胞凋亡、降低的树突细胞成熟或减少的 T 细胞引发。对于 IgG_1 Fc 区，在 238、265、269、270、297、327 和 329 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。在一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG_1 Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸残基为 A，编号依据为 EU 索引。对于 IgG_4 Fc 区，在 228 等位置的氨基酸残基取代可降低的效应子功能。

抗原结合分子还可包含二硫键改造，例如第一亚基的 354C 和第二亚基的 349C。为增加抗原结合分子的血清半衰期，可以引入 252Y、254T 和 256E 的突变。

当抗原结合分子包含与 Fc 区的两个亚基融合的不同结合模块，可能导致不期望的同源二聚化。为了提高产率和纯度，因此在本披露的抗原结合分子的 Fc 区中引入促进异源二聚化的修饰将是有利的。在一些实施方式中，本披露的 Fc 区包含根据杵臼（knob-into-hole，KIH）技术的改造，该方法涉及在第一亚基的界面处引入凸起结构（knob）以及在第二亚基的界面处引入孔结构（hole）。使得所述凸起结构可以定位在孔结构中，促进异源二聚体的形成并抑制同源二聚体的产生。凸起结构是通过用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）取代来自第一亚基的界面的小氨基酸侧链而构建的。而孔结构是通过用较小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）取代大氨基酸侧链而在第二亚基的界面中创建的。凸起结构和孔结构通过改变编码多肽的核酸来制备，可选的氨基酸取代如表 4 所示：

表 4. KIH 突变组合

第一亚基	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A
第二亚基	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S

除了杵臼技术外，用于修饰重链的 CH3 结构域以实现异源二聚化的其他技术也是本领域中已知的，例如 WO1996027011A1、WO1998050431A2、EP1870459A1、WO2007110205A2、WO2009089004A1、WO2010129304A2、

WO2011143545A1、WO2012058768A1、WO2013157954A1 和 WO2013096291A2。

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

重组方法

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

在天然抗体、天然抗体片段或具有同源二聚体重链的双特异性抗体的情况下，需要两个核酸，一个用于轻链或其片段，一个用于重链或其片段。此类核酸编码包含抗体 VL 的氨基酸序列和/或包含抗体 VH 的氨基酸序列（例如抗体的轻链和/或重链）。这些核酸可以在相同的表达载体上或在不同的表达载体上。

在具有异二聚体重链的双特异性抗体的情况下，需要例如四个核酸，一个用于第一轻链，一个用于包含第一异源单体 Fc 区多肽的第一重链，一个用于第二轻链，并且一个用于包含第二异源单体 Fc 区多肽的第二重链。这四个核酸可包含在一个或更多个核酸分子或表达载体中，通常这些核酸位于两个或三个表达载体上，即一个载体可包含这些核酸中的多于一个。

在一个实施方案中，本披露提供了编码如前所述的抗体的分离的核酸。此类核酸可以独立地编码前述的任一多肽链。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的一种或多种载体（例如表达载体）。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个实施方案中，提供制备抗原结合分子的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述抗体。

为了重组产生抗原结合分子，将编码蛋白的核酸分离并插入一个或更多个载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序（例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针），或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

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

步纯化。

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

免疫缀合物

本披露还提供免疫缀合物，其包含与一种或多种细胞毒性剂缀合的抗原结合分子，所述一种或多种细胞毒性剂为诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素，或它们的片段）、或放射性同位素。

诊断与治疗组合物

在某些实施方案中，本披露提供的抗原结合分子可用于检测生物学样品中 GUCY2C 和/或 CD3 的存在。在用于本文时，术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中，生物学样品包含细胞或组织，诸如肿瘤组织。

在一个实施方案中，提供了在诊断或检测方法中使用的抗原结合分子。在又一方面，提供了检测生物学样品中 GUCY2C 和/或 CD3 的存在的方法。在某些实施方案中，该方法包括在适宜条件下使生物学样品与抗原结合分子接触，并检测是否在检测试剂与抗原之间形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，使用抗原结合分子来选择适合治疗的受试者，例如 GUCY2C

和/或 CD3 是用于选择患者的生物标志物。

可使用本披露的抗原结合分子来诊断的示例性病症，例如增殖性疾病或肿瘤（如癌症）。

在某些实施方案中，提供了经标记的抗原结合分子。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块（诸如荧光、发色、电子致密、化学发光、和放射性标记物），和间接检测的模块（例如，经由酶反应或分子相互作用间接检测的模块，诸如酶或配体）。

在另外的方面，提供包含所述抗原结合分子的药物组合物，例如，用于以下任何治疗方法。在一个方面，药物组合物包含本文提供的任何抗原结合分子和药学上可接受的载体。在另一个方面，药物组合物包含本文提供的任何抗原结合分子和至少一种另外的治疗剂。

本披露所述的抗原结合分子的药物组合物通过以下制备：将具有所需纯度的此类抗原结合分子与一种或更多种任选的药学上可接受的载体混合，所述药物组合物为冻干组合物或水溶液的形式。用于体内施用的制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现，例如通过穿过无菌滤膜过滤。

治疗方法与施用途径

本文提供的任何抗原结合分子可用于治疗方法。

在又一个方面，本披露提供抗原结合分子在药物的制造或制备中的用途。在一个实施方案中，所述药物用于治疗增殖性疾病或肿瘤。并且所述药物是以对上述疾病的有效量的形式存在的。在一些实施方式中，所述有效量是单位日剂量或单位周剂量。在一个此类实施方案中，所述用途进一步包括向受试者施用有效量的至少一种另外的治疗剂（例如一种、两种、三种、四种、五种或六种另外的治疗剂）。根据任意以上实施方案的“受试者”可以是人。

在又一个方面，提供包含所述抗原结合分子的药物组合物，例如，其用于以上任何制药用途或治疗方法。在另一个实施方案中，药物组合物还包含至少一种另外的治疗剂。

本披露的抗原结合分子可单独使用或与其他试剂联合用于治疗。例如，本披露的抗原结合分子可与至少一种另外的治疗剂共同施用。在一些实施方案中，所述的另外的治疗剂是特异性结合 EGFR 和 CD28 的双特异性抗体。

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

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

为了预防或治疗疾病，本披露的抗原结合分子（当单独使用或与一种或更多种其他另外的治疗剂组合使用时）的适当的剂量将取决于待治疗的疾病的类型，治疗分子的类型，疾病的严重性和病程，是为预防还是治疗目的施用，之前的治疗，患者的临床病史和对治疗分子的响应，和主治医师的判断。治疗分子恰当地以一次或经过一系列治疗施用于患者。取决于疾病的类型和严重性，约 1μg/kg 至 15mg/kg 的抗原结合分子可以是用于施用至患者的初始候选剂量，不管例如是通过一次或更多次分开的施用还是通过连续输注。一种典型的每日剂量可能在约 1μg/kg 至 100mg/kg 或更多的范围内，这取决于上文提及的因素。相应的，以 50kg 体重为例，示例性的单位日剂量为 50μg -5g。

制品

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

实施例与测试例

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

实施例 1. 含有 Titin 链/Obscurin 链的抗原结合分子

本披露的 Titin 链/Obscurin 链可以来源于任意适宜的多肽，包括来源于 WO2021139758A1（通过援引完整收入本文）和 CN202110527339.7 及将其作为优先权文件的专利（通过援引完整收入本文）中的多肽。构建双特异性抗体，其中 CL 为 WO2021139758A1 中的 kappa 轻链恒定区，Titin 链和 Obscurin 链的氨基酸序列见表 3-1 和表 3-2，连接子序列包括 GGGGS（SEQ ID NO：90）、ASTKG（SEQ ID NO：243）或 RTVAS（SEQ ID NO：244），本实施例中的 Fc1、Fc2、CH1 的氨基酸序列如下所示。

> 实施例 1-Fc1（knob，SEQ ID NO：85）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 实施例 1-Fc2（hole，SEQ ID NO：86）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 实施例 1-CH1（SEQ ID NO：84）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

1.1 DI 双特异性抗体

参照 WO2021139758A1 的实施例 5，构建抗 hNGF 和 hRANKL 的 DI 双特异性抗体：DI-2 至 DI-20，其包含如下所述的第一重链、第二重链、第一轻链和第二轻链：

第一重链：从 N 端到 C 端依次为：[VH1-I]-[连接子 1]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

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

第二重链：从 N 端到 C 端依次为：[VH2-D]-[CH1]-[Fc1]，和

第二轻链：从 N 端到 C 端依次为：[VL2-D]-[CL]；

其中，VH1-I 和 VL1-I 分别为 WO2021139758A1 中 I0 的重链可变区和轻链可变区，VH2-D 和 VL2-D 分别为 WO2021139758A1 中 D0 的重链可变区和轻链可变区。本实施例中 DI 双特异性抗体中 Obscurin 链、Titin 链、连接子 1、连接子 2 结构见下表。

表 5. DI 双特异性抗体中 Obscurin 链/ Titin 链和连接子对应表

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

注：表格中 Titin 链和 Obscurin 链的编号见表 3-1 和表 3-2。

采用 WO2021139758A1 的测试例 4 中的方法检测 DI-2 至 DI-20 双特异性抗体与其抗原的结合活性。对抗体进行热稳定性研究。研究方法：用 PBS 将抗体的浓度稀释至 5 mg/mL，采用高通量微分扫描荧光仪（UNCHAINED，规格型号：Unit）测定其热稳定性。实验结果表明，改造后的双特异性抗体对抗原的结合活性没有显著变化；并且，与 DI-2 相比，DI-4 至 DI-8、DI-10 至 DI-16、DI-20 的 Tm1 (°C)、Tonset (°C)有明显的提升，双特异性抗体的热稳定性更优。

表 6. DI 双特异性抗体的结合活性检测

编号	RANKL	NGF	编号	RANKL	NGF

	EC_{50}(nM)			EC_{50}(nM)	
DI-2	0.3832	6.633	DI-12	0.4125	6.5156
DI-3	0.3613	5.7730	DI-13	0.4440	5.5420
DI-4	0.3959	6.2930	DI-14	0.4182	3.2610
DI-5	0.3290	6.1890	DI-15	0.2206	5.2800
DI-6	0.2509	5.6720	DI-16	0.1474	5.5140
DI-7	0.2557	6.6430	DI-17	0.2329	6.7270
DI-8	0.3643	7.6250	DI-18	0.2662	5.9080
DI-9	0.2944	8.4950	DI-19	0.1843	5.9280
DI-10	0.3460	7.1660	DI-20	0.3184	6.4250
DI-11	0.3721	10.9600			

表 7. DI 双特异性抗体的热稳定性实验结果

编号	Tm1 (°C)	Tonset (°C)	编号	Tm1 (°C)	Tonset (°C)
DI-2	55.6	48.3	DI-11	57.35	-
DI-4	60.1	52.493	DI-12	59.9	51.726
DI-5	61	51.967	DI-13	61	50.988
DI-6	60.8	53.012	DI-14	61.2	52.191
DI-7	60.34	52.003	DI-15	60.41	50.558
DI-8	60.61	50.425	DI-16	61.5	50.691
DI-10	60.2	52.766	DI-20	60.7	51.859

采用 10mM 乙酸，pH5.5，9%蔗糖的缓冲液配制含 DI 双特异性抗体的溶液，将溶液置于 40°C恒温箱中孵育四周，结束后将抗体浓度浓缩至孵育开始时浓度，观察溶液沉淀情况。实验结果表明，DI-2 双特异性抗体组溶液出现沉淀，DI-3 至 DI-7 相比 DI-2 具有更好的稳定性。

表 8. DI 双特异性抗体的沉淀

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

1.2 PL 双特异性抗体

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

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

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

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

第二轻链：从 N 端到 C 端依次为：[VL2-L]-[CL]；

其中，VH1-P 和 VL1-P 分别为 WO2020177733A1 中 h1831K 抗体的重链可变区和轻链可变区，VH2-L 和 VL2-L 的氨基酸序列如下所示。

> VH2-L（SEQ ID NO：180）

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFIS YDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLG PFDYWGQGTLVTVSS

> VL2-L（SEQ ID NO：181）

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

本实施例中 PL 双特异性抗体中 Obscurin 链、Titin 链、连接子 1、连接子 2 结构见下表。

表 9. PL 双特异性抗体中 Obscurin 链/ Titin 链和连接子对应表

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

注：表格中 Titin 链和 Obscurin 链的编号见表 3-1 和表 3-2。

参照 WO2021139758A1 中测试例 4 中的 ELISA 方法检测 PL 双特异性抗体

的结合活性，其中 hPDL1、hCTLA4 抗原购自：Sino biology。对抗体进行热稳定性研究。方法：用 PBS 将抗体的浓度稀释至 1.4-3 mg/mL，采用高通量微分扫描荧光仪（UNCHAINED，规格型号：Unit）测定其热稳定性。实验结果表明，PL 双特异性抗体对抗原仍具有良好的结合活性；并且，与 PL-1 相比，PL-2 至 PL-19 的 Tm1 (°C)、Tagg 266 (°C)、Tonset (°C)有明显的提升，双特异性抗体的热稳定性更优。

表 10. PL 双特异性抗体的结合活性检测

编号	hPDL1	hCTLA4	编号	hPDL1	hCTLA4
	EC_{50}(nM)			EC_{50}(nM)	
PL-1	1.6	16.5	PL-11	0.6	5.6
PL-2	0.5	8.0	PL-12	0.5	8.0
PL-3	0.6	7.9	PL-13	0.5	4.4
PL-4	0.7	6.5	PL-14	1.3	6.0
PL-5	0.7	6.7	PL-15	1.4	3.2
PL-6	0.8	5.3	PL-16	1.7	34.9
PL-7	0.5	7.3	PL-17	1.4	6.2
PL-8	1.4	14.5	PL-18	1.6	6.7
PL-9	0.6	5.5	PL-19	1.6	6.5
PL-10	0.6	6.9			

表 11. PL 双特异性抗体的热稳定性实验结果

编号	Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tonset (°C)	编号	Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tonset (°C)
PL-1	61.64	64.82	52.566	PL-11	65.88	-	57.976
PL-2	66.20	66.55	58.317	PL-12	65.54	67.94	-
PL-3	64.07	68.28	57.661	PL-13	71.85	68.17	58.581
PL-4	70.71	67.29	56.246	PL-14	74.18	69.42	58.589
PL-5	74.56	68.11	58.407	PL-15	70.96	69.91	58.622
PL-6	70.43	70.12	61.069	PL-16	63.48	68.98	58.702
PL-7	68.46	67.41	63.031	PL-17	70.15	69.86	56.193
PL-8	65.00	-	-	PL-18	-	69.43	-
PL-9	69.24	67.83	58.597	PL-19	-	69.52	57.766
PL-10	69.63	68.12	56.788				

1.3 HJ 双特异性抗体

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

第一重链：从 N 端到 C 端依次为：[VH1-H]-[连接子 1]-[Titin 链]-[Fc1]，

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

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

第二轻链：从 N 端到 C 端依次为：[VL2-J]-[CL]；

其中，VH1-H 和 VL1-H 分别为 WO2021139758A1 中 H0 的重链可变区和轻链可变区，VH2-J 和 VL2-J 分别为 WO2021139758A1 中 J1 的重链可变区和轻链可变区。本实施例中 HJ 双特异性抗体中 Obscurin 链、Titin 链、连接子 1、连接子 2 结构见下表。

表 12. HJ 双特异性抗体中 Obscurin 链/Titin 链和连接子对应表

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

参照 WO2021139758A1 中测试例 4 中的方法检测 HJ 双特异性抗体的抗原结合活性。对抗体的热稳定性进行研究，方法：用 10mM 乙酸 pH5.5、9%蔗糖的缓冲液配制 HJ 双特异性抗体稀释溶液，然后通过超滤浓缩的方法将双特异性抗体浓缩，获得不同浓度的 HJ 双特异性抗体溶液（HJ 双特异性抗体的浓度见表 13-2），然后将浓缩溶液置于 40℃恒温箱中孵育，第 0 天（也即 40℃孵育开始前，D0），第 7 天（40℃孵育第 7 天，D7），第 14 天（40℃孵育第 14 天，D14），第 21 天（40℃孵育第 21 天，D21）和第 28 天（40℃孵育第 28 天，D28）检测样品的 SEC 纯度，40℃孵育 28 天后，马上取样检测样品 CE-SDS 纯度。实验结果表明，本披露构建的 HJ 双特异性抗体对抗原的结合活性没有显著变化；并且，与 HJ-3 相比，HJ-5 至 HJ-11 双特异性抗体的热稳定性更优。

表 13-1. HJ 双特异性抗体的结合活性检测

编号	hIL5	hTSLP	编号	hIL5	hTSLP
	EC_{50}(nM)			EC_{50}(nM)	
HJ-3	17.38	3.234	HJ-8	18.74	3.332
HJ-5	15.96	2.639	HJ-9	10.86	3.184
HJ-6	37.05	2.884	HJ-10	20.81	3.173
HJ-7	17.69	2.182	HJ-11	9.464	3.005

表 13-2. HJ 双特异性抗体加速稳定性实验结果

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

实施例 2. 抗人 GUCY2C 鼠源抗体的筛选和鉴定

2.1 细胞株构建

构建 CHO-K1/hGUCY2C 和 HCT116/hGUCY2C 细胞株，相关蛋白序列如下：

人 GUCY2C 蛋白（UniProtKB：P25092）：

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAE
PLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCE
GLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYK
ETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWY
LNALEASVSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKL
KGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSR
NLSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGP
VTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWK
NSKLPNDITGRGPQILMIAVFTLTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWS
HIPPENIFPLETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVILKDLKHNDG
NFTEKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSLREVLNDTI
SYPDGTFMDWEFKISVLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVV
KITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQKGDVYSYGIIAQEIILRKETFYTL
SCRDRNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEEKELEVYLLVKNCWEEDPEKRP
DFKKIETTLAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYKAER
DRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFSDIVGFTTICKYSTPME
VVDMLNDIYKSFDHIVDHHDVYKVETIGDAYMVASGLPKRNGNRHAIDIAK
MALEILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTVN
TASRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFLYEVRGETYLKGRGNETTYWLTG
MKDQKFNLPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQKPRRVASYK
KGTLEYLQLNTTDKESTYF

SEQ ID NO：1

将编码人 GUCY2C 全长基因克隆到哺乳动物细胞表达载体 pCDH 上，用

pVSV-G、pCMV-dR8.91 和 pCDH-人 GUCY2C 三种质粒共同转染 HEK293T 细胞（ATCC，CRL-11268）包装病毒。转染 48 小时后，收集病毒感染 CHO-K1（ATCC，CCL-61）或 HCT116 细胞（ATCC, CCL-247），通过加压筛选两周后，进行细胞亚克隆，经过 FACS 检测获得高表达 GUCY2C 的 CHO-K1/hGUCY2C 和 HCT116/hGUCY2C 细胞株。

2.2 用于免疫或筛选的融合蛋白构建

选择人 GUCY2C 胞外区，并在 C 端连接 His 或者 Fc 标签，构建成融合蛋白进行免疫及筛选检测。相关蛋白序列如下：

hGUCY2C ECD-hFc：

SQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNA
GLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCT
YSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKT
NDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSHELGFKVVLRQD
KEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFED
NVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGHML
KIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTK
KYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGPQEPKSSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：2

hGUCY2C ECD-His：

SQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNA
GLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCT
YSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKT
NDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSHELGFKVVLRQD
KEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFED
NVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGHML
KIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTK
KYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGPQHHHHHH

