



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I878430 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：110100845

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 08 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/01/09 中國大陸

202010020878.7

(71)申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商上海恆瑞醫藥有限公司(中國大陸) SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：應華 YING, HUA (CN)；胡齊悅 HU, QIYUE (CN)；張玲 ZHANG, LING (CN)；毛浪勇 MAO, LANGYONG (CN)；石金平 SHI, JINPING (CN)；黎婷婷 LI, TINGTING (CN)；賴煒明 LAI, WEIMING (CN)；覃千山 QIN, QIANSHAN (CN)；金薪盛 JIN, XINSHENG (CN)；陶維康 TAO, WEIKANG (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 108601830A

期刊 Wu, X., Sereno, A. J., Huang, F., Zhang, K., Batt, M., Fitchett, J. R., ... & Demarest, S. J. Protein design of IgG/TCR chimeras for the co-expression of Fab-like moieties within bispecific antibodies. MAbs 7(2) 2015 364-372

期刊 Pernigo, S., Fukuzawa, A., Pandini, A., Holt, M., Kleinjung, J., Gautel, M., & Steiner, R. A. The crystal structure of the human titin: obscurin complex reveals a conserved yet specific muscle M-band zipper module. Journal of molecular biology 427(4) 2015 718-736.

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：54 項 圖式數：16 共 205 頁

(54)名稱

新型多肽複合物

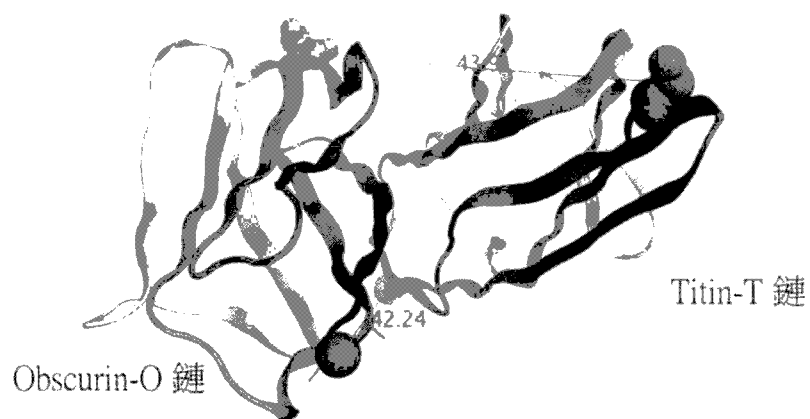
(57)摘要

本披露涉及新型多肽複合物。具體地，本披露涉及一種結構域改造的抗體，該抗體的至少一個恆定區結構域 CH1 和/或 CL 被替代，該結構域 CH1/CL 被 Titin T 鏈/Obscurin-O 鏈或被 Titin T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替代。

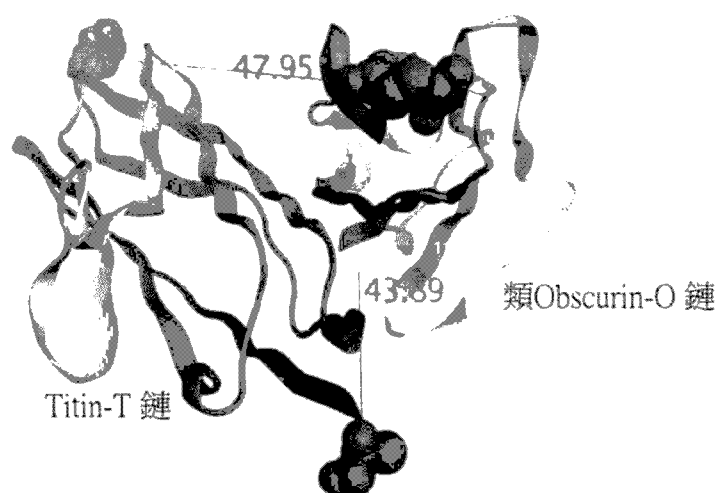
The present disclosure relates to a novel polypeptide complex. Specifically, the present disclosure relates to a domain-modified antibody in which at least one constant region domain CH1 and/or CL of the antibody

is replaced, and the domain CH1/CL is replaced by Titin T chain/Obsecurin-O chain or replaced by Titin T chain/Obsecurin-like-O chain.

指定代表圖：



【圖1A】



【圖1B】

I878430

【發明摘要】

【中文發明名稱】 新型多肽複合物

【英文發明名稱】 A NOVEL POLYPEPTIDE COMPLEX

【中文】

本披露涉及新型多肽複合物。具體地，本披露涉及一種結構域改造的抗體，該抗體的至少一個恆定區結構域CH1和/或CL被替代，該結構域CH1/CL被Titin T鏈/Obseurin-O鏈或被Titin T鏈/類Obseurin -O鏈替代。

【英文】

The present disclosure relates to a novel polypeptide complex. Specifically, the present disclosure relates to a domain-modified antibody in which at least one constant region domain CH1 and/or CL of the antibody is replaced, and the domain CH1/CL is replaced by Titin T chain/Obseurin-O chain or replaced by Titin T chain/Obseurin-like-O chain.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 新型多肽複合物

【英文發明名稱】 A NOVEL POLYPEPTIDE COMPLEX

【0001】 本申請要求 2020 年 01 月 09 日提交的中國專利申請的優先權(申請號 CN202010020878.7)。

【技術領域】

【0002】 本披露涉及抗體藥物領域。具體地包括 CH1 和 CL 結構被替代的新型抗體以及其應用。

【先前技術】

【0003】 這裡的陳述僅提供與本披露有關的背景信息，而不必然地構成現有技術。

【0004】 隨著抗體人源化技術的不斷完善，近年來單株抗體發展迅速。多種單株抗體已被用於治療惡性腫瘤、自身免疫病等重大疾病。但是腫瘤的免疫逃逸往往伴隨著多種不同的機制，而單一的單株抗體只能結合一個特定靶點，這使得單株抗體的治療效果被大打折扣。

【0005】 而雙特異性抗體(Bispecific antibody, BsAb)是藉由基因工程手段將靶向兩個不同抗原或兩個不同抗原表位的抗體組合在一起而形成的人工抗體。與單株抗體不同，雙特異性抗體具有同時靶向 2 個不同表位的能力，並能

發揮特殊的生物學功能，例如免疫細胞召集、受體共刺激或共抑制、多價病毒中和等，有望獲得比單一的單株抗體甚至抗體聯用更好的臨床治療效果。

【0006】已經開發了廣泛多樣的重組雙特異性抗體形式，例如藉由融合例如 IgG 抗體形式和單鏈結構域的四價雙特異性抗體(參見 Coloma, M.J., 等, Nature Biotech. 15(1997)159-163; Morrison, S.L., Nature Biotech. 25(2007)1233-1234)。其它雙特異性形式，如 DVD-Ig、CrossMab、BiTE 等 (Spiess 等, Molecular Immunology, 67(2), pp.95–106(2015))。

【0007】有關雙特異性抗體的各种結構模型也已見公開：例如，向 Fc 區引入突變“knobs-into-holes”(Ridgway 等, Protein Engineering, 9(7), pp.617–21(1996))；引入靜電設計(Gunasekaran 等, Journal of Biological Chemistry, 285(25), pp.19637–19646(2010))，或負狀態設計(Kreidenstein 等, mAbs, 5(5), pp.646–654(2013)；Leaver-Fay 等, Structure, 24(4), pp.641–651(2016))、交換 CH1 和 CL 結構域(CrossMab 平臺)(Schaefer 等, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(27), pp.11187–11192(2011))、與 TCR 恆定區融合(WO2019057122A1)等等。

【發明內容】

【0008】然而，在製備雙特異性抗體過程中，不同的多肽鏈隨機組合會產生多種不同的產物，而僅有一種產物是所需的，這些副產物包括缺失一條輕鏈的抗體、半抗體、重鏈聚合物、輕鏈和重鏈錯配等等，這給下游工藝開發提出了很大的挑戰。為此，本披露提供了一種新的結構域改造的多肽複合物。

【0009】 在一些實施方案中，本披露提供一種多肽複合物，其包含第一抗原結合部分，該第一抗原結合部分包括：

【0010】 A)第一多肽，該第一多肽包含從 N 末端到 C 末端的第一重鏈可變結構域(VH1)，該 VH1 可操作地連接至第一結構域，該第一結構域包含 Titin-T 鏈，和

【0011】 第二多肽，該第二多肽包含從 N 末端到 C 末端的第一輕鏈可變結構域(VL1)，該 VL1 可操作地連接至第二結構域，該第二結構域包含能夠與 Titin-T 鏈相互作用的結構域；

或

【0012】 B)第一多肽，該第一多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VH1，該 VH1 可操作地連接至第一結構域，該第一結構域包含能夠與 Titin-T 鏈相互作用的結構域，和

【0013】 第二多肽，該第二多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VL1，該 VL1 可操作地連接至第二結構域，該第二結構域包含 Titin-T 鏈；

或

【0014】 C)第一多肽，該第一多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VH1，該 VH1 可操作地連接至第一結構域，該第一結構域包含 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈，和

【0015】 第二多肽，該第二多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VL1，該 VL1 可操作地連接至第二結構域，該第二結構域包含能夠與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈相互作用的結構域；

或

【0016】 D)第一多肽，該第一多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VH1，該 VH1 可操作地連接至第一結構域，該第一結構域包含能夠與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈相互作用的結構域，和

【0017】 第二多肽，該第二多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VL1，該 VL1 可操作地連接至第二結構域，該第二結構域包含 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈；

【0018】 其中，該第一抗原結合部分與第一抗原特異性結合，該第一結構域與第二結構域能夠形成二聚體。

【0019】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，該能夠與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈相互作用的結構域是 Titin-T 鏈，該能夠與 Titin-T 鏈相互作用的結構域是 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈。

【0020】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，該第一抗原結合部分的 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的第一抗原結合位點。

【0021】 在一些實施方案中，該 VH1 的 C 端與第一結構域的 N 端可操作地連接。

【0022】 在一些實施方案中，該 VL1 的 C 端與第二結構域的 N 端可操作地連接。

【0023】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，該第一結構域與第二結構域藉由天然鏈間鍵和/或非天然鏈間鍵形成二聚體。

【0024】 在一些實施方案中，該第一結構域與第二結構域藉由天然鏈間鍵形成二聚體；在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈上選自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一個或多個殘基與 Obscurin-O 鏈上的選自第 3-6、9、41、

73、75 和 80-90 位中的一個或多個殘基彼此相結合，或者該 Titin-T 鏈上的選自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一個或多個殘基與類 Obscurin-O 鏈上的選自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一個或多個殘基彼此相結合；該 Titin-T 鏈殘基位中點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈殘基位中點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈殘基位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0025】 在一些實施方案中，前述任一項所述的多肽複合物，該第一結構域與第二結構域藉由至少一個非天然鏈間鍵形成二聚體。

【0026】 在一些實施方案中，該非天然鏈間鍵在第一結構域中的特定突變殘基和第二結構域中的特定突變殘基之間形成。在一些實施方案中，第一結構域中的特定突變殘基和第二結構域中的特定突變殘基中的至少一個是半胱氨酸殘基。

【0027】 在一些實施方案中，該非天然鏈間鍵為二硫鍵；在一些實施方案中，其中該二聚體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個非天然鏈間鍵。

【0028】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，該第一結構域中的特定突變殘基和第二結構域中的特定突變殘基位於第一結構域與第二結構域的接觸界面。

【0029】 在一些實施方案中，前述第一結構域中的特定突變殘基和第二結構域中的特定突變殘基具有選自以下突變，該 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者 Titin-T

鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0030】 在一些具體的實施方案中，前述第一突變殘基和第二突變殘基具有選自以下突變：Titin-T 鏈具有選自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自 3C、9C、25S、76S 和 88C 中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者該 Titin-T 鏈具有選自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一個或多個胺基酸殘基突變。在一些實施方式中，Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 88C 突變；

【0031】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 3C 突變；

【0032】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 26C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 9C 突變；

【0033】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S 和 88C 突變；

【0034】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S 和 3C 突變；

【0035】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 26C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S 和 9C 突變；

【0036】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E 和 74C 突變；

【0037】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E 和 84C 突變；

【0038】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 22C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E 和 86C 突變；

【0039】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E、26S、77S 和 74C 突變；

【0040】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E、26S、77S 和 84C 突變；或者

【0041】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 22C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E、26S、77S 和 86C 突變；

【0042】 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0043】 在一些具體的實施方案中，前述第一突變殘基和第二突變殘基具有選自以下突變：該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變；或者該 Titin-T 鏈

具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0044】 在一些實施方案中，前述第一結構域中的特定突變殘基和第二結構域中的特定突變殘基具有選自以下突變：Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 A88C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，Obscurin-O 鏈具有 A3C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，Obscurin-O 鏈具有 R9C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A88C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A3C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 R9C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 V74C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 G84C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 A86C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突變。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自

然順序編號對應的位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號對應的位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號對應的位點。

【0045】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域為選自以下 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈，或者 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈：該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽；或者該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽，和/或該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽。

【0046】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域為選自以下：Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈，或者 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈。該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變；或者該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序

列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0047】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域為選自以下：Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈，或者 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈。該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 A88C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 A3C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 R9C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 C25S、C76S 和 A88C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 C25S、C76S 和 A3C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 C25S、C76S 和 R9C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E 和 V74C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E 和 G84C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E 和 A86C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID

NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號對應的位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號對應的位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號對應的位點。

【0048】 在一些實施方案中，前述多肽複合物，該 Obscurin-O 鏈具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變。在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈具有選自 7R 或 7K、62K 或 62H、和 11L 的一個或多個胺基酸殘基突變；最較佳地，該 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、7K 和 62K 突變；Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、7K 和 62H 突變；Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、11L 和 62K 突變；或者 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、11L 和 62H；Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點。

【0049】 在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈具有選自 L7K 或 L7R、K11L、T62K 或 T62H 的一個或多個胺基酸殘基突變；在一些實施方案中，Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號對應的位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號對應的位點。

【0050】 在一些實施方案中，前述多肽複合物，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的 Obscurin-O 鏈；在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有選自 L7K 或 L7R、K11L 和 T62K 或 T62H 的一個或多個胺基酸殘基突變；在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突變；Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突變；Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突變；Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ

ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H 突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號對應的位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號對應的位點。

【0051】 在一些實施方案中，前述多肽複合物，該第一結構域和第二結構域具有選自以下一個或多個胺基酸殘基突變：Titin-T 鏈具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0052】 在一些實施方案中，前述多肽複合物，該第一結構域和第二結構域為選自以下的 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈：該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 基礎上具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變的多肽，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 基礎上具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變的多肽。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0053】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域具有選自以下一個或多個殘基突變：Titin-T 鏈具有選自 3W、11I、13L、22M、40S、

42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S 或 66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈具有選自 2E、11K、12S、13Y、14T、17E、20L、22M 或 22S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E、67Q 或 67T、69S、89L、92E、94G 和 97G 中的一個或多個胺基酸突變。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈具有 66S 和 77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 11K、12S、13Y、14T 和 22S 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 66K、70R、79T 和 81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 2E、17E、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S 和 97G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 3W、11I、13L、22M 和 82M 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 20L、22M 和 53L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 11I、66K、79T 和 81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 41K、45T、67Q、69S 和 89L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 47E、49G、56S、58E 和 75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 56S、58E 和 75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；或者該 Titin-T 鏈具有 56S、58E、66S 和 77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 12S、13Y、22S、42L、45T、67Q、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0054】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域具有選自以下一個或多個殘基突變：Titin-T 鏈具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0055】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域為選自以下的 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈：該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0056】 在一些實施方案中，前述 Titin-T 鏈具有 M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 D20L、T22M 和 A53L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；或者該 Titin-T 鏈具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變。該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0057】 在一些實施方案中，前述第一結構域和第二結構域為選自以下 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈：該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基

礎上具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 D20L、T22M 和 A53L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；或者該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自

然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0058】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，該 VH1 藉由第一連接域與第一結構域可操作地連接，VL1 藉由第二連接域與第二結構域可操作地連接。

【0059】 在一些實施方案中，前述第一和/或第二連接域選自：Titin-T 鏈的 N 末端片段，Obscurin-O 鏈的 N 末端片段或類 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，和 $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數(示例是 1、2、3、4、5)，Y 選自 1-6 的整數(示例是 1、2、3、4、5、6)。

【0060】 在一些實施方案中，前述第一和/或第二連接域選自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【0061】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，當該第一結構域為 Titin-T 鏈時，該第一連接域為 KAGIR 多肽；當該第二結構域為 Obscurin-O 鏈時，該第二連接域為 DQPQF 多肽。在另一些實施方案中，該第二結構域為 Titin-T 鏈時，該第二連接域為 KAGIR 多肽，該第一結構域為 Obscurin-O 鏈時，該第一連接域為 DQPQF 多肽。

【0062】 在一些多肽複合物的實施方案中，其中：

【0063】 (A)該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 5 個胺基酸殘基 KAGIR 的序列；較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、

G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；和/或

【0064】 (B)該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；較佳具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；或者

【0065】 該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變的序列；

【0066】 上述 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0067】 在一些多肽複合物的實施方案中，其中：(A)該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和

C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；更佳地，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變，較佳具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點，和/或

【0068】 (B)該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:33 序列基礎上具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；較佳地，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:45 序列基礎上還具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：45 的自然順序編號位點；更佳地，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:50 序列基礎上具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變，較佳具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個

或多個胺基酸突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點；或者

【0069】該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:34 序列基礎上具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0070】在一些多肽複合物的實施方案中，其中：該 Titin-T 鏈包含序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80% 同一性的多肽，和/或該 Obscurin-O 鏈包含序列如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列有至少 80% 同一性的多肽；或者該 Titin-T 鏈包含序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80% 同一性的多肽，和/或該類 Obscurin-O 鏈包含序列如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示序列具有至少 80% 同一性多肽。其中該具有至少 80% 同一性：例如是具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性。

【0071】在一些實施方案中，前述 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：68 所示多肽，Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：80 所示多肽。

【0072】在另一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：73 所示多肽，Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：83 所示多肽。

【0073】在另一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：84 所示多肽。

【0074】在另一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽。

【0075】在另一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽。

【0076】在另一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：75 所示多肽，Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽。

【0077】在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈為如 SEQ ID NO：68 所示多肽，Obscurin-O 鏈為如 SEQ ID NO：80 所示多肽；Titin-T 鏈為如 SEQ ID NO：73 所示多肽，Obscurin-O 鏈為如 SEQ ID NO：83 所示多肽；Titin-T 鏈為如 SEQ ID NO：76 所示多肽，Obscurin-O 鏈為如 SEQ ID NO：84 所示多肽；Titin-T 鏈為如 SEQ ID NO：76 所示多肽，Obscurin-O 鏈為如 SEQ ID NO：86 所示多肽；Titin-T 鏈為如 SEQ ID NO：76 所示多肽，Obscurin-O 鏈為如 SEQ ID NO：86 所示多肽；或者 Titin-T 鏈為如 SEQ ID NO：75 所示多肽，Obscurin-O 鏈為如 SEQ ID NO：86 所示多肽。

【0078】在一些實施方案中，前述的多肽複合物，其中第一抗原選自：外源抗原、內源抗原、自身抗原、新抗原、病毒抗原和腫瘤抗原。

【0079】在一些實施方案中，公開了一種多特異性多肽複合物，包括：

【0080】第一多肽複合物，其為前面任一項所述的多肽複合物，其與第一抗原特異性結合，和

【0081】 第二多肽複合物，其包含第二抗原結合部分，其與第二抗原特異性結合。

【0082】 在一些實施方案中，該第一多肽複合物和第二多肽複合物結合兩種不同的抗原。

【0083】 在一些實施方案中，該第一多肽複合物和第二多肽複合物結合同一種抗原上的兩種不同表位。

【0084】 在一些實施方案中，該多特異性多肽複合物為多特異性多肽複合物，更佳地，該多特異性多肽複合物為雙特異性抗體。

【0085】 在一些實施方案中，該多特異性多肽複合物的第二多肽複合物包含第二重鏈可變結構域(VH2)和第二輕鏈可變結構域(VL2)。第一多肽複合物的 VH1 與第二多肽複合物的 VL2，和/或第二多肽複合物的 VH2 與第一多肽複合物的 VL1 之間不容易發生錯配。在一些實施方案中，該第二抗原結合部分的 VH2 和 VL2 形成與第二抗原特異性結合的第二抗原結合位點。

【0086】 在一些實施方案中，前述的多特異性多肽複合物，該第二多肽複合物的第二抗原結合部分包含：

【0087】 第三多肽，其包含從 N 末端到 C 末端的 VH2，其可操作地連接至第三結構域，該第三結構域包含 CH1，和

【0088】 第四多肽，其包含從 N 末端到 C 末端的 VL2，其可操作地連接至第四結構域，該第四結構域包含 CL。

【0089】 在一些實施方案中，該 VH2 的 C 端與 CH1 的 N 端結合，該 VL2 的 C 端與 CL 的 N 端結合。

【0090】 在一些實施方案中，前述的多特異性多肽複合物，該第一多肽複合物還包含可操作地連接的第一二聚化結構域，該第二多肽複合物還包含可操作地連接的第二二聚化結構域，該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域相結合。

【0091】 在一些實施方案中，該第一多肽複合物的第一結構域的 C 端與第一二聚化結構域的 N 端可操作地連接，該第二多肽複合物的第三結構域的 C 端與第二二聚化結構域的 N 端可操作地連接。

【0092】 在一些實施方案中，前述第一二聚化結構域和第二二聚化結構域藉由抗體鉸鏈區或其部分、連接子、二硫鍵、氫鍵、靜電相互作用、鹽橋、疏水-親水相互作用或其組合的結合方式結合形成二聚體。

【0093】 在一些實施方案中，前述該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域藉由抗體鉸鏈區或其部分結合形成二聚體，較佳 IgG1、IgG2 或 IgG4 的鉸鏈區或其部分結合形成二聚體。在一些實施方案中，較佳 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的鉸鏈區或其部分結合形成二聚體。

【0094】 在一些實施方案中，前述的多特異性多肽複合物，該第一二聚化結構域和/或第二二聚化結構域還包含抗體 CH2 結構域和/或抗體 CH3 結構域。

【0095】 在一些實施方案中，前述多特異性多肽複合物，抗體 CH2 結構域和/或抗體 CH3 結構域源自 IgG1，IgG2 或 IgG4。在一些實施方案中，該抗體 CH2 結構域和/或抗體 CH3 結構域源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4

【0096】 在一些實施方案中，前述多特異性多肽複合物，該第一多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L1-T 鏈-L2-CH2-CH3，該第二多肽從 N 末端

到 C 末端的依次為：VL1-L3-O 鏈或 VL1-L4-OL 鏈，該第三多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-CH2-CH3，該第四多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-CL；或者，該第一多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L2-O 鏈-L3-CH2-CH3，或 VH1-L4-OL 鏈-L5-CH2-CH3；該第二多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L1-T 鏈，該第三多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-CH2-CH3，該第四多肽從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；該 L1-L5 為間隔區(也稱連接域)，間隔區可存在或不存在。較佳的，該間隔區選自：Titin-T 鏈的 N 末端片段，或 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，或類 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段、或連接子(例如 $(G_xS)_y$ 連接子)，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數。最佳地，該間隔區選自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【0097】 在一些實施方案中，前述的多特異性多肽複合物，該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域不相同，並且以阻止同源二聚化和/或有利於異二聚化的方式結合。

【0098】 在一些實施方案中，前述第一二聚化結構域和第二二聚化結構域藉由 knob-into-hole、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用或增加的方式結合形成二聚體。

【0099】 在一些實施方案中，前述第一二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基，該第二二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基；或者該第一二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基，該第二二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基。

【0100】 在一些實施方案中，本披露提供一種結構域改造抗體，其至少一個恆定區結構域 CH1 和至少一個恆定區結構域 CL 被替代，其中：

【0101】 該結構域 CH1 被 Titin-T 鏈替代，該結構域 CL 被能夠與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；

【0102】 該結構域 CL 被 Titin-T 鏈替代，該結構域 CH1 被能夠與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；

【0103】 該結構域 CH1 被 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CL 被能夠與 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；

【0104】 該結構域 CL 被 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CH1 被能夠與 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；

【0105】 該結構域 CH1 被類 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CL 被能夠與類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0106】 該結構域 CL 被類 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CH1 被能夠與類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代。

【0107】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體，該能夠與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈相互作用的結構域是 Titin-T 鏈，該能夠與 Titin-T 鏈相互作用的結構域是 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈；

【0108】 在一些實施方案中，該抗體包含重鏈可變區 VH1 和輕鏈可變區 VL1，該 VH1 和 VL1 形成與其抗原特異性結合的原結合位點；該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可

操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接。

【0109】 在一些實施方案中，本披露提供一種結構域改造抗體的 Fab 片段，其中恆定區結構域 CH1 和恆定區結構域 CL 被替代，其中，

【0110】 該結構域 CH1 被 Titin-T 鏈替代，該結構域 CL 被能夠與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0111】 該結構域 CL 被 Titin-T 鏈替代，該結構域 CH1 被能夠與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0112】 該結構域 CH1 被 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CL 被能夠與 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0113】 該結構域 CL 被 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CH1 被能夠與 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0114】 該結構域 CH1 被類 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CL 被能夠與類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0115】 該結構域 CL 被類 Obscurin-O 鏈替代，該結構域 CH1 被能夠與類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代。

【0116】 在一些實施方案中，前述 Fab 片段，該與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域為 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈；該與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域為 Titin-T 鏈。

【0117】 在一些實施方案中，該 Fab 包含重鏈可變區 VH1 和輕鏈可變區 VL1，該 VH1 和 VL1 形成與其抗原特異性結合的原結合位點；該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類

Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接。

【0118】 在一些實施方案中，本披露提供一種包含前述 Fab 片段的結構域改造抗體。

【0119】 在一些實施方案中，本披露提供一種雙特異性抗體，其包含特異性結合第一抗原的第一重鏈和第一輕鏈，還包含特異性結合第二抗原的第二重鏈和第二輕鏈，其中，

【0120】 該第一重鏈的 CH1 結構域被 Titin-T 鏈替代，第一輕鏈的 CL 結構域被能夠與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0121】 該第一輕鏈的 CL 結構域被 Titin-T 鏈替代，該第一重鏈的 CH1 結構域被能夠與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0122】 該第一重鏈的結構域 CH1 被 Obscurin-O 鏈替代，該第一輕鏈的結構域 CL 被能夠與 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0123】 該第一輕鏈的結構域 CL 被 Obscurin-O 鏈替代，該第一重鏈的結構域 CH1 被能夠與 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0124】 該第一重鏈的結構域 CH1 被類 Obscurin-O 鏈替代，該第一輕鏈的結構域 CL 被能夠與類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代；或者

【0125】 該第一輕鏈的結構域 CL 被類 Obscurin-O 鏈替代，該第一重鏈的結構域 CH1 被能夠與類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域替代。

【0126】該雙特異性抗體結合的第一抗原和第二抗原不相同，或是同一種抗原上的兩種不同表位。

【0127】在具體的實施方案中，第一重鏈和第二輕鏈之間，第一輕鏈與第二重鏈之間不容易發生錯配。

【0128】在一些實施方案中，前述雙特異性抗體，其中該與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域為 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈；該與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域為 Titin-T 鏈。

【0129】在一些實施方案中，其中該第一重鏈包含第一重鏈可變區(VH1)，該第一輕鏈包含第一輕鏈可變區(VL1)，該 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的抗原結合位點，且該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接。

【0130】在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，其中該第二重鏈包含從 N 末端到 C 末端的第二重鏈可變區(VH2)，其可操作地連接至 CH1；該第二輕鏈包含從 N 末端到 C 末端的第二輕鏈可變區(VL2)，其可操作地連接至 CL。

【0131】在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，該 VH2 和 VL2 形成與第二抗原特異性結合的抗原結合位點，該 VH2 的 C 端與 CH1 的 N 端可操作地連接；該 VL2 的 C 端與 CL 的 N 端可操作地連接。

【0132】在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，其中該雙特異性抗體結構模型選自 F(ab)₂、scFv-Fab、(scFv)₂-Fab、KiH、CrossMAb、Triomab

quadroma、Fc Δ Adp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAAb、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、mAAb2、F(ab)₄-CrossMAb、IgG 和 Fab-IgG 等。

【0133】 在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，該第一重鏈和第二重鏈的 C 末端包含 CH2 和/或 CH3 結構域。

【0134】 在一些實施方案中，前述 CH1、CH2 和 CH3 結構域源自 IgG1，IgG2 或 IgG4。在一些實施方案中，前述 CH1、CH2 和 CH3 結構域源自 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4。在一些實施方案中，前述第一重鏈和第二重鏈藉由抗體鉸鏈區或其部分、連接子、二硫鍵、氫鍵、靜電相互作用、鹽橋、疏水-親水相互作用或其組合的結合方式結合形成二聚體。

【0135】 在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L1-T 鏈-L2-CH2-CH3，該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L3-O 鏈或 VL1-L4-OL 鏈，該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-CH2-CH3，該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；或者

【0136】 該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L1-T 鏈，該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L2-O 鏈-L3-CH2-CH3，或 VH1-L4-OL 鏈-L5-CH2-CH3；該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-CH2-CH3，該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；

【0137】 其中，該 L1-L5 為間隔區，間隔區可存在或不存在，較佳的，該間隔區為 Titin-T 鏈的 N 末端片段，或 Obscurin-O 鏈 N 末端片段，或類 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，或連接子，例如 $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數；較佳地，該間隔區選自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【0138】 在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，該第一重鏈的 CH2 和 CH3 與第二重鏈的 CH2 和 CH3 不相同，並且以阻止同源二聚化和/或有利於異二聚化的方式結合。

【0139】 在一些實施方案中，前述第一重鏈和第二重鏈藉由 knob-into-hole、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用或增加的柔韌性的方式結合形成二聚體。

【0140】 在一些實施方案中，前述第一重鏈和第二重鏈藉由 knob-into-hole 方式結合形成二聚體。在一些實施方案中，前述第一重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基，該第二重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基；或者該第一重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基，該第二重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示的序列的第 104 至 330 位胺基酸殘基。

【0141】 在一些實施方案中，前述的雙特異性抗體，該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L1-T 鏈-L2-knob-Fc，該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L3-O 鏈或 VL1-L4-OL 鏈，該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-hole-Fc，該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-

CL；或者該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L1-T 鏈-L2- hole-Fc，該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L3-O 鏈或 VL1-L4-OL 鏈，該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-knob-Fc，該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；或者

【0142】該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L1-T 鏈，該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L2-O 鏈-L3- knob-Fc，或 VH1-L4-OL 鏈-L5-knob-Fc；該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-hole-Fc，該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L1- T 鏈，該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L2-O 鏈-L3- hole-Fc，或 VH1-L4-OL 鏈-L5- hole-Fc；該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-knob-Fc，該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；

【0143】該 L1-L5 為間隔區，間隔區可存在或不存在，較佳的，該間隔區為 Titin-T 鏈的 N 末端片段，或 Obscurin-O 鏈 N 末端片段，或類 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，或連接子，例如 $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數；較佳地，該間隔區選自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【0144】在一些實施方案中，前面任一項該結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段，或雙特異性抗體，其中該與 Titin-T 鏈具有蛋白間相互作用的結構域為 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈；該與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈具有蛋白間相互作用的結構域為 Titin-T 鏈。前面任一項該結構域

改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段，或雙特異性抗體，該可操作地連接是兩條多肽序列藉由間隔區連接或兩條多肽直接連接。

【0145】 在一些實施方案中，前述的結構域改造抗體、或雙特異性抗體，或結構域改造抗體的 Fab 片段，其中該 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈，或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈藉由天然鏈間鍵和/或非天然鏈間鍵結合形成二聚體。

【0146】 在一些實施方案中，該第一結構域與第二結構域藉由天然鏈間鍵形成二聚體，該 Titin-T 鏈上選自第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一個或多個殘基與 Obscurin-O 鏈上的選自第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一個或多個殘基彼此相結合，或者

【0147】 該 Titin-T 鏈上的選自第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一個或多個殘基與類 Obscurin-O 鏈上的選自第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一個或多個殘基彼此相結合。該 Titin-T 鏈殘基位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈殘基位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈殘基位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0148】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體，或結構域改造抗體的 Fab 片段，該 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈藉由至少一個非天然鏈間鍵形成二聚體。在一些實施方案中，該非天然鏈間鍵為二硫鍵；在一些實施方案中，其中該二聚體包含 1，2，3，4，5，6，7，8，9 或 10 個非天然鏈間鍵。

【0149】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，其中：

【0150】 該 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者

【0151】 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變。

【0152】 在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈，或者 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈為：

【0153】 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽；或者

【0154】 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽，和/或該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的多肽。

【0155】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，其中：

【0156】該 Titin-T 鏈具有選自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自 3C、9C、25S、76S 和 88C 中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者

【0157】該 Titin-T 鏈具有選自 8C、20C、22C、25S、26C 和 39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 6E、26S、74C、77S、84C 和 86C 中的一個或多個胺基酸殘基突變；

【0158】更佳地，該非天然鏈間鏈位於選自以下的突變位點：

【0159】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 88C 突變；

【0160】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 3C 突變；

【0161】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 26C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 9C 突變；

【0162】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S 和 88C 突變；

【0163】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S 和 3C 突變；

【0164】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 26C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S 和 9C 突變；

【0165】Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E 和 74C 突變；

【0166】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E 和 84C 突變；

【0167】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 22C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E 和 86C 突變；

【0168】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E、26S、77S 和 74C 突變；

【0169】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 20C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E、26S、77S 和 84C 突變；或者

【0170】 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 22C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 6E、26S、77S 和 86C 突變；

【0171】 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0172】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，其中：

【0173】 該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變；或者

【0174】 該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變；該 Titin-T

鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序位點。

【0175】 在一些實施方案中，前述 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變；或者該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0176】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，其中：

【0177】 該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 A88C 突變；

【0178】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，Obscurin-O 鏈具有 A3C 突變；

【0179】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，Obscurin-O 鏈具有 R9C 突變；

【0180】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A88C 突變；

【0181】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A3C 突變；

【0182】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 R9C 突變；

【0183】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 V74C 突變；

【0184】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 G84C 突變；

【0185】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 A86C 突變；

【0186】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突變；

【0187】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突變；

【0188】 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突變；

【0189】 該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序位點。

【0190】 在一些實施方案中，在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段：該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 A88C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 A3C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 R9C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 C25S、C76S 和 A88C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 C25S、C76S 和 A3C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：33 序列基礎上具有 C25S、C76S 和 R9C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E 和 V74C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E 和 G84C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E 和 A86C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID

NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 序列基礎上具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：34 序列基礎上具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號對應的位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號對應的位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號對應的位點。

【0191】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，該 Obscurin-O 鏈還具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變。在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈具有選自 7R 或 7K、62K 或 62H、和 11L 的一個或多個胺基酸殘基突變；最佳地，該 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、7K 和 62K 突變；Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、7K 和 62H 突變；Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、11L 和 62K 突變；或者 Titin-T 鏈具有 25S、39T 和 8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 25S、76S、88C、11L 和 62H。在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈具有選自 L7K 或 L7R、K11L、T62K 或 T62H 的一個或多個胺基酸殘基突變；在一些實施方案中，Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C

突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突變；或者 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H。上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序位點。

【0192】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變的 Obscurin-O 鏈；在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有選自 L7K 或 L7R、K11L 和 T62K 或 T62H 的一個或多個胺基酸殘基突變；在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突變；Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突變；Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突變；Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：32 基礎上具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：45 基礎上具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H 突變。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號對應的位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號對應的位點。

【0193】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，該 Titin-T 鏈具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變。在一些實施方案中，Titin-T 鏈具有選自 3W、11I、13L、22M、40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、66S 或 66K、70R、75V、77S、79T、81R、82M、83D 和 84L 中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈具有選自 2E、11K、12S、13Y、14T、17E、20L、22M 或 22S、30D、32P、34E、36T、41K、42L、44I、45T、53L、58V、62E、67Q 或 67T、69S、89L、92E、94G 和 97G 中的一個或多個胺基酸突變。更佳地，該 Titin-T 鏈具有 66S 和 77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 11K、12S、13Y、14T 和 22S 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 66K、70R、79T 和 81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 2E、17E、30D、32P、34E、36T、44I、45T、58V、62E、67Q、69S 和 97G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 3W、11I、13L、22M 和 82M 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 20L、22M 和 53L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 11I、66K、79T 和 81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 41K、45T、67Q、69S 和 89L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 40S、42K、45S、47E、49G、56S、58E、75V、83D 和 84L 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 47E、49G、56S、58E 和 75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；該 Titin-T

鏈具有 56S、58E 和 75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 42L、45T、67T、69S、92E 和 94G 胺基酸突變；或者該 Titin-T 鏈具有 56S、58E、66S 和 77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 12S、13Y、22S、42L、45T、67Q、69S、92E 和 94G 胺基酸突變。上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈具有 M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 D20L、T22M 和 A53L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、

A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈具有 N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；或者該 Titin-T 鏈具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變。上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0194】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段：該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 基礎上具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變的多肽，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 基礎上具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變的多肽。該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變，和/或 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、

V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 D20L、T22M 和 A53L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有

Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；或者該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO：35 序列基礎上具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 胺基酸突變，和/或該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO：50 序列基礎上具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【0195】 在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，該 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端藉由連接域與 VH 或 VL 可操作地連接。在一些實施方案中，該連接域選自：Titin-T 鏈的 N 末端片段，Obscurin-O 鏈 N 末端片段或類 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，和 $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數。在一些實施方案中，該連接域選自：“KAGIR”，“DQPQF”， $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【0196】 在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈藉由 KAGIR 多肽與 VH 或 VL 連接，和/或該 Obscurin-O 鏈藉由 DQPQF 多肽與 VL 或 VH 連接。

【0197】 在一些實施方案中，前述的多肽複合物，其中：

【0198】 (A)該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、

T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；和/或

【0199】 (B)該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；較佳具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；或者

【0200】 該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變的序列；

【0201】 上述 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點；

【0202】 較佳地，其中：

【0203】 (A)該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，

該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；更較佳地，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變，較佳具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點，和/或

【0204】 (B)該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:33 序列基礎上具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；較佳地，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:45 序列基礎上還具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：45 的自然順序編號位點；更較佳地，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:50 序列基礎上具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變，較佳具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點；或者

【0205】該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:34 序列基礎上具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0206】在一些實施方案中，前述結構域改造抗體、雙特異性抗體或結構域改造抗體的 Fab 片段，該 Titin-T 鏈包含序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80% 同一性的多肽，和/或該 Obscurin-O 鏈包含序列如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列有至少 80% 同一性的多肽；或者該 Titin-T 鏈包含序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80% 同一性的多肽，和/或該類 Obscurin-O 鏈包含序列如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示序列具有至少 80% 同一性多肽。其中該具有至少 80% 同一性：例如是具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性。

【0207】在一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：68 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：80 所示多肽；Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：73 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：83 所示多肽；Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：84 所示多肽；Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽；Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多

肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽；Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：75 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽。

【0208】 在一些實施方案中，前述雙特異性抗體，其為選自以下 A 至 I 中任一項所述的雙特異性抗體：

【0209】 A、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：89 所示或與 SEQ ID NO：89 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：90 所示或與 SEQ ID NO：90 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：87 所示或與 SEQ ID NO：87 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：88 所示或與 SEQ ID NO：88 具有至少 85%序列同一性；

【0210】 B、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：93 所示或與 SEQ ID NO：93 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：94 所示或與 SEQ ID NO：94 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：91 所示或與 SEQ ID NO：91 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：92 所示或與 SEQ ID NO：92 具有至少 85%序列同一性；

【0211】 C、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：97 所示或與 SEQ ID NO：97 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：98 所示或與 SEQ ID NO：98 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：95 所示或與 SEQ ID NO：95 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

【0212】 D、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：99 所示或與 SEQ ID NO：99 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：100 所示或與 SEQ ID NO：100 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：101 所示或與 SEQ ID NO：101 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

【0213】 E、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：102 所示或與 SEQ ID NO：102 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：100 所示或與 SEQ ID NO：100 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：95 所示或與 SEQ ID NO：95 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

【0214】 F、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：103 所示或與 SEQ ID NO：103 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：104 所示或與 SEQ ID NO：104 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：95 所示或與 SEQ ID NO：95 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

【0215】 G、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：107 所示或與 SEQ ID NO：107 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：108 所示或與 SEQ ID NO：108 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：109 所示或與 SEQ ID NO：109 具有至少 85%序列同一性，

第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：110 所示或與 SEQ ID NO：110 具有至少 85% 序列同一性；

【0216】 H、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：122 所示或與 SEQ ID NO：122 具有至少 85% 序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：123 所示或與 SEQ ID NO：123 具有至少 85% 序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：116 所示或與 SEQ ID NO：116 具有至少 85% 序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：117 所示或與 SEQ ID NO：117 具有至少 85% 序列同一性；

【0217】 I、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：118 所示或與 SEQ ID NO：118 具有至少 85% 序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：119 所示或與 SEQ ID NO：119 具有至少 85% 序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：124 所示或與 SEQ ID NO：124 具有至少 85% 序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：125 所示或與 SEQ ID NO：125 具有至少 85% 序列同一性；

【0218】 其中，前述具有至少 85% 同一性：例如是具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性。

【0219】 在一些實施方案中，本披露提供一種製備多特異性抗體的方法，該方法包括用 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈、或者 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈替換抗體 CH1/CL。在一些製備多特異性抗體的方法的實施方案中，相較於 CH1/CL 未被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或者 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換的野生型，本披露的多特異性抗體具有減少的輕鏈與重鏈錯配。

【0220】 在一些實施方案中，本披露還提供前述製備多特異性抗體的方法製備獲得的多特異性抗體。在一些實施方案中，該多特異性抗體包含第一重鏈可變區(VH1)和第一輕鏈可變區(VL1)，該 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的抗原結合位點，且該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接。

【0221】 在一些實施方案中，該製備多特異性抗體的方法，該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任條一序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一條序列有至少 80%同一性的多肽；或者該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一條序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或該類 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：34、59-64 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一條序列具有至少 80%同一性多肽。

【0222】 在一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：68 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：80 所示多肽；在一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：73 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：83 所示多肽；在一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：84 所示多肽；在一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ

ID NO：86 所示多肽；在一些實施方案中，Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：75 所示多肽，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示多肽。

【0223】 在一些實施方案中，其中：

【0224】 (A)該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 5 個胺基酸殘基 KAGIR 的序列；較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 5 個胺基酸殘基 KAGIR 的序列；和/或

【0225】 (B)該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；較佳具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；或者

【0226】 該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基

酸突變的序列；較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變的序列；

【0227】 上述 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點；

【0228】 較佳地，其中，

【0229】 (A)該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；更較佳地，該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變，較佳具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點，和/或

【0230】 (B)該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:33 序列基礎上具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；較佳地，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:45 序列基礎上還具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 的一個或多

個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：45 的自然順序編號位點；更佳地，該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:50 序列基礎上具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變，較佳具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點；或者

【0231】該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:34 序列基礎上具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【0232】在一些實施方案中，本披露提供一種綴合物，其包含前面任一項所述的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段或雙特異性抗體、或多特異性抗體。

【0233】在一些實施方案中，本披露提供一種多肽，其序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80% 同一性；或者序列如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列有至少 80% 同一性；或者序列如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示序列具有至少 80% 同一性；較佳地，該多肽可用於替換抗體 CH1 和/或 CL。更佳地，該多

肽為 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈，雙特異性抗體的單側 CH1 和 CL 被 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈替換、或 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈替換後，第一重鏈與第二輕鏈之間、第一輕鏈與第二重鏈之間不容易發生錯配。

【0234】 在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或是 SEQ ID NO:32 序列還具有選自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變序列；較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 5 個胺基酸殘基 KAGIR 的序列；該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或是 SEQ ID NO:33 的序列還具有選自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；較佳具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或 SEQ ID NO:34 序列還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變序列；較佳具有選自

C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變序列。

【0235】一種用於替換抗體的 CH1 和/或 CL、替換抗原結合片段的 CH1 和/或 CL，或替換多肽複合物的 CH1 和/或 CL 的多肽，該多肽的序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性；或者序列如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性；或者序列如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性；較佳地，該多肽為 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈。更佳地，該多肽替換雙特異性抗體的單側 CH1 和 CL 後，雙特異性抗體的第一重鏈與第二輕鏈之間、第一輕鏈與第二重鏈之間不容易發生錯配。

【0236】在一些實施方案中，本披露提供一種 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈和/或類 Obscurin-O 鏈，其中該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性，Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性；類 Obscurin-O 鏈序列如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示序列具有至少 80%同一性。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈，或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈可用於替換抗體 CH1 和/或 CL。

【0237】在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或是 SEQ ID NO:32 序列還具有選自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、

40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變序列；較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變序列；該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或是 SEQ ID NO:33 的序列還具有選自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變序列；較佳具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變序列；該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或 SEQ ID NO:34 序列還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變序列；較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變序列。

【0238】 在一些實施方案中，本披露還公開 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈、或者 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈在減少多特異性抗體輕鏈/重鏈錯配中的應用；在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任條一序列具有至少 80%同一性的多肽，和/或該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一條序列有至少 80%同一

性的多肽；或者該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一條序列具有至少 80% 同一性的多肽，和/或該類 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：34、59-64 任一條序列所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一條序列具有至少 80% 同一性多肽。

【0239】 在一些實施方案中，前述 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈、或者 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈在減少多特異性抗體輕鏈/重鏈錯配中的應用，該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或是 SEQ ID NO:32 序列還具有選自 8、20、22、25、26、39、3、11、13、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變，和/或 N 端增加 5 個胺基酸殘基 KAGIR 的序列；較佳具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變序列，和/或 N 端增加 5 個胺基酸殘基 KAGIR 的序列；該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或是 SEQ ID NO:33 的序列還具有選自 3、9、25、76、88、7、11、62、2、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、67、69、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變序列，和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；較佳具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變序列，和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基

的序列；該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或 SEQ ID NO:34 序列還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變序列；較佳具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變序列。

【0240】 在一些實施方案中，該多特異性抗體包含第一重鏈可變區(VH1)和第一輕鏈可變區(VL1)，該 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的抗原結合位點，且該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接。

【0241】 在一些實施方案中，本披露提供一種核酸分子，其編碼前面任一項所述的多肽複合物，或多特異性多肽複合物，或結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段、或雙特異性抗體、或多肽、或多特異性抗體。

【0242】 在一些實施方案中，本披露提供一種載體，其包含前述的核酸分子。

【0243】 在一些實施方案中，本披露提供一種宿主細胞，其由前述的載體轉化(或轉導、轉染)獲得；該宿主細胞選自原核細胞和真核細胞，較佳為真核細胞，更佳哺乳動物細胞。在一些實施方案中，該宿主細胞不包括任何能夠發育成完整個體的動物或植物細胞，如人胚胎幹細胞、受精卵、生殖細胞。

【0244】 在一些實施方案中，該宿主細胞為真核細胞，更佳哺乳動物細胞，其中該哺乳動物細胞包括但不限於 CHO、293、NSO，以及在哺乳動物細胞中進行基因編輯可改變抗體或其抗原結合片段的糖基化修飾，進而改變抗體

或其抗原結合片段的 ADCC 功能的細胞，例如，敲除 FUT8 或 GnT-III 等基因。在一些實施方案中，該哺乳動物細胞不包括人細胞。

【0245】 在一些實施方案中，本披露提供一種製備前面任一項所述的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段、雙特異性抗體、或多肽、或多特異性抗體的方法，該方法包括以下步驟：

【0246】 培養前述的宿主細胞，然後純化並回收多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段、雙特異性抗體或多肽、或多特異性抗體。

【0247】 在一些實施方案中，本披露提供一種醫藥組成物，其含有前面任一項所述的多肽複合物、或多特異性多肽複合物、或結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段、或雙特異性抗體、或核酸、或多特異性抗體、或綴合物，以及一種或多種藥學上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑。較佳地，該醫藥組成物單位劑量中可含有 0.01 至 99 重量%的前述多肽複合物、或多特異性多肽複合物、或結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段、或雙特異性抗體、或多特異性抗體、或綴合物，或醫藥組成物單位劑量中含前述多肽複合物、或多特異性多肽複合物、或結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段、或雙特異性抗體、或多特異性抗體、或綴合物的量較佳為 0.1-2000mg，更佳為 1-1000mg。

【0248】 在一些實施方案中，本披露提供前面任一項所述的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段、雙特異性抗體、醫藥組成物、或核酸分子、或多特異性抗體，在製備用於治療或預防疾病或病症的藥物中的用途。在一些實施方案中，該疾病或病症為腫瘤、

炎性疾病、自身免疫性疾病或感染性疾病。在一些實施方案中，該疾病或病症為骨相關性疾病，骨質疏鬆症、骨質減少或骨關節炎、類風濕性關節炎、牙周病或多發性骨髓瘤的疾病或障礙。在一些實施方案中，該腫瘤選自癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤和白血病或類淋巴惡性瘤。在一些實施方案中，該腫瘤選自：鱗狀細胞癌、骨髓瘤、小細胞肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭和頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、神經膠質瘤、何傑金淋巴瘤、非何傑金淋巴瘤、彌漫性大 B-細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、急性成淋巴細胞性白血病(ALL)、急性類髓細胞白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性類髓細胞白血病(CML)、原發性縱隔大 B-細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤(MCL)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、富含 T-細胞/組織細胞的大 B-細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、類髓細胞白血病-1 蛋白(Mcl-1)、骨髓異常增生綜合症(MDS)、胃腸(道)癌、腎癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴細胞性白血病、淋巴細胞白血病、結腸直腸癌、子宮內膜癌、腎癌、前列腺癌、甲狀腺癌、黑色素瘤、軟骨肉瘤、神經母細胞瘤、胰腺癌、多形性成膠質細胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宮頸癌、腦癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、肝細胞癌(HCC)、透明細胞腎細胞癌(RCC)、頭和頸癌、咽喉癌、肝膽癌(hepatobiliary cancer)、中樞神經系統癌、食管癌、惡性胸膜間皮瘤、全身性輕鏈類澱粉變性、淋巴漿細胞性淋巴瘤(lymphoplasmacytic lymphoma)、骨髓異常增生綜合症、骨髓增生性腫瘤、神經內分泌腫瘤、梅克爾細胞癌、睪丸癌和皮膚癌。在一些實施方案中，該炎性疾病選自：類風濕關節炎、牛皮癬、克羅恩病、強硬性脊椎炎、多發性硬化症、I 型糖尿病、肝炎(例如 B 肝、A 肝、C 肝)、心肌炎、Sjogren 綜合症、移植排斥後的自體免疫性溶血性貧血、水疱性類天皰瘡、格雷夫氏病、橋本甲狀腺炎、

系統性紅斑狼瘡(SLE)、重症肌無力、天皰瘡、惡性貧血。在一些實施方案中，該免疫性疾病可選自：類風濕性關節炎、牛皮癬、關節銀屑病、皮炎、系統性硬皮病及硬化症、炎症性腸病(IBD)、Crohn 病、潰瘍性結腸炎、呼吸窘迫綜合症、腦膜炎、腦炎、葡萄膜炎、腎小球腎炎、濕疹、哮喘、動脈硬化、白細胞黏附缺陷病、多發性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫複合物性腎炎、IgA 腎病、IgM 多發性神經病、免疫介導的血小板減少症狀(如急性特發性血小板減少性紫癜、慢性特發性血小板減少性紫癜)、溶血性貧血、重症肌無力、狼瘡性腎炎、系統性紅斑狼瘡、風濕關節炎(RA)、異位性皮炎、天皰瘡、Graves 病、橋本甲狀腺炎、Wegener 肉芽腫、Omenn 症候群、慢性腎功能衰竭、急性傳染性單核細胞增多症、HIV 和皰疹病毒相關的疾病、嚴重急性呼吸綜合症、脈絡視網膜炎(choreoretinitis)、以及病毒感染引起的免疫性疾病(如伊波病毒(EBV)感染 B 細胞引起或介導的疾病)。

【0249】 在一些實施方案中，本披露提供一種治療或預防疾病或病症方法，該方法包括給予受試者預防有效量或治療有效量的前面任一項所述的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段、雙特異性抗體、醫藥組成物、或核酸分子、或多特異性抗體。在一些實施方案中，該疾病或病症為腫瘤、炎性疾病、自身免疫性疾病或感染性疾病。在一些實施方案中，該疾病或病症為骨相關性疾病，骨質疏鬆症、骨質減少或骨關節炎、類風濕性關節炎、牙周病或多發性骨髓瘤的疾病或障礙。在一些實施方案中，該腫瘤選自癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤和白血病或類淋巴惡性瘤。在一些實施方案中，該腫瘤選自：鱗狀細胞癌、骨髓瘤、小細胞肺癌、非

小細胞肺癌(NSCLC)、頭和頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、神經膠質瘤、何傑金淋巴瘤、非何傑金淋巴瘤、彌漫性大 B-細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、急性成淋巴細胞性白血病(ALL)、急性類髓細胞白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性類髓細胞白血病(CML)、原發性縱隔大 B-細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤(MCL)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、富含 T-細胞/組織細胞的大 B-細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、類髓細胞白血病-1 蛋白(Mcl-1)、骨髓異常增生綜合症(MDS)、胃腸(道)癌、腎癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴細胞性白血病、淋巴細胞白血病、結腸直腸癌、子宮內膜癌、腎癌、前列腺癌、甲狀腺癌、黑色素瘤、軟骨肉瘤、神經母細胞瘤、胰腺癌、多形性成膠質細胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宮頸癌、腦癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、肝細胞癌(HCC)、透明細胞腎細胞癌(RCC)、頭和頸癌、咽喉癌、肝膽癌(hepatobiliary cancer)、中樞神經系統癌、食管癌、惡性胸膜間皮瘤、全身性輕鏈類澱粉變性、淋巴漿細胞性淋巴瘤(lymphoplasmacytic lymphoma)、骨髓異常增生綜合症、骨髓增生性腫瘤、神經內分泌腫瘤、梅克爾細胞癌、睪丸癌和皮膚癌。在一些實施方案中，該炎性疾病選自：類風濕關節炎、牛皮癬、克羅恩病、強硬性脊椎炎、多發性硬化症、I 型糖尿病、肝炎(例如乙肝、甲肝、丙肝)、心肌炎、Sjogren 綜合症、移植排斥後的自體免疫性溶血性貧血、水皰性類天皰瘡、格雷夫氏病、橋本甲狀腺炎、系統性紅斑狼瘡(SLE)、重症肌無力、天皰瘡、惡性貧血。在一些實施方案中，該免疫性疾病可選自：類風濕性關節炎、牛皮癬、關節銀屑病、皮炎、系統性硬皮病及硬化症、炎症性腸病(IBD)、Crohn 病、潰瘍性結腸炎、呼吸窘迫綜合症、腦膜炎、腦炎、葡萄膜炎、腎小球腎炎、濕疹、哮喘、動脈硬化、白細胞黏附缺陷病、多發性硬化

症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫複合物性腎炎、IgA 腎病、IgM 多發性神經病、免疫介導的血小板減少症狀(如急性特發性血小板減少性紫癜、慢性特發性血小板減少性紫癜)、溶血性貧血、重症肌無力、狼瘡性腎炎、系統性紅斑狼瘡、風濕關節炎(RA)、異位性皮炎、天皰瘡、Graves 病、橋本甲狀腺炎、Wegener 肉芽腫、Omenn 症候群、慢性腎功能衰竭、急性傳染性單核細胞增多症、HIV 和疱疹病毒相關的疾病、嚴重急性呼吸綜合症、脈絡視網膜炎(choreoretinitis)、以及病毒感染引起的免疫性疾病(如伊波病毒(EBV)感染 B 細胞引起或介導的疾病)。

【0250】 在一些實施方案中，本披露提供一種用作藥物的前面任一項所述的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段、雙特異性抗體、醫藥組成物、或核酸分子、或多特異性抗體。在一些實施方案中，該藥物用於治療或預防疾病或病症。在一些實施方案中，該疾病或病症為腫瘤、炎性疾病、自身免疫性疾病或感染性疾病。在一些實施方案中，該疾病或病症為骨相關性疾病，骨質疏鬆症、骨質減少或骨關節炎、類風濕性關節炎、牙周病或多發性骨髓瘤的疾病或障礙。在一些實施方案中，該腫瘤選自癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤和白血病或類淋巴惡性瘤。在一些實施方案中，該腫瘤選自：鱗狀細胞癌、骨髓瘤、小細胞肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭和頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、神經膠質瘤、何傑金淋巴瘤、非何傑金淋巴瘤、彌漫性大 B-細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、急性成淋巴細胞性白血病(ALL)、急性類髓細胞白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性類髓細胞白血病(CML)、原發性縱隔大 B-細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤(MCL)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、富含 T-細胞/組織細胞的大 B-細胞淋巴

瘤、多發性骨髓瘤、類髓細胞白血病-1 蛋白(Mcl-1)、骨髓異常增生綜合症(MDS)、胃腸(道)癌、腎癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴細胞性白血病、淋巴細胞白血病、結腸直腸癌、子宮內膜癌、腎癌、前列腺癌、甲狀腺癌、黑色素瘤、軟骨肉瘤、神經母細胞瘤、胰腺癌、多形性成膠質細胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宮頸癌、腦癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳腺癌、結腸癌、肝細胞癌(HCC)、透明細胞腎細胞癌(RCC)、頭和頸癌、咽喉癌、肝膽癌(hepatobiliary cancer)、中樞神經系統癌、食管癌、惡性胸膜間皮瘤、全身性輕鏈類澱粉變性、淋巴漿細胞性淋巴瘤(lymphoplasmacytic lymphoma)、骨髓異常增生綜合症、骨髓增生性腫瘤、神經內分泌腫瘤、梅克爾細胞癌、睪丸癌和皮膚癌。在一些實施方案中，該炎性疾病選自：類風濕關節炎、牛皮癬、克羅恩病、強硬性脊椎炎、多發性硬化症、I 型糖尿病、肝炎(例如乙肝、甲肝、丙肝)、心肌炎、Sjogren 綜合症、移植排斥後的自體免疫性溶血性貧血、水皰性類天皰瘡、格雷夫氏病、橋本甲狀腺炎、系統性紅斑狼瘡(SLE)、重症肌無力、天皰瘡、惡性貧血。在一些實施方案中，該免疫性疾病可選自：類風濕性關節炎、牛皮癬、關節銀屑病、皮炎、系統性硬皮病及硬化症、炎症性腸病(IBD)、Crohn 病、潰瘍性結腸炎、呼吸窘迫綜合症、腦膜炎、腦炎、葡萄膜炎、腎小球腎炎、濕疹、哮喘、動脈硬化、白細胞黏附缺陷病、多發性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫複合物性腎炎、IgA 腎病、IgM 多發性神經病、免疫介導的血小板減少症狀(如急性特發性血小板減少性紫癜、慢性特發性血小板減少性紫癜)、溶血性貧血、重症肌無力、狼瘡性腎炎、系統性紅斑狼瘡、風濕關節炎(RA)、異位性皮炎、天皰瘡、Graves 病、橋本甲狀腺炎、Wegener 肉芽腫、Omenn 症候群、

慢性腎功能衰竭、急性傳染性單核細胞增多症、HIV 和疱疹病毒相關的疾病、嚴重急性呼吸綜合症、脈絡視網膜炎(choreoretinitis)、以及病毒感染引起的免疫性疾病(如伊波病毒(EBV)感染 B 細胞引起或介導的疾病)。

【0251】 在一些實施方案中，本披露提供一種檢測方法，該方法包括：使用前面任一項所述的多肽複合物，或多特異性多肽複合物，或結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段、或雙特異性抗體、或多特異性抗體接觸待測樣本的步驟。

【0252】 在一些實施方案中，本披露提供一種用於檢測或測定的試劑，該試劑包含：前面任一項所述的多肽複合物，或多特異性多肽複合物，或結構域改造抗體、或結構域改造抗體的 Fab 片段、或雙特異性抗體、或多特異性抗體。

【圖式簡單說明】

【0253】 圖 1A 和圖 1B 為 Titin-T 和 Obscurin-O 或 Titin-T 和類 Obscurin-O 鏈結構域間相互作用界面結構圖；

【0254】 圖 2 為 CH1 和 CL 被替換的 Fab 示意圖；

【0255】 圖 3 為雙側 CH1 和 CL 被替換的 IgG 單特異性抗體結構示意圖；

【0256】 圖 4 為單側 CH1 和 CL 被替換 IgG 雙特異性抗體結構示意圖；

【0257】 圖 5 為 DI-1 雙特異性抗體結構示意圖；

【0258】 圖 6A 至圖 6C 為 DI-1 質譜分析圖。圖 6A 為 LC1/LC2 質譜圖，圖 6B 為 HC1/HC2 質譜圖；圖 6C 為為 LC1+LC2+HC1+HC2 質譜圖；

【0259】圖 7 為抗體輕鏈/重鏈交叉錯配分子結構示意圖；

【0260】圖 8 為 BU5 雙特異性抗體結構示意圖；

【0261】圖 9A 至圖 9C 為 BU5 質譜分析圖；

【0262】圖 10 為 DI-1 雙特異性抗體破骨細胞分化實驗結果圖；

【0263】圖 11 為 DI-1 雙特異性抗體 TF1 細胞增殖實驗結果圖；

【0264】圖 12 為雙特異性抗體 HJ-1、HJ-2、HJ-3 和 HJ-4 的結構示意圖；

【0265】圖 13A 至圖 13D 為雙特異性抗體 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4 的四條鏈共表達的質譜分析圖；

【0266】圖 14A 至圖 14B 為雙特異性抗體 HJ-1 的 HJ-1-H1、HJ-1-H2、HJ-1-L2 的 3 條鏈共表達的質譜分析圖；

【0267】圖 15 A 至圖 15B 為雙特異性抗體 HJ-3 的 HJ-3-H1、HJ-3-H2、HJ-3-L2 的 3 條鏈共表達的質譜分析圖；

【0268】圖 16 A 至圖 16B 為殘基之間的相互作用。

【實施方式】

【0269】為了更容易理解本披露，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本披露所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

【0270】本披露所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 J.biol.chem，243，p3558(1968)中所述。

【0271】“抗體(antibody, Ab)”一般是免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)，一個天然完整抗體是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類(class)，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈、和 ϵ 鏈。同一類 Ig 根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如 IgG 可分為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈，據此可以將抗體分為兩型(type)。五類 Ig 中每類 Ig 都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。根據 λ 鏈恆定區個別胺基酸的差異，又可分為 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 和 $\lambda 4$ 四個亞型(subtype)。

【0272】本披露所稱抗體包括抗體或其抗原結合片段，包括在免疫球蛋白基礎上經過改造，同時保留結合抗原的能力的抗體或其抗原結合片段；包括單特異性抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)；還包括一價抗體、或多價抗體(例如二價抗體)。抗體的抗原結合片段，例如可以是包含至少一個 VH-CH1 和至少一個 VL-CL 結構，其中 VH 和 VL 結構能夠基於鏈間相互作用而靠近，並保留結合抗原的能力的抗原結合片段。在一些實施方案中，該抗體的抗原結合片段為一價 Fab 片段(Fab1 片段)、二價 Fab 片段(F(ab)2)、三價 Fab 片段(F(ab)3)、多價(兩個或以上)Fab 片段，也可以是其它包含至少一個 Fab 片段的單特異性、雙特異性或多特異性抗原結合片段。

【0273】本披露所述“結構域改造抗體”是指抗體的 CH1 和/或 CL 被其他結構域或肽片段替換後形成的抗體，可用於替換抗體的 CH1/CL 結構域的結構域或肽片段通常具有分子間相互作用；可選擇的結構域組合包括但不限於：IL13RA1 Fibronectin type-III 3 結構域/IL4R Fibronectin type-III 結構域、IL6ST Fibronectin 型-III 2 結構域/IL6R Fibronectin 型-III 2 結構域、類 HFE IgC1-型結

構域/類 B2M IgC1-型結構域、類 CD1B Ig 結構域/類 B2M Ig C1-型結構域、類 Obscurin Ig1 結構域/類 Titin Ig152 結構域或類 Obscurin 類 Ig1/類 Titin Ig152 結構域。在一些實施方案中，該結構改造抗體為單特異性抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體；在一些實施方案中，該結構改造抗體為一價抗體、二價抗體或多價抗體；在一些實施方案中，該結構改造抗體為完整抗體或其抗原結合片段；在一些實施方案中，該抗體抗原結合片段是 Fab 片段，可以是一價 Fab 片段(Fab1 片段)、二價 Fab 片段(F(ab)2)、三價 Fab 片段(F(ab)3)或多價(兩個或以上)Fab 片段。示例性地，抗體 Fab 片段的 CH1 和 CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈或被 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換的結構示意圖見圖 2；抗體的 CH1 和 CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換結構示意圖見圖 3；雙特異性抗體的一側 CH1 和 CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換的結構示意圖見圖 4。至少一個 CH1 和至少一個 CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或被 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換的其它抗體：例如，二價抗體的一側 CH1 和 CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換；雙特異性抗體的兩側 CH1 和 CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換；F(ab)2 片段的 2 個 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換；F(ab)3 片段的 1 個或 2 個或 3 個 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換。

【0274】“Titin”(肌聯蛋白)是一個巨大的肌小節蛋白，具有複雜的分子折疊結構。已知它具有將粗肌絲與 Z-線連接，維持肌原纖維的完整性和穩定性等功能。肌聯蛋白是骨骼肌纖維中第三類豐富蛋白質，它的分子量為 2700kDa(25000 多個胺基酸)，長度為 1 μ m，約占肌節的一半。

【0275】“類 Titin Ig152 結構域”是 Titin 蛋白上一段命名為類 Titin Ig152 的類 Ig 結構域，該結構域能夠與類 Obscurin Ig1 或類 Obscurin 類 Ig1 結構域藉由分子間相互作用結合形成二聚體複合物(可從 RCSB PDB 數據庫獲得)。

【0276】“Titin-T 鏈”、“T 鏈”是指 Titin 蛋白中一段長度為 78-118 個胺基酸的包含類 Titin Ig152 結構域的肽段或其功能變體，該 Titin-T 鏈能夠與類 Obscurin Ig1 或類 Obscurin 類 Ig 1 結構域藉由分子間相互作用結合形成複合物。該 T 鏈功能變體是對野生型 T 鏈的部分胺基酸進行突變，但依然具有與類 Obscurin Ig1 或類 Obscurin 類 Ig1 藉由分子間相互作用結合形成複合物的肽段。本披露中，Titin-T 鏈可用於替換抗體的 CH1 或 CL 結構域，而不影響抗體 VH 和 VL 的結合及抗體與抗原表位的結合。可以對 Titin-T 鏈部分胺基酸進行突變，只要其仍能夠與類 Obscurin Ig 1 結構域彼此締合形成複合物。例如，在類 Titin Ig152 結構域 C 端和/或 N 端增加或截短合適長度的胺基酸；例如，可增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸殘基；例如，在類 Titin Ig152 結構域 N 端增加 5 個 Titin 蛋白中緊鄰類 Titin Ig152 結構域 N 端的“KAGIR”這 5 個胺基酸，；也可在類 Titin Ig152 結構域的 N 端和/或 C 端添加適當長度的連接序列(例如， $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數，如“G₄S”、“(G₄S)₂”)，使類 Titin Ig152 結構域的 N 端藉由連接序列連接抗體的 VH/或 VL。還可對類 Titin Ig152 結構域胺基酸進行其它突變，例如，對某些胺基酸突變以便增加鏈間二硫鍵，提高複合物穩定性。本披露的一些實施方案中，該 Titin-T 鏈為序列如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列有至少 80%同一性的多肽，該多肽能與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈彼此締合形成複合物。

【0277】“Obscurin”(遮蔽蛋白)，是一種由 OBSCN 基因編碼的蛋白質，屬於巨型肌胺酸信號蛋白家族。Obscurin 在心肌和骨骼肌中表達，並在肌節組

裝過程中在肌原纖維的組織中發揮重要作用。Obscurin 是肌漿網狀蛋白 sANK1 的主要細胞質配體，其可以阻止 sANK1 的降解(Lange S 等. *Molecular Biology of the Cell*. 23(13): 2490–504)；Obscurin 在肌漿網狀結構域和肌漿網狀結構域之間發揮信號聯繫的作用(Bagnato P 等，*The Journal of Cell Biology*. 160(2): 245–53.)；Obscurin 在肌原纖維組裝過程中參與新肌節的形成(Borisov AB，等，*Biochemical and Biophysical Research Communications*. 310(3): 910–918)。

【0278】“類 Obscurin Ig1 結構域”是 Obscurin 蛋白中一段命名為類 Obscurin Ig1 的類 Ig 結構域，該結構域能夠與類 Titin Ig152 結構域藉由分子間相互作用形成複合物(可從 RCSB PDB 數據庫獲得)。

