

通过重组反应制备异源多聚体的方法

本申请要求 2023 年 11 月 20 日提交的中国专利申请 CN 202311544684.7 和 2024 年 01 月 23 日提交的中国专利申请 CN 202410093537.0 的优先权。

5

技术领域

本披露涉及一种制备异源多聚体（尤其是多特异性抗体）的方法和改变 CH3 结构域的氨基酸以促进形成异源多聚体（尤其是多特异性抗体）。

10 背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

多特异性抗体，例如双特异性抗体是能同时特异性结合两种抗原或两种表位的抗体分子。与单克隆抗体相比，双特异抗体具有独特的作用机制，相对单克隆抗体具有显著优势。

15 在众多药物研发公司开发的多种多样的双特异性抗体平台中（Brinkmann U, Kontermann R E. The making of bispecific antibodies[C]/MAbs. Taylor & Francis, 2017, 9(2): 182-212.），DuoBody 平台具有独特的抗体工程方面的机制和优势。

人体的 IgG 可分为四种亚型：IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，其中 IgG4 约占 5%。IgG4 具有独特生物学特性，可在体内动态地进行重链交换，又称 Fab-arm exchange（FAE），可导致形成半抗体分子或者两个半抗体分子进一步形成双特异性抗体（Van Der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. Science, 2007, 317(5844): 1554-1557.）。Genmab 公司基于 IgG4 这种 FAE 的特性进行双特异性抗体开发，实现了抗体可控的 FAE。Genmab 的研究显示，非共价 CH3 区之间的解离是 FAE 的关键限速步骤，IgG4 的 R409 残基会降低 CH3-CH3 之间的作用力。荷兰研究者发现，将 IgG1-409 位的赖氨酸突变成精氨酸（IgG1-K409R），能赋予 IgG1 FAE 的能力（Labrijn A F, Rispens T, Meesters J, et al. Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3 - CH3 interaction strength. The Journal of Immunology, 2011, 187(6): 3238-3246.）；在另外一个抗体 CH3 区域引入相应的突变位点（L368/K370/D399/F405/Y407），多种组合的 FAE 结果表明，IgG1-K409R 和 IgG1-F405L 这种组合能够提高 FAE 的效率（Labrijn A F, Meesters J I, de Goeij B E C G, et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(13): 5145-5150.）。

35 DuoBody 平台制备双特异性抗体的操作相对简单，仅需在两个 IgG1 抗体的 Fc 的 CH3 分别引入 K409R 和 F405L 突变位点，按比例混合两个目标抗体，在特定

还原条件下即可完成 FAE，形成双特异性抗体。DuoBody 平台具有多种优势：工程化改造较少，两个母本抗体只需分别突变一个位点，产生的双特异性抗体在大小和构象上与天然 IgG1 非常接近，理论上具有与天然单克隆抗体近似的理化性质和成药性，免疫原性风险低，并能保留天然 IgG1 Fc 功能（ADCC、ADCP、CDC 等）以及 5 与天然 IgG1 相似的药代动力学。

近几年连续有三个基于 DuoBody 的双特异性抗体被美国 FDA 批准上市，包括：Amivantamab、Teclistamab 和 Talquetamab。其中，Amivantamab(JNJ-61186372) 是基于 DuoBody 平台研发的靶向 EGFR 以及 c-Met 的双特异性抗体，2021 年 5 月 21 日被美国 FDA 批准上市，用于治疗铂类化疗治疗中或之后疾病进展的携带 10 EGFR 外显子 20 插入突变的局部晚期或转移性非小细胞肺癌成人患者。Teclistamab 和 Talquetamab 分别是 CD3×BCMA 和 CD3×GPRC5D 双特异性 T-Cell-Engagers（TCEs），用于既往至少接受过多种前线疗法的复发性或难治性多发性骨髓瘤（MM）成人患者。

本披露在用 Genmab 的 DuoBody 平台制备双特异性抗体时发现，一些携带 15 F405L 突变的母本抗体在用 Protein A 亲和纯化之后的 SEC 纯度经常低于 90%，这表明 F405L 可能会降低母本抗体的内在理化稳定性。此外，用 HPLC-IEC 评估重组效率的结果表明，IgG1-K409R 和 IgG1-F405L 组合 FAE 的效率在 95%左右，反应效率有待提高。另外，Duobody 使用的 K409R 突变源自人 IgG4，而 F405L 突变源自恒河猴 IgG4，因此理论上该平台产生的双特异性抗体分子的稳定性依然与 20 IgG4 类抗体相当，不及人野生型 IgG1。利用 Duobody 平台制备的双特异性抗体可能不适合制备某些类型的抗体药物偶联物（Antibody-drug conjugate, ADC）。因为有些 ADC 采用半胱氨酸定点偶联技术，抗体铰链区的两对二硫键会被还原并偶联上药物分子，如果抗体 Fc 的 CH3 结构域之间的相互作用不够强劲，ADC 分子在体内可能会发生 FAE 现象，这可能会给临床应用带来风险。本披露制备的双特异性 25 性抗体的 CH3 结构域可能具有比 Duobody 更优的理化稳定性，从而带来更好的成药性和更广泛的应用。

发明内容

本披露提供一种制备异源多聚体（例如，异源二聚体）的方法，其包含下列步 30 骤：

- a)提供包含两条第一多肽的二聚体的步骤；
- b)提供包含两条第二多肽的二聚体的步骤；以及
- c)在还原条件下，将所述包含两条第一多肽的二聚体和所述包含两条第二多肽的二聚体一起孵育的步骤；
- 35 d)得到包含第一多肽和第二多肽的异源多聚体（例如，包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源二聚体）；

其中所述第一多肽和第二多肽各包含一个 CH3 结构域；

在所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域中，包含至少一个选自：第 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变；所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域至少有一个突变位点不同，
5 所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

本披露提供一种制备异源多聚体的方法，其包含下列步骤：

a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤；

b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤；以及

c)在还原条件下，将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤；
10

其中所述第一多肽和第二多肽各包含一个 CH3 结构域，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域至少有一个突变位点不同，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其还包含 d) 得到包含所述第一多肽和第二多肽的异源多聚体（例如，包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源二聚体）的步骤。在一些实施方案中，步骤 c)将还原剂加入所述混合物并孵育，可导致同聚体（例如，第一多肽同聚体和第二多肽同聚体）单体之间的解离以及异源单体（例如一条第一多肽和一条第二多肽）的重组，从而形成包含一条解离的第一多肽单体和一条解离的第二多肽单体的异源二聚体。
15

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子结合不同的抗原或表位。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域包含至少一个选自：第 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变。
20

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域包含至少一个选自：第 349、351、354、356、364、366、368、394、405、409、411 和 439 位的氨基酸突变。
25

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个或多个促进异源化形成的突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变，指一类能够促进同聚体（例如，同二聚体）解离为单体，和/或促进两个异源单体形成异源多聚体（例如异源二聚体）的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为在 CH3 相互作用界面的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为在 CH3 相互作用界面带电荷的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为在 CH3 相互作用界面带相反电荷的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域之间形成氢键、静电相互作用或盐桥。
30
35

在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为本披露中所述的任一种突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为一个或多个选自第 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为一个或多个选自第 349、
5 351、354、356、364、366、368、394、405、409、411 和 439 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域包含至少一个选自下列组合的氨基酸突变：

- 第 356 位氨基酸突变为 Lys (K)、Arg (R) 或 His (H)；和/或
- 第 439 位氨基酸突变为 Glu (E) 或 Asp (D)；和/或
- 10 第 349 位氨基酸突变为 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)、Cys (C)、Ala (A)、Val (V)、Thr (T) 或 Gly (G)；和/或
- 第 351 位氨基酸突变为 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I)、Phe (F)、Met (M)；和/或
- 第 364 位氨基酸突变为 Ala(A)、Val (V)、Thr (T)、Leu (L)、Tyr (Y) 或 Phe
15 (F)；和/或
- 第 366 位氨基酸突变为 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Ile (I)；和/或
- 第 368 位氨基酸突变为 Val (V)、Ile (I)、Met (M) 或 Ala (A)；和/或
- 第 394 位氨基酸突变为 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn
20 (N)；和/或
- 第 405 位氨基酸突变为 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y)；和/或
- 第 407 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Phe (F)；
和/或
- 第 409 位氨基酸突变为 Gln(Q)、Arg(R)或 Asp (D)；和/或
- 25 第 411 位氨基酸突变为 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)；和/或
- 第 354 位氨基酸突变为 Tyr (Y)、Cys (C)、Phe (F) 或 Trp (W)；和/或
- 第 357 位氨基酸突变为 Cys (C)；和/或
- 第 347 位氨基酸突变为 Glu (E)。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一
30 多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

- (a1)以 EU 编号表示的第 356 和 351 位的氨基酸残基；
- (a2)以 EU 编号表示的第 356 和 364 位的氨基酸残基；
- (a3)以 EU 编号表示的第 356 和 366 位的氨基酸残基；
- (a4)以 EU 编号表示的第 356 和 368 位的氨基酸残基；
- 35 (a5)以 EU 编号表示的第 356 和 394 位的氨基酸残基；
- (a6)以 EU 编号表示的第 356 和 405 位的氨基酸残基；

- (a7)以 EU 编号表示的第 356 和 409 位的氨基酸残基；
(a8)以 EU 编号表示的第 356 和 411 位的氨基酸残基；
(b1)以 EU 编号表示的第 356 和 349 位的氨基酸残基；
(c1)以 EU 编号表示的第 405 位的氨基酸残基；或
5 (c2)以 EU 编号表示的第 349 位的氨基酸残基；
其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i2)组成的组：
(d1)以 EU 编号表示的第 439 和 351 位的氨基酸残基；
(d2)以 EU 编号表示的第 439 和 364 位的氨基酸残基；
(d3)以 EU 编号表示的第 439 和 366 位的氨基酸残基；
10 (d4)以 EU 编号表示的第 439 和 368 位的氨基酸残基；
(d5)以 EU 编号表示的第 439 和 394 位的氨基酸残基；
(d6)以 EU 编号表示的第 439 和 405 位的氨基酸残基；
(d7)以 EU 编号表示的第 439 和 409 位的氨基酸残基；
(d8)以 EU 编号表示的第 439 和 411 位的氨基酸残基；
15 (e1)以 EU 编号表示的第 439 和 354 位的氨基酸残基；
(f1)以 EU 编号表示的第 439、354 和 351 位的氨基酸残基；
(f2)以 EU 编号表示的第 439、354 和 366 位的氨基酸残基；
(f3)以 EU 编号表示的第 439、354 和 368 位的氨基酸残基；
(g1)以 EU 编号表示的第 394 位的氨基酸残基；
20 (h)以 EU 编号表示的第 354 和 364 位的氨基酸残基；
(i1)以 EU 编号表示的第 364 位的氨基酸残基；或
(i2)以 EU 编号表示的第 354 位的氨基酸残基。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

- 25 (a1)以 EU 编号表示的第 356 和 351 位的氨基酸残基；
(a5)以 EU 编号表示的第 356 和 394 位的氨基酸残基；
(a8)以 EU 编号表示的第 356 和 411 位的氨基酸残基；
(b1)以 EU 编号表示的第 356 和 349 位的氨基酸残基；或
(c2)以 EU 编号表示的第 349 位的氨基酸残基；
30 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组：
(d1)以 EU 编号表示的第 439 和 351 位的氨基酸残基；
(d5)以 EU 编号表示的第 439 和 394 位的氨基酸残基；
(d8)以 EU 编号表示的第 439 和 411 位的氨基酸残基；
(f1)以 EU 编号表示的第 439、354 和 351 位的氨基酸残基；
35 (h)以 EU 编号表示的第 354 和 364 位的氨基酸残基；或
(i1)以 EU 编号表示的第 364 位的氨基酸残基。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

- (a1)以 EU 编号表示的第 356 和 351 位的氨基酸残基；
 - (b1)以 EU 编号表示的第 356 和 349 位的氨基酸残基；或
 - 5 (c2)以 EU 编号表示的第 349 位的氨基酸残基；
- 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组：
- (d1)以 EU 编号表示的第 439 和 351 位的氨基酸残基；
 - (f1)以 EU 编号表示的第 439、354 和 351 位的氨基酸残基；
 - (h)以 EU 编号表示的第 354 和 364 位的氨基酸残基；或
 - 10 (i1)以 EU 编号表示的第 364 位的氨基酸残基。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

- (a1)以 EU 编号表示的 356K 和 351I 的氨基酸残基；或
 - 以 EU 编号表示的 356K 和 351T 的氨基酸残基；
 - 15 (a2)以 EU 编号表示的 356K 和 364A 的氨基酸残基；
 - (a3)以 EU 编号表示的 356K 和 366A 的氨基酸残基；
 - (a4)以 EU 编号表示的 356K 和 368I 的氨基酸残基；
 - (a5)以 EU 编号表示的 356K 和 394A 的氨基酸残基；或
 - 以 EU 编号表示的 356K 和 394S 的氨基酸残基；
 - 20 (a6)以 EU 编号表示的 356K 和 405Y 的氨基酸残基；
 - (a7)以 EU 编号表示的 356K 和 409Q 的氨基酸残基；
 - (a8)以 EU 编号表示的 356K 和 411Y 的氨基酸残基；
 - (b1)以 EU 编号表示的 356K 和 349C 的氨基酸残基；或
 - 以 EU 编号表示的 356K 和 349S 的氨基酸残基；
 - 25 (c1)以 EU 编号表示的 405T 的氨基酸残基；或
 - (c2)以 EU 编号表示的 349C、349S 或 349G 的氨基酸残基；
- 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i2)组成的组：
- (d1)以 EU 编号表示的 439E 和 351I 的氨基酸残基；或
 - 以 EU 编号表示的 439E 和 351T 的氨基酸残基；
 - 30 (d2)以 EU 编号表示的 439E 和 364A 的氨基酸残基；
 - (d3)以 EU 编号表示的 439E 和 366A 的氨基酸残基；
 - (d4)以 EU 编号表示的 439E 和 368I 的氨基酸残基；
 - (d5)以 EU 编号表示的 439E 和 394A 的氨基酸残基；或
 - 以 EU 编号表示的 439E 和 394S 的氨基酸残基；
 - 35 (d6)以 EU 编号表示的 439E 和 405Y 的氨基酸残基；
 - (d7)以 EU 编号表示的 439E 和 409Q 的氨基酸残基；

- (d8)以 EU 编号表示的 439E 和 411Y 的氨基酸残基;
- (e1)以 EU 编号表示的 439E 和 354Y 的氨基酸残基;
- (f1)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 351I 的氨基酸残基;
- (f2)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 366A 的氨基酸残基;
- 5 (f3)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 368I 的氨基酸残基;
- (g1)以 EU 编号表示的 394F 的氨基酸残基;
- (h)以 EU 编号表示的 354C 和 364Y 的氨基酸残基; 或
- 以 EU 编号表示的 354C 和 364F 的氨基酸残基;
- (i1)以 EU 编号表示的 364Y 的氨基酸残基; 或
- 10 (i2)以 EU 编号表示的 354W 的氨基酸残基。

在一些实施方案中,如前一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变:

- (a1)以 EU 编号表示的 356K 和 351I 的氨基酸残基;
- (a5)以 EU 编号表示的 356K 和 394S 的氨基酸残基;
- 15 (a8)以 EU 编号表示的 356K 和 411Y 的氨基酸残基;
- (b1)以 EU 编号表示的 356K 和 349C 的氨基酸残基; 或
- (c2)以 EU 编号表示的 349S 或 349C 的氨基酸残基;
- 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组:
- (d1)以 EU 编号表示的 439E 和 351I 的氨基酸残基;
- 20 (d5)以 EU 编号表示的 439E 和 394S 位的氨基酸残基;
- (d8)以 EU 编号表示的 439E 和 411Y 的氨基酸残基;
- (f1)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 351I 的氨基酸残基;
- (h)以 EU 编号表示的 354C 和 364Y 的氨基酸残基; 或
- 以 EU 编号表示的 354C 和 364F 的氨基酸残基;
- 25 (i1)以 EU 编号表示的 364Y 的氨基酸残基。

在一些实施方案中,如前一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变:

- (a1)以 EU 编号表示的 356K 和 351I 的氨基酸残基;
- (a5)以 EU 编号表示的 356K 和 349C 的氨基酸残基; 或
- 30 (c2)以 EU 编号表示的 349S 或 349C 的氨基酸残基;
- 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组:
- (d1)以 EU 编号表示的 439E 和 351I 的氨基酸残基;
- (f1)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 351I 的氨基酸残基;
- (h)以 EU 编号表示的 354C 和 364Y 的氨基酸残基; 或
- 35 (i1)以 EU 编号表示的 364Y 的氨基酸残基。

含第一类突变组合的异源多聚体的制备方法

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 349、351、364、366、368、394、405、407、409 和 411 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 351 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 351 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、349F、351C、351V、351T、351I、351F、351M、364A、364V、364T、364L、366G、366S、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411N、411L 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、351M、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、351M、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的或不同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变，其中，

5 使以 EU 编号表示的 351 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I)、Phe (F) 或 Met (M)；或

 使以 EU 编号表示的 364 位氨基酸突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L)；或

 使以 EU 编号表示的 366 位氨基酸突变成 Ser(S)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、
10 His (H) 或 Ile (I)；或

 使以 EU 编号表示的 368 位氨基酸突变成 Val(V)、Ile(I)、Met(M)或 Ala(A)；
或

 使以 EU 编号表示的 394 位氨基酸突变成 Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V)
或 Asn (N)；或

15 使以 EU 编号表示的 405 位氨基酸突变成 Leu (L) 或 Tyr (Y)；或

 使以 EU 编号表示的 409 位氨基酸突变成 Gln(Q)；或

 使以 EU 编号表示的 411 位氨基酸突变成 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)。

 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3
20 结构域包含 439E 的氨基酸突变，其中，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域
还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基
酸突变，其中，

 使以 EU 编号表示的 351 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I) 或
Phe (F)；或

25 使以 EU 编号表示的 364 位突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L)；
或

 使以 EU 编号表示的 366 位突变成 Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L) 或
His (H)；或

 使以 EU 编号表示的 368 位突变成 Val (V)、Ile (I) 或 Met (M)；或

30 使以 EU 编号表示的 394 位突变成 Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或
Asn (N)；或

 使以 EU 编号表示的 405 位突变成 Leu (L) 或 Tyr (Y)；或

 使以 EU 编号表示的 409 位突变成 Gln(Q)或 Arg(R)；或

 使以 EU 编号表示的 411 位突变成 Asn (N) 或 Tyr (Y)。

35 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一
多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含

439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中, 如前一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y349L 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351V 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351T 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351F 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351F 的氨基酸突变; 或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351M 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351M 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 S364A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S364A 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 S364T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S364T 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 S364L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S364L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366G 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366G 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366V 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变, 和所述

- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366H 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366I 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368V 的氨基酸突变，和所述
- 5 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368V 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368I 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368A 的氨基酸突变，和所述
- 10 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368A 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368A 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368A 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394A 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394A 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394S 的氨基酸突变，和所述
- 15 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394S 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394C 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394C 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394V 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394V 的氨基酸突变；或
- 20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394N 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394N 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 F405L 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 F405L 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 F405Y 的氨基酸突变，和所述
- 25 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 F405Y 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407C 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407C 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407V 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407V 的氨基酸突变；或
- 30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407L 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407L 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407H 的氨基酸突变，和所述
- 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407H 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407F 的氨基酸突变，和所述
- 35 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407F 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 K409Q 的氨基酸突变，和所述

第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 K409Q 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 K409R 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 K409R 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T411L 的氨基酸突变，和所述
5 第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T411L 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T411Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T411Y 的氨基酸突变。

本披露提供一种制备异源多聚体的方法，其包含下列步骤：

a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤，所述第一多肽包含一个 CH3 结构
10 域，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变；

b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；以及

c)在还原条件下，将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤；

15 其中所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个带电荷的氨基酸突变（例如带正电的氨基酸、带负电的氨基酸），且所述第一多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变和所述第二多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变带相反电荷。进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个相同的氨基酸突变，所述突变位于 CH3 相互作用界面，可以减弱第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体的 CH3 结构域之间的相互作用，使第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体在还原条件下更易解离为第一多肽单体和第二多肽单体，从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

25 **含第二类突变组合的异源二聚体的制备方法**

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至 iv)组成的组的氨基酸突变：

30 i)349；

ii)354 和 351；

iii)354 和 366；和

iv)354 和 368。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一
35 多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含

一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439、354 和 351 位的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至iv)组成的组的氨基酸突变：

- 10 i)349C;
ii)354C 和 351I;
iii)354C 和 366A; 和
iv)354C 和 368I。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L351I 的氨基酸突变；或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 T366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L368I 的氨基酸突变。

本披露提供一种制备异源多聚体的方法，其包含下列步骤：

30 a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤，所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变；

b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；以及

c)在还原条件下，将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤；

35 其中所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一

多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个带电荷的氨基酸突变（例如带正电的氨基酸、带负电的氨基酸），且所述第一多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变和所述第二多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变带相反电荷。进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键。更进一步地，
5 所述第一多肽或第二多肽的 CH3 结构域还包含一个氨基酸突变，所述突变位于 CH3 相互作用界面，可以减弱第一多肽同聚体或第二多肽同聚体的 CH3 结构域之间的相互作用，使第一多肽同聚体或第二多肽同聚体在还原条件下更易解离为第一多肽单体和第二多肽单体，从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

10 **含第三类突变组合的异源多聚体的制备方法**

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的
15 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 366 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的
20 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包
25 含第 364 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 364Y、354F、354W 和 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3
30 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 354F、354Y 和 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 405L 或 407L 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变;或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变。

15 本披露提供一种制备异源多聚体的方法,其包含下列步骤:

a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤,所述第一多肽包含一个 CH3 结构域,所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变;

b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤,所述第二多肽包含一个 CH3 结构域,所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;以及

20 c)在还原条件下,将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤;

其中所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中:

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变,所述突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个凸起,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变,所述突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个空穴,从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生;或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变,所述突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个空穴,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变,所述突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个凸起,从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

含第四类突变组合的异源多聚体的制备方法

35 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变,和所述第二多肽的

CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、364、366、368 和 405 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 347 和 357 位的氨基酸突变。

- 5 在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个
10 选自 351I、364Y、364F、366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变。

- 在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含
15 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变。

- 在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含
20 354C 和 364Y 的氨基酸突变。

本披露提供一种制备异源多聚体的方法，其包含下列步骤：

- a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤，所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变；
b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变；以及
25 c)在还原条件下，将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤；

其中所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

- 在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键；进一步地，所述第一多肽或第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个氨基酸突变，其中所述突变位于 CH3 相互作用界面，可以减弱第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体的 CH3 结构域之间的相互作用，使第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体在还原条件下更易解离为第一多肽单体和第二多肽单体，从而促进包含一条第一多肽和一条
35 第二多肽的异源多聚体的产生。

含第五类突变组合的异源多聚体的制备方法

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至vii)组成的组的氨基酸突变：

- i)349;
- ii)354;
- iii)357;
- iv)366;
- v)394;
- vi)405; 和
- vii)407。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 354 位或第 357 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 366 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 407 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 366 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至vii)组成的组的氨基酸突变：

- i)349S 或 349C;
- ii)354Y 或 354C;
- iii)357C;
- iv)366H;
- v)394F;

vi)405T 或 405L; 和

vii)407L 或 407H。

在一些实施方案中, 如前一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 405L、407L 和 407H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S354Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S354C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 E357C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 F405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 F405L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366H 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中, 如前任一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个带电荷的氨基酸突变 (例如带正电的氨基酸、带负电的氨基酸), 且所述第一多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变和所述第二多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变带相反电荷。进一步地, 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还包含选自以下任意一组的氨基酸突变:

10 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变, 可以形成二硫键; 或

所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个凸起, 所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个空穴; 或

所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变, 可以形成二硫键; 进一步地, 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个空穴, 所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个凸起;

从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

含第六类突变组合的异源多聚体的制备方法

25 在一些实施方案中, 如前任一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前任一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变。

30 在一些实施方案中, 如前任一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变, 可以形成二硫键。

第七类突变组合制备方法

35 在一些实施方案中, 如前任一项所述的制备异源多聚体的方法, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含

至少一个选自 i)或 ii)的氨基酸突变:

i)405;

ii)394。

5 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 405 位的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 和 394 位的氨基酸突变。

10 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i)或 ii)的氨基酸突变:

i)405T;

ii)394F。

15 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中:

20 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变,可以形成二硫键;进一步地,所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变,其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个凸起,所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个空穴;或

25 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变,可以形成二硫键;进一步地,所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变,其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个空穴,所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基,可以在 CH3 界面中产生一个凸起;

从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

30 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域之间的异二聚体相互作用强于所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各自的同二聚体相互作用。

35 在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,其中所述第一多肽和第二多肽的等电点存在差异。在一些实施方案中,如前任一项所述的异源多聚体,其中本披露所述的氨基酸突变以赋予或增加所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点差异。在一些实施方案中,如前任一项所述的制备异源多聚体的方法,

其中所述第一多肽和第二多肽进一步包含额外的氨基酸突变以赋予或增加所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点差异。在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，所述第一多肽和第二多肽进一步包含额外的氨基酸突变以至所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点存在差异。

5 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其包含下列步骤：

a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤；

b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤；

c)在还原条件下，将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤；以及

d)获得包含所述第一多肽和第二多肽的异源多聚体的步骤；

所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域至少有一个突变位点不同，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示；

其中所述第一多肽和第二多肽的等电点存在差异，所述第一多肽和第二多肽进一步引入额外的氨基酸突变以赋予或增加所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点差异。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和第二多肽进一步包含可变区。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和第二多肽进一步包含 VH 和 VL。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 VH 进一步包含选自 Q105E、Q105R 和 Q105K 的氨基酸突变，所述突变位点以 KABAT 编号表示。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 VL 进一步包含 K42E 的氨基酸突变，所述突变位点以 KABAT 编号表示。

25 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原条件可使铰链区内的半胱氨酸引起二硫键异构化。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原条件足以容许铰链区中的链间二硫键还原。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原条件包含但不限于添加选自 2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽(GSH)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸和 β-巯基-乙醇及其化学衍生物中的一种或多种还原剂。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原剂选自 2-MEA、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、β-巯基乙醇和 TCEP 中的一种或多种。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原剂为 2-MEA。

35 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原剂的终浓度为 0.1 mM 至 1 M。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原剂的终浓度为 1 mM 至 1 M。在一些实施方案中，如前

任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述还原剂的终浓度为 5 mM 至 500 mM。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体的方法，所述还原剂的终浓度为 5 mM 至 200 mM。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂的终浓度为 25 mM 至 100 mM。在一些实施方案中，如前任
5 一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂的终浓度为 60 mM 至 90 mM。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂的终浓度为 70 mM 至 80 mM。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂的终浓度为 75 mM。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂的
10 终浓度为约 0.1 mM、约 1 mM、约 5 mM、约 10 mM、约 15 mM、约 20 mM、约 25 mM、约 30 mM、约 35 mM、约 40 mM、约 45 mM、约 50 mM、约 55 mM、约 60 mM、约 65 mM、约 70 mM、约 75 mM、约 80 mM、约 85 mM、约 90 mM、约 95 mM、约 100 mM、约 110 mM、约 120 mM、约 130 mM、约 140 mM、约 150 mM、约 160 mM、约 170 mM、约 180 mM、约 190 mM、约 200 mM、约 210 mM、
15 约 220 mM、约 230 mM、约 240 mM、约 250 mM、约 260 mM、约 270 mM、约 280 mM、约 290 mM、约 300 mM、约 310 mM、约 320 mM、约 330 mM、约 340 mM、约 350 mM、约 360 mM、约 370 mM、约 380 mM、约 390 mM、约 400 mM、约 410 mM、约 420 mM、约 430 mM、约 440 mM、约 450 mM、约 460 mM、约 470 mM、约 480 mM、约 490 mM、约 500 mM、约 550 mM、约 600 mM、约 650 mM、约 700 mM、约 750 mM、约 800 mM、约 850 mM、约 900 mM、约 950 mM
20 mM、约 1M，或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述异源多聚体为多特异性抗体或 Fc 融合蛋白。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述异源
25 多聚体为异源二聚体。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述异源二聚体包含一条第一多肽和一条第二多肽。在一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽是组成异源二聚体的多肽结构，其至少包含 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽为 Fc 区（第一 Fc 区），所述第二多肽为 Fc 区（第二 Fc 区），所述第一 Fc 区和/或第二 Fc 区包含 CH2 和 CH3 结构域。在
30 一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽包含 CH1、CH2 和 CH3 结构域。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述异源多聚体为双特异性抗体。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述双特异性抗体包含第一半抗体和第二半抗体。在一些实施方案中，所述第一半抗体包含第一多肽，和所述第二半抗体包含第二多肽。第一多肽和/或
35 第二多肽是组成双特异性抗体的多肽结构，其至少包含 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽为 Fc 区（第一 Fc 区），所述第二多肽为 Fc 区（第二 Fc 区）。

在一些实施方案中，所述第一 Fc 区和/或第二 Fc 区包含 CH2 和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽包含 CH1、CH2 和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一半抗体与第一个抗原结合，所述第二半抗体与第二个抗原结合。在一些实施方案中，所述第一半抗体包含第一抗原结合结构域，所述第二半抗体包含第二抗原结合结构域。在一些实施方案中，所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的结构选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv、dAb 和 VHH。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述异源多聚体为三特异性抗体。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述三特异性抗体包含第一半抗体和第二半抗体。在一些实施方案中，所述第一半抗体与第一个抗原结合，所述第二半抗体与第二个抗原和第三个抗原结合。在一些实施方案中，所述第一半抗体包含第一抗原结合结构域，所述第二半抗体包含第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域。在一些实施方案中，所述第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域的结构选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv、dAb 和 VHH。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子选自 Fc 区，抗体，包含 Fc 区的融合蛋白(例如受体、细胞因子或激素融合的 Fc 区)，和与药物(肽或毒素)缀合的 Fc 区。在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述包含第一多肽同聚体的分子是第一母本抗体，和所述包含第二多肽同聚体的分子是第二母本抗体。在一些实施方案中，第一母本抗体为第一母本单克隆抗体，第二母本抗体为第二母本单克隆抗体。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽同聚体是由两个第一多肽组成的同聚体，所述第二多肽同聚体是由两个第二多肽组成的同聚体。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽同聚体和所述第二多肽同聚体在铰链区都包含 Cys-Pro-Pro-Cys 序列。

本披露中描述“第一多肽”时，也可以指代第一多肽同聚体中的每一条第一多肽。本披露中描述“第二多肽”时，也可以指代第二多肽同聚体中的每一条第二多肽。在一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽是组成异源二聚体的多肽结构，其至少包含 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽为 Fc 区(第一 Fc 区)，所述第二多肽为 Fc 区(第二 Fc 区)，所述第一 Fc 区和/或第二 Fc 区包含 CH2 和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽包含 CH1、CH2 和 CH3 结构域。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中第一多肽是抗体重链，和/或第二多肽是抗体重链。在一些实施方案中，所述异源多聚体还

包含一个或多个抗体轻链。

在一些实施方案中，第一多肽和第二多肽序列是不同的。例如，包含两条第一多肽的分子为第一母本抗体，包含两条第二多肽的分子为第二母本抗体。在本披露中，第一母本抗体还包含一条或多条多肽（例如，分别与两条第一多肽形成半抗体的轻链）。在本披露中，第二母本抗体还包含一条或多条多肽（例如，分别与两条第二多肽形成半抗体的轻链）。

第一多肽、第二多肽、第一母本抗体或第二母本抗体仅用于区别氨基酸序列，不限制多肽和蛋白位置关系。例如，在一个由一条第一多肽和一条第二多肽组成的异源二聚体中，第一多肽和第二多肽为两条氨基酸序列不同的多肽。当其中任意一条为第一多肽时，另外一条为第二多肽。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述异源多聚体核心铰链区的氨基酸形成二硫键。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG1、IgG2 或 IgG3。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG1。在一些实施方案中，所述 CH3 结构域来源于人 IgG1。在一些实施方案中，所述人 IgG1 具有 SEQ ID NO: 39、40 或 41 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述的异源多聚体具有至少一个经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Obscurin 链和 Titin 链所替换，或所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。在一些实施方案中，所述 Titin 链具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，所述 Obscurin 链具有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中超过 70%（例如超过 75%、超过 80%、超过 85%、超过 88%、超过 90%、超过 91%、超过 92%、超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98% 或超过 99%）的总产物是期望的异源多聚体（相较于总产物中的其他产物，例如半抗体或同聚体）。

在一些实施方案中，所述异源多聚体具有良好的热稳定性。

在一些实施方案中，所述异源多聚体的热稳定性高于包含现有技术中 Fc 区突变的异源多聚体的热稳定性。在一些实施方案中，所述热稳定性包含热力学指标。

在一些实施方案中，所述异源多聚体的母本抗体具有良好的热稳定性。

在一些实施方案中，所述异源多聚体的热稳定性高于母本抗体（例如第一母本抗体、第二母本抗体）的热稳定性。

5 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中：步骤 a) 和步骤 b) 还包含纯化所述包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子的步骤。在一些实施方案中，所述纯化方法包含但不限于蛋白 A 或蛋白 G 层析、基于抗原结合的亲和层析、基于抗独特型抗体的亲和层析、离子交换、疏水性相互作用层析、混合式层析(诸如羟磷灰石)、固定化金属亲和层析、亲疏性吸附层析和尺寸排阻层析 (SEC) 等。在一些实施方案中，所述纯化方法为亲和层析。在一些实施方案中，所述纯化方法为蛋白 A 层析。

10 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中步骤 c) 之后还包括去除所述还原剂的步骤。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂通过但不限于透析、沉淀、层析或过滤去除。在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，所述还原剂通过透析去除。

15 在一些实施方案中，用于去除所述还原剂的步骤在原则上可以是任何导致或能够分开两者而不损害异源多聚体的方法。此类方法包含但不限于透析、沉淀、层析或过滤。去除所述还原剂的步骤可以作为连续过程实施或者其可以作为分批过程实施。