SEQ ID NO：3

2.3 抗 GUCY2C 鼠源抗体的筛选和鉴定

本披露通过杂交瘤融合或者 Single B 技术制备了针对人 GUCY2C 的单克隆抗体，所得抗体以较高的亲和力与人 GUCY2C 特异性结合，并且可以与食蟹猴

GUCY2C 有交叉结合，与细胞表面的人 GUCY2C 有较好的结合活性。

以 hGUCY2C ECD-hFc，hGUCY2C ECD-His，CHO-K1/hGUCY2C 细胞或 HCT116/hGUCY2C 细胞为免疫原。蛋白初次免疫 50μg，加强免疫每次 25μg，以 TiterMax® Gold Adjuvant（Sigma Cat No. T2684）与 Thermo Imject® Alum（Thermo Cat No. 77161）为佐剂交叉免疫。细胞免疫按照每次 1*10^7/次/只进行免疫。经过初次免疫和 4 至 7 次加强免疫后选择血清中抗体滴度高小鼠进行脾细胞融合或者 single B 细胞的筛选。

融合后根据杂交瘤细胞生长密度，对杂交瘤培养上清进行检测。筛选出与细胞表面的人 GUCY2C 以及抗原有较好的结合活性的杂交瘤。收集单克隆杂交瘤细胞，用 NucleoZol（MN）提取 RNA（按照试剂盒说明书步骤），并进行反转录（PrimeScript™ Reverse Transcriptase，Takara, cat # 2680A）。将反转录得到的 cDNA 采用 mouse Ig-Primer Set（Novagen，TB326 Rev.B 0503）进行 PCR 扩增后测序，获得抗体的 CDR 和可变区的氨基酸序列。

表 14. 杂交瘤融合筛选得到的抗 GUCY2C 抗体的 CDR

抗体	重链 CDR		轻链 CDR	
M81	HCDR1	DHNMN（SEQ ID NO：4）	LCDR1	SASSSVNYMY（SEQ ID NO：7）
	HCDR2	VMNPKFGTINYNQKFKD（SEQ ID NO：5）	LCDR2	RTSNLAS（SEQ ID NO：8）
	HCDR3	DDYPNYFDY（SEQ ID NO：6）	LCDR3	QQYHDYPPT（SEQ ID NO：9）
M146	HCDR1	DYNMN（SEQ ID NO：10）	LCDR1	SASSSLNYMY（SEQ ID NO：13）
	HCDR2	LINPKYGTTNYNQKFKG（SEQ ID NO：11）	LCDR2	RTSNLAS（SEQ ID NO：8）
	HCDR3	DDYPAWFAY（SEQ ID NO：12）	LCDR3	QQYHSYPPT（SEQ ID NO：14）
M42	HCDR1	SYAVH	LCDR1	RASSFVGSGYLH
		（SEQ ID NO：250）		（SEQ ID NO：253）
	HCDR2	VIWTGGNTRSNAAFMS	LCDR2	STSKLAS
		（SEQ ID NO：251）		（SEQ ID NO：254）
	HCDR3	NSLLDYAMDY	LCDR3	QQSSGYPLT
		（SEQ ID NO：252）		（SEQ ID NO：255）
M61	HCDR1	DYYMS	LCDR1	SASSSISSNFLH
		（SEQ ID NO：256）		（SEQ ID NO：259）
	HCDR2	DINPNNGGTSDNQKFKG	LCDR2	RTSNLAS
		（SEQ ID NO：257）		（SEQ ID NO：8）
	HCDR3	GRGMVARYFDI	LCDR3	QQGSGLPLT
		（SEQ ID NO：258）		（SEQ ID NO：260）

M64	HCDR1	DYGMH	LCDR1	SASSSVSYMY
		（SEQ ID NO：261）		（SEQ ID NO：264）
	HCDR2	YISSGSSTIYYADTVKG	LCDR2	DTSKLAS
		（SEQ ID NO：262）		（SEQ ID NO：265）
	HCDR3	TRVYFYGSYWYFDV	LCDR3	QQWSSDPPYT
		（SEQ ID NO：263）		（SEQ ID NO：266）
M93	HCDR1	RYWMH	LCDR1	KASQDVSSAVA
		（SEQ ID NO：267）		（SEQ ID NO：270）
	HCDR2	MIDPSDSYTKYNQKFMG	LCDR2	SASYRST
		（SEQ ID NO：268）		（SEQ ID NO：271）
	HCDR3	SIKVAGWYFDV	LCDR3	QQHFSTTLT
		（SEQ ID NO：269）		（SEQ ID NO：272）

>M81 VH：

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDHNMNWVKQSNGKSLEWIGVMNPKFGTINYNQKFKDKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCVRDDYPNYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：15

>M81 VL：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTSNLASGVSARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHDYPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO：16

>M146 VH：

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGLINPKYGTTNYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAIDDYPAWFAYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO：17

>M146 VL：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSLNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPPTFGAGTKLELK

SEQ ID NO：18

>M42VH：

QIQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYAVHWVRQSPGKGLEWLGVIWTGGNTRSNAAFMSRLTITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCAKNSLL

DYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO：273

>M42VL：

ENVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCRASSFVGSGYLHWYQQKSGASPKLW
IYSTSKLASGVPARFSGSGSGTSFFLTISRVEIEDAAAYYCQQSSGYPLTFGGGS
KLEIK

SEQ ID NO：274

>M61VH：

EVQLQQSGPELVRPGASVKISCTASGYTITDYYMSWVKQSHGKSPEWI
GDINPNNGGTSDNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMEYRSLTSEDSAVYYCARGR
GMVARYFDIWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO：275

>M61VL：

EILLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNFLHWYQEKPGFSPKLLIYRT
SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGSMEAEDVATYYCQQGSGLPLTFGAGTKLE
LK

SEQ ID NO：276

>M64VH：

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEW
VAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARTR
VYFYGSYWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO：277

>M64VL：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKSGTSPKRWIY
DTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSLEAEDAATYYCQQWSSDPPYTFGGGT
KLEIK

SEQ ID NO：278

>M93VH：

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTRYWMHGVKRRPGQGLE
WIGMIDPSDSYTKYNQKFMGKAILTVDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARSI
KVAGWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO：279

>M93VL：

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLI
YSASYRSTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAIYYCQQHFSTTLTFGAGT

KLELK

SEQ ID NO：280

注释：单下划线部分为根据 Kabat 规则的 CDR，其余部分为 FR。

Single B 细胞的筛选主要通过正筛选和反筛选，10*genomic 和生物信息学技术得到一系列抗体可变区序列。将得到的序列进行 CDR 分类，选取其鼠源可变区序列与人抗体恒定区序列连接并表达嵌合抗体，通过与 hGUCY2C ECD-His 及 cynoGUCY2C ECD-His（ACRO# GUC-C52H6）蛋白结合，表面等离子共振和细胞结合等方法筛选，选出特异结合 hGUCY2C ECD 和 cynoGUCY2C ECD 的抗体序列。筛选所得抗体的重链和轻链可变区序列如下：

表 15. Single B 筛选得到的抗 GUCY2C 抗体的 CDR

抗体	重链 CDR		轻链 CDR	
P3-C7	HCDR1	DHYIH	LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH
		（SEQ ID NO：19）		（SEQ ID NO：22）
	HCDR2	VINPYNDGATYNQKFKG	LCDR2	KVSNRFS
		（SEQ ID NO：20）		（SEQ ID NO：23）
	HCDR3	PPRAYGNYAGY	LCDR3	SQSTHVPYT
		（SEQ ID NO：21）		（SEQ ID NO：24）
P1-D2	HCDR1	DHNMN	LCDR1	SANSSVNYIY
		（SEQ ID NO：281）		（SEQ ID NO：284）
	HCDR2	VINPKYGTISNNQKFKG	LCDR2	RTSNLAS
		（SEQ ID NO：282）		（SEQ ID NO：8）
	HCDR3	DDYPNYFDY	LCDR3	QQYHSFPPT
		（SEQ ID NO：283）		（SEQ ID NO：285）
P1-D3	HCDR1	TYGMS	LCDR1	SASSSVNYMH
		（SEQ ID NO：286）		（SEQ ID NO：289）
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG	LCDR2	DTSKLAS
		（SEQ ID NO：287）		（SEQ ID NO：265）
	HCDR3	RGYSNLYYYALDY	LCDR3	QQWSSNPST
		（SEQ ID NO：288）		（SEQ ID NO：290）
P1-C6	HCDR1	SYGIT	LCDR1	RASESVSLIGTNLIH
		（SEQ ID NO：291）		（SEQ ID NO：294）
	HCDR2	EIYPRSGNTYYNEKFKG	LCDR2	HASNLEA
		（SEQ ID NO：292）		（SEQ ID NO：295）

	HCDR3	AITTVVGDWYFDV（SEQ ID NO：293）	LCDR3	LQSRKIRT（SEQ ID NO：296）
P1-D9	HCDR1	DYGMH（SEQ ID NO：261）	LCDR1	SASSSVSYMY（SEQ ID NO：264）
	HCDR2	HISSGSSTIYYADTVKG（SEQ ID NO：297）	LCDR2	LTSNLAS（SEQ ID NO：299）
	HCDR3	SRNYYGSRIFDY（SEQ ID NO：298）	LCDR3	QQWSSNPPT（SEQ ID NO：300）
P1-F10	HCDR1	DYGMH（SEQ ID NO：261）	LCDR1	SASSSVNYMY（SEQ ID NO：303）
	HCDR2	HISSGSSTIYYADTVKG（SEQ ID NO：301）	LCDR2	LTSNLAS（SEQ ID NO：299）
	HCDR3	SRNYYGSRVFDY（SEQ ID NO：302）	LCDR3	QQWNSNPPT（SEQ ID NO：304）
P2-C8	HCDR1	DYYMH（SEQ ID NO：305）	LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH（SEQ ID NO：22）
	HCDR2	LINPYNGVTSYNQKFKG（SEQ ID NO：306）	LCDR2	KVSNRFS（SEQ ID NO：23）
	HCDR3	PPRAYGNYAGY（SEQ ID NO：21）	LCDR3	SQSTHVPYT（SEQ ID NO：24）
P2-B9	HCDR1	SYWMH（SEQ ID NO：128）	LCDR1	KASKKVTIFGSISALH（SEQ ID NO：309）
	HCDR2	MIHPKSDSVNNNEKFKN（SEQ ID NO：307）	LCDR2	NGAKLES（SEQ ID NO：310）
	HCDR3	GGDSGYSMDY（SEQ ID NO：308）	LCDR3	LQNKEVPYT（SEQ ID NO：311）
P3-D2	HCDR1	DYFMH（SEQ ID NO：312）	LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH（SEQ ID NO：22）
	HCDR2	LINPYSGGTTYNQKFKG（SEQ ID NO：313）	LCDR2	KVSNRFS（SEQ ID NO：23）
	HCDR3	PPRAYGDYAGY	LCDR3	SQSTHVPLT

		（SEQ ID NO：314）		（SEQ ID NO：315）
P3-B4	HCDR1	TYGMS	LCDR1	SASSSVSYML
		（SEQ ID NO：286）		（SEQ ID NO：317）
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG	LCDR2	DTSKLAS
		（SEQ ID NO：287）		（SEQ ID NO：265）
	HCDR3	RAGSSLYYYAMDY	LCDR3	QQWSSNPPT
		（SEQ ID NO：316）		（SEQ ID NO：300）
P3-E4	HCDR1	NYWMH	LCDR1	RASESVSIHGTHLMH
		（SEQ ID NO：318）		（SEQ ID NO：321）
	HCDR2	EIDPSDGYTDYNQKFKG	LCDR2	AASNLES
		（SEQ ID NO：319）		（SEQ ID NO：322）
	HCDR3	SLRGPITFGPFPY	LCDR3	QHSIEDPRT
		（SEQ ID NO：320）		（SEQ ID NO：323）
P3-F6	HCDR1	DYYMN	LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH
		（SEQ ID NO：324）		（SEQ ID NO：22）
	HCDR2	DINPNNGGTSYNQKFKG	LCDR2	KVSNRFS
		（SEQ ID NO：325）		（SEQ ID NO：23）
	HCDR3	KTWLPYASVY	LCDR3	SQSTHVPPYT
		（SEQ ID NO：326）		（SEQ ID NO：327）
P3-D9	HCDR1	DYGMH	LCDR1	SASSSVSYMY
		（SEQ ID NO：261）		（SEQ ID NO：264）
	HCDR2	HISSGSSTIYYGDTVKG	LCDR2	LTSSLAS
		（SEQ ID NO：328）		（SEQ ID NO：329）
	HCDR3	SRNYYGSRVFDY	LCDR3	QQWSSNPPT
		（SEQ ID NO：302）		（SEQ ID NO：300）

>P3-C7 VH：

EVQLQQSGPVLLKPGASVKMSCKASGYTFTDHYIHWVKLSHGKSLEWIGVINPYNDGATYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARPPRAYGNYAGYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：25

>P3-C7 VL：

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQS

PKLLIYKVSNRFSGVPDRFIGSGSRTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTF
GGGTRLEIK

SEQ ID NO：26

>P1-D2 VH

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDHNMNWVKQSNGKSLEWI
GVINPKYGTISNNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTAEDSAVYYCARDDY
PNYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：330

>P1-D2 VL

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSANSSVNYIYWYQQKPGSSPKPWIYRTS
NLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSFPPTFGGGTKLEI
K

SEQ ID NO：331

>P1-D3 VH

QIQLIQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKWM
GWINTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSANTAYLQINNLKNEDTATYFCARRGY
SNLYYYALDYWGQGASVTVSS

SEQ ID NO：332

>P1-D3 VL

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKSGTSPKRWIYD
TSKLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYFCQQWSSNPSTFGGGTKL
EIK

SEQ ID NO：333

>P1-C6 VH

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGITWVKRRTGQGLGWI
GEIYPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARAITT
VVGDWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO：334

>P1-C6 VL

DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSLIGTNLIHWYQQKPGQPPKLL
IHHASNLEAGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAIYYCLQSRKIRTFGGGTK
LEIK

SEQ ID NO：335

>P1-D9 VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSDYGMHWVRQAPEKGLEWI
AHISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSRN

YYGSRIFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：336

>P1-D9 VL

QIVLTQSPARMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYL
TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGSGTKL
EIK

SEQ ID NO：337

>P1-F10 VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSDYGMHWVRQAPEKGLEW
VAHISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNVKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSR
NYYGSRVFDYWGQGTPLTVSS

SEQ ID NO：338

>P1-F10 VL

QIVLTQSPALMSVSPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQKPRSSPKPWIYL
TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGSGTK
LEIK

SEQ ID NO：339

>P2-C8 VH

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKVSGYTFTDYYMHWVKQSHGKSLE
WIGLINPYNGVTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARP
PRAYGNYAGYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：340

>P2-C8 VL

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP
KLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTF
GGGTKLEIK

SEQ ID NO：341

>P2-B9 VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVKQRPGQGLE
WIGMIHPKSDSVNNNEKFKNKATLTVDKSSSTVYLQLSSLTSEDSAVYSCARG
GDSGYSMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO：342

>P2-B9 VL

DIVLTQSPASLAVSLGQKATISCKASKKVTIFGSISALHWYQQKPGQPPKL
IYNGAKLESGVSARFSDSGSQNRSPFGNQLSFTLTIDPVEADDAATYYCLQNK

EVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO：343

>P3-D2 VH

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYFMHWVKQSHGKSLEW
IGLINPYSGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARPPR
AYGDYAGYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：344

>P3-D2 VL

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP
KLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTF
GTGTKLEIK

SEQ ID NO：345

>P3-B4 VH

QIQLVQSGPELKKPGEIVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKWM
GWINTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARRAG
SSLYYYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO：346

>P3-B4 VL

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMLWYQQKSGTSPKRWIYD
TSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTK
LEIK

SEQ ID NO：347

>P3-E4 VH

QVQLQQPGAELVMPGAAVKLSCKASGYTFINYWMHWLKQRPGQGLE
WIGEIDPSDGYTDYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAISL
RGPITFGPFPYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO：348

>P3-E4 VL

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKL
LIYAASNLESGVPARFSGSGSETDFTLNIHPVAEEDAATYFCQHSIEDPRTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO：349

>P3-F6 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWI
GDINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARKT

WLPYASVYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO：350

>P3-F6 VL

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP
KLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPYT
FGGGTKLEIK

SEQ ID NO：351

>P3-D9 VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSDYGMHWVRQAPEKGLEW
VAHISSGSSTIYYGDTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCTRSR
NYYGSRVFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：352

>P3-D9 VL

QIVLTQSPALMSVSPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYL
TSSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINNVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGSGTK
VEIK

SEQ ID NO：353

注释：单下划线部分为根据 Kabat 规则的 CDR，其余部分为 FR。

鼠源抗 GUCY2C 抗体的可变区序列与 SEQ ID NO：58 和 SEQ ID NO：59 所示的恒定区组合获得嵌合抗体。示例性的，M81CHI 或者 P3-C7 CHI 表示包含 M81 或 P3-C7 鼠源重链可变区、轻链可变区和所述恒定区的嵌合抗体，具体序列如下所示。其余嵌合抗体 M146 CHI、M42 CHI、M61 CHI、M64 CHI、M93 CHI、P1-D2 CHI、P1-D3 CHI、P1-C6 CHI、P1-D9 CHI、P1-F10 CHI、P2-C8 CHI、P2-B9 CHI、P3-D2 CHI、P3-B4 CHI、P3-E4 CHI、P3-F6 CHI、P3-D9 CHI 依此类推；为了节省篇幅，它们的全长序列可以毫无疑义地确定，故未全部列出。

示例性的，抗 GUCY2C 嵌合抗体的全长序列如下：

M81CHI 重链：

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDHNMNWVKQSNGKSLEWIG
VMNPKFGTINYNQKFKDKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCVRDDY
PNYFDYWGQGTTLTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE*

WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：354

M81CHI 轻链：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS NLASGVSARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHDYPPTFGGGTKLE IK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO：355

P3-C7 CHI 重链：

EVQLQQSGPVLLKPGASVKMSCKASGYTFTDHYIHWVKLSHGKSLEWI GVINPYNDGATYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARPPR AYGNYAGYWGQGTTLTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO：356

P3-C7 CHI 轻链：

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP KLLIYKVSNRFSGVPDRFIGSGSRTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTF GGGTRLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC*

SEQ ID NO：357

实施例 3. 抗 GUCY2C 单克隆抗体的人源化

鼠源抗体的人源化根据本领域许多文献公示的方法进行。简言之，在所获得的鼠源抗体 VH/VL CDR 典型结构的基础上，从人源种系数据库中搜索轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）的同源序列，按 FR 的同源性由高到低排序，选取 FR 同源性最高的种系作为模板，将鼠源抗体的 CDR 区移植到人源模板上，对可变区的某些氨基酸突变，并将鼠源抗体的恒定区替换为人恒定区，得到最终的人源化抗体。

3-1. M81 抗体的人源化

M81 抗体的人源化抗体选择 IGKV3-11*01、IGKV6-21*02 或 IGKV1-9*01 和 IGKJ4*01 作为轻链框架区模板；选择 IGHV1-3*01 和 IGHJ6*01 作为重链框架区模板。将鼠源抗体的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，并对可变区的某些氨基酸进行取代，获得人源化抗体的轻链和重链可变区，具体框架替换及氨基酸取代如下：

表 16.人源化抗体 M81 的框架替换及氨基酸取代

VL		VH	
L1	Graft(IGKV3-11*01) + R45K, L46S, L47W, I58V, F71Y	H1	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E,R38K,R66K,V67A + D96N
L2	Graft(IGKV6-21*02) + K16G, L46S, L47W, K49Y, N76S	H2	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E,R38K,R66K,V67A
L3	Graft(IGKV1-9*01) + V15P, K42S, A43S, L46S, L47W, F71Y		
L4	Graft(IGKV1-9*01) + V15P, K42S, A43S, L46S, L47W, F71Y+L54D		
L5	Graft(IGKV1-9*01) + V15P, K42S, A43S, L46S, L47W, F71Y+ S56Q		
L6	Graft(IGKV1-9*01) + V15P, K42S, A43S, L46S, L47W, F71Y+S52Q		
FR4	IGKJ4*01	FR4	IGHJ6*01