【0279】“Obscurin-O 鏈”、“O 鏈”是指 Obscurin 蛋白上一段長度為 87-117 個胺基酸的包含類 Obscurin Ig1 結構域的肽段或其功能變體，該 Obscurin-O 鏈能夠與類 Titin Ig152 結構域藉由分子間相互作用形成複合物。該 Obscurin-O 鏈功能變體是對野生型 O 鏈的部分胺基酸進行突變，但其依然具有與類 Titin Ig152 結構域藉由分子間相互作用形成複合物的肽段。本披露中，Obscurin-O 鏈可替換抗體的 CH1 或 CL 結構域，而不影響抗體 VH 和 VL 的結合及抗體與抗原表位的結合。可以對 Obscurin-O 鏈部分胺基酸進行突變，只要其能夠與類 Titin Ig152 結構域彼此締合形成複合物。例如，在 Obscurin-O 結構域 C 端和/或 N 端增加或截短合適長度的胺基酸，例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸；例如在 Obscurin-O 結構域 N 端增加 5 個野生型 Obscurin 蛋白中緊鄰類 Obscurin Ig 1 結構域 N 端的“DQPQF”這 5 個胺基酸。也可在 Obscurin-O 結構域的 N 端和/或 C 端添加適當長度的連接序列(例如， $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數，如“G₄S”、“(G₄S)₂”)，使 Obscurin-O 結構域的 N 端藉由連接序列連接抗體的 VH/或 VL。還可對類 Obscurin Ig1 結構域部分胺基酸進行其它突變，例如，對某些胺基酸突變以便

增加鏈間二硫鍵，進一步提高抗體穩定性等。本披露的一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈為序列如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列有至少 80%同一性的多肽，該多肽能與 Titin-T 鏈彼此締合形成複合物。

【0280】“類 Obscurin1”、“類遮蔽蛋白 1”，是由位於人染色體 2q35 的 SPEG 內的 OBSL1 基因編碼的一種蛋白質，該蛋白與 Obscurin 密切相關。其可變剪接產生多種同工型，預測分子量範圍為 130 kD 至 230 kD(Geisler SB 等.(2007). Genomics. 89(4): 521-31)。

【0281】“類 Obscurin 類 Ig1 結構域”是類 Obscurin1 蛋白中一段命名為類 Obscurin 類 Ig1 的類 Ig 結構域，該結構域能夠與類 Titin Ig152 結構域藉由分子間天然相互作用形成複合物(可從 RCSB PDB 數據庫獲得)。

【0282】“類 Obscurin-O 鏈”、“OL 鏈”是指類 Obscurin1 蛋白上一段長度為 78-118 個胺基酸的包含類 Obscurin 類 Ig1 結構域的肽段或其功能變體。該類 Obscurin-O 鏈能夠與類 Titin Ig152 結構域藉由分子間相互作用形成複合物。該類 Obscurin-O 鏈功能變體為對野生型 OL 鏈的部分胺基酸進行突變，但其依然具有與類 Titin Ig152 結構域相互作用形成複合物的肽。本披露中，類 Obscurin-O 鏈可替換抗體的 CH1 或 CL 結構域，而不影響抗體 VH 和 VL 的結合及抗體與抗原表位的結合。還可以對類 Obscurin-O 鏈部分胺基酸進行突變，只要其能夠與類 Titin Ig152 結構域彼此締合形成複合物。在一些實施方案中，例如，在 Obscurin-O 結構域 C 端和/或 N 端增加或截短合適長度的胺基酸，例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸)。也可在類 Obscurin-O 結構域的 N 端和/或 C 端添加適當長度的連接序列(例如， $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數，如“G₄S”、“(G₄S)₂”)，使類 Obscurin-O 結構域的 N 端藉由連接序列連接抗體的 VH 或 VL。還可對類 Obscurin 類 Ig1 結

99045 第 74 頁，共 163 頁(發明說明書)

構域部分胺基酸進行其它突變，例如，對某些胺基酸突變以便增加鏈間二硫鍵、進一步提高抗體穩定性等。本披露的一些實施方案中，該類 Obscurin-O 鏈為序列如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示序列具有至少 80% 同一性多肽，該多肽能與 Titin-T 鏈彼此締合形成複合物。

【0283】另外，可對類 Titin Ig152 結構域、類 Obscurin Ig1 結構域或類 Obscurin 類 Ig1 結構域上的部分胺基酸進行突變，只要其仍能夠使類 Titin Ig152 結構域與類 Obscurin Ig1 結構域，或類 Titin Ig152 結構域與類 Obscurin 類 Ig1 結構域彼此締合形成複合物。在一些實施方案中，可以在類 Titin Ig152 結構域、類 Obscurin Ig1 結構域或類 Obscurin 類 Ig1 結構域的 C 端和/或 N 端增加或截短合適長度的胺基酸(例如緊鄰結構域的野生型蛋白的 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸)，只要其仍能夠使類 Titin Ig152 結構域與類 Obscurin Ig1 結構域，或類 Titin Ig152 結構域與類 Obscurin 類 Ig1 結構域彼此締合形成複合物。例如，在類 Titin Ig152 結構域 N 端增加 5 個野生型 Titin 蛋白中緊鄰類 Titin Ig152 結構域 N 端的“KAGIR”這 5 個胺基酸；或在類 Obscurin Ig1 結構域 N 端增加 5 個野生型 Obscurin 蛋白中緊鄰類 Obscurin Ig1 結構域 N 端的“DQPQF”這 5 個胺基酸。在一些實施方案中，可以在類 Titin Ig152 結構域、類 Obscurin Ig1 結構域或類 Obscurin 類 Ig1 結構域的 N 端和/或 C 端可添加適當長度的連接序列(例如， $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數，如“G₄S”、“(G₄S)₂”)，使類 Titin Ig 152 結構域、類 Obscurin Ig 1 結構域、類類 Obscurin Ig 1 結構域的 N 端藉由連接序列連接抗體的 VH 或 VL。在一些實施方案中，還可對類 Titin Ig 152 結構域、類 Obscurin Ig 1 結構域或類類 Obscurin Ig 1 結構域上的部分胺基酸進行其它突變，只要其仍能夠使類 Titin Ig 152 結構域與類 Obscurin Ig 1 結構域，或類 Titin Ig 152 結構域與類類

Obscurin Ig 1 結構域彼此相互作用形成複合物，例如，對部分胺基酸突變以增加鏈間二硫鍵，進一步提高抗體穩定性等。

【0284】“Fab 片段”，是指可以藉由酶處理單株抗體來生產獲得的能夠結合抗原的片段，該片段包含輕鏈(VL-CL)和重鏈的 VH-CH1 結構。

【0285】“結構域改造的 Fab 片段”是指抗體 Fab 片段中 CL 和/或 CH1 被其他結構域或肽片段替換後形成的多肽片段，結構域改造的 Fab 片段仍保留 VH 和 VL 間的相互作用，以及保留抗體與抗原的結合能力。在一些實施方案中，結構域改造的 Fab 片段可以作為多價抗體或多價多肽複合物的一部分。在另一些實施方案中，結構域改造的 Fab 片段作為一個單一的蛋白分子。Fab 片段可以是一價 Fab 片段(Fab 片段 1)、二價 Fab 片段(F(ab)2)、三價 Fab 片段(F(ab)3)或多價(兩個或以上)Fab 片段。示範性地，Fab 片段的 CH1 和 CL 被替換的示意圖見圖 2。

【0286】術語“特異性抗體”或“特異性多肽複合物”指能夠對目標抗原或抗原表位特異性結合的抗體或多肽複合物。根據抗體結合的不同目標抗原或不同抗原表位的數目，分為單特異性抗體、雙特異性抗體、三特異性抗體、四特異性抗體.....，多特異性(結合兩個或兩個以上不同目標抗原或不同抗原表位)抗體。根據多肽複合物結合的不同目標抗原或不同抗原表位的數目，分為單特異性多肽複合物、多特異性多肽複合物、三特異性多肽複合物、四特異性多肽複合物.....，多特異性(結合兩個或兩個以上不同目標抗原或不同抗原表位)多肽複合物。例如，“雙特異性抗體”指能夠對兩個不同抗原或同一抗原的兩個不同抗原表位特異性結合的抗體(包括抗體或其抗原結合片段，如單鏈抗體)。現有技術已公開了各種結構的雙特異性抗體；根據 IgG 分子的完整性分可為類 IgG 雙特異性抗體和抗體片段型雙特異性抗體；根據抗原結合區域的數量構型可分為二價、三價、四價或更多價的雙特異性抗體；根據結構左右是否對稱性可分

為對稱結構雙特異性抗體和不對稱結構雙特異性抗體。其中，基於抗體片段的雙特異性抗體，例如缺乏 Fc 片段的 Fab 片段，其藉由將 2 個或多個 Fab 片段結合在一個分子中形成雙特異性抗體，其具有較低的免疫原性，且分子量小，具有較高的腫瘤組織滲透性，該類型的典型的抗體結構如 F(ab)₂、scFv-Fab、(scFv)₂-Fab 等雙特異性抗體；類 IgG 雙特異性抗體(例如具有 Fc 片段)，這類抗體相對分子量較大，Fc 片段有助於抗體後期的純化，並提高其溶解性、穩定性，Fc 部分還可能會與受體 FcRn 結合，增加抗體血清半衰期，典型的雙特異性抗體結構模型如 KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、FcΔAdp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2:1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP-DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)₂- CrossMAb、IgG-(scFv)₂、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、(scFv)₄-Fc、CODV-Ig、mAb₂、F(ab)₄- CrossMAb 等等雙特異性抗體(參見 Aran F. Labrijn 等，Nature Reviews Drug Discovery volume 18，pages585–608(2019)；Chen S1 等，J Immunol Res. 2019 Feb 11；2019:4516041)。

【0287】術語“一價”、“二價”、“三價”或“多價”是指抗體或多肽複合物中存在指定數量的抗原結合位點。例如“一價抗體”表示抗體中存在一個抗原結合位點，“一價多肽複合物”表示多肽複合物中存在一個抗原結合位點；“二價抗體”表示抗體中存在兩個抗原結合位點，“二價多肽複合物”表示多肽複合物中存在兩個抗原結合位點；“三價抗體”表示抗體中存在三個抗原結合位點，“三價多肽複合物”表示多肽複合物中存在三個抗原結合位點；“多價抗體”表示抗體中存在多個(例如，存在三個或三個以上抗原結合位點)抗原結合位點，“多價多肽複合物”表示多肽複合物中存在多個(例如，存在兩個或兩個以上抗原結合位點)抗原結合位點。

【0288】術語“多肽”、“肽”或“蛋白”在本披露中可互換使用，其指胺基酸殘基的聚合物，或多個胺基酸殘基聚合物的集合體。這些術語應用於其中的一個或多個胺基酸殘基為對應的天然存在的胺基酸的人造化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天然存在的胺基酸聚合物和非天然存在的胺基酸聚合物。多肽序列通常記述為多肽序列的左手端為胺基末端(N 末端、N 端)；多肽序列的右手端為羧基末端(C 末端、C 端)。本披露的“多肽複合物”是指包含一個或多個與實現某些功能相關的多肽的複合物。在一些實施方式中，該多肽複合物為能與抗原特異性結合的抗體或其抗原結合片段。

【0289】術語針對抗原的“結合區”或“結合位點”、“結合結構域”是指在特異性蛋白分子(例如抗體分子)中，能夠與抗原特異性結合的區域或部分，抗原結合區可以是能直接與抗原結合的配體結合結構域部分，也可以是能直接與抗原結合的包含抗體可變區的結構域。

【0290】術語“可操作地連接”或“可操作的連接”或“可操作連接”是指兩個或更多個生物學序列以使其處於以目的方式作用的方式連接，無論是否存在間隔區(也稱接頭、連接子、連接序列)。當用於多肽時，該術語表示多肽序列以使所連接的產物具有目的生物學功能的方式連接，兩條序列間可以存在或不存在間隔區。例如，可將抗體可變區可操作地連接至恆定區，以形成具有抗原結合活性的穩定產物。該術語還可用於多核苷酸。例如，當編碼多肽的多核苷酸可操作地連接至調控序列(例如啟動子、增強子、沉默子序列等)時，該術語表示該多核苷酸序列以允許該多肽由該多核苷酸調控表達的方式連接。

【0291】術語“二聚化結構域”是指能夠促進彼此締合以形成二聚體的多肽結構域。在一些實施方案中，第一二聚化結構域可以與第二二聚化結構域締合。該締合可以藉由任何合適的方式進行結合或連接或鍵合；例如，藉由連接子，二硫鍵，氫鍵，靜電相互作用，鹽橋，或疏水-親水相互作用，或者其組

合。示例性二聚化結構域包括但不限於抗體鉸鏈區、抗體 CH2 結構域、抗體 CH3 結構域、和能夠彼此二聚化和相互作用的其他合適的蛋白質單體或多肽。鉸鏈區、CH2、CH3 可以衍生自任何抗體同種型，例如 IgG1，IgG2、IgG3 和 IgG4。

【0292】術語“相互作用結構域”是指能夠促進兩個或更多個同源或異源多肽的相互作用或締合的多肽的結構域。例如相互作用結構域為促進彼此締合以形成二聚體的二聚化結構域。蛋白間相互作用的結構域是兩個或更多個蛋白之間相互作用或締合的多肽的結構域，例如，Obscurin-like 蛋白中的 Obscurin-like Ig-like 1 結構域，能夠與 Titin 蛋白的 Titin Ig-like 152 結構域藉由分子間相互作用形成複合物。在一些實施方案中，與 Titin-T 鏈相互作用的結構域是 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈。

【0293】術語“二聚體”是指兩個分子(例如多肽或蛋白質)藉由共價或非共價相互作用而形成的結構。同型二聚體或同型二聚化由兩個相同的分子形成，異二聚體或異二聚化由兩個不同的分子形成。兩個分子可藉由天然鏈間鍵形成二聚體，也可以藉由非天然鏈間鍵形成二聚體。本披露的一些實施方案中，Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈可藉由天然鏈間鍵形成二聚體。本領域技術人員公知，兩個彼此締合形成二聚體的結構域，其中第一結構域與第二結構域之間間距在 6 埃以內的接觸界面殘基(尤其是 4.5 埃以內的殘基)對維持兩個結構域的締合起到關鍵作用(Yan, Changhui et al.

“Characterization of protein-protein interfaces.” The protein journal vol. 27,1 (2008): 59-70)。藉由 MOE(Molecular Operating Environment)系統分析 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈締合形成的複合物(見圖 1A 和圖 1B)，發現 Titin-T 鏈上的第 7-15、19-24、26、55、59 和 60 位中的一個或多個殘基與 Obscurin-O 鏈上的第 3-6、9、41、73、75 和 80-90 位中的一個或多個殘

基彼此相互作用，Titin-T 鏈上的第 1、7-10、13-16、19-26、59-60 和 96 位中的一個或多個殘基與類 Obscurin-O 鏈上的第 4-5、10、12-13、74、76、78 和 82-91 位中的一個或多個殘基彼此相互作用(參見圖 16A 和圖 16B)，上述位點的接觸界面殘基間距在 4.5 埃以內，其對維持兩個結構域的締合起到重要作用。另外，在另外一些實施方案中，Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈可藉由非天然鏈間鍵形成二聚體，其中該二聚體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個或更多個非天然鏈間鍵。可以藉由對 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈上的一些胺基酸進行突變，從而使 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈之間形成二硫鍵，從而穩定化二聚體。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該 Obscurin-O 鏈具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 的一個或多個胺基酸殘基突變；或者該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 的一個或多個胺基酸殘基突變，和/或該類 Obscurin-O 鏈具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變。在一些實施方案中，該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 A88C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，Obscurin-O 鏈具有 A3C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，Obscurin-O 鏈具有 R9C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A88C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A3C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 R9C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 V74C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 G84C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 A86C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突變。在一些實施方案中，該 Obscurin-O 鏈還具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變；較佳地，該 Obscurin-O 鏈具有選自 L7K 或 L7R、K11L、T62K 或 T62H 的一個或多個胺基酸殘基突變；最佳地，該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突變；Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突變；或者 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H。上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於 T.0 鏈(序列 SEQ ID NO：32)的自然順序位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於 O.0 鏈(序列 SEQ ID NO：33)的自然順序位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於 OL.0 鏈(序列 SEQ ID NO：34)的自然順序位點。

【0294】 本披露中，”錯配”是指兩個或更多個同源或異源多肽相互作用或締合形成不期望的二聚體或多聚體配對。“不容易發生錯配”意指，例如，當多肽 A1、B1 和 B2 共表達時，如果期望的 A1-B1 二聚體的表達量大於 A1-B 2 二

99045 第 81 頁，共 163 頁(發明說明書)

聚體的量，則認為在 A1- B 1 之間發生優先配對，即 A1- B 2 之間不容易發生錯配。本披露中，在一些實施例中，多特異性多肽複合物中，第一多肽複合物的 VH1 與第二多肽複合物的 VL2 之間不容易發生錯配，和/或第一多肽複合物的 VL1 與第二多肽複合物的 VH2 之間不容易發生錯配，而是 VH1-VL1 之間優先配對，VH2-VL2 之間優先配對。

【0295】“二硫鍵”是指結構 R-S-S-R'中硫原子間形成的共價鍵。胺基酸半胱氨酸包含硫醇基團，其可以與第二個硫醇基團形成二硫鍵，例如與另一個半胱氨酸殘基的硫醇基團形成二硫鍵。二硫鍵可以在分別位於兩條多肽鏈上的兩個半胱氨酸殘基的硫醇基團之間形成，從而形成鏈間橋或鏈間鍵。

【0296】靜電相互作用是非共價相互作用，並且在蛋白質折疊，穩定性，柔韌性和功能中起到重要作用，包括離子相互作用，氫鍵和鹵素鍵合。靜電相互作用可以在多肽中形成，例如，在 Lys 和 Asp 之間，在 Lys 和 Glu 之間，在 Glu 和 Arg 之間，或在第一鏈上的 Glu，Trp 和在第二鏈上的 Arg，Val 或 Thr 之間。

【0297】鹽橋是近距離靜電相互作用，其主要來自 Asp 或 Glu 的陰離子羧酸根和來自 Lys 的陽離子銨或 Arg 的胍基，其是天然蛋白質結構中的空間上靠近的帶相反電荷殘基對。疏水的界面中的帶電和極性殘基可以作為用於結合的熱點。其中，具有可電離側鏈的殘基如 His，Tyr 和 Ser 也可參與鹽橋的形成。

【0298】親水相互作用，帶有極性基團的分子，對水有大的親和能力，分子能透過氫鍵和水形成短暫鍵結。疏水相互作用是非極性分子之間的一種非共價的相互作用。這些非極性分子(如一些中性胺基酸殘基，也稱疏水殘基)在水相環境中具有避開水而相互聚集的傾向。例如可以在第一鏈上的一個或多個 Val，Tyr 和 Ala 與第二鏈上的一個或多個 Val，Leu 和 Trp 之間形成疏水相互作用

用，或者在第一鏈上形成 His 和 Ala，在第二鏈上形成 Thr 和 Phe。(參見 Brinkmann 等，2017)。

【0299】術語“氫鍵”，當氫原子與高電負性原子如氮，氧或氟共價結合時，藉由兩個極性基團之間的靜電引力形成氫鍵。在多肽的兩個殘基的骨架氧(例如硫族元素基團)和鹽胺氫(氨基團)之間可以形成氫鍵，例如 Asn 中的氨基團和 His 中的氧基團，或者 Asn 中的氧基團和 Lys 中的氨基團之間形成氫鍵。氫鍵比范德華相互作用強，但弱於共價鍵或離子鍵，並且對於維持二級結構和三級結構是關鍵的。例如，當胺基酸殘基的間隔在位置 i 和 $i + 4$ 之間有規律地發生時形成 α 螺旋，當兩條肽藉由至少兩個或三個骨架氫鍵連接時形成的 3-10 個胺基酸長的肽段形成扭曲的褶皺的片層為 β 折疊。

【0300】如本文所用，“旋鈕進入孔”、“knob-into-hole”是指兩條多肽之間的相互作用，其中一條多肽由於存在具有龐大側鏈的胺基酸殘基(例如酪胺酸或色胺酸)而具有突起(即“旋鈕”、knob)。另一條多肽具有空腔(即“孔”、hole)，其中存在小的側鏈胺基酸殘基(例如丙胺酸或蘇胺酸)，並且突起可定位在空腔中，以促進兩種多肽的相互作用以形成異二聚體或複合物。產生具有突起到孔的多肽的方法是本領域已知的，可參見專利 US5731169、WO1996027011 等。

【0301】“非天然的鏈間鍵”是指在野生型多肽聚合物中未發現的鏈間鍵。例如，非天然鏈間鍵可以在一條多肽的突變的胺基酸殘基和另一條多肽的野生型胺基酸殘基或突變胺基酸殘基之間形成。在某些實施方案中，至少一個非天然鏈間鍵為胺基酸突變後形成的“二硫鍵”。在本披露的一些實施方案中，Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈、或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈之間的非天然的鏈間鍵是藉由對 Titin-T 鏈上選自第 8、20、22、25、26 和 39 位，和/或 Obscurin-O 鏈上選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變而形成；或者

藉由對 Titin-T 鏈選自第 8、20、22、25、26 和 39 位，和/或類 Obscurin-O 鏈上選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變而形成。

【0302】術語“接觸界面”是指多肽上的特定區域，其中多肽彼此接觸或相互作用。接觸界面包含一個或多個胺基酸殘基，相互作用發生時，某多肽上的接觸界面胺基酸殘基能夠和與其接觸的相應胺基酸殘基相互作用。接觸界面中的胺基酸殘基可以是連續或不連續序列。例如，當界面是三維時，界面內的胺基酸殘基可以在線性序列上的不同位置分開。

【0303】“連接結構域”或“連接域”或“間隔區”是指兩條多肽序列融合或組合的邊界或邊界區域。例如，連接結構域可包含來自第一融合多肽的至少一部分 C 末端片段，其與來自第二融合多肽的 N 末端片段的至少一部分融合，其間具有或不具有其它間隔區。例如，間隔區可富含甘胺酸和脯胺酸殘基。例如具有由蘇胺酸/絲胺酸和甘胺酸組成的單個或重複序列的間隔區，GGGGS、TGGGG、SGGGG、或其串聯重複序列(例如 2，3，4，5 或更多個重複)。在某些實施方案中，間隔區包含 GGGGS 或其 2 個或更多個串聯重複序列。

【0304】天然完整抗體包含兩條重鏈和兩條輕鏈。每條重鏈由可變區(“HCVR”、VH)和第一，第二和第三恆定區(CH1，CH2 和 CH3)組成，抗體第二(CH2)和第三(CH3)恆定區組成“Fc”，CH2 的 N 端可含或不含抗體鉸鏈區部分，鉸鏈區部分富含脯胺酸，包括鏈間二硫鍵；而每條輕鏈由可變區(“LCVR”、VL)和恆定區組成(CL)。靠近重鏈和輕鏈 N 端的約 110 個胺基酸的序列變化很大，為可變區(Fv 區)；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區。可變區包括 3 個高變區(HVR)和 4 個序列相對保守的骨架區(FR)。3 個高變區決定抗體的特異性，又稱為互補決定區(CDR)。每條輕鏈可變區(VL)和重鏈可變區(VH)由 3 個 CDR 區 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指

LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

【0305】本披露的抗體，例如，可以是源自動物的抗體(如鼠、禽、兔、駱駝、猴等來源抗體)、嵌合抗體、人源化抗體和全人源抗體。本披露抗體除包括全長抗體外，還包括能結合抗原的抗原結合片段。

【0306】術語“鼠源抗體”在本披露中為根據本領域知識和技能製備的針對抗原的單株抗體。製備時用抗原注射試驗對象，然後分離表達具有所需序列或功能特性的抗體的融合瘤。在本披露一個較佳的實施方案中，該鼠源抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其變體的重鏈恆定區。

【0307】術語“嵌合抗體(chimeric antibody)”，是將其它第一物種抗體的可變區與第二物種抗體的恆定區融合而成的抗體。例如，建立人鼠嵌合抗體，要先建立分泌鼠源性特異性單抗的融合瘤，然後從鼠融合瘤細胞中選殖可變區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基因，將鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入表達載體中，最後在真核系統或原核系統中表達嵌合抗體分子。在本披露一個較佳的實施方案中，該嵌合抗體的抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。該抗原嵌合抗體的抗體重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變(例如 L234A 和/或 L235A 突變，和/或 S228P 突變)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 變體。

【0308】術語“人源化抗體(humanized antibody)”，也稱為 CDR 移植抗體(CDR-grafted antibody)，是指將鼠的 CDR 序列移植到人的抗體可變區框架，即不同類型的人種系抗體框架序列中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量鼠蛋白成分，從而誘導的異源性反應。此類構架序列可以從包括種系抗體基

因序列的公共 DNA 數據庫或公開的參考文獻獲得。如人重鏈和輕鏈可變區基因的種系 DNA 序列可以在“VBase”人種系序列數據庫獲得，以及在 Kabat，E.A.等人發表，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對該人抗體可變區框架序列進行最少反向突變或回復突變，以保持活性。本披露的人源化抗體也包括進一步由酵母菌展示對 CDR 進行親和力成熟突變後的人源化抗體。

【0309】在本披露一個的實施方案中，該抗體或其抗原結合片段，可進一步包含人源或鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的重鏈恆定區，或進一步包含人源或鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈恆定區；較佳包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變(例如 L234A 和/或 L235A 突變、和/或 S228P 突變)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 變體。

【0310】本披露公開中所述人抗體重鏈恆定區和人抗體輕鏈恆定區包括其的“常規變體”是指，其為現有技術已公開的來源於人的不改變抗體可變區結構和功能的重鏈恆定區或輕鏈恆定區的變體，示例性變體包括對重鏈恆定區進行定點改造和胺基酸替換的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重鏈恆定區變體，具體替換如現有技術已知的 YTE 突變，L234A 和/或 L235A 突變，S228P 突變，和/或獲得 knob-into-hole 結構的突變(使得抗體重鏈具有 knob-Fc 和 hole-Fc 組合)，這些突變已被證實使得抗體具有新的性能，但不改變抗體可變區的功能。

【0311】“人抗體”(HuMAb)、“人源抗體”、“全人抗體”、“完全人抗體”可以互換使用，可以是源於人的抗體或者是從一種轉基因生物體中獲得的抗體，該轉基因生物體經“改造”以響應於抗原刺激而產生特異性人抗體並且可以藉由本領域已知的任何方法產生。轉基因生物可以合成人抗體，並且該生物可以用於產生人抗體-分泌融合瘤。人抗體還可以是一種抗體，其中重鏈和輕鏈是由源於一個或更多個人 DNA 來源的核苷酸序列編碼的。完全人抗體還可以藉

由基因或染色體轉染方法以及噬菌體展示技術來構建，或者由體外活化的 B 細胞構建，所有的這些都是本領域已知的。

【0312】術語“全長抗體”、“完整抗體”、“完全抗體”和“全抗體”在本文中可互換使用，指基本上完整形式的抗體，與下文定義的抗原結合片段相區分。該術語特別指輕鏈和重鏈包含恆定區的抗體。本披露“抗體”包含“全長抗體”及其抗原結合片段。

【0313】在一些實施方案中，本披露的全長抗體包括輕鏈可變區與輕鏈恆定區連接的輕鏈和重鏈可變區與重鏈恆定區連接的重鏈所形成的全長抗體。本領域技術人員可以根據實際需要選擇不同的抗體來源的輕鏈恆定區、重鏈恆定區，例如人抗體來源的輕鏈恆定區和重鏈恆定區。

【0314】術語抗體的“抗原結合片段”是指抗體中保持抗原(例如，抗原)結合能力的一個或更多個片段。已顯示可利用全長抗體的片段來進行抗體的抗原結合功能。術語抗體的“抗原結合片段”中包含的結合片段的實例包括(i)Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 結構域組成的單價片段；(ii)F(ab')₂ 片段，包含藉由鉸鏈區上的二硫橋連接的兩個 Fab 片段的二價片段，(iii)由 VH 和 CH1 結構域組成的 Fd 片段；(iv)由抗體的單臂的 VH 和 VL 結構域組成的 Fv 片段；(v)dsFv，由 VH 和 VL 經鏈間二硫鍵形成的穩定的抗原結合片段；(vi)包含 scFv、dsFv、Fab 等片段的雙抗體、雙特異性抗體和多特異性抗體。此外，雖然 Fv 片段的兩個結構域 VL 和 VH 由分開的基因編碼，但可使用重組方法，藉由合成的接頭連接它們，從而使得其能夠產生為其中 VL 和 VH 區配對形成單價分子的單個蛋白質鏈(稱為單鏈 Fv(scFv)；參見，例如，Bird 等人(1988)Science242 :423-426 ；和 Huston 等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此類單鏈抗體也包括在術語抗體的“抗原結合片段”中。使用本領域技術人員已知的常規技術獲得此類抗體片段，並且以與對於完整抗體

的方式相同的方式就功用性篩選片段。可藉由重組 DNA 技術或藉由酶促或化學斷裂完整免疫球蛋白來產生抗原結合部分。抗體可以是不同種型的抗體，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亞型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗體。

【0315】 F(ab')₂ 是藉由用酶消化 IgG 鉸鏈區中兩個二硫鍵的下方部分而獲得的分子量為約 100,000 並具有抗原結合活性並包含在鉸鏈位置相連的兩個 Fab 區的抗體片段。

【0316】 Fab' 是藉由切割上述 F(ab')₂ 的鉸鏈區的二硫鍵而獲得的分子量為約 50,000 並具有抗原結合活性的抗體片段。本披露的 Fab' 可以藉由用還原劑例如二硫蘇糖醇處理本披露的特異性識別抗原的 F(ab')₂ 來生產。

【0317】 此外，可以藉由將編碼抗體的 Fab' 片段的 DNA 插入到原核生物表達載體或真核生物表達載體中並將載體導入到原核生物或真核生物中以表達 Fab' 來生產該 Fab'。

【0318】 術語“單鏈抗體”、“單鏈 Fv”或“scFv”意指包含藉由接頭連接的抗體重鏈可變結構域(或區域；VH)和抗體輕鏈可變結構域(或區域；VL)的分子。此類 scFv 分子可具有一般結構：NH₂-VL-接頭-VH-COOH 或 NH₂-VH-接頭-VL-COOH。合適的現有技術接頭由重複的 GGGGS 胺基酸序列或其變體組成，例如使用 1-4 個重複的變體(Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448)。可用於本披露的其他接頭由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur.J.Immuno 1.31:94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol. 描述。

【0319】雙抗體是其中 scFv 或 Fab 被二聚體化的抗體片段，是具有二價抗原結合活性的抗體片段。在二價抗原結合活性中，兩個抗原可以是相同或不同的。

【0320】本披露的雙抗體可以藉由以下步驟來生產：獲得本披露的抗體的 VH 和 VL 的編碼 cDNA，構建編碼 scFv 的 DNA，將該 DNA 插入到表達載體中，然後將該表達載體導入到原核生物或真核生物中以表達雙抗體。

【0321】dsFv 是藉由將其中每個 VH 和 VL 中的一個胺基酸殘基被半胱胺酸殘基取代的多肽經由半胱胺酸殘基之間的二硫鍵相連而獲得的。可以按照已知方法(Protein Engineering, 7, 697(1994))基於抗體的三維結構預測來選擇被半胱胺酸殘基取代的胺基酸殘基。

【0322】本披露的全長抗體或抗原結合片段或雙特異性抗體或多特異性抗體、多肽、多肽複合物、多特異性多肽複合物，可以藉由以下步驟來生產：獲得本披露的抗體的編碼 cDNA，構建編碼 dsFv 的 DNA，將該 DNA 插入到表達載體中，然後將該表達載體導入到原核生物或真核生物中以表達 dsFv。

【0323】術語“胺基酸差異”或“胺基酸突變”是指相較于原蛋白質或多肽，變體蛋白質或多肽存在胺基酸的改變或突變，包括在原蛋白質或多肽的基礎上發生 1 個、2 個、3 個或更多個胺基酸的插入、缺失或替換。

【0324】術語“抗體框架”或“FR 區”，是指可變結構域 VL 或 VH 的一部分，其用作該可變結構域的抗原結合環(CDR)的支架。從本質上講，其是不具有 CDR 的可變結構域。術語“互補決定區”、“CDR”或“高變區”是指抗體的可變結構域內主要促成抗原結合的 6 個高變區之一。通常，每個重鏈可變區中存在三個 CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每個輕鏈可變區中存在三個 CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各種公知方案中的任何一種來確定 CDR 的胺基酸序列邊界，包括“Kabat”編號規則(參見 Kabat 等(1991)，

“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD）、“Chothia”編號規則(參見 Al-Lazikani 等人，(1997)JMB 273：927-948)和 ImMunoGenTics(IMG)編號規則 (Lefranc M.P.，Immunologist，7，132-136(1999)；Lefranc，M.P.等，Dev. Comp. Immunol.，27，55-77(2003)等。

【0325】術語“表位”或“抗原決定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗體特異性結合的部位(例如，抗原分子上的特定部位)。表位通常以獨特的空間構象包括至少 3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14 或 15 個連續或非連續的胺基酸。參見，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G.E.Morris，Ed.(1996)。

【0326】術語“特異性結合”、“選擇性結合”、“選擇性地結合”或“特異性地結合”是指抗體對預先確定的抗原上的表位的結合。通常，抗體以大約小於 10^{-7}M ，例如大約小於 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小的親和力 (KD)結合。

【0327】術語“KD”是指特定抗體-抗原相互作用的解離平衡常數。通常，本披露的抗體以小於大約 10^{-7}M ，例如小於大約 10^{-8}M 或 10^{-9}M 的解離平衡常數(KD)結合抗原，例如，在本披露中抗體與抗原的親和力採用 FACS 法測定 KD 值。

【0328】當術語“競爭”用於競爭相同表位的抗原結合蛋白(例如中和抗原結合蛋白或中和抗體)的情況中時，意指在抗原結合蛋白之間競爭，其藉由以下測定法來測定：在該測定法中，待檢測的抗原結合蛋白(例如抗體或其免疫學功能片段)防止或抑制(例如降低)參考抗原結合蛋白(例如配體或參考抗體)與共同抗原的特異性結合。眾多類型的競爭性結合測定可用於確定一種抗原結合蛋白是否與另一種競爭，這些測定例如：固相直接或間接放射免疫測定(RIA)、固相