20 在一些实施方案中，所述步骤 c) 获得的产物中异源多聚体的含量超过 70% (例如超过 75%、超过 80%、超过 85%、超过 88%、超过 90%、超过 91%、超过 92%、超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98% 或超过 99%)。

25 在一些实施方案中，如前一项所述的制备异源多聚体的方法，其中步骤 d) 还包含纯化从步骤 c) 获得的产物的方法。在一些实施方案中，所述纯化方法包含但不限于蛋白 A 或蛋白 G 层析、基于抗原结合的亲和层析、基于抗独特型抗体的亲和层析、离子交换、疏水性相互作用层析、混合式层析(诸如羟磷灰石)、固定化金属亲和层析、亲疏性吸附层析和尺寸排阻层析 (SEC) 等。在一些实施方案中，所述纯化方法为亲和层析。在一些实施方案中，所述纯化方法为尺寸排阻层析 (SEC)。

30 在一些实施方案中，可以举出下述的方法：分别培养产生包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子的细胞株，将该培养上清纯化后，使用纯化抗体引起 FAE (Fab 臂交换) 反应的方法；分别培养产生包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子的细胞株，无需纯化该培养上清而进行混合，在混合培养上清中引起 FAE 反应，然后进行纯化的方法；将产生包含第一多肽同聚体的分子的细胞株与产生包含第二多肽同聚体的分子的细胞株混合并进行培养，将该培养上清纯化后，使用纯化抗体引起 FAE 反应的方法；将产生包含第一多肽同聚体的分子的细胞株与产生包含第二多肽同聚体的分子的细胞株混合并进行培养，在
35 该培养上清中引起 FAE 反应，然后进行纯化的方法。

在一些实施方案中，本披露提供一种制备异源多聚体的方法，该方法包括以下

a)至 c)的步骤:

a)分别培养产生包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子的细胞株的步骤;

5 b)分别纯化各细胞株的培养上清得到包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子, 将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子在还原剂存在的条件下一起孵育的步骤; 以及

c)得到包含所述第一多肽和第二多肽的异源多聚体。

在一些实施方案中, 本披露提供一种制备异源多聚体的方法, 该方法包括以下

a)至 c)的步骤:

10 a)将产生包含第一多肽同聚体的分子的细胞株与产生包含第二多肽同聚体的分子的细胞株混合的步骤;

b)在该培养上清中将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子在还原剂存在的条件下一起孵育的步骤; 以及

c)得到包含所述第一多肽和第二多肽的异源多聚体。

15 在一些实施方案中, 本披露提供一种制备异源多聚体的方法, 该方法包括以下a)至 c)的步骤:

a)分别培养产生包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子的细胞株的步骤;

20 b)将各细胞株的培养上清混合, 将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子在还原剂存在的条件下一起孵育的步骤; 以及

c)得到包含所述第一多肽和第二多肽的异源多聚体。

在一些实施方案中, 本披露提供一种制备异源多聚体的方法, 该方法包含以下步骤:

a)提供编码包含第一多肽同聚体的分子的第一核酸构建体,

25 b)提供编码包含第二多肽同聚体的分子的第二核酸构建体,

其中所述第一多肽与第二多肽的序列不同, 并使得所述第一多肽与第二多肽之间的异二聚体相互作用强于所述第一多肽与第二多肽各自的同二聚体相互作用;

c)使所述第一和第二核酸构建体在宿主细胞中共表达, 和

d)从细胞培养物获得所述异源多聚体。

30 在另一个方面, 本披露提供一种根据如前任一项所述的方法制备的异源多聚体。

在另一个方面, 本披露提供一种异源多聚体, 其包含第一多肽和第二多肽, 其中所述第一多肽和第二多肽各包含一个 CH3 结构域, 其中第一多肽的 CH3 结构域和第二多肽的 CH3 结构域包含氨基酸突变, 其中所述的氨基酸突变包含至少一个
35 选自: 第 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变; 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域至少有

一个突变位点不同，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述的氨基酸突变包含至少一个选自：第 349、351、354、356、364、366、368、394、405、409、411 和 439 位的氨基酸突变。

- 5 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述 CH3 结构域包含一个或多个促进异源化形成的突变。促进异源化形成的突变，在本披露中指一类能够促进同聚体（例如，同二聚体）解离为单体，和/或促进两个异源单体形成异源多聚体（例如异源二聚体）的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为在 CH3 相互作用界面的氨基酸突变。在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为在 CH3 相互作用界面带电荷的氨基酸突变。在 10 一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为在 CH3 相互作用界面带相反电荷的氨基酸突变。

在一些实施方案中，所述促进异源化形成的突变为本披露中所述的任一种突变。

- 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和/或 15 第二多肽的 CH3 结构域包含至少一个选自下列组合的氨基酸突变：

第 356 位氨基酸突变为 Lys (K)、Arg (R) 或 His (H)；和/或

第 439 位氨基酸突变为 Glu (E) 或 Asp (D)；和/或

第 349 位氨基酸突变为 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)、Cys (C)、Ala (A)、Val (V)、Thr (T) 或 Gly (G)；和/或

- 20 第 351 位氨基酸突变为 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I)、Phe (F)、Met (M)；和/或

第 364 位氨基酸突变为 Ala(A)、Val (V)、Thr (T)、Leu (L)、Tyr (Y) 或 Phe (F)；和/或

- 25 第 366 位氨基酸突变为 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Ile (I)；和/或

第 368 位氨基酸突变为 Val (V)、Ile (I)、Met (M) 或 Ala (A)；和/或

第 394 位氨基酸突变为 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N)；和/或

第 405 位氨基酸突变为 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y)；和/或

- 30 第 407 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Phe (F)；和/或

第 409 位氨基酸突变为 Gln(Q)、Arg(R)或 Asp (D)；和/或

第 411 位氨基酸突变为 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)；和/或

第 354 位氨基酸突变为 Tyr (Y)、Cys (C)、Phe (F) 或 Trp (W)；和/或

- 35 第 357 位氨基酸突变为 Cys (C)；和/或

第 347 位氨基酸突变为 Glu (E)。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

- (a1)以 EU 编号表示的第 356 和 351 位的氨基酸残基；
 - (a2)以 EU 编号表示的第 356 和 364 位的氨基酸残基；
 - 5 (a3)以 EU 编号表示的第 356 和 366 位的氨基酸残基；
 - (a4)以 EU 编号表示的第 356 和 368 位的氨基酸残基；
 - (a5)以 EU 编号表示的第 356 和 394 位的氨基酸残基；
 - (a6)以 EU 编号表示的第 356 和 405 位的氨基酸残基；
 - (a7)以 EU 编号表示的第 356 和 409 位的氨基酸残基；
 - 10 (a8)以 EU 编号表示的第 356 和 411 位的氨基酸残基；
 - (b1)以 EU 编号表示的第 356 和 349 位的氨基酸残基；
 - (c1)以 EU 编号表示的第 405 位的氨基酸残基； 或
 - (c2)以 EU 编号表示的第 349 位的氨基酸残基；
- 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i2)组成的组：
- 15 (d1)以 EU 编号表示的第 439 和 351 位的氨基酸残基；
 - (d2)以 EU 编号表示的第 439 和 364 位的氨基酸残基；
 - (d3)以 EU 编号表示的第 439 和 366 位的氨基酸残基；
 - (d4)以 EU 编号表示的第 439 和 368 位的氨基酸残基；
 - (d5)以 EU 编号表示的第 439 和 394 位的氨基酸残基；
 - 20 (d6)以 EU 编号表示的第 439 和 405 位的氨基酸残基；
 - (d7)以 EU 编号表示的第 439 和 409 位的氨基酸残基；
 - (d8)以 EU 编号表示的第 439 和 411 位的氨基酸残基；
 - (e1)以 EU 编号表示的第 439 和 354 位的氨基酸残基；
 - (f1)以 EU 编号表示的第 439、354 和 351 位的氨基酸残基；
 - 25 (f2)以 EU 编号表示的第 439、354 和 366 位的氨基酸残基；
 - (f3)以 EU 编号表示的第 439、354 和 368 位的氨基酸残基；
 - (g1)以 EU 编号表示的第 394 位的氨基酸残基；
 - (h)以 EU 编号表示的第 354 和 364 位的氨基酸残基；
 - (i1)以 EU 编号表示的第 364 位的氨基酸残基； 或
 - 30 (i2)以 EU 编号表示的第 354 位的氨基酸残基。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

- (a1)以 EU 编号表示的第 356 和 351 位的氨基酸残基；
- (a5)以 EU 编号表示的第 356 和 394 位的氨基酸残基；
- 35 (a8)以 EU 编号表示的第 356 和 411 位的氨基酸残基；
- (b1)以 EU 编号表示的第 356 和 349 位的氨基酸残基； 或

(c2)以 EU 编号表示的第 349 位的氨基酸残基；

其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组：

(d1)以 EU 编号表示的第 439 和 351 位的氨基酸残基；

(d5)以 EU 编号表示的第 439 和 394 位的氨基酸残基；

5 (d8)以 EU 编号表示的第 439 和 411 位的氨基酸残基；

(f1)以 EU 编号表示的第 439、354 和 351 位的氨基酸残基；

(h)以 EU 编号表示的第 354 和 364 位的氨基酸残基；或

(i1)以 EU 编号表示的第 364 位的氨基酸残基。

在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3

10 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

(a1)以 EU 编号表示的第 356 和 351 位的氨基酸残基；

(b1)以 EU 编号表示的第 356 和 349 位的氨基酸残基；或

(c2)以 EU 编号表示的第 349 位的氨基酸残基；

其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组：

15 (d1)以 EU 编号表示的第 439 和 351 位的氨基酸残基；

(f1)以 EU 编号表示的第 439、354 和 351 位的氨基酸残基；

(h)以 EU 编号表示的第 354 和 364 位的氨基酸残基；或

(i1)以 EU 编号表示的第 364 位的氨基酸残基。

在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3

20 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：

(a1)以 EU 编号表示的 356K 和 351I 的氨基酸残基；或

以 EU 编号表示的 356K 和 351T 的氨基酸残基；

(a2)以 EU 编号表示的 356K 和 364A 的氨基酸残基；

(a3)以 EU 编号表示的 356K 和 366A 的氨基酸残基；

25 (a4)以 EU 编号表示的 356K 和 368I 的氨基酸残基；

(a5)以 EU 编号表示的 356K 和 394A 的氨基酸残基；或

以 EU 编号表示的 356K 和 394S 的氨基酸残基；

(a6)以 EU 编号表示的 356K 和 405Y 的氨基酸残基；

(a7)以 EU 编号表示的 356K 和 409Q 的氨基酸残基；

30 (a8)以 EU 编号表示的 356K 和 411Y 的氨基酸残基；

(b1)以 EU 编号表示的 356K 和 349C 的氨基酸残基；或

以 EU 编号表示的 356K 和 349S 的氨基酸残基；

(c1)以 EU 编号表示的 405T 的氨基酸残基；或

(c2)以 EU 编号表示的 349C、349S 或 349G 的氨基酸残基；

35 其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i2)组成的组：

(d1)以 EU 编号表示的 439E 和 351I 的氨基酸残基；或

- 以 EU 编号表示的 439E 和 351T 的氨基酸残基；
(d2)以 EU 编号表示的 439E 和 364A 的氨基酸残基；
(d3)以 EU 编号表示的 439E 和 366A 的氨基酸残基；
(d4)以 EU 编号表示的 439E 和 368I 的氨基酸残基；
5 (d5)以 EU 编号表示的 439E 和 394A 的氨基酸残基；或
以 EU 编号表示的 439E 和 394S 的氨基酸残基；
(d6)以 EU 编号表示的 439E 和 405Y 的氨基酸残基；
(d7)以 EU 编号表示的 439E 和 409Q 的氨基酸残基；
(d8)以 EU 编号表示的 439E 和 411Y 的氨基酸残基；
10 (e1)以 EU 编号表示的 439E 和 354Y 的氨基酸残基；
(f1)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 351I 的氨基酸残基；
(f2)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 366A 的氨基酸残基；
(f3)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 368I 的氨基酸残基；
(g1)以 EU 编号表示的 394F 的氨基酸残基；
15 (h)以 EU 编号表示的 354C 和 364Y 的氨基酸残基；或
以 EU 编号表示的 354C 和 364F 的氨基酸残基；
(i1)以 EU 编号表示的 364Y 的氨基酸残基；或
(i2)以 EU 编号表示的 354W 的氨基酸残基。
- 在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3
20 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：
(a1)以 EU 编号表示的 356K 和 351I 的氨基酸残基；
(a5)以 EU 编号表示的 356K 和 394S 的氨基酸残基；
(a8)以 EU 编号表示的 356K 和 411Y 的氨基酸残基；
(b1)以 EU 编号表示的 356K 和 349C 的氨基酸残基；或
25 (c2)以 EU 编号表示的 349S 或 349C 的氨基酸残基；
其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组：
(d1)以 EU 编号表示的 439E 和 351I 的氨基酸残基；
(d5)以 EU 编号表示的 439E 和 394S 位的氨基酸残基；
(d8)以 EU 编号表示的 439E 和 411Y 的氨基酸残基；
30 (f1)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 351I 的氨基酸残基；
(h)以 EU 编号表示的 354C 和 364Y 的氨基酸残基；或
以 EU 编号表示的 354C 和 364F 的氨基酸残基；
(i1)以 EU 编号表示的 364Y 的氨基酸残基。
- 在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3
35 结构域具有选自由以下(a1)至(c2)组成的组的氨基酸突变：
(a1)以 EU 编号表示的 356K 和 351I 的氨基酸残基；

(a5)以 EU 编号表示的 356K 和 349C 的氨基酸残基；或

(c2)以 EU 编号表示的 349S 或 349C 的氨基酸残基；

其中所述第二多肽的 CH3 结构域具有选自由以下(d1)至(i1)组成的组：

(d1)以 EU 编号表示的 439E 和 351I 的氨基酸残基；

5 (f1)以 EU 编号表示的 439E、354C 和 351I 的氨基酸残基；

(h)以 EU 编号表示的 354C 和 364Y 的氨基酸残基；或

(i1)以 EU 编号表示的 364Y 的氨基酸残基。

第一类突变组合

10 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 349、351、364、366、368、394、405、407、409 和 411 位的氨基酸突变。

15 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变。

20 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 351 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 351 位的氨基酸突变。

25 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、349F、351C、351V、351T、351I、351F、351M、364A、364V、364T、364L、366G、366S、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411N、411L 和 411Y 的氨基酸突变。

30 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、351M、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3

结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、351M、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、
5 394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前任一所述项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、364、
10 366、368、394、405、409、411 位的氨基酸突变, 其中:

使以 EU 编号表示的 351 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I)、Phe (F) 或 Met (M); 或

使以 EU 编号表示的 364 位氨基酸突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L); 或
15

使以 EU 编号表示的 366 位氨基酸突变成 Ser(S)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、His (H) 或 Ile (I); 或

使以 EU 编号表示的 368 位氨基酸突变成 Val(V)、Ile(I)、Met(M) 或 Ala(A);
或

使以 EU 编号表示的 394 位氨基酸突变成 Ala(A)、Ser(S)、Cys(C)、Val(V) 或 Asn (N); 或
20

使以 EU 编号表示的 405 位氨基酸突变成 Leu (L) 或 Tyr (Y); 或

使以 EU 编号表示的 409 位氨基酸突变成 Gln(Q); 或

使以 EU 编号表示的 411 位氨基酸突变成 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)。
25

在一些实施方案中, 如前任一所述项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中, 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409、411 位的氨基酸突变, 其中:

使以 EU 编号表示的 351 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I) 或 Phe (F); 或
30

使以 EU 编号表示的 364 位突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L);
或

使以 EU 编号表示的 366 位突变成 Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L) 或 His (H); 或
35

使以 EU 编号表示的 368 位突变成 Val (V)、Ile (I) 或 Met (M); 或

使以 EU 编号表示的 394 位突变成 Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N); 或

使以 EU 编号表示的 405 位突变成 Leu (L) 或 Tyr (Y); 或

使以 EU 编号表示的 409 位突变成 Gln(Q)或 Arg(R); 或

5 使以 EU 编号表示的 411 位突变成 Asn (N) 或 Tyr (Y)。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突

10 变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中:

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y349L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351C 的氨基酸突变; 或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351V 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351T 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351I 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351F 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L351M 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351M 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 S364A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S364A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 S364T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S364T 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 S364L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S364L 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366G 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366G 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366V 的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366H 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368V 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368I 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 L368A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L368A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394A 的氨基酸突变; 或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394S 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394V 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T394N 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394N 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 F405L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 F405L 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 F405Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 F405Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407V 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407H 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407F 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407F 的氨基酸突变；或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 K409Q 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 K409Q 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 K409R 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 K409R 的氨基酸突变；或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T411L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T411L 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T411Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的制备异源多聚体的方法，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个带电荷的氨基酸突变（例如带正电的氨基酸、带负电的氨基酸），且所述第一多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变和所述第二多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变带相反电荷。进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个相同的氨基酸突变，所述突变位于 CH3 相互作用界面，可以减弱第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体的 CH3 结构域之间的相互作用，使第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体在还原条件下更易解离为第一多肽单体和第二多肽单体，从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

第二类突变组合

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自以下 i)至 iv)组成的组的氨基酸突变：

- i)349;
- ii)354 和 351;
- iii)354 和 366; 和
- 30 iv)354 和 368。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域区还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第

439、354 和 351 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至iv)组成的组的氨基酸突变：

- i)349C；
- ii)354C 和 351I；
- iii)354C 和 366A；和
- iv)354C 和 368I。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L351I 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 T366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L368I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个带电荷的氨基酸突变（例如带正电的氨基酸、带负电的氨基酸），且所述第一多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变和所述第二多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变带相反电荷。进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键。更进一步地，所述第一多肽或第二多肽的 CH3 结构域还包含一个氨基酸突变，所述突变位于 CH3 相互作用界面，可以减弱第一多肽同聚体或第二多肽同聚体的 CH3 结构域之间的相互作用，使第一多肽同聚体或第二多肽同聚体在还原条件下更易解离为第一多肽单体和第二多肽单体，从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

第三类突变组合

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的

CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 366 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 364Y、354F、354W 和 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 354F、354Y 和 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 405L 或 407L 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3

结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变, 所述突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个凸起, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变, 所述突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个空穴; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变, 所述突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个空穴, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个氨基酸突变, 所述突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基, 可以在 CH3 界面中产生一个凸起;

从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

第四类突变组合

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、364、366、368 和 405 位的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 347 和 357 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、364Y、364F、366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变, 可以形成二硫键; 进一步地, 所述

第一多肽或第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个氨基酸突变，其中所述突变位于 CH3 相互作用界面，可以减弱第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体的 CH3 结构域之间的相互作用，使第一多肽同聚体和/或第二多肽同聚体在还原条件下更易解离为第一多肽单体和第二多肽单体，从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

第五类突变组合

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自以下 i)至vii)组成的组的氨基酸突变：

- i)349;
- ii)354;
- iii)357;
- iv)366;
- v)394;
- vi)405; 和
- vii)407。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 354 位或第 357 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 366 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 407 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 366 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自以下 i)至vii)组成的组的氨基酸突变：

- i)349S 或 349C;

ii)354Y 或 354C;

iii)357C;

iv)366H;

v)394F;

5 vi)405T 或 405L; 和

vii)407L 或 407H。

在一些实施方案中, 如前任一项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 405L、407L 和 407H 的氨基酸突变; 或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变。

25 在一些实施方案中, 如前任一项所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前任一项所述的异源多聚体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S354Y 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 S354C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 E357C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 F405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T394F 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 F405L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407L 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 T366H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 Y407H 的氨基酸突变；或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366H 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 D/E356K 和 Y407H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 T366H 的氨基酸突变。

10 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个带电荷的氨基酸突变（例如带正电的氨基酸、带负电的氨基酸），且所述第一多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变和所述第二多肽的 CH3 结构域中的氨基酸突变带相反电荷。进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还包含选自以下任意一组的氨基酸突变：

15 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键；或

所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变，其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个凸起，所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个空穴；或

20 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键；进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变，其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个空穴，所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个凸起；

从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

第六类突变组合

30 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键。

第七类突变组合

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i)或 ii)的氨基酸突变：

- i)405；
- ii)394。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 和 394 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i)或 ii)的氨基酸突变：

- i)405T；
- ii)394F。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中：

所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键；进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变，其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个凸起，所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个空穴；或

所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各包含一个半胱氨酸突变，可以形成二硫键；进一步地，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个不同的氨基酸突变，其中所述第一多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从大体积氨基酸残基突变为小体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个空穴，所述第二多肽的 CH3 结构域的氨基酸突变从小体积氨基酸残基突变为大体积氨基酸残基，可以在 CH3 界面中产生一个凸起；

从而促进包含一条第一多肽和一条第二多肽的异源多聚体的产生。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的等电点存在差异。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中本披露所述的氨基酸突变以赋予或增加所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电

点差异。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽进一步包含额外的氨基酸突变以赋予或增加所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点差异。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，所述第一多肽5 和第二多肽进一步包含额外的氨基酸突变以至所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点存在差异。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽进一步包含可变区。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽进一步包含 VH 和 VL。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 VH 进10 一步包含选自 Q105E、Q105R 和 Q105K 的氨基酸突变，所述突变位点以 KABAT 编号表示。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 VL 进一步包含 K42E 的氨基酸突变，所述突变位点以 KABAT 编号表示。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体为多15 特异性抗体或 Fc 融合蛋白。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体为异源二聚体。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述异源二聚体包含一条第一多肽和一条第二多肽。在一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽是组成异源二聚体的多肽结构，其至少包含 CH3 结构域。在一些实施方案20 中，所述第一多肽为 Fc 区（第一 Fc 区），所述第二多肽为 Fc 区（第二 Fc 区），所述第一 Fc 区和/或第二 Fc 区包含 CH2 和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽和/或第二多肽包含 CH1、CH2 和 CH3 结构域。

在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体为双特异性抗体。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述双特异性25 抗体包含第一半抗体和第二半抗体。在一些实施方案中，所述第一半抗体包含第一多肽，和所述第二半抗体包含第二多肽。第一多肽和/或第二多肽是组成双特异性抗体的多肽结构，其至少包含 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一多肽为 Fc 区（第一 Fc 区），所述第二多肽为 Fc 区（第二 Fc 区）。在一些实施方案中，所述第一 Fc 区和/或第二 Fc 区包含 CH2 和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所30 述第一多肽和/或第二多肽包含 CH1、CH2 和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述第一半抗体与第一个抗原结合，所述第二半抗体与第二个抗原结合。在一些实施方案中，所述第一半抗体包含第一抗原结合结构域，所述第二半抗体包含第二抗原结合结构域。在一些实施方案中，所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的结构选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv、dAb 和 VHH。

35 在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体为三特异性抗体。在一些实施方案中，如前任一项所述的异源多聚体，其中所述三特异

性抗体包含第一半抗体和第二半抗体。在一些实施方案中，所述第一半抗体与第一个抗原结合，所述第二半抗体与第二个抗原和第三个抗原结合。在一些实施方案中，所述第一半抗体包含第一抗原结合结构域，所述第二半抗体包含第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域。在一些实施方案中，所述第一抗原结合结构域、第二抗原结合结构域和第三抗原结合结构域的结构选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv、dAb 和 VHH。

在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中第一多肽是抗体重链，和/或第二多肽是抗体重链。在一些实施方案中，所述异源多聚体还包含一个或多个抗体轻链。

在一些实施方案中，第一多肽和第二多肽序列是不同的。第一多肽或第二多肽仅用于区别氨基酸序列，不限制多肽和蛋白位置关系。例如，在一个由一条第一多肽和一条第二多肽组成的异源二聚体中，第一多肽和第二多肽为两条氨基酸序列不同的多肽。当其中任意一条为第一多肽时，另外一条为第二多肽。

在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体核心铰链区的氨基酸形成二硫键。

在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于 IgG。在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG1、IgG2 或 IgG3。在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于 IgG1。在一些实施方案中，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于人 IgG1。在一些实施方案中，所述人 IgG1 具有 SEQ ID NO: 39、40 或 41 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体具有至少一个经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方案中，如前一项所述的异源多聚体，其中所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Obscurin 链和 Titin 链所替换，或所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。在一些实施方案中，所述 Titin 链具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，所述 Obscurin 链具有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在另一个方面，本披露提供一种异源多聚体，包含第一多肽和第二多肽，其中：所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前所述的异源多聚体，其中所述第一多肽包含一个 CH3

结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 D356K 和 L351I 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；或

其中所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含
5 E356K 和 L351I 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

在另一个方面，本披露提供一种异源多聚体，包含第一多肽和第二多肽，其中：

所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 356K
10 和 349C 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前所述的异源多聚体，其中所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 D356K 和 Y349C 的氨基酸突变，

15 所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；或

其中所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 E356K 和 Y349C 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、
20 S354C 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

在另一个方面，本披露提供一种异源多聚体，包含第一多肽和第二多肽，其中：

所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y
25 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前所述的异源多聚体，其中所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 Y349S 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 S364Y 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

30 在另一个方面，本披露提供一种通过胞外 Fab-臂交换反应（胞外半抗体重组反应）制备的异源多聚体，包含第一多肽和第二多肽，其中：

所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y
35 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前所述的通过胞外 Fab-臂交换反应（胞外半抗体重组

反应) 制备的异源多聚体, 其中所述第一多肽包含一个 CH3 结构域, 其中第一多肽的 CH3 结构域包含 Y349S 的氨基酸突变,

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域, 其中第二多肽的 CH3 结构域包含 S364Y 的氨基酸突变, 所述突变位点以 EU 编号表示。

- 5 在另一个方面, 本披露提供一种异源多聚体, 包含第一多肽和第二多肽, 其中:
所述第一多肽包含一个 CH3 结构域, 其中第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域, 其中第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变, 所述突变位点以 EU 编号表示。

- 10 在一些实施方案中, 如前所述的异源多聚体, 其中所述第一多肽包含一个 CH3 结构域, 其中第一多肽的 CH3 结构域包含 Y349C 的氨基酸突变,

所述第二多肽包含一个 CH3 结构域, 其中第二多肽的 CH3 结构域包含 S354C 和 S364Y 的氨基酸突变, 所述突变位点以 EU 编号表示。

- 15 在另一个方面, 本披露提供一种药物组合物, 其包含如前任一项目所述的异源多聚体以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在另一个方面, 本披露提供一种免疫偶联物, 其包含: 如前任一项目所述的异源多聚体和效应分子, 其中所述效应分子偶联至所述异源多聚体。在一些实施方案中, 所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子, 以及其任何组合。

- 20 在另一个方面, 本披露提供一种制备免疫偶联物的方法, 其包含下列步骤:

a) 提供包含第一多肽同聚体的分子和包含第二多肽同聚体的分子的步骤;

b) 将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子混匀形成混合物; 以及

c) 将还原剂加入所述混合物并孵育;

- 25 d) 得到包含所述第一多肽和第二多肽的免疫偶联物;

其中所述第一多肽和第二多肽各包含一个 CH3 结构域, 所述 CH3 结构域各包含一个或多个促进异源化形成的突变;

其中所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子包含与前药、肽、药物或毒素缀合的 Fc 区。

- 30 在一些实施方案中, 其中所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子包含与毒素缀合的 Fc 区。

在一些实施方案中, 其中所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子为抗体药物偶联物。

在另一个方面, 本披露提供一种制备免疫偶联物的方法, 其包含:

- 35 使用本披露所述的任意一种制备异源多聚体的方法获得的异源多聚体, 与毒素缀合。

在另一个方面，本披露提供一种或多种分离的核酸，其编码如前一项所述的异源多聚体的第一多肽和/或第二多肽。

在另一个方面，本披露提供一种或多种载体，其包含如前一项所述的一种或多种分离的核酸。

5 在另一个方面，本披露提供一种或多种宿主细胞，其包含如前一项所述的一种或多种分离的核酸。

在另一个方面，本披露提供一种制备如前一项所述的异源多聚体的方法，其包含表达如前一项所述的一种或多种分离的核酸、或培养如前一项所述的一种或多种宿主细胞，以产生所述异源多聚体。

10 在另一个方面，本披露提供一种制备如前一项所述的异源多聚体的方法，其包含：(a)将编码形成该多肽间界面的氨基酸残基的核酸进行改变的步骤；(b)培养具有该核酸的宿主细胞以表达该多肽的步骤；(c)由该宿主细胞的培养物回收该多肽的步骤；以及(d)在还原剂存在的条件下，孵育各多肽，回收所希望的异源多聚体的步骤。

15 在另一个方面，本披露提供一种通过重组反应制备多特异性抗体的方法，其包含下列步骤：

- a)提供第一母本抗体的步骤；
- b)提供第二母本抗体的步骤；
- c)在还原条件下，将所述第一母本抗体和所述第二母本抗体一起孵育的步骤，

20 所述还原条件足以容许铰链区中的链间二硫键还原；以及

- d)获得多特异性抗体的步骤，其中，
- 在所述第一母本抗体和/或第二母本抗体的CH3结构域中，包含至少一个选自：347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、397、399、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变；

25 所述第一母本抗体和第二母本抗体结合不同的抗原或表位，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

本披露提供一种通过重组反应制备多特异性抗体的方法，其包含下列步骤：

- a)提供第一母本抗体的步骤；
- b)提供第二母本抗体的步骤；
- c)在还原条件下，将所述第一母本抗体和所述第二母本抗体一起孵育的步骤，

30 所述还原条件足以容许铰链区中的链间二硫键还原；以及

- d)获得多特异性抗体的步骤，其中，
- 在所述第一母本抗体和/或第二母本抗体的CH3结构域中，包含至少一个选自：349、351、354、356、357、364、366、368、394、397、405、407、409、411 和 439

35 位的氨基酸突变；

所述第一母本抗体和第二母本抗体结合不同的抗原或表位，所述 CH3 结构域

突变位点以 EU 编号表示。

在另一个方面，本披露提供一种通过重组反应制备多特异性抗体的方法，其包含下列步骤：

- a)提供第一母本抗体的步骤；
- 5 b)提供第二母本抗体的步骤；
- c)在还原条件下，将所述第一母本抗体和所述第二母本抗体一起孵育的步骤，所述还原条件足以容许铰链区中的链间二硫键还原；以及
- d)获得多特异性抗体的步骤，其中，
- 在所述第一母本抗体和/或第二母本抗体的CH3结构域中，包含至少一个选自：
- 10 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、399、405、407、411 和 439 位的氨基酸突变；

所述第一母本抗体和第二母本抗体结合不同的抗原或表位，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示；

前提是，不包含以下两种情形：

- 15 i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 356 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 439 位的氨基酸突变；以及
- ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 409 位的氨基酸突变。

在另一个方面，本披露提供一种通过重组反应制备多特异性抗体的方法，其包含下列步骤：

- 20 a)提供第一母本抗体的步骤；
- b)提供第二母本抗体的步骤；
- c)在还原条件下，将所述第一母本抗体和所述第二母本抗体一起孵育的步骤，所述还原条件足以容许铰链区中的链间二硫键还原；以及
- 25 d)获得多特异性抗体的步骤，其中，
- 在所述第一母本抗体和/或第二母本抗体的CH3结构域中，包含至少一个选自：
- 349、351、354、356、357、364、366、368、394、397、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变；

所述第一母本抗体和第二母本抗体结合不同的抗原或表位，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示；

前提是，不包含以下两种情形：

- i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 356 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 439 位的氨基酸突变；以及
- ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅含一个第 409 位的氨基酸突变。
- 35

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本

抗体和/或第二母本抗体的 CH3 结构域包含至少一个选自：349、351、354、356、364、366、368、394、405、409、411 和 439 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体和/或第二母本抗体的 CH3 结构域包含至少一个选自下列组合的氨基酸突变：

- 5 使以 EU 编号表示的 356 位氨基酸突变成 Lys (K)；或
 使以 EU 编号表示的 439 位氨基酸突变成 Glu (E)；或
 使以 EU 编号表示的 349 位氨基酸突变成 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)、Cys (C)、Ala (A)、Val (V)、Thr (T) 或 Gly (G)；或
 使以 EU 编号表示的 351 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile
10 (I)、Phe (F)、Met (M)；或
 使以 EU 编号表示的 364 位氨基酸突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr(T)、Leu (L)、Tyr (Y) 或 Phe (F)；或
 使以 EU 编号表示的 366 位氨基酸突变成 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Ile (I)；或
15 使以 EU 编号表示的 368 位氨基酸突变成 Val (V)、Ile (I)、Met (M) 或 Ala (A)；或
 使以 EU 编号表示的 394 位氨基酸突变成 Phe (F)、Ala(A)、Ser(S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N)；或
 使以 EU 编号表示的 397 位氨基酸突变成 Thr (T)、Ile (I) 或 Leu (L)；或使
20 以 EU 编号表示的 405 位氨基酸突变成 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y)；或
 使以 EU 编号表示的 407 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Phe (F)；或
 使以 EU 编号表示的 409 位氨基酸突变成 Gln(Q)、Arg(R)或 Asp (D)；或
 使以 EU 编号表示的 411 位氨基酸突变成 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)；或
25 使以 EU 编号表示的 354 位氨基酸突变成 Tyr (Y)、Cys (C)、Phe (F) 或 Trp (W)；或
 使以 EU 编号表示的 357 位氨基酸突变成 Cys (C)；或
 使以 EU 编号表示的 347 位氨基酸突变成 Glu (E)；或
 使以 EU 编号表示的 399 位氨基酸突变成 Lys (K)。
30 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体和/或第二母本抗体的 CH3 结构域包含至少一个选自下列组合的氨基酸突变：
 使以 EU 编号表示的 356 位突变成 Lys (K)；或
 使以 EU 编号表示的 439 位突变成 Glu (E)；或
 使以 EU 编号表示的 349 位突变成 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)或 Cys (C)；或
35 使以 EU 编号表示的 351 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I) 或 Phe (F)；或