注：氨基酸编号按照 Kabat 编号系统。

M81 的人源化抗体的 CDR 如下：

表 17. M81 人源化抗体的 CDR

可变区	CDR	序列	SEQ ID NO
h81 H1	HCDR3	D**N**YPNYFDY	27
h81 L4	LCDR2	RTSN**D**AS	28
h81 L5	LCDR2	RTSNLA**Q**	29
h81 L6	LCDR2	RT**Q**NLAS	30

M81 人源化抗体的可变区序列如下：

> h81 L1：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVNYMYWYQQKPGQAP**K**S**W**IYRT SNLASG**V**PARFSGSGSGTD**Y**TLTISSLEPEDFAVYYCQQYHDYPPTFGGGTKVE

IK

SEQ ID NO：31

> h81 L2：

EIVLTQSPDFQSVTPGEKVTITCSASSSVNYMYWYQQKPDQSPKSWIYRT
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDAATYYCQQYHDYPPTFGGGTKV
EIK

SEQ ID NO：32

> h81 L3：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO：33

> h81 L4：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NDASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO：34

> h81 L5：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLAQGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI
K

SEQ ID NO：35

> h81 L6：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRT
QNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVE
IK

SEQ ID NO：36

> h81 H1：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHNMNWVKQAPGQRLEW
MGVMNPKFGTINYNQKFKDKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPNYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：37

> h81 H2：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHNMNWVKQAPGQRLEW
MGVMNPKFGTINYNQKFKDKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD

DYPNYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：38

注：单下划线部分为 CDR，点下划线粗体处为氨基酸取代位点，其余部分为 FR。

3-2. M146 抗体的人源化

M146 抗体的人源化抗体选择 IGKV3-11*01 和 IGKJ4*01 作为轻链框架区模板；选择 IGHV1-3*01 和 IGHJ6*01 作为重链框架区模板。将鼠源抗体的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，并对可变区的某些氨基酸进行取代，获得人源化抗体的轻链和重链可变区，具体框架替换及氨基酸取代如下：

表 18.人源化抗体 M146 的框架替换及氨基酸取代

VL		VH	
L1	Graft(IGKV3-11*01) + Q42S,A43S,L46P,L47W,I58V,F71Y+N53Q	H1	Graft(IGHV1-3*01) + Q1E,V2F,T28S,I69L,R71V,T73Q,A75S+D96N
FR4	IGKJ4*01	FR4	IGHJ6*01

注：氨基酸编号按照 Kabat 编号系统。

M146 的人源化抗体的 CDR 如下：

表 19. M146 人源化抗体的 CDR

可变区	CDR	序列	SEQ ID NO
h146 L1	LCDR2	RTS**Q**LAS	39
h146 H1	HCDR3	D**N**YPAWFAY	40

人源化抗体 M146 的可变区序列如下：

>h146 L1：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSLNYMYWYQQKPG**S**SPR**P**W**I**YRTS**Q**LASG**V**PARFSGSGSGTD**Y**TLTISSLEPEDFAVYYCQQYHSYPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO：41

> h146 H1：

EF**I**QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**S**FTDYNMNWVRQAPGQRLEWMGLINPKYGTTNYNQKFKGRVT**L**T**V**D**Q**S**S**STAYMELSSLRSEDTAVYYCARD**N**YPAWFAYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：42

注：单下划线部分为 CDR，点下划线粗体处为氨基酸取代位点，其余部分为 FR。

3-3. P3-C7 抗体的人源化

P3-C7 抗体的人源化抗体选择 IGKV2-40*01 或 IGKV1-39*01 和 IGKJ4*01 作为轻链框架区模板；选择 IGHV1-46*01 和 IGHJ6*01 作为重链框架区模板。将鼠源抗体的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，并对可变区的某些氨基酸进行取代，获得人源化抗体的轻链和重链可变区，具体框架替换及氨基酸取代如下：

表 20.人源化抗体 P3-C7 的框架替换及氨基酸取代

VL		VH	
L1	Graft(IGKV2-40*01)	H1	Graft(IGHV1-46*01) + Q1E，R71V, T73K
L2	Graft(IGKV2-40*01) + I2V, G68R	H2	Graft(IGHV1-46*01) + Q1E，Q39L, Q43K, M69L, R71V, T73K
L3	Graft(IGKV2-40*01) + I2V, G68R + N28Q		
L4	Graft(IGKV2-40*01) + I2V, G68R + N28S		
L5	Graft(IGKV2-40*01) + I2V, G68R + N28T		
L6	Graft(IGKV2-40*01) + I2V, G68R + G29V		
L7	Graft(IGKV2-40*01) + I2V, G68R + G29Q		
L8	Graft(IGKV1-39*01) + I2V, Q3V, G68R, T74K + G29Q		
FR4	IGKJ4*01	FR4	IGHJ6*01

注：氨基酸编号按照 Kabat 编号系统。

P3-C7 的人源化抗体的 CDR 如下：

表 21. P3-C7 人源化抗体的 CDR

可变区	CDR	序列	SEQ ID NO
hP3-C7 L3	LCDR1	RSSQSLVHS**Q**GNTYLH	43
hP3-C7 L4	LCDR1	RSSQSLVHS**S**GNTYLH	44
hP3-C7 L5	LCDR1	RSSQSLVHS**T**GNTYLH	45
hP3-C7 L6	LCDR1	RSSQSLVHSN**V**NTYLH	46

hP3-C7 L7/ hP3-C7 L8	LCDR1	RSSQSLVHSN**Q**NTYLH	47

人源化抗体 P3-C7 的可变区序列如下：

> hP3-C7 L1：

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：48

> hP3-C7 L2：

D**V**VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：49

> hP3-C7 L3：

D**V**VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHS**Q**GNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：50

> hP3-C7 L4：

D**V**VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHS**S**GNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：51

> hP3-C7 L5：

D**V**VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHS**T**GNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：52

> hP3-C7 L6：

D**V**VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSN**V**NTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：53

> hP3-C7 L7：

D**V**VMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSN**Q**NTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG

GGTKVEIK

SEQ ID NO：54

> hP3-C7 L8：

DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGKAP
KLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSRTDFTLKISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK

SEQ ID NO：55

> hP3-C7 H1：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRQAPGQGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
PPRAYGNYAGYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：56

> hP3-C7 H2：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRLAPGKGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARP
PRAYGNYAGYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：57

注：单下划线部分为 CDR，点下划线处为氨基酸取代位点，其余部分为 FR。

将抗 GUCY2C 人源化抗体的重链可变区和轻链可变区分别与重链恒定区 hIgG1: CH1-Fc 和轻链恒定区 CL 重组，获得全长的人源化抗体。

> hIgG1: CH1-Fc：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：58

> CL：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID NO：59

本披露获得的抗 GUCY2C 的人源化抗体如下：

表 22-1. 81 系列的人源化抗体

可变区	h81 L1	h81 L2	h81 L3	h81 L4	h81 L5	h81 L6
h81 H1	81 L1H1	81 L2H1	81 L3H1	81 L4H1	81 L5H1	81 L6H1
h81 H2	81 L1H2	81 L2H2	81 L3H2	81 L4H2	81 L5H2	81 L6H2

表 22-2. 146 系列的人源化抗体

可变区	h146 L1
h146 H1	146 L1H1

表 22-3. P3-C7 系列的人源化抗体

可变区	hP3-C7 L1	hP3-C7 L2	hP3-C7 L3	hP3-C7 L4	hP3-C7 L5	hP3-C7 L6	hP3-C7 L7	hP3-C7 L8
hP3-C7 H1	P3-C7 L1H1	P3-C7 L2H1	P3-C7 L3H1	P3-C7 L4H1	P3-C7 L5H1	P3-C7 L6H1	P3-C7 L7H1	P3-C7 L8H1
hP3-C7 H2	P3-C7 L1H2	P3-C7 L2H2	P3-C7 L3H2	P3-C7 L4H2	P3-C7 L5H2	P3-C7 L6H2	P3-C7 L7H2	P3-C7 L8H2

示例性的，抗 GUCY2C 人源化抗体的全长序列如下：

81 L3H1 重链：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHNMNWVKQAPGQRLEW
MGVMNPKFGTINYNQKFKDKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPNYFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP*
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：60

81 L3H1 轻链：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI
K*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES*
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：61

146 L1H1 重链：

EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMNWVRQAPGQRLEW
MGLINPKYGTTNYNQKFKGRVTLTVDQSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPAWFAYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP*
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：62

146 L1H1 轻链：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSLNYMYWYQQKPGSSPRPWIYRTS
QLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQYHSYPPTFGGGTKVEI
K*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES*
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：63

P3-C7 L7H1 重链：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRQAPGQGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
PPRAYGNYAGYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF*
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：64

P3-C7 L7H1 轻链：

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNQNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSRTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ*
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO：65

P3-C7 L8H1 重链（同 P3-C7 L7H1 重链，SEQ ID NO：64）

P3-C7 L8H1 轻链：

DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGKAP KLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSRTDFTLKISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFG GGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC*

SEQ ID NO：66

注：单下划线部分为 CDR，点下划线粗体处为氨基酸取代位点，斜体部分为恒定区。

本披露使用的抗 GUCY2C 抗体的对照抗体如下：

1608（可变区序列参考专利 WO2019224716A2 中 GUCY2c-1608 双特异性抗体的 GUCY2c 端构建，恒定区序列如 SEQ ID NO：58 和 SEQ ID NO：59 所示），其全长序列如下：

> 1608 重链：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWI GEIKPSNELTNVHEKFKDRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRTIT TTEGYWFFDVWGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO：67

> 1608 轻链：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDYYGSSLLQWYQQKPGKAPKL LIYAASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTRKAYTFGQG TKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

SEQ ID NO：68

抗体 5F9（可变区序列参考专利 WO2014134311A1 制备，恒定区序列如 SEQ ID NO：58 和 SEQ ID NO：59 所示），具体序列如下：

>5F9 重链：

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIG

EINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGY
TYGNFDHWGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV*
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：69

>5F9 轻链：

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLIYG
ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTN
VEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS*
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：70

实施例 4. 抗 GUCY2C-CD3 双特异性抗体的制备

本披露 GUCY2C-CD3 双特异性抗体的 GUCY2C 臂为本披露中的抗 GUCY2C 抗体，CD3 臂可以来源于任意适宜的抗体。具体的，本披露采用的 CD3 臂是 S107E 或者 N103QN106Q。

表 23. S107E 的 CDR

抗体	重链		轻链	
S107E	HCDR1	KYAMN（SEQ ID NO：71）	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN（SEQ ID NO：74）
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO：72）	LCDR2	GTKFLAP（SEQ ID NO：75）
	HCDR3	HGNFGNEYISYWAY（SEQ ID NO：73）	LCDR3	VLWYSNRWV（SEQ ID NO：76）

S107E 可变区序列如下：

> S107E-VH：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI
RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN
FGNEYISYWAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO：77

> S107E-VL：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT
KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK

LTVL

SEQ ID NO：78

表 24. N103QN106Q 的 CDR

抗体	重链		轻链	
N103Q N106Q	HCDR1	KYAMN（SEQ ID NO：71）	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN（SEQ ID NO：74）
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO：72）	LCDR2	GTKFLAP（SEQ ID NO：75）
	HCDR3	HGQFGQSYISYWAY（SEQ ID NO：88）	LCDR3	VLWYSNRWV（SEQ ID NO：76）

N103QN106Q 可变区序列如下：

> N103QN106Q-VH：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGQFGQSYISYWAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO：89

> N103QN106Q-VL（同 S107E-VL，SEQ ID NO：78）

本披露中的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体具有以下 Format 1 至 Format 5 的分子结构：

Format 1 为非对称结构分子，包含完整分子共两条链，两条链均不相同，具体如下：

链 1：[GUCY2C-VL]-[连接子 1]-[CD3-VH]-[连接子 2]-[IgG1Fc(Knob-DI)]

链 2：[CD3-VL]-[连接子 3]-[GUCY2C-VH]-[连接子 2]-[IgG1Fc(Hole-DI)]；

其示意图如图 1A 所示。

相关序列如下：

> IgG1Fc(Knob-DI，L234A/L235A/G237A/Y349C/T366W)：

CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：79

> IgG1Fc(Hole-DI，L234A/L235A/G237A/S354C/T366S/L368A/Y407V)：

CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA

VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：80

> 连接子 1：

GGGSGGGG

SEQ ID NO：81

> 连接子 2：

G

SEQ ID NO：82

> 连接子 3：

GGGGSGGGG

SEQ ID NO：83

Format 2 为非对称结构分子，完整分子共四条链，四条链均不相同，具体如下：

链 1：[CD3-VH]-[IgG1(CH1)]-[IgG1Fc(Knob)]；

链 2：[CD3-VL]-[CL(Lambda)]；

链 3：[GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[IgG1Fc(Hole)]；

链 4：[GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]；

其示意图如图 1B 所示（其中：Ob 代表 Obscurin）。

相关序列如下：

>IgG1(CH1)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO：84

> IgG1Fc(Knob，L234A/L235A/S354C/T366W)：

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：85

> IgG1Fc(Hole，L234A/L235A/Y349C/T366S/L368A/Y407V)：

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：86

> CL(Lambda)：

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
EC

SEQ ID NO：87

> Titin(T.16)：

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFH
IENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：198

> Obscurin(O.28)：

SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRF
RLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA

SEQ ID NO：236

> 连接子 4：

GGGGS

SEQ ID NO：90

Format 3 为非对称结构分子，完整分子共四条链，四条链均不相同，具体如下：

链 1：[GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[IgG1Fc(Knob)]；

链 2：[GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]；

链 3：[CD3-VH]-[IgG1(CH1)]-[IgG1Fc(Hole)]；

链 4：[CD3-VL]-[CL(Lambda)]；

其示意图如图 1C 所示（其中：Ob 代表 Obscurin）。

相关序列如下：

> IgG1(CH1)（SEQ ID NO：84）

> IgG1Fc(Knob)（SEQ ID NO：85）

> IgG1Fc(Hole)（SEQ ID NO：86）

> CL(Lambda)（SEQ ID NO：87）

> Titin(T.16)（SEQ ID NO：198）

> Obscurin(O.28)（SEQ ID NO：236）

> 连接子 4（SEQ ID NO：90）

> 链 3（Format 3-3，CD3-VH-IgG1(CH1)-IgG1Fc(Hole)）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：93

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2，SEQ ID NO：92）

Format 4 为对称结构分子，完整分子共四条链，四条链由两条相同的链 1 与两条相同的链 2 组成，具体如下：

链 1：[GUCY2C-VH]-[IgG1(CH1)]-[CD3-VH]-[连接子 5]-[CD3-VL]-[连接子 6]-[IgG1Fc]；

链 2：[GUCY2C-VL]-[CL]；

其示意图如图 1D 所示。

相关序列如下：

> IgG1(CH1)（SEQ ID NO：84）

> CL（SEQ ID NO：59）

> IgG1Fc (L234A/L235A)：

DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：94

> 连接子 5：

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO：95

> 连接子 6

GGG

SEQ ID NO：96

Format 5 为对称结构分子，完整分子共六条链，六条链由两条相同的链 1、两条相同的链 2 和两条相同的链 3 组成，具体如下：

链 1：[GUCY2C-VH]-[IgG1(CH1)]-[连接子 7]-[CD3-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[IgG1Fc]；

链 2：[GUCY2C-VL]-[CL]；

链 3：[CD3-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]；

其示意图如图 1E 所示（其中：Ob 代表 Obscurin）。

相关序列如下：

> IgG1(CH1)（SEQ ID NO：84）

> IgG1Fc（SEQ ID NO：86）

> CL（SEQ ID NO：59）

> Titin(T.16)（SEQ ID NO：198）

> Obscurin(O.28)（SEQ ID NO：236）

>连接子 4（SEQ ID NO：90）

> 连接子 7：

GGGGSGGGGS

SEQ ID NO：97

> 链 3（Format 5-3，CD3-VL-Linker 4-Titin）

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI
GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG
GTKLTVLGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKI
HSQEQGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：98

根据表 25 构建抗原结合分子，所有双抗分子采用 S107E 或者 N103QN106Q 的可变区作为 CD3 臂。编号中，抗 GUCY2C 抗体可变区见抗体名，后面的数字编号代表所用的 Format，Format 后面标注（N103QN106Q）即代表其双抗所用的 CD3 臂为 N103QN106Q，Format 后面无标注即代表其双抗所用的 CD3 臂为 S107E。例如 P3-C7 L7H1-1 表示该分子采用抗体 P3-C7 L7H1 抗体的可变区作为 GUCY2C 结合域，采用 Format 1 作为分子结构，CD3 臂为 S107E。以此类推。

表 25.本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体

编号	链 1	链 2	链 3	链 4
P3-C7 L7H1-1	P3-C7 L7H1-1-1	P3-C7 L7H1-1-2		
P3-C7 L8H1-1	P3-C7 L8H1-1-1	P3-C7 L8H1-1-2		

P3-C7 L7H1-2	Format 2-1	Format 2-2	P3-C7 L7H1-2-3	P3-C7 L7H1-2-4
P3-C7 L7H1-3	P3-C7 L7H1-3-1	P3-C7 L7H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
P3-C7 L7H1-4	P3-C7 L7H1-4-1	P3-C7 L7H1-4-2		
P3-C7 L8H1-4	P3-C7 L8H1-4-1	P3-C7 L8H1-4-2		
P3-C7 L7H1-5	P3-C7 L7H1-5-1	P3-C7 L7H1-5-2	P3-C7 L7H1-5-3	
P3-C7 L8H1-5	P3-C7 L8H1-5-1	P3-C7 L8H1-5-2	P3-C7 L8H1-5-3	
M81-1	M81-1-1	M81-1-2		
M81-2	Format 2-1	Format 2-2	M81-2-3	M81-2-4
81 L1H1-2	Format 2-1	Format 2-2	81 L1H1-2-3	81 L1H1-2-4
81 L2H1-2	Format 2-1	Format 2-2	81 L2H1-2-3	81 L2H1-2-4
81 L3H1-2	Format 2-1	Format 2-2	81 L3H1-2-3	81 L3H1-2-4
81 L3H1-2 (N103QN106Q)	Format 2-1 (N103QN106Q)	Format 2-2	81 L3H1-2-3	81 L3H1-2-4
81 L4H1-2	Format 2-1	Format 2-2	81 L4H1-2-3	81 L4H1-2-4
81 L5H1-2	Format 2-1	Format 2-2	81 L5H1-2-3	81 L5H1-2-4
81 L6H1-2	Format 2-1	Format 2-2	81 L6H1-2-3	81 L6H1-2-4
81 L1H1-3	81 L1H1-3-1	81 L1H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
81 L2H1-3	81 L2H1-3-1	81 L2H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
81 L3H1-3	81 L3H1-3-1	81 L3H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
81 L4H1-3	81 L4H1-3-1	81 L4H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
81 L5H1-3	81 L5H1-3-1	81 L5H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
81 L6H1-3	81 L6H1-3-1	81 L6H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4
M146-1	M146-1-1	M146-1-2		
M146-2	Format 2-1	Format 2-2	M146-2-3	M146-2-4
146 L1H1-2	Format 2-1	Format 2-2	146 L1H1-2-3	146 L1H1-2-4
146 L1H1-3	146 L1H1-3-1	146 L1H1-3-2	Format 3-3	Format 3-4

