



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201734037 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：106106646

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 01 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/705 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/02/26

澳大利亞

2016900708

2016/02/26

澳大利亞

2016900709

(71)申請人：伊莫納瑟斯有限公司 (澳大利亞) IMUNEXUS PTY LTD (AU)

澳大利亞

(72)發明人：科普斯達斯 喬治 KOPSIDAS, GEORGE (AU)；路克 麥可 羅斯 LUKE,
MICHAEL ROSS (AU)；詹寧斯 菲爾 安東尼 JENNINGS, PHIL ANTHONY
(AU)；羅伯特斯 安東尼 賽門 ROBERTS, ANTHONY SIMON (AU)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：43 項 圖式數：29 共 206 頁

(54)名稱

多重專一性分子

MULTI-SPECIFIC MOLECULES

(57)摘要

本文之揭示內容係關於多重專一性分子，其等能夠同時結合至少二種不同的目標抗原或表位。該等分子包含至少一個與第一目標抗原或表位結合之結合功能域分子(BDM)，該 BDM 係經修飾以與異源性目標選擇性結合，與為和第二目標抗原或表位結合之抗體或其抗原結合片段或非抗體蛋白質或胜肽之藥理活性蛋白質或胜肽耦合，該等 BDM 係與該藥理活性蛋白質或胜肽內出現之多肽之 C 端耦合。

The present disclosure relates to multi-specific molecules which are capable of simultaneously binding at least two different target antigens or epitopes. The molecules comprise at least one binding domain molecule (BDM) which binds to a first target antigen or epitope, the BDM being modified for selective binding to a heterologous target, coupled to a pharmacologically active protein or peptide which is an antibody or antigen-binding fragment thereof or a non-antibody protein or peptide which binds to a second target antigen or epitope, the BDMs being coupled to a C-terminus of a polypeptide present within the pharmacologically active protein or peptide.

指定代表圖：

KAMHVAQPAVVLASSRGIA SFVCEYTVSWVDMEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYVWNGRWLTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVQLDPSWGYYWQGYEGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN

Figure 1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

多重專一性分子

Multi-specific Molecules

【技術領域】

【0001】 本文之揭示內容係關於多重專一性分子，其等能夠同時結合至少二種不同的目標抗原或表位。該等分子包含至少一個與第一目標抗原或表位結合之結合功能域分子（BDM），該 BDM 係經修飾以與異源性目標選擇性結合，與為和第二目標抗原或表位結合之抗體或其抗原結合片段或非抗體蛋白質或胜肽之藥理活性蛋白質或胜肽耦合，該等 BDM 係與該藥理活性蛋白質或胜肽內出現之多肽之 C 端耦合。

以引用方式納入納入

【0002】 所有於本文中引用或參考之文獻、與所有在於本文中引用之文獻中引用或參考之文獻、加上於本文中或於任何以引用方方式納入本文中之文獻中提及之任何產品之任何製造商之指引、描述、產品說明書、與產品表單皆特此以其等之完整內容以引用方式納入本文中。

【0003】 本申請案根據澳洲專利申請案編號 2016900708 與澳洲專利申請案編號 2016900709（其等之完整內容係以引用方式納入於本文中）主張優先權。

序列表之參照

【0004】 電子呈送之序列表之完整內容係為所有目的以其之完整內容以引用方式納入。

【先前技術】

【0005】 已開發出一些重組蛋白質作為治療劑。然而，已知蛋白質於其等之未經修飾形式於活體內被腎過濾、網狀內皮系統中之細胞清除機制、或蛋白分解性降解快速地移除 (Francis (1992) Focus on Growth Factors 3:4-11)。已開發出種種蛋白質與胜肽之修飾以增加治療性蛋白質之穩定性、循環時間與生物活性 (參見 Francis (1992) Focus on Growth Factors 3:4-10)。然而，於所屬技術領域中對於允許如此治療性蛋白質於活體內存留更久之機制存在有需求。

【0006】 治療性單株抗體以及與抗體相關的產品(諸如抗體融合蛋白質、抗體片段、與抗體-藥物共軛物(於以下一起被稱為抗體產品))已漸漸變成生物醫藥市場內之首要產品種類。今日，抗體產品被核准用於治療各種各樣之疾病，包括一些癌症、多發性硬化症、氣喘與類風溼性關節炎(僅列舉一些)。

【0007】 儘管抗體藥物開發領域有此最近之空前成功，對某些疾病目標缺乏效力已促使去尋找新策略以開發更有效之抗體藥物。一種用以改善抗體之效力之方法係去開發同時與二種目標結合之似抗體蛋白質結構(即雙專一性物)。正常之抗體僅可結合一個專一目標(即其具有一種專一性)。

雙專一性物大體而言係一種經設計之蛋白質，其係由二種不同的抗體或似抗體片段（稱為似抗體支架）構成，其等被融合在一起以使得該雙專一性物可同時與二種不同類型之目標結合（即二種專一性）。大部分的似抗體支架大體而言係自抗體之片段構築或自可與專一目標結合（與抗體類似）之似抗體蛋白質製造。雙重專一性抗體允許更有效能之抗體藥物，其可被設計成會使免疫效應細胞（諸如 T 細胞）改向並活化之以專一性地殺死腫瘤；與多種目標結合並實現多種致病性途徑；與一個目標細胞或蛋白質上之多個位置結合以增加專一性或誘發協同性誘發；以及瞄準在本質上係異質之腫瘤。