- 使以 EU 编号表示的 364 位突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L);
或
使以 EU 编号表示的 366 位突变成 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L) 或 His (H); 或
5 使以 EU 编号表示的 368 位突变成 Val (V)、Ile (I) 或 Met (M); 或
使以 EU 编号表示的 394 位突变成 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N); 或
使以 EU 编号表示的 397 位突变成 Thr (T)、Ile (I) 或 Leu (L); 或
使以 EU 编号表示的 405 位突变成 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y); 或
10 使以 EU 编号表示的 407 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L) 或 His (H);
或
使以 EU 编号表示的 409 位突变成 Gln(Q)或 Arg(R); 或
使以 EU 编号表示的 411 位突变成 Asn (N) 或 Tyr (Y); 或
使以 EU 编号表示的 354 位突变成 Tyr (Y) 或 Cys (C); 或
15 使以 EU 编号表示的 357 位突变成 Cys (C)。在一些实施方案中, 如前所述的制备多特异性抗体的方法, 其中:
1)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含第 354 位或第 357 位的氨基酸突变; 或
20 2)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变; 或
3)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 349、351、364、366、368、
25 394、397、405、407、409 和 411 位的氨基酸突变; 或
4)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变; 或
5)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变, 和所述
30 述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变; 或
6)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变; 或
7)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变, 其中, 所述第二母本抗体的
35 CH3 结构域还包含一个选自第 351、364、366、368 和 405 位的氨基酸突变; 或
8)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二

母本抗体的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

9)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 366 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变；或

10)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 347 和 357 位的氨基酸突变；或

11)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 366 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变；或

12)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 407 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 366 位的氨基酸突变；或

13)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 354 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 和 394 位的氨基酸突变；或

14)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 409 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 399 位的氨基酸突变。

15 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自第 354 或 357 位的氨基酸突变；或

20 ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

iii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 349、351、364、366、368、394、397、405、407、409 和 411 位的氨基酸突变；或

25 iv)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变；或

v)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变；或

30 vi)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变；或

vii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变，其中，所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自第 366、368 和 405 位的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：

1)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所

述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

2)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

3)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变；或

4)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439、354 和 351 位的氨基酸突变；或

5)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变；或

6)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

iii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变；或

iv)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含第 351 位的氨基酸突变。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变，其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变，其中，

使以 EU 编号表示的 351 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I)、Phe (F) 或 Met (M)；或

使以 EU 编号表示的 364 位氨基酸突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L)；或

使以 EU 编号表示的 366 位氨基酸突变成 Ser(S)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、His (H) 或 Ile (I)；或

- 使以 EU 编号表示的 368 位氨基酸突变成 Val(V)、Ile(I)、Met(M)或 Ala(A);
或
使以 EU 编号表示的 394 位氨基酸突变成 Ala(A)、Ser(S)、Cys(C)、Val(V)
或 Asn(N); 或
- 5 使以 EU 编号表示的 405 位氨基酸突变成 Leu(L) 或 Tyr(Y); 或
使以 EU 编号表示的 407 位氨基酸突变成 Phe(F); 或
使以 EU 编号表示的 409 位氨基酸突变成 Gln(Q); 或
使以 EU 编号表示的 411 位氨基酸突变成 Asn(N)、Tyr(Y) 或 Leu(L)。
在一些实施方案中, 如前所述的制备多特异性抗体的方法, 其中:
- 10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二母本
抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中, 所述第一和第二母本抗体的
CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和
411 位的氨基酸突变, 其中,
使以 EU 编号表示的 351 位突变成 Cys(C)、Val(V)、Thr(T)、Ile(I) 或
15 Phe(F); 或
使以 EU 编号表示的 364 位突变成 Ala(A)、Val(V)、Thr(T) 或 Leu(L);
或
使以 EU 编号表示的 366 位突变成 Ser(S)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L) 或
His(H); 或
- 20 使以 EU 编号表示的 368 位突变成 Val(V)、Ile(I) 或 Met(M); 或
使以 EU 编号表示的 394 位突变成 Ala(A)、Ser(S)、Cys(C)、Val(V) 或
Asn(N); 或
使以 EU 编号表示的 405 位突变成 Leu(L) 或 Tyr(Y); 或
使以 EU 编号表示的 409 位突变成 Gln(Q)或 Arg(R); 或
- 25 使以 EU 编号表示的 411 位突变成 Asn(N) 或 Tyr(Y)。在一些实施方案中,
如前所述的制备多特异性抗体的方法, 其中:
1)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述
第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或
所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第
30 二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或
2)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本
抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或
3)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二母
本抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一和第二母本抗体的
35 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、
351M、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、

368A、394A、394S、394C、394V、394N、397I、397L、405L、405Y、407C、407V、
407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变；或

4)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变；或

5)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变；或

6)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变；或

7)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、364Y、364F、366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变；或

8)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含一个选自 364Y、354F、354W 和 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含一个选自 354F、354Y 和 354W 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

9)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 405L 或 407L 的氨基酸突变；或

10)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变；或

11)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变，其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自 405L、407L 和 407H 的氨基酸突变；或

12)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变；或

13)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变；或

14)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409D 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 399K 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的制备多特异性抗体的方法, 其中:

5 i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或

ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

10 iii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、368V、368I、394A、394S、394C、394V、394N、397I、397L、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、409Q、
15 409R 和 411Y 的氨基酸突变; 或

iv)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变; 或

20 v)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

vi)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变; 或

vii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二母本抗体的 CH3
25 结构域还包含一个选自 366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的制备多特异性抗体的方法, 其中:

1)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

30 2)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

3)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变; 或

35 4)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

5)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变,其中所述第二母本抗体的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变;或

6)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中:

i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或

ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

iii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变,其中所述第一和第二母本抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变;或

iv)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中:

1)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变;或

2)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

3)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349L 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 349L 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351C 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351C 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351V 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351V 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351F 的氨基酸突变,和所述第

- 二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351F 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351M 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351M 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变；或
- 5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364T 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364L 的氨基酸突变；或
- 10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366G 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366G 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366V 的氨基酸突变；或
- 15 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366L 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变；或
- 20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366I 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368V 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变；或
- 25 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368A 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变；或
- 30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394C 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394V 的氨基酸突变；或
- 35 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394N 的氨基酸突变，和所述第

- 二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394N 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 397I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 397I 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 397L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 397L 的氨基酸突变；或
- 5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405L 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变；或
- 10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407C 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407V 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407L 的氨基酸突变；或
- 15 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407H 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407F 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407F 的氨基酸突变；或
- 20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409R 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409R 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411L 的氨基酸突变；或
- 25 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变；或
- 4)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；或
- 30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变；或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变；或
- 5)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变；或
- 35 6)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母

本抗体的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变；或

7)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 351I 的氨基酸突变；或

5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 366A 的氨基酸突变；或

10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 368I 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 405Y 的氨基酸突变；或

15 8)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

25 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

35 9)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 405L 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本

抗体的 CH3 结构域包含 407L 的氨基酸突变；或

10)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变；或

11)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变，和所述
5 所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405L 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407L 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407H 的氨基酸突变；或

12)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变，和所述
10 所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变；或

13)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变，和所述
15 所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变；或

14)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409D 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 399K 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述
20 所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变；或

ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

25 iii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349L 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 349L 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351C 的氨基酸突变；或

30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351V 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351V 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；或

35 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351F 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351F 的氨基酸突变；或

- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364T 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364T 的氨基酸突变; 或
- 5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364L 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364L 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366G 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366G 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变; 或
- 10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366V 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366V 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366L 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366L 的氨基酸突变; 或
- 15 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368V 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368V 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变; 或
- 20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或
- 25 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394C 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394V 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394V 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394N 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394N 的氨基酸突变; 或
- 30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 397I 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 397I 的氨基酸突变; 或
- 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 397L 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 397L 的氨基酸突变; 或
- 35 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405L 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405L 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407C 的氨基酸突变; 或

5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407V 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407V 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407L 的氨基酸突变; 或

10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 407H 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409R 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409R 的氨基酸突变; 或

15 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或

iv) 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变; 或

v) 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

25 vi) 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变; 或

vii) 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 366A 的氨基酸突变; 或

30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 368I 的氨基酸突变; 或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 405Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的制备多特异性抗体的方法, 其中:

35 1) 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

2) 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本

抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

3)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变；或

5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变；或

10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变；或

15 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变；或

20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变；或

4)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；或

25 5)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变；或

6)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

30 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

35 ii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

iii)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变;或

5 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变;或

10 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变;或

15 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变;或

所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变;或

20 所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变;或

iv)所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

25 在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。

30 在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变,和所述第二母本抗体的 CH3

结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域
10 包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本
15 抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 394F 的氨基酸突变。

20 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的
25 CH3 结构域仅包含 439E 和 394S 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本
30 抗体的 CH3 结构域仅包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 364Y 的氨基酸突变。

 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构

域仅包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体的 CH3 结构域仅包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二母本抗体的 CH3 结构域仅包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述第一母本抗体为第一母本单克隆抗体，所述第二母本抗体为第二母本单克隆抗体。

在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG1。在一些实施方案中，所述 CH3 结构域来源于人 IgG1。

10 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述的多特异性抗体具有至少一个经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Obscurin 链和 Titin 链所替换，或所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。在一些实施方案中，所述 Titin 链具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，所述 Obscurin 链具有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

15 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述还原条件包含但不限于添加选自 2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽(GSH)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸和β-巯基-乙醇及其化学衍生物的还原剂。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述还原剂选自 2-MEA、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、β-巯基乙醇和 TCEP。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述还原剂为 2-MEA。

25 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中所述多特异性抗体为双特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中超过 80%（例如超过 85%、超过 88%、超过 90%、超过 91%、超过 92%、超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的总产物是期望的多特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中超过 92%（例如超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的总产物是期望的多特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中超过 94%（例如超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的总产物是期望的多特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中超过 95%（例如超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的总产物是期望的多特异性抗体。

35 在一些实施方案中，如前所述的制备多特异性抗体的方法，其中：步骤 a)和步骤 b)还包含纯化所述第一母本抗体和第二母本抗体的步骤。在一些实施方案中，所述纯化方法包含但不限于蛋白 A 或蛋白 G 层析、基于抗原结合的亲和层析、基

于抗独特型抗体的亲和层析、离子交换、疏水性相互作用层析、混合式层析(诸如羟磷灰石)、固定化金属亲和层析、亲疏性吸附层析和尺寸排阻层析 (SEC) 等。

5 在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中:步骤 c)后还包含分开所述多特异性抗体和所述还原剂的步骤。在一些实施方案中,用于分开所述多特异性抗体与还原剂的方法包含但不限于下文描述的任何方法,例如透析、沉淀、层析或过滤。

10 用于分开所述多特异性抗体与所述还原剂的方法在原则上可以是任何导致或能够分开两者而不损害多特异性抗体的方法。此类方法包含但不限于透析、沉淀、层析或过滤。分开所述多特异性抗体和所述还原剂可以作为连续过程实施或者其可以作为分批过程实施。

15 在一些实施方案中,如前所述的制备多特异性抗体的方法,其中步骤 d)还包含纯化从步骤 c)获得的组合物的方法。在一些实施方案中,所述纯化方法包含但不限于蛋白 A 或蛋白 G 层析、基于抗原结合的亲和层析、基于抗独特型抗体的亲和层析、离子交换、疏水性相互作用层析、混合式层析(诸如羟磷灰石)、固定化金属亲和层析、亲疏性吸附层析和尺寸排阻层析 (SEC) 等。

20 在一些实施方案中,可以举出下述的方法:分别培养产生第一和第二母本抗体的细胞株,将该培养上清纯化后,使用纯化抗体引起 FAE(Fab 臂交换)反应的方法;分别培养产生第一和第二母本抗体的细胞株,无需纯化该培养上清而进行混合,在混合培养上清中引起 FAE 反应,然后进行纯化的方法;将产生第一母本抗体的细胞株与产生第二母本抗体的细胞株混合并进行培养,将该培养上清纯化后,使用纯化抗体引起 FAE 反应的方法;将产生第一母本抗体的细胞株与产生第二母本抗体的细胞株混合并进行培养,在该培养上清中引起 FAE 反应,然后进行纯化的方法。

25 在一些实施方案中,本披露提供多特异性抗体的制备方法,该方法包括以下 a) 至 c)的步骤:

a)分别培养产生第一和第二母本抗体的细胞株的步骤;

b)分别纯化各细胞株的培养上清得到第一和第二母本抗体,将该第一母本抗体和该第二母本抗体一起孵育以使铰链区内的半胱氨酸引起二硫键的异构化的步骤;以及

c)获得包含第一和第二母本抗体的多特异性抗体的步骤。

30 在一些实施方案中,本披露提供多特异性抗体的制备方法,该方法包括以下 a) 至 c)的步骤:

a)将产生第一母本抗体的细胞株与产生第二母本抗体的细胞株混合的步骤;

b)在该培养上清中将该第一母本抗体和该第二母本抗体一起孵育以使铰链区内的半胱氨酸引起二硫键的异构化的步骤; 以及

35 c)获得包含第一和第二母本抗体的多特异性抗体的步骤。

在一些实施方案中,本披露提供多特异性抗体的制备方法,该方法包括以下 a)

至 c) 的步骤:

a) 分别培养产生第一和第二母本抗体的细胞株的步骤;

b) 将各细胞株的培养上清混合, 将该第一母本抗体和该第二母本抗体一起孵育以使铰链区内的半胱氨酸引起二硫键的异构化的步骤; 以及

5 c) 获得包含第一和第二母本抗体的多特异性抗体的步骤。

在另一个方面, 本披露提供一种根据如前所述的方法制备的多特异性抗体。在一些实施方案中, 本披露提供一种多特异性抗体, 其包含两个 CH3 结构域的相互结合的多肽, 其中第一多肽的 CH3 结构域和第二多肽的 CH3 结构域引入氨基酸突

10 变, 以促进形成异源化的多特异性抗体, 其中所述的氨基酸突变包含至少一个选自: 第 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、397、399、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变; 其中所述第一多肽和第二多肽结合不同的抗原或表位, 所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中, 本披露提供一种多特异性抗体, 其包含两个 CH3 结构域的相互结合的多肽, 其中第一多肽的 CH3 结构域和第二多肽的 CH3 结构域引入氨基酸突变, 以促进形成异源化的多特异性抗体, 其中, 所述的氨基酸突变包含至少

15 一个选自: 第 349、351、354、356、357、364、366、368、394、397、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸突变; 其中所述第一多肽和第二多肽结合不同的抗原或表位, 所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中所述 CH3 结构域的氨基酸突变包含至少一个选自: 第 349、351、354、356、364、366、368、394、405、

20 409、411 和 439 位的氨基酸突变; 其中所述第一多肽和第二多肽结合不同的抗原或表位, 所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中 CH3 结构域的氨基酸突变包含至少一个选自下列组合的氨基酸突变:

25 使以 EU 编号表示的 356 位氨基酸突变成 Lys (K); 或

使以 EU 编号表示的 439 位氨基酸突变成 Glu (E); 或

使以 EU 编号表示的 349 位氨基酸突变成 Leu (L)、Phe (F)、Ser (S)、Cys (C)、Ala (A)、Val (V)、Thr (T) 或 Gly (G); 或

使以 EU 编号表示的 351 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile

30 (I)、Phe (F) 或 Met (M); 或

使以 EU 编号表示的 364 位氨基酸突变成 Ala (A)、Val (V)、Thr (T)、Leu (L)、Tyr (Y) 或 Phe (F); 或

使以 EU 编号表示的 366 位氨基酸突变成 Gly (G)、Ser (S)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Ile (I); 或

35 使以 EU 编号表示的 368 位氨基酸突变成 Val (V)、Ile (I)、Met (M) 或 Ala (A); 或

- 使以 EU 编号表示的 394 位氨基酸突变成 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N); 或
- 使以 EU 编号表示的 397 位氨基酸突变成 Thr (T)、Ile (I) 或 Leu (L); 或使以 EU 编号表示的 405 位氨基酸突变成 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y); 或
- 5 使以 EU 编号表示的 407 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Phe (F); 或
- 使以 EU 编号表示的 409 位氨基酸突变成 Gln(Q)或 Asp (D); 或
- 使以 EU 编号表示的 411 位氨基酸突变成 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L); 或
- 使以 EU 编号表示的 354 位氨基酸突变成 Tyr (Y)、Cys (C)、Phe (F) 或 Trp
- 10 (W); 或
- 使以 EU 编号表示的 357 位氨基酸突变成 Cys (C); 或
- 使以 EU 编号表示的 347 位氨基酸突变成 Glu (E); 或
- 使以 EU 编号表示的 399 位氨基酸突变成 Lys (K)。
- 在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中 CH3 结构域的氨基酸突
- 15 变包含至少一个选自下列组合的氨基酸突变:
- 使以 EU 编号表示的 356 位突变成 Lys (K); 或
- 使以 EU 编号表示的 439 位突变成 Glu (E); 或
- 使以 EU 编号表示的 349 位突变成 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)或 Cys (C); 或
- 使以 EU 编号表示的 351 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I) 或
- 20 Phe (F); 或
- 使以 EU 编号表示的 364 位突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L);
- 或
- 使以 EU 编号表示的 366 位突变成 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu
- (L) 或 His (H); 或
- 25 使以 EU 编号表示的 368 位突变成 Val (V)、Ile (I) 或 Met (M); 或
- 使以 EU 编号表示的 394 位突变成 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val
- (V) 或 Asn (N); 或
- 使以 EU 编号表示的 397 位突变成 Thr (T)、Ile (I) 或 Leu (L); 或
- 使以 EU 编号表示的 405 位突变成 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y); 或
- 30 使以 EU 编号表示的 407 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L) 或 His (H);
- 或
- 使以 EU 编号表示的 409 位突变成 Gln(Q)或 Arg(R); 或
- 使以 EU 编号表示的 411 位突变成 Asn (N) 或 Tyr (Y); 或
- 使以 EU 编号表示的 354 位突变成 Tyr (Y) 或 Cys (C); 或
- 35 使以 EU 编号表示的 357 位突变成 Cys (C)。
- 在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

- 1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 354 位或第 357 位的氨基酸突变; 或
- 2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变; 或
- 3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 349、351、364、366、368、394、397、405、407、409、411 位的氨基酸突变; 或
- 4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变; 或
- 5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变; 或
- 6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变; 或
- 7)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、364、366、368 和 405 位的氨基酸突变; 或
- 8)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变; 或
- 9)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 366 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变; 或
- 10)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 347 和 357 位的氨基酸突变; 或
- 11)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 366 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变; 或
- 12)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 407 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 366 位的氨基酸突变; 或
- 13)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 和 394 位的氨基酸突变; 或
- 14)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 409 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 399 位的氨基酸突变。
- 在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:
- i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第

二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 354 或 357 位的氨基酸突变; 或

ii) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变; 或

5 iii) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 349、351、364、366、368、394、397、405、407、409、411 位的氨基酸突变; 或

iv) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变; 或

v) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变; 或

vi) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变; 或

vii) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变, 其中, 所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 366、368 和 405 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

1) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变; 或

2) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变; 或

3) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变; 或

4) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439、354 和 351 位的氨基酸突变; 或

5) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变; 或

6) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

i) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变; 或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变; 或

5 iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变; 或

iv)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个相同的选自第 351 位的氨基酸突变。

10 在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、364、366、368、394、405、409、411 位的氨基酸突变, 其中,

15 使以 EU 编号表示的 351 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I)、Phe (F) 或 Met (M); 或

使以 EU 编号表示的 364 位氨基酸突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L); 或

20 使以 EU 编号表示的 366 位氨基酸突变成 Ser(S)、Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、His (H) 或 Ile (I); 或

使以 EU 编号表示的 368 位氨基酸突变成 Val(V)、Ile(I)、Met(M)或 Ala(A); 或

使以 EU 编号表示的 394 位氨基酸突变成 Ala(A)、Ser(S)、Cys(C)、Val(V) 或 Asn(N); 或

25 使以 EU 编号表示的 405 位氨基酸突变成 Leu (L) 或 Tyr (Y); 或

使以 EU 编号表示的 407 位氨基酸突变成 Phe (F); 或

使以 EU 编号表示的 409 位氨基酸突变成 Gln(Q); 或

使以 EU 编号表示的 411 位氨基酸突变成 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)。

在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中, 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、364、366、368、394、405、409、411 位的氨基酸突变, 其中,

35 使以 EU 编号表示的 351 位突变成 Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Ile (I) 或 Phe (F); 或

使以 EU 编号表示的 364 位突变成 Ala(A)、Val (V)、Thr (T) 或 Leu (L);

或

使以 EU 编号表示的 366 位突变成 Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L) 或 His (H); 或

使以 EU 编号表示的 368 位突变成 Val (V)、Ile (I) 或 Met (M); 或

5 使以 EU 编号表示的 394 位突变成 Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N); 或

使以 EU 编号表示的 405 位突变成 Leu (L) 或 Tyr (Y); 或

使以 EU 编号表示的 409 位突变成 Gln(Q)或 Arg(R); 或

使以 EU 编号表示的 411 位突变成 Asn (N) 或 Tyr (Y)。

10 在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或

15 2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、351M、
20 364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、394A、394S、394C、394V、394N、397I、397L、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变; 或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3
25 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变; 或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变; 或

30 7)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、364Y、364F、366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变; 或

8)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 364Y、354F、354W 和 354Y 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 354F、354Y 和 354W 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变;或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变;或

9)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 405L 或 407L 的氨基酸突变;或

10 10)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变;或

11)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 405L、407L 和 407H 的氨基酸突变;或

12)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变;或

13)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变;或

20 14)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409D 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 399K 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前所述的多特异性抗体,其中:

i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变;或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

30 iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变,其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 349L、351C、351V、351T、351I、351F、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、368V、368I、394A、394S、394C、394V、394N、397I、397L、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、409Q、409R 和 411Y 的氨基酸突变;或

35 iv)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3

结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变；或

v)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变；或

vi)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的
5 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变；或

vii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中：

10 1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变，和所述第二多肽的
15 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q、411Y 的氨基酸突变；或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；或

20 5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变；或

6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中：

i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

30 ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、

35 409Q、411Y 的氨基酸突变；或

iv)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第

二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中：

1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变；或

2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 349L 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351C 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351V 的氨基酸突变；或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351F 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351M 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351M 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变；或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364T 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364L 的氨基酸突变；或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366G 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366V 的氨基酸突变；或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366L 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366I 的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368V 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394V 的氨基酸突变; 或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394N 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394N 的氨基酸突变;

或所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 397I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 397I 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 397L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 397L 的氨基酸突变; 或所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407V 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407V 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407L 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407F 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409R 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409R 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411L 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或

4) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变; 或

5) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

20 6) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变; 或

7) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 366A 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 368I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405Y 的氨基酸突变; 或

8) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354Y 的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变; 或

9)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 405L 的氨基酸突变; 或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 407L 的氨基酸突变; 或

10)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变; 或

11)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405L 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407L 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407H 的氨基酸突变; 或

30 12)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

13)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变; 或

35 14)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409D 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 399K 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中：

i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变；或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

10 iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 349L 的氨基酸突变；或
所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351C 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351V 的氨基酸突变；或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351F 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364T 的氨基酸突变；或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364L 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366G 的氨基酸突变；或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366V 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366L 的氨基酸突变；或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368V 的氨基酸突变，和所述第二多

- 肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368V 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变；或
- 5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394C 的氨基酸突变；或
- 10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394V 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394N 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394N 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 397I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 397I 的氨基酸突变；或
- 15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 397L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 397L 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405L 的氨基酸突变；或
- 20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407C 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407V 的氨基酸突变；或
- 25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407L 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 407H 的氨基酸突变；或
- 30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409R 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409R 的氨基酸突变；或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变；或
- 35 iv) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第

二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变；或

v)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变；或

vi)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变；或

vii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 368I 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中：

1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或

5 4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变; 或

6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

15 在一些实施方案中, 如前所述的多特异性抗体, 其中:

i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

20 iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变, 和所述第二多

肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变；或

iv)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结

构域仅包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E 和 394S 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于 IgG1。在一些实施方案中，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于人 IgG1。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述多特异性抗体具有至少一个经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Obscurin 链和 Titin 链所替换，或所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。在一些实施方案中，所述 Titin 链具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，所述 Obscurin 链具有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在另一个方面，本披露提供一种药物组合物，其包含如前所述的多特异性抗体以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在另一个方面，本披露提供一种免疫偶联物，其包含：如前所述的多特异性抗

体和效应分子，其中所述效应分子偶联至所述多特异性抗体。在一些实施方案中，所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。

在另一个方面，本披露提供一种分离的核酸，其编码如前所述的多特异性抗体。

5 在另一个方面，本披露提供一种载体，其包含如前所述的分离的核酸。

在另一个方面，本披露提供一种宿主细胞，其包含如前所述的分离的核酸。

在另一个方面，本披露提供一种制备如前所述的多特异性抗体的方法，其包含培养如前所述的宿主细胞，以及从宿主细胞培养物中回收所述多特异性抗体。

在另一个方面，本披露提供一种制备如前所述的多特异性抗体的方法，其包含：

10 (a)将编码形成该多肽间界面等的氨基酸残基的核酸进行改变的步骤；(b)培养具有该核酸的宿主细胞以表达该多肽的步骤；(c)由该宿主细胞的培养物回收该多肽的步骤；以及(d)在还原条件下，孵育各多肽，回收所希望的多特异性抗体的步骤。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体，其中第一多肽是抗体重链，和/或第二多肽是抗体重链。

15 在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体还包含一个或多个抗体轻链。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体为双特异性抗体。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体为一种特异性结合 CCR8 和 CTLA4 的双特异性抗体。

20 在一些实施方案中，本披露提供一种特异性结合 CCR8 和 CTLA4 的双特异性抗体，其具有：一条包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的第三链，一条包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列的第四链。

在一些实施方案中，如前所述的多特异性抗体为一种特异性结合 HER2 双表位的双特异性抗体。

25 在一些实施方案中，本披露提供一种特异性结合 HER2 双表位的双特异性抗体，其具有：一条包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列的第三链，一条包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列的第四链。

30 在另一方面，本披露提供一种特异性结合 CD3、CEA 和 MUC1 的三特异性抗体，其具有：一条包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列的第一链、一条包含 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列的第二链，一条包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列的第三链，一条包含 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列的第四链。

35 在另一方面，本披露提供一种抗 CD3 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别包含 SEQ ID NO: 27 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列，和所

述轻链可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别包含SEQ ID NO: 28中的LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列。

5 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述重链可变区的HCDR1包含SEQ ID NO: 21的氨基酸序列，HCDR2包含SEQ ID NO: 22的氨基酸序列，和HCDR3包含SEQ ID NO: 23的氨基酸序列，和所述轻链可变区的LCDR1包含SEQ ID NO: 24的氨基酸序列，LCDR2包含SEQ ID NO: 25的氨基酸序列，和LCDR3包含SEQ ID NO: 26的氨基酸序列。

10 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体为人源化抗体。

15 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO: 27具有至少80%（例如至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含与SEQ ID NO: 28具有至少80%（例如至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 27的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 28的氨基酸序列。

20 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述的抗CD3抗体是抗体片段。在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、dsFv或dAb。

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述的抗CD3抗体包含重链恒定区和轻链恒定区。

25 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述重链恒定区为人IgG1重链恒定区及其变体，和所述轻链恒定区为人Lambda轻链恒定区；

在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述重链恒定区包含SEQ ID NO: 29的氨基酸序列，和所述轻链恒定区包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列。

30 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述的抗CD3抗体包含重链和轻链，其中所述重链包含与SEQ ID NO: 31具有至少80%（例如至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含与SEQ ID NO: 32具有至少80%（例如至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%）序列同一性的氨基酸序列。

35 在一些实施方案中，如前任一项所述的抗CD3抗体，其中所述重链包含SEQ ID NO: 31的氨基酸序列，和所述轻链包含SEQ ID NO: 32的氨基酸序列。

在另一方面，本披露提供一种多特异性抗体，所述多特异性抗体特异性结合人 CD3，同时再结合肿瘤相关抗原（TAA）或细胞表面抗原、受体或受体配体，所述多特异性抗体包含如前一项所述的抗 CD3 抗体。

5 在一些实施方案中，如前一项所述的多特异性抗体，其中所述肿瘤抗原是肿瘤细胞上的抗原，所述肿瘤细胞选自以下组成的组的肿瘤细胞：乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、结直肠癌（包括结肠癌和直肠癌）、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、口腔癌、鼻咽癌、食道癌、喉癌、骨癌、皮肤癌、黑色素瘤、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、脑癌、胶质母细胞瘤、甲状腺癌、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病。

10 在一些实施方案中，如前一项所述的多特异性抗体是双特异性抗体。
另一方面，本披露提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的抗 CD3 抗体，或如前一项所述的多特异性抗体，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些实施方案中，如前一项所述药物的组合物用于激活 T 细胞。在一些实施方案中，如前一项所述药物的组合物用于治疗肿瘤、自身免疫性疾病或炎症疾病。在一些实施方案中，如前一项所述药物的组合物用于治疗癌症。

15 另一方面，本披露提供分离的核酸，其编码如前一项所述的抗 CD3 抗体。
另一方面，本披露提供一种载体，其包含前述的核酸分子。
另一方面，本披露提供一种宿主细胞，其包含如前一项所述的分离的核酸。
在另一方面，本披露提供一种用于生产如前一项所述的抗 CD3 抗体，或如前一项所述的多特异性抗体的方法，所述方法包含表达如前一项所述的分离的核酸、或培养如前一项所述的宿主细胞以产生所述抗 CD3 抗体或所述多特异性抗体的步骤。

20 在另一方面，本披露提供作为药物的如前一项所述的抗 CD3 抗体，或如前一项所述的多特异性抗体，或如前一项所述的药物组合物，或如前一项所述的分离的核酸分子。在一些实施方案中，所述药物用于激活 T 细胞。在一些实施方案中，所述药物用于治疗、预防或改善疾病或病症。

25 在另一方面，本披露提供如前一项所述的抗 CD3 抗体，或如前一项所述的多特异性抗体，或如前一项所述的药物组合物，或如前一项所述的分离的核酸分子在制备激活 T 细胞的药物中的用途。

30 在另一方面，本披露提供如前一项所述的抗 CD3 抗体，或如前一项所述的多特异性抗体，或如前一项所述的药物组合物，或如前一项所述的分离的核酸分子在制备用于治疗、预防或改善疾病或病症的药物中的用途。

35 在另一方面，本披露提供一种激活 T 细胞的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前一项所述的抗 CD3 抗体，或如前一项所述的多特异性抗体，或如前一项所述的药物组合物，或如前一项所述的分离的核酸分子。在一些实施方案中，所述方法包括向受试者施用包含单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg（更优选为 1-1000mg）的如前一项所述的多特异性抗体，或如前一项

所述的药物组合物，或如前任一项所述的分离的核酸分子。

在另一方面，本披露提供一种治疗、预防或改善疾病或病症的方法。在一些实施方案中，其中所述疾病或病症为与 CD3 相关的疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病或病症选自肿瘤、自身免疫性和炎性疾病。在一些实施方案中，所述疾病或病症为癌症。在一些实施方案中，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前任一项所述的抗 CD3 抗体，或如前任一项所述的多特异性抗体，或如前任一项所述的药物组合物，或如前任一项所述的分离的核酸分子。在一些实施方案中，所述方法包括向受试者施用包含单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg（更优选为 1-1000mg）的如前任一项所述的多特异性抗体，或如前任一项所述的药物组合物，或如前任一项所述的分离的核酸分子。

附图说明

图 1A 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-F405L*CP11-K409R、Ipi-K409R*CP11-F405L、Ipi-D356K*CP11-K439E 和 Ipi-K439E*CP11-D356K 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1B 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+T366A*CP11-K439E+T366A、Ipi-D356K+Y407V*CP11-K439E+Y407V 和 Ipi-D356K+Y407L*CP11-K439E+Y407L 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1C 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+T366L*CP11-K439E+T366L、Ipi-D356K+L368V*CP11-K439E+L368V、Ipi-D356K+K409R*CP11-K439E+K409R 和 Ipi-D356K+K409Q*CP11-K439E+K409Q 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1D 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+Y349F*CP11-K439E+Y349F、Ipi-D356K+Y349L*CP11-K439E+Y349L、Ipi-D356K+L351V*CP11-K439E+L351V、Ipi-D356K+L351T*CP11-K439E+L351T、Ipi-D356K+L351I*CP11-K439E+L351I、Ipi-D356K+S364A*CP11-K439E+S364A、Ipi-D356K+T366V*CP11-K439E+T366V 和 Ipi-D356K+T411N*CP11-K439E+T411N 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1E 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+T394S*CP11-K439E+T394S、Ipi-D356K+V397M*CP11-K439E+V397M、Ipi-D356K+V397T*CP11-K439E+V397T、Ipi-D356K+F405L*CP11-K439E+F405L 和 Ipi-D356K+F405Y*CP11-K439E+F405Y 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1F 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+L351F*CP11-K439E+L351F、Ipi-D356K+S364T*CP11-K439E+S364T、Ipi-D356K+S364V*CP11-K439E+S364V、Ipi-D356K+S364L*CP11-K439E+S364L、Ipi-D356K+T394A*CP11-K439E+T394A 和 Ipi-D356K+T411Y*CP11-K439E+T411Y 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合

水平。

图 1G 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+L351C*CP11-K439E+L351C、Ipi-D356K+T366G*CP11-K439E+T366G、Ipi-D356K+T366S*CP11-K439E+T366S、Ipi-D356K+T394N*CP11-K439E+T394N、Ipi-D356K+T394C*CP11-K439E+T394C、Ipi-D356K+V397I*CP11-K439E+V397I、Ipi-D356K+Y407C*CP11-K439E+Y407C、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+E357C 和 Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1H 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-F405T*CP11-T394F、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+T366A、Ipi-Y349C*CP11-S354C+T366A、Ipi-Y349C*CP11-S354C+F405Y 和 Ipi-Y349C*CP11-E357C 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 1I 为采用流式细胞术检测重组反应产物 Ipi-D356K+T366H*CP11-K439E+T366H、Ipi-D356K+L368M*CP11-K439E+L368M、Ipi-D356K+L368I*CP11-K439E+L368I、Ipi-D356K+T394V*CP11-K439E+T394V、Ipi-D356K+V397L*CP11-K439E+V397L、Ipi-D356K+Y407H*CP11-K439E+Y407H、Ipi-D356K+Y349S*CP11-K439E+S354Y、Ipi-D356K+F405T*CP11-K439E+T394F、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L368I、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I 和 Ipi-Y349C*CP11-S354C+L368I 对 CCR8 和 CTLA4 双靶点的结合水平。