示例性地，本披露采用 Format 1 构建的双特异性抗体具体氨基酸序列如下：

1. P3-C7 L7H1-1 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L7H1-1-1）：

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNQNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSRTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN

NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGCPPCPAPEAAGA
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

SEQ ID NO：99

> 链 2（P3-C7 L7H1-1-2）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL
IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG
GGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYI
HWVRQAPGQGLEWMGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELS
SLRSEDTAVYYCARPPRAYGNYAGYWGQGTTVTVSSGCPPCPAPEAAGAPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：100

2. P3-C7 L8H1-1 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L8H1-1-1）：

DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGKAP
KLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSRTDFTLKISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFG
GGTKVEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN
WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN
NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGCPPCPAPEAAGA
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

SEQ ID NO：101

> 链 2（P3-C7 L8H1-1-2，同 P3-C7 L7H1-1-2，SEQ ID NO：100）

3. M81-1 的全长序列

> 链 1（M81-1-1）：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLASGVSARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHDYPPTFGGGTKLE
IKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
CTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：102

> 链 2（M81-1-2）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL
IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG
GGTKLTVLGGGGSGGGGEFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDHNMN
WVKQSNGKSLEWIGVMNPKFGTINYNQKFKDKATLTVDQSSSTAYMQLNSLT
SEDSAVYYCVRDDYPNYFDYWGQGTTLTVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：103

4. M146-1 的全长序列

> 链 1（M146-1-1）：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSLNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPPTFGAGTKLE
LKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
CTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：104

> 链 2（M146-1-2）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL
IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG
GGTKLTVLGGGGSGGGGEFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMN
WVKQSNGKSLEWIGLINPKYGTTNYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLT
SEDSAVYYCAIDDYPAWFAYWGQGTLVTVSAGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO：105

示例性地，本披露采用 Format 2 构建的双特异性抗体具体氨基酸序列如下：

1. P3-C7 L7H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：91

> 链 2（Format 2-2）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI
GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG
GTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADG
SPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK
TVAPTEC

SEQ ID NO：92

> 链 3（P3-C7 L7H1-2-3）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRQAPGQGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
PPRAYGNYAGYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSC
QIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCR

ARNAHGEAFACLGLQVDAEA*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO：106

> 链 4（P3-C7 L7H1-2-4）：

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSN**Q**NTYLHWYLQKPGQSPQ LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS**R**TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFG GGTKVEIKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGR KIHSQEQGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRS I

SEQ ID NO：107

2. M81-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（M81-2-3）：

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDHNMNWVKQSNGKSLEWI GVMNPKFGTINYNQKFKDKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCVRDD YPNYFDYWGQGTTLTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVG NPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARN AHGEAFACLGLQVDAEA*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO：108

> 链 4（M81-2-4）：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRT SNLASGVSARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHDYPPTFGGGTKL EIKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE QGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：109

3. 81 L1H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L1H1-2-3）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHNMNWVKQAPGQRLEW
MGVMNPKFGTINYNQKFKDKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPNYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIV
GNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRAR
NAHGEAFACLGLQVDAEA*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT*
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSC
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：110

> 链 4（81 L1H1-2-4）：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVNYMYWYQQKPGQAPKSWIYRT
SNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQYHDYPPTFGGGTKVE
IKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：111

4. 81 L2H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L2H1-2-3，同 81 L1H1-2-3，SEQ ID NO：110）

> 链 4（81 L2H1-2-4）：

EIVLTQSPDFQSVTPGEKVTITCSASSSVNYMYWYQQKPDQSPKSWIYRT
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDAATYYCQQYHDYPPTFGGGTKV
EIKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE
QGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：112

5. 81 L3H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L3H1-2-3，同 81 L1H1-2-3，SEQ ID NO：110）

> 链 4（81 L3H1-2-4）：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI

KGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：113

6. 81 L3H1-2 (N103QN106Q) 的全长序列

> 链 1（Format 2-1 (N103QN106Q)）

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR
HGQFGQSYISYWAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：242

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L3H1-2-3，同 81 L1H1-2-3，SEQ ID NO：110）

> 链 4（81 L3H1-2-4，SEQ ID NO：113）：

6. 81 L4H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L4H1-2-3，同 81 L1H1-2-3，SEQ ID NO：110）

> 链 4（81 L4H1-2-4）：

DIQLTQSPSFLSAS**P**GDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPG**SS**PK**SW**IYRTS
N**D**ASGVPSRFSGSGSGTE**Y**TLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI
KGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：114

7. 81 L5H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L5H1-2-3，同 81 L1H1-2-3，SEQ ID NO：110）

> 链 4（81 L5H1-2-4）：

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLAQGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVEI
KGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：115

8. 81 L6H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（81 L6H1-2-3，同 81 L1H1-2-3，SEQ ID NO：110）

> 链 4（81 L6H1-2-4）

DIQLTQSPSFLSASPGDRVTITCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRT
QNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYHDYPPTFGGGTKVE
IKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：116

9. M146-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（M146-2-3）：

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIG
LINPKYGTTNYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAIDDYP
AWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNP
FPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAH
GEAFACLGLQVDAEA*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT*
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：117

> 链 4（M146-2-4）：

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSLNYMYWYQQKPGSSPKSWIYRTS
NLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPPTFGAGTKLE
LKGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE

QGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：118

10. 146 L1H1-2 的全长序列

> 链 1（Format 2-1，SEQ ID NO：91）

> 链 2（Format 2-2，SEQ ID NO：92）

> 链 3（146 L1H1-2-3）：

EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMNWVRQAPGQRLEW
MGLINPKYGTTNYNQKFKGRVTLTVDQSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPAWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIV
GNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRAR
NAHGEAFACLGLQVDAEA*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT*
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSC
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：119

> 链 4（146 L1H1-2-4）：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSLNYMYWYQQKPGSSPRPWIYRTS
QLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQYHSYPPTFGGGTKVEI
KGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：120

示例性地，本披露采用 Format 3 构建的双特异性抗体具体氨基酸序列如下：

1. P3-C7 L7H1-3 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L7H1-3-1）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRQAPGQGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARP
PRAYGNYAGYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQ
IVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRA
RNAHGEAFACLGLQVDAEADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE
MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：121

> 链 2（P3-C7 L7H1-3-2，同 P3-C7 L7H1-2-4，SEQ ID NO：107）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2；SEQ ID NO：92）

2. 81 L1H1-3 的全长序列

> 链 1（81 L1H1-3-1）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHNMNWVKQAPGQRLEW
MGVMNPKFGTINYNQKFKDKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPNYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIV
GNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRAR
NAHGEAFACLGLQVDAEADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM
TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：122

> 链 2（81 L1H1-3-2，同 81 L1H1-2-4，SEQ ID NO：111）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2，SEQ ID NO：92）

3. 81 L2H1-3 的全长序列

> 链 1（81 L2H1-3-1，同 81 L1H1-3-1，SEQ ID NO：122）

> 链 2（81 L2H1-3-2，同 81 L2H1-2-4，SEQ ID NO：112）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2，SEQ ID NO：92）

4. 81 L3H1-3 的全长序列

> 链 1（81 L3H1-3-1，同 81 L1H1-3-1，SEQ ID NO：122）

> 链 2（81 L3H1-3-2，同 81 L3H1-2-4，SEQ ID NO：113）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2，SEQ ID NO：92）

5. 81 L4H1-3 的全长序列

> 链 1（81 L4H1-3-1，同 81 L1H1-3-1，SEQ ID NO：122）

> 链 2（81 L4H1-3-2，同 81 L4H1-2-4，SEQ ID NO：114）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2；SEQ ID NO：92）

6. 81 L5H1-3 的全长序列

> 链 1（81 L5H1-3-1，同 81 L1H1-3-1，SEQ ID NO：122）

> 链 2（81 L5H1-3-2，同 81 L5H1-2-4，SEQ ID NO：115）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2；SEQ ID NO：92）

7. 81 L6H1-3 的全长序列

> 链 1（81 L6H1-3-1，同 81 L1H1-3-1，SEQ ID NO：122）

> 链 2（81 L6H1-3-2，同 81 L6H1-2-4，SEQ ID NO：116）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2，SEQ ID NO：92）

8. 146 L1H1-3 的全长序列

> 链 1（146 L1H1-3-1）：

EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMNWVRQAPGQRLEW
MGLINPKYGTTNYNQKFKGRVTLTVDQSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
NYPAWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIV
GNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRAR
NAHGEAFACLGLQVDAEADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM
TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：123

> 链 2（146 L1H1-3-2，同 146 L1H1-2-4，SEQ ID NO：120）

> 链 3（Format 3-3，SEQ ID NO：93）

> 链 4（Format 3-4，同 Format 2-2，SEQ ID NO：92）

示例性地，本披露采用 Format 4 构建的双特异性抗体具体氨基酸序列如下：

1. P3-C7 L7H1-4 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L7H1-4-1）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRQAPGQGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARP
PRAYGNYAGYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF*
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
*TKVDKKVEPKSC*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQA
PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED
TAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFL

APGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV
LGGG*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP*
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO：124

> 链 2（P3-C7 L7H1-4-2，同 P3-C7 L7H1 轻链，SEQ ID NO：65）

2. P3-C7 L8H1-4 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L8H1-4-1，同 P3-C7 L7H1-4-1，SEQ ID NO：124）

> 链 2（P3-C7 L8H1-4-2，同 P3-C7 L8H1 轻链，SEQ ID NO：66）

本披露示例性采用 Format 5 构建的双特异性抗体具体氨基酸序列如下：

1. P3-C7 L7H1-5 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L7H1-5-1）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYIHWVRQAPGQGLEW
MGVINPYNDGATYNQKFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARP
PRAYGNYAGYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF*
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
*TKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN
KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA
YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSSG
APRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQ
DGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEA*DKTHTCPPC*
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：125

> 链 2（P3-C7 L7H1-5-2，同 P3-C7 L7H1 轻链，SEQ ID NO：65）

> 链 3（Format 5-3，SEQ ID NO：98）

2. P3-C7 L8H1-5 的全长序列

> 链 1（P3-C7 L8H1-5-1，同 P3-C7 L7H1-5-1，SEQ ID NO：125）

> 链 2（P3-C7 L8H1-5-2，同 P3-C7 L8H1 轻链，SEQ ID NO：66）

> 链 3（Format 5-3，SEQ ID NO：98）

此外，本披露也使用了 GUCY2C-CD3 双特异性抗体 GUCY2c-1608（本披露中命名为 1608-BsAb），参考专利 WO2019224716A2 制备，其具有 DIABODY 结构，完整分子包含两条链，具体如下：

> 链 1（GUCY2c-1608 -Knob 序列）：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDYYGSSLLQWYQQKPGKAPKL LIYAASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTRKAYTFGQG TKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWV RQAPGKGLEWVAFIRNQARGYTSDHNPSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDRPSYYVLDYWGQGTTVTVSSG*CPPCPAPEAAGAPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO：126

> 链 2（GUCY2c-1608 -Hole 序列）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTSSQSLFNVRSQKNYLAWYQQKPGKAP KLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCKQSYDLFTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQAPGKGLEWIGEIKPSNELTNVHEKFKDRFTISVDKAKNSAYLQMNSL RAEDTAVYYCTRTITTTEGYWFFDVWGQGTLVTVSSG*CPPCPAPEAAGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

SEQ ID NO：127

表 26. 1608-BsAb 的 CDR 序列

GUCY2C	HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO：128)
	HCDR2	EIKPSNELTNVHEKFKD (SEQ ID NO：129)
	HCDR3	TITTTEGYWFFDV (SEQ ID NO：130)
	LCDR1	RASESVDYYGSSLLQ (SEQ ID NO：131)
	LCDR2	AASKLAS (SEQ ID NO：132)
	LCDR3	QQTRKAYT (SEQ ID NO：133)
CD3	HCDR1	DYYMT (SEQ ID NO：134)
	HCDR2	FIRNQARGYTSDHNPSVKG (SEQ ID NO：135)
	HCDR3	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO：136)
	LCDR1	TSSQSLFNVRSQKNYLA (SEQ ID NO：137)

	LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO：138)
	LCDR3	KQSYDLFT (SEQ ID NO：139)

此外，本披露也使用了 EGFR-CD28 双特异性抗体 97H2L3OT-ZAL，参考专利 CN202210371538.8 制备，其序列具体如下：

表 27. EGFR-CD28 双特异性抗体 97H2L3OT-ZAL 的 CDR

	重链		轻链	
EGFR	HCDR1	TYGMH（SEQ ID NO：140）	LCDR1	RASQDISSALV（SEQ ID NO：143）
	HCDR2	VIWDDGSYKYYGDSVKG（SEQ ID NO：141）	LCDR2	DASSLES（SEQ ID NO：144）
	HCDR3	DGITMVRGVMKDYFDY（SEQ ID NO：142）	LCDR3	QQFNSYPLT（SEQ ID NO：145）
CD28	HCDR1	SYWIT（SEQ ID NO：146）	LCDR1	RASQDISNYLN（SEQ ID NO：149）
	HCDR2	DIYPGSGRTNYNEMFKN（SEQ ID NO：147）	LCDR2	YTSRLHS（SEQ ID NO：150）
	HCDR3	RHYGTGYESFDV（SEQ ID NO：148）	LCDR3	QQGNTLPWT（SEQ ID NO：151）

EGFR-VH：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO：152

EGFR-VL：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO：153

CD28-VH：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGSGRTNYNEMFKNRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRHYGTGYESFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：154

CD28-VL：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPDGTIKLLIYYT
SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVE
IK

SEQ ID NO：155

EGFR-CD28 双特异性抗体 97H2L3OT-ZAL 的全长序列：

>链 1：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYWITWVRQAPGQGLEW
MGDIYPGSGRTNYNEMFKNRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
RHYGTGYESFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASA
FTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLT
LRNEFGSDSATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：156

>链 2：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPDGTIKLLIYYT
SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVE
IKGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVT
AGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAE
A

SEQ ID NO：157

>链 3：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
DGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL
PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：158

>链 4：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDA
SSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

SEQ ID NO：159

此外，本披露也使用了 EGFR-CD28 双特异性抗体 129H4L1OT-ZAL 和 94H6L12-ZALOT，均参考专利 CN202210371538.8 制备，其序列具体如下：

表 28. EGFR-CD28 双特异性抗体 129H4L1OT-ZAL 的 CDR

	重链		轻链	
EGFR	HCDR1	TYGMH（SEQ ID NO：140）	LCDR1	RASQDISSALV（SEQ ID NO：143）
	HCDR2	VIWDDGSYKYYGDSVKG（SEQ ID NO：141）	LCDR2	DASSLES（SEQ ID NO：144）
	HCDR3	DGITMVRGVMKDYFDY（SEQ ID NO：142）	LCDR3	QQFNSYPLT（SEQ ID NO：145）
CD28	HCDR1	SHWIQ（SEQ ID NO：160）	LCDR1	RASQDISNYLN（SEQ ID NO：149）
	HCDR2	EIFPGSGSTHYNEKFKG（SEQ ID NO：161）	LCDR2	YTSRLHS（SEQ ID NO：150）
	HCDR3	LHYGTSYDAMDY（SEQ ID NO：162）	LCDR3	QQGYTLPRT（SEQ ID NO：163）

EGFR-VH（同 129H4L1OT-ZAL 的 EGFR-VH，SEQ ID NO：152）

EGFR-VL（同 129H4L1OT-ZAL 的 EGFR-VL，SEQ ID NO：153）

CD28-VH：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAPGYTFTSHWIQWVRQAPGQGLEW
MGEIFPGSGSTHYNEKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARL
HYGTSYDAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：164

CD28-VL：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYY
TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGYTLPRTFGGGTKV
EIK

SEQ ID NO：165

EGFR-CD28 双特异性抗体 129H4L1OT-ZAL 的全长序列：

>链 1（SEQ ID NO：166）：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAPGYTFTSHWIQWVRQAPGQGLEW
MGEIFPGSGSTHYNEKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARL
HYGTSYDAMDYWGQGTTVTVSSGGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASA
FTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLT
LRNEFGSDSATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT
KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>链 2（SEQ ID NO：167）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYY
TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGYTLPRTFGGGTKV
EIKGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVT
AGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAE
A

>链 3（同 97H2L3OT-ZAL 的链 3，SEQ ID NO：158）

>链 4（同 97H2L3OT-ZAL 的链 4，SEQ ID NO：159）

表 29. EGFR-CD28 双特异性抗体 94H6L12-ZALOT 的 CDR

	重链		轻链	
EGFR	HCDR1	TYGMH（SEQ ID NO：140）	LCDR1	RASQDISSALV（SEQ ID NO：143）
	HCDR2	VIWDDGSYKYYGDSVKG（SEQ ID NO：141）	LCDR2	DASSLES（SEQ ID NO：144）
	HCDR3	DGITMVRGVMKDYFDY（SEQ ID NO：142）	LCDR3	QQFNSYPLT（SEQ ID NO：145）
CD28	HCDR1	GYYMN（SEQ ID NO：168）	LCDR1	LASQTIGTWLA（SEQ ID NO：171）
	HCDR2	EINPSTGDTTYNQKFKA（SEQ ID NO：169）	LCDR2	AATTGAD（SEQ ID NO：172）
	HCDR3	PYYDLTPFLY（SEQ ID NO：170）	LCDR3	QQLYSTPYT（SEQ ID NO：173）

EGFR-VH（同 129H4L1OT-ZAL 的 EGFR-VH，SEQ ID NO：152）

EGFR-VL（同 129H4L1OT-ZAL 的 EGFR-VL，SEQ ID NO：153）

CD28-VH：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMNWVRQAPGQRLEW
MGEINPSTGDTTYNQKFKAKVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCASP
YYDLTPFLYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO：174

CD28-VL：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPKLLIYA
ATTGADGVPSRFSGSGSGTKFTLTISSLQPEDFATYYCQQLYSTPYTFGGGTK
VEIK

SEQ ID NO：175

EGFR-CD28 双特异性抗体 94H6L12-ZALOT 的全长序列：

>链 1：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMNWVRQAPGQRLEW
MGEINPSTGDTTYNQKFKAKVTLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPY
YDLTPFLYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：176

>链 2：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPKLLIYA
ATTGADGVPSRFSGSGSGTKFTLTISSLQPEDFATYYCQQLYSTPYTFGGGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO：177

>链 3：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
DGITMVRGVMKDYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVVSVGK
DATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDS
GQYVCRARNAHGEAFACLGLQVDAEADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：178

>链 4：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDA
SSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEI
KGGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ
GRFHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

SEQ ID NO：179

> IgG1Fc-Knob（L234A/L235A/S354C/T366W）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：248

> IgG1Fc-Hole（L234A/L235A/Y349C/T366S/L368A/Y407V）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：249

>连接子 8（SEQ ID NO：90）

测试例

测试例 1. 本披露 GUCY2C 单抗对抗原的亲和力

为测试本披露的 GUCY2C 单抗对 GUCY2C 的亲和力，本测试例用仪器 Biacore 8K 以及 Biacore T200 检测了抗体与 hGUCY2C-ECD-His(SEQ ID NO：3)的结合能力。具体方法如下：用偶联有抗人抗体的 Protein A 生物传感芯片亲和捕获抗体，然后于芯片表面流经含 GUCY2C 蛋白的溶液，用仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用 10 mM 甘氨酸-盐酸（pH 1.5)将生物传感芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 模型。本披露的 GUCY2C 单抗与相应抗原结合的亲和力数据如下表所示。

表 30-1.单抗与人 GUCY2C 抗原的结合作用

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
81 L3H1	1.81E+05	5.19E-05	0.29