直接或間接酶免疫測定(EIA)、夾心競爭測定(參見例如 Stahli 等，1983，*Methods in Enzymology* 9：242-253)；固相直接生物素-親和素 EIA(參見例如 Kirkland 等，1986，*J.Immunol.*137：3614-3619)、固相直接標記測定、固相直接標記夾心測定(參見例如 Harlow 和 Lane，1988，*Antibodies，A Laboratory Manual*(抗體，實驗室手冊)，Cold Spring Harbor Press)；用 I-125 標記物的固相直接標記 RIA(參見例如 Morel 等，1988，*Molec.Immunol.*25：7-15)；固相直接生物素-親和素 EIA(參見例如 Cheung，等，1990，*Virology*176：546-552)；和直接標記的 RIA(Moldenhauer 等，1990，*Scand.J.Immunol.*32：77-82)。通常該測定法涉及使用結合荷有未標記的檢測抗原結合蛋白及標記的參考抗原結合蛋白任一種的固態表面或細胞的純化的抗原。藉由測量在所測抗原結合蛋白存在下結合固態表面或細胞的標記的量來測量競爭性抑制。通常所測抗原結合蛋白過量存在。由競爭性測定(競爭抗原結合蛋白)鑒定的抗原結合蛋白包括：結合與參考抗原結合蛋白同一表位的抗原結合蛋白；和結合充分接近參考抗原結合蛋白的結合表位的鄰近表位的抗原結合蛋白，該兩個表位在空間上互相妨礙發生結合。在本文實施例中提供關於用於測定競爭性結合的方法的其它詳細資料。通常當競爭的抗原結合蛋白過量存在時，其將抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或 75%或更多參考抗原結合蛋白與共同抗原的特異性結合。在某些情況下，結合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或 97%或更多本文中使用的術語“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是單鏈或雙鏈的，較佳是雙鏈 DNA 或單鏈 mRNA 或修飾的 mRNA。當將核酸與另一個核酸序列置於功能關係中時，核酸是“有效連接的”。例如，如果啟動子或增強子影響編碼序列的轉錄，那麼啟動子或增強子有效地連接至該編碼序列。

【0329】術語“表達載體”是指能夠運輸已與其連接的另一個核酸的核酸分子。在一個實施方案中，載體是“質粒”，其是指可將另外的 DNA 區段連接至其中的環狀雙鏈 DNA 環。在另一個實施方案中，載體是病毒載體，其中可將另外的 DNA 區段連接至病毒基因組中。本文中公開的載體能夠在已引入它們的宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌的複製起點的細菌載體和附加型哺乳動物載體)或可在引入宿主細胞後整合入宿主細胞的基因組，從而隨宿主基因組一起複製(例如，非附加型哺乳動物載體)。

【0330】現有技術中熟知生產和純化抗體和抗原結合片段的方法，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8 章和 15 章。例如，鼠可以用抗原免疫，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 區加上一個或更多個人源 FR 區。人 FR 種系序列可以藉由比對 IMGT 人類抗體可變區種系基因數據庫和 MOE 軟件，從 ImMunoGeneTics(IMGT)的網站得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351 上獲得。

【0331】術語“宿主細胞”是指已向其中引入了表達載體的細胞。宿主細胞可包括細菌、微生物、植物或動物細胞。易於轉化的細菌包括腸桿菌(*enterobacteria*)的成員，例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)或沙門氏菌(*Salmonella*)的菌株；芽孢桿菌(*Bacillus*)例如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；鏈球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。適當的微生物包括釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。適當的動物宿主細胞系包括 CHO(中國倉鼠卵巢細胞系)、293 細胞和 NS0 細胞。

【0332】本披露工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。比如，編碼重鏈和輕鏈的 cDNA 序列，可以選殖並重組至表達載體。重組的表達載體可以穩定地轉染 CHO 細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表達系統會導致抗體的糖基化，特別是在 Fc 區的高度保守 N 端位點。藉由表達與抗原特異性結合的抗體得到穩定的純株。陽性的純株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化。比如，用 A 或 G Sepharose FF 管柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用 pH 梯度法沖提結合的抗體，用 SDS-PAGE 檢測抗體片段，收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70℃，或者凍乾。

【0333】“施用”、“給予”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“施用”、“給予”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。“施用”、“給予”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組合物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0334】“治療”意指給予受試者內用或外用治療劑，例如包含本披露的任一種結合化合物的組合物，該受試者具有一種或多種疾病症狀，而已知該治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療受試者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發展到任何臨床可測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作“治療有效量”)可根據多種因素變化，例如受試者的疾病狀態、年齡和體重，以及

藥物在受試者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本披露的實施方案(例如治療方法或製品)在緩解每個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如 Student t 檢驗、卡方檢驗、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢驗、Kruskal-Wallis 檢驗(H 檢驗)、Jonckheere-Terpstra 檢驗和 Wilcoxon 檢驗確定，其在統計學顯著數目的受試者中應當減輕目標疾病症狀。

【0335】“保守修飾”或“保守置換或取代”是指具有類似特徵(例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等)的其它胺基酸置換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性(參見例如 Watson 等(1987)Molecular Biology of the Gene，The Benjamin/Cummings Pub.Co.，第 224 頁，(第 4 版))。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破壞生物學活性。示例性保守取代於下表“示例性胺基酸保守取代”中陳述。示例性胺基酸保守取代：

原始殘基 保守取代

Ala(A) Gly；Ser

Arg(R) Lys；His

Asn(N) Gln；His；Asp

Asp(D) Glu；Asn

Cys(C) Ser；Ala；Val

Gln(Q) Asn；Glu

Glu(E) Asp；Gln

Gly(G) Ala

His(H) Asn ; Gln ; Lys; Arg

Ile(I) Leu ; Val

Leu(L) Ile ; Val

Lys(K) Arg ; His

Met(M)Leu ; Ile ; Tyr

Phe(F) Tyr ; Met ; Leu

Pro(P) Ala

Ser(S) Thr

Thr(T) Ser

Trp(W) Tyr ; Phe

Tyr(Y) Trp ; Phe

Val(V) Ile ; Leu 。

【0336】 “有效量”或“有效劑量”是指獲得任一種或多種有益的或所需的治療結果所必需的藥物、化合物或醫藥組成物的量。對於預防用途，有益的或所需的結果包括消除或降低風險、減輕嚴重性或延遲病症的發作，包括病症、其併發症和在病症的發展過程中呈現的中間病理表型的生物化學、組織學和/或行為症狀。對於治療應用，有益的或所需的結果包括臨床結果，諸如減少各種本披露靶抗原相關病症的發病率或改善該病症的一個或更多個症狀，減少治療病症所需的其它藥劑的劑量，增強另一種藥劑的療效，和/或延緩受試者的本披露靶抗原相關病症的進展。

【0337】 “外源性”指根據情況在生物、細胞或人體外產生的物質。

【0338】 “內源性”指根據情況在生物、細胞或人體內產生的物質。

【0339】 “同源性”、“同一性”是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。當兩個比較序列中的位置均被相同鹼基或胺基酸單體亞基佔據

時，例如如果兩個 DNA 分子的每一個位置都被腺嘌呤佔據時，那麼該分子在該位置是同源的。兩個序列之間的同源性百分率是兩個序列共有的匹配或同源位置數除以比較的位置數 $\times 100$ 的函數。例如，在序列最佳比對時，如果兩個序列中的 10 個位置有 6 個匹配或同源，那麼兩個序列為 60%同源；如果兩個序列中的 100 個位置有 95 個匹配或同源，那麼兩個序列為 95%同源。通常，當比對兩個序列時進行比較以給出最大百分比同源性。例如，可以藉由 BLAST 算法執行比較，其中選擇算法的參數以在各個參考序列的整個長度上給出各個序列之間的最大匹配。以下參考文獻涉及經常用於序列分析的 BLAST 算法：

BLAST 算法(BLAST ALGORITHMS): Altschul, S.F.等人, (1990)J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W.等人, (1993)Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L.等人, (1996)Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F.等人, (1997)Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J.等人, (1997)Genome Res. 7:649-656。其他如 NCBI BLAST 提供的常規 BLAST 算法也為本領域技術人員所熟知。本披露中，例如“相對於 XX 序列的自然順序編號位點”，既包括 XX 序列上的自然順序編號相應的位點，也包括 XX 序列的突變序列中與 XX 序列等同位置的位點，等同位置可藉由將 XX 序列的突變序列與 XX 序列進行比對以獲得最高百分比同一性，此時 XX 序列的突變序列上與 XX 序列相對應的位點即為等同位點。

【0340】 本文使用的表述“細胞”、“細胞系”和“細胞培養物”可互換使用，並且所有這類名稱都包括後代。因此，單詞“轉化體”和“轉化細胞”包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在 DNA 含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

【0341】 本文使用的“聚合酶鏈式反應”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美國專利 US4683195 中所述擴增的程序或技術。一般來說，需要獲得來自目標區域末端或之外的序列信息，使得可以設計寡核苷酸引物；這些引物在序列方面與待擴增模板的對應鏈相同或相似。2 個引物的 5'末端核苷酸可以與待擴增材料的末端一致。PCR 可用於擴增特定的 RNA 序列、來自總基因組 DNA 的特定 DNA 序列和由總細胞 RNA 轉錄的 cDNA、噬菌體或質粒序列等。一般參見 Mullis 等(1987)Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263；Erlich 編輯，(1989)PCR TECHNOLOGY(Stockton Press，N.Y.)。本文使用的 PCR 被視為用於擴增核酸測試樣品的核酸聚合酶反應法的一個實例，但不是唯一的實例，該方法包括使用作為引物的已知核酸和核酸聚合酶，以擴增或產生核酸的特定部分。

【0342】 術語“綴合物”、“藥物偶聯物”指配體藉由穩定的連接單元與具有生物活性的藥物相連而成的新型藥物。例如，“抗體藥物偶聯物”(antibody drug conjugate，ADC)，其是將抗體或者抗體片段藉由連接單元與具有生物活性的藥物相連。抗體可直接地或經接頭地偶聯至藥物。每個抗體的平均藥物模塊數，其範圍可以是例如每個抗體約 0 到約 20 個藥物模塊，在一些實施方案中是每個抗體 1 個到約 10 個藥物模塊，在某些實施方案中是每個抗體 1 個到約 8 個藥物模塊。本披露的綴合物，其中每個抗體的平均藥物載荷是約 2 個至約 5 個或約 3 個至約 4 個。

【0343】 “分離的”指純化狀態，並且在這種情況下意味著在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白質、脂質、碳水化合物或其他材料，例如細胞碎片和生長培養基。通常，術語“分離的”並不意圖指完全不存在這些材料或不存在水、緩衝液或鹽，除非它們以顯著干擾如本文所述的化合物的實驗或治療用途的量存在。

【0344】“任選”或“任選地”意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。

【0345】“醫藥組成物”表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，該其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。醫藥組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【0346】術語“藥學上可接受的載體”指適合用於製劑中用於遞送抗體或抗原結合片段的任何無活性物質。載體可以是抗黏附劑、黏合劑、包衣、崩解劑、充填劑或稀釋劑、防腐劑(如抗氧化劑、抗菌劑或抗真菌劑)、增甜劑、吸收延遲劑、潤濕劑、乳化劑、緩衝劑等。合適的藥學上可接受的載體的示例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)右旋糖、植物油(例如橄欖油)、鹽水、緩衝液、緩衝的鹽水和等滲劑例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化鈉。

【0347】此外，本披露包括用於治療疾病或病症的藥物製劑，例如治療與目標抗原陽性細胞相關的疾病的藥劑，該製劑包含本披露的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片段、雙特異性抗體、醫藥組成物、或核酸分子、或多特異性抗體，作為活性成分。

【0348】本披露中的疾病沒有限制，例如利用本披露的分子誘導的治療反應可藉由結合人類抗原，然後阻遏抗原與其受體/配體的結合，或殺傷過表達抗原的腫瘤細胞。

【0349】此外，本披露涉及用於免疫檢測或測定目標抗原的方法、用於免疫檢測或測定目標抗原的試劑、用於免疫檢測或測定表達目標抗原的細胞的方法和用於診斷與目標抗原陽性細胞相關的疾病的診斷劑，其包含本披露的多肽複合物、多特異性多肽複合物、結構域改造抗體、結構域改造抗體的 Fab 片

段、雙特異性抗體、醫藥組成物、或核酸分子、或多特異性抗體作為活性成分。

【0350】 在本披露中，用於檢測或測定目標抗原的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫檢測或測定方法。

【0351】 免疫檢測或測定方法是使用標記的抗原或抗體檢測或測定抗體量或抗原量的方法。免疫檢測或測定方法的實例包括放射性物質標記的免疫抗體方法(RIA)、酶免疫測定法(EIA 或 ELISA)、熒光免疫測定法(FIA)、發光免疫測定法、蛋白質免疫印跡法、物理化學方法等。

【0352】 上述與抗原陽性細胞相關的疾病可以藉由用本披露的抗體檢測或測定表達抗原的細胞來診斷。

【0353】 為了檢測表達多肽的細胞，可以使用已知的免疫檢測方法，並較佳使用免疫沉澱法、熒光細胞染色法、免疫組織染色法等。此外，可以使用利用 FMAT8100HTS 系統(Applied Biosystem)的熒光抗體染色法等。

【0354】 在本披露中，對用於檢測或測定目標抗原的活體樣品沒有特別限制，只要它具有包含表達目標抗原的細胞的可能性即可，例如組織細胞、血液、血漿、血清、胰液、尿液、糞便、組織液或培養液。

【0355】 根據所需的診斷方法，含有本披露的抗體或其抗體片段的診斷劑還可以含有用於執行抗原-抗體反應的試劑或用於檢測反應的試劑。用於執行抗原-抗體反應的試劑包括緩衝劑、鹽等。用於檢測的試劑包括通常用於免疫檢測或測定方法的試劑，例如識別該單株抗體、其抗體片段或其結合物的標記的第二抗體和與該標記對應的受質等。

【0356】 在以上說明書中提出了本披露一種或多種實施方式的細節。雖然可使用與本文該類似或相同的任何方法和材料來實施或測試本披露，但是以下描述較佳的方法和材料。藉由說明書和申請專利範圍，本披露的其他特點、

目的和優點將是顯而易見的。在說明書和申請專利範圍中，除非上下文中有清楚的另外指明，單數形式包括複數指代物的情況。除非另有定義，本文使用的所有技術和科學術語都具有本披露所屬領域普通技術人員所理解的一般含義。說明書中引用的所有專利和出版物都藉由引用納入。提出以下實施例是為了更全面地說明本披露的較佳實施方式。這些實施例不應以任何方式理解為限制本披露的範圍。

【0357】 以下結合實施例用於進一步描述本發明，但這些實施例並非限制本發明的範圍。本發明實施例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，如冷泉港的抗體技術實驗手冊，分子選殖手冊；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未註明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

【0358】 儘管實施例中所用抗體靶向特定的抗原，但是技術人員在本披露的教導下，能夠理解技術效果的實現不依賴於特定的 CDR 序列，也不依賴於特定的抗原序列，而是受益於 Titin T 鏈/Obseurin-O 鏈、或 Titin T 鏈/類 Obseurin-O 鏈對 CH1/CL 的替代，以改善重鏈/輕鏈之間的錯配。

【0359】 實施例 1. 抗體或多肽蛋白的製備方法

【0360】 設計引物 PCR 搭建基因片段(例如，抗體 VH/VK 基因片段)，再與表達載體(例如 pHr(帶信號肽及恆定區基因(例如 CH1-Fc/CL)片段))進行同源重組，構建表達載體(例如 VH-CH1-Fc-pHr/VK-CL-pHr)，然後將構建的表達載體導入到原核生物或真核生物中表達，最後對產物進行純化，從而獲得所需的抗體或多肽蛋白。非限制性地，抗體恆定區可選自人 κ 、 λ 鏈輕鏈恆定區，以及選自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重鏈恆定區。非限制性實施例，還包括對人抗體恆定區進行優化設計，例如對重鏈恆定區恆定區的 L234A/L235A 或 L234F/L235E 等位點突變等。示例性的，抗體輕/重鏈恆定區序列如下：

> IgG1 重鏈恆定區(簡稱 hIgG1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 1) ;

備註：序列中，單下劃線部分為 CH1，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3。

> knob-IgG1 重鏈恆定區(簡稱 knob -IgG1) :

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 2) ;

備註：序列中，單下劃線部分為 CH1，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3。

> hole -IgG1 重鏈恆定區(簡稱 hole -IgG1) :

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED

PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK*GQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVK*
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 3) ;

備註：序列中，單下劃線部分為 CH1，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3。

> kappa 輕鏈恆定區(簡稱 kappa 或 κ)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC(SEQ ID NO : 4)。

> lambda 輕鏈恆定區(簡稱 lambda 或 λ)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV
 KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
 PTECS(SEQ ID NO : 5)。

【0361】 本披露實施例或測試例中提及的針對 B7H3、CD3 等多種抗原的抗體的輕鏈和重鏈可變區的胺基酸序列如下：

> F0 抗體 VH 胺基酸序列：

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWV
 AVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS
 ARLYASFDYWGQGALVTVSS(SEQ ID NO : 6) ;

>F0 抗體 VL 胺基酸序列

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLI
 YNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFG
 GGTKLTVL(SEQ ID NO : 7) ;

>N0 抗體 VH 胺基酸序列

DVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTSSLSWMSWLRQAPGKGLEW
VANINQDGSEKNYVDSVKGRFTISRDNANSLYLQMSSSLRAEDTAVYYCAR
GLWTFDSWGQGTLTVP(SAQ ID NO : 8) ;

> N0 抗體 VL 胺基酸序列

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQNINRFLAWYQQRPGQAPRLLIY
AASSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDFAMYHCQQYGSFPRTFGQGT
MVDIK(SAQ ID NO : 9) ;

> S0 抗體 VH 胺基酸序列

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPERGLEWV
AYISSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDVAVYYCAAHY
FGSSGPFAYWGQGTLLTVSS(SAQ ID NO : 10) ;

> S0 抗體 VL 胺基酸序列

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVY
NTRTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTK
LEIK(SAQ ID NO : 11) ;

>V0 抗體 VH 胺基酸序列

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYSFTSYTIHWVKQRPGQGLEWI
GYINPNSRNTDYNQKFKDETTLTADRSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARYS
GSTPYWYFDVWGAGTTVTVSS(SAQ ID NO : 12) ;

>V0 抗體 VL 胺基酸序列

QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKPGSSPKPWIYA
TSNLASGVPARFSVSVSGTSHSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTK
LELK(SAQ ID NO : 13) ;

> J0 抗體 VH 胺基酸序列

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMHWVRQAPGKGLEW
VGHKSKTDAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
AREIYYYAFDSWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 14) ;

> J0 抗體 VL 胺基酸序列

SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYG
DNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQAADWVDFYVFGGG
TKLTVL(SEQ ID NO : 15) ;

>H0 抗體 VH 胺基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYMAWVRQAPGKGLEW
VTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCASQT
LRESFDYWQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 16) ;

>H0 抗體 VL 胺基酸序列

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYG
TSNLEVGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKV
EIK(SEQ ID NO : 17) ;

>R0 抗體 VH 胺基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLTNSNVNWIRQAPGKGLEWV
GLIWSNGDTDYNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYY
GYFDYWQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 18) ;

> R0 抗體 VL 胺基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYG
ANSLQTGVPSRFSGSGSATDYTLTISSLQPEDFATYYCQQSYKFPNTFGQGTK
VEVK(SEQ ID NO : 19) ;

>Bmab(簡稱 B0)抗體 VH 胺基酸序列

QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEW
MGGIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDVAVYYCARS
RDLLLFPHHALSPWGRGTMVTVSS(SEQ ID NO : 20) ;

>Bmab(簡稱 B0)抗體 VL 胺基酸序列

SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY
GKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWVFG
GGTELTVL(SEQ ID NO : 21) ;

>Umab(簡稱 U0)抗體 VH 胺基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWI
GIMSPVDSDIRYSPSFQGQVTMSVDKSITTAYLQWNSLKASDTAMYCYCARRR
PGQGYFDFWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 22) ;

>Umab(簡稱 U0)抗體 VL 胺基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYA
ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPYTFGQGTKL
EIK(SEQ ID NO : 23) ;

>Dmab(簡稱 D0)抗體 VH 胺基酸序列

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDP
GTTVIMSWFDPWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 24) ;

>Dmab(簡稱 D0)抗體 VL 胺基酸序列

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWSYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCYQQYGSSPRTFGQGTK
VEIK(SEQ ID NO : 25) ;

>Tmab(簡稱 I0)抗體 VH 胺基酸序列

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGII
WGDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYW
YATSY YFDYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 26) ;

>Tmab(簡稱 I0)抗體 VL 胺基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYY
TSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKL
EIK(SEQ ID NO : 27) ;

> C0 抗體 VH 胺基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYHMNWVRQAPGQRLE
WMGDINPDIGGTSYNQNFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
WDFDSFANWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 28) ;

> C0 抗體 VL 胺基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQPPKLL
IYHASNLETGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRKIPYTFGG
GTKVEIK(SEQ ID NO : 29) ;

>A0 抗體 VH 胺基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW
VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO : 105) ;

>A0 抗體 VL 胺基酸序列

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG
LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVF
GGGTKLTVL(SEQ ID NO : 106) ;

【0362】 上述抗體 F0、N0、S0、V0、J0、H0、R0、B0、U0、D0、I0、C0、A0 抗體的重鏈恆定區序列為 IgG1 重鏈恆定區(SEQ ID NO：1)，N0、S0、H0、R0、U0、I0、C0 抗體輕鏈恆定區序列為 kappa 輕鏈恆定區(SEQ ID NO：4)；F0、V0、J0、B0、D0、A0 抗體輕鏈恆定區序列為 lambda 輕鏈恆定區(SEQ ID NO：5)。

【0363】 另外，hB7H3 抗原蛋白的序列如下：

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH
SFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDF
GSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDG
QGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
SSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIW
QLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQRVRVADEG
SFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGY
PEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCL
VRNPVLQQDAHGSVTITGQPMT DYKDDDDKHHHHHHH(SEQ ID NO：111)；

【0364】 hCD3 抗原蛋白為 hCD3 抗原的 δ 亞基和 ϵ 亞基組成的異源二聚體，其中，hCD3 抗原的 δ 亞基序列：

FKIPIEELED RVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDP RGIYRC
NGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVASAENAQCEKELQALEKENA
QLEWELQALEKELAQDYKDDDDK(SEQ ID NO：112)；

hCD3 抗原的 ϵ 亞基序列：

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDD
KNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCME

MDAKNAQCKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQHSHHHHHH(SEQ ID NO : 113)。

【0365】 實施例 2、抗體 CH1/CL 結構域的替換

【0366】 分別使用天然 Titin/Obscurin 複合物、Titin/類 Obscurin O 複合物和 IL6Ra/IL6Rb 複合物中具備天然的分子間相互作用的類 Ig 結構域，來替換抗體的 CH1/CL 結構域，獲得 CH1/CL 結構域改造的抗體。

【0367】 其中，IL6Ra/IL6Rb 複合物中，用於替換抗體 CH1 或 CL 的 IL6Ra 蛋白中的類 Ig 結構域為 IL6Ra.0 鏈，用於替換抗體 CL 或 CH1 的 IL6Rb 蛋白中的類 Ig 結構域為 IL6Rb.0 鏈；Titin/Obscurin 複合物中，用於替換抗體 CH1 或 CL 的 Titin 蛋白中的類 Ig 結構域(類 Titin Ig152 結構域)為 T.0 鏈，用於替換抗體 CL 或 CH1 的 Obscurin 蛋白中的類 Ig 結構域(類 Obscurin Ig-1 結構域)為 O.0 鏈；Titin/類 Obscurin O 複合物中，用於替換抗體 CH1 或 CL 的類 Obscurin 蛋白中的類 Ig 結構域(類 Obscurin-類 Ig-1 結構域)為 OL.0 鏈，用於替換抗體 CL 或 CH1 的 Titin 蛋白中的類 Ig 結構域(類 Titin Ig 152 結構域)為 T.0 鏈。其中：

>IL6Ra.0 鏈序列為：

GILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAE
RSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEFGQGEWSEWSPEA
MGTPW(SEQ ID NO : 30)；

> IL6Rb.0 鏈序列為：

FDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKD
ASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEA
SGIT(SEQ ID NO : 31)；

>T.0 鏈序列為：

GIIPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSSEQGR
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLISLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 32) ;

>O.0 鏈序列為：

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA(SE
Q ID NO : 33) ;

>OL.0 鏈序列為：

QGSPPCFLRFPRPVRVVSAGAEELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAASE
RLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP(SE
Q ID NO : 34) ;

【0368】 構建多種 CH1/CL 被替換的抗體，按照測試例 2 和 4 的方法，檢測待測的抗體的純度和與相應抗原的結合活性。實驗結果見下表 1，實驗結果表明，F0、V0、S0、N0、J0、H0、R0、和 C0 等結合不同抗原的抗體，其 CH1/CL 同時被 T.0 鏈/ O.0 鏈或 T.0 鏈/ OL.0 鏈替換後，抗體仍保持良好的結合活性，且抗體純度高。

【0369】 表 1. CH1/CL 結構域替換後的抗體的純度和親和力

抗體名稱		抗體結構域替換方式		抗體純度 SEC(%)	與相應抗原結合 實驗 EC50(nM)
		重鏈 CH1 被替換	輕鏈 CL 被替換		
F0 的 CH1/CL 被替換	F0	CH1	CL	98	1.29
	F1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	47	71.6
	F2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	59.28
	F3	T.0	O.0	100	2.83
	F4	T.0	OL.0	100	2.17
V0 的 CH1/CL 被替換	V0	CH1	CL	86	1.8
	V1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	38	38.4
	V2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	-
	V3	T.0	O.0	99	3.6
	V4	T.0	OL.0	97	2.9
	V5	O.0	T.0	98	3.2
	V6	OL.0	T.0	97	4.7
S0 的 CH1/CL 被替換	S0	CH1	CL	97	1.01
	S1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	NA	-
	S2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	-
	S3	T.0	OL.0	83	3.5
	S4	OL.0	T.0	90	1.96
N0 的 CH1/CL 被替換	N0	CH1	CL	99	0.82
	N1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	100	1229
	N2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	67	766.5
	N3	T.0	O.0	90	6.45
	N4	T.0	OL.0	83	5.93
	N5	O.0	T.0	90	5.24
J0 的 CH1/CL 被替換	J0	CH1	CL	95	0.08
	J1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	NA	-
	J2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	NA	179
	J3	OL.0	T.0	93	0.25
H0 的 CH1/CL 被替換	H0	CH1	CL	NA	1.74
	H1	IL6Rb.0	IL6Ra.0	75	19.35
	H2	IL6Ra.0	IL6Rb.0	80	24.38

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

備註：例如，F1 表示 F0 抗體的重鏈 CH1 被 IL6Rb.0 鏈(SEQ ID NO：31)替換，輕鏈 CL 被 IL6Ra.0 鏈(SEQ ID NO：30)替換，其它部分保持與 F0 相同，而獲得的抗體。其它依此類推。表中“-”表示未檢測，SEC 為尺寸排阻色譜法檢測抗體的純度結果(NA 表示因表達過低而未檢測)。

【0370】 實施例 3、CH1/CL 結構域改造抗體的優化設計

【0371】 對類 Titin Ig 152 結構域(T.0 鏈)、類 Obscurin Ig 1 結構域(O.0 鏈)、類類 Obscurin Ig 1 結構域(OL.0 鏈)的個別胺基酸進行突變，包括胺基酸的插入、缺失或替換，驗證結構域改造抗體的活性。

【0372】 示例性地，首先，藉由對 T.0 鏈、O.0 鏈以及 OL.0 鏈上的少量胺基酸進行突變，增加鏈間二硫鍵；其次，還對結構域中的其它個別胺基酸進行突變，例如對類 Obscurin Ig 1 結構域的第 7、62、11 位進行胺基酸突變；在類 Titin Ig 152 結構域 N 端增、減胺基酸(例如增加 5 個野生型 Titin 蛋白中緊鄰類 Titin Ig 152 結構域 N 端的 5 個胺基酸“KAGIR”)；在類 Obscurin Ig 1 結構域 N 端增、減少胺基酸(例如增加 5 個野生型 Obscurin 蛋白中緊鄰類 Obscurin Ig 1

結構域 N 端的 5 個胺基酸“DQPQF”)；此外，還在類 Titin Ig 152 結構域、類 Obscurin Ig 1 結構域或類類 Obscurin Ig 1 結構域的 N 端或 C 端添加連接序列(例如在 N 端增加 “G₄S”、“(G₄S)₂”連接序列)，抗體 VH 或 VL 的 C 端藉由連接序列與類 Titin Ig 152 結構域、類 Obscurin Ig 1 結構域或類類 Obscurin Ig 1 結構域連接。具體結構域優化設計見表 2。

【0373】 表 2. T.0 鏈、O.0 鏈、OL.0 鏈的胺基酸突變

Titin-T 鏈		Obscurin-O 鏈		類 Obscurin-O 鏈	
名稱	突變方式	名稱	突變方式	名稱	突變方式
T.0	野生型(SEQ ID NO：32)	O.0	野生型(SEQ ID NO：33)	OL.0	野生型(SEQ ID NO：34)
T.1	C25S，C39T，A8C	O.1	A88C	OL.1	C6E，V74C
T.2	C25S，C39T，V20C	O.2	A3C	OL.2	C6E，G84C
T.3	C25S，C39T，A26C	O.3	R9C	OL.3	C6E，A86C
T.4	C25S，C39T，T22C	O.4	C25S，C76S，A88C	OL.4	C6E，C26S，C77S，V74C
T.5	C25S，C39T，A8C +Titin_KAGIR	O.5	C25S，C76S，A3C	OL.5	C6E，C26S，C77S，G84C
T.6	C25S，C39T，A8C +(G ₄ S) ₁ 連接序列	O.6	C25S，C76S，R9C	OL.6	C6E，C26S，C77S，A86C
T.7	C25S，C39T，A8C +(G ₄ S) ₂ 連接序列	O.7	C25S，C76S，A88C，L7K，T62K		

		O.8	C25S , C76S , A88C , L7K , T62H		
		O.9	C25S , C76S , A88C , K11L , T62K		
		O.10	C25S , C76S , A88C , K11L , T62H		
		O.11	C25S , C76S , A88C+Obscurin_D QPQF		
		O.12	C25S , C76S , A88C , L7K , T62K+Obscurin_D QPQF		
		O.13	C25S , C76S , A88C , L7K , T62H+Obscurin_D QPQF		
		O.14	C25S , C76S , A88C , L7R , T62K+Obscurin_D QPQF		
		O.15	C25S , C76S , A88C , L7R , T62H+Obscurin_D QPQF		
		O.16	C25S , C76S , A88C +(G4S) ₁ 連接 序列		

		O.17	C25S , C76S , A88C +(G4S) ₂ 連接 序列		
--	--	------	--	--	--

備註：表中 Obscurin-O 鏈中的 O.1 突變方式“A88C”，表示將 O.0(SEQ ID NO：33)序列的第 88 位胺基酸殘基由 A 突變為 C；O.11 突變方式 “C25S，C76S，A88C+Obscurin_DQPQF”，表示對 O.0(SEQ ID NO：33)序列進行 C25S、C76S、A88C 胺基酸突變，並在 N 末端增加“DQPQF”5 個胺基酸。其它依此類推。

【0374】 部分胺基酸突變後的 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈、類 Obscurin-O 鏈序列如下：

>T.1(T.0 具有 C25S，C39T，A8C 的突變)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO：35)；

>T.2(T.0 具有 C25S，C39T，V20C 的突變)

GIPPKIEALPSDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO：36)；

>T.3(T.0 具有 C25S，C39T，A26C 的突變)

GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASCFTEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO：37)；

>T.4(T.0 具有 C25S，C39T，T22C 的突變)

GIPPKIEALPSDISIDEGKVL CVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTL SLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 38) ;

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

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVL TVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHS
QEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTL SLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SE
Q ID NO : 39) ;

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

GGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVL TVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHS
QEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTL SLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SE
Q ID NO : 40) ;

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

GGGGSGGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVL TVASAFTGEPTPEVTWSTGG
RKIHSQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTL SLGNEFGSDSATVNIHI
RSI(SEQ ID NO : 41) ;

>O.1(O.0 具有 A88C 突變)

SGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFACVGLQVDAEA(SE
Q ID NO : 42) ;

>O.2(O.0 具有 A3C 突變)

SGCPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEA(SE
Q ID NO : 43) ;

>0.3(O.0 具有 R9C 突變)

SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAAE(SE
Q ID NO : 44) ;

>0.4(O.0 具有 C25S , C76S , A88C 突變)

SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SE
Q ID NO : 45) ;

>0.5(O.0 具有 C25S , C76S , A3C 突變)

SGCPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAAE(SE
Q ID NO : 46) ;

>0.6(O.0 具有 C25S , C76S , R9C 突變)

SGAPRFLTCPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAAVGLQVDAAE(SE
Q ID NO : 47) ;

> 0.7(O.0 具有 C25S , C76S , A88C , L7K , T62K 突變)

SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGA
RFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SE
Q ID NO : 48) ;

>0.8(O.0 具有 C25S , C76S , A88C , L7K , T62H 突變)

SGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SEQ ID NO : 49) ;

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

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SEQ ID NO : 50) ;

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

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SEQ ID NO : 51) ;

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

DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SEQ ID NO : 52) ;

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

DQPQF)

DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAAE(SEQ ID NO : 53) ;

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

DQPQF)

DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQP
VAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD
AEA(SEQ ID NO : 54) ;

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

DQPQF)

DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQP
VAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD
AEA(SEQ ID NO : 55) ;

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

DQPQF)

DQPQFSGAPRFRTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQP
VAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD
AEA(SEQ ID NO : 56) ;

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

GGGGSSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQP
VAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD
AEA(SEQ ID NO : 57) ;

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

GGGGSGGGGSSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWE
KDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV
GLQVDAEA(SEQ ID NO : 58) ;

>OL.1(OL.0 具有 C6E , V74C 突變)

QGSPPEFLRFPRPVRVVSAGAEAEELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAAS
ERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVCRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP(S
EQ ID NO : 59) ;

> OL.2(OL.0 具有 C6E , G84C 突變)

QGSPPEFLRFPRPVRVVSAGAEAEELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAAS
ERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAACEAYAAAAVTVLEPP(S
EQ ID NO : 60) ;

> OL.3(OL.0 具有 C6E , A86C 突變)

QGSPPEFLRFPRPVRVVSAGAEAEELKCVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAAS
ERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGECYAAAAVTVLEPP(S
EQ ID NO : 61) ;