【0008】 目前，一個利用現存技術且被執行以產生雙專一性抗體產品之重要區別物係將種種似抗體支架融合在一起以產生雙專一性物之一般方法。此類型之雙專一性物具有一些顯著的缺點：首先，藉由將二或多個似抗體支架融合在一起而創造之雙專一性物之小尺寸大體而言係明顯低於腎閾且典型會顯示非常短之血液循環半生期，其範圍在數分鐘至數小時。如此短的半生期使每日之給藥間隔或透過持續灌注成為必須，其可能導致超過藥物之毒性閾值。此外，第二，許多似抗體支架對於其等之目標之親和力係不充分的，而此係由於其等之單價天性（即其等僅具有一個抗原結合位置，相較於具有二個的抗體）。完整之抗體以兩個抗原結合位置結合，改善整體結合強度（稱為結合功效），其相較於單價似抗體支架給予某種優點。

【0009】 目前，僅有數目有限之可產生呈完整 IgG 之形式之雙專一性抗體產品之方法。大體而言，此等方法設計抗體主鏈以允許二個具有不同的專一性之不同的親本抗體結合在一起以形成具有與不同目標結合之複數

臂之單一 IgG（即卡妥索單抗（Catumaxomab））。此完整抗體方法相較於融合較小之片段具有某些優點，然而，雖然此類型之完整 IgG 雙專一性方法迴避於小型片段雙專一性物中所見之半生期問題，其並未解決喪失結合性之問題，而此係因為對於每個目標而言雙專一性物只有一臂與之結合。

【0010】 因此，所屬技術領域中對於以下者有需求：協助改善現存治療性蛋白質與抗原結合性分子之治療效力及/或半生期之改善如此分子之方法。此外，所屬技術領域中對於以下者有需求：克服於目前之雙專一性抗體方法與其等之應用中所見之缺點之方法。

【發明內容】

【0011】 本文之揭示內容係基於用於改善蛋白質或胜肽（包括抗體或免疫球蛋白抗原結合片段）之一或多個特徵之方法。更明確言之，本文之揭示內容係基於藉由使差的治療性蛋白質（例如治療性抗體）轉變成多重專一性形式來改善其之方法。使該蛋白質或胜肽與至少一個於本文中描述之結合功能域分子（BDM）耦合提供雙專一性或多重專一性分子，因此憑藉利用該蛋白質與該 BDM 之不同結合目標（即抗原或表位）而允許該分子與不同的目標結合。因此，該蛋白質或胜肽之一或多個特徵可被改善，包括治療效力、半生期、免疫銜接、結合性、細胞穿透力及/或容忍性。該等分子因此提供傳統雙專一性抗體外之另外的選項。

【0012】 較佳地，被該 BDM 結合之目標抗原或表位與被該蛋白質或胜肽結合之目標抗原或表位不同。例如，該蛋白質可與於細胞或組織上出現之目標抗原或表位結合且該 BDM 可與於免疫調節細胞（諸如細胞毒性 T

細胞)或蛋白質上之目標抗原或表位結合以幫助殺死細胞、或與於人類血清白蛋白(HSA)上之目標抗原結合以使得該蛋白質或胜肽之半生期可被延長。

【0013】 藉由利用該蛋白質或胜肽與該 BDM 與其等之目標之同時結合，該蛋白質或胜肽之治療效力可藉由利用該 BDM 與之結合之目標之官能而促升。藉由使另外的 BDM 與該蛋白質或胜肽耦合，該蛋白質或胜肽可被轉變成雙專一性物、三專一性物或甚至多專一性物。尤其，該等 BDM 之較小尺寸、結合親和力特徵與溶解度使得其等為用於改善差的治療性蛋白質或胜肽之效力(例如促進身體之天然免疫機制以摧毀腫瘤細胞)之理想之劑。

【0014】 本文之揭示內容因此提供能夠與二或多種不同的目標抗原或表位結合之多重專一性分子，該分子包含：

(i)至少一個與第一目標抗原或表位結合之結合功能域分子(BDM)，該 BDM 包含似 V 功能域(VLD)支架或由 VLD 支架組成，其內含有三個暴露之結合環(BL)且其中該三個 BL 中之至少二者相較於其等之支架中的相對應天然序列係經修飾或置換以與異源性目標抗原或表位選擇性結合；與

(ii)藥理活性蛋白質或胜肽，其係與第二目標抗原或表位結合之抗體或其抗原停留片段或非抗體蛋白質或胜肽；

其中該至少一個 BDM 係與該藥理活性蛋白質或胜肽內出現之多肽之 C 端耦合。

【0015】 於一個實例中，該藥理活性蛋白質與其之天然目標抗原或表位結合。

【0016】 較佳地，該等表位係在分開的抗原上。

【0017】 於一個實例中，該第一與第二目標抗原係不同的。於一個實例中，該第一與第二目標抗原係相同的但該分子與該目標抗原上之不同的表位結合。於一個實例中，該第一與第二目標表位係不同的。

【0018】 於一個實例中，該分子係雙專一性物。於一個實例中，該分子係三專一性物。

【0019】 於一個實例中，該分子包含一、二、三、四或五個 BDM（或其多聚體，例如 BDM 二聚體）。於另一個實例中，該分子包含一對或二對 BDM，其中於該對中之該等 BDM 係完全相同的。於一個實例中，一、二或三個 BDM（或其多聚體，例如二聚體）係與該非抗體蛋白質或胜肽耦合。