146 L1H1	1.27E+05	1.17E-04	0.92

表 30-2.单抗与人 GUCY2C 抗原的结合作用

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
81 L2H2	2.74E+05	1.27E-04	0.46
81 L3H2	2.51E+05	1.03E-04	0.41
81 L4H2	2.12E+05	2.07E-04	0.98
81 L6H2	2.41E+05	1.14E-04	0.47
M81 CHI	2.16E+05	5.90E-05	0.27
M146 CHI	2.03E+05	9.22E-05	0.46

表 30-3.单抗与人 GUCY2C 抗原的结合作用

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
P3-C7 CHI	2.26E+04	1.49E-04	6.61
P3-C7 L1H1	2.37E+04	1.56E-04	6.55
P3-C7 L2H1	3.10E+04	1.66E-04	5.35
P3-C7 L3H1	2.84E+04	1.35E-03	47.50
P3-C7 L4H1	2.85E+04	2.09E-03	73.40
P3-C7 L5H1	2.69E+04	7.19E-04	26.70
P3-C7 L7H1	2.39E+04	1.86E-04	7.77

5

表 30-4.单抗与人 GUCY2C 抗原的结合作用

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
M42 CHI	3.73E+04	3.35E-04	8.99
M61 CHI	5.08E+04	2.28E-04	4.49
M64 CHI	1.71E+04	3.48E-04	20.40
M93 CHI	2.12E+04	3.60E-04	17.00

表 30-5.单抗与人 GUCY2C 抗原的结合作用

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
P1-D2 CHI	1.95E+05	1.80E-04	0.92
P1-D3 CHI	4.60E+04	2.33E-04	5.06
P1-C6 CHI	7.07E+04	1.81E-04	2.57
P1-D9 CHI	2.03E+04	3.99E-04	19.60
P1-F10 CHI	3.23E+04	2.79E-04	8.64
P2-C8 CHI	3.49E+04	1.78E-04	5.12
P2-B9 CHI	5.81E+04	1.75E-04	3.02
P3-D2 CHI	3.86E+04	1.73E-04	4.50

P3-B4 CHI	2.58E+04	2.14E-04	8.28
P3-E4 CHI	1.77E+04	2.28E-04	12.90
P3-F6 CHI	6.61E+03	2.45E-04	37.00
P3-D9 CHI	1.90E+04	5.04E-04	26.50

结果显示，本批露的 GUCY2C 单抗与人 GUCY2C 均具有较好的结合亲和力。

测试例 2. 抗 GUCY2C 单抗对细胞表面抗原的结合活性

本测试例用流式细胞术检测 GUCY2C 单抗对过表达人 GUCY2C 的稳转细胞株 HCT116/hGUCY2C、肠癌细胞 HT-55 和 T84 细胞表面的人 GUCY2C 的结合活性。具体如下：

于反应孔中加入 1% BSA 重悬过的 1E5 的细胞，离心后去上清。加入稀释好的对应浓度抗体，室温敷育 30 分钟，用 1% BSA 洗一次。然后加入 F(ab')2-山羊抗人 IgG Fc 二抗, PE（Cat.# H10104，Invitrogen）二抗，重悬后避光室温敷育 30 分钟。1% BSA 洗两次后使用流式细胞仪读取荧光信号值。示例性的 FACS 结果如图 2A 至图 2E 所示。

结果显示，本批露 GUCY2C 单抗与细胞表面的 GUCY2C 有较好的特异性结合，结合活性优于 1608。

测试例 3. 本披露的 GUCY2C 人源化抗体的非特异性结合作用

本测试例检测 GUCY2C 人源化抗体对非靶细胞（例如 T 细胞）的非特异性结合作用。具体如下：

实验一：采用流式细胞术，每孔加入 1% BSA 重悬过的 1E5 的 Jurkat 细胞（ATCC#TIB-152），离心后去上清。加入稀释好的对应浓度抗体，室温敷育 30 分钟，用 1% BSA 洗一次。然后加入 $F(ab')_2$-山羊抗人 IgG Fc 二抗，PE（Cat.# H10104，Invitrogen），重悬后避光室温敷育 30 分钟。1% BSA 洗两次后使用流式细胞仪读取荧光信号值。将抗体结合的平均荧光强度减去未孵育抗体的细胞的背景荧光强度即得到相对平均荧光强度值。结果如下表 31 所示。

表 31. GUCY2C 人源化单抗与 Jurkat 的结合作用

抗体	相对平均荧光强度值	
	100nM	25nM
P3-C7 L7H1	27	不结合
1608	1714	970
1608-BsAb	1352	613

结果显示，本批露 GUCY2C 人源化单抗与无 GUCY2C 表达的 Jurkat 细胞无非特异性结合；1608 与 Jurkat 细胞有明显结合。

实验二：采用流式细胞术检测本披露 GUCY2C 人源化单抗是否与人 PBMC 以及 PBMC 中的 CD3+ T 细胞有非特异性结合，每孔加入 1% BSA 重悬过的 3E5 的人外周血细胞，离心后去上清。加入稀释好的对应浓度抗体，室温敷育 30 分钟，用 1% BSA 洗一次。然后加入 PE-Cy7 抗人 CD3（BD#557851）和 APC 抗人 IgG Fc（BioLegend#409306）的二抗工作液，重悬后避光室温敷育 30 分钟。1% BSA 洗两次后使用流式细胞仪读取荧光信号值。将抗体结合的平均荧光强度减去未孵育抗体的细胞的背景荧光强度即得到相对平均荧光强度值。结果如下表 32 所示。

表 32. GUCY2C 人源化单抗与人 PBMC 的结合作用

抗体	相对平均荧光强度值			
	PBMC		$CD3^+$ T 细胞	
P3-C7 L7H1	1	不结合	3	不结合
1608	560	541	503	499

结果显示，本批露 GUCY2C 人源化单抗与无 GUCY2C 表达的 PBMC 以及 T 细胞无非特异性结合，对照抗体 1608 与 PBMC 以及 T 细胞有明显非特异性结合。本批露 GUCY2C 人源化单抗的靶点特异性优于 1608。

测试例 4. 本披露的 GUCY2C 单抗的表位分析

为测试本披露 GUCY2C 单抗对抗原结合的表位，采用 ELISA 方法检测抗体对抗原的结合表位的差异。具体如下：

将所测试单抗 100ng 包板 4℃过夜，洗板后用 1% BSA 封闭。然后加入 50ng hGUCY2C ECD-His 抗原 37℃敷育 1 小时，洗板，再分别加入生物素化的抗体 100ng 37℃敷育 1 小时，最后用 HRP-链霉亲和素进行信号检测。相对竞争系数=（抗体自竞争的信号值/他抗竞争的信号值）*100。表位完全一致的两个抗体在竞争结合中竞争系数为 100，表位相差越大的抗体其之间的竞争系数越小。具体如下表 33 所示：

表 33. GUCY2C 单抗对抗原的竞争性结合作用

竞争性结合 / 包被	1608-生物素化	P3-C7 L7H1-生物素化	81 L3H1-生物素化	146 L1H1-生物素化
	100ng	100ng	100ng	100ng
1608	100	3	6	12
P3-C7 L7H1	10	100	6	13
81 L3H1	11	3	100	81
146 L1H1	12	4	99	100

结果显示，所披露 GUCY2C 单抗所结合的抗原表位与 1608 相差较大，不能

与其竞争性地结合 GUCY2C 抗原。

测试例 5. GUCY2C-CD3 双特异抗体对抗原的蛋白结合活性

本测试例用 ELISA 方法检测 GUCY2C-CD3 双抗对人 GUCY2C 的结合活性。具体如下：

将反应孔中加入 100ng 链霉亲和素（ACRO#STN-N5116），4℃包板过夜。1% BSA（PBS）封闭后加入 100ng hGUCY2C ECD-His 37℃孵育 1 小时。洗板后加入稀释后的梯度抗体，37℃孵育 1 小时。然后加入 Peroxidase AffiniPure 山羊抗人 IgG (H+L)（Cat.#109-035-003，Jackson ImmunoResearch），37℃孵育 1 小时。洗板后加入显色液，显色充分后加入终止液终止反应。酶标仪 450nM 读取信号值。抗体的结合活性如下表 34 所示。

表 34. GUCY2C-CD3 双特异性抗体与人 GUCY2C 蛋白的结合活性（吸光值）

抗体	Top	EC_{50} (nM)
P3-C7 L7H1-1	2.402	0.37
81 L3H1-2	2.334	0.12
146 L1H1-2	2.353	0.06
1608-BsAb	2.153	1.23

结果显示，本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体与人 GUCY2C 蛋白有良好结合作用。

测试例 6. GUCY2C-CD3 双特异抗体对细胞表面抗原的结合活性

本测试例用流式细胞术检测 GUCY2C-CD3 双抗对过表达人 GUCY2C 的稳转细胞株 HCT116/hGUCY2C 和肠癌细胞 HT55（南京科佰#CBP60012）以及表达 CD3 的 Jurkat 细胞（ATCC#TIB-152）的结合活性。HCT116/hGUCY2C 细胞和肠癌细胞 HT55 中的 GUCY2C 表达量分别为高表达(++++)和中度表达(++)。具体如下：

实验一：于反应孔中加入 1% BSA 重悬过的 1E5 的细胞，离心后去上清。加入稀释好的对应浓度抗体，室温孵育 30 分钟，用 1% BSA 洗两次。然后加入 1：400 稀释好的 山羊抗人 IgG(γ) R-PE conjugate F(ab') 二抗（life technologies #H10104），重悬后避光室温敷育 30 分钟。1% BSA 洗两次后使用流式细胞仪读取荧光信号值。示例性的 FACS 结果如图 3A-3B 所示。

结果显示，本批露 GUCY2C-CD3 双抗对表达 GUCY2C 不同水平的细胞均有较好的特异性结合活性，结合活性优于 1608-BsAb。

实验二：采用与实验一相同的方法。抗体与 Jurkat 细胞结合活性如图 3C 所示。

结果显示，本批露 GUCY2C-CD3 双抗对表达 Jurkat 的细胞有较好的特异性结合活性，且其结合活性优于 1608-BsAb。

测试例 7. GUCY2C-CD3 双特异性抗体对 T 细胞的激活

为测试本披露 GUCY2C-CD3 双特异性抗体在靶细胞 HCT116/GUCY2C 和 LS1034 细胞的共同作用下，对 T 细胞的激活情况。本测试例用 Jurkat-Lucia™ NFAT (InvivoGen，jktl-nfat)用于细胞检测。方法如下：

Jurkat Lucia™ NFAT 细胞和靶细胞分别在完全培养基及对应的培养基中传代培养，离心收集 Jurkat-NFAT lum 细胞集，使用 1640+10%FBS 的培养基重悬计数，调整细胞数为 1E6 细胞/mL；将靶细胞 HCT116/GUCY2C 和 LS1034 细胞重悬、计数后，分别调整细胞数至 2E5 细胞/mL 和 4E5 细胞/mL。将上述 Jurkat Lucia™ NFAT 和靶细胞按照等体积混合，每孔加入 100 μL，确保 HCT116/GUCY2C 和 LS1034 细胞 E:T 比值为 5:1 和 2.5:1。抗体用 1640+10% FBS 培养基稀释，向细胞孔中加入 20 μL，37℃放置 5 小时后。按照说明书的要求，用 25 mL 的 ddH_2O 溶解 QUANTI-Luc™ Gold 试剂。加入 50μL QUANTI-Luc™ Gold，室温孵育 5 分钟后，用 Vendor 检测发光，计算抗体在不同浓度下对 Jurkat Lucia™ NFAT 细胞的激活作用。采用抗体作用后的 Lumin 值除以背景 Lumin 值的相对倍数做曲线图。其相对倍数值及 EC_{50} 结果见图 4A-图 4B。

结果显示，本批露的 GUCY2C-CD3 双抗与靶细胞共同作用，对 T 细胞具有较好的激活作用，其激活作用优于 1608-BsAb。

测试例 8. 本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体的细胞毒活性

本测试例研究了本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体作为 T 细胞衔接分子对肿瘤细胞的杀伤活性。具体如下：

用表达 GUCY2C 的肠癌细胞株 LS1034、HT-55 和 LS174T（ATCC#CL-188）构建的 LucG 稳转细胞株，分别作为高表达、中度表达和低表达的靶细胞来检测本披露的双特异性抗体的靶点特异性细胞毒活性。冻存 PBMC（购自妙顺生物公司）复苏后用 1640+10% FBS 完全培养基重悬，置于 T75 培养瓶培养 4 小时（密度为 2E6 细胞/mL）。PBMC 收集离心后用 1640+10% FBS 重悬、计数，调整细胞数为 1.5E6 细胞/mL。收集靶细胞，1000 rpm 离心 3 分钟，重悬、计数，调整细胞浓度至 1.5E5 细胞/mL。将上述 PBMC 悬液和靶细胞悬液按照等体积混合，每孔加入 100 μL 确保 E:T Ratio 为 10:1。另外设置 PBMC ONLY 组，将上述 PBMC 悬液和 1640+10% FBS 完全培养基按照等体积混合。抗体用 1640+10% FBS 培养基稀释，起始浓度为 600 nM (6x 终浓度)，5 倍稀释，9 个剂量点，每孔加入 20 μL。将处理好的细胞放在 37°C，5% CO_2 的培养箱培养 48 小时后进行发光检测。使用 Graphpad Prism8.0 软件根据抗体的对数浓度和信号值做出量效曲线图，拟

合得出抗体介导杀伤的最大抑制率（Imax）和 IC_{50}。将只有靶细胞、PBMC 不加抗体的孔设为 0%抑制，计算抗体的最大抑制率。结果见下表 35-1、35-2 和 35-3。

表 35-1. GUCY2C-CD3 双特异性抗体对靶细胞的细胞毒活性

抗体	LS1034(+++)		HT-55(++)		LS174T(+)	
	Imax (%)	IC_{50} (nM)	Imax (%)	IC_{50} (nM)	Imax (%)	IC_{50} (nM)
P3-C7 L7H1-1	87	0.75	39	0.85	65	0.75
P3-C7 L8H1-1	86	0.17	41	0.60	62	0.33
81 L3H1-2	92	0.31	47	0.39	67	0.58
146 L1H1-2	87	0.17	46	0.56	69	0.49

注：+表示 GUCY2C 的表达量，其中+越高，表示 GUCY2C 的表达量高。

表 35-2. GUCY2C-CD3 双特异性抗体对靶细胞的细胞毒活性

抗体	LS174T	
	Max (%)	IC50 (nM)
P3-C7 L7H1-3	92	0.49

表 35-3. GUCY2C-CD3 双特异性抗体对靶细胞的细胞毒活性

抗体	LS174T	
	Max (%)	IC_{50} (nM)
81 L3H1-2 (N103QN106Q)	82	0.16

结果显示，本批露 GUCY2C-CD3 双特异性抗体对不同表达量的靶细胞均有较好的细胞毒活性。

测试例 9. 本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体细胞因子的释放

本测试例检测了在 GUCY2C-CD3 双抗和靶细胞（测试例 8 中的 LS1034 细胞和 LS174T 细胞）的共同作用下，PBMC 中细胞因子 IFN-γ 及 IL-6 分泌的变化。

将细胞杀伤实验中（测试例 8）收集的冻存于-20 冰箱的上清，常温解冻，震荡混匀，样品使用 1640+4%FBS 培养基稀释 20 倍备用。使用无菌水溶解 IL-6 及 IFN-γ 标准品粉末，使用 1640+4% FBS 培养基稀释标准品至需要的浓度。取出要检测的细胞因子的试剂盒，包括人 IL6 ELISA 试剂盒（欣博盛生物科技有限公司，EHC007.96）和人 IFN-γ 试剂盒（CISBIO，62HIFNGPEG），平衡试剂盒至常温，按照说明书操作检测。结果见图 5A-5C 和图 6A-6C。

结果显示，本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体能够有效诱导与细胞毒活性相关的 IFN-γ 的释放，且与炎症相关的细胞因子 IL-6 的释放水平相对较低。

体内活性生物学评价

测试例 10. 本披露的 GUCY2C-CD3 双特异性抗体在 LS1034 皮下移植瘤模型中的药效

本披露使用人结肠癌细胞 LS1034 小鼠皮下移植瘤模型，对 GUCY2C-CD3 双特异性抗体的体内药效进行评价。

雌性 NOG 小鼠，购自北京维通利华上海分公司。购入时 6-8 周龄。本测试例所使用的人 PBMCs 来自于妙顺生物商业购买。

将 LS1034 细胞 1×10^6 细胞/只/200 μL（含 50% 基底膜基质）接种于 NOG 小鼠右肋部皮下，接种后次日将复苏后状态良好的人 PBMCs 以 5×10^6 细胞/只/100 μL 注射到 NOG 小鼠腹腔，当荷瘤小鼠肿瘤体积达到 150 mm^3 左右时，去除体积过大过小、体重过小的小鼠，随机分组，每组 8 只。将分组当天定义为该实验第 0 天，第 0 天开始腹腔注射各等摩尔量的抗体，每周 2 次，共给药两至三周。每周 2 次监测肿瘤体积、动物重量并记录数据。当实验动物肿瘤体积超过 1000 mm^3 或多数肿瘤出现破溃或体重下降 20%时，将荷瘤动物进行安乐死作为实验终点。

肿瘤体积（V）计算公式为：$V=1/2\times a\times b^2$，其中 a、b 分别表示长、宽。

相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)\times100\%$，其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积；T_0、C_0 为实验开始时的肿瘤体积。

抑瘤率 TGI(%)=1- T/C(%)。

表 36-1. GUCY2C-CD3 双特异性抗体的抗肿瘤活性

组别	第 0 天 平均值±SEM (mm^3)	第 21 天 平均值±SEM (mm^3)	TGI (%)
溶媒对照	140.5±9.7	1327.6±103.5	-
P3-C7 L7H1-1（0.3 mpk）	140.5±11.8	123.2±15.7***	> 100%
P3-C7 L7H1-1（0.06 mpk）	138.3±10.8	363.5±52***	81.03%
P3-C7 L7H1-4（0.12 mpk）	138.4±11.7	160.1±25.5***	98.17%
P3-C7 L7H1-5（0.12 mpk）	139.1±9.8	321.6±157.3***	84.63%

注：*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 溶媒对照，T 检验。

表 36-2. GUCY2C-CD3 双特异性抗体的抗肿瘤活性

组别	第 0 天 平均值±SEM (mm^3)	第 21 天 平均值±SEM (mm^3)	TGI (%)
溶媒对照	159±15.3	921.7±80.4	-
P3-C7 L8H1-1（0.2 mpk）	158.7±15.9	77.4±15.9***	> 100%
P3-C7 L8H1-1（0.05 mpk）	158.4±15.0	422.4±96.3**	65.39%
81 L3H1-2（0.3 mpk）	158.4±13.7	94.5±8.26***	> 100%

81 L3H1-2（0.075 mpk）	160.8±15.2	135.2±10.4***	> 100%

注：*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 溶媒对照，T 检验。

结果显示，本披露 GUCY2C-CD3 双抗对该模型有明显肿瘤抑制作用。

测试例 11. 本披露的双特异性抗体在 LS174T 皮下移植瘤模型中的药效

本披露使用人结肠癌细胞 LS174T 小鼠皮下移植瘤模型，对 GUCY2C-CD3 双特异性抗体的体内药效进行评价。

雌性 NOG 小鼠，购自北京维通利华上海分公司。购入时 6-8 周龄。本测试例所使用的人 PBMCs 来自于妙顺生物商业购买。

将 LS174T 细胞 1×10^6 细胞/只/100 μL 与冻存复苏后的 PBMC 混合后（E:T=1:1）接种于 NOG 小鼠右肋部皮下。当荷瘤小鼠肿瘤体积达到 150 mm^3 左右时，去除瘤体积过大过小和体重过小的小鼠，随机分组，每组 8 只。将分组当天定义为该实验第 0 天，并于第 0 天、第 3 天、第 7 天和 第 10 天腹腔注射各抗体，共给药 4~5 次，每周 2 次监测肿瘤体积、动物重量并记录数据。当实验动物肿瘤体积超过 1000 mm^3 或多数肿瘤出现破溃或体重下降 20%时，将荷瘤动物进行安乐死作为实验终点。