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

QGSPPEFLRFPRPVRVVSAGAEAEELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAAS
ERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVSRARNAAGEAYAAAAVTVLEPP(S
EQ ID NO : 62) ;

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

QGSPPEFLRFPRPVRVVSAGAEAEELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAAS
ERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAACEAYAAAAVTVLEPP(S
EQ ID NO : 63) ;

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

QGSPPEFLRFPRPVRVVSAGAEAEELKSVVLGEPPPVVVWEKGGQQLAAS
ERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAAGECYAAAAVTVLEPP(S
EQ ID NO : 64) 。

【0375】 利用上述突變的或結構改造的 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈、類 Obscurin-O 鏈構建多種 CH1/CL 被替換的抗體，藉由本披露的測試例 4 的方法，檢測優化後各突變抗體與相應抗原結合的結合活性，實驗結果見表 3。結果表明，二硫鍵改造後抗體保持良好抗原結合活性。

【0376】 表 3. CH1/CL 結構域改造後的抗體親和力

抗體名稱		抗體結構域替換方式		與相應抗原結合 實驗 EC50(nM)
		重鏈 CH1 被 替換	輕鏈 CL 被 替換	
F0 的 CH1/CL 被替換	F3	T.0	O.0	2.64
	F5	T.1	O.1	1.21
	F6	T.2	O.2	2.71
	F7	T.3	O.3	3.38
	F8	T.1	O.4	3.14
	F9	T.2	O.5	3.52
	F10	T.3	O.6	3.94
	F4	T.0	OL.0	3.01
	F11	T.1	OL.1	6.15
	F12	T.2	OL.2	8.19
	F13	T.4	OL.3	6.08
	F14	T.1	OL.4	5.15
	F15	T.2	OL.5	4.44
H0 的 CH1/CL 被替換	H3	T.0	O.0	3.24
	H5	T.1	O.1	3.40
	H6	T.2	O.2	2.10
	H7	T.3	O.3	2.70
	H8	T.1	O.4	2.11
	H9	T.2	O.5	2.92
	H10	T.3	O.6	2.86
	H4	T.0	OL.0	3.28
	H11	T.1	OL.1	3.38
	H12	T.2	OL.2	4.34

	H13	T.4	OL.3	3.56
	H14	T.1	OL.4	2.61
	H15	T.4	OL.6	4.26
R0 的 CH1/CL 被 替換	R5	T.0	O.0	4.13
	R7	T.1	O.1	4.89
	R8	T.2	O.2	3.84
	R9	T.3	O.3	3.95
	R10	T.1	O.4	3.20
	R11	T.2	O.5	3.30
	R12	T.3	O.6	4.36
N0 的 CH1/CL 被 替換	N3	T.0	O.0	4.5
	N6	T.2	O.5	8.4
	N4	T.0	OL.0	4.6
	N7	T.5	OL.1	2.8
	N8	T.5	OL.4	2.6

備註：例如，表中抗體“F5”表示 F0 抗體的重鏈 CH1 被 T.1 鏈(SEQ ID NO：35)替換，且輕鏈 CL 被 O.1 鏈(SEQ ID NO：42)替換，其它部分保持與 F0 相同，而獲得的抗體，其它依此類推。

【0377】 另外，利用上述突變或結構改造的 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈，構建 CH1/CL 被替換的抗體，藉由本披露的測試例 2 和測試例 4 的方法，檢測其它 CH1/CL 被替換的抗體功能活性。實驗結果見表 4，實驗結果表明，CH1/CL 被替換後，抗體仍具有良好的抗原結合活性，抗體純度 SEC(%)較高。

【0378】 表 4. CH1/CL 結構域改造後抗體的純度及結合活性的檢測結果

抗體名稱		抗體結構域替換方式		抗體純度 SEC(%)	與相應抗原結 合實驗 EC50(nM)
		重鏈 CH1 被 替換	輕鏈 CL 被替 換		
F0 的 CH1/CL 被替換	F16	T.5	O.4	65	2.0
	F17	T.5	O.7	72	4.8
	F18	T.1	O.8	70	3.9
	F19	T.5	O.8	68	2.2
	F20	T.1	O.9	71	1.9
	F21	T.5	O.9	68	3.4
	F22	T.1	O.10	74	2.4
	F23	T.5	O.10	73	4.1
	F24	T.1	O.12	71	2.4
	F25	T.5	O.12	66	2.6
	F26	T.1	O.13	73	2.6
	F27	T.5	O.13	71	1.2
	F28	T.1	O.14	75	2.4
	F29	T.5	O.14	68	3.6
	F30	T.1	O.15	75	3.4
	F31	T.5	O.15	69	2.4
	F32	T.6	O.17	72	3.69
	F33	T.7	O.16	69	1.92
	F34	T.7	O.17	73	2.38
N0 的 CH1/CL 被替換	N10	T.5	O.4	89	3.0
	N11	T.1	O.7	86	5.0
	N12	T.1	O.8	84	5.3
	N13	T.5	O.8	82	2.9
	N14	T.1	O.9	92	1.9
	N15	T.5	O.9	92	2.6
	N16	T.5	O.10	91	3.4
	N17	T.1	O.11	90	2.2
	N18	T.5	O.11	89	3.2
	N19	T.1	O.12	84	4.3

	N20	T.5	O.12	84	2.8
	N21	T.5	O.13	84	5.2
	N22	T.5	O.14	87	4.5
	N23	T.1	O.15	86	9.4
	N24	T.5	O.15	84	6.7
	N25	T.6	O.17	92	0.62
	N26	T.7	O.16	93	0.84
	N27	T.7	O.17	94	0.67
R0 的 CH1/CL 被替換	R10	T.1	O.4	84	0.37
	R13	T.5	O.4	76	0.4
	R14	T.5	O.7	78	0.2
	R15	T.5	O.8	82	0.3
	R16	T.5	O.9	80	0.33
	R17	T.5	O.10	77	0.4
	R18	T.5	O.11	71	0.44
	R19	T.5	O.12	78	0.36
	R20	T.5	O.13	75	0.39
	R21	T.5	O.14	77	0.37
	R22	T.5	O.15	74	0.39

備註：例如，表中抗體“F16”表示 F0 抗體的重鏈 CH1 被 T.5 鏈(SEQ ID NO：39)替換，輕鏈 CL 被 O.4 鏈(SEQ ID NO：45)替換，其它部分保持與 F0 相同，而獲得的抗體，其它依此類推。

【0379】 另外，還對類 Titin Ig 152 結構域、類 Obscurin Ig 1 結構域的其它胺基酸進行突變，具體胺基酸突變設計如表 5。

【0380】 表 5. T.1 鏈/O.9 鏈的胺基酸突變設計

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

T.17	T.1+(N56S , D58E , M66S , T77S) , + KAGIR	O.27	O.9+(A12S , F13Y , T22S , Q42L , A45T , A67Q , G69S , Q92E , D94G) , + DQPQF , +(G4S) ₁ 連接序列
T.18	T.1+(N56S , D58E , M66S , T77S) , + KAGIR , +(G4S) ₁ 連接序列		
T.19	T.1+(N56S , D58E , M66S , T77S) , +(G4S) ₁ 連 接序列		

備註：表中，例如 T.8 表示對 T.1(SEQ ID NO：35)序列進行 M66S、T77S 胺基酸突變後獲得的 Titin-T 鏈；O.24 表示對 O.9(SEQ ID NO：50)先進行 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變，然後在 N 末端添加“DQPQF”序列，最後在 N 末端添加“GGGGS”連接序列後獲得的 Obscurin-O 鏈，其它依此類推。

T.1 鏈和 O.9 鏈的突變體序列如下：

> T.8(T.1 具有 M66S，T77S 突變)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGRF
HIENTDDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO：65)；

> T.9(T.1 具有 M66K，K70R，S79T，G81R 突變)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIENTDDLTTLIKDVQRQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO：66)；

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

GIWPKIECLPIDLSIDEGKVLMTASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG
RFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLTLGMEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 67) ;

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

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 68) ;

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

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTSGKKISSEEGGRF
HIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLTLGNDLGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 69) ;

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

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEEGGR
FHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLTLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 70) ;

> T.14(T.1 具有 N56S , D58E , L75V 突變)

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR
FHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLTLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 71) ;

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

GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSEQGR
FHIESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ ID
NO : 72) ;

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

GGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSE
QEQGRFHIENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI(SE
Q ID NO : 73) ;

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

KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSE
QEQGRFHIESTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ
ID NO : 74) ;

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

GGGGSKAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGG
RKIHSEQGRFHIENTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIR
SI(SEQ ID NO : 75) ;

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

GGGGSGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSE
QEQGRFHIENTEDLTTLIISDVQKQDGGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI(SEQ
ID NO : 76) ;

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

SGAPRFLTRPKSYTVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA(SEQ ID NO : 77) ;

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

SEAPRFLTRPLAFVVSEGKDATLSSQIVGDPPEVTWEKDQQPITAGARFRLAQDGDVYRLEILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEG(SEQ ID NO : 78) ;

> O.20(O.9 具有 D20L , T22M , A53L 突變)

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKLAMLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA(SEQ ID NO : 79) ;

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

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVDAEA(SEQ ID NO : 80) ;

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

SGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLTLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVDAEA(SEQ ID NO : 81) ;

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

SGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAGAR
FRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAE(ASEQ
ID NO : 82) ;

> O.24(O.9 具有 Q41K , A45T , A67Q , G69S , V89L 突變 ; +(G4S)1 連接
序列)

GGGGSSGAPRFLTRPLAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQP
VTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVD
AEA(SEQ ID NO : 83) ;

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

GGGGSSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPV
TAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAE
A(SEQ ID NO : 84) ;

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

DQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPV
TAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLVGAE
A(SEQ ID NO : 85) ;

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

GGGGSDQPQFSGAPRFLTRPLSYVVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEK
DQLPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGL
EVGAEA(SEQ ID NO : 86) 。

【0381】 利用上述突變或結構改造的 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈，構建 CH1/CL 被替換的抗體，並藉由本披露的測試例 4 的方法對 CH1/CL 被替換的抗體進行檢測，實驗結果見表 6 所示。結果顯示，CH1/CL 被被優化後的 Titin-T 鏈、Obscurin-O 鏈替換後，抗體仍保持良好抗原結合活性。

【0382】 表 6. CH1/CL 被替換後抗體與相應抗原結合實驗結果

抗體		抗體結構域替換方式		與相應抗原結合實驗 EC50(nM)
		重鏈 CH1 被替換	輕鏈 CL 被替換	
B0 的 CH1/CL 被 替換	B0	CH1	CL	0.2
	B1	T.1	O.9	0.28
	B2	T.8	O.18	0.19
	B3	T.9	O.19	0.5
	B4	T.11	O.21	0.25
	B5	T.12	O.22	0.29
	B6	T.13	O.22	0.19
	B7	T.14	O.22	0.35
	B8	T.15	O.23	0.16
U0 的 CH1/CL 被 替換	U0	CH1	CL	0.06
	U1	T.1	O.9	0.03
	U2	T.8	O.18	0.07
	U3	T.9	O.19	0.02
	U4	T.11	O.21	0.06
	U5	T.12	O.22	0.11
	U6	T.13	O.22	0.11
	U7	T.14	O.22	0.07
	U8	T.15	O.23	0.16
D0 的 CH1/CL 被 替換	D0	CH1	CL	0.089
	D1	T.1	O.9	0.026
	D2	T.9	O.19	0.056
	D3	T.11	O.21	0.083
	D4	T.12	O.22	0.103

	D5	T.13	O.22	0.134
	D6	T.14	O.22	0.132
	D7	T.15	O.23	0.102
I0 的 CH1/CL 被 替換	I0	CH1	CL	1.424
	I2	T.8	O.18	3.195
	I3	T.11	O.21	2.989
	I4	T.12	O.22	4.132
	I5	T.13	O.22	3.592
	I6	T.14	O.22	4.121
	I7	T.15	O.23	3.153

備註：表中例如抗體“B1”表示 B0 抗體的重鏈 CH1 被 T.1 鏈(SEQ ID NO：35)替換，輕鏈 CL 被 O.9 鏈(SEQ ID NO：50)替換，其它部分與 B0 相同，而獲得的抗體，其它依此類推。

【0383】另外，藉由本披露測試例 1 的方法對 CH1/CL 被替換後的抗體的蛋白表達量進行檢測，實驗結果見表 7。結果顯示，類 Titin Ig 152 結構域和類 Obscurin Ig 1 結構域的一些胺基酸突變後，抗體的表達量獲得了很大的提高。

【0384】 表 7. CH1/CL 結構域改造後抗體表達量

抗體		抗體結構域替換方式		抗體表達量 (mg/L)
		重鏈 CH1 被替換	輕鏈 CL 被 替換	
B0 的 CH1/CL 被替換	B1	T.1	O.9	9.4
	B2	T.8	O.18	25.6
	B3	T.9	O.19	13.9
	B4	T.11	O.21	21.4
D0 的 CH1/CL 被替換	D1	T.1	O.9	5.9
	D2	T.9	O.19	44.4
	D3	T.11	O.21	40.5
	D4	T.12	O.22	17.8
	D5	T.13	O.22	21.4
	D6	T.14	O.22	23.3
	D7	T.15	O.23	34.3
I0 的 CH1/CL 被替換	I1	T.1	O.9	2.1
	I2	T.8	O.18	11.0
	I3	T.11	O.21	10.4
	I4	T.12	O.22	4.0
	I5	T.13	O.22	4.6
	I6	T.14	O.22	8.2
	I7	T.15	O.23	6.9

【0385】 實施例 4、CH1/CL 結構域改造後抗體的半衰期

【0386】 為了評價抗體的 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈 / 類 Obscurin-O 鏈替換後，抗體在動物體內的穩定性是否受影響，我們檢測了替換前後抗體在大鼠體內的半衰期。示例性地，我們分別檢測了 F0 抗體的 CH1/CL 被 T.1/O.9 替換後的抗體 F20，以及 C0 抗體的 CH1/CL 被 T.1/O.9 替換後的抗體 C3 在大鼠體內的半衰期。具體方法如下：

【0387】 將 3mpk 抗體以靜脈注射的方式對大鼠給藥，並分別於給藥後 5min，、8h，、1 d，、2 d，、4 d，、7 d，、10d，、14 d，、21 d，、28d 採集全血 0.3 ml，不加抗凝，取血後在 4℃放置 30min，1000g 離心 15 min，取上清(血清)置於 EP 管中，於-80℃保存。各個時間點抗體藥物濃度的檢測方法採取夾心 ELISA，即將相應抗原包被在 ELISA 板，4 度孵育過夜後，用洗滌液清洗，隨後加入封閉緩衝液室溫孵育 1-3 小時，用洗滌液清洗，然後加入 100μl 標準品或待測血清樣品於 37℃孵育 3 小時，用洗滌液清洗，加入二抗 Anti-Human IgG FC (HRP)mouse preadsorbed(Abcam，貨號 ab98624，1:10000 稀釋)於 37℃孵育 1-1.5h，用 wash 緩衝液清洗後，加入 TMB 室溫避光孵育 10 分鐘，隨後加入終止液，讀取 OD450 值。

【0388】 實驗結果見表 8，結果顯示，抗體的 CH1/CL 被替換成 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈後，抗體在大鼠體內仍然保有原始抗體的半衰期，提示 CH1/CL 被替換後的抗體和原始抗體一樣，在體內具有良好的穩定性。

【0389】 表 8. CH1/CL 結構域被替換的抗體半衰期

抗體名稱	大鼠體內半衰期 (3mpk)T1/2(天)
F0	13.3 ± 1.0
F20	12.8 ± 0.3
C0	17.3 ± 2.2
C3	15.4 ± 4.1

【0390】 實施例 5、雙特異抗體的構建與檢測

【0391】 將結合第一抗原的抗體與結合第二抗原的抗體，藉由搭橋 PCR，構建雙特異性抗體。示例性地，我們構建了多種雙特異性抗體。

一、雙特異抗體的構建

【0392】 首先，我們構建了 DI-1 雙特異性抗體，DI-1 雙特異性抗體是由 D0 抗體的一條重鏈(Fc 區進行 knob 修飾)和一條輕鏈，與 I0 抗體的 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換後的改造抗體的一條重鏈(Fc 區進行 hole 修飾)和一條輕鏈所構成的類 IgG 雙特異性抗體，其結構示意圖見圖 5，其序列如下所示：

【0393】 DI-1 鏈 1(DI-1-H1)的胺基酸序列：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SGITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
DPGTTVIMSWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT

YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK***GQPREPQVYTLPP***
CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 87) ;

備註：序列中，粗體字部分為 D0 的 VH，單下劃線部分為 CH1，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3。

DI-1 鏈 2(DI-1-L1)的胺基酸序列：

EIVLTQSPGTL***SLSPGERATL******SCRASQSVRGRYLA******WYQQKPGQAPRLLIY***
GASSRATGIPDRFSGSGGTDFTL***TISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQ***
GTKVEIKRTVAAPS***VFIFPPSDEQLKSGTASV******VCLLNNFY******PREAKVQWKVDN***
ALQSGNSQESVTEQDSK***STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP***
VTKSFN***RGE******C***(SEQ ID NO : 88) ;

備註：序列中，粗體字部分為 D0 的 VL，單下劃線部分為 D0 輕鏈恆定區 CL。

DI-1 鏈 3(DI-1-H2)的胺基酸序列：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGII
WGDGTTDYN***SAVKSRVTISKDT******SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGY***
WYATSYYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASA
FTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQE***QGRFHIENTDDLTTLIKDVQKQDGGGLYTLT***
LRNEFGSDSATVNIHIRSIDK***THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT***
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEM
TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 89) ;

備註：序列中，粗體字部分為 I0 的 VH，單下劃線部分為 T.16，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3；

DI-1 鏈 4(DI-1-L2)的胺基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLI
YYTSRHHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFG
QG**TKLEIKGGGGSSGAPRFLTRPLAFVVS****VGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEK**
DKQPVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGL
QVDAEA(SEQ ID NO : 90) ;

備註：序列中，粗體字部分為 I0 的 VL，單下劃線部分為 O.24。

【0394】 另外，構建了由 B0 或 B0 的 CH1/CL 結構改造抗體與 U0 或 U0 的 CH1/CL 結構改造抗體構建的類 IgG 雙特異性抗體(示例性的，BU5 結構示意圖見圖 8)，所得雙特異性抗體的 4 條鏈序列如下表 9：

【0395】 表 9.類 IgG 雙特異性抗體序列表

雙 抗 名 稱	類 IgG 雙特異性抗體 4 條鏈序列			
	鏈 1	鏈 2	鏈 3	鏈 4
B U 1	B0 的重鏈(knob)	B0 的輕鏈	U0 的重鏈(hole) , 且 CH1 被 T.19 替換	U0 的輕鏈 , 且 CL 被 O.25 替換
	QVQLQQSGAEVKKPGSS VRVSKASGGTFNNNAI NWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQG RVAITADESTGTASMELS SLRSED~~TAVYYCAR~~SRD LLLFPHHALSPWGRGT MVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCD KTH~~TCPPCPAPEA~~AGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYK~~TPPVLDSDGSF~~ FLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK(SEQ ID NO : 91)	SSELTQDP AVSVALG QTVRVTC QGDSLSRY YASWYQQ KPGQAPV LVIIYGKNN RPSGIPDR FSGSSSGN TASLTITG AQAED~~EA~~ DYCYCSR~~D~~ SSGNHWV FGGGTELT VLGQPKAA PSVTLEPPS SEELQANK ATLVCLISD FYPGA~~VT~~ AWKADSSP VKAGVETT TPSKQSNN KYAASSYL SLTPEQWK SHRSYSQ~~Q~~ VTHEGSTV EKTVA~~PTE~~ CS(SEQ ID NO : 92)	EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTTYW LGWVRQMPGKGLDWI GIMSPVDSDIRYSPSFQ GQVTMSVDKSITTAYL QWNSLKASDTAMY~~YC~~ ARRRPGQGYFDFW~~GQ~~ GTLVTVSSGGGGSGIPP KIECLPSDISIDEGKVLTV ASAFTGEPTPEVTWSTG GRKIHSQEQGRFHIESTE DLTTLIISDVQKQDGGLY SLSLGNEFGSDSATVNIH IRSIDKTH~~TCPPCPAPEA~~ AGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVS~~VL~~TVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYK~~TPPVLDSDGSF~~FL VSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK(SEQ ID NO : 93)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQ SGVPSRFS GSGSGTDF TLTISSLQ PEDFATYY CQQYNIYP YTFGQGT KLEIKGGG GSSGAPRF LTRPLSYV VSVGKDAS LSSQIVGN PTQVSW~~E~~ KDQLPVTA GARFRLAQ DGDLYRL KILDQLS DSGQYVSR ARNAIGEA FACVGLEV GAEA(SEQ ID NO : 94)
	U0 的重鏈(knob)	U0 的輕鏈	B0 的重鏈(hole) , 且 CH1 被 T.19 替換	B0 的輕鏈 , 且 CL 被 O.27

B U 2	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWL GWVRQMPGKGLDWIGI MSPVDSDIRYSPSFQGGV TMSVDKSITTAYLQWNS LKASDTAMYYCARRRP GQGYFDWGWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTL PCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQOGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K(SEQ ID NO : 95)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQ SGVPSRFS GSGSGTDF TLTISSLQ EDFATYYC QQYNIYPY TFGQGTK LEIKRTVA APSVFIFPP SDEQLKSG TASVVCLL NNFYPREA KVQWKVD NALQSGNS QESVTEOD SKDSTYSL STLTLSKA DYEKHKV YACEVTHQ GLSSPVTKS FNRGEC(SEQ ID NO : 96)	QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNN AINWVRQAPGQGLEW MGGIHPMFGTAKYSQN FQGRVAITADESTGTAS MELSSLRSEDTAVYYC ARSRDLLLFPHALSP WGRGTMVTVSSGGGGS GIPPKIECLPSDISIDEGK VLTVASAFTGEPTPEVT WSTGGRKIHSEEQGRFH IESTEDLTTLISDVQKQD GGLYSLSLGNEFGSDSA TVNIHIRSIDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLN NGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQOGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS LSLSPGK(SEQ ID NO : 97)	SSELTQDP AVSVALG QTVRVTC QGDSLRS YYASWYQ QKPGQAP VLVIYCK NNRPSGIP DRFSGSSS GNTASLTI TGAQAED EADYYCSS RDSSGNH WVFGGGT ELTVLGG GGSDQPF SGAPRFLT RPLSYVVS VGKDASLS SOIVGNPT POVSWEK DQLPVTAG ARFRLAQD GDLYRLKI LDLQLSDS GOYVSRA RNAIGEAF ACVGLEV GAEA(SEQ ID NO : 98)
	B0 的重鍵(knob)，且 CH1 被 T.19 替換	B0 的輕鍵，CL 被 O.27 替換	U0 的重鍵(hole)	U0 的輕鍵

B U 3	QVQLQQSGAEVKKPGSS VRVSKASGGTFNNNAI NWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQG RVAITADESTGTASMELS SLRSED~~TAVYYCAR~~SRD LLLFPHHALSPWGRGT MVTVSSGGGGSGIPPKIEC LP~~SDISIDE~~GKVLTVASAF TGEPTPEVTWSTGGRKIHS QE~~QGRFH~~IESTEDLTTLIS DVQKQDGGLYSLSLGNEF GSDSATVNIHIRSIDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLP PCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K(SEQ ID NO : 99)	SSELTQDP AVSVALG QTVRVTC QGDSLSRY YASWYQQ KPGQAPV LVIYGKNN RPSGIPDR FSGSSSGN TASLTITG AQAED~~EA~~ DYYCSSRD SSGNHWV FGGGTELT VLGGGGSD QPOFSGAP RELTRPLSY VVSVGKDA SLSSQIVGN PTQVSWE KDQLPVT GARFRLAQ DGDLYRLK ILDQLSDS GOYVSRAR NAIGEAF A CVGLEVGA EA(SEQ ID NO : 100)	EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTTYW LGWVRQMPGKGLDWI GIMSPVDSDIRYSPSFQ GQVTMSVDKSITTAYL QWNSLKASDTAMYCY ARRRPGQGYFDFWGO GTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHNKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS LSLSPGK(SEQ ID NO : 101)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQ SGVPSRFS GSGSGTDF TLTISSLQ PEDFATYY CQQYNIYP YTFGQGT KLEIKRTV AAPSVFIFP PSDEQLKS GTASVVCL LNNFYPRE AKVQWKV DNALQSG NSQESVTE QDSKDSTY SLSSTLTLS KADYEKH KVYACEV THQGLSSP VTKSFNRG EC(SEQ ID NO : 96)
	U0 的重鏈(knob)	U0 的輕鏈	B0 的重鏈(hole)，且 CH1 被 T.18 替換	B0 的輕鏈，且 CL 被 O.27 替換

B U 4	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTTYWL GWVRQMPGKGLDWIGI MSPVDSDIRYSPSFQGQV TMSVDKSITTAYLQWNS LKASDTAMYYCARRRP GQGYFDFWGGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLT PCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG K(SEQ ID NO : 95)	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQGISSW LAWYQQK PEKAPKSL IYAASSLQ SGVPSRFS GSGSGTDF TLTISSLQP EDFATYYC QQYNIYPY TFGQGTK LEIKRTVA APSVFIFPP SDEQLKSG TASVVCLL NNFYPREA KVQWKVD NALQSGNS QESVTEQD SKDSTYSL STLTLSKA DYEKHKV YACEVTHQ GLSSPVTKS FNRGEC(SE Q ID NO : 96)	QVQLQQSGAEVKKPGS SVRVSCKASGGTFNNN AINWVRQAPGQGLEW MGGIIPMFGTAKYSQN FQGRVAITADESTGTAS MELSSLRSEDTAVYYC ARSRDLLLFPFHALLSP WGRGTMVTVSSGGGGS KAGIRGIPPKIECLPSDISI DEGKVLTVASAFTGEPT PEVTWSTGGRKIHSQEQ GRFHIEDTLTTLISDV QKQDGGGLYSLSLGNEFG SDSATVNIHIRSIDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHN HYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 102)	SSELTQDP AVSVALG QTVRVTC QGDSLRS YYASWYQ QKPGQAP VLVIYGK NNRPSGIP DRFSGSSS GNTASLTI TGAQAED EADYYCSS RDSSGNH WVFGGGT ELTVLGG GGSDQPQF SGAPRFLT RPLSYVVS VGKDASLS SQIVGNPT POVSWEK DQLPVTAG ARFRLAOD GDLYRLKI LDLQLSDS GQYVSRA RNAIGEAF ACVGLEV GAEA(SEQ ID NO : 100)
	B0 重鍵(hole) , 且 CH1 被 T16 替換	B0 輕鍵 , 且 CL 被 0.24 替換	U0 的重鍵(knob)	U0 的輕鍵

B U 5	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRV SCKASGGTFNNNAINWVRQA PGQGLEWMGGIIPMFGTAKY SQNFQGRVAITADESTGTASM ELSSLRSEDTAVYYCARSRL LLFPHHALSPWGRGTMVTVS SGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEG KVLTVASAFTIGEPTPEVTWSTG GRKIHSQEQGRFHIENTDDLTT LIKDVOKQDGGLYTLTLRNEF GSDSATVNIHRSIDKTHTCP PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHODWLN GKEYCKCKVSNKALPAIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSSREEMT KNQVYSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 103)	SSELTDQPAV SVALGQTVR VTCQGDSLRL SYYASWYQQ KPGQAPVLV IYGKNNRPS GIPDRFSGSS SGN TASLTIT GAQAEDEAD YYCSSRDSSG NHWVFGGG TELTVLGGG GSSGAPRELT RPLAFVSVG KDATLSSQIV GNPTPOVSWE KDKQPV TAG ARFRLAQDG DLYRLKIDL QLSDSGOYVS RARNAIG EAF ACLGLOVDA EA(SEQ ID NO : 104)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTTYWLGWVRQ MPKGGLDWIGIMSPVDSDIR YSPSFQGGVTMSVDKSITTA YLQWNSL KASDTAMY YCAR RRPQGQGYDFW GQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHODWLN GKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO : 95)	DIQMTQSPSS LSASVGDRV TITCRASQGI SSWLAWYQ QKPEKAPKS LIYAASSLQS GVPSRFSGS GSGTDFLTIT SSLQPEDFAT YYCQQYNIY PYTFGQGTK LEIKRTVAAP SVFIFFPSDEQ LKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVD NALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKH KVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC(SE Q ID NO : 96)
-------------	---	---	--	---

備註：序列中，粗體字部分為可變區序列，單下劃線部分為 CH1 或 Titin-T 鏈，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3，雙下劃線部分為 CL 或 Obscurin-O 鏈。

【0396】此外，還構建了 FA-1 雙特異性抗體，FA-1 雙特異性抗體是由 A0 抗體的一條重鏈(Fc 區進行 knob 修飾)和一條輕鏈，與 F0 抗體的一條重鏈(Fc 區進行 hole 修飾，CH1 被 T.16 替換)和一條輕鏈(CL 被 O.24 替換)構成的類 IgG 雙特異性抗體。FA-1 的四條鏈序列如下表 10：

【0397】 表 10. FA-1 雙特異性抗體序列表

雙 抗 名 稱	類 IgG 雙特異性抗體 4 條鏈序列			
	鏈 1	鏈 2	鏈 3	鏈 4
F A - 1	F0 的重鏈(hole)，且 CH1 被 T.16 替換	F0 的輕鏈，且 CL 被 O.24 替換	A0 的重鏈(knob)	A0 的輕鏈
	QVQLVQSGGGVVP PGTS LRLSCAASGFIFSS AMH WVRQAPGKGLEW VAVI SYDGSNKYYVDS VKGRF TISRDN SKNTLYLQ MNS LRAEDTAVYYCAR SARL YASFDYWQGAL VTVSS <u>GGGGSGIPPKIECLPIDISID</u> <u>EGKVLTVASAFTGEPTPE</u> <u>VTWSTGGRKIHSQEQGRF</u> <u>HIENTDDLTTLIKDVQKQ</u> <u>DGGLYTLTLRNEFGSDSA</u> <u>TVNIHIRSIDKTHTCPPCPA</u> <u>PEAAGGPSVFLFPPKPKDT</u> <u>LMISRTPEVTCVVVDVSH</u> <u>EDPEVKFNWYVDGVEVH</u> <u>NAKTKPREEQYNSTYRVV</u> <u>SVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>CKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVCTLP</u> <u>PSREEM</u> <u>TKNQVSLCAVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTPPV</u> <u>LDSDGSFFLVSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO : 107)	DTVVTQEP SFSVSPGG TVTLTCGL SSGSVSTS HYP SWYQ QTPGQAP RMLIYNTN TRSSGVPD RFSGSILG NKAALTIT GAQADDE SDYYCAIH VDRDIWVF GGG TKLT VLGGGGSS GAPRFLTR PLAFVVS GKDATLSS QIVGNPTP QVSWEKD KOPV TAGA RFRLAQDG DLYRLKIL DLQLSDSG QYVSRARN AIGEAFAC LGLQVDAE <u>A</u> (SEQ ID NO : 108)	EVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNEYISY WAYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPCREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO : 109)	QTVVTQE PSLTVSPG GTVTLTC GSSTGAVT SGNYPNW VQOKPGQ APRGLIGG TKFLAPG TPARFSGS LLGGKAA LTLSGVQP EDEAEYY CVLWYSN RWVFGGG TKLTVLRT VAAPSVFIF PPSDEQLK SGTASVVC LLNNFYPR EAKVQWK VDNALQS GNSQESVT EQDSKDST YLSLSTLTL SKADYEK HKVYACE VTHQGLSS PVTKSFNR GEC (SEQ ID NO : 110)

備註：序列中，粗體字部分為可變區序列，單下劃線部分為 CH1 或 Titin-T 鏈，點劃線部分為 CH2，斜體字部分為 CH3，雙下劃線部分為 CL 或 Obscurin-O 鏈。

二、雙特異抗體的檢測

【0398】藉由本披露測試例 3 方法檢測 DI-1，將 DI-1 的 4 條鏈共同轉染細胞進行表達，然後進行質譜分析，實驗結果見表 11 和圖 6A 至圖 6C，質譜分析結果未檢測到同型二聚體和錯配分子，DI-1 正確組裝。

【0399】表 11. DI-1 質譜數據

DI-1 鏈	鏈 1(DI-1- H1)	鏈 2(DI-1-L1)	鏈 3(DI-1- H2)	鏈 4(DI-1- L2)	DI-1-L1+DI-1-L2+ DI-1-H1+DI-1-H2	MS 結果
分子 量	49983.82	23487.38	50450.05	22567.45	146488.70	正確，未檢測 到同型二聚體 和錯配分子

【0400】另外，藉由本披露測試例 3 和測試例 2 方法檢測 BU5 表達。首先將 BU5 的四條鏈共同轉染細胞表達雙特異性抗體，另外 B0、U0 做為對照。然後對表達產物進行純度及質譜分析，實驗結果見表 12 及圖 9A 至圖 9C，實驗結果表明，雙特異性抗體 BU5 被成功表達，BU5 四條鏈成功組裝成目標分子，且無錯配出現。且雙特異性分子 BU5 純度高，SEC%達 88%。

【0401】表 12. BU5 質譜分析結果

抗體	質譜分析
對照 B0	✓
對照 U0	✓
BU5	✓

備註：表中，“✓”表示正確配對

【0402】此外，藉由本披露的測試例 2 和測試例 4 的方法檢測構建的 BU1- BU4 雙特異性抗體的抗體純度以及抗原結合活性，實驗結果見表 13，實

驗結果表明，CH1/CL 被替換後的雙特異性抗體，仍保持良好的抗原結合活性，且抗體純度高。

【0403】 表 13、雙特異性抗體抗原結合活性及純度實驗結果

抗體名稱	抗體純度 SEC(%)	抗原結合 EC50(nM)	
		抗原 BAFF	抗原 P40
B0	99.05	0.2193	-
U0	99.63	-	0.08881
BU1	95.23	0.3561	0.08397
BU2	91.09	0.4693	0.05674
BU3	83.45	0.4131	0.2238
BU4	91.85	0.5057	0.04429

測試例

測試例 1、抗體的表達量測試方法

【0404】 使用單株抗體或雙特異性抗體的表達質粒轉染 HEK293E 細胞，6 天后收集表達上清，高速離心去除雜質。上清用 Protein A 管柱(GE Healthcare)進行純化。用 PBS 沖洗管柱子，至 A280 讀數降至基線，再用 100mM 乙酸緩衝液(pH3.5)沖洗層析管柱，用 1M Tris-HCl，pH8.0 中和。抗體的表達量由最終純化得到的抗體量/表達體積來定量。