【0020】 於一個實例中，該分子包含最少二個 BDM，或至少一對 BDM，其中各 BDM（或 BDM 對）與不同的目標抗原或表位結合。於另外的實例中，各 BDM（或 BDM 對）與和該藥理活性蛋白質或胜肽與之結合之目標抗原或表位不同之目標抗原或表位結合。

【0021】 於另一個實例中，二、四、六、或八個 BDM 係與該全長抗體耦合，其中該分子與至少二個不同的目標抗原或表位結合。於一個實例中，該分子與二個不同的目標抗原或表位結合。於另一個實例中，該分子與三個不同的目標抗原或表位結合。於另一個實例中，該分子與四個不同的目標抗原或表位結合。

【0022】 於一個實例中，該醫藥活性蛋白質係全長抗體或免疫球蛋白其抗原結合片段。於另一個實例中，該蛋白質係非抗體蛋白質或胜肽。

【0023】 於一個實例中，該非抗體蛋白質或胜肽係選自由以下者所組

成之群組：凝血因子、抗運載蛋白(anticalin)、類毒素、膠原結合蛋白、人類血清結合蛋白（例如人類血清白蛋白，HSA）、腫瘤壞死因子（TNF）- α 受體結合蛋白、整聯蛋白結合蛋白、血管內皮生長因子（VEGF）或其擬似物、促紅血球形成素（EPO）或其擬似物、C4 結合蛋白、尿激酶受體拮抗劑、淋巴激素、細胞介素、護骨素（osteoprotegerin，OPG）、或選自計畫性細胞死亡 1 蛋白質（PD1）、計畫性死亡配體 1（PD-L1）、NKG2D、與第 I 類 MHC 多肽相關之序列 A（MICA）、與第 I 類 MHC 多肽相關之序列 B（MICB）、UL16 結合蛋白（ULBP）之蛋白質之細胞外功能域。

【0024】 於一個實例中，該凝血因子係因子 VIII 或因子 IX。

【0025】 於一個實例中，該類毒素係肉毒桿菌類毒素。

【0026】 於一個實例中，該淋巴激素係 IL-2 或其擬似物或 GM-CSF 或其擬似物。

【0027】 於一個實例中，該細胞介素係 G-CSF 或其擬似物或幹細胞因子（SCF）或其擬似物。

【0028】 於一個實例中，該分子包含一個與該非抗體蛋白質耦合之 BDM。於一個實例中，BDM 與非抗體蛋白質之比率係 1:1。

【0029】 於一個實例中，該至少一個 BDM 係與抗體重鏈多肽之 C 端耦合。於一個實例中，該至少一個 BDM 係與兩個抗體重鏈多肽之 C 端耦合。

【0030】 於一個實例中，該至少一個 BDM 係與抗體輕鏈多肽之 C 端耦合。於一個實例中，該至少一個 BDM 係與兩個抗體輕鏈多肽之 C 端耦合。

【0031】 於一個實例中，該至少一個 BDM 係與所有抗體重鏈與輕鏈多肽之 C 端耦合。

【0032】 於一個實例中，該至少一個 BDM 係與抗體重鏈多肽之 CH1、CH2 或 CH3 功能域之 C 端耦合。

【0033】 於一個實例中，該至少一個 BDM 係與抗體 Fc 之 C 端耦合。

【0034】 於一個實例中，至少一個 BDM 係與以下者耦合：

- (i) 抗體輕鏈多肽之 C 端；
- (ii) 各個抗體輕鏈多肽之 C 端；
- (iii) 抗體重鏈多肽之 C 端；
- (iv) 各個抗體重鏈多肽之 C 端。

【0035】 根據本文之揭示內容之全長抗體或免疫球蛋白抗原結合片段本身可為單專一性或雙專一性。於單專一性抗體之例子中，其意謂該抗體透過對該目標抗原或表位共有相同之專一性之互補重鏈與輕鏈可變功能域（即一對 V_H/V_L ）與單一目標或表位結合。雙專一性抗體在 Y 形抗體分子之各臂上包含一個 V_H/V_L 對，其中各 V_H/V_L 與不同的目標抗原或表位結合。

【0036】 全長抗體包含二個重鏈與二個輕鏈，各形成一對。因此，於一個實例中，抗體鏈與 BDM 之比率係 4:2。於一個實例中，該分子包含與抗體耦合之四個 BDM（即在各上輕鏈一個 BDM 且在各重鏈上一個 BDM）。於一個實例中，抗體鏈與 BDM 之比率係 4:4。於一個實例中，該分子包含與抗體耦合之六個 BDM。於一個實例中，抗體鏈與 BDM 之比率係 4:6。於另一個實例中，該分子包含與抗體耦合之八個 BDM。於另一個實例中，抗體鏈與 BDM 之比率係 4:8。於另一個實例中，抗體鏈與 BDM 之比率係 4:2ⁿ，其中 n 係介於 1 與 5 間之數字，包括 1 與 5。

【0037】 於一個實例中，該免疫球蛋白抗原結合片段係選自由 Fab、

F(ab')₂、Fab'、scFv、二-scFv、或經化學連接之 F(ab')₂ 所組成之群組。

【0038】 於一個實例中，該分子包含與免疫球蛋白抗原結合片段耦合之單一 BDM。於一個實例中，免疫球蛋白抗原結合片段鏈與 BDM 之比率係 2:1。於一個實例中，免疫球蛋白抗原結合片段鏈與 BDM 之比率係 2:2。於另一個實例中，BDM 之鏈可與該抗原結合片段耦合，其中免疫球蛋白抗原結合片段鏈與 BDM 之比率係 2:n，其中 n 亦介於 1 與 16 間之數字。於另一個實例中，n 係介於 1 與 14 間、介於 1 與 12 間、介於 1 與 10 間、介於 1 與 8 間、介於 1 與 4 間、或 2、或 1 之數字。