表 37-1. GUCY2C-CD3 双特异性抗体的抗肿瘤活性

组别	第 0 天 平均值±SEM (mm^3)	第 14 天 平均值±SEM (mm^3)
溶媒对照	193.4±21.9	-
P3-C7 L7H1-1（0.5 mpk）	193.7±20.9	481.5±76.5
1608-BsAb（0.5 mpk）	194.4±23.5	809.9±227

注：*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 溶媒对照，T 检验。

表 37-2. GUCY2C-CD3 双特异性抗体的抗肿瘤活性

组别	第 0 天 平均值±SEM (mm^3)	Day13 平均值±SEM (mm^3)
溶媒对照	181.0±13.8	1506.3±237.3
81 L3H1-2（0.75 mpk）	180.2±15.7	377.2±70.5***
81 L3H1-2（0.375 mpk）	181.1±14.7	346.2±63.8***
81 L3H1-2（0.188 mpk）	181.1±14.9	415.1±92.5***

注：*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 溶媒对照，T 检验。

结果显示，本披露 GUCY2C-CD3 双抗对该模型有明显肿瘤抑制作用。实验期间瘤重数据与瘤体积趋势基本相符。

测试例 12. GUCY2C-CD3 双抗与 EGFR-CD28 双抗联用的抗肿瘤活性

本披露使用 LS174T 皮下瘤模型研究 GUCY2C-CD3 双抗与 EGFR-CD28 双抗（97H2L3OT-ZAL，参考专利 CN202210371538.8 制备）联用的抗肿瘤活性的作用。

雌性 NOG 小鼠，购自北京维通利华上海分公司。购入时 6-8 周龄。本测试例所使用的人 PBMCs 来自于妙顺生物商业购买。

将 LS174T 细胞 1×10^6 细胞/只/100 μL 与冻存复苏后的 PBMC 混合后（E:T=1:1）接种于 NOG 小鼠右肋部皮下。当荷瘤小鼠肿瘤体积达到 150 mm^3 左右时，去除瘤体积过大过小和体重过小的小鼠，随机分组，每组 8 只。将分组当天定义为该实验第 0 天，并于第 0 天、第 3 天、第 7 天和 第 11 天腹腔注射各抗体，共给药 4 次，其中联用组药物为分别配制后同时给药，每周 2 次监测肿瘤体积、动物重量并记录数据。当实验动物肿瘤体积超过 1000 mm^3 或多数肿瘤出现破溃或体重下降 20%时，将荷瘤动物进行安乐死作为实验终点。具体结果如下表 38。

表 38. GUCY2C-CD3 双抗联用 EGFR-CD28 双抗的抗肿瘤活性

组别	第 0 天 平均值±SEM (mm^3)	Day13 平均值±SEM (mm^3)	TGI (%)
溶媒对照	181.0±13.8	1506.3±237.3	-
P3-C7 L7H1-1（0.25 mpk）	181.4±15.7	520.5±91.3**	74.41%
81 L3H1-2（0.188 mpk）	181.1±14.9	415.1±92.5***	82.34%
97H2L3OT-ZAL（2.5 mpk）	180.8±13.7	742.3±104.9*	57.63%
P3-C7 L7H1-1（0.25 mpk）+ 97H2L3OT-ZAL（2.5 mpk）	180.5±12.3	241.3±95.2***	95.41%
81 L3H1-2（0.188 mpk）+ 97H2L3OT-ZAL（2.5 mpk）	181.0±12.2	195.5±34.4***	98.91%

注：*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 溶媒对照，T 检验。

结果显示，本披露 EGFR-CD28 双抗与 GUCY2C-CD3 双抗联用能有效提高各自单药的药效。

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本披露的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书

1. 一种特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合分子，其包含至少一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和至少一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块包含重链可变区 GUCY2C-VH 和轻链可变区 GUCY2C-VL，所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块包含重链可变区 CD3-VH 和轻链可变区 CD3-VL；其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2 和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 或 6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8、28、29 或 30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 或 12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 或 8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：250 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：251 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：252 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：253 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：254 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：255 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：256 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：257 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：258 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：259 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：260 的氨基酸

序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：262 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：263 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：266 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：267 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：268 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：269 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：270 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：271 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：272 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：281 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：282 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：283 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：284 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：285 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：288 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：289 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：290 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：291 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：292 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：293 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：294 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：295 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：296 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：297 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：298 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ

ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：301 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：303 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：304 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：305 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：306 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：128 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：307 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：308 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：309 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：310 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：311 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：312 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：313 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：314 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：315 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：316 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：317 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：318 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：319 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：320 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-

VL 具有：包含 SEQ ID NO：321 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：322 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：323 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：324 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：325 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：326 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：327 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：328 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：329 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；

优选地，

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗原结合分子，其中：

所述 CD3-VH 具有：包含 SEQ ID NO：71 的氨基酸序列的 CD3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：72 的氨基酸序列的 CD3-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：73 或 88 的氨基酸序列的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：74 的氨基酸序列的 CD3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：75 的氨基酸序列的 CD3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：76 的氨基酸序列的 CD3-LCDR3；

优选地，所述 CD3-VH 具有：包含 SEQ ID NO：71 的氨基酸序列的 CD3-HCDR1，包含 SEQ ID NO：72 的氨基酸序列的 CD3-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：73 的氨基酸序列的 CD3-HCDR3；和所述 CD3-VL 具有：包含 SEQ ID NO：74 的氨基酸序列的 CD3-LCDR1，包含 SEQ ID NO：75 的氨基酸序列的 CD3-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：76 的氨基酸序列的 CD3-LCDR3。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗原结合分子，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56、25 或 57 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、26、48、49、50、51、52 或 53 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37、15 或 38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、16、31、32、34、35 或 36 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 或 17 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 或 18 的氨基酸序列；

优选地，

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、48、49、50、51 或 52 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列，或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、32、34 或 36 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列，或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-

VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列，或

更优选地：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗原结合分子，其中：

所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 或 89 的氨基酸序列，和所述 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；

优选地，

所述 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗原结合分子，其中所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块或所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；

优选地，

所述 Titin 链包含选自由 SEQ ID NO：182 至 SEQ ID NO：200 组成的组的氨基酸序列，所述 Obscurin 链包含选自由 SEQ ID NO：201 至 SEQ ID NO：241 组成的组的氨基酸序列；

更优选地，

所述 Titin 链包含 SEQ ID NO：198 的氨基酸序列，所述 Obscurin 链包含 SEQ ID NO：236 的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区优选为 IgG Fc 区，进一步优选为 IgG1 Fc 区；

更优选地，所述 Fc 区包含一个或多个能够减少 Fc 区与 Fcγ 受体结合的氨基酸取代；

最优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 Fc 区，并且在 234 和 235 位置的氨基酸为 A，编号依据为 EU 索引。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含 Fc 区，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 和 Fc2 各自独立地具有一个或多个减少 Fc 区同源二聚化的氨基酸取代；

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

更优选地，所述 Fc1 在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 366 位置的氨基酸为 S，在 368 位置的氨基酸为 A，和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引；

最优选地，所述 Fc1 包含 SEQ ID NO：79 或 85 的氨基酸序列；所述 Fc2 包含 SEQ ID NO：80 或 86 的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合模块均是 scFv；

优选地，

所述抗原结合分子包含一条具有式(a)所示结构的第一链和一条具有式(b)所示结构的第二链，

(a) [GUCY2C-VL]-[连接子 1]-[CD3-VH]-[连接子 2]- [Fc1]，

(b) [CD3-VL]-[连接子 3]-[GUCY2C-VH]-[连接子 2]-[Fc2]，

其中：所述连接子 1、连接子 2 和连接子 3 是相同或不同的肽连接子；或连接子 1、连接子 2 和连接子 3 不存在；

式(a)和(b)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

更优选地，其中：

i) 所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

ii) 所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；或

iii) 所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；并且所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；

最优选地，

i) 所述抗原结合分子具有：

一条包含 SEQ ID NO：99 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：100 的氨基酸序列的第二链；或

一条包含 SEQ ID NO：101 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：100 的氨基酸序列的第二链；或

ii) 所述抗原结合分子具有：

一条包含 SEQ ID NO：102 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：103 的氨基酸序列的第二链；或

iii) 所述抗原结合分子具有：

一条包含 SEQ ID NO：104 的氨基酸序列的第一链和一条包含 SEQ ID NO：105 的氨基酸序列的第二链。

9. 根据权利要求 7 所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块和一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块是 Fab；所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；

优选地，

所述抗原结合分子包含一条具有式(c)所示结构的第一链、一条具有式(d)所示结构的第二链、一条具有式(e)所示结构的第三链和一条具有式(f)所示结构的第四链，

(c) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

(e) [GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(f) [GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 4 是肽连接子；或连接子 4 不存在；

式(c)、(d)、(e)和(f)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

更优选地，其中：

i) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；

或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：89 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：31 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：32 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：34 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：35 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：36 的氨基酸序列；或

ii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

iii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：

42 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；

最优选地，

所述抗原结合分子具有：

i) 一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：242 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：108 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：109 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：111 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：112 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：114 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：115 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：110 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：116 的氨基酸序列的第四链；或

ii) 一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：106 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：107 的氨基酸序列的第四链；或

iii) 一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：

92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：119 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：120 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：91 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：117 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：118 的氨基酸序列的第四链。

10. 根据权利要求 7 所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含一个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和一个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块是 Fab；

优选地，

所述抗原结合分子包含一条具有式(g)所示结构的第一链、一条具有式(f)所示结构的第二链、一条具有式(h)所示结构的第三链和一条具有式(d)所示结构的第四链，

(g) [GUCY2C-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc1]，

(f) [GUCY2C-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

(h) [CD3-VH]-[CH1]-[Fc2]，

(d) [CD3-VL]-[CL]，

其中：所述连接子 4 是肽连接子；或连接子 4 不存在；

式(g)、(f)、(h)和(d)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

更优选地，其中：

i) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

ii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：31 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：32 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：

37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：34 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：35 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：36 的氨基酸序列；或

iii) 所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列；

最优选地，

所述抗原结合分子具有：

i) 一条包含 SEQ ID NO：121 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：107 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

ii) 一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：111 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：112 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：113 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：114 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：

115 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

一条包含 SEQ ID NO：122 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：116 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链；或

iii) 一条包含 SEQ ID NO：123 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：120 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：93 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：92 的氨基酸序列的第四链。

11. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含两个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和两个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 和 CD3 的抗原结合模块均是 scFv；

优选地，

所述抗原结合分子包含两条具有式(i)所示结构的第一链和两条具有式(j)所示结构的第二链，

(i) [GUCY2C-VH]-[CH1]-[CD3-VH]-[连接子 5]-[CD3-VL]-[连接子 6]-[Fc 区的一个亚基]，

(j) [GUCY2C-VL]-[CL]，

其中：所述连接子 5 和连接子 6 是肽连接子；或连接子 5 和连接子 6 不存在；

式(i)和(j)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

更优选地，其中：

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；

最优选地，

所述抗原结合分子具有：

两条包含 SEQ ID NO：124 的氨基酸序列的第一链和两条包含 SEQ ID NO：65 的氨基酸序列的第二链；或

两条包含 SEQ ID NO：124 的氨基酸序列的第一链和两条包含 SEQ ID NO：66 的氨基酸序列的第二链。

12. 根据权利要求 7 所述的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含两个特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块和两个特异性结合 CD3 的抗原结合模块，所述特异性结合 GUCY2C 的抗原结合模块是 Fab；所述特异性结合 CD3 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；

优选地，

所述抗原结合分子包含两条具有式(k)所示结构的第一链、两条具有式(j)所示结构的第二链和两条具有式(l)所示结构的第三链，

(k) [GUCY2C-VH]-[CH1]-[连接子 7]-[CD3-VH]-[连接子 4]-[Obscurin 链]-[Fc 区的一个亚基]，

(j) [GUCY2C-VL]-[CL]，

(l) [CD3-VL]-[连接子 4]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 4 和连接子 7 是肽连接子；或连接子 4 和连接子 7 不存在；

式(k)、(j)和(l)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

更优选地，其中：

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述的 CD3-VH 包含 SEQ ID NO：77 的氨基酸序列，和所述的 CD3-VL 包含 SEQ ID NO：78 的氨基酸序列；并且所述的 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述的 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；

最优选地，

所述抗原结合分子具有：

两条包含 SEQ ID NO：125 的氨基酸序列的第一链，两条包含 SEQ ID NO：65 的氨基酸序列的第二链和两条包含 SEQ ID NO：98 的氨基酸序列的第三链；或

两条包含 SEQ ID NO：125 的氨基酸序列的第一链，两条包含 SEQ ID NO：66 的氨基酸序列的第二链和两条包含 SEQ ID NO：98 的氨基酸序列的第三链。

13. 一种抗 GUCY2C 抗体，其能够特异性结合 GUCY2C，所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链可变区 GUCY2C-VH 和轻链可变区 GUCY2C-VL，其中：

(i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ

ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47、22、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

(ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 或 6 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8、28、29 或 30 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 或 12 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 或 8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：250 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：251 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：252 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：253 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：254 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：255 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：256 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：257 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：258 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：259 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：260 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：262 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：263 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：266 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：267 的氨基酸序列的

GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：268 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：269 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：270 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：271 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：272 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：281 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：282 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：283 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：284 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：285 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：288 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：289 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：290 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：291 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：292 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：293 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：294 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：295 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：296 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：297 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：298 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：301 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：303 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：299 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：304 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：305 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：306 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：128 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：307 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：308 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：309 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：310 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：311 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：312 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：313 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：314 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：315 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：286 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：287 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：316 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：317 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：265 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：318 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：319 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：320 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：321 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：322 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：323 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：324 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：325 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：326 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：22 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：327 的氨基酸

序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：261 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：328 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：302 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：264 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：329 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：300 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；

优选地，

i) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：19 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：20 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：21 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：47 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：23 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：24 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：27 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：9 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 具有：包含 SEQ ID NO：10 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR1，包含 SEQ ID NO：11 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：40 的氨基酸序列的 GUCY2C-HCDR3；和所述 GUCY2C-VL 具有：包含 SEQ ID NO：13 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR1，包含 SEQ ID NO：39 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列的 GUCY2C-LCDR3。

14. 根据权利要求 13 所述的抗 GUCY2C 抗体，其中：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56、25 或 57 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54、55、26、48、49、50、51、52 或 53 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37、15 或 38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、16、31、32、34、35 或 36 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 或 17 的氨基酸序列，和所述

GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 或 18 的氨基酸序列；或

iv-1) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：273 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：274 的氨基酸序列；或

iv-2) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：275 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：276 的氨基酸序列；或

iv-3) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：277 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：278 的氨基酸序列；或

iv-4) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：279 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：280 的氨基酸序列；或

iv-5) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：330 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：331 的氨基酸序列；或

iv-6) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：332 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：的氨基酸序列；333 或

iv-7) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：334 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：335 的氨基酸序列；或

iv-8) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：336 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：337 的氨基酸序列；或

iv-9) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：338 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：339 的氨基酸序列；或

iv-10) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：340 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：341 的氨基酸序列；或

iv-11) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：342 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：343 的氨基酸序列；或

iv-12) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：344 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：345 的氨基酸序列；或

iv-13) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：346 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：347 的氨基酸序列；或

iv-14) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：348 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：349 的氨基酸序列；或

iv-15) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：350 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：351 的氨基酸序列；或

iv-16) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：352 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：353 的氨基酸序列；

优选地，

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-

VL 包含 SEQ ID NO：54、55、48、49、50、51 或 52 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：25 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：26 的氨基酸序列，或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：38 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33、32、34 或 36 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：15 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：16 的氨基酸序列，或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列，或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：17 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：18 的氨基酸序列；

更优选地：

i) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：54 的氨基酸序列；或

所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：56 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：55 的氨基酸序列；或

ii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：37 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：33 的氨基酸序列；或

iii) 所述 GUCY2C-VH 包含 SEQ ID NO：42 的氨基酸序列，和所述 GUCY2C-VL 包含 SEQ ID NO：41 的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的抗 GUCY2C 抗体，其是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

16. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区为人 IgG1 恒定区，轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区；更优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO：58 的氨基酸序列，所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO：59 的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 13 至 16 中任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体包含重链和轻链，其中：

所述重链包含与 SEQ ID NO：64 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：65 或 66 具有至少 85%序列同一性的氨基酸序

列；或

所述重链包含与 SEQ ID NO：60 具有至少 85％序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：61 具有至少 85％序列同一性的氨基酸序列；或

所述重链包含与 SEQ ID NO：62 具有至少 85％序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：63 具有至少 85％序列同一性的氨基酸序列；

优选地，所述重链包含与 SEQ ID NO：64 的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：65 或 66 的氨基酸序列；或

所述重链包含 SEQ ID NO：60 的氨基酸序列，和所述轻链包含 SEQ ID NO：61 的氨基酸序列；或

所述重链包含与 SEQ ID NO：62 的氨基酸序列，和所述轻链包含与 SEQ ID NO：63 的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，其中所述的抗 GUCY2C 抗体是抗体片段；优选地，所述的抗体片段为 Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv、scFv、dsFv 或 dAb。

19. 一种药物组合物，其含有：

治疗有效量的权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗原结合分子，或权利要求 13 至 18 中任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，以及一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

20. 分离的核酸，其编码权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗原结合分子或权利要求 13 至 18 中任一项所述的抗 GUCY2C 抗体。

21. 一种宿主细胞，其包含如权利要求 20 所述的分离的核酸。

22. 一种治疗疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗原结合分子，或权利要求 13 至 18 中任一项所述的抗 GUCY2C 抗体，或权利要求 19 所述的药物组合物；

优选地，所述疾病是肿瘤；更优选地，所述的肿瘤为胃癌、胃肠癌、肠癌、胃腺癌、小肠癌、结直肠癌、食道癌、肛门癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、尿道上皮癌、乳腺癌、膀胱癌、胸腺癌、黑色素瘤、胶质瘤、肉瘤、骨肉瘤、卵巢癌、甲状腺癌、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、宫颈鳞状细胞癌、子宫内膜癌、肺癌、皮肤癌、头颈癌、脑癌、多形性胶质母细胞瘤、胃食管癌、胃食管腺癌、肝脏转移性腺癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、白血病或 B 细胞淋巴瘤；最优选地，其中所述的肿瘤的细胞或靠近该肿瘤的血管内皮细胞表达 GUCY2C。

23. 根据权利要求 22 所述的治疗疾病的方法，所述方法进一步包括使用第二治疗剂；优选地，所述第二治疗剂包括抗肿瘤药剂、放射疗法、抗体药物缀合物、双特异性抗体、与抗肿瘤药剂缀合的双特异性抗体、免疫检查点抑制剂或其组合。

24. 根据权利要求 23 所述的治疗疾病的方法，所述的第二治疗剂是特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体，其包含至少一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和至少一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD28 的抗原结合模块包含重链可变区 CD28-VH 和轻链可变区 CD28-VL，所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块包含重链可变区 EGFR-VH 和轻链可变区 EGFR-VL；