图 2A 为 Ipi-D356K*CP11-K439E 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2B 为 Ipi-F405L*CP11-K409R 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2C 为 Ipi-D356K+L351T*CP11-K439E+L351T 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2D 为 Ipi-D356K+L351I*CP11-K439E+L351I 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2E 为 Ipi-D356K+S364A*CP11-K439E+S364A 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2F 为 Ipi-D356K+T366A*CP11-K439E+T366A 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2G 为 Ipi-D356K+L368I*CP11-K439E+L368I 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2H 为 Ipi-D356K+T394A*CP11-K439E+T394A 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2I 为 Ipi-D356K+T394S*CP11-K439E+T394S 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2J 为 Ipi-D356K+F405Y*CP11-K439E+F405Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2K 为 Ipi-D356K+K409Q*CP11-K439E+K409Q 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

5 图 2L 为 Ipi-D356K+T411Y*CP11-K439E+T411Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2M 为 Ipi-D356K+Y349S*CP11-K439E+S354Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2N 为 Ipi-F405T*CP11-T394F 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的
10 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2O 为 Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2P 为 Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 Biomix 叠加图谱。

15 图 2Q 为 Ipi-Y349S*CP11-S364Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2R 为 Ipi-Y349C*CP11-S354C+S364Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 2S 为 Ipi-Y349C*CP11-S354C+S364F 的母本单克隆抗体和对应的双特异性
20 抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 3A 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-E356K+V397L*Per-K439E+V397L、Tra-E356K+V397M*Per-K439E+V397M、Tra-E356K+V397T*Per-K439E+V397T、Tra-E356K+V397I*Per-K439E+V397I、Tra-E356K+F405Y*Per-K439E+F405Y、Tra-
25 -E356K+F405L*Per-K439E+F405L、Tra-E356K+T411L*Per-K439E+T411L、Tra-E356K+T411Y*Per-K439E+T411Y 和 Tra-E356K+L351C*Per-K439E+L351C 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3B 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-E356K+T394C*Per-K439E+T394C、
30 Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+E357C、Tra-E356K+T366G*Per-K439E+T366G、Tra-E356K+T366S*Per-K439E+T366S、Tra-E356K+Y349L*Per-K439E+Y349L、Tra-E356K+L351I*Per-K439E+L351I、Tra-E356K+L351T*Per-K439E+L351T 和 Tra-E356K+L351F*Per-K439E+L351F 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3C 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-
35 -F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-E356K+T394A*Per-K439E+T394A、Tra-E356K+T394N*Per-K439E+T394N、Tra-E356K+T366V*Per-K439E+T366V、

Tra-E356K+T366A*Per-K439E+T366A、Tra-E356K+L368A*Per-K439E+L368A、Tra-E356K+Y407L*Per-K439E+Y407L、Tra-E356K+Y407V*Per-K439E+Y407V 和 Tra-Y407L*Per-T366H 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3D 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-K439E*Per-E356K、Tra-E356K*Per-K439E、Tra-E356K+Y407C*Per-K439E+Y407C、Tra-E356K+S364T*Per-K439E+S364T、Tra-E356K+T394V*Per-K439E+T394V、Tra-E356K+K409R*Per-K439E+K409R 和 Tra-E356K+K409Q*Per-K439E+K409Q 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3E 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-E356K+T366L*Per-K439E+T366L、Tra-E356K+T366I*Per-K439E+T366I、Tra-E356K+L368V*Per-K439E+L368V、Tra-E356K+Y407F*Per-K439E+Y407F、Tra-E356K+Y407H*Per-K439E+Y407H、Tra-E356K+T366H*Per-K439E+Y407H、Tra-E356K+T366H*Per-K439E+Y407L 和 Tra-F405L*Per-T366H 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3F 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-E356K+L351V*Per-K439E+L351V、Tra-E356K+S364A*Per-K439E+S364A、Tra-E356K+S364L*Per-K439E+S364L、Tra-E356K+T394S*Per-K439E+T394S、Tra-E356K+L368I*Per-K439E+L368I、Tra-E356K+L368M*Per-K439E+L368M、Tra-E356K+T366H*Per-K439E+T366H、Tra-E356K+Y407H*Per-K439E+T366H 和 Tra-E356K+Y349S*Per-K439E+S354Y 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3G 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-Y349S*Per-S354Y、Tra-F405T*Per-T394F、Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L368I、Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L351I、Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+T366A、Tra-Y349C*Per-S354C+T366A、Tra-Y349C*Per-E357C、Tra-Y349C*Per-E357C+Q347E 和 Tra-E356K+Y407L*Per-K439E+T366H 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3H 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-T366H*Per-Y407L、Tra-E356K+T366H*Per-K439E+F405L、Tra-T366H*Per-F405L、Tra-E356K+D399K*Per-K439E+K409D、Tra-E356K+K409D*Per-K439E+D399K、Tra-Y349V*Per-S354F、Tra-Y349T*Per-S354F 和 Tra-Y349S*Per-S354F 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3I 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-E356K+F405T*Per-K439E+T394F、Tra-Y349C*Per-S354C+L351I、Tra-Y349C*Per-S354C+F405Y 和 Tra-E356K+L351M*Per-K439E+L351M 对 HER2 双表位的结合能力。

图 3J 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-Y349C*Per-S354C+L368I、Tra-Y349A*Per-S354F、Tra-Y349S*Per-S354W、Tra-Y349A*Per-S354W 和 Tra-Y349G*Per-S354W 对 HER2 双表位的结合能力。

5 图 3K 为采用 Bridging ELISA 检测混合物(Tra+Per) Mix 和重组反应产物 Tra-F405L*Per-K409R、Tra-K409R*Per-F405L、Tra-Y349S*Per-S364Y、Tra-Y349C*Per-S354C+S364Y、Tra-Y349C*Per-S354C+S364F 和 Tra-F405T+S354C*Per-T394F+Y349C 对 HER2 双表位的结合能力。

图 4A 为 Tra-E356K*Per-K439E 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 H
10 PLC-IEC 叠加图谱。

图 4B 为 Tra-F405L*Per-K409R 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 H PLC-RP 叠加图谱。

图 4C 为 Tra-K409R*Per-F405L 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 H PLC-RP 叠加图谱。

15 图 4D 为 Tra-E356K+L351I*Per-K439E+L351I 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4E 为 Tra-E356K+S364A*Per-K439E+S364A 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4F 为 Tra-E356K+T366A*Per-K439E+T366A 的母本单克隆抗体和对应的双
20 特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4G 为 Tra-E356K+T394A*Per-K439E+T394A 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4H 为 Tra-E356K+T394S*Per-K439E+T394S 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

25 图 4I 为 Tra-E356K+F405Y*Per-K439E+F405Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4J 为 Tra-E356K+T411Y*Per-K439E+T411Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4K 为 Tra-E356K+Y349S *Per-K439E+S354Y 的母本单克隆抗体和对应的
30 双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4L 为 Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L351I 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 4M 为 Tra-Y349G*Per-S354W 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-RP 叠加图谱。

35 图 4N 为 Tra-Y349S*Per-S364Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 H PLC-RP 叠加图谱。

图 4O 为 Tra-Y349C*Per-S354C+S364Y 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-RP 叠加图谱。

图 4P 为 Tra-Y349C*Per-S354C+S364F 的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体的 HPLC-RP 叠加图谱。

5 图 5A 为 C-E356K+L351I*CM-K439E+L351I 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5B 为 C-E356K+S364A*CM-K439E+S364A 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

10 图 5C 为 C-E356K+T366A*CM-K439E+T366A 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5D 为 C-E356K+T394A*CM-K439E+T394A 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5E 为 C-E356K+T394S*CM-K439E+T394S 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

15 图 5F 为 C-E356K+F405Y*CM-K439E+F405Y 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5G 为 C-E356K+T411Y*CM-K439E+T411Y 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

20 图 5H 为 C-E356K+Y349S*CM-K439E+S354Y 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5I 为 C-E356K+Y349C*CM-S354C+L351I 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5J 为 C-F405T*CM-T394F 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

25 图 5K 为 C-Y349G*CM-S354W 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5L 为 C-Y349S*CM-S364Y 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

30 图 5M 为 C-Y349C*CM-S354C+S364Y 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

图 5N 为 C-Y349C*CM-S354C+S364F 的母本突变体和对应的重组反应产物的 HPLC-IEC 叠加图谱。

具体实施方式

35 术语

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

说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括
5 复数指代，除非上下文清楚表明并非如此。

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

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

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

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

术语“氨基酸突变”包括氨基酸取代（也称氨基酸替换）、缺失、插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体
25 拥有期望的特性，例如降低或对 Fc 受体的结合。氨基酸序列缺失和插入包括在多肽链的氨基端和/或羧基端的缺失和插入。具体的氨基酸突变可以是氨基酸取代。在一个实施方式中，氨基酸突变是非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种天然氨基酸的衍生物（例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、
30 高丝氨酸、5-羟赖氨酸）替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR，基因合成等。预计基因工程以外的改变氨基酸侧链基团的方法，如化学修饰也可能是可用的。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。本文中，可采用位置+氨基酸残基的方式表示特定位置的氨基酸残基，例如 356K，表示在 356 位点上的氨基酸残基为 K。D356K 则表示第 356
35 位点上的氨基酸残基由原来的 D 突变为了 K。D/E356K 则表示第 356 位点上的氨基酸残基由原来的 D 突变为了 K，或表示第 356 位点上的氨基酸残基由原来的 E

突变为了 K。应当理解，当权利要求中以位置+残基的方式限定氨基酸序列时，该位点突变前的氨基酸不对技术方案构成限制。在本文中，“Fc 区包含 356K 和 349S 的氨基酸突变”，表示 Fc 区的氨基酸突变包含第 356 位突变成赖氨酸(K)和第 349 位突变成丝氨酸(S)。

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

 术语“异源多聚体”是指由多种的多肽构成、该多肽可以彼此缔合的蛋白的多聚体。更详细而言，“异源多聚体”至少具有第一多肽和第二多肽，在此，第二多肽是下述的分子：在其氨基酸序列中与第一多肽至少 1 个氨基酸残基不同。而且，虽然没有特别限定，但该异源多聚体可以对至少两种不同的配体、抗原（或表位）、受体或底物等具有抗原结合活性。该异源多聚体除了由第一多肽和第二多肽形成的“异源二聚体”之外，还可存在其它种的多肽。即，本披露的“异源多聚体”不限于
10 异源二聚体，例如，还包含异源三聚体、异源四聚体等。

 术语“同聚体”是指，具有同一氨基酸序列的多肽同伴呈缔合的状态。

 术语“包含第一多肽同聚体的分子”或“包含第二多肽同聚体的分子”选自（包括但不限于）CH3 结构域，Fc 区，抗体，包含 CH3 结构域的融合蛋白，和与药物（肽或毒素）缀合的 Fc 区等。在一些实施方案中，所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子除了包含 Fc 区以外，还包含抗体的一个或更多个或所有其它区，即 CH1 区、VH 区、CL 区和/或 VL 区。本披露中描述“第一多肽”时，也可以指代第一多肽同聚体中的每一条第一多肽。本披露中描述“第二多肽”时，也可以指代第二多肽同聚体中的每一条第二多肽。
20

 本披露中，术语“多特异性抗体(multispecific antibody)”和“多重特异性抗体(polyspecific antibody)”意思相同，是指能够和多种不同表位进行特异性结合的抗体。即，多特异性抗体是对至少两种不同表位具有特异性的抗体，除了识别不同抗原的抗体以外，还包括识别同一抗原上的不同表位的抗体。（例如，当抗原为异源受体(heterologous receptor)时，多特异性抗体识别构成异源受体的不同结构域；或者当抗原为单体时，多特异性抗体识别单体抗原的多个位点）。通常，这种分子和两个抗原结合(双特异性抗体(bispecific antibody)，在本说明书中和“双重特异性抗体”(dual-specific antibody)意思相同)，但是可以对两种以上(例如三种)的抗原具有特异性。
25
30

 术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体）；全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。在本披露的抗体中，作为人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3、人 IgG4 恒定区，
35

基因多态性所致的多个的同种异型序列记载于 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242 中, 本披露可以是其中的任一个序列。作为人 IgG1 的序列, 以 EU 编号表示的 356-358 位的氨基酸序列可以是 DEL 也可以是 EEM, 特别是以 EU 编号表示的 356 位的氨基酸可以是 D 也可以是 E (Jefferis R, Lefranc M P. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity//MAbs. Taylor & Francis, 2009, 1(4): 332-338.)。

“天然抗体”指天然存在的免疫球蛋白分子。例如, 天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白, 由二硫键结合的两条轻链和两条重链构成。从 N 至 C 端, 每条重链具有一个可变区 (VH), 又称作可变重域、重链可变区, 接着是重链恒定区, 天然 IgG 重链恒定区通常含三个恒定域 (CH1、CH2 和 CH3)。类似地, 从 N 至 C 端, 每条轻链具有一个可变区 (VL), 又称作可变轻域, 或轻链可变域, 接着是一个恒定轻域 (轻链恒定区、CL)。

术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用, 指具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有如本文所限定的 Fc 区的重链的抗体。天然完整抗体轻链包括轻链可变区 VL 及恒定区 CL, VL 处于轻链的氨基末端, 轻链恒定区包括 κ 链及 λ 链; 重链包括可变区 VH 及恒定区 (CH1、CH2 及 CH3), VH 处于重链的氨基末端, 恒定区处于羧基末端, 其中 CH3 最接近多肽的羧基末端, 重链可属于任何同种型, 包括 IgG (包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亚型)、IgA (包括 IgA1 及 IgA2 亚型)、IgM 及 IgE。

本披露方法中使用的抗体可以是任何同种异型的。预计同种异型对 Fab-臂交换没有影响。抗体同种异型与抗体恒定区序列中特定位置处的氨基酸序列变异有关。

常见的野生型人 IgG1 重链恒定区序列如下所示:

> hIgG1-1
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO: 39

> hIgG1-2
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
5 SLSPGK

SEQ ID NO: 40

> hIgG1-3
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
10 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 41

术语“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原
表位特异性结合的抗体（包括抗体或其抗原结合片段，如单链抗体）。现有技术已
公开了各种结构的双特异性抗体，根据 IgG 分子的完整性可分为 IgG 样双特异性
抗体和抗体片段型双特异性抗体；根据抗原结合区域的数量，可分为二价、三价、
20 四价或更多价的双特异性抗体，根据结构左右是否对称，可分为对称结构双特异性
抗体和不对称结构双特异性抗体。其中，基于抗体片段的双特异性抗体，例如缺乏
Fc 片段的 Fab 片段，其通过将 2 个或多个 Fab 片段结合在一个分子中形成双特异
性抗体，其具有较低的免疫原性，且分子量小，具有较高的肿瘤组织渗透性，该类
型的典型的抗体结构如 F(ab)₂、scFv-Fab、(scFv)₂-Fab 等双特异性抗体；IgG
25 样双特异性抗体（例如具有 Fc 片段），这类抗体相对分子量较大，Fc 片段有助于
抗体后期的纯化，并提高其溶解性、稳定性，Fc 部分还可能会与受体 FcRn 结合，
增加抗体血清半衰期，典型的双特异性抗体结构模型如 KiH、CrossMAb、Triomab
quadroma、Fc Δ Adp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、
XmAb、2 : 1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、
30 DART-Fc、LP- DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)₂- CrossMAb、IgG-(scFv)
2、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、(scFv)₄-Fc、CODV-Ig、mAb2、F(ab)
4- CrossMAb 等双特异性抗体（参见 Aran F. Labrijn 等，Nature Reviews Drug
Discovery volume 18, pages585 – 608 (2019)；Chen S1 等，J Immunol Res. 2019 Feb
11；2019：4516041）。

35 术语“母本抗体”是作为一个或多个抗体片段的来源的抗体。母本抗体可以包

含天然或野生型序列。母本抗体可以包含其中一个或多个氨基酸残基由一个或多个半胱氨酸残基替换的氨基酸序列。相对于抗体的其他天然、野生型或修饰形式，母本抗体可以具有预先存在的氨基酸序列修饰(如添加、缺失和/或置换)。母本抗体可以针对目的靶抗原，例如生物学重要的多肽。母本抗体可以针对非多肽抗原(如人 CCR8 抗原；例如，专利 WO2023208182A1)。示例性母本抗体包括但不限于，对细胞表面受体及跨膜受体和肿瘤相关抗原(TAA)具有亲和力和选择性的抗体。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。在一些实施方式中，Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适 Fc 区包括人 IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3 和 IgG4 的 Fc 区。在一些实施方式中，Fc 区的边界还可以变化，例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸(根据 EU 编号系统的残基 447)或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸(根据 EU 编号系统的残基 446 和 447)。除非另有说明，Fc 区的编号规则为 EU 编号系统，又称作 EU 索引(KabatEA 等人,1991.Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)。尽管在具体的实施方案中，采用了一种编号系统(如 EU)来限定氨基酸残基，但是其他编号系统所对应的技术方案将视为等同技术方案。

Fc 区可通过用胃蛋白酶等蛋白水解酶部分消化 IgG 单克隆抗体等之后，再洗脱吸附于蛋白 A 或蛋白 G 柱上的组分而适当地获取。作为所述蛋白水解酶，通过适当设定 pH 值等的酶的反应条件，能够限制性地消化全长抗体以产生 Fab、F(ab')₂ 的酶即可，没有特别限定，例如可以示例胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等。

在本披露中，术语“Fc 区”或“Fc 域”指至少包含 CH2 域和 CH3 域的抗体区(参见例如 Kabat EA, 于 US Department of Health and Human Services, NIH publication n91-3242, Edn. 第 5 版 662,680,689(1991)。在本披露中，术语“CH2 区”或“CH2 域”意图指免疫球蛋白的 CH2 区。如此，例如人 IgG1 抗体的 CH2 区对应于依照 EU 编号系统的氨基酸 228-340。然而，CH2 区也可以是如本披露中描述的任何其它抗体同种型。

在本披露中，术语“CH3 区”、“CH3 域”或“CH3 结构域”意图指免疫球蛋白的 CH3 区。如此，例如人 IgG1 抗体的 CH3 区对应于依照 EU 编号系统的氨基酸 341-447。然而，CH3 区也可以是如本披露中描述的任何其它抗体同种型。

本披露中，多肽的缔合换而言之是指例如多个多肽区相互作用的状态。

本披露中，“调节缔合”是指调节成所需的缔合状态，更具体而言，是指使在多肽内不形成不希望的缔合。

本披露中，“界面”通常是指缔合(相互作用)时的缔合面。形成界面的氨基酸残基通常是指经受该缔合的多肽区所含的一个或多个氨基酸残基，更优选缔合时接近并参与相互作用的氨基酸残基。该相互作用具体包括：缔合时接近的氨基酸残基

之间形成氢键、静电相互作用、盐桥的情况等。

本披露中，“形成界面的氨基酸残基”详细而言是指构成界面的多肽区所含的氨基酸残基。构成界面的多肽区的例子有：抗体、配体、受体、底物等中，在其分子内或分子间担负选择性键合的多肽区。在本披露中，可以指在两个 CH3 区相互作用的界面上的氨基酸残基。

术语“Fab-臂”是指抗体的一个重链-轻链对，也可以称为半抗体。

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

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

表 1. CDR 编号系统之间的关系

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

除非另有说明，本披露实施例中的可变区和 CDR 均适用“Kabat”编号规则。尽管在具体的实施方案中，采用了 Kabat 编号规则来限定氨基酸残基，但是其他编号系统所对应技术方案将视为等同技术方案。

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

Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fd、单域抗体(sdAb,例如 VH、VL、VHH 或 V_{HH})、单链 Fab(scFab)、双抗体、线性抗体、单链抗体(例如 scFv, sc(Fv)₂)；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

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

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

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

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

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

术语“表面等离子共振”指的是通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的变化而分析实时相互作用的光学现象，例如，使用 BIAcore™ 系统(Biacore LifeSciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

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

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体的群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的，除了可能少量存在的天然突变以外。相比之下，多克隆抗

体通常包含在其可变结构域具有不同氨基酸序列的多种不同抗体，其通常特异性针对不同表位。“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。在一些实施方式中，本披露提供的抗体是单克隆抗体。

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

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

术语“能够特异性结合”、“特异性结合”或“结合”是指相比其他抗原或表位，抗体能够以更高的亲和力结合至某个抗原或其表位。通常地，抗体以约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小（例如约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 或更小）的平衡解离常数（KD）结合抗原或其表位。在一些实施方式中，抗体与抗原结合的 KD 为该抗体结合至非特异性抗原（例如 BSA、酪蛋白）的 KD 的 10% 或更低（例如 1%）。可使用已知的方法来测量 KD，例如通过 BIACORE® 表面等离子体共振测定法所测量的。然而，特异性结合至抗原或其表位的抗体不排除对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种（同源）（诸如人或猴，例如食蟹猕猴（*Macaca fascicularis*）（*cynomolgus*, cyno）、黑猩猩（*Pan troglodytes*）（*chimpanzee*, *chimp*）或狨猴（*Callithrix jacchus*）（*common marmoset*, *marmoset*）的相应抗原具有交叉反应性。

术语“Titin 链”是指 Titin 蛋白中一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Titin Ig-样 152 结构域的肽段或其功能变体，所述 Titin 链能够与 Obscurin Ig-样 1 或 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域结合形成二聚化复合物。

术语“Obscurin 链”是指 Obscurin 蛋白上一段长度为 87-117 个氨基酸的包含 Obscurin Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体，或 Obscurin-样 1 蛋白上一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Obscurin-样 Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体。

所述 Obscurin 链能够与 Titin 链结合形成二聚化复合物。本披露的 Titin 链与 Obscurin 链可用于分别替换 Fab 中的 CH1 和 CL，形成经替换的 Fab（Fab-S），该替换不影响抗体与抗原的结合（WO2021139758A1、WO2022237882A1）。

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

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

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

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

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

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

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

术语“载体”意指能够转运与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指环状双链 DNA 环，其中可以连接附加的 DNA 区段。另一种类型的载体是病毒载体，例如腺相关病毒载体（AAV 或 AAV2），其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自

主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如，非附加型哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。术语“表达载体”或“表达构建体”是指可对宿主细胞进行转化，且含有指导和/或控制（连同宿主细胞一起）与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的RNA剪接的序列。

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

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

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述的多特异性抗体与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。

术语“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”指药学配制剂中与活性成分

不同的,且对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

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

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

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

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

“有效量”一般是足以降低症状的严重程度和/或频率、消除这些症状和/或潜在病因、预防症状和/或其潜在病因出现和/或改良或改善由疾病状态引起或与其相关的损伤(例如肺病)的量。在一些实施例中,有效量是治疗有效量或预防有效量。

“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状,或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应,例如预防或延迟该疾病状态的发作(或复发),或者降低该疾病状态或相关症状的发作(或复发)可能性的量。完全治疗或预防未必在给予一个剂量之后便发生,可能在给予一系列剂量之后发生。因而,治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于多种因素变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发期望的应答的能力。有效治疗剂或治疗剂组合的示例性指标包括例如患者改善的健康状况。

示例性的异源多聚体(双特异性抗体)

本披露的双特异性抗体及其制备方法

在一个方面中，本披露提供一种通过重组反应制备双特异性抗体的方法，其包含下列步骤：

- a)提供结合第一抗原的第一母本单克隆抗体的步骤；
- 5 b)提供结合第二抗原的第二母本单克隆抗体的步骤；
- c)在还原条件下，将所述第一母本单克隆抗体和所述第二母本单克隆抗体一起孵育的步骤，所述还原条件足以容许铰链区中的链间二硫键还原；以及
- d)获得双特异性抗体的步骤，其中，

在所述第一母本单克隆抗体和/或第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域中，包含
10 至少一个选自：第 349、351、354、356、364、366、368、394、405、409、411 和 439 位的氨基酸突变；

所述第一母本单克隆抗体和第二母本单克隆抗体结合不同的抗原或表位，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：

15 1)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

2)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

20 3)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一和第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变；或

4)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中
25 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变；或

5)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变；或

30 6)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

35 ii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

iii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，所述

第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一和第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、364、366、368、394、405、409、411 位的氨基酸突变; 或

- iv) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和
5 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的制备双特异性抗体的方法, 其中:

- 1) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,
10 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

2) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

- 3) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一和第二
15 母本单克隆抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变; 或

- 4) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的
20 氨基酸突变; 或

5) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变; 或

- 6) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变; 或
25

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的制备双特异性抗体的方法, 其中:

- i) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,
30 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

ii) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

- iii) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一和第二
35 母本单克隆抗体的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q、411Y 的氨基酸突变; 或

iv)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变,其中所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中,如前所述的制备双特异性抗体的方法,其中:

1)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或

2)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

10 3)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变;或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变;或

15 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变;或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变;或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变;或

20 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变;或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变;或

25 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变;或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变;或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变;或

30 4)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变;

或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变;

35 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和

所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变；
或

5)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述
第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变；或

5 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，和所述第
二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变；或

6)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第
二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第
10 二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变，
和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变；或

ii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述
15 第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

iii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变，
和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变；或

20 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变，和
25 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变；或

30 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变，和
35 所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变；或

iv)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，

和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；
或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变；

5 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：

1)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349S 所示的氨基酸
10 突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 354Y 所示的氨基酸突变；或

2)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 405T 所示的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 394F 所示的氨基酸突变；或

3) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 351T 所示的氨基
15 酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 351T 所示的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 351I 所示的氨基酸突
变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 351I 所示的氨基酸
突变；或

20 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 364A 所示的氨基酸
突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 364A 所示的氨基酸
突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 366A 所示的氨基酸
突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 366A 所示的氨基
25 酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 Fc 区包括如 356K 和 368I 所示的氨基酸突变，和
所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 368I 所示的氨基酸突变；
或

30 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 394A 所示的氨基酸
突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 394A 所示的氨基
酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 394S 所示的氨基酸突
变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 394S 所示的氨基酸
突变；或

35 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 405Y 所示的氨基酸
突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 405Y 所示的氨基

酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 409Q 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 409Q 所示的氨基酸突变；或

5 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 411Y 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 411Y 所示的氨基酸突变；或

4)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349C 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E、354C 和 351I 所示的氨基酸突变；或

10 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349C 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E、354C 和 366A 所示的氨基酸突变；或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349C 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E、354C 和 368I 所示的氨基酸突变；或

5)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 349C 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 354C 和 364Y 所示的氨基酸突变；或

20 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 349C 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 354C 和 364F 所示的氨基酸突变；或

6)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 349S 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 364Y 所示的氨基酸突变；或

25 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 349G 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 354W 所示的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：

i)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349S 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 354Y 所示的氨基酸突变；或

30 ii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 405T 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 394F 所示的氨基酸突变；或

iii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 351T 所示的氨基酸突变，和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 351T 所示的氨基酸突变；或

35 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 351I 所示的氨基酸突

变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 351I 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 364A 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 364A 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 366A 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 366A 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 Fc 区包括如 356K 和 368I 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 368I 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 394A 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 394A 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 394S 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 394S 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 405Y 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 405Y 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 409Q 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 409Q 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 411Y 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E 和 411Y 所示的氨基酸突变; 或

iv) 所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349C 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E、354C 和 351I 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349C 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E、354C 和 366A 所示的氨基酸突变; 或

所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 356K 和 349C 所示的氨基酸突变, 和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包括如 439E、354C 和 368I 所示的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的制备双特异性抗体的方法, 其中:

- 1)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或
- 2)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或
- 5 3)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变;或
- 4)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变;或
- 5)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变;或
- 10 6)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;或
- 7)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变;
- 15 或
- 8)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变;或
- 9)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。
- 20 在一些实施方案中,如前所述的制备双特异性抗体的方法,其中:
- i)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或
- ii)所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。
- 25 在一些实施方案中,如前所述的制备双特异性抗体的方法,其中所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 351I 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。
- 在一些实施方案中,如前所述的制备双特异性抗体的方法,其中所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 364Y 的氨基酸突变。
- 30 在一些实施方案中,如前所述的制备双特异性抗体的方法,其中所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。
- 在一些实施方案中,如前所述的制备双特异性抗体的方法,其中所述第一母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 349C 的氨基酸突变,和所述第二母本单克隆抗体的 CH3 结构域仅包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。
- 35

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于 IgG1。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中所述 CH3 结构域来源于人 IgG1。

5 在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中所述双特异性抗体具有至少一个经替换的 Fab，其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Obscurin 链和 Titin 链所替换，或所述经替换的 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。在一些实施方案中，所述 Titin 链具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，所述 Obscurin 链具有如
10 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中超过 80%（例如超过 85%、超过 88%、超过 90%、超过 91%、超过 92%、超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的产物是期望的双特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中超过 92%
15 （例如超过 93%、超过 94%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的产物是期望的双特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中超过 94%（例如超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的产物是期望的双特异性抗体。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中超过 95%（例如超过 96%、超过 97%、超过 98%或超过 99%）的产物是期望的双特异性抗体。
20

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中所述还原条件包含但不限于添加选自 2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽 (GSH)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸和 β-巯基-乙醇及其化学衍生物的还原剂。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性
25 抗体的方法，其中所述还原剂选自 2-MEA、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、β-巯基乙醇和 TCEP。在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中所述还原剂为 2-MEA。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：步骤 a)和步骤 b)还包含纯化所述第一母本单克隆抗体和第二母本单克隆抗体的步骤。在一些
30 实施方案中，所述纯化方法包含但不限于蛋白 A 或蛋白 G 层析、基于抗原结合的亲和层析、基于抗独特型抗体的亲和层析、离子交换、疏水性相互作用层析、混合式层析(诸如羟磷灰石)、固定化金属亲和层析、亲疏性吸附层析和尺寸排阻层析 (SEC) 等。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：步骤 c)后还
35 包含分开所述双特异性抗体和所述还原剂的步骤。在一些实施方案中，用于分开所述双特异性抗体与还原剂的方法包含但不限于下文描述的任何方法，例如透析、沉

淀、层析或过滤。

在一些实施方案中，如前所述的制备双特异性抗体的方法，其中：步骤 d)还包含纯化从步骤 c)获得的组合物的方法。在一些实施方案中，所述纯化方法包含但不限于蛋白 A 或蛋白 G 层析、基于抗原结合的亲和层析、基于抗独特型抗体的亲和层析、离子交换、疏水性相互作用层析、混合式层析(诸如羟磷灰石)、固定化金属亲和层析、亲疏性吸附层析和尺寸排阻层析 (SEC) 等。

在另一个方面，本披露提供一种双特异性抗体，其包含两个 CH3 结构域的相互结合的多肽，其中第一多肽的 CH3 结构域和第二多肽的 CH3 结构域引入氨基酸突变，以促进形成异源化的双特异性抗体，其中所述的氨基酸突变包含至少一个选自：第 349、351、354、356、364、366、368、394、405、409、411 和 439 位的氨基酸突变；其中所述第一多肽和第二多肽结合不同的抗原或表位，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

在一些实施方案中，如前所述的双特异性抗体，其中：

1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个相同或不同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变；或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变；或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变；或

6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变。

在一些实施方案中，如前所述的双特异性抗体，其中，

i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域各还包含一个选自第 351、364、366、368、394、405、409、411 位的氨基

酸突变；或

iv)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中,如前所述的双特异性抗体,其中:

1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或

2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

10 3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变,所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变,其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还包含一个相同或不同的选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变;或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变;或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变;或

20 6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变。

在一些实施方案中,如前所述的双特异性抗体,其中:

25 i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变,所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变;或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

30 iii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变,所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变,其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351T、351I、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q、411Y 的氨基酸突变;或

iv)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变。

35 在一些实施方案中,如前所述的双特异性抗体,其中:

- 1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 Fc 区包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或
- 2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 Fc 区包含 394F 的氨基酸突变; 或
- 5 3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变; 或
- 10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变; 或
- 15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变; 或
- 20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或
- 25 4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变; 或
- 30 5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或
- 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变; 或
- 35 6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变;

优选地,

1) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

2) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

3) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或

4) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或

5) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或

6) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变; 或

7) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

8) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或

9) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中:

i) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 Fc 区包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

ii) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 Fc 区包含 394F 的氨基酸突变; 或

iii) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351T 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351T 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 364A 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 364A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366A 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 368I 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 368I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394A 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394A 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405Y 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 405Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 409Q 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 409Q 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或

iv) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 366A 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 368I 的氨基酸突变;

优选地,

i) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

20 ii) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中,

1) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

25 2) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变; 或

3) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或

30 4) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 394S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394S 的氨基酸突变; 或

5) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 411Y 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 411Y 的氨基酸突变; 或

6) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变; 或

35 7) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变; 或

8)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或

9)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364F 的氨基酸突变。

5 在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中:

i)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

ii)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变。

10 在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E 和 351I 的氨基酸突变。

在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 364Y 的氨基酸突变。

15 在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变。

20 在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述第一多肽的 CH3 结构域仅包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域仅包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变。在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于 IgG1。在一些实施方案中, 所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域来源于人 IgG1。

25 在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述双特异性抗体具有至少一个经替换的 Fab, 其包含能够形成二聚体的 Titin 链和 Obscurin 链。在一些实施方案中, 如前所述的双特异性抗体, 其中所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Obscurin 链和 Titin 链所替换, 或所述经替换的 Fab 为 Fab 原有的 CH1 和 CL 分别被 Titin 链和 Obscurin 链所替换。在一些实施方案中, 所述 Titin 链具有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列, 所述 Obscurin 链具有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

30 在另一个方面, 本披露提供一种药物组合物, 其包含如前所述的双特异性抗体以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

35 在另一个方面, 本披露提供一种免疫偶联物, 其包含: 如前所述的双特异性抗体和效应分子, 其中所述效应分子偶联至所述双特异性抗体。在一些实施方案中, 所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子, 以及其任何组合。