測試例 2、抗體的純度檢測方法

【0405】 使用 SEC-HPLC 進行抗體純度監控。檢測根據儀器操作說明書進行，使用 Waters e2695 色譜儀，色譜管柱為 Waters Xbridge BEH 200A SEC，

流動相為 PBS(用稀鹽酸調節 pH 至 6.8)，進樣 100μg 蛋白，等度沖提，流速為 0.5mL/min。抗體純度為主峰的峰面積占總出峰面積的百分比(SEC(%))。

測試例 3、抗體質譜檢測方法

(一)樣品準備：

1. 脫糖完整分子量測定: 取所表達抗體 30 μg，凍乾後加入 10 μl 8M Gua-HCl，70℃水浴變性 10 min。加入 90 μl 蒸餾水，取 30 μl 加入 0.8 μL PNG 酶 F(肽 N-糖苷酶 F)，放入 37℃水浴中孵育 2h，取 0.5μg 進行脫糖完整分子量測定。

2. 脫糖還原分子量測定: 取所表達抗體 30 μg，凍乾後加入 10 μl 8 M Gua-HCl，70℃水浴變性 10 min。加入 90 μl 蒸餾水，取 30 μl 加入 0.8 μL PNG 酶 F(肽 N-糖苷酶 F)，放入 37℃水浴中孵育 2hr。再加入 2 μl 0.025M DTT，70℃水浴中還原 10 min，取 0.5μg 進行脫糖還原分子量測定。

(二)色譜-質譜條件：

色譜條件：

色譜管柱：Poroshell 300SB-C8 5um 2.1*75mm

流動相：A：0.1%HCOOH/H2O B: 0.1% HCOOH/CAN

管柱溫：75℃

梯度：

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

【0406】

質譜條件：

質譜：Agilent 6530 Q-TOF LC-MS

電離模式 ESI

採集模式：1 GHz(質量範圍 500–5000 m/z)

乾燥氣溫度：325°C

乾燥氣流量：10 L/min

霧化器：40psi

鞘氣溫度：350°C

鞘氣流速：12L/min

噴霧電壓：500V

毛細管電壓：3, 500 V

裂解電壓：200 V

Skimmer 電壓：65V

Rf 電壓：7500V

將待測抗體進行質譜分析，實驗結果表明 CH1/CL 被 Titin-T/Obseurin-O 替換後，抗體保持正確組裝。

測試例 4、抗體結合活性檢測方法

【0407】對膜蛋白靶點的抗體，其與抗原結合活性檢測可採用 FACS 的方法。例如，C0、N0、F0、V0、S0，及其 CH1/CL 結構改造抗體，可藉由 FACS 的方法進行檢測。在 96 孔 U 型底板(corning, 3795)中加入 FACS 緩衝液 (98% PBS, 2% FBS)重懸的細胞(2×10^6 細胞/ml, 90 μ l)，並加入 10 μ l 梯度稀釋

的抗體，4℃孵育 1h，FACS 緩衝液清洗 2 次，隨後每孔加入 Alexa Fluor 488 羊抗-人 IgG(H+L)(invitrogen，Cat# 2015982，1:1000 稀釋)，4℃孵育一小時，清洗 2 次後用 FACS 緩衝液重懸細胞，最後用 FACS CantoII(BD)讀取熒光信號值。最後用 FlowJo 7.6 和 Graphpad Prism 5 對數據進行處理分析。

【0408】對於靶點為可溶性蛋白的抗體，用 ELISA 的方法檢測抗體與可溶性蛋白的結合活性，例如，D0、I0、B0、U0、H0、R0、J0，及其 CH1/CL 結構改造抗體，可藉由 ELISA 的方法檢測。方法如下：用 pH7.4 的 PBS(源培生物，B320)緩衝液將蛋白稀釋至 1 µg/ml，以 100 µl/孔的體積加入 96 孔酶標板(Corning，9018)中，4℃過夜孵育。棄去液體後，每孔加入 300 µl 用 PBS 稀釋的 5%脫脂牛奶(BD，232100)進行封閉，37℃孵育 2 小時。封閉結束後，棄去封閉液，並用 PBST 緩衝液(PH7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次後，每孔加入 100 µl 梯度稀釋的抗體溶液，於 37℃孵育 1 小時。孵育結束後用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 µl 鼠抗-人 IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch，209-035-088，1:8000 稀釋)，37℃孵育 1 小時。用 PBST 洗板 3 次後，每孔加入 100 µl TMB 顯色受質(KPL，5120-0077)，室溫孵育 10-15 min，每孔加入 50 µl 1 M H2SO4 終止反應，用酶標儀讀取在 450 nm 處的吸收值，用軟件擬合出抗體與抗原的結合曲線，計算出 EC50 值。

【0409】本測試例中抗體相應抗原如下：D0 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 hRANKL(購自 Sino biological，11682-HNCH)；I0 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 hNGF(購自 Sino biological，11050-HNAC)；B0 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 hBAFF(購自 Sino biological，10056-HNCH)；U0 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 hP40(購自 Sino biological，10052-H08H)；H0、R0，及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 hIL-5(購自 R&D systems，205-IL-025/CF)；J0 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合

的抗原為 hTSLP(購自 Sino biological, 16135-H08H); C0、N0, 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 CEA(過表達 CEA 細胞 MKN45(購自南京科佰, CBP60488)); F0、V0、S0, 及其 CH1/CL 結構改造抗體結合的抗原為 B7H3(過表達 B7H3 重組細胞系 CT26-B7H3(CT26 來源於中科院細胞庫, B7H3 序列參見 ID: XP_005254757.1))。

測試例 5、CH1/CL 結構改造抗體減少錯配實驗方法

一、不同抗體輕/重鏈交叉錯配分子的表達檢測方法

【0410】本實驗藉由分析不同輕/重鏈抗體配對表達來驗證 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈或 Titin-T 鏈/類 Obscurin-O 鏈替換後能有效減少重/輕鏈錯配的發生。具體地, 在轉染細胞表達抗體時, 將 D0 和 I0 的重/輕鏈分別交換(即 I/D-1(D0 重鏈+I0 輕鏈); I/D-2(I0 重鏈+D0 輕鏈)來檢測野生型 CH1 和 CL 是否會形成交叉錯配分子; 同時, 將 D0 和 I0 的 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換後的結構改造的抗體 D3(D0 的重鏈 CH1 被 T.11 替換, 輕鏈 CL 被 O.21 替換)、I3(I0 的重鏈 CH1 被 T.11 替換, 輕鏈 CL 被 O.21 替換)的重/輕鏈分別交換, 構建錯配分子: I/D-3(D0 重鏈+I3 輕鏈)、I/D-4(D3 重鏈+I0 輕鏈)、I/D-5(I0 重鏈+I3 輕鏈)、I/D-6(I3 重鏈+D0 輕鏈), 構建的抗體結構示意圖見圖 7。

【0411】藉由測試例 1 方法檢測抗體表達量, 藉由測試例 3 方法對表達產物進行質譜分析, 檢測是否會形成錯配分子。實驗結果見表 14, 實驗結果表明, D0 重鏈+I0 輕鏈, 或 I0 重鏈+D0 輕鏈, 共同表達時, 均可形成完整 IgG 分子(150kDa), 表達量很高, 分別達到 74.4mg/L 和 73.8mg/L, 且 LC-MS 結果證明所得蛋白為錯配後的 IgG 分子, 這說明如果不對 CH1-CL 進行改造或替換,

雙特異性抗體的四條不同重輕鏈共同表達，將會形成大量輕/重鏈錯配分子。而經 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換 CH1/CL 後，I/D-3(D0 重鏈+I3 輕鏈)、I/D-4(D3 重鏈+I0 輕鏈)、I/D-5(I0 重鏈+I3 輕鏈)、I/D-6(I3 重鏈+D0 輕鏈)四種形式交叉錯配表達均無目的分子產生(150kDa)，除 D3 重鏈+I0 輕鏈組合形成有少量兩條重鏈的錯誤分子外(分子量為 100kDa，)，其他三種形式無錯配分子產生，這說明改造後的非同源配對不會形成 IgG 結構形式的錯配分子。因此，用 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換 CH1-CL 後將有效避免或減少類 IgG 的雙特異性抗體的輕/重鏈間的非同源交叉配對分子的形成。

【0412】 表 14. 不同輕/重鏈交叉配對的抗體表達量和質譜分析

錯配 名稱	重鏈	輕鏈	抗體表 達量 (mg/L)	質譜分析
I/D-1	D0 重鏈	I0 輕鏈	74.4	√
I/D-2	I0 重鏈	D0 輕鏈	73.8	√
I/D-3	D0 重鏈	I3 輕鏈	0.04	×
I/D-4	D3 重鏈	I0 輕鏈	12.75	只有重鏈，無輕鏈
I/D-5	I0 重鏈	D3 輕鏈	0.04	×
I/D-6	I3 重鏈	D0 輕鏈	0.25	×

備註：表中，“√”表示檢測到該錯配分子，“×”表示未檢測到該錯配分子。

二、雙特異性抗體輕/重鏈錯配表達檢測方法

【0413】 為驗證 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換後將不會發生錯配或減少錯配，本測試例設計了三種形式的輕/重鏈交叉配對表達，即用兩條不

同的重鏈和一條相同的 VL-CL 輕鏈來做雙特異性抗體表達，或兩條不同的重鏈和一條相同的 Obscurin-O 鏈替換 CL 的輕鏈來做表達，或用兩條不同的重鏈和兩條不同的輕鏈的正常表達做對照(具體配對見表 15)。

【0414】然後對表達產物進行質譜分析(方法見本披露測試例 3)，並檢測抗體純度 SEC(方法見本披露測試 2)。實驗結果見表 15，結果表明，Obscurin-O 鏈替換的輕鏈和未進行 CL 替換的輕鏈共同加入時才會形成正確的分子，而只加一條未進行 CL 替換的輕鏈或只加一條 Obscurin-O 鏈替換 CL 的輕鏈的交叉配對中沒有找到正確的目標分子。這說明被 Obscurin-O 鏈替換 CL 的輕鏈會更容易與 CH1 被 Titin-T 鏈替換的重鏈配對結合形成分子，而不會與 CH1 未被 Titin-T 鏈替換的重鏈發生交叉錯配；CL 未被 Obscurin-O 鏈替換的輕鏈更容易與 CH1 未進行 Titin-T 鏈替換的重鏈配對結合，而不會與 CH1 被 Titin-T 鏈替換的重鏈結合。

【0415】 表 15. 雙特異性抗體輕/重鏈錯配的檢測結果

錯配名稱	第一重鏈(B-H1)	第二重鏈(B-H2)	第一輕鏈(B-L1)	第二輕鏈(B-L2)	質譜分析				抗體純度SEC(%)	抗體表達量(mg/L)
					B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H1 B-H2 B-L1 B-L2	B-H1 B-H2 B-L1 B-L2		
B/U-1	B0重鏈CH1被T11替換(含hole修飾)形成的鏈	U0重鏈(含knob修飾)	B0輕鏈的CL被O.21替換後形成的鏈	U0輕鏈	✓	--	--	--	91	25.6
B/U-2	B0重鏈(含hole修飾)	U0重鏈(含knob修飾)	B0輕鏈的CL被O.21替換後形成的鏈	B0輕鏈的CL被O.21替換後形成的鏈	--	--	--	--	--	0.5
B/U-3	B0重鏈CH1被T11替換(含hole修飾)形成的鏈	U0重鏈(含knob修飾)	U0輕鏈	U0輕鏈	--	--	--	✓	33	15.6

備註(表中，“✓”表示檢測到該 4 條鏈配對分子，“--”表示未檢測到該 4 條鏈配對分子)。

測試例 6、雙特異性抗體與抗原的親和力檢測

【0416】用 Biacore T200(GE)儀器測定待測抗體與抗原蛋白的親和力。按照人抗捕獲試劑盒(GE, Cat# BR-1008-39)說明書中的方法,用 Protein A 生物傳感芯片(Cat. # 29127556, GE)親和捕獲待測抗體,然後於芯片表面流經一系列濃度梯度的可溶性抗原,用 Biacore T200 儀器實時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線。在每個實驗循環解離完成後,用甘胺酸-鹽酸再生溶液(pH 1.5 Cat. # BR-1003-54, GE)將生物傳感芯片洗淨再生。實驗得到的數據用 BIAevaluation version 4.1, GE 軟件以(1:1)Langmuir 模型擬合數據,得出親和力數值,實驗結果見表 16。

【0417】實驗結果表明,本披露的結構改造的雙特異性抗體完全保留了兩個母源單株抗體對其抗原的親和力。本實驗中,抗原 hRANKL(購自 Sino biological, 11682-HNCH), hNGF(購自 Sino biological, 11050-HNAC), hBAFF(購自 Sino biological, 10056-HNCH), hP40(購自 Sino biological, 10052-H08H), hB7H3(實驗室製備,序列參見 SEQ ID NO: 111), hCD3 抗原(實驗室製備,為 hCD3 的 δ 亞基(序列參見 SEQ ID NO: 112)和 ϵ 亞基(序列參見 SEQ ID NO: 113)組成的異源二聚體)。

【0418】 表 16. 雙特異性抗體親和力檢測結果

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

測試例 7、CH1-CL 結構改造後的雙抗同時結合兩個靶抗原實驗

【0419】 藉由用 Biacore T200(GE)儀器測定待測抗體與抗原蛋白的親和力，驗證本披露的 CH1-CL 結構改造的雙特異性抗體可以同時結合兩個靶抗原。具體實驗步驟為：用 Protein A 生物傳感芯片(Cat. # 29127556，GE)親和捕獲抗體 BU5，然後於芯片表面流經雙特異性抗體的第一抗原分子 hP40(購自 Sino biological，10052-H08H)至飽和，再進樣一定濃度的第二抗原分子

hBAFF(購自 Sino biological, 10056-HNCH), 用 Biacore T200 儀器實時檢測反應信號獲得結合和解離曲線。在每個實驗循環解離完成後, 用甘胺酸-鹽酸再生溶液(pH 1.5 Cat. # BR-1003-54, GE)將生物傳感芯片洗淨再生, 數據擬合模型採用 BIAevaluation version 4.1, GE 軟件以(1:1)Langmuir 模型擬合。然後, 再用 Protein A 生物傳感芯片(Cat. # 29127556, GE)親和捕獲抗體 BU5, 然後於芯片表面流經雙特異性抗體的第一抗原分子 hP40(購自 Sino biological, 10052-H08H)至飽和, 再進樣一定濃度的第二抗原分子 hBAFF(購自 Sino biological, 10056-HNCH), 用 Biacore T200 儀器實時檢測反應信號獲得結合和解離曲線在每個實驗循環解離完成後, 用甘胺酸-鹽酸再生溶液(pH 1.5 Cat. # BR-1003-54, GE)將生物傳感芯片洗淨再生, 數據擬合模型採用 BIAevaluation version 4.1, GE 軟件以(1:1)Langmuir 模型擬合。

【0420】實驗結果見表 17, 實驗結果表明雙特異性抗體 BU5 在結合抗原 hP40 達到飽和後, 可繼續結合抗原 hBAFF, 且再結合 hBaFF 的能力和單抗 B0 相當。同樣地, 雙特異性抗體 BU5 在結合抗原 hBAFF 達到飽和後, 可繼續結合抗原 hP40, 且再結合 hP40 的能力和 U0 相當。這說明本披露的 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換的雙特異性抗體具備雙靶性特點, 可同時結合兩個靶抗原。

【0421】 表 17. 抗體親和力檢測結果

抗體	芯片表面流經抗原	親和力檢測數據			
		抗原	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
Bmab	hBAFF	hBAFF	1.77E+05	1.53E-04	8.64E-10
Umab	hP40	hP40	1.59E+06	1.09E-04	6.89E-11
BU5	hBAFF 進樣至飽和結合， 再進樣 hP40 抗原	hP40	1.57E+06	1.04E-04	6.61E-11
	hP40 至飽和結合， 再進樣 hBAFF 抗原	hBAFF	1.57E+05	8.44E-05	5.37E-10

測試例 8、DI-1 雙特異性抗體破骨細胞分化實驗

【0422】 消化 Raw264.7 細胞(中科院細胞庫，SCSP-5036)並重懸計數，鋪在 24 孔細胞培養板(Corning，3524)中，37℃細胞培養箱中過夜培養。次日將抗體溶液按不同濃度進行稀釋並與 RANKL(Sino biological，11682-HNCH)混合均勻加入細胞培養板中，RANKL 終濃度為 50 ng/ml，37℃繼續培養。96 h 後除去 24 孔板中的溶液，每孔加入 100 μl 細胞裂解液(碧雲天，P0013J)，吹打混勻，將裂解液轉移到 EP 管中，12000 g 離心 5 min，取上清液用抗酒石酸酸性磷酸酶檢測試劑盒(碧雲天，P0332)按說明書的方法進行檢測，用酶標儀讀取 405 nm 處的吸收值。將檢測值用軟件擬合成曲線，計算 IC50 值。實驗結果見圖 10，實驗結果表明 CH1/CL 被替換後的雙特異性抗體 DI-1 保持良好的活性，有效抑制破骨細胞分化。

測試例 9、DI-1 雙特異性抗體 TF1 細胞增殖實驗

【0423】 藉由 NGF 誘導的 TF-1 細胞(ATCC，CRL-2003)增殖實驗來評價抗體在細胞水平的活性。實驗方法如下：消化收集 TF1 細胞，重懸後計數，鋪

在 96 孔板(Corning, 3903)中, 37°C 培養箱中過夜培養。次日將抗體溶液按不同濃度進行稀釋並與 NGF(Sino biological, 11050-HNAC)混合均勻加入細胞培養板中, NGF 的終濃度為 10 ng/ml, 細胞放入培養箱中繼續培養。72 h 後取出細胞培養板, 每孔加入 50 μ l Cell-titer Glo(Promega, G755B)檢測液, 放在搖床上孵育 10 min, 室溫靜置 10 min。用酶標儀(PerkinElmer, Victor3)檢測發光信號。將檢測的信號值用軟件擬合出曲線圖, 計算 IC₅₀ 值。實驗結果見圖 11, 實驗結果表明 CH1/CL 被替換後的雙特異性抗體 DI-1 具有良好的活性。

測試例 10、雙特異性抗體 CH1/CL 被不同結構域替換後輕重鏈錯配檢測

【0424】 以下藉由實驗分析 CH1/CL 被 Titin-T 鏈/Obseurin-O 鏈替換或被 TCR α /TCR β 替換對雙特異性抗體的輕重鏈錯配情況, 具體實驗如下:

一、雙特異性抗體四條鏈共表達時輕重鏈錯配實驗

【0425】 用 TCR α /TCR β 替換 H0 或 J1 的 CH1/CL, 構建由四條鏈組成的雙特異性抗體 HJ-1 和 HJ-2; 用 Titin-T 鏈/Obseurin-O 鏈替換 H0 或 J1 的 CH1/CL, 構建由四條鏈組成的雙特異性抗體 HJ-3 和 HJ-4, 雙特異性抗體的結構示意圖參見圖 12, 雙特異性抗體的全長序列參見表 18:

【0426】 表 18. 雙特異性抗體序列表

雙 抗 名 稱	類 IgG 雙特異性抗體 4 條鏈序列			
	鏈 1	鏈 3	鏈 2	鏈 4
H J- 1	H0 的重鏈(knob),且 CH1 被 TCRβ 替換	H0 的輕鏈, 且 CL 被 TCRα 替換	J1 的重鏈(hole)	J1 的輕鏈
	HJ-1-H1 : <u>EVQLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSISY</u> <u>EGDITYYGDSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAE</u> <u>DTATYYCASQTLRESFDY</u> <u>WGQGLTVTVSSLEDLKN</u> <u>VFPPEVAVFEPSEAEISHT</u> <u>QKATLVCLATGFYPDHVE</u> <u>LSWWVNGKEVHSGVCTD</u> <u>PQPLKEQPALQDSRYALS</u> <u>SRLRVSATFWQNPRNHFR</u> <u>CQVQFYGLSENDEWTQD</u> <u>RAKPVTQIVSAEAWGRAS</u> <u>DKTHTCPPCPAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMIS RTP</u> <u>EVTCTVVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPREP</u> <u>QVYTLPPCREEMTKNQVS</u> <u>LWCLVKGFYPSDIAVEWE</u> <u>SNGQPENNYKTPPVLD</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSV MHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGKHHHHH</u> (SEQ ID NO : 114)	HJ-1-L1 : <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVITTCR</u> <u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQOKP</u> <u>GKSPKLLIY</u> <u>GTSNLEVG</u> <u>VPSRFSGR</u> <u>SGTDFTLTI</u> <u>SSLQPEDFA</u> <u>TYYCLQDK</u> <u>EFPRTFGG</u> <u>GTKVEIKK</u> <u>PDIQNPDA</u> <u>VYQLRDSK</u> <u>SSDKSVCL</u> <u>FTDFDSQT</u> <u>QVSQSKDS</u> <u>DVYITDKC</u> <u>VLDMRSM</u> <u>DFKSNSAV</u> <u>AWSQKSDF</u> <u>ACANAFQN</u> <u>SIIPEDTFFP</u> <u>SPESS(SEQ</u> <u>ID NO : 115)</u>	HJ-1-H2 : <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLR</u> <u>SED TAVYYCAREDNTGT</u> <u>AFDYWGQGT TTVTVSSAS</u> <u>TKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPV</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSSVVTVP</u> <u>SSSLGTQTYICNVNHKPS</u> <u>NTKVDKKVEPKSCDKTH</u> <u>TCPPCPAPEAAGGPSVFL</u> <u>FPPKPKDTLMISRTPEVT</u> <u>CVVVDVSHEDPEVKFN</u> <u>WYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVL</u> <u>HQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVCTLPPSREEMTK</u> <u>NQVSLSCAVKGFYP</u> <u>SDI AVEWESNGOPENNYKT</u> <u>TPPVLDSDGSFFLVSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>PGKDYKDDDDK(SEQ</u> <u>ID NO : 116)</u>	HJ-1-L2 : <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u> <u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGQSPQLLI</u> <u>YYVSEHYT</u> <u>GVPDRFSG</u> <u>SGYGTDF</u> <u>LKISRVEA</u> <u>EDVGVYY</u> <u>CQQHHRFP</u> <u>LTFGQGTK</u> <u>LEIKRTVA</u> <u>APSVFI</u> <u>PP SDEQLKSG</u> <u>TASVVCLL</u> <u>NNFYPREA</u> <u>KVQWKVD</u> <u>NALQSGNS</u> <u>QESVTEQD</u> <u>SKDSTYSL</u> <u>SSTLTLSK</u> <u>ADYEKHK</u> <u>VYACEVT</u> <u>HQGLSSPV</u> <u>TKSFNRGE</u> <u>C(SEQ ID</u> <u>NO : 117)</u>
H J- 2	H0 的重鏈(hole)	H0 的輕鏈	J1 的重鏈(knob),且 CH1 被 TCRβ 替換	J1 的輕鏈, 且 CL 被 TCRα 替換
	HJ-2-H1 : <u>EVQLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSISY</u> <u>EGDITYYGDSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAE</u> <u>DTATYYCASQTLRESFDY</u> <u>WGQGLTVTVSSASTKGPS</u>	HJ-2-L1 : <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVITTCR</u> <u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQOKP</u> <u>GKSPKLLIY</u> <u>GTSNLEVG</u>	HJ-1-H2 : <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLR</u> <u>SED TAVYYCAREDNTGT</u> <u>AFDYWGQGT TTVTVSSLE</u>	HJ-2-L2 : <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u> <u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGQSPQLLI</u> <u>YYVSEHYT</u>

	VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPSSREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGOPENNYKTTTP VLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQOGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKDY KDDDDK(SEQ ID NO : 118)	VPSRFSGSR SGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCLQDK EFPRTFGG GTKVEIKR TVAAPSVFI FPPSDEQLK SGTASVVC LLNNFYPR EAKVQWK VDNALQSG NSQESVTE QDSKDSKY SLSSTLTLS KADYEKH KVYACEVT HQGLSSPV TKSFNRGE C(SEQ ID NO : 119)	DLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWVNG KEVHSGVCTDPQPLKE QPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQC VQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRA SDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQOGNV FSCSVMHEALHNHYTQK LSLSLSPGKHHHHHHH(SEQ ID NO : 120)	GVPDRFSG SGYGTDFE LKISRVEA EDVGVYY CQQHHRFP LTFGQGTK LEIKKPD QNPDPV YQLRDSK SSDKSVCL FTDFDSQT QVSQSKDS DVYITDKC VLDMRSM DFKSNSAV AWSQKSD FACANAF QNSIIPED TFFPSPESS (SEQ ID NO : 121)
H J- 3	H0 的重鏈(knob) , 且 CH1 被 T.11 替換	H0 的輕鏈, 且 CL 被 O.21 替換	J1 的重鏈(hole)	J1 的輕鏈
	HJ-3-H1 : EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSHYMA WVRQAPGKGLEWVTSISY EGDITYYGDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAE DTATYYCASQTLRESFDY WGQGLTVTVSSGGGGSG IPPKIECLPIDISIDEKGV LTVASAFTGEPTPEVTW STGGRKIHSQEQRFHIE NTDDLTTLLIKDVQKQD GGLYTLTLRNEFGSDSA TVNIHIRSIDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGOPENNY KTTTPVLDSGDSFFLVSKL TVDKSRWQOGNVFSCSV	HJ-3-L1 : DIQMTQSP SSVSASVG DRVITICR ASQDIANY LSWYQQKP GKSPKLLIY GTSNLEVG VPSRFSGSR SGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCLQDK EFPRTFGG GTKVEIKG GGGSSGAP RFLTRPLA FVSVSGKD ATLSSQIV GNPTPQVS WEKDKQP VTAGARF RLAQDGD LYRLKILD LQLSDSGQ YVSRARNA	HJ-3-H2 : EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKASGYTFSNYLIE WVRQAPGQGLEWIGVID PGVGDTNYNENFKGRAT LTADKSTSTAYIELSSLR SEDNAVYYCAREDNTGT AFDYWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQ REPQVCTLPSSREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGOPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLT	HJ-3-L2 : SIVMTQTP LSLSVTPG QPASISCK ASQSVSSD VTWYLOK PGQSPQLLI YYVSEHYT GVPDRFSG SGYGTDFE LKISRVEA EDVGVYY CQQHHRFP LTFGQGTK LEIKRTVA APSVFIFPP SDEQLKSG TASVVCLL NNFYPREA KVQWKVD NALQSGNS QESVTEQD SKDSTYSL SSTLTLSK ADYEKHK

	<u>MHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GKHHHHHHH</u> (SEQ ID NO : 122)	IGEA FACL GLQV DAE A (SEQ ID NO : 123)	<u>VDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLS</u> <u>PGKDYKDDDDK</u> (SEQ ID NO : 116)	<u>VYACEVT</u> <u>HQGLSSPV</u> <u>TKSFNRGE</u> <u>C</u> (SEQ ID NO : 117)
H J- 4	H0 的重鏈(hole)	H0 的輕鏈	J1 的重鏈(knob),且 CH1 被 T.11 替換	J1 的輕鏈, 且 CL 被 O.21 替換
	HJ-4-H1 : <u>EVQLVESGGGLVQPGGSL</u> <u>RLSCAASGFTFSHYMA</u> <u>WVRQAPGKGLEWVTSISY</u> <u>EGDITYYGDSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAE</u> <u>DTATYYCASQTLRESFDY</u> <u>WGQGTLLTVSSASTKGPS</u> <u>VFPLAPSSKSTSGGTAALG</u> <u>CLVKDYFPEPVTVSWNSG</u> <u>ALTSGVHTFPAVLQSSGL</u> <u>YSLSSVVTVPSSSLGTQTY</u> <u>ICNVNHKPSNTKVDKKVE</u> <u>PKSCDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>SNKALPAPIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVCTLPSPREEMTK</u> <u>NQVSLSCAVKGFYPEDIA</u> <u>VEWESNGOPENNYKTTTP</u> <u>VLDSGDSFFLVSKLTVDK</u> <u>SRWQQGNVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGKDY</u> <u>KDDDDK</u> (SEQ ID NO : 118)	HJ-4-L1 : <u>DIQMTQSP</u> <u>SSVSASVG</u> <u>DRVITICR</u> <u>ASQDIANY</u> <u>LSWYQQKP</u> <u>GKSPKLLIY</u> <u>GTSNLEVG</u> <u>VPSRFSGSR</u> <u>SGTDFTLTI</u> <u>SSLQPEDFA</u> <u>TYYCLQDK</u> <u>EFPRTFGG</u> <u>GTKVEIKR</u> <u>TVAAPSFI</u> <u>FPPSDEQLK</u> <u>SGTASVVC</u> <u>LLNNFYPR</u> <u>EAKVQWK</u> <u>VDNALQSG</u> <u>NSQESVTE</u> <u>QDSKDY</u> <u>SLSTLTLS</u> <u>KADYEKH</u> <u>KVYACEVT</u> <u>HQGLSSPV</u> <u>TKSFNRGE</u> <u>C</u> (SEQ ID NO : 119)	HJ-4-H2 : <u>EVQLVQSGAEVKKPGSS</u> <u>VKVSCKASGYTFSNYLIE</u> <u>WVRQAPGQGLEWIGVID</u> <u>PGVGDTNYNENFKGRAT</u> <u>LTADKSTSTAYIELSSLR</u> <u>SEDATVYYCAREDNTGT</u> <u>AFDYWGQGTITVTVSSG</u> GGGSGIPPKIECLPIDISI DEGKVLTVASAFTGEP TPEVTWSTGGRKIHSQ EQGRFHIENTDDLTLTI IKDVQKQDGGGLYTLTL RNEFGSDSATVNIHIRSI <u>DKTHTCPPCPAPEAAGG</u> <u>PSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPE</u> <u>VKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPCRE</u> <u>EMTKNQVSLWCLVKGF</u> <u>YPSDIAVEWESNGOPEN</u> <u>NYKTTTPPVLDSDGSFFLY</u> <u>SKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKS</u> <u>LSLSPGKHHHHHHH</u> (SEQ ID NO : 124)	HJ-4-L2 : <u>SIVMTQTP</u> <u>LSLSVTPG</u> <u>QPASISCK</u> <u>ASQSVSSD</u> <u>VTWYLQK</u> <u>PGQSPQLLI</u> <u>YYVSEHYT</u> <u>GVPDRFSG</u> <u>SGYGTDFI</u> <u>LKISRVEA</u> <u>EDVGVYY</u> <u>CQQHHRFP</u> <u>LTFGQGTK</u> <u>LEIKGGGG</u> SSGAPRFL TRPLAFVV SVGKDAT LSSQIVGN PTPOVSW EKDKQPV TAGARFR LAQDGL YRLKILD QLSDSGQ YVSRARN AIGEA FAC EA (SEQ ID NO : 125)

備註：序列中，粗體字部分為被替換部分，點劃線部分為恆定區部分，單下劃線部分為可變區。

J1 重鏈:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVID
PGVGDNTNYNENFKGRATLTADKSTSTAYIELSSLRSEDNAVYYCAREDNTGT
AFDYWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO : 126) ;

J1 輕鏈:

SIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVSSDVTWYLOKPGQSPQLLIYY
VSEHYTGVPDRFSGSGYGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQHHRFPLTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

(SEQ ID NO : 117) ;

【0427】 分別將 HJ-1、HJ-2、HJ-3、HJ-4 的四條鏈共轉染表達，然後對表達產物進行質譜分析(方法見本披露測試例 3)，檢測是否有輕重鏈錯配分子。實驗結果見圖 13A 至圖 13D 及表 19。

【0428】 表 19. 雙特異性抗體表達質譜分析實驗結果

雙抗名稱	共轉染的鏈	質譜分析結果		
		HJ(1+2+3+4)	錯配分子 1(1+2+3+3)	錯配分子 2(1+2+4+4)
HJ-1	1 : HJ-1-H1	√	X	√
	2 : HJ-1-H2			
	3 : HJ-1-L1			
	4 : HJ-1-L2			
HJ-2	1 : HJ-2-H2	√	X	√
	2 : HJ-2-H1			
	3 : HJ-2-L2			
	4 : HJ-2-L1			
HJ-3	1 : HJ-3-H1	√	X	X
	2 : HJ-3-H2			
	3 : HJ-3-L1			
	4 : HJ-3-L2			
HJ-4	1 : HJ-4-H2	√	X	X
	2 : HJ-4-H1			
	3 : HJ-4-L2			
	4 : HJ-4-L1			

備註：表中“√”表示檢測到該分子，“X”表示未檢測到該分子，

“HJ(1+2+3+4)”表示由其左側對應的編號為 1、2、3 和 4 這四條鏈形成的雙特異性抗體，“錯配分子 1(1+2+3+3)”表示由其左側對應的編號為 1、2、3 和 3 這四條鏈形成的錯配分子 1；“錯配分子 2(1+2+4+4)”表示由其左側對應的編號為 1、2、4 和 4 這四條鏈形成的錯配分子 2。

【0429】實驗結果表明，以 TCRβ/TCRα 替換 CH1/CL 的雙特異性抗體，當其四條鏈共轉染表達時，其輕重鏈會發生錯配。而 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換 CH1/CL 的雙特異性抗體，均沒有出現輕重鏈的錯配。這說明本披露的 Titin-T 鏈/Obscurin-O 鏈替換 CH1/CL 的雙特異性性抗體具有出色的減少輕重鏈錯配的能力。

二、3 條鏈共表達雙特異性抗體實驗

【0430】本測試用三條鏈(1 條 CH1 被 TCRβ 或 Titin-T 鏈替換的重鏈，1 條 CH1 未被替換的重鏈，1 條 CL 未被替換的野生型輕鏈(VL-CL)，具體序列參見表 18)共轉染表達，然後對表達產物進行質譜分析(方法見本披露測試例 3)，檢測抗體純度 SEC(方法見本披露測試 2)，驗證野生型輕鏈(VL-CL)是否會與 CH1 被 TCRβ 或 Titin-T 鏈替換的重鏈組合形成錯配分子。實驗結果見圖 14A、圖 14B、圖 15A、圖 15B 和表 20。

【0431】表 20. 3 條鏈共表達雙特異性抗體實驗結果

組別	共轉染的鏈	抗體純度 SEC(%)	質譜分析結果	
			分子 (1+2+3)	錯配分子(1+2+3+3)
1	1 : HJ-1-H1	75.85	√	√
	2 : HJ-1-H2			
	3 : HJ-1-L2			
2	1 : HJ-3-H1	96.82	√	X
	2 : HJ-3-H2			
	3 : HJ-3-L2			