【0039】 本文之揭示內容考慮一些其中該至少一個 BDM 可與全長抗體耦合之不同組態，例如：

- (i)至少一個 BDM 係與抗體之重鏈多肽之 CH3 功能域 C 端耦合；
- (ii)至少一個 BDM 係與輕鏈多肽之 CH1 功能域之 C 端耦合；
- (iii)至少一個 BDM 係與重鏈多肽之 CH3 功能域之 C 端耦合並與輕鏈多肽之 CH1 功能域之 C 端耦合；
- (iv)至少一個 BDM 係與兩個重鏈多肽之 CH3 功能域之 C 端耦合；或
- (v)至少一個 BDM 係與兩個輕鏈多肽之 CH1 功能域之 C 端耦合。

【0040】 關於免疫球蛋白抗原結合片段，BDM 可與該免疫球蛋白片段之重鏈或輕鏈之 C 端耦合。於另一個實例中，BDM 可與該免疫球蛋白片段之重鏈與輕鏈兩者之 C 端耦合。於另一個實例中，該 BDM 可與該免疫球蛋白片段（例如 Fab）之輕鏈及/或重鏈之恆定功能域（例如 CH1）耦合。

【0041】 例如：

- (i)至少一個 BDM 係與 Fab 之輕鏈多肽之恆定區域之 C 端耦合；

- (ii)至少一個 BDM 係與 Fab 之重鏈多肽之 CH1 之 C 端耦合；或
- (iii)至少一個 BDM 係與該輕鏈多肽之恆定區域之 C 端及 Fab 之重鏈多肽之 CH1 之 C 端耦合。

【0042】 根據本文之揭示內容之 BDM 較佳包含內含有三個暴露之結合環 (BL) 之支架或係由其組成。該支架可選自由含似免疫球蛋白 (似 Ig) 功能域之超家族成員、似 V 功能域、i-體、VNAR 或 VHH 所組成之群組。

【0043】 於一個實例中，該經暴露之 BL 序列相較於天然 BL 序列係經修飾或置換以提供具有對異源性目標抗原或表位之選擇性結合之經改變之結合環。此等結合環分別被稱為 BL1、BL2 與 BL3，如於圖 1A 中闡明的。該等 BL 係與抗體可變區域之 CDR1、CDR2 與 CDR3 區域類似。

【0044】 於一個實例中，BL1 與 BL3 相較於天然 BL 序列係經修飾或置換。於另一個實例中，BL1、BL2 與 BL3 相較於天然 BL 序列係經修飾或置換。

【0045】 於另一個實例中，該 BDM 支架與人類免疫球蛋白可變區域功能域具有少於約 20% 序列一致性、該支架具有二或多個經改變之 BL 且展現對異源性目標抗原或表位之選擇性結合。

【0046】 該含似 Ig 功能域之超家族成員可選自由以下者所組成之群組：似 V 功能域 (VLD)、C-set 功能域、ThyOx 家族成員多肽、T 細胞受體、CD2、CD4、CD8、第 I 類 MHC、第 II 類 MHC、CD1、細胞介素受體、G-CSF 受體、GM-CSF 受體、激素受體、生長激素受體、促紅血球形成素受體、干擾素 γ 受體、泌乳素受體、NCAM、VCAM、ICAM、N-鈣黏蛋白、E-鈣黏蛋白、纖維接合素、生腱蛋白、與含 I-set 功能域多肽或其等之功能性片段。

【0047】 根據本文之揭示內容之 BDM 支架可選自由似 V 功能域 (VLD)、C1 set 功能域或 C2 set 功能域所組成之群組。與該蛋白質或胜肽耦合之 BDM 之組合亦被考慮。作為闡明，一個 BDM 可係 VLD 且另一個 BDM 可係 C set 功能域。

【0048】 於一個實例中，該 BDM 支架包含天然 VLD 或相較於天然 VLD 具有改變之結合環（即經修飾之 BDM）之 VLD 之細胞外部分或係由其組成，其中該 VLD 係來自選自由以下者所組成之群組之蛋白質：ACAN、ADORA3、ALCAM、JAML、AMIGO1、AXL、basigin、BCAM、BTNL2、3、8、9 或 10、嗜乳脂蛋白（butyrophilin，BTN）、細胞黏著分子（CAM）、CD2、CD4、CD7、CD8、CD28、CD33、CD48、CD79、CD80、CD83、CD86、CD101、CD112、CD226、CD274、CD276、CD300、與癌胚抗原相關之細胞黏著分子（CEACAM）、CRTAM、CTLA4、CXADR、C10orf54、ERMAP、ESAM、FAM187A、FCAMR、F11R、GPA33、玻尿酸與蛋白聚糖連接蛋白（HAPLN）、HAVCR1、HEPACAM、HHLA2、HSPG2、ICOS、IGHA、IGSF、JAM2、JAM3、KDR、KIRREL、LY6G6F、MCAM、MOG、MPZ、MXRA8、NCA、NCR2、NCR3、NPHS1、PD1、PDCD1、PIGR、PILR、PSG、PTGFRN、PVR、鈉通道次單元蛋白質（SCN）、SEMA3D、Silo adhesin 蛋白（SIGLEC）、訊號調節蛋白（SIRP）、SLAMF6、SLAMF7、TIGIT、TIMD4、TREM、TREML、VCAN、VPREB、VSIG、VSTM、與 VTCN1。