在另一个方面，本披露提供一种分离的核酸，其编码如前所述的双特异性抗体。

在另一个方面，本披露提供一种载体，其包含如前所述的分离的核酸。

在另一个方面，本披露提供一种宿主细胞，其包含如前所述的分离的核酸。

在另一个方面，本披露提供一种制备如前所述的双特异性抗体的方法，其包含：
5 培养如前所述的宿主细胞，以及从宿主细胞培养物中回收所述双特异性抗体。

在另一个方面，本披露提供一种制备如前所述的双特异性抗体的方法，其包含：
(a)将编码形成该多肽间界面等的氨基酸残基的核酸进行改变的步骤；(b)培养具有
该核酸的宿主细胞以表达该多肽的步骤；(c)由该宿主细胞的培养物回收该多肽的
步骤；以及(d)在还原条件下，孵育各多肽，回收所希望双特异性抗体的步骤。

10 与等电点改变技术等组合

作为本披露的进一步优选的方案，通过将改变多肽的等电点(pI 值)的氨基酸变
异导入到本披露的多肽中，可以更高纯度且有效地纯化或制备具有目标第 1~第 4
多肽的多肽多聚体(WO2007114325、US20130171095)。作为用于促进多肽缔合而导
入的氨基酸变异，还可以使用 ProteinEng.1996Jul;9(7):617-21.、
15 ProteinEngDesSel.2010Apr;23(4):195-202.、JBiolChem.2010Jun18;285(25):19637-46.、
WO2009080254、US20130195849 等中记载的、通过改变重链恒定区的 CH3 结构
域而对包含 2 种重链恒定区的多肽进行异源缔合化的方法；以及 WO2009080251、
WO2009080252、WO2009080253 等中记载的、促进重链与轻链的特定组合的缔合
化的方法等。

20 与其它恒定区和/或可变区改变技术的组合

作为本披露的非限定的实施方案，可以举出与下述的改变技术组合：以与 Fc
γ R 的结合增强为目的的恒定区改变技术(WO2013047752)。

作为本披露与其它恒定区改变技术的其它组合的方案，可以举出：与控制和补
体结合的技术的组合。作为补体，只要是形成补体级联的多肽即可使用任一种的补
25 体成分，但作为优选的补体，可以适当举出：参与调理素结合的 C1q、C1r 或 C1s
的补体成分。Fc 区对补体的结合活性高于天然型 Fc 区对补体的结合活性的 Fc 区
可以通过改变天然型 Fc 区的氨基酸来制作。在此所述的天然型 Fc 区是指，以人
IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 表示的 Fc 区。Fc 区对补体的结合活性是否高于天然型
Fc 区对补体的结合活性，这可以使用 FACS、ELISA 等已知的免疫学方法来适当
30 实施。Fc 区的“氨基酸的改变”或“氨基酸改变”包含：改变为与起始 Fc 区的氨
基酸序列不同的氨基酸序列。起始 Fc 区的修饰改变体只要在 pH 中性范围与补体
结合，可以将任一个的 Fc 区用作起始结构域。而且，将已经加入了改变的 Fc 区作
为起始 Fc 区且加入了进一步改变的 Fc 区也可以适当用作本披露的 Fc 区。起始 Fc
区是指，多肽本身、包含起始 Fc 区的组合物、或编码起始 Fc 区的氨基酸序列。在
35 起始 Fc 区中，可以包含通过在抗体的项目中概述的重组而产生的已知的 IgG 抗体
的 Fc 区。对起始 Fc 区的来源没有特别限定，可以从非人动物的任意生物或人中

获取。作为任意的生物，可以优选适当举出：选自小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猫、兔、狗、山羊、绵羊、牛、马、骆驼和非人灵长类的生物。在另外的方案中，起始 Fc 区还可以从食蟹猴、狨猴、猕猴、黑猩猩或人中获得。优选起始 Fc 区可以从人 IgG1 中获得，但不限于 IgG 的特定类型。这意味着可以将人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区适当用作起始 Fc 区。同样意味着：在本披露中，可以将来自上述的任意生物 IgG 的任意类型或亚类的 Fc 区优选用作起始 Fc 区。天然存在的 IgG 的变体或工程模型的例子记载于已知的文献 (Curr.Opin.Biotechnol.(2009)20(6),685-91、Curr.Opin.Immunol.(2008)20(4),460-470、ProteinEng.Des.Sel.(2010)23(4),195-202、WO2009086320、WO2008092117、WO2007041635、和 WO2006105338) 中，但不限于这些。

氨基酸的改变只要是具有对补体的结合活性、或提高对补体结合的结合活性，可以改变任意位置的氨基酸。抗体包含人 IgG1 的 Fc 区作为人 Fc 区时，优选包含产生对补体的结合强于人 IgG1 的起始 Fc 区的结合活性的效果的变化。作为用于改变对补体的结合活性的氨基酸，例如可以示例：在 Duncan 等人 (Nature(1988)332,738-740)、Tao 等人 (J.Exp.Med.(1993)178,661-667)、Brekke 等人 (Eur.J.Immunol.(1994)24,2542-2547)、Xu 等人 (Immunol.(1993)150,152A)、WO1994029351、WO2000042072 和 WO2011091078 等中报道的对 C1q 的结合活性得到改变的 Fc 区的氨基酸。

作为这样的可改变而增强对 C1q 的结合活性的氨基酸，例如可以举出：选自以 EU 编号表示的 231 位~238 位、318 位~337 位的至少一个以上的氨基酸。作为该氨基酸的非限定的一个例子，可以举出：选自 235 位、237 位、318 位、320 位、322 位、324 位、327 位、331 位和 333 位的至少一个以上的氨基酸。通过改变这些氨基酸，可以增强 IgG 型免疫球蛋白的 Fc 区对补体的结合。

作为本披露与其它恒定区改变技术的其它组合方案，可以举出：与酸性 pH 下的 FcRn 结合增强改变 Fc 技术 (WO2002060919、WO2004035752、WO2000042072)、中性 pH 下的 FcRn 结合增强改变 Fc 技术 (WO2011122011、WO2012133782)、抑制型 Fc γ 受体选择性结合增强技术 (WO2012115241、WO2013125667)、活性型 Fc γ 受体选择性结合增强技术 (ADCC 活性增强技术) (WO2013002362)、对类风湿因子的结合活性降低的技术 (WO2013046704) 等抗体改变技术的组合，用于调节效应子功能的 Fc 突变组合 (Liu R, Oldham R J, Teal E, et al. Fc-engineering for modulated effector functions—improving antibodies for cancer treatment[J]. Antibodies, 2020, 9(4): 64.)。

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

残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。

作为本披露与可变区改变技术的非限定的组合方案，可以举出：与 pH 依赖性
5 抗体(WO2009125825)、钙依赖性抗体(WO2012073992)等改变技术的组合。

核酸的改变

在本披露的制备方法的另一种实施方案中，本披露提供异源多聚体（例如多特异性抗体）的制备方法，该方法是使形成多肽间界面的氨基酸残基(例如，以 EU 编号表示的至少一个选自：347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、
10 397、399、405、407、409、411 和 439 位的氨基酸残基)具有变异以控制多肽间的解离和/或缔合的异源多聚体的制备方法，该制备方法包括下述的步骤：(a)将编码形成该多肽间界面等的氨基酸残基的核酸根据原核酸进行改变以控制多肽间的解离和缔合的步骤；(b)培养具有该核酸的宿主细胞以表达该多肽的步骤；(c)由该宿主细胞的培养物回收该多肽的步骤；以及(d)在还原条件下，温育各多肽，回收所希望异源多聚体的步骤。
15

而且，包含利用本披露的上述的解离和/或缔合控制方法，将编码形成该多肽间界面的氨基酸残基的核酸根据原核酸进行改变以抑制多肽间缔合的步骤的方法也是本披露的上述制备方法的优选方案之一。

在本披露的上述方法中，“改变核酸”是指改变核酸以与通过本披露中的“改变”而导入的氨基酸残基对应。更具体而言，是指将编码原(改变前)氨基酸残基的核酸改变为编码通过改变而导入的氨基酸残基的核酸。通常，是指对于原核酸进行至少 1 个碱基的插入、缺失或取代的基因操作或诱变处理，以形成编码目标氨基酸残基的密码子。即，编码原氨基酸残基的密码子被编码通过改变而导入的氨基酸残基的密码子取代。这样的核酸的改变，可以使用本领域技术人员已知的技术，例
20 如位点特异性诱变法、PCR 诱变法等适当实施。
25

而且，本披露中的核酸通常被携带(插入)到适当的载体中并导入到宿主细胞中。作为该载体，只要稳定地保持所插入的核酸即可，没有特别限定。

宿主细胞，没有特别限制，根据目的可以使用各种的宿主细胞。

为了使宿主细胞中所表达的多肽分泌到内质网的内腔、细胞周质间隙、或细胞
30 外环境中，可以将适当的分泌信号与目标多肽组合。这些信号对于目标多肽可以是内源性信号、也可以是异源信号。

关于上述制备方法中的多肽的回收，当本披露的多肽分泌到培养基时，回收培养基。当本披露的多肽在细胞内生产时，首先将该细胞溶解，然后回收多肽。

由重组细胞培养物回收本披露的多肽进行纯化时，可以使用包含硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟磷灰石层析和凝聚素层析的已知方法。
35

重组方法

异源多聚体（例如多特异性抗体）可以使用重组方法来产生。对于这些方法，提供编码异源多聚体的一个或更多个分离的核酸。

- 在一个实施方案中，本披露提供了编码如前所述的异源多聚体的分离的核酸。
- 5 此类核酸可以给自独立的编码前述的任一多肽链。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的一种或多种载体（例如表达载体）。在另一方面中，本披露提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个实施方案中，提供制备异源多聚体的方法，其中所述方法包括，在适合表达的条件下，培养包含编码所述异源多聚体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述蛋白。
- 10 为了重组产生异源多聚体，将编码蛋白的核酸分离并插入一个或更多个载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序，或者通过重组方法产生或通过化学合成获得。

用于克隆或表达编码异源多聚体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，可在细菌中产生，特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。

- 15 在表达后，可以在可溶级分中从细菌细胞糊状物分离，并且可进一步纯化。

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

测定

- 本文提供的异源多聚体可以通过本领域已知的多种测定法对其物理/化学特征
- 35 和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。在一个方面中，例如通过已知方法如流式细胞术、ELISA、蛋白印迹法、SEC、IEC、质谱等，测试本披露的异源多聚体的

活性。

治疗方法与施途径

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

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

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

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

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

制品

在本披露的另一方面中，提供一种制品，所述制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料。该制品包含容器和在容器上或与容器联合的标签或包装插页（package insert）。合适的容器包括，例如，瓶子、管形瓶、注射器、IV 溶液袋等。容器可以自各种材料诸如玻璃或塑料形成。容器装有单独或与另一种组合物组合有效治疗，预防和/或诊断疾患的组合物，并且可具有无菌的存取口（例如，

容器可以是具有由皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或管形瓶)。组合物中的至少一种活性试剂是本披露的异源多聚体。标签或包装插页指示使用该组合物是来治疗选择的病况。此外,制品可以包含:(a)其中装有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本披露的异源多聚体;和(b)其中装有组合物的第二容器,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他方面的治疗剂。本披露的该实施方案中的制品可进一步包含包装插页,所述包装插页指示所述组合物可以用于治疗特定病况。备选地,或另外地,制品可进一步包含第二(或第三)容器,所述第二(或第三)容器包含药学上可接受的缓冲液。从商业和用户立场,它可进一步包括所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

尽管实施例中所用抗体靶向特定的抗原,但是技术人员在本披露的教导下,能够理解技术效果的实现不依赖于特定的 CDR 序列,也不依赖于特定的抗原序列,而是受益于 Fc 区氨基酸(例如至少一个氨基酸选自:第 347、349、351、354、356、357、364、366、368、394、397、399、405、407、409、411 和 439 位)的突变,以促进双特异性抗体的形成。

实施例

以下实施例进一步描述本披露,这些实施例不应理解为对本披露范围的限制。本披露实施例不包括对传统方法的详细描述,未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件进行,因为这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的,并且在许多出版物中都有所描述,如 Cold Spring Harbor Laboratory 出版的《分子克隆》(Green M R, Sambrook J. Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th, 2012.),或 Springer protocols 的《Antibody engineering: methods and protocols》(Antibody engineering: methods and protocols. Humana Press, 2018.);或按照原料或商品制造厂商所建议的条件;未注明具体来源的试剂材料,为市场购买获得。

实施例 1.1: 抗 CTLA4 单克隆抗体 Ipilimumab 的来源和制备

Ipilimumab重链和轻链氨基酸序列来自Drugbank数据库(Accession Number: DB06186)

Ipilimumab重链氨基酸序列如下(SEQ ID NO: 1):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISY
DGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFD
YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ipilimumab轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 2):

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
5 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注: 斜体区域表示抗体恒定区。

由苏州金唯智生物科技有限公司合成编码上述可变区的DNA。Ipilimumab的重
链可变区 (Ipilimumab-VH) 和轻链可变区 (Ipilimumab-VL) 分别与人IgG1重链恒
定区和人Kappa轻链恒定区DNA相连, 构建成全长的Ipilimumab的重链和轻链基因,
10 分别命名为Ipilimumab-HC和Ipilimumab-LC。将上述重链和轻链基因分别克隆到表
达载体pcDNA3.4中, 利用PEI (Polyethylenimine) 将两个表达载体同时转染入
FreeStyle™ 293-F 细胞 (Thermo Fisher Scientific, 货号: R79007) 中以表达抗体。
293-F细胞在无血清培养基中培养5天, 收取细胞上清, 利用Protein A亲和层析法纯
化抗体。

15 纯化步骤描述如下: 高速离心去除细胞培养上清中杂质, 通过MabSelect SuRe
(Cytiva, 货号: 17543801) 亲和层析法捕获上清中抗体。先用0.2 M NaOH洗涤
MabSelect Sure亲和柱, 用纯水冲洗后再用PBS平衡亲和柱, 使上清流过亲和柱, 用
PBS洗涤亲和柱直至A280降至基线, 用pH 3.5的0.1 M醋酸缓冲液洗脱目的蛋白,
用1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中和抗体溶液。用超滤法适当浓缩抗体溶液, 然后利用
20 凝胶层析柱HiLoad Superdex 200 (Cytiva, 货号: 28989335) 进一步纯化抗体。用
紫外分光光度法测定抗体浓度, 过滤除菌并保存至冰箱 (4℃)。此方法用来纯化相
关单克隆抗体, 该方法也可以用来纯化本披露中的其它抗体或重组蛋白。

实施例 1.2: 抗 CCR8 单克隆抗体 CP11 的来源和制备

CP11是人源化的抗人CCR8单克隆抗体, 其重链可变区和轻链可变区序列来自
25 于专利WO2023208182A1, 人源化的重链可变区和轻链可变区分别命名为CP11-VH
和CP11-VL (SEQ ID NO: 13和14)。

CP11-VH (SEQ ID NO: 13)

EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTRYGINWIRQPPGKGLEWLGVIW
TGGDTNYNSALKSRLTISKDKSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAREGVVNYY
30 GSRYSFFDVWGQGTTVTVSS

CP11-VL (SEQ ID NO: 14)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKSPKPIWYATS
NLASGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPYTFGGGTKVEIK

由苏州金唯智生物科技有限公司合成编码上述人源化的重链可变区和轻链可
35 变区的DNA。将合成的人源化重链可变区与人IgG1重链恒定区相连, 获得全长的

人源化重链基因，命名为CP11-HC (SEQ ID NO: 3)；将人源化轻链可变区与人Kappa链恒定区相连，获得全长的人源化轻链基因，命名为CP11-LC (SEQ ID NO: 4)。将CP11-HC和CP11-LC基因分别构建到表达载体pcDNA3.4中。按照实施例1中描述的表达和纯化方法制备单克隆抗体CP11。

5 CP11重链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 3):

EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTRYGINWIRQPPGKGLEWLGVWTGG
DTNYNSALKSRLTISKDKSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAREGVVNYYSRY
SFFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
10 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFGLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
GK

15 CP11轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 4):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKSPKPIYATSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPYTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

20 注：斜体区域表示抗体恒定区。

实施例1.3：抗CTLA4和CCR8双特异性抗体的制备

为了检验双特异性抗体的重组效率，在此制备了一个抗CTLA4和CCR8的双特异性抗体。该双特异性抗体采用的技术源自专利WO2022237882A1，用来自Obscurin的结构域替代Ipilimumab的重链CH1结构域，用来自Titin的结构域替代
25 Ipilimumab的轻链CL结构域，以此来防止双特异性抗体制备过程中重链和轻链之间的错误配对。此外，使用经典的Knob-into-Hole方法促使重链之间的异源二聚化。该双特异性抗体（命名为CP11-Ip-F31）包含四条不同的多肽链，它们的氨基酸序列分别如下：

Obscurin结构域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5):

30 SGAPRFLTCPKASVSVSGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQ
DGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQVDAEA

Titin结构域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6):

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQRFHIENT
DDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

35 CP11-Ip-F31的抗CTLA4臂重链的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 7):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISY
DGNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFD
YWGQGTLLTVSSGGGGSSGAPRFLTCPKASVVS VGKDATLSSQIVGNPFPQVSW
EKDKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLG
5 LQVDAEADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFPY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 CP11-Ip-F31的抗CTLA4臂轻链的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 8):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGG
GGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQR FHI
ENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

15 CP11-Ip-F31的抗CCR8臂重链的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 9):

EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTRYGINWIRQPPGKGLEWLGVIWTGG
DTNYSALKSRITISKDKSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAREGVVNYYGSRY
SFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
20 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK
GFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25 CP11-Ip-F31的抗CCR8臂轻链的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 10):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKSPKWIYATSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPYTFGGGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30 按照上述实施例中描述的表达和纯化方法制备双特异性抗体CP11-Ip-F31。用HPLC-SEC对CP11-Ip-F31进行精细纯化, 去除没有正确组装的分子碎片, 最终获得SEC纯度超过95%的样品。用0.2- μ m滤头对该双特异性抗体样品进行过滤除菌, 并用NanoDrop微量分光光度计测定抗体的浓度。

实施例 1.4: Ipilimumab 和 CP11 突变体的制备

35 采用定点诱变 (site-directed mutagenesis) 的方法在Ipilimumab和CP11重链CH3

结构域的编码区引入基因突变，把特定位置处的氨基酸残基突变为特定氨基酸，使用Eu numbering scheme标识氨基酸残基的位置。按照实施例1中描述的表达和纯化方法，制备带有基因突变的Ipilimumab和CP11。用0.2-μm滤头对所得抗体样品进行过滤除菌，并用NanoDrop微量分光光度计测定抗体的浓度。抗体突变体的命名规则如下，示例性地，Ipilimumab-D356K+T366A表示Ipilimumab 356位的D突变成K，366位的T突变成A，其余类推，如表2所示。

表2. 母本单克隆抗体突变及对应重组反应

序号	Ipilimumab CH3 突变	CP11 CH3 突变	重组反应
1	F405L	K409R	Ipi-F405L*CP11-K409R
2	K409R	F405L	Ipi-K409R*CP11-F405L
3	D356K	K439E	Ipi-D356K*CP11-K439E
4	K439E	D356K	Ipi-K439E*CP11-D356K
5	D356K+Y349L	K439E+Y349L	Ipi-D356K+Y349L*CP11-K439E+Y349L
6	D356K+Y349F	K439E+Y349F	Ipi-D356K+Y349F*CP11-K439E+Y349F
7	D356K+L351C	K439E+L351C	Ipi-D356K+L351C*CP11-K439E+L351C
8	D356K+L351V	K439E+L351V	Ipi-D356K+L351V*CP11-K439E+L351V
9	D356K+L351T	K439E+L351T	Ipi-D356K+L351T*CP11-K439E+L351T
10	D356K+L351I	K439E+L351I	Ipi-D356K+L351I*CP11-K439E+L351I
11	D356K+L351F	K439E+L351F	Ipi-D356K+L351F*CP11-K439E+L351F
12	D356K+S364A	K439E+S364A	Ipi-D356K+S364A*CP11-K439E+S364A
13	D356K+S364V	K439E+S364V	Ipi-D356K+S364V*CP11-K439E+S364V
14	D356K+S364T	K439E+S364T	Ipi-D356K+S364T*CP11-K439E+S364T
15	D356K+S364L	K439E+S364L	Ipi-D356K+S364L*CP11-K439E+S364L
16	D356K+T366G	K439E+T366G	Ipi-D356K+T366G*CP11-K439E+T366G
17	D356K+T366S	K439E+T366S	Ipi-D356K+T366S*CP11-K439E+T366S
18	D356K+T366A	K439E+T366A	Ipi-D356K+T366A*CP11-K439E+T366A
19	D356K+T366V	K439E+T366V	Ipi-D356K+T366V*CP11-K439E+T366V
20	D356K+T366L	K439E+T366L	Ipi-D356K+T366L*CP11-K439E+T366L
21	D356K+T366H	K439E+T366H	Ipi-D356K+T366H*CP11-K439E+T366H
22	D356K+L368V	K439E+L368V	Ipi-D356K+L368V*CP11-K439E+L368V
23	D356K+L368I	K439E+L368I	Ipi-D356K+L368I*CP11-K439E+L368I
24	D356K+L368M	K439E+L368M	Ipi-D356K+L368M*CP11-K439E+L368M
25	D356K+T394A	K439E+T394A	Ipi-D356K+T394A*CP11-K439E+T394A

26	D356K+T394S	K439E+T394S	Ipi-D356K+T394S*CP11-K439E+T394S
27	D356K+T394C	K439E+T394C	Ipi-D356K+T394C*CP11-K439E+T394C
28	D356K+T394V	K439E+T394V	Ipi-D356K+T394V*CP11-K439E+T394V
29	D356K+T394N	K439E+T394N	Ipi-D356K+T394N*CP11-K439E+T394N
30	D356K+V397T	K439E+V397T	Ipi-D356K+V397T*CP11-K439E+V397T
31	D356K+V397I	K439E+V397I	Ipi-D356K+V397I*CP11-K439E+V397I
32	D356K+V397L	K439E+V397L	Ipi-D356K+V397L*CP11-K439E+V397L
33	D356K+V397M	K439E+V397M	Ipi-D356K+V397M*CP11-K439E+V397M
34	D356K+F405L	K439E+F405L	Ipi-D356K+F405L*CP11-K439E+F405L
35	D356K+F405Y	K439E+F405Y	Ipi-D356K+F405Y*CP11-K439E+F405Y
36	D356K+Y407C	K439E+Y407C	Ipi-D356K+Y407C*CP11-K439E+Y407C
37	D356K+Y407V	K439E+Y407V	Ipi-D356K+Y407V*CP11-K439E+Y407V
38	D356K+Y407L	K439E+Y407L	Ipi-D356K+Y407L*CP11-K439E+Y407L
39	D356K+Y407H	K439E+Y407H	Ipi-D356K+Y407H*CP11-K439E+Y407H
40	D356K+K409Q	K439E+K409Q	Ipi-D356K+K409Q*CP11-K439E+K409Q
41	D356K+K409R	K439E+K409R	Ipi-D356K+K409R*CP11-K439E+K409R
42	D356K+T411N	K439E+T411N	Ipi-D356K+T411N*CP11-K439E+T411N
43	D356K+T411Y	K439E+T411Y	Ipi-D356K+T411Y*CP11-K439E+T411Y
44	D356K+Y349S	K439E+S354Y	Ipi-D356K+Y349S*CP11-K439E+S354Y
45	D356K+Y349C	K439E+S354C	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C
46	D356K+Y349C	K439E+E357C	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+E357C
47	D356K+F405T	K439E+T394F	Ipi-D356K+F405T*CP11-K439E+T394F
48	D356K+Y349C	K439E+S354C+L351I	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I
49	D356K+Y349C	K439E+S354C+T366A	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+T366A
50	D356K+Y349C	K439E+S354C+L368I	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L368I
51	Y349C	S354C+T366A	Ipi-Y349C*CP11-S354C+T366A
52	Y349C	S354C+L368I	Ipi-Y349C*CP11-S354C+L368I
53	Y349C	S354C+F405Y	Ipi-Y349C*CP11-S354C+F405Y
54	Y349C	E357C	Ipi-Y349C*CP11-E357C
55	F405T	T394F	Ipi-F405T*CP11-T394F
56	Y349A	S354F	Ipi-Y349A*CP11-S354F
57	Y349S	S354F	Ipi-Y349S*CP11-S354F
58	Y349V	S354F	Ipi-Y349V*CP11-S354F
59	Y349T	S354F	Ipi-Y349T*CP11-S354F

60	Y349A	S354Y	Ipi-Y349A*CP11-S354Y
61	Y349G	S354W	Ipi-Y349G*CP11-S354W
62	Y349A	S354W	Ipi-Y349A*CP11-S354W
63	Y349S	S354W	Ipi-Y349S*CP11-S354W
64	Y349S	S364Y	Ipi-Y349S*CP11-S364Y
65	Y349C	S354C+S364Y	Ipi-Y349C*CP11-S354C+S364Y
66	Y349C	S354C+S364F	Ipi-Y349C*CP11-S354C+S364F
67	D356K+D399K	K439E+K409D	Ipi-D356K+D399K*CP11-K439E+K409D
68	D356K+K409D	K439E+D399K	Ipi-D356K+K409D*CP11-K439E+D399K

注：*表示两个单克隆抗体之间进行重组反应。

实施例1.5：抗CTLA4和CCR8抗体的重组方法

称量1700 mg 2-MEA（Sigma-Aldrich，货号/规格：30078/100G），溶解于20 mL PBS，用1M NaOH 将pH调整到7.4，此溶液中2-MEA物质的量浓度大约为750 mM。

5 用PBS把上述实施例中制备的Ipilimumab和CP11突变体的浓度分别调整到1.5 mg/mL，取0.9 mL Ipilimumab突变体跟对应的0.9 mL CP11突变体混匀，然后取0.2 mL 2-MEA母液，加入上述抗体混合物中，混匀。将该混合溶液（含Ipilimumab突变体、CP11突变体和2-MEA）放置到37 °C的水浴锅中孵育2.5 h。将混合溶液转移到Slide-A-Lyzer™ G3 Dialysis Cassettes（Thermo Fisher Scientific，货号：A52971）

10 中，在5 L的PBS中室温条件下进行透析，5小时后更换PBS，在冷库（4℃）中进行透析。第二天上午收集样品，重新测定浓度。测定各个样品以及对应的母本单克隆抗体的理化性质。

实施例1.6：抗CTLA4和CCR8双特异性抗体的重组效率

将人全长CCR8基因克隆到带有嘌呤霉素（puromycin）抗性基因的慢病毒表达载体pCDH（System Biosciences，货号：CD510B-1）中，将pCDH-CCR8和慢病毒包装载体共同转染HEK293T细胞（ATCC，货号：CRL-11268）来产生病毒颗粒。

15 用含有病毒颗粒的HEK293T细胞上清液感染CHO-K1细胞（ATCC, CCL-61），48小时后更换新鲜培养基并加入嘌呤霉素加压筛选，待细胞生长至一定密度后通过流式细胞术（Flowcytometry）测定CCR8在细胞表面的表达，通过有限稀释法进一步

20 获取过表达CCR8的单克隆细胞株，并命名为CHOK1-CCR8。用DME/F12（含10% FBS+10 μg/mL puromycin）在37℃含5% CO₂的恒温培养箱中培养CHOK1-CCR8。全长人CCR8氨基酸序列如下（SEQ ID NO：11）：

MDYTLDLSTTVTDYYPDIFSSPCDAELIQTNGKLLAVFYCLLFVFSLLGNSL
VILVLVCKKLRSITDVYLLNLALSDLLFVFSFPFQTYLLDQWVFGTVMCKVV

SGFYIIGFYSSMFFITLMSVDRYLAVVHAVYALKVVRTIRMGTTLCLAVWLTAIM
ATIPLLVFYQVASEDGVLCYSFYNNQQLKWKIFTNFKMNILGLLIPFTIFMFCYI
KILHQLKRCQNHNKTKAIRLVLVIVIASLLFWVPFNVVLFTSLHSMHILDGCSIS
QQLTYATHVTEIISFTHCCVNPVIYAFVGEKFKKHLSEIFQKSCSQIFNYLGRQMP
5 RESCEKSSSCQQHSSRSSSVDIYL

将人CTLA4胞外段（包含信号肽）与人IgG1 Fc段编码基因连接，该融合蛋白
基因克隆至表达载体中，按照上述实施例中描述的表达和纯化方法，制备带有Fc的
CTLA4融合蛋白，并命名为CTLA4-Fc。用0.2-μm滤头对所得抗体样品进行过滤除
菌，并用NanoDrop微量分光光度计测定CTLA4-Fc的浓度。用Alexa Fluor™ 488蛋
10 白标记试剂盒（Thermo Fisher Scientific，货号：A10235）对CTLA4-Fc进行标记，
荧光标记的CTLA4-Fc记作CTLA4-Fc-A488，置于4℃冰箱避光保存。

CTLA4-Fc氨基酸序列如下（SEQ ID NO：12）：
MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIA
SFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSS
15 GNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFG
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLS
20 PGK

注：斜体表示Fc结构域。
用0.25% Trypsin-EDTA消化CHOK1-CCR8使细胞不再贴壁，300 g离心5分钟收
集细胞，用含有1% BSA的PBS洗涤细胞并重悬，计数后按照每孔10万个转入圆底
96孔板中。在96孔板中用含有1% BSA的PBS梯度稀释重组反应产物、双特异性抗
25 体CP11-Ipi-F31和单克隆抗体混合物，稀释倍数为5。将梯度稀释的抗体转入上述加
有CHOK1-CCR8细胞的圆底96孔板中，样品的终浓度依次为200、40、8、1.6、0.32、
0.064、0.0128、0.00256 nM，用多道移液器将细胞和抗体溶液混合均匀，置于4℃
冰箱中孵育1小时。300g离心圆底96孔板5分钟，弃上清后用PBS洗涤细胞两遍，每
孔加入100 μL 3 μg/mL的CTLA4-Fc-A488（用含有1% BSA的PBS配制），4 ℃避光
30 孵育30分钟。300 g离心圆底96孔板5分钟，弃上清后用PBS洗涤细胞两遍，用Fix
Buffer I（BD Biosciences，货号：557870）固定细胞（室温5分钟）。300g离心圆底
96孔板5分钟，弃上清后用PBS洗涤细胞两遍，在FACS CantoII上测定细胞的荧光强
度。用Flowjo 10.9对Flowcytometry数据进行分析，用Graphpad Prism10.0对抗体浓
度和细胞荧光强度进行处理并作图。

35 图1A至图1I中，Top表示拟合曲线的高平台（high plateau），Top越大，表明结
合活性越强。Ipilimumab+CP11 mix表示单克隆抗体Ipilimumab和CP11的1:1混合物。

用流式细胞术测得的重组反应产物对CCR8和CTLA4的结合参数如表3中所示。

表3. 重组反应产物同时结合CCR8和CTLA4的能力

附图编号	对照抗体或重组反应产物	EC ₅₀ (nM)	Top
1A	CP11-Ipi-F31	3.26	130.4
	Ipi-F405L*CP11-K409R	2.85	136.4
	Ipi-K409R*CP11-F405L	1.74	112.1
	Ipi-D356K*CP11-K439E	NA	NA
	Ipi-K439E*CP11-D356K	NA	NA
1B	CP11-Ipi-F31	5.75	309.4
	Ipi-D356K+T366A*CP11-K439E+T366A	4.51	334.7
	Ipi-D356K+Y407V* CP11-K439E+Y407V	4.39	336.8
	Ipi -D356K+Y407L*CP11-K439E+Y407L	4.12	347.3
1C	CP11-Ipi-F31	7.57	349.0
	Ipi-D356K+T366L*CP11-K439E+T366L	4.64	339.3
	Ipi-D356K+L368V*CP11-K439E+L368V	5.75	380.6
	Ipi-D356K+K409R*CP11-K439E+K409R	5.05	374.4
	Ipi-D356K+K409Q* CP11-K439E+K409Q	4.76	373.6
1D	CP11-Ipi-F31	7.87	174.5
	Ipi-D356K+Y349F*CP11-K439E+Y349F	NA	NA
	Ipi-D356K+Y349L*CP11-K439E+Y349L	3.37	105.3
	Ipi-D356K+L351V*CP11-K439E+L351V	5.52	196.7
	Ipi-D356K+L351T*CP11-K439E+L351T	5.74	201.4
	Ipi-D356K+L351I*CP11-K439E+L351I	6.27	195.9
	Ipi-D356K+S364A*CP11-K439E+S364A	7.89	203.3
	Ipi-D356K+T366V*CP11-K439E+T366V	4.03	188.0
	Ipi-D356K+T411N*CP11-K439E+T411N	NA	NA
1E	CP11-Ipi-F31	7.31	198.0
	Ipi-D356K+T394S*CP11-K439E+T394S	4.64	210.7
	Ipi-D356K+V397M*CP11-K439E+V397M	5.33	177.6
	Ipi-D356K+V397T*CP11-K439E+V397T	NA	NA
	Ipi-D356K+F405L*CP11-K439E+F405L	5.59	228.3
	Ipi-D356K+F405Y*CP11-K439E+F405Y	6.10	220.0
1F	CP11-Ipi-F31	6.21	184.2