備註：表中“√”表示檢測到該分子，“X”表示未檢測到該分子，“分子(1+2+3)”表示由其左側對應的編號為 1、2、3 這 3 條鏈形成的分子，“錯配分子(1+2+3+3)”表示由其左側對應的編號為 1、2、3、3 這四條鏈形成的錯配分子。

【0432】實驗結果表明：VL-CL 很容易與 CH1 被 TCR β 替換的重鏈結合從而表達出有兩條相同輕鏈的錯配分子。但是 VL-CL 輕鏈並未與 CH1 被 Titin-T 鏈替換的重鏈結合形成兩條相同輕鏈的錯配分子，這也間接說明相比重鏈 CH1 被 TCR β 替換的雙特異性抗體，本披露的 Titin-T 鏈替換重鏈 CH1 的雙特異性抗體具有更出色的減少輕重鏈錯配的能力。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種多肽複合物，其包含第一抗原結合部分，該第一抗原結合部分包括：

A)第一多肽，該第一多肽包含從 N 末端到 C 末端的第一重鏈可變結構域(VH1)，該 VH1 可操作地連接至第一結構域，該第一結構域包含 Titin-T 鏈，和
第二多肽，該第二多肽包含從 N 末端到 C 末端的第一輕鏈可變結構域(VL1)，該 VL1 可操作地連接至第二結構域，該第二結構域包含 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin -O 鏈；

或

B)第一多肽，該第一多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VH1，該 VH1 可操作地連接至第一結構域，該第一結構域包含 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin -O 鏈，和
第二多肽，該第二多肽包含從 N 末端到 C 末端的 VL1，該 VL1 可操作地連接至第二結構域，該第二結構域包含 Titin-T 鏈；

其中，該第一抗原結合部分與第一抗原特異性結合，該第一結構域與第二結構域能夠形成二聚體；該第一抗原結合部分的 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的第一抗原結合位點；該 VH1 的 C 端與第一結構域的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與第二結構域的 N 端可操作地連接；

該第一結構域與第二結構域藉由天然鏈間鍵形成二聚體；和/或該第一結構域與第二結構域藉由至少一個非天然鏈間鍵形成二聚體；該非天然鏈間鍵在第一結構域的特定突變殘基和第二結構域的特定突變殘基之間形成；該突變殘基中的至少一對是半胱氨酸殘基；該非天然鏈間鍵為二硫鍵；

該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；

該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變的序列；

該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項2】 如請求項 1 所述的多肽複合物，

其中該二聚體包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個非天然鏈間鍵。

【請求項3】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，該第一結構域的特定突變殘基和第二結構域的特定突變殘基選自以下突變：

(A)該 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和該 Obscurin-O 鏈具有選自第 3、9、25、76 和 88 位中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者

(B)該 Titin-T 鏈具有選自第 8、20、22、25、26 和 39 位中的一個或多個胺基酸殘基突變，和該類 Obscurin-O 鏈具有選自 6、26、74、77、84 和 86 位中的一個或多個胺基酸殘基突變；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項4】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，

(A) 該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，和該 Obscurin-O 鏈具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 中的一個或多個胺基酸殘基突變；或者

(B) 該 Titin-T 鏈具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，和該類 Obscurin-O 鏈具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個胺基酸殘基突變；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項5】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，該第一結構域的突變殘基和第二結構域的突變殘基選自如下突變：

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 A88C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 A3C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A26C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 R9C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S 和 A88C 突變；

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

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

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 V74C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 G84C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 C6E 和 A86C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 V74C 突變；

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 V20C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 G84C 突變；或者

Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 T22C 突變，且類 Obscurin-O 鏈具有 C6E、C26S、C77S 和 A86C 突變；

Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項6】 如請求項 3 所述的多肽複合物，其中，該 Obscurin-O 鏈還具有選自第 7、11、62 位中的一個或多個胺基酸殘基突變。

【請求項7】 如請求項 3 所述的多肽複合物，其中，該 Obscurin-O 鏈還具有選自 L7R 或 L7K、T62K 或 T62H、和 K11L 的一個或多個胺基酸殘基突變。

【請求項8】 如請求項 3 所述的多肽複合物，其中，該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62K 突變；

該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、L7K 和 T62H 突變；

該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62K 突變；或者

該 Titin-T 鏈具有 C25S、C39T 和 A8C 突變，且 Obscurin-O 鏈具有 C25S、C76S、A88C、K11L 和 T62H；

該 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點。

【請求項9】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，該第一結構域和第二結構域具有選自以下一個或多個胺基酸殘基突變：

Titin-T 鏈具有選自第 3、11、13、22、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 位中的一個或多個胺基酸突變，和 Obscurin-O 鏈具有選自的第 2、11、12、13、14、17、20、22、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、89、92、94 和 97 位中的一個或多個胺基酸突變；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【請求項10】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，該第一結構域和第二結構域具有選自以下一個或多個殘基突變：

Titin-T 鏈具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、

N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變，和 Obscurin-O 鏈具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【請求項11】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，該 Titin-T 鏈具有 M66S 和 T77S 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 L11K、A12S、F13Y、V14T 和 T22S 胺基酸突變；

該 Titin-T 鏈具有 M66K、K70R、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 G2E、V17E、N30D、T32P、Q34E、S36T、V44I、A45T、L58V、K62E、A67Q、G69S 和 A97G 胺基酸突變；

該 Titin-T 鏈具有 P3W、S11I、I13L、T22M 和 N82M 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 D20L、T22M 和 A53L 胺基酸突變；

該 Titin-T 鏈具有 S11I、M66K、S79T 和 G81R 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 Q41K、A45T、A67Q、G69S 和 V89L 胺基酸突變；

該 Titin-T 鏈具有 G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、L75V、E83D 和 F84L 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；

該 Titin-T 鏈具有 Q47E、Q49G、N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；

該 Titin-T 鏈具有 N56S、D58E 和 L75V 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 Q42L、A45T、A67T、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；或者

該 Titin-T 鏈具有 N56S、D58E、M66S 和 T77S 胺基酸突變，和該 Obscurin-O 鏈具有 A12S、F13Y、T22S、Q42L、A45T、A67Q、G69S、Q92E 和 D94G 胺基酸突變；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點。

【請求項12】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，該 VH1 藉由第一連接域與第一結構域可操作地連接，該 VL1 藉由第二連接域與第二結構域可操作地連接；

該第一連接域和/或該第二連接域選自：Titin-T 鏈的 N 末端片段，Obscurin-O 鏈 N 末端片段、Obscurin-樣-O 鏈的 N 末端片段，和 $(G_xS)_y$ 連接子，其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數。

【請求項13】 如請求項 12 所述的多肽複合物，其中，該第一連接域和/或該第二連接域選自以下多肽片段：“KAGIR”、“DQPQF”、 $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【請求項14】 如請求項 13 所述的多肽複合物，其中，

該第一結構域為 Titin-T 鏈，該第一連接域為 KAGIR 多肽，該第二結構域為 Obscurin-O 鏈，該第二連接域為 DQPQF 多肽；或者

該第二結構域為 Titin-T 鏈，該第二連接域為 KAGIR 多肽，該第一結構域為 Obscurin-O 鏈，該第一連接域為 DQPQF 多肽。

【請求項15】 如請求項 1 所述的多肽複合物，其中，

(A)該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、

K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；和

(B)該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；或者

該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變的序列；

上述 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO:33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項16】 如請求項 15 所述的多肽複合物，其中，

(A) 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；或者

該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；

和

(B)該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:33 序列基礎上具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；或者

該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:45 序列基礎上還具有選自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：45 的自然順序編號位點；或者

該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:50 序列基礎上具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點；

或者

(A) 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；或者

該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；

和

(B) 該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:34 序列基礎上具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項17】 如請求項 1 所述的多肽複合物，該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80%同一性的序列，和該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列具有至少 80%同一性的序列；或者

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80%同一性的序列，和該類 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一序列具有至少 80%同一性的序列

【請求項18】 如請求項 1 所述的多肽複合物，該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：68 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：80 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：73 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：83 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：84 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示序列；或者

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：75 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示序列。

【請求項19】 如請求項 1 至 18 中任一項所述的多肽複合物，其中，該第一抗原選自：外源抗原、內源抗原、自身抗原、新抗原、病毒抗原和腫瘤抗原。

【請求項20】 如請求項 1 至 19 中任一項所述的多肽複合物，其中，該多肽複合物為結構域改造抗體或其 Fab 片段。

【請求項21】 一種多特異性多肽複合物，其包括：

第一多肽複合物，其為如請求項 1 至 20 中任一項所述的多肽複合物，其與第一抗原特異性結合，和

第二多肽複合物，其包含第二抗原結合部分，其與第二抗原特異性結合，該第一多肽複合物和第二多肽複合物結合兩種不同的抗原，或結合同一種抗原上的兩種不同表位；

該第二多肽複合物包含第二重鏈可變結構域(VH2)和第二輕鏈可變結構域(VL2)，該第一多肽複合物的 VH1 與第二多肽複合物的 VL2，和/或第二多肽複合物的 VH2 與第一多肽複合物的 VL1 之間不容易發生錯配。

【請求項22】 如請求項 21 所述的多特異性多肽複合物，其中，該第二多肽複合物的第二抗原結合部分包含：

第三多肽，其包含從 N 末端到 C 末端的 VH2，其可操作地連接至第三結構域，該第三結構域包含 CH1，和

第四多肽，其包含從 N 末端到 C 末端的 VL2，其可操作地連接至第四結構域，該第四結構域包含 CL；

該 VH2 的 C 端與 CH1 的 N 端可操作地連接，該 VL2 的 C 端與 CL 的 N 端可操作地連接。

【請求項23】 如請求項 21 或 22 所述的多特異性多肽複合物，其中，該第一多肽複合物還包含第一二聚化結構域，該第二多肽複合物還包含第二二聚化結構域，該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域相結合；

該第一多肽複合物的第一結構域的 C 端與第一二聚化結構域的 N 端可操作地連接，該第二多肽複合物的第三結構域的 C 端與第二二聚化結構域的 N 端可操作地連接。

【請求項24】 如請求項 23 所述的多特異性多肽複合物，其中，該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域藉由選自以下的方式相結合：抗體鉸鏈區或其部分、連接子、二硫鍵、氫鍵、靜電相互作用、鹽橋、疏水-親水相互作用、或其組合；該抗體鉸鏈區或其部分為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的鉸鏈區或其部分。

【請求項25】 如請求項 23 所述的多特異性多肽複合物，其中，該第一二聚化結構域包含抗體 CH2 結構域和/或抗體 CH3 結構域，和/或該第二二聚化結構域包含抗體 CH2 結構域和/或抗體 CH3 結構域；

該抗體 CH2 結構域和/或抗體 CH3 結構域源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

【請求項26】 如請求項 23 所述的多特異性多肽複合物，其中，該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域不相同，並且以阻止同源二聚化和/或有利於異二聚化的方式結合；

該第一二聚化結構域和第二二聚化結構域藉由選自以下的方式相結合：knob-into-hole、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用、或增加柔韌性的方式。

【請求項27】 如請求項 23 所述的多特異性多肽複合物，其中，該第一二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基，且該第二二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基；或者

該第一二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基，且該第二二聚化結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基。

【請求項28】 一種雙特異性抗體，其包含特異性結合第一抗原的第一重鏈和第一輕鏈，和還包含特異性結合第二抗原的第二重鏈和第二輕鏈，其中，

該第一重鏈的 CH1 結構域被 Titin-T 鏈替代，第一輕鏈的 CL 結構域被 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈替代；

該第一輕鏈的 CL 結構域被 Titin-T 鏈替代，該第一重鏈的 CH1 結構域被 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈替代；

該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；

該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變的序列；

該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；

該 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈，或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈藉由天然鏈間鍵結合形成二聚體；和/或

該 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈，或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈藉由至少一個非天然鏈間鍵形成二聚體；該非天然鏈間鍵為二硫鍵；

該第一抗原和第二抗原不相同，或該第一抗原和第二抗原是同一種抗原上的兩種不同表位；

該第一重鏈與第二輕鏈之間、第一輕鏈與第二重鏈之間不容易發生錯配；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO:32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO:33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO:34 的自然順序編號位點。

【請求項29】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，

(A) 該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；和

(B) 該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；或者

該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變的序列；

上述 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO:33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項30】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，

(A) 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；或者

該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；

和

(B)該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:33 序列基礎上具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；或者

該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:45 序列基礎上還具有選自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：45 的自然順序編號位點；或者

該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:50 序列基礎上具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點；

或者

(A) 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；或者

該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、

L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；
該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；

和

(B) 該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:34 序列基礎上具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項31】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80%同一性的序列，和該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 任一序列具有至少 80%同一性的序列；或者

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 任一序列具有至少 80%同一性的序列，和該類 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：34、59-64 任一所示的序列或與 SEQ ID NO：34、59-64 任一序列具有至少 80%同一性的序列。

【請求項32】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO:68 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：80 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO:73 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：83 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO:76 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：84 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO:76 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO:86 所示序列；或者

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO:75 所示序列，且該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO:86 所示序列。

【請求項33】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，該第一重鏈包含第一重鏈可變區(VH1)，該第一輕鏈包含第一輕鏈可變區(VL1)，該 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的抗原結合位點，且

該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者

該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接。

【請求項34】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，該第二重鏈包含從 N 末端到 C 末端的第二重鏈可變區(VH2)，其可操作地連接至 CH1；該第二輕鏈包含從 N 末端到 C 末端的第二輕鏈可變區(VL2)，其可操作地連接至 CL；

該 VH2 和 VL2 形成與第二抗原特異性結合的抗原結合位點，該 VH2 的 C 端與 CH1 的 N 端可操作地連接；該 VL2 的 C 端與 CL 的 N 端可操作地連接。

【請求項35】 如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，該第一重鏈和第二重鏈的 C 末端包含 CH2 和/或 CH3 結構域；

該 CH1、CH2 和 CH3 結構域源自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；

該第一重鏈和第二重鏈藉由選自以下的方式結合：抗體鉸鏈區或其部分、連接子、二硫鍵、氫鍵、靜電相互作用、鹽橋、疏水-親水相互作用或其組合。

【請求項36】 如請求項 35 所述的雙特異性抗體，其中：

該第一重鏈從 N 末端到 C 末端依次為：VH1-L1-Titin-T 鏈-L2-CH2-CH3，

該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端依次為：VL1-L3-Obscurin-O 鏈或 VL1-L4-類 Obscurin-O 鏈；

該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-CH2-CH3，

該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；

或者，

該第一輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL1-L1-Titin-T 鏈，

該第一重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH1-L2-Obscurin-O 鏈-L3-CH2-CH3，或 VH1-L4-類 Obscurin-O 鏈-L5-CH2-CH3；

該第二重鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VH2-CH1-CH2-CH3，

該第二輕鏈從 N 末端到 C 末端的依次為：VL2-CL；

該 L1 至 L5 為間隔區，間隔區可存在或不存在；

該間隔區選自：Titin-T 鏈的 N 末端片段，Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，類 Obscurin-O 鏈的 N 末端片段，或 $(G_xS)_y$ 連接子；其中，X 選自 1-5 的整數，Y 選自 1-6 的整數。

【請求項37】 如請求項 36 所述的雙特異性抗體，其中：

該間隔區選自：“KAGIR”、“DQPQF”、 $(G_4S)_1$ 和 $(G_4S)_2$ 。

【請求項38】 如請求項 36 所述的雙特異性抗體，其中，該第一重鏈的 CH2 和 CH3 與第二重鏈的 CH2 和 CH3 不相同，並且以阻止同源二聚化和/或有利於異二聚化的方式結合；

該第一重鏈和第二重鏈藉由選自以下的方式結合：knob-into-hole、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用或增加的柔韌性的方式。

【請求項39】 如請求項 36 所述的雙特異性抗體，其中，該第一重鏈和第二重鏈包括藉由 knob-into-hole 的方式結合；

該第一重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基，該第二重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基；或者

該第一重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：3 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基，該第二重鏈 CH2-CH3 結構域具有如 SEQ ID NO：2 所示序列中的第 104 至 330 位胺基酸殘基。

【請求項40】如請求項 28 所述的雙特異性抗體，其中，該雙特異性抗體為選自以下 A 至 I 中任一項所述的雙特異性抗體：

A、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：89 所示或與 SEQ ID NO：89 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：90 所示或與 SEQ ID NO：90 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：87 所示或與 SEQ ID NO：87 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：88 所示或與 SEQ ID NO：88 具有至少 85%序列同一性；

B、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：93 所示或與 SEQ ID NO：93 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：94 所示或與 SEQ ID NO：94 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：91 所示或與 SEQ ID NO：91 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：92 所示或與 SEQ ID NO：92 具有至少 85%序列同一性；

C、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：97 所示或與 SEQ ID NO：97 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：98 所示或與 SEQ ID NO：98 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：95 所示或與 SEQ ID NO：95 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

D、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：99 所示或與 SEQ ID NO：99 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：100 所示或與 SEQ ID NO：100 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：101 所示或與 SEQ ID NO：101 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

E、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：102 所示或與 SEQ ID NO：102 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：100 所示或與 SEQ ID NO：100 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：95 所示或與 SEQ ID NO：95 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；

F、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：103 所示或與 SEQ ID NO：103 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：104 所示或與 SEQ ID NO：104 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：95 所示或與 SEQ ID NO：95 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：96 所示或與 SEQ ID NO：96 具有至少 85%序列同一性；和

G、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：107 所示或與 SEQ ID NO：107 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：108 所示或與 SEQ ID NO：108 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO：109 所示或與 SEQ ID NO：109 具有至少 85%序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO：110 所示或與 SEQ ID NO：110 具有至少 85%序列同一性；

H、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO：122 所示或與 SEQ ID NO：122 具有至少 85%序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO：123 所示或與 SEQ ID NO：123 具有至少 85%序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID

NO: 116 所示或與 SEQ ID NO: 116 具有至少 85% 序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO: 117 所示或與 SEQ ID NO: 117 具有至少 85% 序列同一性；

I、該雙特異性抗體的第一重鏈的序列如 SEQ ID NO: 118 所示或與 SEQ ID NO: 118 具有至少 85% 序列同一性，第一輕鏈的序列如 SEQ ID NO: 119 所示或與 SEQ ID NO: 119 具有至少 85% 序列同一性，第二重鏈的序列如 SEQ ID NO: 124 所示或與 SEQ ID NO: 124 具有至少 85% 序列同一性，第二輕鏈的序列如 SEQ ID NO: 125 所示或與 SEQ ID NO: 125 具有至少 85% 序列同一性。

【請求項41】一種綴合物，其包含選自以下的(A)至(C)中任一項：

(A)請求項 1 至 20 中任一項所述的多肽複合物；

(B)請求項 21 至 27 中任一項所述的多特異性多肽複合物；

(C)請求項 28 至 40 中任一項所述的雙特異性抗體。

【請求項42】一種 Titin-T 鏈和 Obscurin-O 鏈的組合、或者 Titin-T 鏈和類 Obscurin-O 鏈的組合在減少多特異性抗體輕鏈/重鏈錯配中的用途；

該多特異性抗體包含第一重鏈可變區(VH1)和第一輕鏈可變區(VL1)，該 VH1 和 VL1 形成與第一抗原特異性結合的抗原結合位點，且

該 VH1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VL1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接，或者

該 VL1 的 C 端與 Titin-T 鏈的 N 端可操作地連接，該 VH1 的 C 端與 Obscurin-O 鏈或類 Obscurin-O 鏈的 N 端可操作地連接；

該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 3、8、11、13、20、22、25、26、39、40、42、45、47、49、56、58、66、70、75、77、79、81、82、83 和 84 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；

該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 2、3、7、9、11、12、13、14、17、20、22、25、30、32、34、36、41、42、44、45、53、58、62、67、69、76、88、89、92、94 和 97 中一個或多個位點的胺基酸突變的序列；

該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 6、26、74、77、84 和 86 中一個或多個位點胺基酸突變的序列；

該 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈，或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈藉由天然鏈間鍵結合形成二聚體；和/或

該 Titin-T 鏈與 Obscurin-O 鏈，或 Titin-T 鏈與類 Obscurin-O 鏈藉由至少一個非天然鏈間鍵形成二聚體；該非天然鏈間鍵為二硫鍵；

上述 Titin-T 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為相對於序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項43】 如請求項 42 所述的用途，其中，

(A) 該 Titin-T 鏈的序列如 SEQ ID NO:32 所示或在 SEQ ID NO:32 序列基礎上還具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C、C39T、P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S 或 M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 KAGIR 胺基酸殘基的序列；和

(B) 該 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:33 所示或在 SEQ ID NO:33 的序列基礎上還具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S、A88C、L7K、T62K 或 T62H、G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、T62E、A67Q 或 A67T、

G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中一個或多個位點胺基酸突變和/或 N 端增加 DQPQF 胺基酸殘基的序列；或者

該類 Obscurin-O 鏈的序列如 SEQ ID NO:34 所示或在 SEQ ID NO:34 序列基礎上還具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 中的一個或多個位點胺基酸突變的序列；

上述 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO:33 的自然順序編號位點；類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項44】 如請求項 42 所述的用途，其中，

(A) 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；或者

該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；

和

(B) 該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:33 序列基礎上具有選自 A3C、R9C、C25S、C76S 和 A88C 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：33 的自然順序編號位點；或者

該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:45 序列基礎上還具有選自 L7K 或 L7R、T62K 或 T62H、和 K11L 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：45 的自然順序編號位點；或者

該 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:50 序列基礎上具有選自 G2E、L11K、A12S、F13Y、V14T、V17E、D20L、T22M 或 T22S、N30D、T32P、Q34E、S36T、Q41K、Q42L、V44I、A45T、A53L、L58V、K62E、A67Q 或 A67T、G69S、V89L、Q92E、D94G 和 A97G 中的一個或多個胺基酸突變，該 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：50 的自然順序編號位點；

或者

(A) 該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:32 序列基礎上具有選自 A8C、V20C、T22C、C25S、A26C 和 C39T 中的一個或多個胺基酸殘基突變，該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：32 的自然順序編號位點；或者

該 Titin-T 鏈為在 SEQ ID NO:35 序列基礎上具有選自 P3W、S11I、I13L、T22M、G40S、R42K、H45S、Q47E、Q49G、N56S、D58E、M66S、M66K、K70R、L75V、T77S、S79T、G81R、N82M、E83D 和 F84L 中的一個或多個胺基酸突變；該 Titin-T 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：35 的自然順序編號位點；

和

(B) 該類 Obscurin-O 鏈為在 SEQ ID NO:34 序列基礎上具有選自 C6E、C26S、C77S、V74C、G84C 和 A86C 的一個或多個胺基酸殘基突變，該類 Obscurin-O 鏈突變位點為序列 SEQ ID NO：34 的自然順序編號位點。

【請求項45】 如請求項 42 所述的用途，其中，

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 中任一所示的序列或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 中任一序列具有至少 80%同一性的序列，和/或該 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 中任一所示的序列或與 SEQ ID NO：33、42-58、77-86 中任一序列有至少 80%同一性的序列；或者

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 中任一所示的序列或與 SEQ ID NO：32、35-41、65-76 中任一條序列具有至少 80%同一性的序列，和/或該類 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：34、59-64 中任一所示的序列或與 SEQ ID NO：34、59-64 中任一條序列具有至少 80%同一性序列。

【請求項46】 如請求項 42 所述的用途，其中，

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：68 所示序列，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：80 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：73 所示序列，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：83 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示序列，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：84 所示序列；

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：76 所示序列，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示序列；或者

該 Titin-T 鏈包含如 SEQ ID NO：75 所示序列，且 Obscurin-O 鏈包含如 SEQ ID NO：86 所示序列。

【請求項47】 一種核酸分子，其編碼選自以下(A)至(C)中的任一項：

(A)如請求項 1 至 20 中任一項所述的多肽複合物，

(B)如請求項 21 至 27 中任一項所述的多特異性多肽複合物，

(C)如請求項 28 至 40 中任一項所述的雙特異性抗體。

【請求項48】 一種載體，其包含如請求項 47 所述的核酸分子。

【請求項49】 一種宿主細胞，其由如請求項 48 所述的載體轉化獲得；該宿主細胞選自原核細胞和真核細胞。

【請求項50】 如請求項 49 所述的宿主細胞，其為真核細胞。

【請求項51】 如請求項 49 所述的宿主細胞，其為哺乳動物細胞。

【請求項52】 一種製備方法，其製備選自以下的任一項：

如請求項 1 至 20 中任一項所述的多肽複合物，或如請求項 21 至 27 中任一項所述的多特异性多肽複合物，或如請求項 28 至 40 中任一項所述的雙特异性抗體；

該方法包括以下步驟：

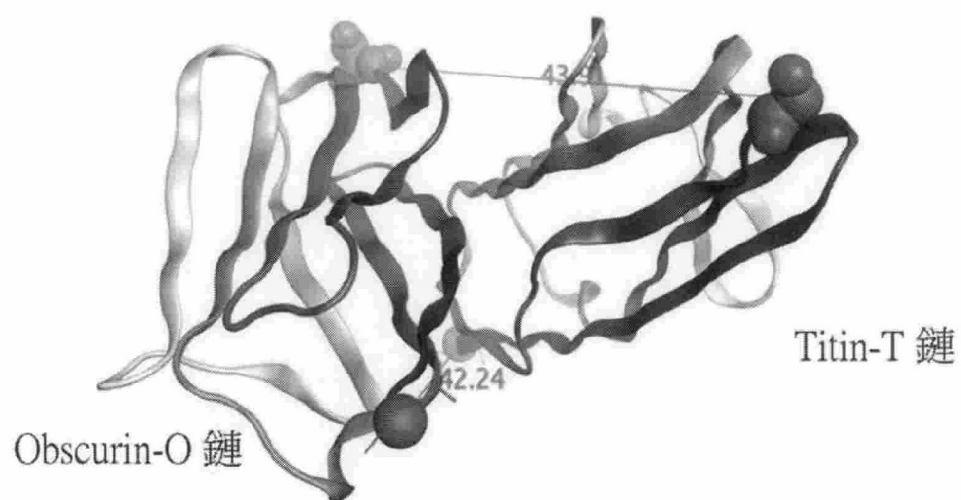
培養如請求項 49 至 51 中任一項所述的宿主細胞，然後純化並回收多肽複合物、多特异性多肽複合物、或雙特异性抗體。

【請求項53】 一種醫藥組成物，其包含一種或多種藥學上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑，以及選自以下的任一項：

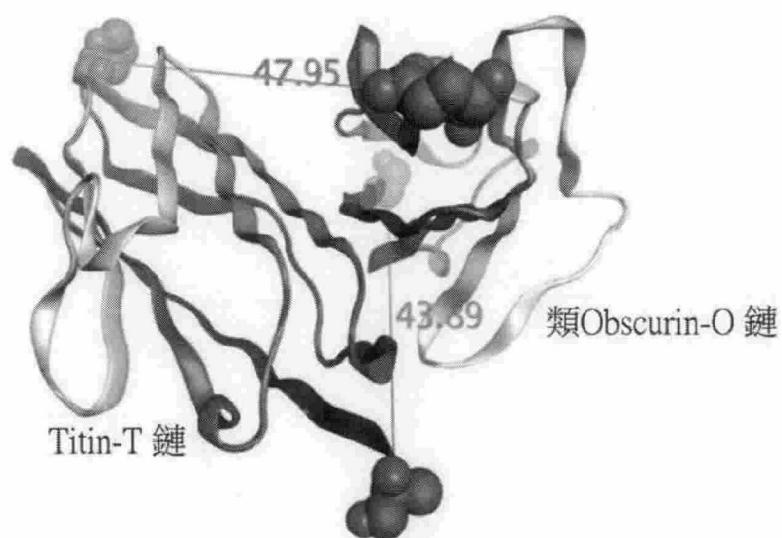
如請求項 1 至 20 中任一項所述的多肽複合物，或如請求項 21 至 27 中任一項所述的多特异性多肽複合物，或如請求項 28 至 40 中任一項所述的雙特异性抗體、或如請求項 41 所述的綴合物。

【請求項54】 一種選自以下的任一項在製備用於治療或預防疾病或病症的藥物中的用途：如請求項 1 至 20 中任一項所述的多肽複合物，或如請求項 21 至 27 中任一多特异性多肽複合物，或如請求項 28 至 40 中任一項所述的雙特异性抗體、或如請求項 53 所述的醫藥組成物、或如請求項 41 所述的綴合物。