【0049】 於一個實例中，該 BDM 支架包含天然 C-set 功能域（C1-set 或 C2-set 功能域）或相較於天然 C-set 功能域具有經改變之結合環之 C-set 功能域（即經修飾之 C-set 功能域）之細胞外部分或係由其組成，其中該 C-set

功能域係來自選自由以下者所組成之群組之蛋白質：AZGP1；basigin、B2M；CEACAM1、3、4、5、6、7、8；CD1A；CD1B；CD1C；CD1D；CD1E；DMA；DQB2；DRB1；ELK2P1；FCGRT；HFE；HHLA2；HLA-A；HLA-B；HLA-B35；HLA-B57；HLA-C；HLA-CW；HLA-Cw；HLA-D；HLA-DMA；HLA-DMB；HLA-DOA；HLA-DOB；HLA-DP；HLA-DPA1；HLA-DPB1；HLA-DQA1；HLA-DQA2；HLA-DQB1；HLA-DQB2；HLA-DRA；HLA-DRB1；HLA-DRB2；HLA-DRB3；HLA-DRB4；HLA-DRw12；HLA-Dw12；HLA-E；HLA-F；HLA-G；HLA-G2.2；HLA-H；HLAC；IGHA1；IGHA2；IGHD；IGHE；IGHG1；IGHG2；IGHG3；IGHG4；IGHM；IGHV4-31；IGKC；IGKV1-5；IGKV2-24；IGL@；IGLC1；IGLC3；IGLL1；IGLV2-14；IGLV3-21；IGLV3-25；IGLV4-3；MICA；MICB；MR1；SIRPA；SIRPB1；SIRPG；SNC73；TAPBP；TAPBPL；TRBC1；TRBV19；TRBV21-1；TRBV3-1；TRBV5-4；TRBV7-2；micB、CD2、CD4、CD80、VCAM 與 ICAM。

【0050】 於一個實例中，該 BDM 支架包含整個天然似 Ig 功能域或相較於天然似 Ig 功能域具有經改變之結合環（即經修飾之似 Ig 功能域）之似 Ig 功能域或其部分或係由其組成，其中該似 Ig 功能域係選自由以下者所組成之群組：ThyOx 家族成員多肽、T 細胞受體、CD2、CD4、CD8、第 I 類 MHC、第 II 類 MHC、CD1、細胞介素受體、G-CSF 受體、GM-CSF 受體、激素受體、生長激素受體、促紅血球形成素受體、干擾素 γ 受體、泌乳素受體、NCAM、VCAM、ICAM、N-鈣黏蛋白、E-鈣黏蛋白、纖維接合素、生腱蛋白、與含 I-set 功能域多肽或其等之功能性片段。

【0051】 術語「經修飾之 VLD」、「經修飾之 C-set 功能域」、等等用

於本文中係關於 BDM，其中所暴露之結合環之至少二者且較佳為三者皆被改變以提供對異源性目標抗原或表位之結合。該改變可藉由胺基酸取代或置換整個個別結合環或其部分來達成。於該結合環中之經改變之胺基酸序列賦予對除被未經改變之含似 Ig 功能域支架結合者以外之目標抗原之選擇性結合活性。該等胺基酸改變可於核酸或多肽水平使用所屬技術領域中已知之方法製造。

【0052】 VLD 或 C-set 功能域可涵蓋與異源性目標抗原或表位結合之 BDM。經修飾之 VLD 或 C-set 功能域亦可包含一或多個改變該 BDM 對其之天然目標之親和力之修飾。該對天然目標之親和力相較於天然 VLD 或 C-set 功能域可係增加或減少。

【0053】 於一個實例中，該經修飾之 BDM 包含與天然 VLD 或 Cset 功能域之序列至少約 60%、70%、75%、80%、85%、87%、90%、或 95%一致之序列或係由其組成。

【0054】 所屬技術領域中具有通常知識者會熟習選擇適當之異源性結合環序列以提供該 BDM 與所欲之目標抗原之結合。如此實例包括該等於 US 7,166,697（其完整內容係藉由引用方式納入本文中）中描述者。

【0055】 於另一個實例中，該 BDM 包含相較於相對應天然 VLD 或 C-set 功能域蛋白包含介於 5 與 30 個胺基酸取代、介於 5 與 20 個胺基酸取代、介於 5 與 15 個胺基酸取代、介於 5 與 10 個胺基酸取代、或至多達 5 個胺基酸取代之整個 VLD 蛋白或 C-set 功能域蛋白或其部分或係由其組成。於另一個實例中，該 BDM 非係於 US 7,094,874 中描述之 CLTA-4 VLD 突變分子 L104EA29Y 或 L104E。

【0056】 於某些實例中，該經修飾之 BDM 包含一個異源性 BL 序列。於另一個實例中，該經修飾之 BDM 包含二個異源性 BL 序列。於又另一個實例中，該 BDM 包含三個異源性 BL 序列。

【0057】 於特別之實例中，該 BDM 係包含 CTLA4、CD28 或 ICOS 之細胞外部分或由其組成之 VLD 支架。於另一個實例中，該 VLD 支架係人類 CTLA4 之細胞外部分。於另一個實例中，該 BDM VLD 包含於以下者提出之序列或係由其組成：