	Ipi-D356K+L351F*CP11-K439E+L351F	8.00	114.9
	Ipi-D356K+S364T*CP11-K439E+S364T	6.00	107.8
	Ipi-D356K+S364V*CP11-K439E+S364V	NA	NA
	Ipi-D356K+S364L*CP11-K439E+S364L	6.49	190.0
	Ipi-D356K+T394A*CP11-K439E+T394A	4.51	199.3
	Ipi-D356K+T411Y*CP11-K439E+T411Y	7.64	206.9
1G	CP11-Ipi-F31	7.12	231.8
	Ipi-D356K+L351C*CP11-K439E+L351C	4.08	204.9
	Ipi-D356K+T366G*CP11-K439E+T366G	5.02	243.8
	Ipi-D356K+T366S*CP11-K439E+T366S	NA	NA
	Ipi-D356K+T394N*CP11-K439E+T394N	6.53	271.7
	Ipi-D356K+T394C*CP11-K439E+T394C	2.11	93.7
	Ipi-D356K+V397I*CP11-K439E+V397I	1.98	102.3
	Ipi-D356K+Y407C*CP11-K439E+Y407C	4.60	249.4
	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+E357C	5.65	260.8
	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C	NA	NA
1H	CP11-Ipi-F31	6.89	226.2
	Ipi-F405T*CP11-T394F	6.22	265.8
	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+T366A	6.83	286.2
	Ipi-Y349C*CP11-S354C+T366A	3.85	194.1
	Ipi-Y349C*CP11-S354C+F405Y	3.45	150.0
	Ipi-Y349C*CP11-E357C	3.60	214.1
1I	CP11-Ipi-F31	6.89	226.2
	Ipi-D356K+T366H*CP11-K439E+T366H	33.00	273.6
	Ipi-D356K+L368M*CP11-K439E+L368M	NA	NA
	Ipi-D356K+L368I*CP11-K439E+L368I	5.47	259.9
	Ipi-D356K+T394V*CP11-K439E+T394V	4.35	228.6
	Ipi-D356K+V397L*CP11-K439E+V397L	3.35	180.0
	Ipi-D356K+Y407H*CP11-K439E+Y407H	4.27	222.0
	Ipi-D356K+Y349S*CP11-K439E+S354Y	4.42	244.9
	Ipi-D356K+F405T*CP11-K439E+T394F	3.85	260.0
	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L368I	4.55	265.1
	Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I	4.78	255.7

	Ipi-Y349C*CP11-S354C+L368I	3.28	175.2
--	----------------------------	------	-------

注：NA表示无法测量。

图1A所示结果显示，Ipi-F405L和CP11-K409R的重组产物Ipi-F405L*CP11-K409R（Top 136.4）能够同时结合CHO细胞表面的CCR8和荧光素标记的CTLA4，结合活性与双特异性抗体CP11-Ipi-F31（Top 130.4）相当。Ipi-K409R和CP11-F405L重组成的双特异性抗体Ipi-K409R*CP11-F405L（Top 112.1）同时结合CCR8和CTLA4的活性略弱于CP11-Ipi-F31。Ipi-D356K*CP11-K439E和Ipi-K439E*CP11-D356K的信号曲线与Ipilimumab+CP11 mix重叠，表明这两种组合在本实施例条件下不能产生双特异性抗体。

图1B所示结果显示，Ipi-D356K+T366A*CP11-K439E+T366A（Top 334.7）、Ipi-D356K+Y407V*CP11-K439E+Y407V（Top 336.8）和Ipi-D356K+Y407L*CP11-K439E+Y407L（Top 347.3）均能有效同时结合CCR8和CTLA4，结合活性均强于CP11-Ipi-F31（Top 309.4）。

图1C所示结果显示，Ipi-D356K+T366L*CP11-K439E+T366L（Top 339.3）、Ipi-D356K+L368V*CP11-K439E+L368V（Top 380.6）、Ipi-D356K+K409R*CP11-K439E+K409R（Top 374.4）和Ipi-D356K+K409Q*CP11-K439E+K409Q（Top 373.6）均能有效同时结合CCR8和CTLA4，Ipi-D356K+T366L*CP11-K439E+T366L结合活性与CP11-Ipi-F31（Top 349）相当，其余三者结合活性均强于CP11-Ipi-F31。

图1D所示结果显示，Ipi-D356K+L351V*CP11-K439E+L351V（Top 196.7）、Ipi-D356K+L351T*CP11-K439E+L351T（Top 201.4）、Ipi-D356K+L351I*CP11-K439E+L351I（Top 195.9）、Ipi-D356K+S364A*CP11-K439E+S364A（Top 203.3）和Ipi-D356K+T366V*CP11-K439E+T366V（Top 188.0）均能有效同时结合CCR8和CTLA4，结合活性均强于CP11-Ipi-F31（Top 174.5）。

图1E所示结果显示，Ipi-D356K+T394S*CP11-K439E+T394S（Top 210.7）、Ipi-D356K+V397M*CP11-K439E+V397M（Top 177.6）、Ipi-D356K+F405L*CP11-K439E+F405L（Top 228.3）和Ipi-D356K+F405Y*CP11-K439E+F405Y（Top 220.0）均能有效同时结合CCR8和CTLA4，D356K+V397M*CP11-K439E+V397M结合活性略弱于CP11-Ipi-F31（Top 198.0），其余三者结合活性强于CP11-Ipi-F31。

图1F所示结果显示，Ipi-D356K+S364L*CP11-K439E+S364L（Top 190.0）、Ipi-D356K+T394A*CP11-K439E+T394A（Top 199.3）和Ipi-D356K+T411Y*CP11-K439E+T411Y（Top 206.9）均能有效同时结合CCR8和CTLA4，结合活性均强于CP11-Ipi-F31（Top 184.2）。

图1G所示结果显示，Ipi-D356K+L351C*CP11-K439E+L351C（Top 204.9）、Ipi-D356K+T366G*CP11-K439E+T366G（Top 243.8）、Ipi-D356K+T394N*CP11-K439E+T394N（Top 271.7）、Ipi-D356K+Y407C*CP11-K439E+Y407C（Top 249.4）和Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+E357C（Top 260.8）均能有效同时结合CCR8和

CTLA4, Ipi-D356K+L351C*CP11-K439E+L351C结合活性略弱于CP11-Ipi-F31 (Top 231.8), 其余结合活性均强于CP11-Ipi-F31。

图1H所示结果显示, Ipi-F405T*CP11-T394F (Top 265.8)、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+T366A (Top 286.2) 和Ipi-Y349C*CP11-E357C (Top 214.1) 均能有效同时结合CCR8和CTLA4, Ipi-Y349C*CP11-E357C结合活性略弱于CP11-Ipi-F31 (Top 226.2), 其余结合活性均强于CP11-Ipi-F31。

图1I所示结果显示, Ipi-D356K+L368I*CP11-K439E+L368I (Top 259.9)、Ipi-D356K+T394V*CP11-K439E+T394V (Top 228.6)、Ipi-D356K+Y407H*CP11-K439E+Y407H (Top 222.0)、Ipi-D356K+Y349S*CP11-K439E+S354Y (Top 244.9)、Ipi-D356K+F405T*CP11-K439E+T394F (Top 260.0)、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L368I (Top 265.1) 和Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I (Top 255.7) 均能有效同时结合CCR8和CTLA4, Ipi-D356K+T394V*CP11-K439E+T394V结合活与CP11-Ipi-F31 (Top 226.2) 相当, 其余结合活性均强于CP11-Ipi-F31。

实施例1.7: 抗CTLA4和CCR8双特异性抗体的重组效率

本实施例中使用的理化性质分析方法说明如下。

1、高效液相色谱-尺寸排阻色谱 (High-performance liquid chromatography-size exclusion chromatography, HPLC-SEC)

抗体是高分子量蛋白质, 具有高度复杂的二级和三级结构。由于翻译后修饰、聚集和降解等变化, 抗体在生物化学和生物物理特性方面是异质的。当通过分离技术分析双特异性抗体时, 通常会观察到变体、聚集体和降解片段, 它们的存在可能会损害安全性和有效性。在生产和存储抗体的过程中容易出现聚集体、降解片段和不完整组装的分子。使用HPLC-SEC检测样品中上述杂质的含量。聚集体的分子量要大于单体, 因此相应谱峰的保留时间较短; 降解片段或不完整组装分子的分子量要小于单体, 因此相应谱峰的保留时间较长。

HPLC-SEC所用色谱仪为Waters e2695-2489。

流动相配制方法如下: 称量6.28 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、3.06 g K_2HPO_4 和22.37 g KCl, 用适量纯化水溶解, 继续加纯化水至总体积为1L, 用2M KOH溶液调节pH至6.8。色谱柱为Waters XBridge BEH 200A SEC, 规格为7.8×300 mm 3.5 μm 。进样量设定为30 μg , 流速0.5 mL/min, 洗脱时间30 分钟, 柱温30 $^{\circ}C$, 样品室温度15 $^{\circ}C$, 检测波长280 nm。

2、高效液相色谱-离子交换色谱 (High-performance liquid chromatography-ion exchange chromatography, HPLC-IEC)

许多蛋白翻译后修饰 (例如N糖基化、C末端赖氨酸残基修饰、N末端谷氨酰胺或谷氨酸环化、天冬酰胺脱酰胺化、天冬氨酸异构化和氨基酸残基氧化等) 会直接

或间接地引起抗体表面电荷的改变，导致电荷异质性的产生。基于所带电荷可对电荷变体进行分离和分析，常用的分析方法有阳离子交换色谱法（cation exchange chromatography, CEX）和阴离子交换色谱法（anion exchange chromatography, AEX）。当通过基于色谱法的方法分析时，酸性种类（acidic species）和碱性种类（basic species）基于它们相对于主峰（main peak）的保留时间来定义。酸性种类是早于CEX的主峰或晚于AEX的主峰洗脱出来的变体，而碱性种类是晚于CEX的主峰或早于AEX的主峰洗脱出来的变体。酸性种类和碱性种类所对应的谱峰分别称作酸性峰和碱性峰。在此使用HPLC-IEC分析重组反应混合物中各组分的占比，从而计算重组反应效率。

HPLC-IEC所用色谱仪为Agilent 1260 Infinity II DAD BIO-LC。

流动相A为20 mM MES pH 6.0（称量3.9048 g MES，分子量195.24 g/mol，用适量纯化水溶解，继续加纯化水至总体积为1L，用10 M NaOH 调节pH至6.0），流动相B为20 mM MES+500 mM NaCl pH 6.0（称量3.9048 g MES，和29.22 g NaCl，用适量纯化水溶解，继续加纯化水至总体积为1 L，用10 M NaOH 调节pH至6.0），两种流动相混合的比例按照预先设置的程序随时间而改变，流速0.4 mL/min。色谱柱为YMC BioPro SP-F，规格4.6×100 mm 5 μm。进样量设定为30 μg，柱温30 ℃，样品室温度15 ℃，检测波长280 nm。

3、Biomix分析方法描述如下。

Biomix测试所用色谱仪为Agilent1260DAD/Agilent 1290 UPLC DAD；流动相配制方法如下：150 mM PB (pH6.8)-称取Na₂HPO₄·12H₂O 62.01 g和NaH₂PO₄·2H₂O 19.795 g，置于2 L烧杯中，加入2000 mL超纯水，用磷酸或氢氧化钠微调pH至6.8；进样量：30 μg；色谱柱为Sepax BioMix SEC 300A，7.8×300 mm 3 μm；流速0.5 mL/min，洗脱时间30 min；柱温30 ℃，样品室温度15 ℃；检测波长280 nm。

用HPLC-SEC和IEC对上述实施例产生的母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体进行分析，测得纯度（此处，SEC纯度为主峰面积占比，IEC纯度为主峰、酸性峰和碱性峰等主要谱峰面积占比的总和）的数据汇总至表4中。

表4. 母本单克隆抗体的SEC及对应双特异性抗体的SEC和IEC纯度

母本单克隆抗体		重组反应产物	
名称	SEC (%)	SEC (%)	IEC (%)
Ipi-F405L	86.61	83.30	89.12
CP11-K409R	97.67		
Ipi-K409R	97.00	81.97	86.72
CP11-F405L	88.39		
Ipi-D356K	98.24	NA	NA

CP11-K439E	98.21		
Ipi-K439E	98.10	NA	NA
CP11-D356K	98.21		
Ipi-D356K+Y349L	98.18	73.45	76.99
CP11-K439E+Y349L	97.72		
Ipi-D356K+L351C	96.14	90.81	94.76
CP11-K439E+L351C	96.98		
Ipi-D356K+L351V	97.56	90.49	93.70
CP11-K439E+L351V	97.16		
Ipi-D356K+L351T	97.16	95.47	97.02
CP11-K439E+L351T	96.94		
Ipi-D356K+L351I	98.40	93.91	96.40
CP11-K439E+L351I	97.52		
Ipi-D356K+L351F	95.92	75.67	81.16
CP11-K439E+L351F	97.92		
Ipi-D356K+S364A	97.53	92.44	94.23
CP11-K439E+S364A	98.23		
Ipi-D356K+S364T	96.60	75.94	79.93
CP11-K439E+S364T	96.74		
Ipi-D356K+S364L	72.29	91.40	98.12
CP11-K439E+S364L	93.80		
Ipi-D356K+T366G	97.53	96.91	93.10
CP11-K439E+T366G	98.46		
Ipi-D356K+T366A	98.98	97.17	97.64
CP11-K439E+T366A	98.78		
Ipi-D356K+T366V	72.27	88.71	95.76
CP11-K439E+T366V	87.57		
Ipi-D356K+T366L	92.94	93.92	93.47
CP11-K439E+T366L	94.06		
Ipi-D356K+T366H	87.40	85.42	89.62
CP11-K439E+T366H	97.87		
Ipi-D356K+L368V	87.52	95.54	94.37
CP11-K439E+L368V	96.69		
Ipi-D356K+L368I	93.51	96.28	94.67

CP11-K439E+L368I	97.24		
Ipi-D356K+T394A	97.69	97.45	96.63
CP11-K439E+T394A	97.27		
Ipi-D356K+T394S	98.05	98.53	96.32
CP11-K439E+T394S	98.05		
Ipi-D356K+T394C	95.69	60.70	60.81
CP11-K439E+T394C	97.29		
Ipi-D356K+T394V	98.20	93.05	92.62
CP11-K439E+T394V	96.06		
Ipi-D356K+T394N	92.14	97.26	92.84
CP11-K439E+T394N	95.37		
Ipi-D356K+V397I	97.68	66.10	66.45
CP11-K439E+V397I	97.93		
Ipi-D356K+V397L	97.65	89.96	92.35
CP11-K439E+V397L	98.88		
Ipi-D356K+V397M	97.73	90.27	90.34
CP11-K439E+V397M	97.73		
Ipi-D356K+F405L	96.02	94.16	93.73
CP11-K439E+F405L	93.42		
Ipi-D356K+F405Y	96.16	97.37	95.17
CP11-K439E+F405Y	96.02		
Ipi-D356K+Y407C	80.45	96.07	94.41
CP11-K439E+Y407C	90.78		
Ipi-D356K+Y407V	84.39	95.85	97.70
CP11-K439E+Y407V	95.00		
Ipi-D356K+Y407L	81.26	94.47	96.69
CP11-K439E+Y407L	91.64		
Ipi-D356K+Y407H	41.85	85.17	86.04
CP11-K439E+Y407H	62.48		
Ipi-D356K+K409Q	95.91	95.14	96.06
CP11-K439E+K409Q	96.17		
Ipi-D356K+K409R	94.30	94.25	93.41
CP11-K439E+K409R	99.25		
Ipi-D356K+T411Y	97.92	94.68	95.23

CP11-K439E+T411Y	95.00		
Ipi-D356K+Y349S	97.59	94.24	97.37
CP11-K439E+S354Y	98.75		
Ipi-D356K+Y349C	91.36	92.10	97.21
CP11-K439E+E357C	75.69		
Ipi-D356K+F405T	59.38	92.36	96.09
CP11-K439E+T394F	93.98		
Ipi-D356K+Y349C	90.08	93.83	97.66
CP11-K439E+S354C+L351I	97.13		
Ipi-D356K+Y349C	90.08	90.49	96.94
CP11-K439E+S354C+T366A	95.02		
Ipi-D356K+Y349C	90.08	91.53	96.44
CP11-K439E+S354C+L368I	91.89		
Ipi-Y349C	95.11	84.23	89.00
CP11-S354C+T366A	97.80		
Ipi-Y349C	95.11	80.64	85.13
CP11-S354C+L368I	94.65		
Ipi-Y349C	95.11	76.22	76.78
CP11-S354C+F405Y	97.33		
Ipi-Y349C	95.11	89.09	93.11
CP11-E357C	86.74		
Ipi-F405T	91.16	92.82	95.90
CP11-T394F	98.38		
Ipi-Y349A	98.44	93.45	94.43
CP11-S354F	97.61		
Ipi-Y349S	98.86	87.42	87.60
CP11-S354F	97.61		
Ipi-Y349V	99.05	84.71	83.44
CP11-S354F	97.61		
Ipi-Y349T	98.17	85.60	85.69
CP11-S354F	97.61		
Ipi-Y349A	98.44	87.96	88.60
CP11-S354Y	97.45		
Ipi-Y349G	90.88	91.69	93.58

CP11-S354W	97.86		
Ipi-Y349A	98.44	91.41	92.54
CP11-S354W	97.86		
Ipi-Y349S	98.86	89.57	89.80
CP11-S354W	97.86		
Ipi-Y349S	98.86	94.58	96.00
CP11-S364Y	97.28		
Ipi-Y349C	96.22	92.51	94.74
CP11-S354C+S364Y	96.67		
Ipi-Y349C	96.22	92.26	95.00
CP11-S354C+S364F	97.88		
Ipi-D356K+D399K	33.70	78.32	76.10
CP11-K439E+K409D	86.09		
Ipi-D356K+K409D	92.56	91.18	94.61
CP11-K439E+D399K	86.96		

注：NA表示无法准确测得。

对图1A至图1I、表3和表4中数据进行综合分析，选择部分母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体进行HPLC-IEC图谱的叠加。选择的组合包括：Ipi-D356K*CP11-K439E（图2A）、Ipi-F405L*CP11-K409R（图2B）、Ipi-D356K+L351T*CP11-K439E+L351T（图2C）、Ipi-D356K+L351I*CP11-K439E+L351I（图2D）、Ipi-D356K+S364A*CP11-K439E+S364A（图2E）、Ipi-D356K+T366A*CP11-K439E+T366A（图2F）、Ipi-D356K+L368I*CP11-K439E+L368I（图2G）、Ipi-D356K+T394A*CP11-K439E+T394A（图2H）、Ipi-D356K+T394S*CP11-K439E+T394S（图2I）、Ipi-D356K+F405Y*CP11-K439E+F405Y（图2J）、Ipi-D356K+K409Q*CP11-K439E+K409Q（图2K）、Ipi-D356K+T411Y*CP11-K439E+T411Y（图2L）、Ipi-D356K+Y349S*CP11-K439E+S354Y（图2M）、Ipi-F405T*CP11-T394F（图2N）、Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I（图2O和2P）、Ipi-Y349S*CP11-S364Y（图2Q）、Ipi-Y349C*CP11-S354C+S364Y（图2R）和Ipi-Y349C*CP11-S354C+S364F（图2S）。图2A显示，Ipi-D356K和CP11-K439E在本实施例条件下，无法重组形成双特异性抗体。如果重组反应有双特异性抗体形成，谱图中会产生双特异性抗体所对应的新谱峰，并且母本单克隆抗体对应位置处的谱峰会相对减少，母本单克隆抗体对应谱峰面积百分比即为重组反应后的残留量。

重组反应效率计算公式为：100%-(母本单克隆抗体A对应谱峰面积百分比+母本单克隆抗体B对应谱峰面积百分比)。用于重组反应的单克隆抗体并未经过精细

纯化，会有聚集体和少量杂质存在。

表5. 通过母本单克隆抗体的残留量计算重组反应效率

母本单克隆抗体		重组反应效率 (%)	附图编号
名称	残留量 (%)		
Ipi-D356K	46.2	5.2	2A
CP11-K439E	48.6		
Ipi-F405L	4.6	90.4	2B
CP11-K409R	5.0		
Ipi-D356K+L351T	2.1	97.9	2C
CP11-K439E+L351T	0.0		
Ipi-D356K+L351I	2.7	96.5	2D
CP11-K439E+L351I	0.8		
Ipi-D356K+S364A	3.7	95.1	2E
CP11-K439E+S364A	1.2		
Ipi-D356K+T366A	1.7	97.6	2F
CP11-K439E+T366A	0.7		
Ipi-D356K+L368I	0.3	99.3	2G
CP11-K439E+L368I	0.4		
Ipi-D356K+T394A	0.7	99.3	2H
CP11-K439E+T394A	0.0		
Ipi-D356K+T394S	2.0	97.3	2I
CP11-K439E+T394S	0.7		
Ipi-D356K+F405Y	2.2	97.1	2J
CP11-K439E+F405Y	0.7		
Ipi-D356K+K409Q	2.8	96.5	2K
CP11-K439E+K409Q	0.7		
Ipi-D356K+T411Y	4.8	95.2	2L
CP11-K439E+T411Y	0.0		
Ipi-D356K+Y349S	1.8	97.6	2M
CP11-K439E+S354Y	0.6		
Ipi-F405T	1.8	97.2	2N
CP11-T394F	1.0		

Ipi-D356K+Y349C	2.1	94.1	2O+2P
CP11-K439E+S354C+L351I	3.7		
Ipi-Y349S	3.0	96.0	2Q
CP11-S364Y	1.0		
Ipi-Y349C	0.8	95.0	2R
CP11-S354C+S364Y	4.2		
Ipi-Y349C	3.0	95.0	2S
CP11-S354C+S364F	2.0		

需要注意的是，重组产生的双特异性抗体的保留时间并不一定介于两个母本单克隆抗体之间，这可能与定点突变给抗体带来的静电变化有关。

上述重组反应效率的计算结果显示（图2和表5），Ipi-D356K*CP11-K439E的重组反应效率非常低（大约5.2%），Ipi-F405L*CP11-K409R重组反应效率大约90.4%，而表5中其他组合的重组反应效率均高于94%。由于母本单抗Ipi-D356K+Y349C存在比较明显的电荷异质性，其IEC谱峰与重组产物的谱峰存在重叠（图2O），在此使用Biomix对重组反应Ipi-D356K+Y349C*CP11-K439E+S354C+L351I进行分析（结果见图2P）并计算该反应重组效率。其余反应的重组效率均通过HPLC-IEC进行分析并计算。4、质谱（Mass Spectrometry）检测抗体分子量的方法描述如下。

测定脱糖完整分子量时样品处理方法如下：取所表达抗体30 μg，冻干后加入10 μL 8 M Guanidine-HCl，70 °C水浴变性10分钟。加入90 μL蒸馏水，取30 μL加入0.8 μL PNGase F，放入37 °C水浴中孵育2小时，取0.5 μg样品测定脱糖完整分子量。测定脱糖还原分子量时样品处理方法如下：取所表达抗体30 μg，冻干后加入10 μL 8 M Guanidine-HCl，70 °C水浴变性10 分钟。加入90 μL蒸馏水，取30 μL加入0.8 μL PNGase F，放入37℃水浴中孵育2小时。再加入2 μL 0.025 M DTT，70 °C水浴中还原10分钟，取0.5 μg进行脱糖还原分子量测定。

色谱分离条件描述如下。

色谱柱为Poroshell 300SB-C8，规格5 μm 2.1*75 mm。

流动相A为0.1% HCOOH/H₂O，流动相B为0.1% HCOOH/ACN。柱温为75 °C。质谱检测条件描述如下：质谱仪为Agilent 6530 Q-TOF LC-MS，电离模式为电喷雾电离（electrospray ionization, ESI）。采集模式为1 GHz（质量范围500-5000 m/z）。干燥气温度设定为325 °C，干燥气流量10 L/min，雾化器40 psi，鞘气温度350 °C，鞘气流速12 L/min，喷雾电压500 V，毛细管电压3500 V，裂解电压为200 V，Skimmer电压65 V，Rf电压7500 V。

表6. 双特异性抗体的质谱分析结果

母本单克隆抗体		重组反应产物	
名称	理论重链/轻链 分子量	理论完整 分子量	实测重链/轻链/完整分子量
Ipi-D356K+L351T	49113/23455	145456	49108/49634/23452/23279/145460
CP11-K439E+L351T	49639/23282		
Ipi-D356K+L351I	49125/23455	145481	49120/49647/23452/23279/145484
CP11-K439E+L351I	49651/23282		
Ipi-D356K+S364A	49109/23455	145453	49105/49631/23452/23279/145453
CP11-K439E+S364A	49635/23282		
Ipi-D356K+T366A	49094/23455	145420	49098/49624/23456/23283/145430
CP11-K439E+T366A	49621/23282		
Ipi-D356K+L368I	49125/23455	145491	49118/49644/23451/23277/145483
CP11-K439E+L368I	49651/23282		
Ipi-D356K+T394A	49095/23455	145420	49091/49617/23452/23279/145433
CP11-K439E+T394A	49621/23282		
Ipi-D356K+T394S	49111/23455	145452	49108/49634/23453/23280/145460
CP11-K439E+T394S	49637/23282		
Ipi-D356K+F405Y	49141/23455	145513	49139/49664/23453/23279/145520
CP11-K439E+F405Y	49667/23282		
Ipi-D356K+K409Q	49125/23455	145480	49128/49655/23457/23284/145488
CP11-K439E+K409Q	49651/23282		
Ipi-D356K+T411Y	49187/23455	145605	49183/49709/23452/23279/145613
CP11-K439E+T411Y	49713/23282		
Ipi-D356K+Y349S	49049/23455	145481	49042/49720/23451/23277/145483
CP11-K439E+S354Y	49727/23282		
Ipi-D356K+Y349C	49065/23455	145435	49058/49660/23451/23277/145436
CP11-K439E+S354C+L351I	49667/23282		
Ipi-D356K+Y349C	49065/23455	145405	49058/49630/23451/23277/145407
CP11-K439E+S354C+T366A	49637/23282		
Ipi-D356K+Y349C	49065/23455	145437	49058/49660/23451/23277/145436
CP11-K439E+S354C+L368I	49667/23282		
Ipi-F405T	49038/23455	145439	49031/49689/23451/23277/145442
CP11-T394F	49696/23282		
Ipi-Y349S	49000/23451	145439	49001/49718/23451/23278/145438

CP11-S364Y	49718/23278		
Ipi-Y349C	49044/23451	145499	49045/49734/23451/23278/145496
CP11-S354C+S364Y	49734/23278		
Ipi-Y349C	49044/23451	145483	49045/49719/23451/23278/145479
CP11-S354C+S364F	49718/23278		

注：本表中的理论重链、轻链和完整分子量是考虑蛋白的翻译后修饰和氧化还原状态后通过软件计算得到的理论数值。因此，不同实验条件下相同轻链的理论分子量可能不相同。

表6结果显示，上述组合产生的双特异性抗体的理论重链、轻链、完整分子量与质谱测得的实际重链、轻链、完整分子量非常相近，这表明双特异性抗体分子的重组和结构符合预期。重组样品的质谱图中没有出现母本单克隆抗体对应的谱峰，表明上述重组反应进行相对彻底。

实施例 2.1: 抗 HER2 单克隆抗体 Trastuzumab 和 Pertuzumab 的来源和制备

Trastuzumab 和 Pertuzumab 重链和轻链氨基酸序列来自 Inxight Drugs 数据库 (Trastuzumab Entry: P188ANX8CK; Pertuzumab Entry: K16AIQ8CTM)。

10 Trastuzumab 重链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 15):
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG DGFYAM
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
15 CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Trastuzumab 轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 16):
20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
Pertuzumab 重链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 17):
25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADV N
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Pertuzumab轻链氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 18):

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注: 斜体区域表示抗体恒定区。

10 由苏州金唯智生物科技有限公司合成编码上述可变区的DNA。
Trastuzumab/Pertuzumab的重链可变区(Trastuzumab-VH/Pertuzumab-VH)和轻链可
变区(Trastuzumab-VL/Pertuzumab-VL)分别与人IgG1重链恒定区和人Kappa轻链
恒定区DNA相连, 构建成全长的Trastuzumab/Pertuzumab的重链和轻链基因, 分别
命名为Trastuzumab-HC/Pertuzumab-HC和Trastuzumab-LC/Pertuzumab-LC。将上述
15 重链和轻链基因分别克隆到表达载体pcDNA3.4中, 利用PEI (Polyethylenimine) 将
两个表达载体同时转染入Expi293F™ 细胞 (Thermo Fisher Scientific, 货号: A14527)
中以表达抗体。293-F细胞在无血清培养基中培养5天, 收取细胞上清, 利用Protein
A亲和层析法纯化抗体。

纯化步骤描述如下: 高速离心去除细胞培养上清中杂质, 通过MabSelect SuRe
20 (Cytiva, 货号: 17543801) 亲和层析法捕获上清中抗体。先用0.2 M NaOH洗涤
MabSelect Sure亲和柱, 用纯水冲洗后再用PBS平衡亲和柱, 使上清流过亲和柱, 用
PBS洗涤亲和柱直至A280降至基线, 用pH 3.5的0.1 M醋酸缓冲液洗脱目的蛋白,
用1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中和抗体溶液。用超滤法适当浓缩抗体溶液, 然后利用
凝胶层析柱HiLoad Superdex 200 (Cytiva, 货号: 28989335) 进一步纯化抗体。用
25 紫外分光光度法测定抗体浓度, 过滤除菌并保存至冰箱(4℃)。此方法用来纯化相
关单克隆抗体, 该方法也可以用来纯化本披露中的其它抗体或重组蛋白。

实施例 2.2: Trastuzumab 和 Pertuzumab 突变体的制备

采用定点诱变(site-directed mutagenesis)的方法在Trastuzumab和Pertuzumab重
链CH3结构域的编码区引入基因突变, 把特定位置处的氨基酸残基突变为特定氨基
30 酸, 使用Eu numbering scheme标识氨基酸残基的位置。按照实施例8中描述的表
达和纯化方法, 制备带有基因突变的Trastuzumab和Pertuzumab。用0.2-μm滤头对所得
抗体样品进行过滤除菌, 并用NanoDrop微量分光光度计测定抗体的浓度。抗体突
变体的命名规则如下, 示例性地, Trastuzumab-E356K+T366A表示Trastuzuamb 356
位的E突变成K, 366位的T突变成A, 其余类推, 如表7所示。重组反应中将
35 Trastuzuamb和Pertuzumab分别简写为Tra和Per。

表7. 母本单克隆抗体突变及对应重组反应

序号	Trastuzumab CH3 突变	Pertuzumab CH3 突变	重组反应
1	F405L	K409R	Tra-F405L*Per-K409R
2	K409R	F405L	Tra-K409R*Per-F405L
3	E356K	K439E	Tra-E356K*Per-K439E
4	K439E	E356K	Tra-K439E*Per-E356K
5	E356K+Y349L	K439E+Y349L	Tra-E356K+Y349L*Per-K439E+Y349L
6	E356K+L351C	K439E+L351C	Tra-E356K+L351C*Per-K439E+L351C
7	E356K+L351V	K439E+L351V	Tra-E356K+L351V*Per-K439E+L351V
8	E356K+L351T	K439E+L351T	Tra-E356K+L351T*Per-K439E+L351T
9	E356K+L351I	K439E+L351I	Tra-E356K+L351I*Per-K439E+L351I
10	E356K+L351M	K439E+L351M	Tra-E356K+L351M*Per-K439E+L351M
11	E356K+L351F	K439E+L351F	Tra-E356K+L351F*Per-K439E+L351F
12	E356K+S364A	K439E+S364A	Tra-E356K+S364A*Per-K439E+S364A
13	E356K+S364T	K439E+S364T	Tra-E356K+S364T*Per-K439E+S364T
14	E356K+S364L	K439E+S364L	Tra-E356K+S364L*Per-K439E+S364L
15	E356K+T366G	K439E+T366G	Tra-E356K+T366G*Per-K439E+T366G
16	E356K+T366A	K439E+T366A	Tra-E356K+T366A*Per-K439E+T366A
17	E356K+T366S	K439E+T366S	Tra-E356K+T366S*Per-K439E+T366S
18	E356K+T366V	K439E+T366V	Tra-E356K+T366V*Per-K439E+T366V
19	E356K+T366L	K439E+T366L	Tra-E356K+T366L*Per-K439E+T366L
20	E356K+T366I	K439E+T366I	Tra-E356K+T366I*Per-K439E+T366I
21	E356K+T366H	K439E+T366H	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+T366H
22	E356K+L368A	K439E+L368A	Tra-E356K+L368A*Per-K439E+L368A
23	E356K+L368V	K439E+L368V	Tra-E356K+L368V*Per-K439E+L368V
24	E356K+L368I	K439E+L368I	Tra-E356K+L368I*Per-K439E+L368I
25	E356K+L368M	K439E+L368M	Tra-E356K+L368M*Per-K439E+L368M
26	E356K+T394A	K439E+T394A	Tra-E356K+T394A*Per-K439E+T394A
27	E356K+T394S	K439E+T394S	Tra-E356K+T394S*Per-K439E+T394S
28	E356K+T394C	K439E+T394C	Tra-E356K+T394C*Per-K439E+T394C
29	E356K+T394V	K439E+T394V	Tra-E356K+T394V*Per-K439E+T394V
30	E356K+T394N	K439E+T394N	Tra-E356K+T394N*Per-K439E+T394N
31	E356K+V397T	K439E+V397T	Tra-E356K+V397T*Per-K439E+V397T