优选地，

i) 所述 CD28-VH 具有：包含 SEQ ID NO：146 的氨基酸序列的 CD28-HCDR1，包含 SEQ ID NO：147 的氨基酸序列的 CD28-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：148 的氨基酸序列的 CD28-HCDR3；并且所述 CD28-VL 具有：包含 SEQ ID NO：149 的氨基酸序列的 CD28-LCDR1，包含 SEQ ID NO：150 的氨基酸序列的 CD28-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：151 的氨基酸序列的 CD28-LCDR3；或

ii) 所述 CD28-VH 具有：包含 SEQ ID NO：160 的氨基酸序列的 CD28-HCDR1，包含 SEQ ID NO：161 的氨基酸序列的 CD28-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：162 的氨基酸序列的 CD28-HCDR3；并且所述 CD28-VL 具有：包含 SEQ ID NO：149 的氨基酸序列的 CD28-LCDR1，包含 SEQ ID NO：150 的氨基酸序列的 CD28-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：163 的氨基酸序列的 CD28-LCDR3；或

iii) 所述 CD28-VH 具有：包含 SEQ ID NO：168 的氨基酸序列的 CD28-HCDR1，包含 SEQ ID NO：169 的氨基酸序列的 CD28-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：170 的氨基酸序列的 CD28-HCDR3；并且所述 CD28-VL 具有：包含 SEQ ID NO：171 的氨基酸序列的 CD28-LCDR1，包含 SEQ ID NO：172 的氨基酸序列的 CD28-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：173 的氨基酸序列的 CD28-LCDR3；

更优选地，

i) 所述 CD28-VH 包含 SEQ ID NO：154 的氨基酸序列，和所述 CD28-VL 包含 SEQ ID NO：155 的氨基酸序列；或

ii) 所述 CD28-VH 包含 SEQ ID NO：164 的氨基酸序列，和所述 CD28-VL 包含 SEQ ID NO：165 的氨基酸序列；或

iii) 所述 CD28-VH 包含 SEQ ID NO：174 的氨基酸序列，和所述 CD28-VL 包含 SEQ ID NO：175 的氨基酸序列。

25. 根据权利要求 24 所述的治疗疾病的方法，其中所述特异性结合 EGFR

的抗原结合模块包含重链可变区 EGFR-VH 和轻链可变区 EGFR-VL，其中：

所述 EGFR-VH 具有：包含 SEQ ID NO：140 的氨基酸序列的 EGFR-HCDR1，包含 SEQ ID NO：141 的氨基酸序列的 EGFR-HCDR2，和包含 SEQ ID NO：142 的氨基酸序列的 EGFR-HCDR3；并且所述 EGFR-VL 具有：包含 SEQ ID NO：143 的氨基酸序列的 EGFR-LCDR1，包含 SEQ ID NO：144 的氨基酸序列的 EGFR-LCDR2，和包含 SEQ ID NO：145 的氨基酸序列的 EGFR-LCDR3；

更优选地，

所述 EGFR-VH 包含 SEQ ID NO：152 的氨基酸序列，和所述 EGFR-VL 包含 SEQ ID NO：153 的氨基酸序列。

26. 根据权利要求 25 所述的治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区包含能够相互缔合的第一亚基 Fc1 和第二亚基 Fc2，所述 Fc1 具有根据杵臼技术的凸起结构，和所述 Fc2 具有根据杵臼技术的孔结构；

更优选地，所述 Fc1 在 366 位置的氨基酸为 W；并且所述 Fc2 在 366 位置的氨基酸为 S，在 368 位置的氨基酸为 A，和在 407 位置的氨基酸为 V，编号依据为 EU 索引；

最优选地，所述 Fc1 包含 SEQ ID NO：248 的氨基酸序列；所述 Fc2 包含 SEQ ID NO：249 的氨基酸序列。

27. 根据权利要求 26 所述的治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD28 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块是 Fab；

优选地，

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一条具有式(m)所示结构的第一链、一条具有式(n)所示结构的第二链、一条具有式(o)所示结构的第三链和一条具有式(p)所示结构的第四链，

(m) [CD28-VH]-[连接子 8]-[Titin 链]-[Fc1]，

(n) [CD28-VL]-[连接子 8]-[Obscurin 链]，

(o) [EGFR-VH]-[CH1]-[Fc2]，

(p) [EGFR-VL]-[CL]，

其中：所述连接子 8 是肽连接子；或所述连接子 8 不存在；

式(m)、(n)、(o)和(p)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

最优选地，

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条包含 SEQ ID NO：156 的氨基酸序列的第一链，一条包含 SEQ ID NO：157 的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO：158 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：159 的氨基酸序列的第四链；或

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条包含 SEQ ID NO：166 的氨基酸序列的第一链，一条包含 SEQ ID NO：167 的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO：158 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：159 的氨基酸序列的第四链。

28. 根据权利要求 26 所述的治疗疾病的方法，其中所述的特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一个特异性结合 CD28 的抗原结合模块和一个特异性结合 EGFR 的抗原结合模块，所述特异性结合 CD28 的抗原结合模块是 Fab；所述特异性结合 EGFR 的抗原结合模块是经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链；

优选地，

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体包含一条具有式(q)所示结构的第一链、一条具有式(r)所示结构的第二链、一条具有式(s)所示结构的第三链和一条具有式(t)所示结构的第四链，

(q) [CD28-VH]-[CH1]-[Fc1]，

(r) [CD28-VL]-[CL]，

(s) [EGFR-VH]-[连接子 8]-[Obscurin 链]-[Fc2]，

(t) [EGFR-VL]-[连接子 8]-[Titin 链]，

其中：所述连接子 8 是肽连接子；或所述连接子 8 不存在；

式(q)、(r)、(s)和(t)所示的结构是从 N 端至 C 端排列的；

更优选地，

所述特异性结合 CD28 和 EGFR 的双特异性抗体具有：一条包含 SEQ ID NO：176 的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO：177 的氨基酸序列的第二链、一条包含 SEQ ID NO：178 的氨基酸序列的第三链和一条包含 SEQ ID NO：179 的氨基酸序列的第四链。

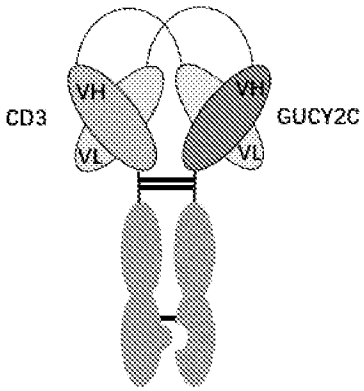
CD3
VH
VL
VH
VL
GUCY2C

图 1A

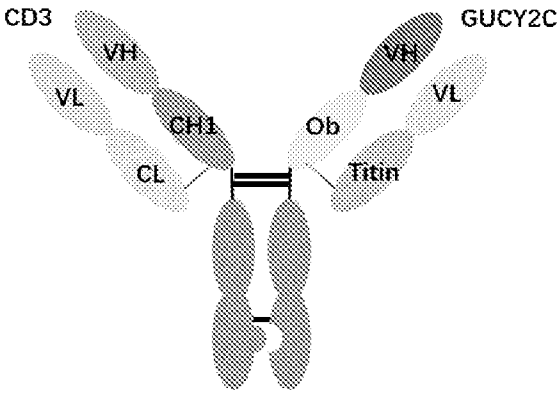
CD3
VH
VL
CH1
CL
Ob
Titin
VH
VL
GUCY2C

图 1B

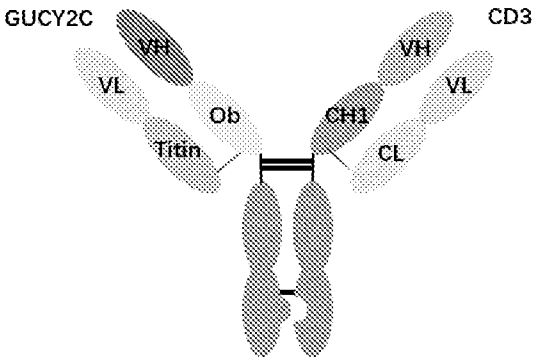
GUCY2C
VH
VL
Ob
Titin
CH1
CL
VH
VL
CD3

图 1C

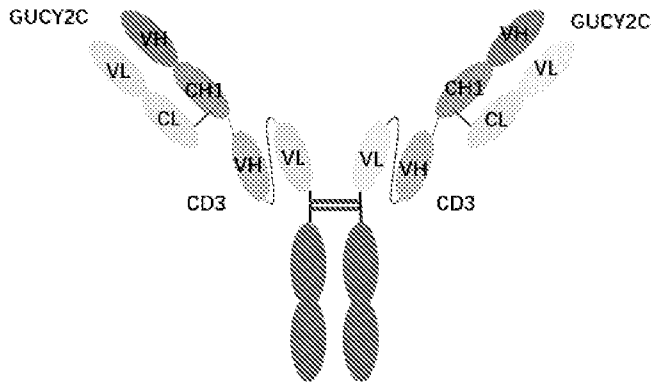
GUCY2C
VH
VL
CH1
CL
VH
VL
CD3
VL
VH
CD3
VH
VL
CH1
CL
GUCY2C

图 1D

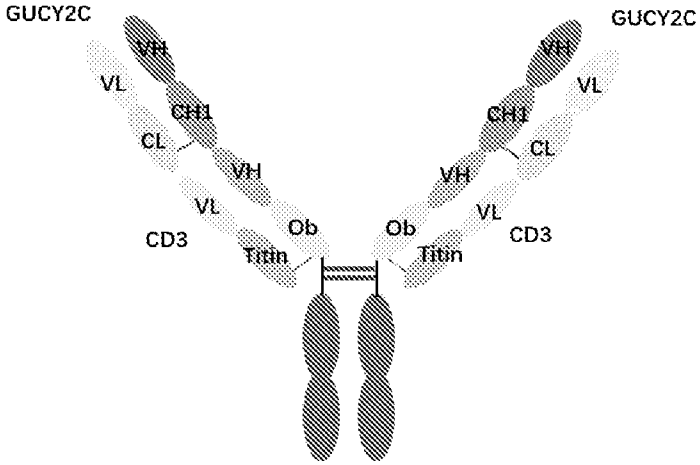
GUCY2C
VH
VL
CH1
CL
VH
VL
CD3
Ob
Titin
Ob
Titin
VH
VL
CD3
VH
VL
CH1
CL
GUCY2C

图 1E

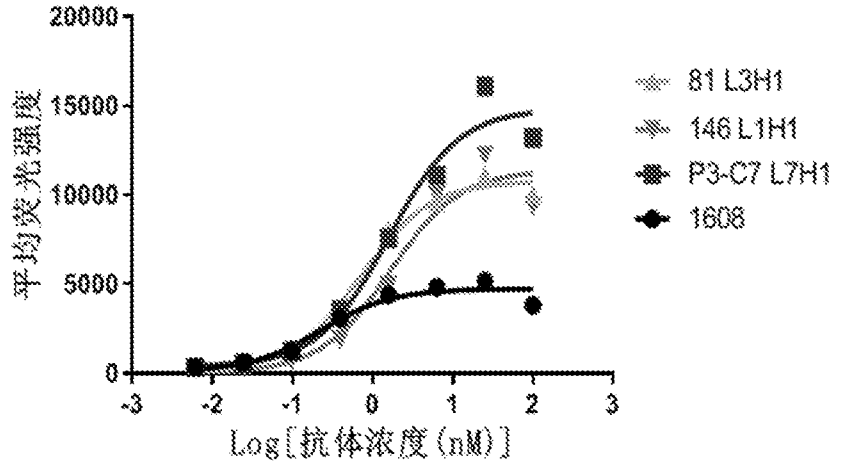
20000
15000
10000
5000
0
平均荧光强度
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体浓度(nM)]
81 L3H1
146 L1H1
P3-C7 L7H1
1608

图 2A

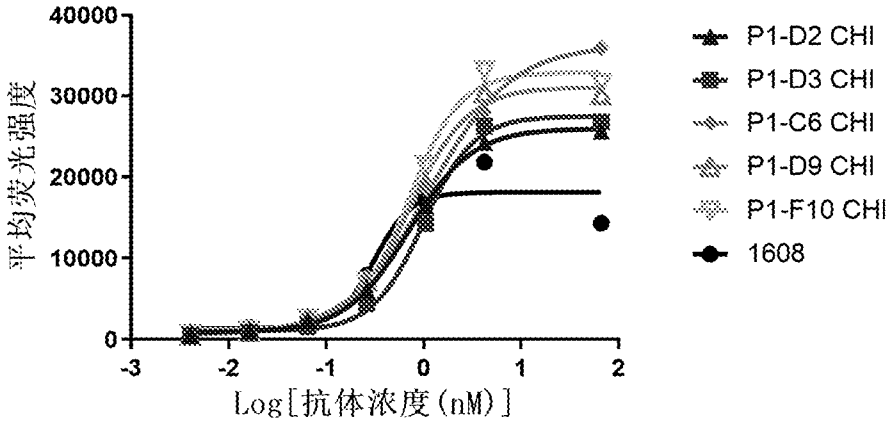
40000
30000
20000
10000
0
平均荧光强度
-3
-2
-1
0
1
2
Log[抗体浓度(nM)]
P1-D2 CHI
P1-D3 CHI
P1-C6 CHI
P1-D9 CHI
P1-F10 CHI
1608

图 2B

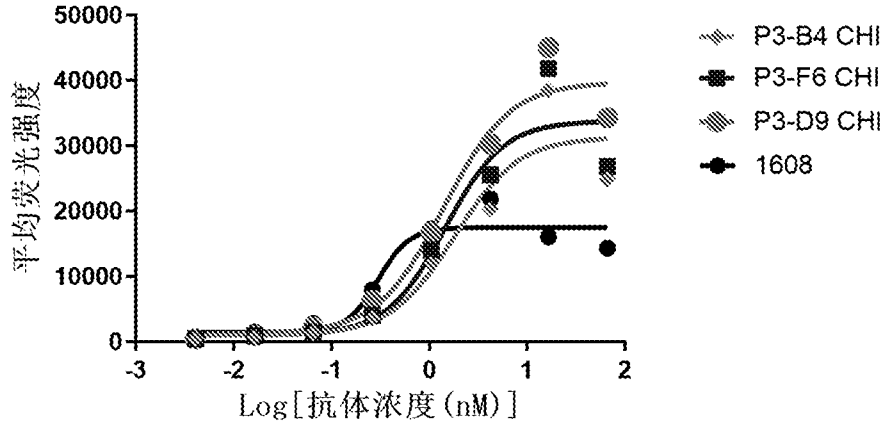
50000
40000
30000
20000
10000
0
平均荧光强度
-3
-2
-1
0
1
2
Log[抗体浓度(nM)]
P3-B4 CHI
P3-F6 CHI
P3-D9 CHI
1608

图 2C

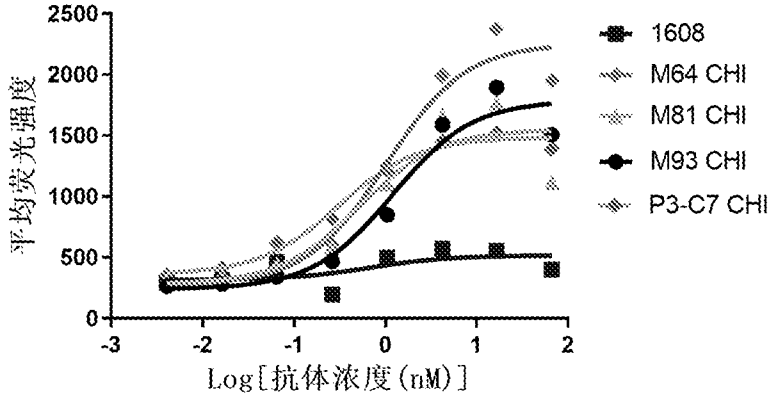
平均荧光强度
2500
2000
1500
1000
500
0
-3
-2
-1
0
1
2
Log[抗体浓度(nM)]
1608
M64 CHI
M81 CHI
M93 CHI
P3-C7 CHI

图 2D

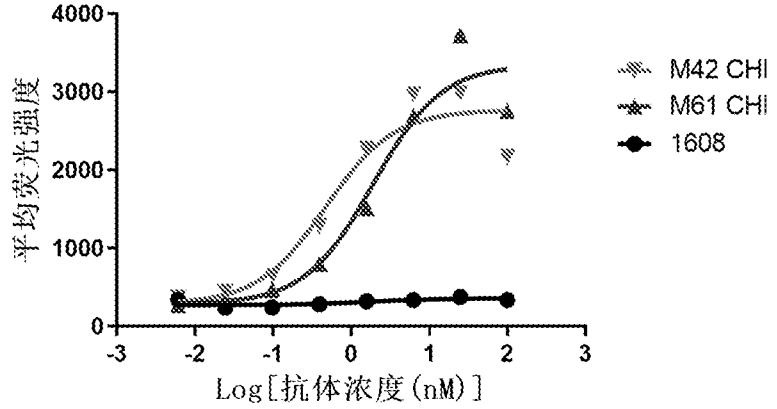
平均荧光强度
4000
3000
2000
1000
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体浓度(nM)]
M42 CHI
M61 CHI
1608

图 2E

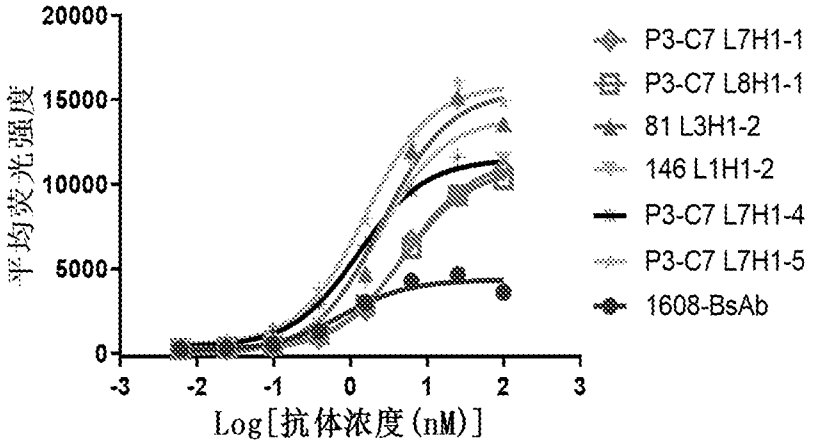
平均荧光强度
20000
15000
10000
5000
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log[抗体浓度(nM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2
P3-C7 L7H1-4
P3-C7 L7H1-5
1608-BsAb

图 3A

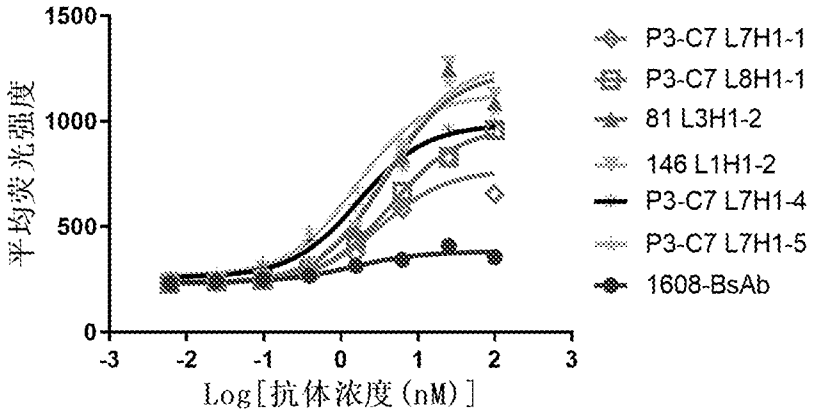
1500
1000
500
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
平均荧光强度
Log[抗体浓度(nM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2
P3-C7 L7H1-4
P3-C7 L7H1-5
1608-BsAb