KAMHVAQPAVVLASSRGIA SFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP
YYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN (SEQ ID NO:1)。

【0058】 於一個實例中，位於位置 31 之丙胺酸 (A) 係以酪胺酸 (Y) 取代。於一個實例中，位於位置 56 之甲硫胺酸 (M) 係以蘇胺酸 (T) 置換。

【0059】 於另一個實例中，該 BDM VLD 支架係由對應於 SEQ ID NO:1 之殘基 1 至 25、34 至 54、60 至 96 與 106 至 126 之架構序列組成。

【0060】 於另一個實例中，該 BDM 支架包含與 SEQ ID NO:1 或與 SEQ ID NO:1 之殘基 1 至 25、34 至 54 與 60-107 與 116 至 136 有至少約 70% 序列一致性、或至少 75%、80%、85%、87%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97% 98% 或 99% 一致性之序列或係由其組成。

【0061】 於另一個實例中，天然 BDM 支架之單一之暴露之結合環、二個暴露之結合環或三個暴露之結合環皆可藉由胺基酸取代、添加或刪除、及/或藉由對一或多種物理特徵（例如大小、形狀、電荷、疏水性、等等）之任何改變來修飾。

【0062】 於另一個實例中，天然人類 CTLA-4 VLD 序列之暴露之結合環 (BL1) 序列 ASPGKATE (SEQ ID NO:2) 或 ASPGKYTE (SEQ ID NO:7)、及/或暴露之環 (BL2) 序列 MMGNE (SEQ ID NO:3) 及/或暴露之結合環 (BL3) 序列 ELMYPPPY (SEQ ID NO:4) 係經藉由胺基酸取代、添加或刪除或以異源性序列置換來修飾。

【0063】 於一個實例中，該位於 SEQ ID NO:1 之位置 26 至 33、及/或位置 55 至 59 及/或位置 98 至 105 之胺基酸殘基係經修飾或置換。

【0064】 於另一個實例中，該位於 SEQ ID NO:1 之位置 27 至 33、及/或位置 54 至 62 及/或位置 98 至 106 之胺基酸殘基係經修飾或經異源性序列置換。

【0065】 於另一個實例中，修飾天然人類 CTLA-4 VLD 之功效係徹底破壞該 VLD 對 CD80 與 CD86 之天然親和力。

【0066】 於一個實例中，該 BDM VLD 支架包含以下序列或係由其組成：

KAMHVAQPAVVLASSRGLASFVCEYX_{n1}VRVTVLRQADSQVTEVCAATYX_{n2}
LTFLLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVX_{n3}LGIGNGTQIYVIDP
EPSPDSN (SEQ ID NO:5)

其中 X、X 與 X 係任何胺基酸殘基且 n 係介於 5 與 15 間之數字且數字 1、2 與 3 指示其結合環區域。更明確言之，1、2 與 3 分別對應於該 BDM 之 BL-1、BL-2 與 BL-3。

【0067】 於一個實例中，該 BDM VLD 支架包含以下序列或係由其組成：

KAMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYX_n EVRVTVLRQADSQVTEVCAATYX_n
 2LTLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVX_n3GIGNGTQIYVIDPE
 PSPDSN (SEQ ID NO:6)

其中 X、X 與 X 係任何胺基酸殘基且 n 係介於 5 與 15 間之數字且數字 1、2、
 與 3 指示其結合環區域。更明確言之，1、2 與 3 分別對應於該 BDM 之 BL-1、
 BL-2 與 BL-3。

【0068】 於一個實例中，該 BDM 之 BL-1、BL-2 與 BL-3 分別包含
 ASPGKATE (SEQ ID NO:2) 或 ASPGKYTE (SEQ ID NO:7)、MMGNE (SEQ
 ID NO:3) 與 ELMYPPPYL (SEQ ID NO:9) 或係由其等組成，其中該 BDM
 與 B7-1 結合。

【0069】 於一個實例中，該分子之 BDM 之 BL-1、BL-2 與 BL-3 分別
 包含 TVSWVDME (SEQ ID NO:10)、WNGRW (SEQ ID NO:11) 與
 QLDPSWGYYWQGYE (SEQ ID NO:12) 或係由其等組成，其中該 BDM 與抑
 硬素(sclerostin)結合。

【0070】 於一個實例中，該 BDM VLD 包含以下序列或係由其組成：
 KAMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCA
 ATYMTGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP
 YYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN (SEQ ID NO:13)，其中該 BDM 與 B7-1 結合。

【0071】 於另一個實例中，該 BDM VLD 包含以下序列或係由其組
 成：

KAMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYTVSWVDMEVRVTVLRQADSQVTEVC
 AATYWNGRWLTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVQLDPS

WGYYWQGYEGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN (SEQ ID NO:14), 其中該 BDM 與抑硬素結合。

【0072】 於另一個實例中，該 BDM 之 BL-1、BL-2 與 BL-3 係分別以抗體之 CDR1、CDR2 與 CDR3 序列置換。自其該等 CDR 序列衍生之抗體可衍生自任何物種。於一個實例中，該抗體係衍生自人類。於另一個實例中，該抗體係衍生自家畜，例如貓、狗、兔、天竺鼠或馬。