32	E356K+V397L	K439E+V397L	Tra-E356K+V397L*Per-K439E+V397L
33	E356K+V397I	K439E+V397I	Tra-E356K+V397I*Per-K439E+V397I
34	E356K+V397M	K439E+V397M	Tra-E356K+V397M*Per-K439E+V397M
35	E356K+F405L	K439E+F405L	Tra-E356K+F405L*Per-K439E+F405L
36	E356K+F405Y	K439E+F405Y	Tra-E356K+F405Y*Per-K439E+F405Y
37	E356K+Y407C	K439E+Y407C	Tra-E356K+Y407C*Per-K439E+Y407C
38	E356K+Y407V	K439E+Y407V	Tra-E356K+Y407V*Per-K439E+Y407V
39	E356K+Y407L	K439E+Y407L	Tra-E356K+Y407L*Per-K439E+Y407L
40	E356K+Y407H	K439E+Y407H	Tra-E356K+Y407H*Per-K439E+Y407H
41	E356K+Y407F	K439E+Y407F	Tra-E356K+Y407F*Per-K439E+Y407F
42	E356K+K409Q	K439E+K409Q	Tra-E356K+K409Q* Per-K439E+K409Q
43	E356K+K409R	K439E+K409R	Tra-E356K+K409R*Per-K439E+K409R
44	E356K+T411L	K439E+T411L	Tra-E356K+T411L*Per-K439E+T411L
45	E356K+T411Y	K439E+T411Y	Tra-E356K+T411Y*Per-K439E+T411Y
46	E356K+Y349S	K439E+S354Y	Tra-E356K+Y349S*Per-K439E+S354Y
47	E356K+Y349C	K439E+E357C	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+E357C
48	E356K+T366H	K439E+F405L	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+F405L
49	E356K+T366H	K439E+Y407L	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+Y407L
50	E356K+T366H	K439E+Y407H	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+Y407H
51	E356K+F405T	K439E+T394F	Tra-E356K+F405T*Per-K439E+T394F
52	E356K+Y407L	K439E+T366H	Tra-E356K+Y407L*Per-K439E+T366H
53	E356K+Y407H	K439E+T366H	Tra-E356K+Y407H*Per-K439E+T366H
54	E356K+Y349C	K439E+S354C+L351I	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L351I
55	E356K+Y349C	K439E+S354C+T366A	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+T366A
56	E356K+Y349C	K439E+S354C+L368I	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L368I
57	Y349A	S354F	Tra-Y349A*Per-S354F
58	Y349S	S354F	Tra-Y349S*Per-S354F
59	Y349S	S354Y	Tra-Y349S*Per-S354Y
60	Y349V	S354F	Tra-Y349V*Per-S354F
61	Y349T	S354F	Tra-Y349T*Per-S354F
62	Y349G	S354W	Tra-Y349G*Per-S354W
63	Y349A	S354W	Tra-Y349A*Per-S354W
64	Y349S	S354W	Tra-Y349S*Per-S354W
65	Y349S	S364Y	Tra-Y349S*Per-S364Y

66	Y349C	E357C	Tra-Y349C*Per-E357C
67	Y349C	E357C+Q347E	Tra-Y349C*Per-E357C+Q347E
68	Y349C	S354C+L351I	Tra-Y349C*Per-S354C+L351I
69	Y349C	S354C+S364Y	Tra-Y349C*Per-S354C+S364Y
70	Y349C	S354C+S364F	Tra-Y349C*Per-S354C+S364F
71	Y349C	S354C+T366A	Tra-Y349C*Per-S354C+T366A
72	Y349C	S354C+L368I	Tra-Y349C*Per-S354C+L368I
73	Y349C	S354C+F405Y	Tra-Y349C*Per-S354C+F405Y
74	T366H	F405L	Tra-T366H*Per-F405L
75	T366H	Y407L	Tra-T366H*Per-Y407L
76	F405T	T394F	Tra-F405T*Per-T394F
77	F405L	T366H	Tra-F405L*Per-T366H
78	Y407L	T366H	Tra-Y407L*Per-T366H
79	F405T+S354C	T394F+Y349C	Tra-F405T+S354C*Per-T394F+Y349C
80	E356K+D399K	K439E+K409D	Tra-E356K+D399K*Per-K439E+K409D
81	E356K+K409D	K439E+D399K	Tra-E356K+K409D*Per-K439E+D399K

注：*表示两个单克隆抗体之间进行重组反应。

实施例2.3：抗HER2双表位双特异性抗体的重组方法

- 称量1700 mg 2-MEA（Sigma-Aldrich，货号/规格：30078/100G），溶解于20 mL PBS，用1M NaOH 将pH调整到7.4，此溶液中2-MEA物质的量浓度大约为750 mM。
- 5 用PBS把上述实施例中制备的Trastuzumab和Pertuzumab突变体的浓度分别调整到相同的物质的量浓度（0.5-50mg/mL），取等体积的Trastuzumab突变体跟对应Pertuzumab突变体混匀，然后取适量2-MEA母液，加入上述抗体混合物中，混匀，使2-MEA终浓度为75 mM。将该混合溶液（含Trastuzumab突变体、Pertuzumab突变体和2-MEA）放置到37 °C的水浴锅中孵育2.5 h。将混合溶液转移到Slide-A-Lyzer™
- 10 G3 Dialysis Cassettes（Thermo Fisher Scientific，货号: A52971）中，在5 L的PBS中室温条件下进行透析，5小时后更换PBS，在冷库（4℃）中进行透析。第二天上午收集样品，重新测定浓度。测定各个样品以及对应的母本单克隆抗体的理化性质。

实施例2.4：抗HER2双表位双特异性抗体的重组效率

- Trastuzumab和Pertuzumab分别结合HER2胞外段的结构域4和2，基于这两个单
- 15 克隆抗体可以制备成抗HER2双表位双特异性抗体（参考文献：Weisser N E, Sanches M, Escobar-Cabrera E, et al. An anti-HER2 biparatopic antibody that induces unique HER2 clustering and complement-dependent cytotoxicity[J]. Nature Communications,

2023, 14(1): 1394.)。

该实施例中使用的Bridging ELISA说明如下：用HER2胞外段结构域1-3对应的重组蛋白（购自ACROBiosystems，Cat: HE2-H52H9）包被微孔板，用封闭液（封闭液为含有1%牛血清白蛋白和0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液）处理微孔板。将待测抗体进行梯度稀释，然后转移到上述微孔板中，室温孵育半小时。洗板后加入适度稀释的Biotin标记的HER2胞外段结构域4对应的重组蛋白（购自Sino Biological，Cat: 10004-H08H4-B），室温孵育半小时。洗板后加入适度稀释的Streptavidin-Peroxidase（购自Sigma，Cat: S2438），室温孵育半小时。洗板后每孔加入100 μL以TMB（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine）为底物的显色液，室温孵育1-5min。加50 μL终止液（2M H₂SO₄）终止反应。Microplate reader（VERSA max）测定OD450。用GraphPad Prism10进行作图和数据分析，并计算EC₅₀。理论上，单克隆抗体或单克隆抗体的混合物不能同时结合该实验中的HER2胞外段的结构域2和4。

图3A至图3K中，Top表示拟合曲线的高平台（high plateau），Top越大，EC₅₀越小，表明结合活性越强。(Tra+Per) Mix为单克隆抗体Trastuzumab和Pertuzumab按照物质的量之比1:1的混合物，未进行重组反应。用Bridging ELISA测得的重组反应产物对HER2双表位的结合参数如表8中所示。

表8. 重组反应产物同时结合HER2双表位的能力

附图编号	对照抗体或重组反应产物	EC ₅₀ (nM)	Top
3A	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.58	2.99
	Tra-K409R*Per-F405L	0.51	3.06
	Tra-E356K+V397L*Per-K439E+V397L	0.40	2.88
	Tra-E356K+V397M*Per-K439E+V397M	0.54	2.90
	Tra-E356K+V397T*Per-K439E+V397T	NA	NA
	Tra-E356K+V397I*Per-K439E+V397I	0.70	2.24
	Tra-E356K+F405Y*Per-K439E+F405Y	0.54	3.19
	Tra-E356K+F405L*Per-K439E+F405L	0.64	3.05
	Tra-E356K+T411L*Per-K439E+T411L	0.83	2.95
	Tra-E356K+T411Y*Per-K439E+T411Y	0.57	3.02
	Tra-E356K+L351C*Per-K439E+L351C	0.97	2.89
3B	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.53	2.71
	Tra-K409R*Per-F405L	0.44	2.67

	Tra-E356K+T394C*Per-K439E+T394C	0.62	1.70
	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+E357C	0.40	2.62
	Tra-E356K+T366G*Per-K439E+T366G	0.56	2.39
	Tra-E356K+T366S*Per-K439E+T366S	NA	NA
	Tra-E356K+Y349L*Per-K439E+Y349L	1.38	2.42
	Tra-E356K+L351I*Per-K439E+L351I	0.71	2.54
	Tra-E356K+L351T*Per-K439E+L351T	0.63	2.72
	Tra-E356K+L351F*Per-K439E+L351F	0.76	2.49
3C	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.52	2.65
	Tra-K409R*Per-F405L	0.46	2.69
	Tra-E356K+T394A*Per-K439E+T394A	0.46	2.46
	Tra-E356K+T394N*Per-K439E+T394N	0.49	2.79
	Tra-E356K+T366V*Per-K439E+T366V	0.64	2.87
	Tra-E356K+T366A*Per-K439E+T366A	0.55	2.54
	Tra-E356K+L368A*Per-K439E+L368A	0.69	2.59
	Tra-E356K+Y407L*Per-K439E+Y407L	0.81	2.94
	Tra-E356K+Y407V*Per-K439E+Y407V	0.78	2.67
	Tra-Y407L*Per-T366H	0.95	2.31
3D	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.42	2.66
	Tra-K409R*Per-F405L	0.42	2.64
	Tra-K439E*Per-E356K	NA	NA
	Tra-E356K*Per-K439E	NA	NA
	Tra-E356K+Y407C*Per-K439E+Y407C	0.50	2.64
	Tra-E356K+S364T*Per-K439E+S364T	0.39	2.45
	Tra-E356K+T394V*Per-K439E+T394V	0.43	2.62
	Tra-E356K+K409R*Per-K439E+K409R	0.38	2.72
	Tra-E356K+K409Q*Per-K439E+K409Q	0.34	2.69
3E	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.42	2.38
	Tra-K409R*Per-F405L	0.51	2.56
	Tra-E356K+T366L*Per-K439E+T366L	0.62	2.72
	Tra-E356K+T366I*Per-K439E+T366I	0.64	2.79

	Tra-E356K+L368V*Per-K439E+L368V	0.77	2.85
	Tra-E356K+Y407F*Per-K439E+Y407F	0.64	2.60
	Tra-E356K+Y407H*Per-K439E+Y407H	0.78	2.94
	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+Y407H	0.52	2.93
	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+Y407L	0.37	2.92
	Tra-F405L*Per-T366H	0.59	2.45
3F	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.48	2.16
	Tra-K409R*Per-F405L	0.40	2.23
	Tra-E356K+L351V*Per-K439E+L351V	0.41	2.15
	Tra-E356K+S364A*Per-K439E+S364A	0.39	2.01
	Tra-E356K+S364L*Per-K439E+S364L	0.56	2.33
	Tra-E356K+T394S*Per-K439E+T394S	0.48	2.00
	Tra-E356K+L368I*Per-K439E+L368I	0.72	2.27
	Tra-E356K+L368M*Per-K439E+L368M	0.90	0.83
	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+T366H	1.04	2.38
	Tra-E356K+Y407H*Per-K439E+T366H	0.88	2.30
	Tra-E356K+Y349S*Per-K439E+S354Y	0.55	2.27
3G	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.47	1.98
	Tra-K409R*Per-F405L	0.43	2.06
	Tra-Y349S*Per-S354Y	0.38	1.79
	Tra-F405T*Per-T394F	0.39	2.06
	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L368I	0.43	1.99
	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L351I	0.47	1.81
	Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+T366A	0.62	1.90
	Tra-Y349C*Per-S354C+T366A	0.75	1.77
	Tra-Y349C*Per-E357C	0.90	1.90
	Tra-Y349C*Per-E357C+Q347E	0.71	1.95
	Tra-E356K+Y407L*Per-K439E+T366H	0.49	2.12
3H	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.45	2.08
	Tra-K409R*Per-F405L	0.46	2.13
	Tra-T366H*Per-Y407L	0.61	2.02

	Tra-E356K+T366H*Per-K439E+F405L	0.50	2.49
	Tra-T366H*Per-F405L	0.49	1.67
	Tra-E356K+D399K*Per-K439E+K409D	0.57	2.30
	Tra-E356K+K409D*Per-K439E+D399K	0.86	2.43
	Tra-Y349V*Per-S354F	0.96	2.01
	Tra-Y349T*Per-S354F	1.15	2.17
	Tra-Y349S*Per-S354F	0.78	2.14
3I	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.40	2.49
	Tra-K409R*Per-F405L	0.45	2.57
	Tra-E356K+F405T*Per-K439E+T394F	0.84	3.00
	Tra-Y349C*Per-S354C+L351I	0.71	1.47
	Tra-Y349C*Per-S354C+F405Y	0.63	2.42
	Tra-E356K+L351M*Per-K439E+L351M	0.38	1.08
3J	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.83	2.24
	Tra-K409R*Per-F405L	0.89	2.36
	Tra-Y349C*Per-S354C+L368I	1.07	2.16
	Tra-Y349A*Per-S354F	0.85	2.07
	Tra-Y349S*Per-S354W	0.73	2.11
	Tra-Y349A*Per-S354W	0.77	2.19
	Tra-Y349G*Per-S354W	0.70	2.28
3K	(Tra+Per) Mix	NA	NA
	Tra-F405L*Per-K409R	0.63	2.34
	Tra-K409R*Per-F405L	0.73	2.25
	Tra-Y349S*Per-S364Y	0.89	2.52
	Tra-Y349C*Per-S354C+S364Y	0.74	2.54
	Tra-Y349C*Per-S354C+S364F	0.71	2.41
	Tra-F405T+S354C*Per-T394F+Y349C	0.81	2.75

注：NA表示结合信号弱，曲线无法准确拟合，从而无法提供该参数。

图3A-3K和表8显示，(Tra+Per) Mix对应的OD接近背景值，表明其不能同时结合HER2的两个表位；重组产物Tra-F405L*Per-K409R和Tra-K409R*Per-F405L能同时结合HER2的两个表位；Tra-K439E*Per-E356K、Tra-E356K*Per-K439E、Tra-E356K+V397T*Per-K439E+V397T和Tra-E356K+T366S *Per-K439E+T366S的信号

曲线与(Tra+Per) Mix几乎重叠，表明这四种组合在本实施例条件下不能产生双特异性抗体；其余大部分组合的重组反应产物能同时有效结合HER2的两个表位，表明这些重组反应生成了双特异性抗体。本实施例所示实验数据可以大致判断各种重组反应产生双特异性抗体的效率。

5 **实施例2.5：抗HER2双表位双特异性抗体的重组效率**

本实施例中使用的理化性质分析方法说明如下。

- 1、HPLC-SEC和HPLC-IEC的方法和条件与前述实施例中相同或相似。
- 2、反相液相色谱（High-Performance Liquid Chromatography-Reversed-Phase, HPLC-RP）

- 10 所用色谱仪为Agilent 1290 UPLC DAD；流动相配制方法如下：流动相A为0.1%高氯酸水溶液，流动相B为乙腈，梯度洗脱B%：0-15 min (20%~45%)；25 min (85%)；25.1-30 min (20%)；进样量：3 μg；色谱柱为Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl，2.1×100 mm 3.5 μM；流速0.3 mL/min，洗脱时间30 min；柱温60 ℃，样品室温度15 ℃；检测波长280 nm。
- 15 用HPLC-SEC、HPLC-IEC和HPLC-RP对上述实施例中产生的母本单克隆抗体和对应的重组反应产物（含有双特异性抗体）进行分析，测得的纯度（此处，SEC纯度为主峰面积占比，IEC纯度为主峰、酸性峰和碱性峰等主要谱峰面积占比的总和，RP纯度为主峰面积占比）数据汇总至表9中。带有E356K的Trastuzumab与携带K439E的Pertuzumab突变体的等电点有明显差别（相差0.5左右），可以通过HPLC-
- 20 IEC将母本单克隆抗体和对应的双特异性抗体进行有效分离。然而，不带有E356K的Trastuzumab与不携带K439E的Pertuzumab突变体，因为等电点相近（仅相差0.1左右），无法通过HPLC-IEC进行有效分离，因此使用HPLC-RP对其余重组反应产物进行分析。

表9. 母本单克隆抗体的SEC及对应双特异性抗体的SEC和IEC纯度

序号	母本单克隆抗体		重组反应产物	
	名称	SEC（%）	SEC（%）	IEC/RP（%）
1	Tra-E356K	99.63	98.97	NA
	Per-K439E	99.65		
2	Tra-K439E	99.62	99.24	NA
	Per-E356K	99.24		
3	Tra-E356K+L351C	99.12	98.92	88.94
	Per-K439E+L351C	99.68		
4	Tra-E356K+L351V	95.97	97.71	97.42

	Per-K439E+L351V	97.93		
5	Tra-E356K+L351I	96.55	98.62	98.20
	Per-K439E+L351I	98.15		
6	Tra-E356K+L351M	99.17	99.25	54.50
	Per-K439E+L351M	99.79		
7	Tra-E356K+L351F	98.96	99.12	83.26
	Per-K439E+L351F	99.01		
8	Tra-E356K+S364A	95.21	97.28	96.22
	Per-K439E+S364A	97.12		
9	Tra-E356K+S364T	99.57	98.79	85.89
	Per-K439E+S364T	99.60		
10	Tra-E356K+S364L	78.16	91.78	91.80
	Per-K439E+S364L	93.80		
11	Tra-E356K+T366G	98.20	98.48	96.17
	Per-K439E+T366G	98.96		
12	Tra-E356K+T366A	90.15	96.59	97.38
	Per-K439E+T366A	96.71		
13	Tra-E356K+T366V	63.33	90.01	77.10
	Per-K439E+T366V	86.50		
14	Tra-E356K+T366L	73.66	90.85	87.12
	Per-K439E+T366L	83.32		
15	Tra-E356K+T366I	69.03	91.56	90.70
	Per-K439E+T366I	87.48		
16	Tra-E356K+T366H	72.99	92.74	93.85
	Per-K439E+T366H	93.53		
17	Tra-E356K+L368A	90.01	97.34	96.80
	Per-K439E+L368A	97.09		
18	Tra-E356K+L368V	85.51	94.64	89.10
	Per-K439E+L368V	95.78		
19	Tra-E356K+L368M	98.24	97.82	38.19
	Per-K439E+L368M	97.98		
20	Tra-E356K+T394A	98.16	98.81	97.18
	Per-K439E+T394A	99.31		
21	Tra-E356K+T394S	96.85	98.51	95.99

	Per-K439E+T394S	98.16		
22	Tra-E356K+T394C	99.17	99.18	60.81
	Per-K439E+T394C	99.55		
23	Tra-E356K+T394V	99.40	98.82	92.51
	Per-K439E+T394V	99.75		
24	Tra-E356K+T394N	82.98	94.07	95.52
	Per-K439E+T394N	92.63		
25	Tra-E356K+V397I	99.53	98.89	65.18
	Per-K439E+V397I	99.44		
26	Tra-E356K+V397M	99.38	99.03	86.84
	Per-K439E+V397M	99.67		
27	Tra-E356K+Y407C	73.40	95.77	93.25
	Per-K439E+Y407C	90.56		
28	Tra-E356K+Y407V	81.14	94.47	94.61
	Per-K439E+Y407V	93.41		
29	Tra-E356K+Y407L	75.74	89.35	96.13
	Per-K439E+Y407L	86.34		
30	Tra-E356K+Y407H	58.30	67.50	69.88
	Per-K439E+Y407H	56.32		
31	Tra-E356K+Y407F	98.05	98.65	94.24
	Per-K439E+Y407F	99.65		
32	Tra-E356K+T411L	98.27	98.55	97.27
	Per-K439E+T411L	99.61		
33	Tra-E356K+Y349S	93.13	95.82	95.53
	Per-K439E+S354Y	95.15		
34	Tra-E356K+Y349C	85.28	94.75	91.50
	Per-K439E+E357C	81.59		
35	Tra-E356K+T366H	72.40	84.29	83.56
	Per-K439E+Y407L	86.50		
36	Tra-E356K+T366H	72.99	85.57	87.88
	Per-K439E+F405L	91.65		
37	Tra-E356K+T366H	72.40	73.84	91.76
	Per-K439E+Y407H	56.32		
38	Tra-E356K+F405T	60.88	93.11	94.73

	Per-K439E+T394F	93.21		
39	Tra-E356K+Y407L	76.12	91.77	93.99
	Per-K439E+T366H	93.53		
40	Tra-E356K+Y407H	57.72	90.86	83.92
	Per-K439E+T366H	93.53		
41	Tra-E356K+Y349C	90.14	97.21	97.23
	Per-K439E+S354C+L351I	98.05		
42	Tra-E356K+Y349C	90.14	95.90	97.06
	Per-K439E+S354C+T366A	91.66		
43	Tra-E356K+Y349C	90.14	91.84	95.78
	Per-K439E+S354C+L368I	95.08		
44	Tra-Y349S	96.05	97.50	88.02
	Per-S354F	95.59		
45	Tra-Y349S	96.05	97.49	86.82
	Per-S354Y	95.83		
46	Tra-Y349V	95.51	96.90	70.35
	Per-S354F	95.59		
47	Tra-Y349T	93.55	96.71	69.78
	Per-S354F	95.59		
48	Tra-Y349G	95.14	98.18	92.45
	Per-S354W	98.54		
49	Tra-Y349A	97.37	97.30	93.06
	Per-S354W	98.54		
50	Tra-Y349S	97.83	97.73	88.77
	Per-S354W	98.54		
51	Tra-Y349S	97.10	97.19	94.43
	Per-S364Y	96.26		
52	Tra-Y349C	94.86	96.74	94.66
	Per-E357C	74.05		
53	Tra-Y349C	94.86	95.34	89.59
	Per-E357C+Q347E	67.14		
54	Tra-Y349C	94.86	97.90	72.62
	Per-S354C+L351I	97.28		
55	Tra-Y349C	95.20	93.37	92.92

	Per-S354C+S364Y	93.60		
56	Tra-Y349C	95.20	96.53	95.69
	Per-S354C+S364F	94.20		
57	Tra-Y349C	94.86	97.74	86.99
	Per-S354C+T366A	96.23		
58	Tra-Y349C	97.53	98.72	77.04
	Per-S354C+L368I	96.18		
59	Tra-Y349C	94.86	97.49	79.14
	Per-S354C+F405Y	93.98		
60	Tra-T366H	91.31	96.50	70.05
	Per-F405L	93.20		
61	Tra-T366H	91.31	94.19	63.63
	Per-Y407L	89.02		
62	Tra-F405L	98.36	97.49	68.04
	Per-T366H	90.07		
63	Tra-Y407L	92.38	96.21	64.15
	Per-T366H	90.03		
64	Tra-F405T+S354C	78.20	87.83	89.63
	Per-T394F+Y349C	72.80		
65	Tra-E356K+D399K	51.80	89.82	90.50
	Per-K439E+K409D	92.82		
66	Tra-E356K+K409D	85.68	91.74	93.89
	Per-K439E+D399K	80.90		

注：NA表示无法准确测得。

对图3、表8和表9中数据进行综合分析，优选部分母本单克隆抗体和对应的重组反应产物进行HPLC-IEC或HPLC-RP图谱叠加。选择的组合包括：Tra-E356K*Per-K439E（图4A）、Tra-F405L*Per-K409R（图4B）、Tra-K409R*Per-F405L（图4C）、
5 Tra-E356K+L351I*Per-K439E+L351I（图4D）、Tra-E356K+S364A*Per-K439E+S364A（图4E）、Tra-E356K+T366A*Per-K439E+T366A（图4F）、Tra-E356K+T394A*Per-K439E+T394A（图4G）、Tra-E356K+T394S*Per-K439E+T394S（图4H）、Tra-E356K+F405Y*Per-K439E+F405Y（图4I）、Tra-E356K+T411Y*Per-K439E+T411Y（图4J）、Tra-E356K+Y349S*Per-K439E+S354Y（图4K）、Tra-E356K+Y349C*Per-K439E+S354C+L351I（图4L）、Tra-Y349G*Per-S354W（图4M）、Tra-Y349S*Per-S364Y（图4N）、Tra-Y349C*Per-S354C+S364Y（图4O）和Tra-Y349C*Per-S354C+S364F

10

(图4P)。

如果重组反应有双特异性抗体形成，谱图中会产生双特异性抗体所对应的新谱峰，并且母本单克隆抗体对应位置处的谱峰会相对减少，母本单克隆抗体对应谱峰面积百分比即为重组反应后的残留量。图4A显示，Tra-E356K和Per-K439E在本实施例条件下，谱图中没有新谱峰产生，表明该反应无法有效发生重组反应。图4B到4P图显示，重组反应产物谱图中有新谱峰产生，表明有重组抗体生成。

重组反应效率计算公式为： $100\% - (\text{母本单克隆抗体A对应谱峰面积百分比} + \text{母本单克隆抗体B对应谱峰面积百分比})$ 。用于重组反应的单克隆抗体并未经过精细纯化，会有聚集体和少量杂质存在。

10 表10. 通过母本单克隆抗体的残留量计算重组反应效率

母本单克隆抗体		重组反应效率（%）	附图编号
名称	残留量（%）		
Tra-E356K	49.0	0.3%	4A
Per-K439E	50.7		
Tra-F405L	3.9	90.0	4B
Per-K409R	6.1		
Tra-K409R	3.3	88.8	4C
Per-F405L	7.9		
Tra-E356K+L351I	0.2	99.0	4D
Per-K439E+L351I	0.9		
Tra-E356K+S364A	0.3	97.4	4E
Per-K439E+S364A	2.3		
Tra-E356K+T366A	0.0	98.7	4F
Per-K439E+T366A	1.3		
Tra-E356K+T394A	0.0	98.6	4G
Per-K439E+T394A	1.4		
Tra-E356K+T394S	1.1	96.5	4H
Per-K439E+T394S	2.5		
Tra-E356K+F405Y	0.4	97.6	4I
Per-K439E+F405Y	2.0		
Tra-E356K+T411Y	1.6	96.5	4J
Per-K439E+T411Y	1.9		
Tra-E356K+Y349S	2.1	96.7	4K

Per-K439E+S354Y	1.2		
Tra-E356K+Y349C	1.4	97.0	4L
Per-K439E+S354C+L351I	1.6		
Tra-Y349G	3.2	92.5	4M
Per-S354W	4.4		
Tra-Y349S	1.9	95.0	4N
Per-S364Y	3.0		
Tra-Y349C	0.8	92.9	4O
Per-S354C+S364Y	6.2		
Tra-Y349C	1.8	95.7	4P
Per-S354C+S364F	2.5		

上述结果显示（图4A-4P和表10），本实施例几乎检测不到Tra-E356K*Per-K439E重组反应的发生，Tra-F405L*Per-K409R和Tra-K409R*Per-F405L重组反应效率分别为90.0%和88.8%，而表10中其他组合的重组反应效率均高于92.0%，最高可达99.0%。

5 3、质谱（Mass Spectrometry）检测抗体脱糖后分子量的方法和条件与前述实施例中所述相同。

表11. 双特异性抗体的质谱分析结果

母本单克隆抗体		重组反应产物	
名称	理论重链/轻链分子量	理论完整分子量	实测重链/轻链/完整分子量
Tra-E356K+L351I	49156/23443	145183	49154/49089/23442/23526/145185
Per-K439E+L351I	49090/23526		
Tra-E356K+S364A	49140/23443	145151	49139/49073/23442/23526/145153
Per-K439E+S364A	49073/23526		
Tra-E356K+T366A	49126/23443	145123	49124/49060/23442/23526/145126
Per-K439E+T366A	49060 /23526		
Tra-E356K+T394A	49126/23443	145123	49123/49059/23442/23526/145125
Per-K439E+T394A	49060/23526		
Tra-E356K+T394S	49142/23443	145155	49140/49076/23442/23526/145157
Per-K439E+T394S	49076/23526		
Tra-E356K+F405Y	49172/23443	145215	49169/49106/23442/23526/145216

Per-K439E+F405Y	49106/23526		
Tra-E356K+T411Y	49218/23443	145307	49217/49152/23442/23526/145309
Per-K439E+T411Y	49152/23526		
Tra-E356K+Y349S	49081/23443	145183	49079/49165/23442/23526/145186
Per-K439E+S354Y	49165/23526		
Tra-E356K+Y349C	49096/23443	145139	49098/49098/23442/23526/145141
Per-K439E+S354C+L351I	49106/23526		
Tra-F405T	49111/23443	145183	49111/49134/23442/23256/145186
Per-T394F	49135/23526		
Tra-Y349G	49043/23439	145176	49043/49181/23439/23522/145176
Per-S354W	49180/23522		
Tra-Y349S	49073/23439	145183	49073/49157/23439/23522/145184
Per-S364Y	49157/23522		
Tra-Y349C	49089/23439	145216	49088/49172/23439/23523/145214
Per-S354C+S364Y	49173/23522		
Tra-Y349C	49089/23439	145199	49090/49157/23439/23520/145198
Per-S354C+S364F	49157/23522		

注：本表中的理论重链、轻链和完整分子量是考虑蛋白的翻译后修饰和氧化还原状态后通过软件计算得到的理论数值。因此，不同实验条件下相同轻链的理论分子量可能不相同。

表11结果显示，上述组合产生的双特异性抗体的理论重链、轻链、完整分子量与质谱测得的实际重链、轻链、完整分子量非常相近，这表明双特异性抗体分子的重组5 和结构符合预期。重组样品的质谱图中没有出现母本单克隆抗体对应的谱峰，表明上述重组反应进行相对彻底。

实施例 3.1：小鼠抗人 CD3 单克隆抗体的来源和人源化

通过杂交瘤技术制备的小鼠抗人 CD3 单克隆抗体（anti-CD3）的重链和轻链可变区氨基酸序列来自 US 2009/0252683 A1 中的 SEQ ID NO: 2 和 4。对 anti-CD3 10 的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）的氨基酸序列进行分析，依照 Kabat 编号方案确定各个 VH 和 VL 的框架区（Framework Region，FR）和互补决定区（Complementarity Determining Region，CDR）。Anti-CD3 的重链及轻链可变区序列如下所示。

>Anti-CD3-VH 氨基酸序列（SEQ ID NO: 19）：
15 EVKLLES GGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRS
KYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGN
SYVSWFAYWGQGLTVSA

>Anti-CD3-VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20):
QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLFTGLIGGTN
KRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTV
L

5 鼠源 anti-CD3 抗体的人源化过程如下。使用 IgBlast 工具, 把 anti-CD3-VH 和
anti-CD3-VL 分别与 NCBI 人类抗体可变区种系 (germline) 基因数据库进行对比,
通过同源性分析, 在此选择 IGHV3-23*05 和 IGLV7-43*01 分别作为 anti-CD3-VH
和 anti-CD3-VL 人源化的模板。将 anti-CD3-VH 和 anti-CD3-VL 的 CDR 分别移植
到相应的人源模板中, 分别选择 WGQGT TVTVSS 和 FGGGTKLTVL 作为 VH 和
10 VL 的 FR4, 形成一级结构为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的 CDR-grafted
VH 和 VL。

 在此, 对 CDR-grafted VH 和 VL 的氨基酸残基进行回复突变或其它突变。

 对 CDR-grafted VH 第 73、94、96 和 100 位的氨基酸残基进行突变, 具体突变
组合为 N73D、K94R、G96E 和 N100Q, 获得人源化的 VH, 命名为 anti-CD3-Hu-
15 VH。对 CDR-grafted VL 第 24、33、36、46、49、57、58 和 94 位的氨基酸残基进
行突变, 具体突变组合为 R24A、A33P、F36V、A46G、Y49G、W57G、T58V 和
N94E, 获得人源化的 VL, 命名为 anti-CD3-Hu-VL。

表 12. anti-CD3-Hu 抗体的 CDR 序列

抗体	重链		轻链	
anti- CD3-Hu	HCDR1	TYAMN (SEQ ID NO: 21)	LCDR1	ASSTGAVTTSNYPN (SEQ ID NO: 24)
	HCDR2	RIRSKYNNYATY YADSVKD (SEQ ID NO: 22)	LCDR2	GTNKRAP (SEQ ID NO: 25)
	HCDR3	HENFGQSYVSW FAY (SEQ ID NO: 23)	LCDR3	ALWYSELWV (SEQ ID NO: 26)

20 >Anti-CD3-Hu-VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 27):
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRS
KYN~~NY~~ATYYADSVKDRFTISRDD~~SK~~N~~TL~~YLQMNSLR~~A~~EDTAVYYC~~AR~~HENFGQ
SYVSWFAYWGQGT TVTVSS

 >Anti-CD3-Hu-VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 28):
25 QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTTSNYPN~~WV~~QKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSELWVFGGGTKLT
VL

 注: 加粗部分表示回复突变或其它突变。

 合成编码上述人源化的重链和轻链可变区的 DNA。将 anti-CD3-Hu-VH 与包
30 含 AAA 突变 (L234A+L235A+G237A, 沉默 Fc 介导的效应功能) 的人 IgG1 重链

恒定区 (SEQ ID NO: 29) 的编码基因重组, 获得全长的人源化重链基因, 命名为 anti-CD3-Hu-HC (SEQ ID NO: 31); 将 anti-CD3-Hu-VL 与人 Lambda 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 30) 的编码基因相连, 获得全长的人源化轻链基因, 命名为 anti-CD3-Hu-LC (SEQ ID NO: 32)。

5 >Fc 沉默的人 IgG1 重链恒定区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 29):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
10 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

>人 Lambda 轻链恒定区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 30):

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
15 TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

>Anti-CD3-Hu-HC 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 31):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRS
KYNMYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHENFGQ
SYVSWFAYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
20 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
25 VFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>Anti-CD3-Hu-LC 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 32):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTTSNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSELWVFGGGTKLT
VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG
30 VETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

将 anti-CD3-Hu-HC 和 anti-CD3-Hu-LC 基因分别构建到 pcDNA3.4 表达载体中, 利用 PEI 转染法将所得重链和轻链的表达载体同时转入 Expi293F™ 细胞 (Thermo Fisher Scientific, 货号: A14527) 中以表达抗体。293 细胞在无血清培养基中培养 5 天, 收取细胞上清, 利用 Protein A 亲和层析法纯化抗体, 所得抗体命名为 anti-CD3-Hu。

实施例 3.2: 抗 CEA 和抗 MUC1 抗体的来源和对应双特异性抗体的制备

人源化的抗 CEA 单克隆抗体 (Hu67-14) 的重链和轻链氨基酸序列来自 WO2021121204A1 中的 SEQ ID NO: 84 和 85。人源化的抗 MUC1 单克隆抗体

(M6H2L2) 的重链和轻链氨基酸序列来自 WO2024213106A1 中的 SEQ ID NO:83 和 84。

>Hu67-14 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 33):

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYHMNWVKQMPGKGLEWMGDIN
5 PDIGGTSYNQNFKGKVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWDFDSFAN
WGQGT~~LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SWNSGAL
~~TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK~~
~~THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV~~
~~DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI~~
10 ~~SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT~~
~~TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~