图 3B

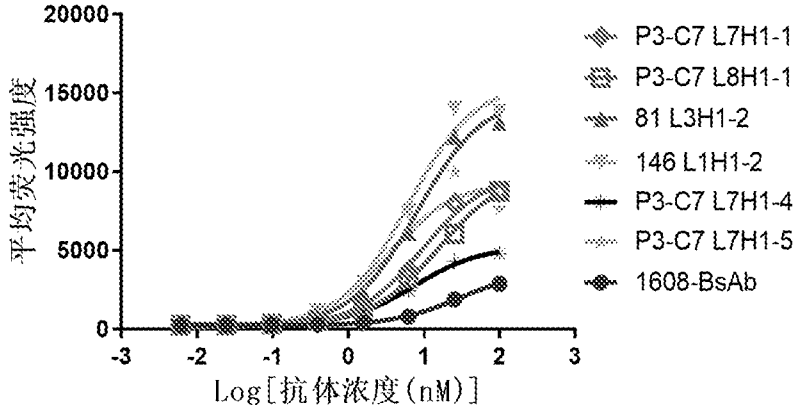
20000
15000
10000
5000
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
平均荧光强度
Log[抗体浓度(nM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2
P3-C7 L7H1-4
P3-C7 L7H1-5
1608-BsAb

图 3C

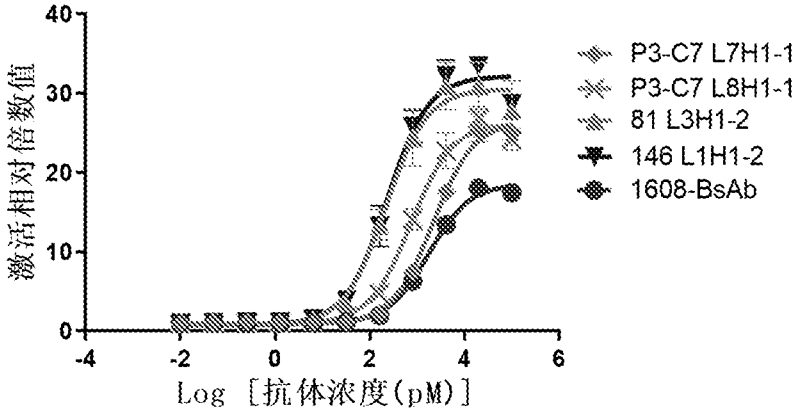
40
30
20
10
0
-4
-2
0
2
4
6
激活相对倍数值
Log [抗体浓度(pM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2
1608-BsAb

图 4A

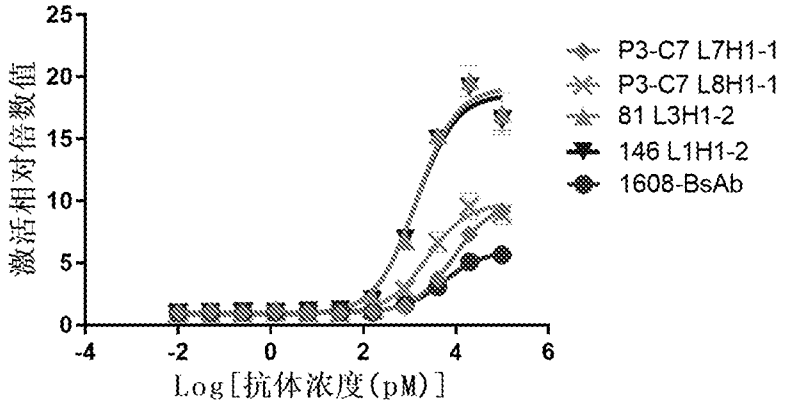
激活相对倍数值
25
20
15
10
5
0
-4
-2
0
2
4
6
Log[抗体浓度(pM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2
1608-BsAb

图 4B

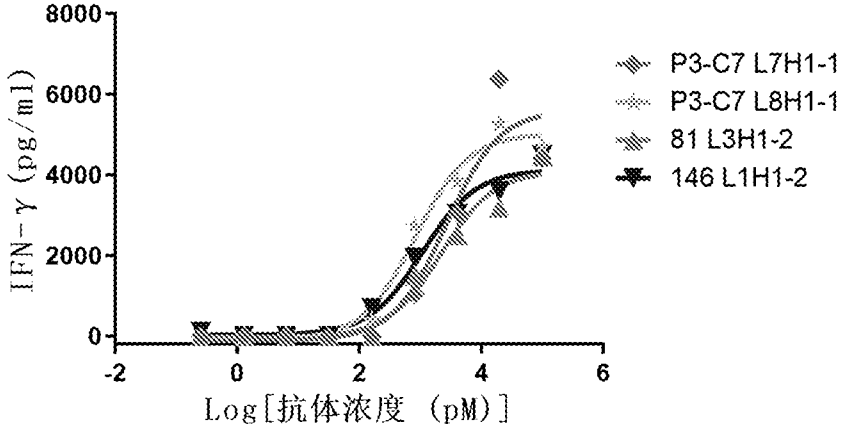
IFN-γ (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
-2
0
2
4
6
Log[抗体浓度 (pM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2

图 5A

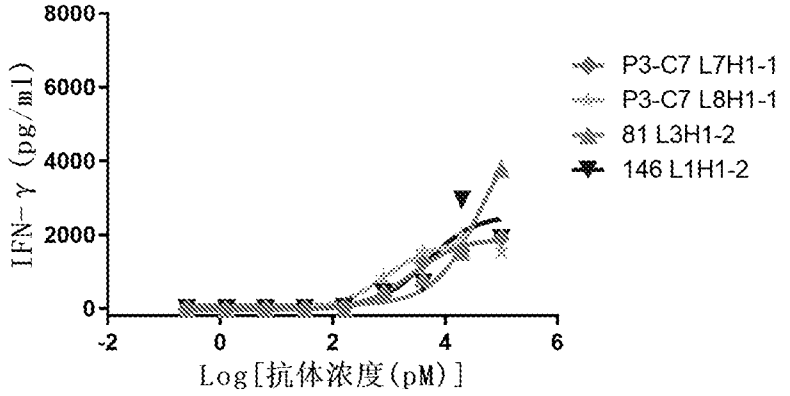
IFN-γ (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
-2
0
2
4
6
Log[抗体浓度(pM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2

图 5B

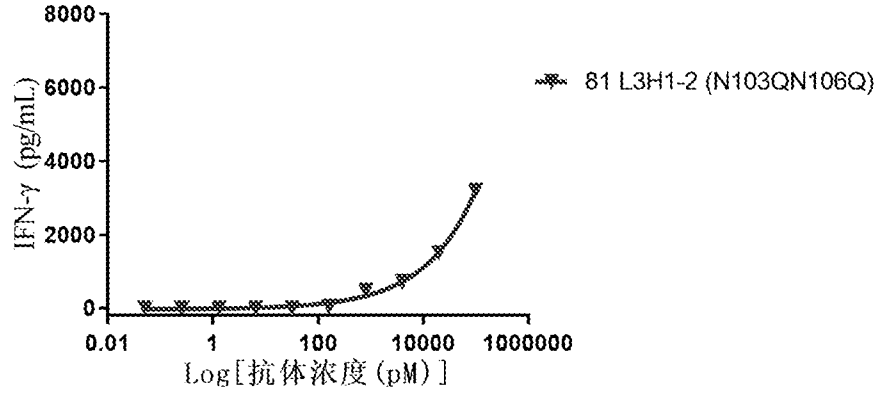
8000
6000
4000
2000
0
IFN-γ (pg/mL)
0.01
1
100
10000
1000000
Log[抗体浓度(pM)]
81 L3H1-2 (N103QN106Q)

图 5C

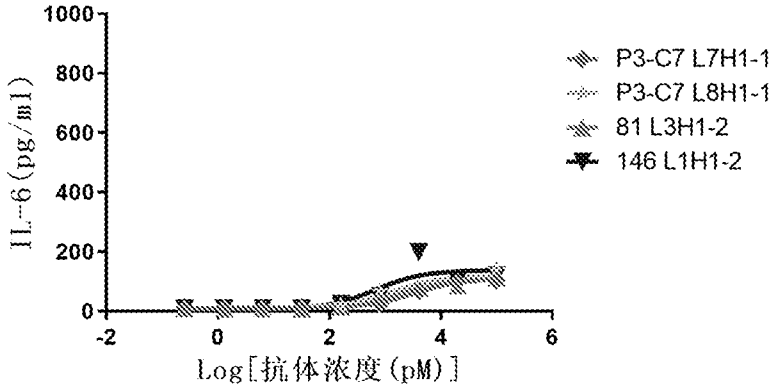
1000
800
600
400
200
0
IL-6(pg/ml)
-2
0
2
4
6
Log[抗体浓度(pM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2

图 6A

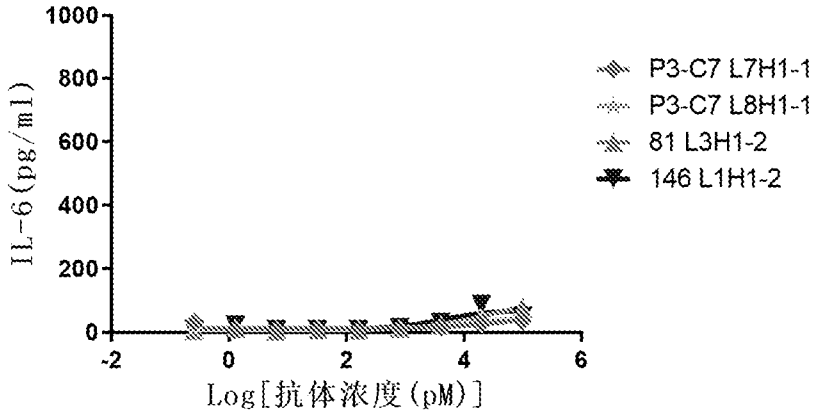
1000
800
600
400
200
0
IL-6(pg/ml)
-2
0
2
4
6
Log[抗体浓度(pM)]
P3-C7 L7H1-1
P3-C7 L8H1-1
81 L3H1-2
146 L1H1-2

图 6B

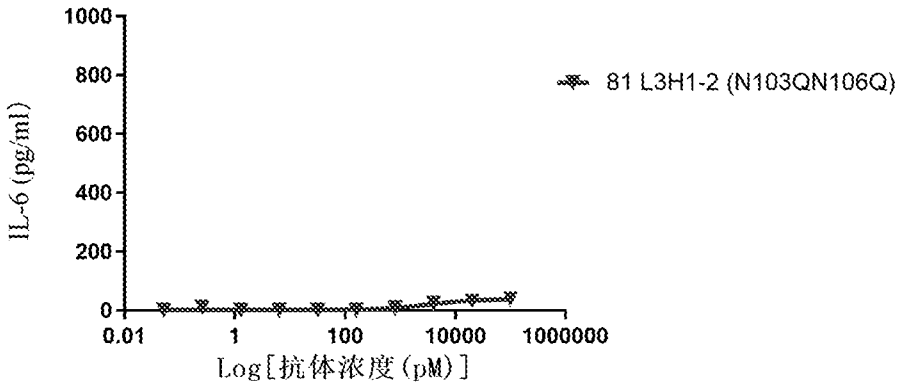
1000
800
600
400
200
0
IL-6 (pg/ml)
0.01
1
100
10000
1000000
Log[抗体浓度(pM)]
81 L3H1-2 (N103QN106Q)

图 6C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/111149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P35/00(2006.01)i; C07K16/00(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C07K16/40(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)

A61P,C07K,C12N

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, WANFANG, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 特异性结合, GUCY2C, CD3, 抗原结合分子, 双抗体, 治疗, 肿瘤, 重链可变区, 轻链可变区, 抗原结合模块, Specific Binding, Antigen Binding Molecules, Diabodies, Therapeutics, Tumors, Heavy Chain Variable Regions, Light Chain Variable Regions, Antigen Binding Moieties

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113286634 A (PFIZER INC.) 20 August 2021 (2021-08-20) entire document	1-28
A	CN 113801238 A (NANJING BIOHENG BIOTECH CO., LTD.) 17 December 2021 (2021-12-17) entire document	1-28
A	WO 2022127871 A1 (PARASOL BIOTECH LTD.) 23 June 2022 (2022-06-23) entire document	1-28
A	WO 2010119704 A1 (IMMUNAS PHARMA, INC.) 21 October 2010 (2010-10-21) entire document	1-28
A	CN 110055224 A (SHENZHEN IN VIVO BIOMEDICINE TECHNOLOGY LIMITED COMPANY) 26 July 2019 (2019-07-26) entire document	1-28

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August 2023	**06 September 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110564693 A (INNOVATIVE CELLULAR THERAPEUTICS CO., LTD.) 13 December 2019 (2019-12-13) entire document	1-28
A	CN 110257338 A (INNOVATIVE CELLULAR THERAPEUTICS CO., LTD.) 20 September 2019 (2019-09-20) entire document	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/111149

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/111149

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **22-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 22-28 relate to a method for treatment or diagnosis of a living human or animal body, which falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(IV) for which an international search is not required. In the present report, a search is conducted on the basis of "a use in the preparation of a drug for diseases".

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/111149

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113286634	A	20 August 2021	CO	2020014345	A2	30 November 2020
				JP	2021525080	A	24 September 2021
				JP	7057843	B2	20 April 2022
				JP	2022106751	A	20 July 2022
				TW	202003041	A	16 January 2020
				CA	3100829	A1	28 November 2019
				KR	20210013165	A	03 February 2021
				WO	2019224716	A2	28 November 2019
				WO	2019224716	A3	05 March 2020
				WO	2019224716	A8	01 October 2020
				IL	278924	A	31 January 2021
				EP	3796983	A2	31 March 2021
				PH	12020500671	A1	28 June 2021
				SG	11202010934	SA	30 December 2020
				AU	2019274655	A1	26 November 2020
				AU	2019274655	B2	09 March 2023
				PE	20210488	A1	15 March 2021
				TW	202308693	A	01 March 2023
				US	2020010566	A1	09 January 2020
				US	11525010	B2	13 December 2022
				AU	2023202234	A1	11 May 2023
				BR	112020022595	A2	09 February 2021
				MX	2020012607	A	29 January 2021
CN	113801238	A	17 December 2021	WO	2021249462	A1	16 December 2021
				JP	2023514386	A	05 April 2023
				AU	2021286676	A1	08 September 2022
				US	2023242661	A1	03 August 2023
				EP	4112721	A1	04 January 2023
				KR	20220166837	A	19 December 2022
				CA	3171344	A1	16 December 2021
WO	2022127871	A1	23 June 2022	IL	303610	A	01 August 2023
				AU	2021404641	A1	29 June 2023
				CO	2023009279	A2	21 July 2023
				CA	3205007	A1	23 June 2022
WO	2010119704	A1	21 October 2010	DK	2419447	T3	25 September 2017
				US	2012082667	A1	05 April 2012
				US	9090679	B2	28 July 2015
				JP	2012524023	A	11 October 2012
				JP	5812418	B2	11 November 2015
				EP	2419447	A1	22 February 2012
				EP	2419447	A4	26 February 2014
				EP	2419447	B1	23 August 2017
				ES	2641612	T3	10 November 2017
CN	110055224	A	26 July 2019	US	2022185858	A1	16 June 2022
				WO	2020200325	A1	08 October 2020
				AU	2020255735	A1	14 October 2021
CN	110564693	A	13 December 2019	None			
CN	110257338	A	20 September 2019	None			

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/111149

A. 主题的分类

A61P35/00(2006.01)i；C07K16/00(2006.01)i；C07K16/28(2006.01)i；C12N15/13(2006.01)i；C07K16/40(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)

A61P,C07K,C12N

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,DWPI,SIPOABS,CNTXT,WOTXT,JPTXT,USTXT,EPTXT,万方,CNKI,PubMed,GenBank,ISI web of knowledge: 特异性结合,GUCY2C,CD3,抗原结合分子,双抗体，治疗，肿瘤，重链可变区，轻链可变区，抗原结合模块，Specific Binding, Antigen Binding Molecules, Diabodies, Therapeutics, Tumors, Heavy Chain Variable Regions, Light Chain Variable Regions, Antigen Binding Moieties

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 113286634 A (辉瑞公司) 2021年8月20日 (2021-08-20) 全文	1-28
A	CN 113801238 A (南京北恒生物科技有限公司) 2021年12月17日 (2021-12-17) 全文	1-28
A	WO 2022127871 A1 (PARASOL BIOTECH LTD.) 2022年6月23日 (2022-06-23) 全文	1-28
A	WO 2010119704 A1 (IMMUNAS PHARMA, INC.) 2010年10月21日 (2010-10-21) 全文	1-28
A	CN 110055224 A (深圳市体内生物医药科技有限公司) 2019年7月26日 (2019-07-26) 全文	1-28
A	CN 110564693 A (上海斯丹赛生物技术有限公司) 2019年12月13日 (2019-12-13) 全文	1-28

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年8月30日	2023年9月6日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 吕健 电话号码 (+86) 010-53962098

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/111149

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 110257338 A（上海斯丹赛生物技术有限公司）2019年9月20日（2019 - 09 - 20） 全文	1-28

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/111149

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/111149

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 22-28
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求22-28涉及对有生命的人体或动物体的治疗或诊断方法，属于PCT细则39.1（Ⅳ）中所列的无需进行国际检索的情形。本报告基于“制备疾病的药物中的用途”进行检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/111149

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	113286634	A	2021年8月20日	CO	2020014345	A2	2020年11月30日
				JP	2021525080	A	2021年9月24日
				JP	7057843	B2	2022年4月20日
				JP	2022106751	A	2022年7月20日
				TW	202003041	A	2020年1月16日
				CA	3100829	A1	2019年11月28日
				KR	20210013165	A	2021年2月3日
				WO	2019224716	A2	2019年11月28日
				WO	2019224716	A3	2020年3月5日
				WO	2019224716	A8	2020年10月1日
				IL	278924	A	2021年1月31日
				EP	3796983	A2	2021年3月31日
				PH	12020500671	A1	2021年6月28日
				SG	11202010934	SA	2020年12月30日
				AU	2019274655	A1	2020年11月26日
				AU	2019274655	B2	2023年3月9日
				PE	20210488	A1	2021年3月15日
				TW	202308693	A	2023年3月1日
				US	2020010566	A1	2020年1月9日
				US	11525010	B2	2022年12月13日
				AU	2023202234	A1	2023年5月11日
				BR	112020022595	A2	2021年2月9日
				MX	2020012607	A	2021年1月29日
CN	113801238	A	2021年12月17日	WO	2021249462	A1	2021年12月16日
				JP	2023514386	A	2023年4月5日
				AU	2021286676	A1	2022年9月8日
				US	2023242661	A1	2023年8月3日
				EP	4112721	A1	2023年1月4日
				KR	20220166837	A	2022年12月19日
				CA	3171344	A1	2021年12月16日
WO	2022127871	A1	2022年6月23日	IL	303610	A	2023年8月1日
				AU	2021404641	A1	2023年6月29日
				CO	2023009279	A2	2023年7月21日
				CA	3205007	A1	2022年6月23日
WO	2010119704	A1	2010年10月21日	DK	2419447	T3	2017年9月25日
				US	2012082667	A1	2012年4月5日
				US	9090679	B2	2015年7月28日
				JP	2012524023	A	2012年10月11日
				JP	5812418	B2	2015年11月11日
				EP	2419447	A1	2012年2月22日
				EP	2419447	A4	2014年2月26日
				EP	2419447	B1	2017年8月23日
				ES	2641612	T3	2017年11月10日
CN	110055224	A	2019年7月26日	US	2022185858	A1	2022年6月16日
				WO	2020200325	A1	2020年10月8日
				AU	2020255735	A1	2021年10月14日
CN	110564693	A	2019年12月13日		无		
CN	110257338	A	2019年9月20日		无		