【0073】 於一個實例中，該至少一個 BDM 可以單體形式或二聚體形式存在於該分子中。於另一個實例中，該至少一個 BDM 可由一系列連接在一起之 BDM 單體組成。

【0074】 因此，術語「BDM」用於本文中係意欲包括呈單體形式之 BDM。於一個實例中，該 BDM 係二聚體。該二聚體可透過於該等 CTLA4 單體之柄部（各柄部對應於將其 VLD 連結至其跨膜區域之約 10 個殘基）中之半胱胺酸殘基（Cys¹²⁰）間之二硫鍵來形成。供選擇地，該二聚體可藉由連接單體單元來形成。於一個實例中，一系列（或菊鍊）之單體 BDM 可被連接在一起。例如，介於 2 與 16 個 BDM 單體可以似菊鍊排列頭尾連結。於另一個實例中，介於 2 與 14 個、介於 2 與 12 個、介於 2 與 10 個、介於 2 與 8 個、或介於 2 與 4 個 BDM 被頭尾連結。

【0075】 BDM 單體之連接可例如藉由使用共價或非共價鍵或藉由使用如於本文中進一步描述的短胜肽連接子來達成。可利用於本文中論及之連接方法學之任一者以將該等 BDM 單體連接在一起。供選擇地，鄰接的 BDM 單體可被直接地融合在一起。

【0076】 於一個實例中，該 BDM 係可溶的。本文之揭示內容之 BDM

支架之「溶解度」與正確折疊的單體功能域之產生有關。溶解度可例如藉由高效能液相層析術（HPLC）評估。例如，可溶的單體 BDM 會在 HPLC 層析圖上引起單一峰，而不可溶的（例如多聚性或聚集性）BDM 會引起複數個峰。

【0077】 該至少一個 BDM 與該藥理活性蛋白質之耦合可藉由所屬技術領域中具有通常知識者已知之方法達成。耦合可例如藉由使用連接子、藉由直接融合、藉由共軛或藉由共價或非共價鍵結來達成。

【0078】 於一個實例中，該藥理活性蛋白質與該至少一個 BDM 之耦合係藉由胜肽連接子達成。所屬技術領域中已知之任何適合的胜肽連接子可被利用於本文之揭示內容中。於一個實例中，該連接子包含序列(SGGGG)_nS (SEQ ID NO:15)，其中 n 係 2 至 8、或 3 至 6 或 3 至 4 之任何數字。於一個實例中，該連接子包含序列 SGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16) 或 SGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:17) 或係由其組成

【0079】 於另一個實例中，該藥理活性蛋白質與該至少一個 BDM 之耦合係在不使用連接子下達成。

【0080】 於一個實例中，該分子能夠與該第一、第二及/或視需要地第三目標抗原同時結合。

【0081】 於另一個實例中，該分子能夠同時與 B7-1-Fc 及抑硬素結合。

【0082】 於另一個實例中，該藥理活性蛋白質或胜肽與該至少一個 BDM 專一性地與其等各自之目標抗原結合。於另一個實例中，該分子與表現被該分子之個別 BDM 與醫藥活性蛋白質部分辨識之二或多種不同的目標抗原或表位之細胞選擇性地結合但不與僅僅表現該等目標抗原或表位之一

者之細胞結合。

【0083】 本文之揭示內容亦提供包含與藥理活性蛋白質或胜肽耦合之 BDM 支架之多肽。於一個實例中，該多肽進一步包含連接子。於一個實例中，該連接子包含序列 (SGGGG)_nS，其中 n 係 2 至 8、或 3 至 6 或 3 至 4 之任何數字。於一個實例中，該連接子包含以下序列或係由其組成：SGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16) 或 SGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:17)。

【0084】 本文之揭示內容亦提供選自包含以下者之任一者之序列或由其等所組成之群組之多肽：SEQ ID NO: 5、6、13、14、19、21、22、23、24、25、27、28 或 29 之任一者之序列。較佳地，該多肽係經分離的。於一個實例中，本文之揭示內容之多肽包括多肽標籤。適合的標籤之實例包括（但不限於）p97 分子、myc、六-his 標籤、flag、E7。

【0085】 於一個實施方式中，根據本文之揭示內容之分子係核酸。本文之揭示內容亦提供編碼本文之揭示內容之多肽（尤其係 SEQ ID NO: 5、6、13、19、21、22、23、24、25、27、28 或 29 之任一者之多肽）之核酸。核酸可包含 DNA 或 RNA 或兩者。

【0086】 於一個實例中，該分子包含於以下提出之 BDM VLD 之核酸序列或係由其組成：

GCCATGGCAAAAGCAATGCATGTTGCACAGCCTGCAGTTGTTCTGGCAAG
CAGCCGTGGTATTGCCAGCTTTGTTTGTGAGTATN1GTGCGCGTGACCGTT
CTGCGTCAGGCAGATAGCCAGGTTACCGAAGTTTGTGCAGCAACCTATN2
CTGACCTTTCTGGATGATAGCATTTGTACCGGCACCAGCAGCGGTAATCA

GGTTAATCTGACCATTTCAGGGTCTGCGTGCAATGGATACCGGTCTGTATA
TTTGCAAAGTTN3CTGGGCATTGGCAATGGCACCCAGATTTATGTTATTGA
TCCTGAACCGTCACCGGATAGCAATGCGGCCGC (SEQ ID NO:30)