>Hu67-14 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 34):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVSIIGTNIHWHYQQKPGKAPKLLIYHAS
NLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQPEDFATYYCLQSRKIPYTFGGGT~~KVEIKRT
15 ~~VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCLLN~~NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ~~
~~DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC~~

>M6H2L2 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 35):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYR~~FIPYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILP~~
GTGR~~TNYNEKFKGRVTFTADTSTNTVY~~MELSS~~LRSEDTAVYYCARYGDDTSGG~~
20 ~~YYAVDYWGQGT~~TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
~~SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV~~
~~EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE~~
~~VKNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL~~
~~PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ~~
25 ~~PENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSL~~
~~SPGK~~

>M6H2L2 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 36):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVN~~ILGTNIHWHYQQKPGQAPKLLIYHAS~~
NLETGIPARFSGSGSR~~TDFTLTIS~~LEPEDFAVYYCLQSRKIPWTFGGGT~~KVEIKRT~~
30 ~~VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCLLN~~NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ~~
~~DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC~~

注: 斜体部分为抗体恒定区, 波浪线部分为 CH1 结构域。

经过 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 分析, 发现 Hu67-14 和
M6H2L2 的轻链可变区氨基酸序列存在较高的相似性 (Identities: 82%; Positives:
35 94%)。对两个抗体的轻链 CDR 进行对比, 发现对应的 CDR 之间存在高度相似性。
在此, 选择 Hu67-14 的轻链作为潜在的共同轻链 (common light chain) 构建结构对
称的四价的双特异性抗体。Anti-CEA*MUC1 双特异性抗体的构建方法描述如下:
通过 3 个串联的 GGGGS 衔接子将 M6H2L2 的 VH 和 CH1 结构域和 Hu67-14 的重
链相连, 产生的一条长重链。在该长重链的两个 VH 中引入 Q105E 突变, 以调低

潜在的双特异性抗体的等电点。在该长重链的 Fc 结构域引入 AAA 突变 (L234A+L235A+G237A)，以沉默 Fc 介导的效应功能。经过前述改造后产生的长重链命名为 anti-CEA*MUC1-HC (SEQ ID NO: 37)。在 Hu67-14 的轻链中引入 K42E 突变，以进一步调低潜在的双特异性抗体的等电点，如此产生的共同轻链命名为 anti-CEA*MUC1-LC (SEQ ID NO: 38)。

>Anti-CEA*MUC1-HC 氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 37):

```
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFPYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILP
GTGRITNYNEKFKGRVTFTADTSTNTVMELSSLRSEDVAVYYCARYGDDTSGG
YYAVDYWGEGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
10 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK
GSGYSFTDYHMNWKQMPGKGLEWMGDINPDIGGTSYNQNFKGKVTISVDKS
ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWDFDSFANWGEGTLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
15 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGA
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

>Anti-CEA*MUC1-LC 氨基酸序列如下 (SEQ ID NO: 38):

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVSIIGTNIHWHYQQKPGEAPKLLIYHAS
NLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSRKIPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

将 anti-CEA*MUC1-HC 和 anti-CEA*MUC1-LC 基因分别构建到 pcDNA3.4 表达载体中，利用 PEI 转染法将所得重链和轻链的表达载体同时转入 Expi293F™ 细胞 (Thermo Fisher Scientific, 货号: A14527) 中以表达抗体。293 细胞在无血清培养基中培养 5 天，收取细胞上清，利用 Protein A 亲和层析法纯化抗体，所得抗体命名为 anti-CEA*MUC1。

30 实施例 3.3: Anti-CD3-Hu 和 anti-CEA*MUC1 突变体的制备

采用定点诱变 (site-directed mutagenesis) 的方法在 anti-CD3-Hu 单克隆抗体和 anti-CEA*MUC1 双特异性抗体的重链 CH3 结构域中引入基因突变，把特定位置处的氨基酸残基突变为其它氨基酸残基，在此使用 Eu numbering scheme 标识氨基酸残基的位置。按照前述实施例中描述的表达和纯化方法，制备带有突变的 anti-CD3-Hu 单克隆抗体和 anti-CEA*MUC1 双特异性抗体。用 0.2-μm 滤头对所得抗体样品进行过滤除菌，并用 NanoDrop 微量分光光度计测定抗体的浓度。抗体突变体以及相应的重组反应如表 13 所示。抗体突变体的命名规则如下，示例性地，E356K+L351I

表示第356位的E突变成K，同时第351位的L突变成I，其余类推。重组反应中将anti-CD3-Hu和anti-CEA*MUC1分别简写为C和CM。

表13. 母本抗体突变体及对应重组反应

序号	Anti-CD3-Hu CH3 突变	Anti-CEA*MUC1 CH3 突变	重组反应
1	E356K+L351I	K439E+L351I	C-E356K+L351I*CM-K439E+L351I
2	E356K+S364A	K439E+S364A	C-E356K+S364A*CM-K439E+S364A
3	E356K+T366A	K439E+T366A	C-E356K+T366A*CM-K439E+T366A
4	E356K+T394A	K439E+T394A	C-E356K+T394A*CM-K439E+T394A
5	E356K+T394S	K439E+T394S	C-E356K+T394S*CM-K439E+T394S
6	E356K+F405Y	K439E+F405Y	C-E356K+F405Y*CM-K439E+F405Y
7	E356K+T411Y	K439E+T411Y	C-E356K+T411Y*CM-K439E+T411Y
8	E356K+Y349S	K439E+S354Y	C-E356K+Y349S*CM-K439E+S354Y
9	E356K+Y349C	K439E+S354C+L351I	C-E356K+Y349C*CM-K439E+S354C+L351I
10	F405T	T394F	C-F405T*CM-T394F
11	Y349G	S354W	C-Y349G*CM-S354W
12	Y349S	S364Y	C-Y349S*CM-S364Y
13	Y349C	S354C+S364Y	C-Y349C*CM-S354C+S364Y
14	Y349C	S354C+S364F	C-Y349C*CM-S354C+S364F

注：*表示两个母本抗体之间进行重组反应。

5 **实施例3.4： anti-CD3*CEA*MUC1三特异性抗体的制备方法**

称量1700 mg 2-MEA（Sigma-Aldrich，货号/规格：30078/100G），溶解于20 mL PBS，用1M NaOH将pH调整到7.4，此溶液中2-MEA物质的量浓度大约为750 mM。用PBS把上述实施例中制备的anti-CD3-Hu和anti-CEA*MUC1抗体突变体的浓度分别调整到相同的物质的量浓度（3.45 μM-690 μM），取等体积的anti-CD3-Hu突变体跟对应的anti-CEA*MUC1突变体混匀，然后取适量2-MEA母液，加入上述抗体混合物中，混匀，使2-MEA终浓度大约为75 mM。将该混合溶液（含anti-CD3-Hu突变体、anti-CEA*MUC1突变体和2-MEA）放置到37 °C的水浴锅中孵育2.5 h。将混合溶液转移到Slide-A-Lyzer™ G3 Dialysis Cassettes（Thermo Fisher Scientific，货号：A52971）中，在5 L的PBS中室温条件下进行透析，5小时后更换PBS，在冷库（4℃）中继续进行透析。透析过夜后收集样品，重新测定抗体浓度。用HPLC-SEC和IEC测定母本抗体以及对应重组反应产物的理化性质。

实施例3.5： anti-CD3*CEA*MUC1三特异性抗体的重组效率

本实施例中使用的理化性质分析方法如前述实施例中所示。

用HPLC-SEC和HPLC-IEC分析上述实施例产生的母本抗体和对应的重组反应产物（含有三特异性抗体），测得的纯度（此处，SEC纯度为主峰面积占比，IEC纯度为主峰、酸性峰和碱性峰等主要谱峰面积占比的总和，数据汇总至表14中。

表14. 母本抗体的SEC及对应重组反应产物的SEC和IEC纯度

母本抗体突变体		重组反应产物	
名称	SEC（%）	SEC（%）	IEC（%）
C-E356K+L351I	96.19	94.33	97.30
CM-K439E+L351I	96.58		
C-E356K+S364A	96.41	94.18	98.12
CM-K439E+S364A	96.65		
C-E356K+T366A	94.78	93.29	100.00
CM-K439E+T366A	92.13		
C-E356K+T394A	95.64	94.62	98.13
CM-K439E+T394A	94.72		
C-E356K+T394S	96.43	93.27	96.42
CM-K439E+T394S	96.55		
C-E356K+F405Y	88.26	89.52	94.70
CM-K439E+F405Y	90.71		
C-E356K+T411Y	86.62	90.49	94.14
CM-K439E+T411Y	92.30		
C-E356K+Y349S	91.46	91.49	97.31
CM-K439E+S354Y	93.72		
C-E356K+Y349C	88.15	89.50	94.23
CM-K439E+S354C+L351I	94.26		
C-F405T	92.83	85.17	90.02
CM-T394F	85.39		
C-Y349G	84.49	90.70	96.37
CM-S354W	91.93		
C-Y349S	96.63	93.57	96.20
CM-S364Y	94.70		
C-Y349C	95.84	88.38	93.34
CM-S354C+S364Y	88.68		

C-Y349C	95.84	90.96	90.13
CM-S354C+S364F	91.79		

HPLC-IEC结果显示，所有组合的母本抗体突变体的主峰的保留时间存在明显差别，重组反应产物（包含三特异性抗体）的主峰处于两个母本抗体之间。在此，可以通过HPLC-IEC有效地分离和鉴定反应物和重组反应产物。对表14中的母本突变体和对应的重组反应产物的HPLC-IEC图谱进行叠加并分析，反应组合包括：C-E356K+L351I*CM-K439E+L351I（图5A）、C-E356K+S364A*CM-K439E+S364A（图5B）、C-E356K+T366A*CM-K439E+T366A（图5C）、C-E356K+T394A*CM-K439E+T394A（图5D）、C-E356K+T394S*CM-K439E+T394S（图5E）、C-E356K+F405Y*CM-K439E+F405Y（图5F）、C-E356K+T411Y*CM-K439E+T411Y（图5G）、C-E356K+Y349S*CM-K439E+S354Y（图5H）、C-E356K+Y349C*CM-S354C+L351I（图5I）、C-F405T*CM-T394F（图5J）、C-Y349G*CM-S354W（图5K）、C-Y349S*CM-S364Y（图5L）、C-Y349C*CM-S354C+S364Y（图5M）和C-Y349C*CM-S354C+S364F（图5N）。

如果有三特异性抗体形成，重组反应产物的谱图中会产生三特异性抗体所对应的新谱峰，并且母本抗体对应位置处的谱峰会相对减少，母本抗体对应谱峰面积百分比即为重组反应后的残留量。图5A-图5N显示，重组反应产物的谱图中有明显的新谱峰产生，表明有重组抗体生成。在此，重组反应效率的计算公式为：100% - （母本抗体A对应谱峰面积百分比+母本抗体B对应谱峰面积百分比）。

表15. 各种母本抗体突变体组合的重组反应效率

组合编号	母本抗体		重组反应效率	附图号
	名称	残留量（%）		
1	C-E356K+L351I	0.8	97.3	5A
	CM-K439E+L351I	1.9		
2	C-E356K+S364A	0.0	98.1	5B
	CM-K439E+S364A	1.9		
3	C-E356K+T366A	0.0	100.0	5C
	CM-K439E+T366A	0.0		
4	C-E356K+T394A	0.0	98.1	5D
	CM-K439E+T394A	1.9		
5	C-E356K+T394S	0.8	96.4	5E
	CM-K439E+T394S	2.8		
6	C-E356K+F405Y	5.3	94.7	5F

	CM-K439E+F405Y	0.0		
7	C-E356K+T411Y	5.9	94.1	5G
	CM-K439E+T411Y	0.0		
8	C-E356K+Y349S	1.8	97.3	5H
	CM-K439E+S354Y	0.9		
9	C-E356K+Y349C	3.4	94.3	5I
	CM-K439E+S354C+L351I	2.3		
10	C-F405T	10.0	90.0	5J
	CM-T394F	0.0		
11	C-Y349G	2.8	96.4	5K
	CM-S354W	0.8		
12	C-Y349S	2.5	96.2	5L
	CM-S364Y	1.3		
13	C-Y349C	6.4	93.4	5M
	CM-S354C+S364Y	0.2		
14	C-Y349C	5.1	90.1	5N
	CM-S354C+S364F	4.8		

上述结果显示（图5A至图5N，和表15），本披露的不同组合的重组反应效率介于90.0%至100.0%，其中8对组合的重组反应效率高于95%。

2、质谱（Mass Spectrometry）检测抗体脱糖后分子量的方法和条件与前述实施例中所述相同。

5

表16. 重组反应产物的质谱分析结果

母本抗体		重组反应产物	
名称	理论重链/轻链分子量	理论完整分子量	实测重链/轻链/完整分子量
C-E356K+L351I	49980/22561	194255	49980/74215/22561/23769/194262
CM-K439E+L351I	74217/23770		
C-E356K+S364A	49964/22561	194223	49959/74197/22560/23769/194222
CM-K439E+S364A	74201/23770		
C-E356K+T366A	49950/22561	194195	49945/74183/22558/23769/194191
CM-K439E+T366A	74187/23770		
C-E356K+T394A	49950/22561	194195	49944/74180/22556/23768/194191
CM-K439E+T394A	74187/23770		
C-E356K+T394S	49966/22561	194227	49965/74201/22560/23768/194230
CM-K439E+T394S	74203/23770		

C-E356K+F405Y	49996/22561	194287	49995/74231/22560/23768/194291
CM-K439E+F405Y	74233/23770		
C-E356K+T411Y	50042/22561	194380	50042/74278/22560/23768/194379
CM-K439E+T411Y	74279/23770		
C-E356K+Y349S	49904/22561	194255	49903/74291/22558/23768/194256
CM-K439E+S354Y	74293/23770		
C-E356K+Y349C	49920/22561	194211	49919/74230/22560/23768/194209
CM-K439E+S354C+L351I	74233/23770		
C-F405T	49935/22561	194255	49934/74260/22561/23768/194254
CM-T394F	74262/23770		
C-Y349G	49875/22561	194248	49874/74313/22563/23768/194247
CM-S354W	74315/23770		
C-Y349S	49905/22561	194255	49904/74290/22560/23768/194255
CM-S364Y	74292/23770		
C-Y349C	49921/22561	194288	49921/74307/22560/23768/194287
CM-S354C+S364Y	74308/23770		
C-Y349C	49921/22561	194272	49920/74295/22560/23769/194269
CM-S354C+S364F	74293/23770		

注：本表中的理论重链、轻链和完整分子量是在考虑蛋白的翻译后修饰和氧化还原状态等条件下通过软件计算得到的理论数值。因此，不同实验条件下相同轻链的理论分子量可能不完全相同。

表16结果显示，上述重组反应产生的三特异性抗体的理论重链、轻链、完整分子量与质谱测得的实际重链、轻链、完整分子量非常相近，这表明三特异性抗体的结构符合理论预期。此外，重组反应产物的质谱图中没有出现明显的母本抗体对应的谱峰，也表明作为反应物的母本抗体已经充分转化为重组产物。

实施例5：anti-CD3*CEA*MUC1三特异性抗体的结合活性

通过桥联ELISA检验重组反应产物同时结合CD3和CEA，或者同时结合CD3和MUC1的能力。该实施例中使用的ELISA说明如下：

用人CD3重组蛋白（购自ACROBiosystem，Cat: CDE-H5223）包被微孔板（每孔100 ng），用封闭液（封闭液为含有1%牛血清白蛋白和0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液）处理微孔板。将待测抗体进行梯度稀释，然后转移到上述微孔板中，室温孵育半小时。洗板后加入适度稀释的生物素化的人CEA重组蛋白（购自ACROBiosystems，Cat: CE5-H82E0），室温孵育半小时。洗板后每孔加入100 μL适度稀释的Streptavidin-Peroxidase（购自Sigma，Cat: S2438）。洗板后每孔加入100 μL以TMB（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine）为底物的显色液，室温

孵育1-5min。加50 μL终止液（2M H₂SO₄）终止反应。Microplate reader（VERSA max）测定OD450。用GraphPad Prism 10.0进行作图 and 数据分析，并计算EC₅₀和Top。

- 用人MUC1重组蛋白（购自ACROBiosystems，Cat: MU1-H52H9）包被微孔板（每孔50 ng），用封闭液处理微孔板。将待测抗体进行梯度稀释，然后转移到上述微孔板中，室温孵育半小时。洗板后加入适度稀释的生物素化的人CD3重组蛋白（购自ACROBiosystems，Cat: CDE-H82E1），室温孵育半小时。洗板后每孔加入100 μL适度稀释的Streptavidin-Peroxidase。洗板后每孔加入100 μL以TMB（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine）为底物的显色液，室温孵育1-5min。
- 加50 μL终止液（2M H₂SO₄）终止反应。Microplate reader（VERSA max）测定OD450。用GraphPad Prism 10.0进行作图 and 数据分析，并计算EC₅₀和Top。

Top表示拟合曲线的高平台（high plateau），Top越大，EC₅₀越小，表明结合活性越强。用桥联ELISA测得的重组反应产物（三特异性抗体）的结合参数如表17所示。结果表明，作为对照的母本抗体不能同时结合CD3和CEA，也不能同时结合CD3和MUC1，而上述重组反应产物能同时结合CD3和CEA，或同时结合CD3和MUC1。这些结果进一步说明，anti-CD3-Hu单克隆抗体与anti-CEA*MUC1双特异性抗体能通过半抗体重组反应生成了anti-CD3*CEA*MUC1的三特异性抗体。

表17. 重组反应产物结合抗原的活性

抗原	母本抗体或重组反应产物	EC ₅₀ (nM)	Top
CD3/CEA	C-E356K+L351I	NA	NA
	CM-K439E+L351I	NA	NA
	C-E356K+L351I*CM-K439E+L351I	10.02	3.06
	C-E356K+S364A*CM-K439E+S364A	10.97	2.95
	C-E356K+T366A*CM-K439E+T366A	9.60	2.81
	C-E356K+T394A*-CM-K439E+T394A	9.56	2.82
	C-E356K+T394S*CM-K439E+T394S	8.58	2.96
	E356K+F405Y*CM-K439E+F405Y	11.07	3.42
	C-E356K+T411Y*CM-K439E+T411Y	9.22	3.21
	C-E356K+Y349S*CM-K439E+S354Y	10.44	3.17
	C-E356K+Y349C*CM-K439E+S354C+L351I	12.28	3.23
	C-F405T*CM-T394F	9.56	3.31
	C-Y349G*CM-S354W	9.26	2.92
	C-Y349S*CM-S364Y	10.57	3.06
	C-Y349C*CM-S354C+S364Y	11.67	3.32
	C-Y349C*CM-S354C+S364F	10.86	3.14

CD3/MUC1	C-E356K+L351I	NA	NA
	CM-K439E+L351I	NA	NA
	C-E356K+L351I*CM-K439E+L351I	1.97	2.31
	C-E356K+S364A*CM-K439E+S364A	2.51	2.49
	C-E356K+T366A*CM-K439E+T366A	2.50	2.61
	C-E356K+T394A*-CM-K439E+T394A	2.29	2.49
	C-E356K+T394S*CM-K439E+T394S	1.63	2.15
	E356K+F405Y*CM-K439E+F405Y	2.00	2.78
	C-E356K+T411Y*CM-K439E+T411Y	1.92	2.72
	C-E356K+Y349S*CM-K439E+S354Y	2.07	2.57
	C-E356K+Y349C*CM-K439E+S354C+L351I	2.13	2.38
	C-F405T*CM-T394F	1.73	2.69
	C-Y349G*CM-S354W	2.53	2.52
	C-Y349S*CM-S364Y	2.28	2.42
	C-Y349C*CM-S354C+S364Y	1.93	2.61
	C-Y349C*CM-S354C+S364F	2.48	2.47

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本披露的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书

1. 一种制备异源多聚体的方法，其包含下列步骤：
- a)提供包含第一多肽同聚体的分子的步骤；
- 5 b)提供包含第二多肽同聚体的分子的步骤；
- c)在还原条件下，将所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子一起孵育的步骤；以及
- d)获得包含所述第一多肽和第二多肽的异源多聚体的步骤；
- 其中所述第一多肽和第二多肽各包含一个 CH3 结构域，所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域至少有一个突变位点不同，所述 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示；其中：
- 10 1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、349、364、366、368、394、405、
- 15 407、409 和 411 位的氨基酸突变；
- 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409 和 411 位的氨基酸突变；
- 20 更优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 351 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 351 位的氨基酸突变；或
- 2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 364、351、366、368 和 405 位的氨基酸突变；或
- 25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 347 和 357 位的氨基酸突变；
- 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变；或
- 3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至 iv)组成的组的氨基酸突变：
- 30 i)349；
- ii)354 和 351；
- iii)354 和 366；和
- 35 iv)354 和 368；
- 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和

所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变；

更优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439、354 和 351 位的氨基酸突变；或

5 4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 366 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变；

优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变；

15 更优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位的氨基酸突变；或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至 vii)组成的组的氨基酸突变：

20 i)349；

ii)354；

iii)357；

iv)366；

v)394；

25 vi)405；和

vii)407；

优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 354 位或第 357 位的氨基酸突变；或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 366 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变；或

35 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 407 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 366 位的氨基酸突变；

优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变；或

6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变；或

5 7)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i)或 ii)的氨基酸突变：

i)405；

ii)394；

10 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 405 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 和 394 位的氨基酸突变；

任选地，其中：

第 356 位氨基酸突变为 Lys (K)、Arg (R) 或 His (H)；和/或

第 439 位氨基酸突变为 Glu (E) 或 Asp (D)；和/或

15 第 351 位氨基酸突变为 Ile (I)、Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Phe (F)、Met (M)；和/或

第 349 位氨基酸突变为 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)、Cys (C)、Ala (A)、Val (V)、Thr (T) 或 Gly (G)；和/或

20 第 364 位氨基酸突变为 Ala(A)、Val (V)、Thr (T)、Leu (L)、Tyr (Y) 或 Phe (F)；和/或

第 366 位氨基酸突变为 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Ile (I)；和/或

第 368 位氨基酸突变为 Val (V)、Ile (I)、Met (M) 或 Ala (A)；和/或

25 第 394 位氨基酸突变为 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N)；和/或

第 405 位氨基酸突变为 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y)；和/或

第 407 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Phe (F)；和/或

第 409 位氨基酸突变为 Gln(Q)、Arg(R)或 Asp (D)；和/或

30 第 411 位氨基酸突变为 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L)；和/或

第 354 位氨基酸突变为 Tyr (Y)、Cys (C)、Phe (F) 或 Trp (W)；和/或

第 357 位氨基酸突变为 Cys (C)；和/或

第 347 位氨基酸突变为 Glu (E)。

35 2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中：

1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，

和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 351I、351C、351V、351T、351F、351M、349L、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 351I、351C、351V、351T、351F、351M、349L、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变;

进一步优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351I、351T、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变;

更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或

2) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 364Y、364F、351I、366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变;

更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或

3) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i) 至 iv) 组成的组的氨基酸突变:

- i) 349C;
- ii) 354C 和 351I;
- iii) 354C 和 366A; 和
- iv) 354C 和 368I;

优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变；

更优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，和
5 所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变；或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 364Y、354F、354W 和 354Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 354F、354Y 和 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3
15 结构域包含 354F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 405L 或 407L 的氨基酸突变；或

20 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变；或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3
25 结构域包含 394F 的氨基酸突变；

更优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变；或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至vii)组成的组的氨基酸突变：
30

i)349S 或 349C；

ii)354Y 或 354C；

iii)357C；

35 iv)366H；

v)394F；

vi)405T 或 405L; 和

vii)407L 或 407H;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或

10 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 405L、407L 和 407H 的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变;

更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

20 6)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变; 或

7)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i)或 ii)的氨基酸突变:

25 i)405T;

ii)394F;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变。

30 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述第一多肽和第二多肽的等电点存在差异; 优选地, 所述第一多肽和第二多肽进一步包含额外的氨基酸突变以至所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点存在差异。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法, 其中所述还原条件包含添加选自 2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽(GSH)、
35 三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸和 β -巯基-乙醇及其化学衍生物

中的一种或多种还原剂；优选地，所述还原剂选自 2-MEA、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、二硫苏糖醇、 β -巯基乙醇和 TCEP 中的一种或多种；更优选地，所述还原剂为 2-MEA。

5 5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法，其中所述异源多聚体为多特异性抗体或 Fc 融合蛋白。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述包含第一多肽同聚体的分子和所述包含第二多肽同聚体的分子选自 Fc 区，抗体，包含 Fc 区的融合蛋白(例如受体、
10 细胞因子或激素融合的 Fc 区)，和与药物（例如肽或毒素）缀合的 Fc 区；

 优选地，所述包含第一多肽同聚体的分子是第一母本抗体，和所述包含第二多肽同聚体的分子是第二母本抗体。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法制备的异源多聚体。

15

8. 一种异源多聚体，其包含第一多肽和第二多肽，其中所述第一多肽和第二多肽各包含一个 CH3 结构域，其中：

 1)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3
20 结构域还各包含一个相同或不同的选自第 351、349、364、366、368、394、405、407、409 和 411 位的氨基酸突变；

 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自第 351、364、366、368、394、405、409
25 和 411 位的氨基酸突变；或

 更优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 351 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 351 位的氨基酸突变；或

 2)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变，其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自第 364、351、366、368 和 405 位的氨基酸突变；或
30

 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 347 和 357 位的氨基酸突变；或

 优选地，所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 364 位的氨基酸突变；或

35 3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变，和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变，其中所述第一多肽和/或第二多肽的

CH3 结构域还包含至少一个选自以下 i)至iv)组成的组的氨基酸突变:

i)349;

ii)354 和 351;

iii)354 和 366; 和

5 iv)354 和 368;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域区还包含一个选自第 351、366 和 368 位的氨基酸突变;

更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 10 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439、354 和 351 位的氨基酸突变; 或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变; 或

15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 366 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位或第 354 位的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 20 CH3 结构域包含第 394 位的氨基酸突变;

更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 364 位的氨基酸突变; 或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的

25 CH3 结构域还包含至少一个选自以下 i)至vii)组成的组的氨基酸突变:

i)349;

ii)354;

iii)357;

iv)366;

30 v)394;

vi)405; 和

vii)407;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 35 CH3 结构域还包含第 354 位或第 357 位的氨基酸突变; 或

第一多肽和第二多肽所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 405 位的氨基

酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 394 位的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 366 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 位的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含第 405 位或第 407 位的氨基酸突变; 或

5 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 407 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 366 位的氨基酸突变;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 356 和 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 439 和 354 位的氨基酸突变; 或

6) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 357 位的氨基酸突变; 或

7) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 位的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i) 或 ii) 的氨基酸突变:

i) 405;

15 ii) 394;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含第 354 和 405 位的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 349 和 394 位的氨基酸突变;

任选地, 其中:

第 356 位氨基酸突变为 Lys (K)、Arg (R) 或 His (H); 和/或

20 第 439 位氨基酸突变为 Glu (E) 或 Asp (D); 和/或

第 351 位氨基酸突变为 Ile (I)、Cys (C)、Val (V)、Thr (T)、Phe (F)、Met (M); 和/或

第 349 位氨基酸突变为 Leu (L)、Phe (F)、Ser(S)、Cys (C)、Ala (A)、Val (V)、Thr (T) 或 Gly (G); 和/或

25 第 364 位氨基酸突变为 Ala(A)、Val (V)、Thr (T)、Leu (L)、Tyr (Y) 或 Phe (F); 和/或

第 366 位氨基酸突变为 Gly(G)、Ser (S)、Ala(A)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Ile (I); 和/或

第 368 位氨基酸突变为 Val (V)、Ile (I)、Met (M) 或 Ala (A); 和/或

30 第 394 位氨基酸突变为 Phe (F)、Ala(A)、Ser (S)、Cys (C)、Val (V) 或 Asn (N); 和/或

第 405 位氨基酸突变为 Thr (T)、Leu (L) 或 Tyr (Y); 和/或

第 407 位氨基酸突变成 Cys (C)、Val (V)、Leu (L)、His (H) 或 Phe (F); 和/或

35 第 409 位氨基酸突变为 Gln(Q)、Arg(R)或 Asp (D); 和/或

第 411 位氨基酸突变为 Asn (N)、Tyr (Y) 或 Leu (L); 和/或

第 354 位氨基酸突变为 Tyr (Y)、Cys (C)、Phe (F) 或 Trp (W); 和/或

第 357 位氨基酸突变为 Cys (C); 和/或

第 347 位氨基酸突变为 Glu (E) 第一多肽和第二多肽;

其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域至少有一个突变位点不同, 所述

5 CH3 结构域突变位点以 EU 编号表示。

9. 根据权利要求 8 所述的异源多聚体, 其中:

1) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同或不同的选自 351I、351C、
10 351V、351T、351F、351M、349L、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变;

15 优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351I、351C、351V、351T、351F、351M、349L、364A、364T、364L、366G、366A、366V、366L、366H、366I、368V、368I、368A、368M、394A、394S、394C、394V、394N、405L、405Y、407C、407V、407L、407H、
20 407F、409Q、409R、411L 和 411Y 的氨基酸突变;

进一步优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和第二多肽的 CH3 结构域还各包含一个相同的选自 351I、351T、364A、366A、368I、394A、394S、405Y、409Q 和 411Y 的氨基酸突变;

25 更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变; 或

2) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含第 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 364Y、364F、351I、366A、368I 和 405Y 的氨基酸突变; 或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 347E 和 357C 的氨基酸突变;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含 364Y 或 364F 的氨基酸突变;

35 更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变; 或

3)所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变,其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i)至iv)组成的组的氨基酸突变:

- 5 i)349C;
 ii)354C 和 351I;
 iii)354C 和 366A; 和
 iv)354C 和 368I;

优选地,所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变,其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 351I、366A 和 368I 的氨基酸突变;

更优选地,所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变;或

4)所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 364Y、354F、354W 和 354Y 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349A 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含一个选自 354F、354Y 和 354W 的氨基酸突变;或

20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349V 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354F 的氨基酸突变;或

25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 366H 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 405L 或 407L 的氨基酸突变;

优选地,所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;或

30 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349G 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 354W 的氨基酸突变;或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 405T 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 394F 的氨基酸突变;

35 更优选地,所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变,和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变;或

5)所述第一多肽的 CH3 结构域包含选自 356K、356R 和 356H 的氨基酸突变,

和所述第二多肽的 CH3 结构域包含选自 439E 和 439D 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自由以下 i) 至 vii) 组成的组的氨基酸突变:

- i) 349S 或 349C;
- 5 ii) 354Y 或 354C;
- iii) 357C;
- iv) 366H;
- v) 394F;
- vi) 405T 或 405L; 和
- 10 vii) 407L 或 407H;

优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354C 的氨基酸突变; 或

- 15 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 357C 的氨基酸突变; 或

第一多肽和第二多肽所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 394F 的氨基酸突变; 或

- 20 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 366H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 的氨基酸突变, 其中所述第二多肽的 CH3 结构域还包含一个选自 405L、407L 和 407H 的氨基酸突变; 或

所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407L 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变; 或

- 25 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 407H 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 366H 的氨基酸突变;

更优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349S 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 354Y 的氨基酸突变; 或

6) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 357C 的氨基酸突变; 或

- 30 7) 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变, 其中所述第一多肽和/或第二多肽的 CH3 结构域还包含至少一个选自 i) 或 ii) 的氨基酸突变:

- i) 405T;
- ii) 394F;

- 35 优选地, 所述第一多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 405T 的氨基酸突变, 和所述第二多肽的 CH3 结构域包含 349C 和 394F 的氨基酸突变第一多肽和第二多肽。

10. 根据权利要求 8 或 9 中任一项所述的异源多聚体，其中所述第一多肽和第二多肽的等电点存在差异；优选地，所述第一多肽和第二多肽进一步包含额外的氨基酸突变以至所述第一多肽和所述第二多肽之间的等电点存在差异。
- 5
11. 根据权利要求 8 至 10 中任一项所述的异源多聚体，其中所述异源多聚体为多特异性抗体或 Fc 融合蛋白。
12. 一种通过胞外 Fab-臂交换反应制备的异源多聚体，包含第一多肽和第二多肽；其中：
- 10
- （1）所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 351I 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 439E 和 351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；
- 15
- 优选地，所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 D356K 和 L351I 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；或
- 所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 E356K 和 L351I 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3
- 20
- 结构域包含 K439E 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；或
- （2）所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 349C 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 354C 和 364Y 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；
- 25
- 优选地，所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 Y349C 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 S354C 和 S364Y 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；或
- （3）所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 356K 和 349C 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 439E、354C 和 351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号
- 30
- 表示；
- 优选地，所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 D356K 和 Y349C 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点
- 35
- 以 EU 编号表示；或
- 所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 E356K

- 和 Y349C 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 K439E、S354C 和 L351I 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；或
- （4）所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 349S 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 364Y 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示；
- 优选地，所述第一多肽包含一个 CH3 结构域，其中第一多肽的 CH3 结构域包含 Y349S 的氨基酸突变，所述第二多肽包含一个 CH3 结构域，其中第二多肽的 CH3 结构域包含 S364Y 的氨基酸突变，所述突变位点以 EU 编号表示。
13. 一种药物组合物，其包含权利要求 8 至 12 中任一项所述的异源多聚体以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
14. 一种免疫偶联物，其包含：权利要求 8 至 12 中任一项所述的异源多聚体和效应分子，其中所述效应分子偶联至所述异源多聚体；优选地，所述效应分子选自抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。
15. 一种或多种分离的核酸，其编码权利要求 8 至 12 中任一项所述的异源多聚体的第一多肽和/或第二多肽。
16. 一种或多种宿主细胞，其包含如权利要求 15 所述的一种或多种分离的核酸。
17. 制备如权利要求 8 至 12 中任一项所述的异源多聚体的方法，包含表达如权利要求 15 所述的一种或多种分离的核酸、或培养如权利要求 16 所述的一种或多种宿主细胞，以产生所述异源多聚体。