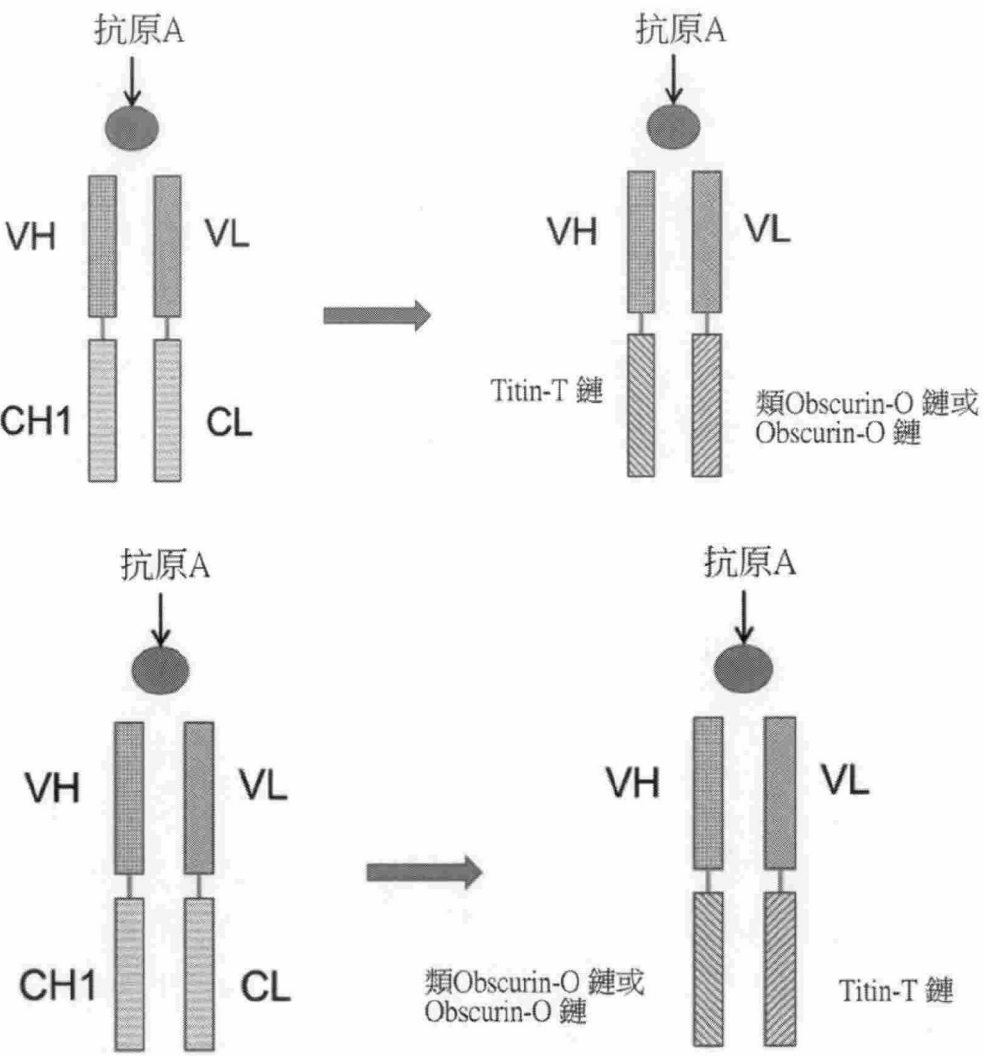
【發明圖式】



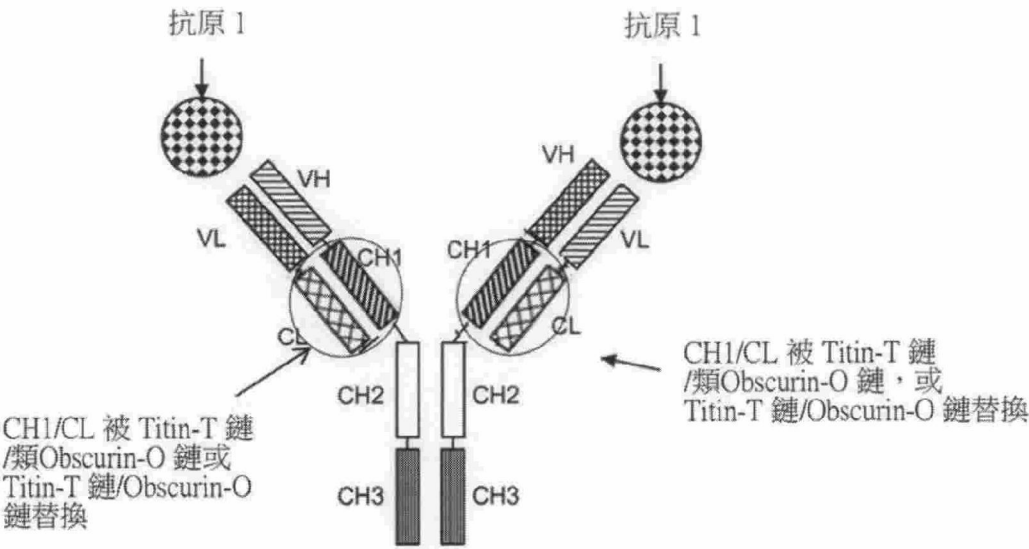
【圖1A】



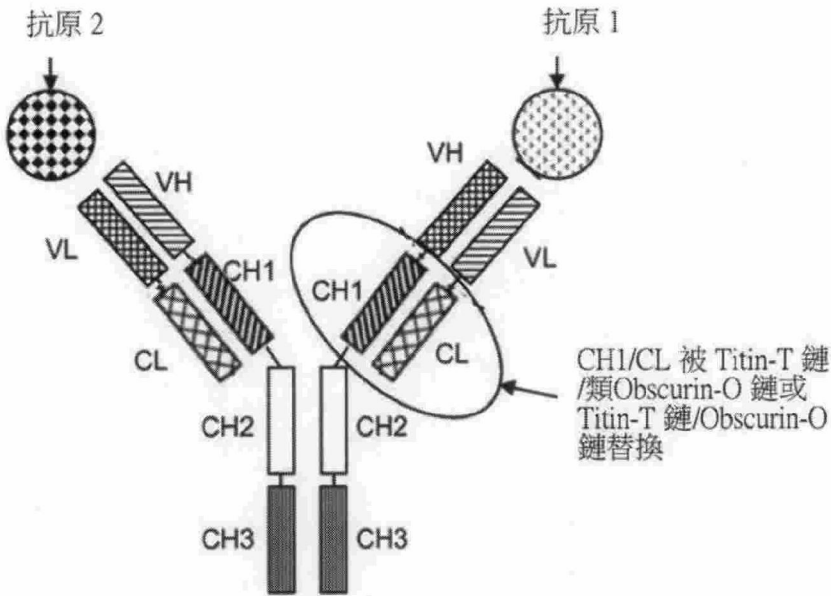
【圖1B】



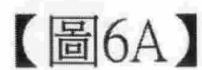
【圖2】

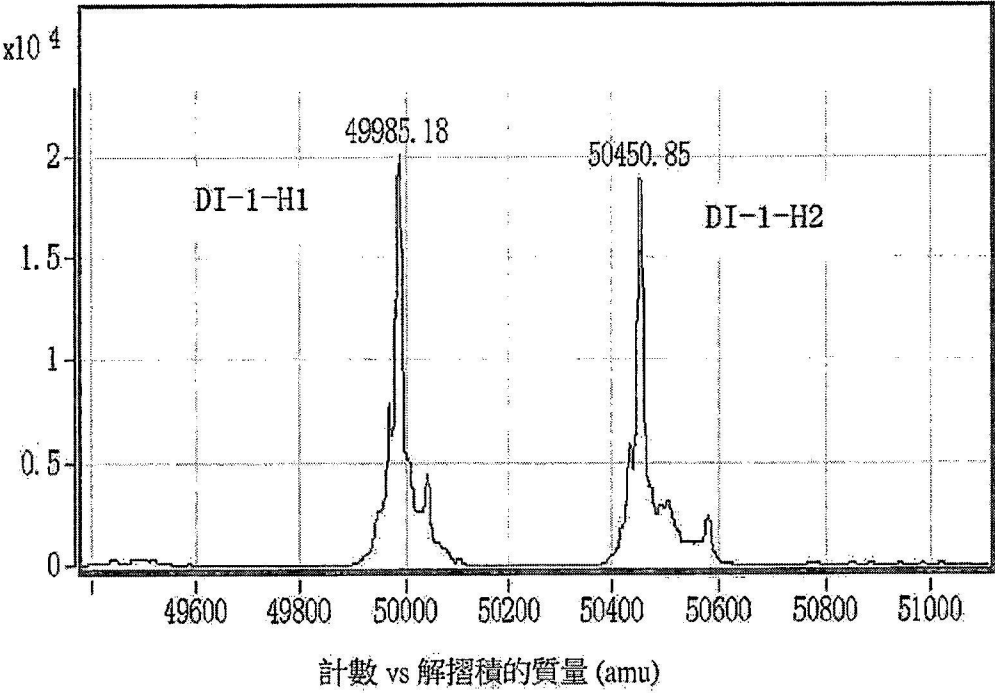


【圖3】

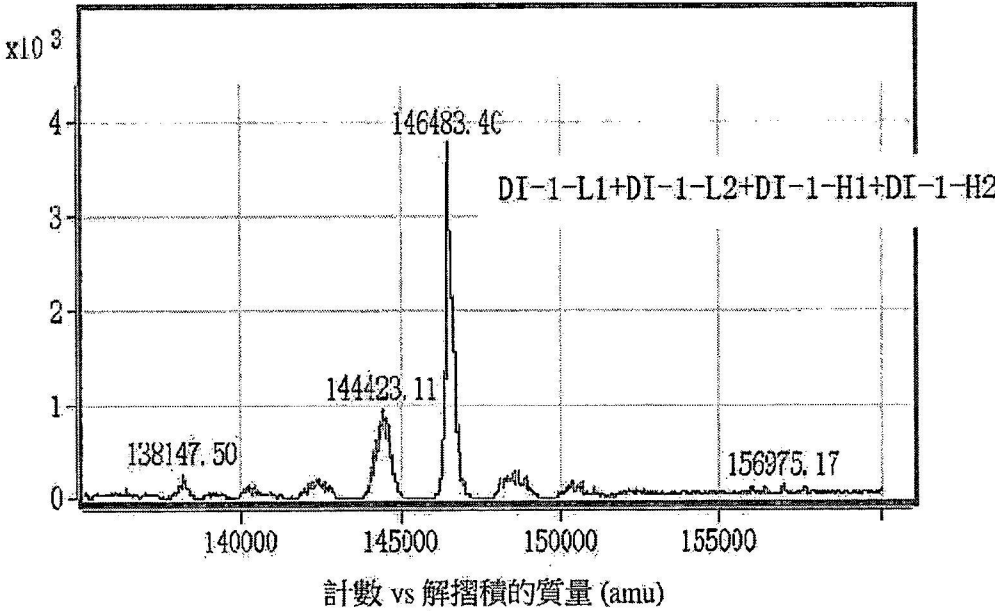


【圖4】

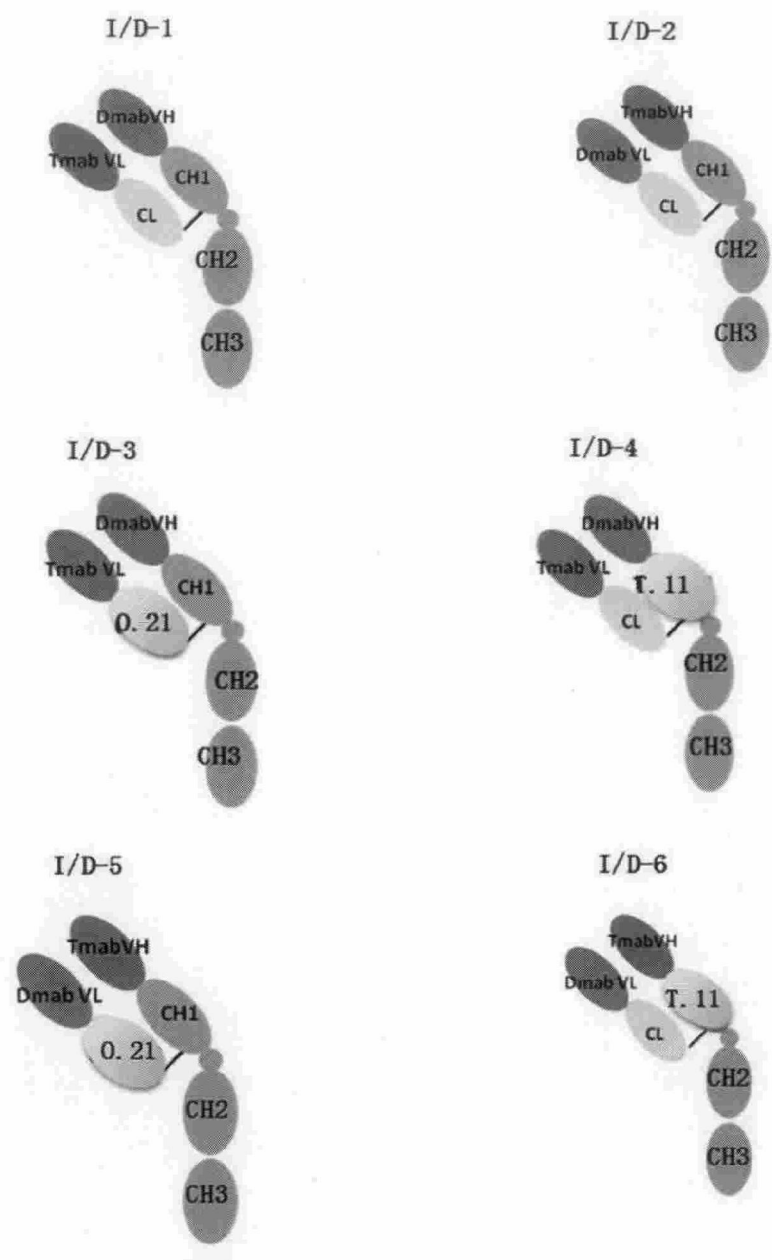




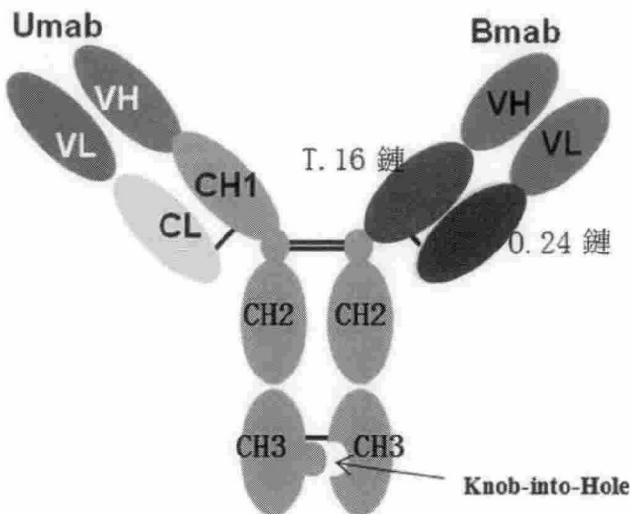
【圖6B】



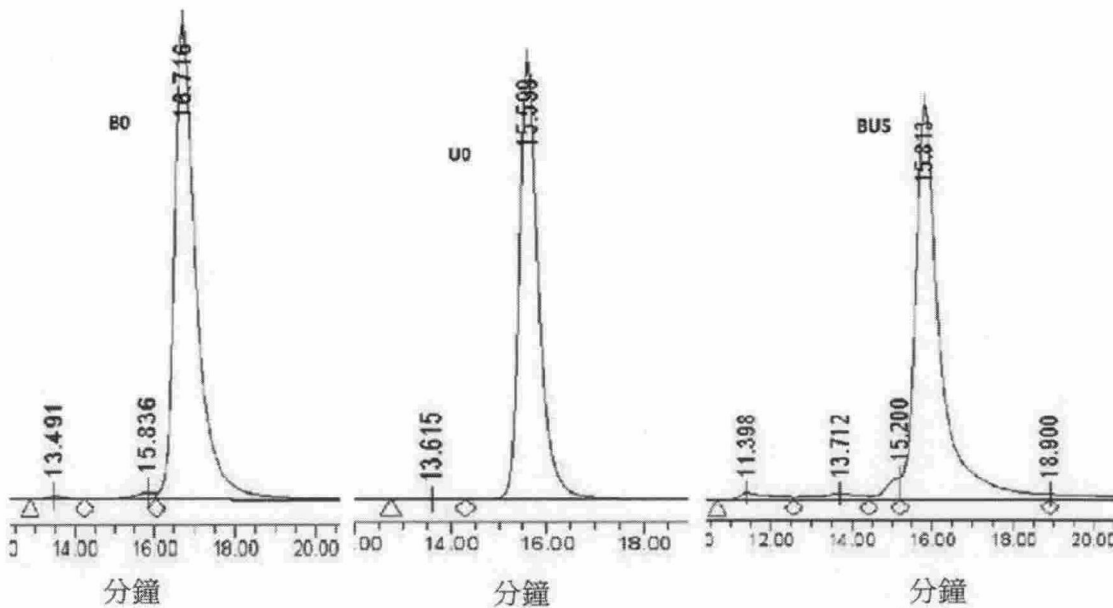
【圖6C】



【圖7】



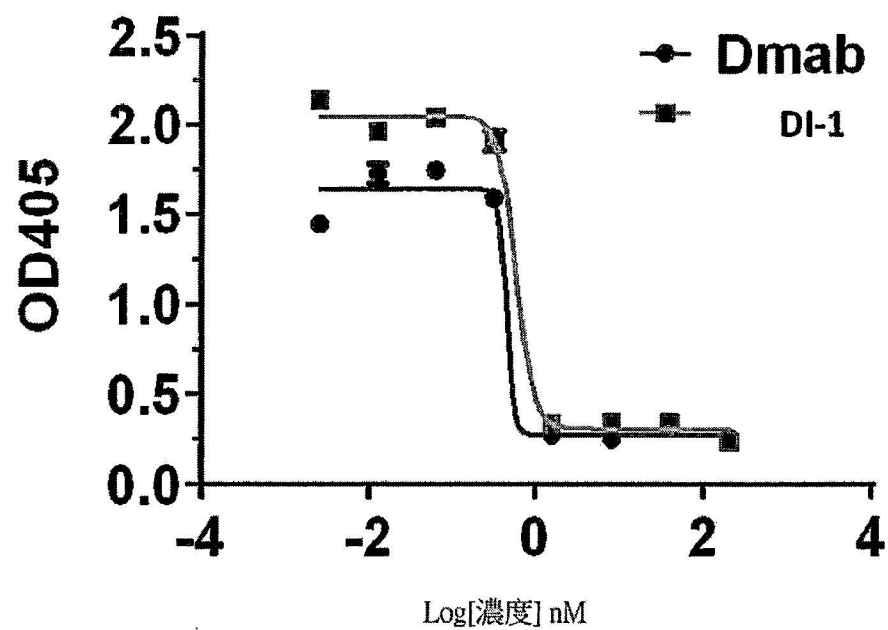
【圖8】



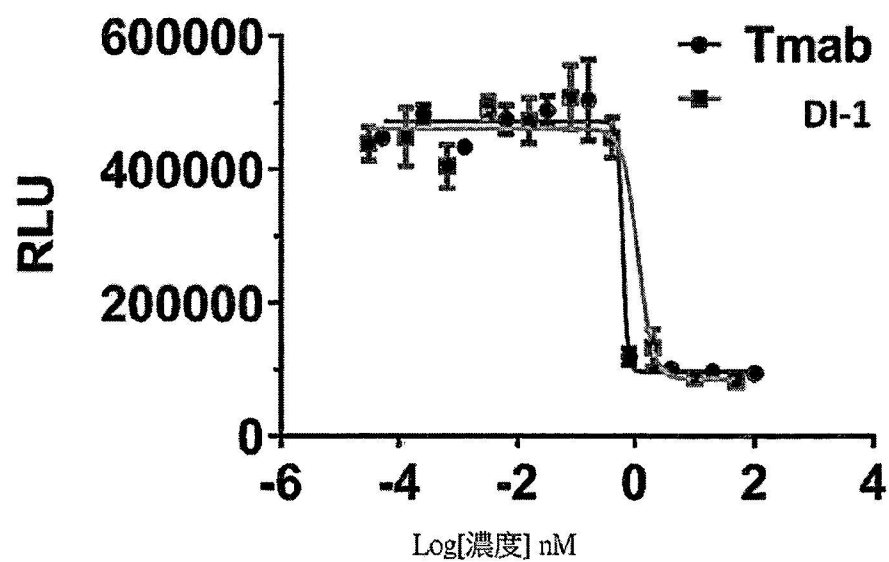
【圖9A】

【圖9B】

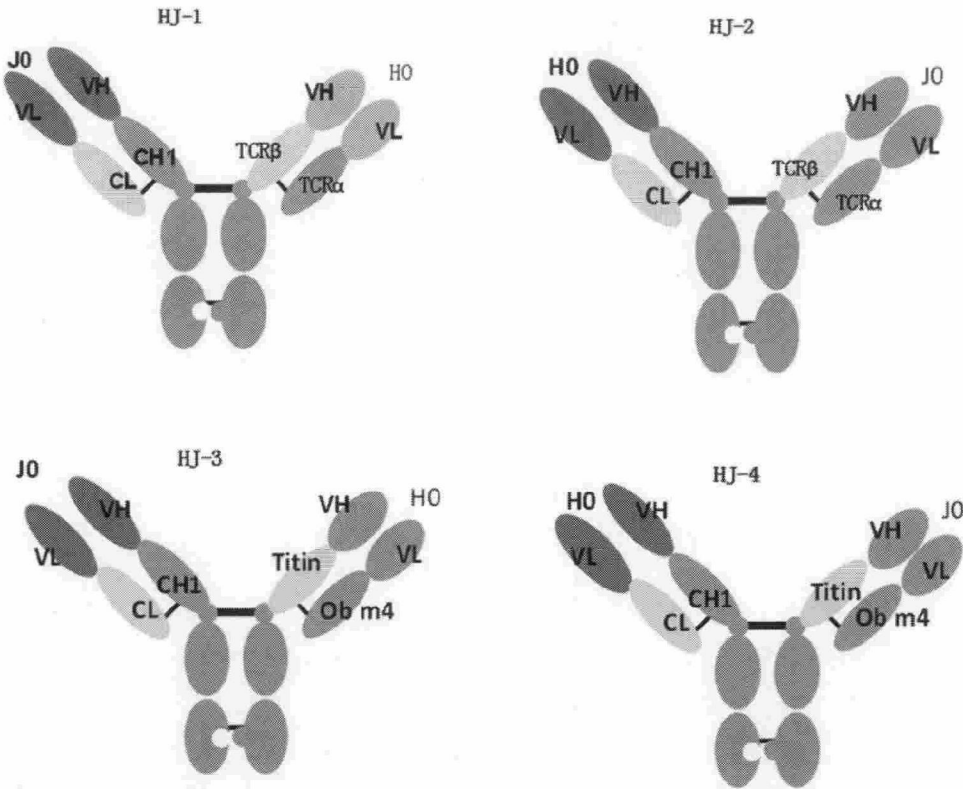
【圖9C】



【圖10】

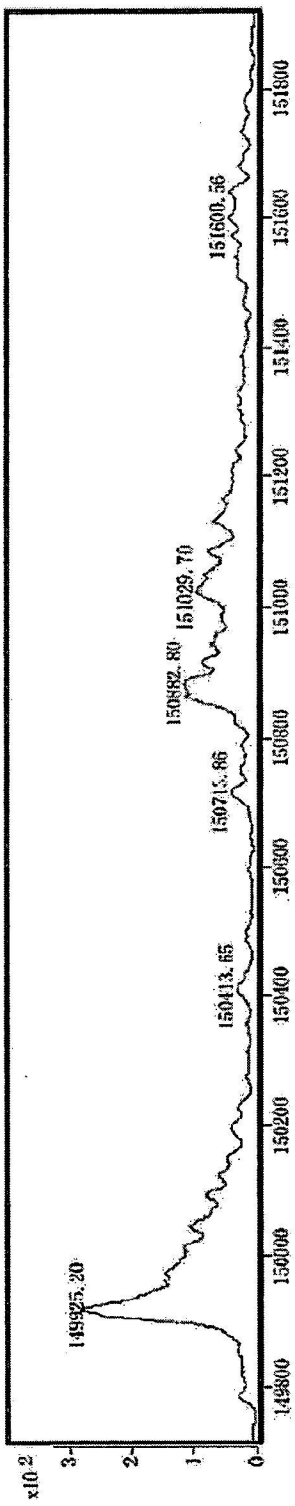


【圖11】



【圖12】

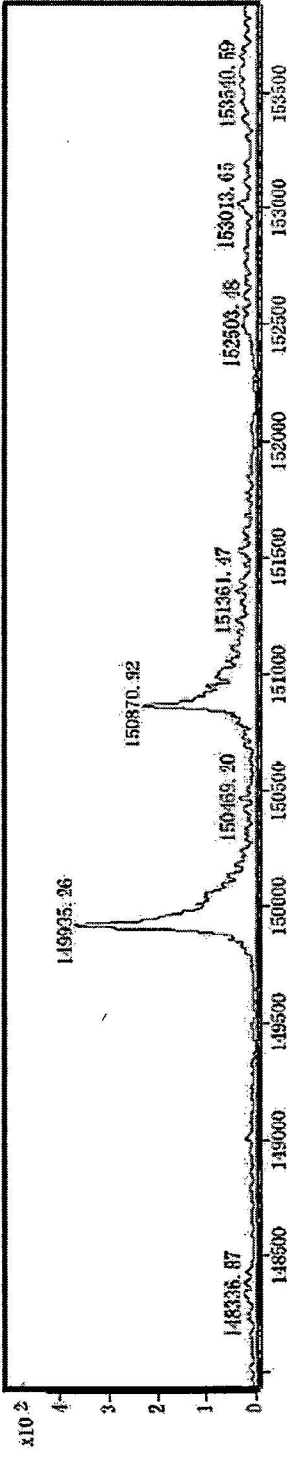
HJ-1



計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖13A】

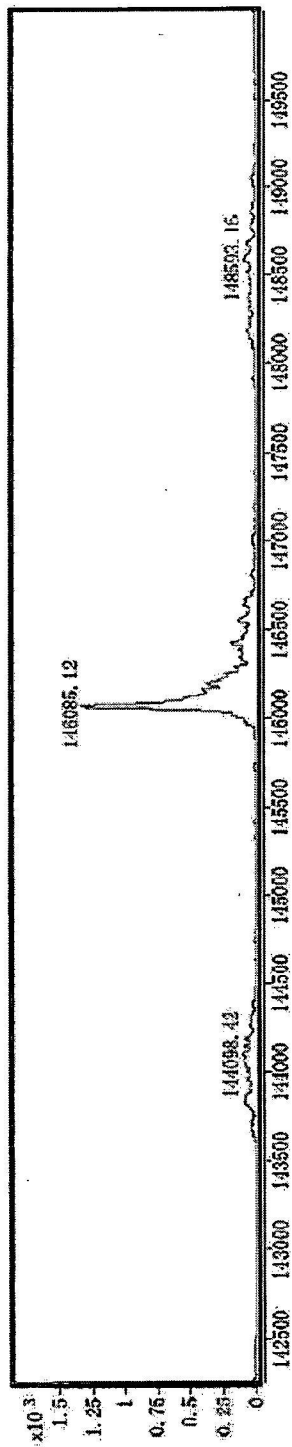
HJ-2



計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖13B】

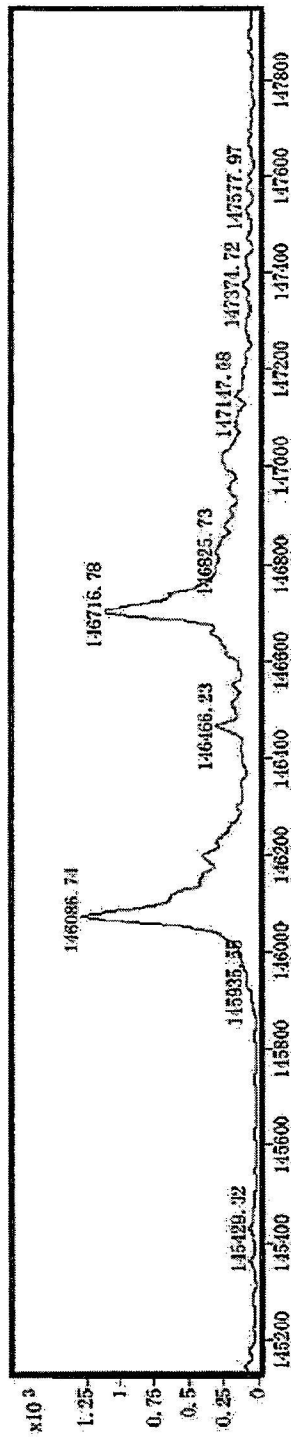
HJ-3



計數 vs 解摺積的質量 (amu)

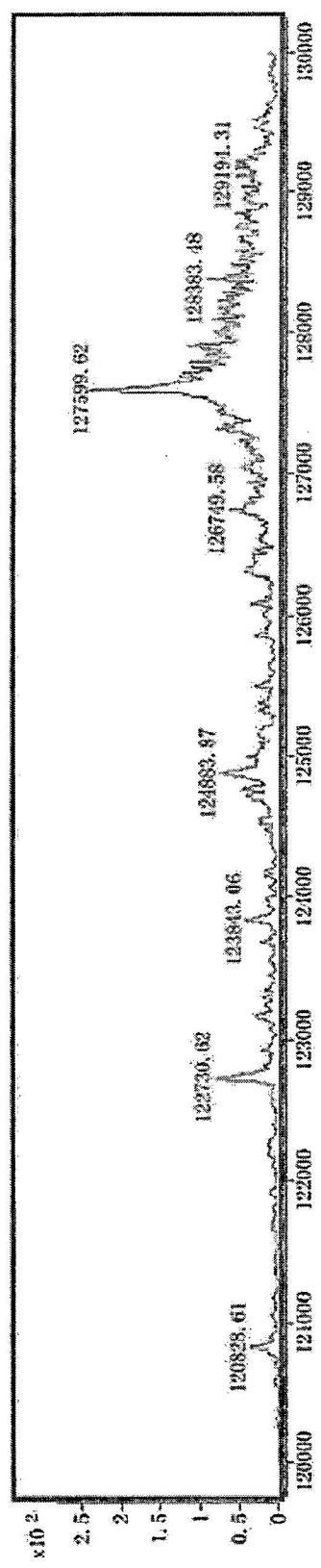
【圖13C】

HJ-4



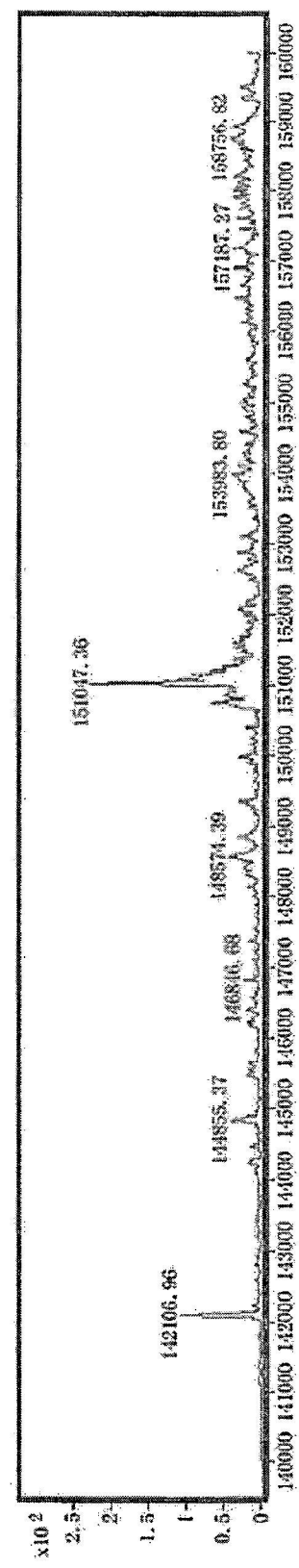
計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖13D】



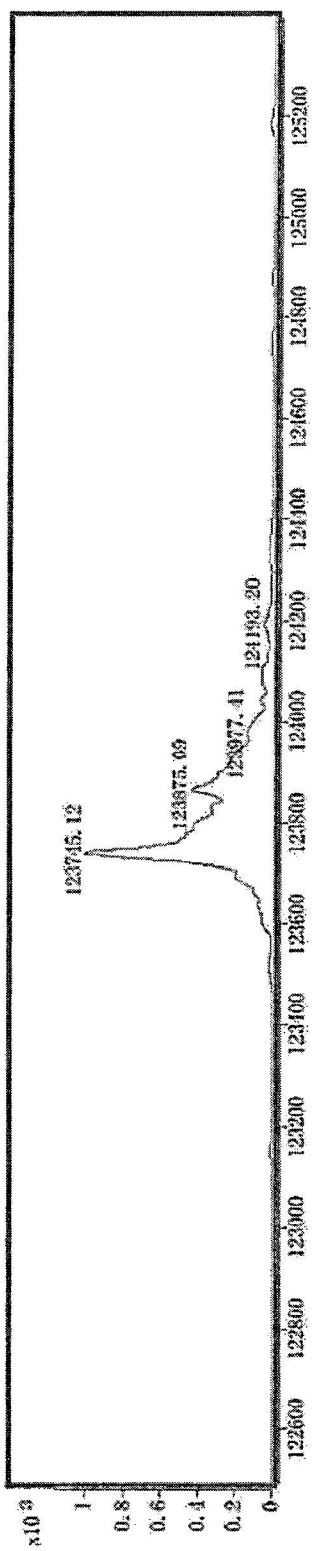
計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖14A】



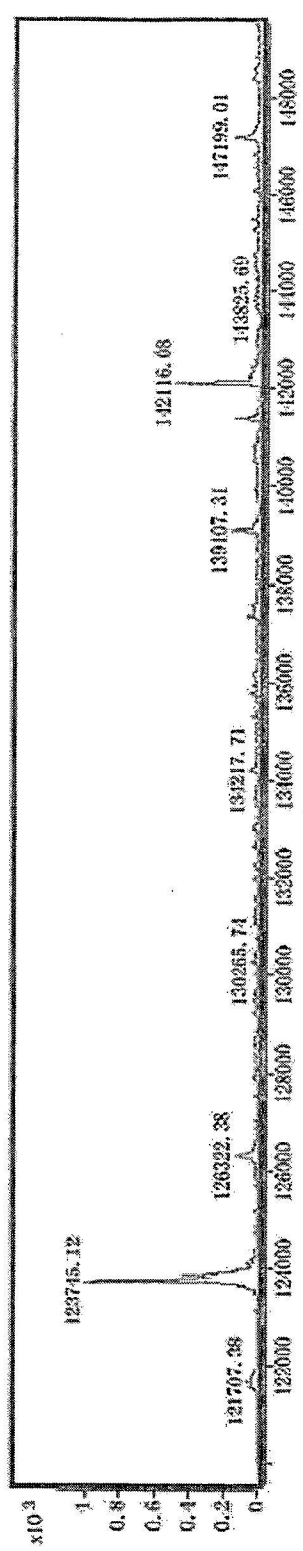
計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖14B】



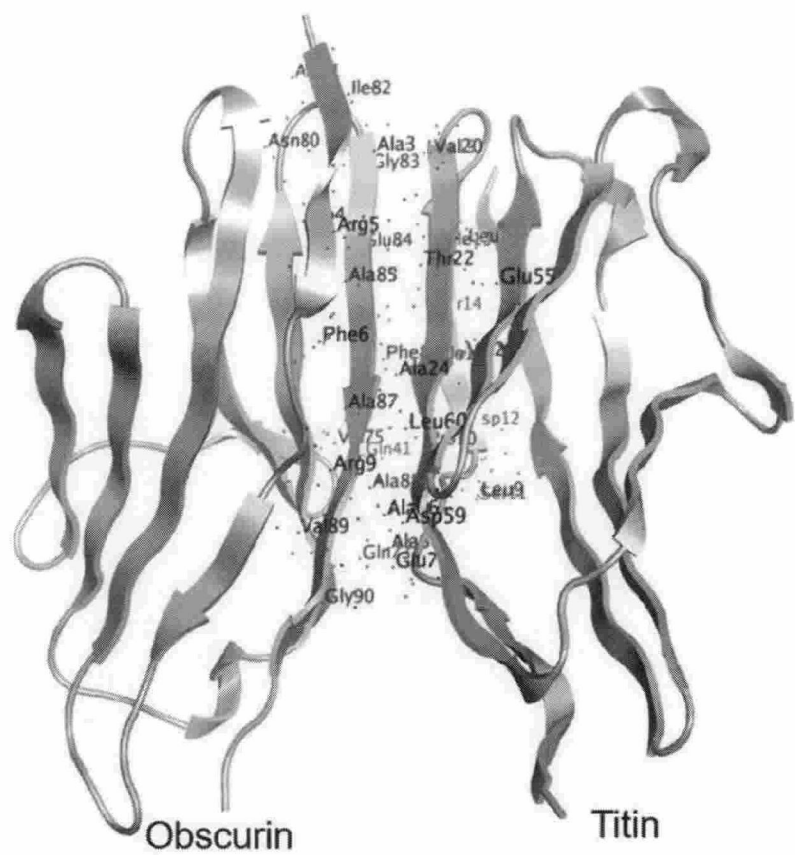
計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖15A】

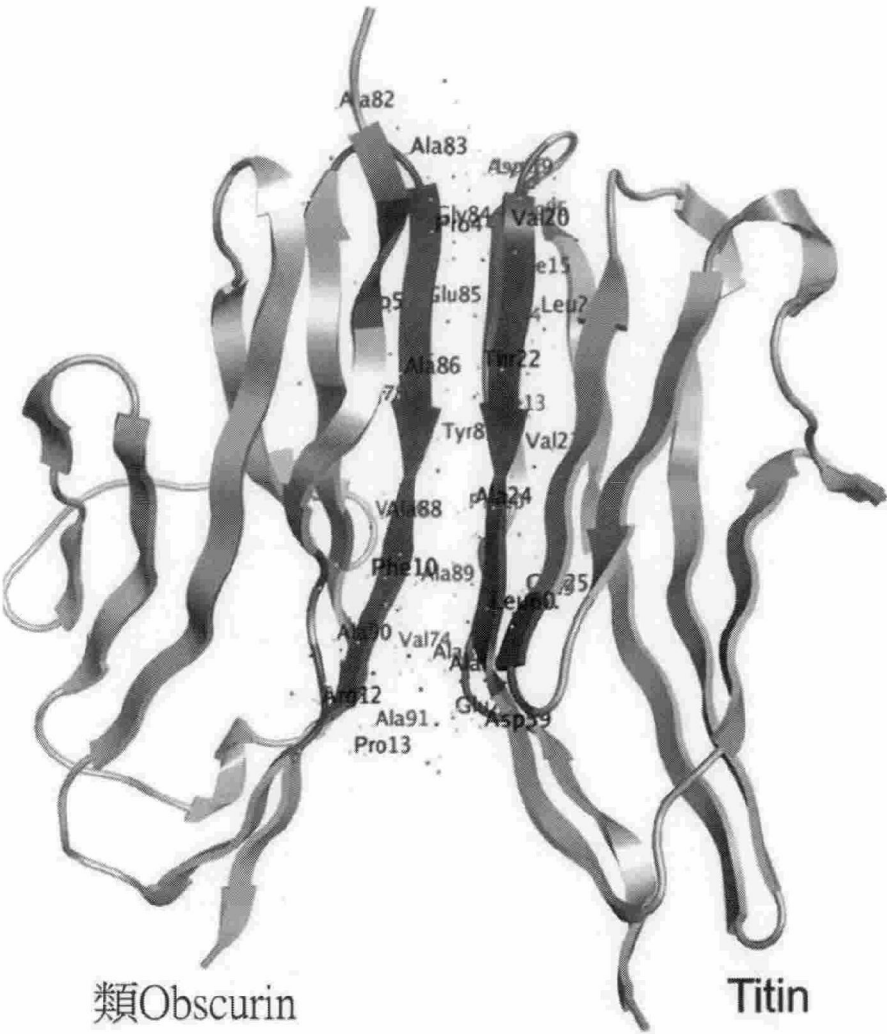


計數 vs 解摺積的質量 (amu)

【圖15B】



【圖16A】



【圖16B】