其中 N1 係編碼第一結合環之核苷酸之長度、N2 係編碼第二結合環之核苷酸之長度且 N3 係編碼第三結合環之核苷酸之長度。於一個實例中，N1、N2 與 N3 係介於 15 與 45 個核苷酸。於一個實例中，N1 係介於 15 與 24 個核苷酸。N2 係 15 個核苷酸且 N3 係介於 30 與 45 個核苷酸。N 係任何核苷酸 (A、C、T、G)。

【0087】 於一個實例中，該核酸係於表現構築體中提供，於該構築體中該核酸係可操作地連接至啟動子。如此表現構築體可呈載體，例如質體。於一個實例中，該表現構築體可係雙順反子表現構築體。本文之揭示內容亦考慮用於該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段之重鏈與輕鏈之分開之表現構築體。例如，一個載體可包含編碼該免疫球蛋白輕鏈與 BDM VLD 之核酸且另一者其包含碼免疫球蛋白重鏈之核酸或反之亦然。

【0088】 該核酸可進一步包括一個部分 (例如 FLAG) 以幫助純化與鑑認。用於在各種各樣之不同宿主細胞中選殖與表現多肽之系統係已知的且如於本文中進一步描述的。

【0089】 本文之揭示內容亦提供以於本文中描述之核酸轉形之宿主細胞。適合的宿主細胞包括細菌、哺乳類動物細胞、酵母菌、苔蘚 (苔蘚植物)、與桿狀病毒系統。

【0090】 本文之揭示內容亦提供用於製造本文之揭示內容之多肽分子之方法，其包含在使該多肽之表現成為可能之條件下培養本文之揭示內

容之宿主細胞並視需要地回收該多肽。取決於宿主細胞之選擇，該多肽可經醣化或未經醣化。

【0091】 本文之揭示內容亦提供用於製造包含至少一個與藥理活性蛋白質耦合之 BDM VLD 之多重專一性分子之方法，該方法包含：

- (i)提供編碼 BDM VLD 序列之核酸，其中該 VLD 之三個 BL 中之至少二者係經修飾或經異源性序列置換；
- (ii)提供編碼藥理活性蛋白質或胜肽之核酸；與
- (iii)視需要地提供編碼連接子序列之核酸；
- (iv)於適合的載體中表現該等核酸序列；
- (v)回收經表現之蛋白質。

【0092】 本文之揭示內容亦提供用於製造包含至少一個與抗體耦合之 BDM VLD 之多重專一性分子之方法，該方法包含：

- (i)提供編碼抗體輕鏈序列或其部分之核酸；
- (ii)提供編碼抗體重鏈序列或其部分之核酸；
- (iii)提供編碼 BDM VLD 序列之核酸，其中該 VLD 之三個 BL 中之至少二者係經修飾或經異源性序列置換；
- (iv)於一或多個適合的載體中表現該等核酸序列；與
- (v)回收經表現之蛋白質。

【0093】 於根據該方法之一個實例中，該抗體重鏈係由全長序列組成。於根據該方法之另一個實例中，該抗體重鏈係由可變區域與至少 CH1 區域組成。於另一個實例中，該抗體重鏈係由可變區域與至少 CH1 與 CH2 區域組成。

【0094】 於根據該方法之一個實例中，不存在連接子序列且該藥理活性蛋白質或胜肽與 BDM VLD 之核酸序列係連續的。於另一個實例中，不存在連接子序列且該等編碼該抗體重鏈及/或輕鏈與 BDM 序列之核酸序列係連續的。

【0095】 該抗體核酸序列可進一步包含鉸鏈區域。

【0096】 本文之揭示內容亦提供一或多個包含一或多個於本文中描述之核酸序列之載體。於一個實例中，該載體包含編碼如於本文中描述之藥理活性蛋白質與該 BDM VLD 之核酸序列且視需要地包含編碼該連接子之核序列。於一個實例中，該（等）載體包含編碼如於本文中描述之抗體輕鏈或重鏈之核酸序列與編碼 BDM VLD 之核酸序列且視需要地包含編碼該連接子之核酸序列。於另一個實例中，該（等）載體包含編碼如於本文中描述之抗體重鏈與輕鏈兩者之核酸序列與編碼 BDM VLD 之核酸序列且視需要地包含編碼該連接子之核酸序列。

【0097】 本文之揭示內容亦提供宿主細胞，其含有於本文中描述之載體或含有一或多個於本文中描述之核酸序列。

【0098】 本文之揭示內容亦提供藉由於本文中描述之方法製造之多重專一性分子。

【0099】 本文之揭示內容之分子可以組成物之形式提供。因此，於另一個實施方式中，本文之揭示內容提供包含於本文中描述之多重專一性分子加上醫藥上可接受之載劑及/或賦形劑之醫藥組成物。該組成物可以醫藥品之形式提供。於一個實例中，該組成物係供用於治療失調。於另一個實例中，該組成物係用於抗老化或作為化妝品。

【0100】 於另一個實例中，該分子可以一個劑標記以幫助偵測。

【0101】 本文之揭示內容之組成物亦可以具有供根據一個特殊治療適應症使用之用法說明之套組之形式提供。

【0102】 本文之揭示內容亦提供如於本文中描述之多重專一性分子之用途，其用於偵測該分子之一或多個部分與之結合之一或多個目標抗原。

【圖式簡單說明】

【0103】 圖 1 提供 (A) 天然人類 CTLA4 VLD 支架之序列之示意圖，該示意圖顯示其之架構序列與結合環 1、2 與 3 之序列所在之位置（稱為 BL1、BL2 與 BL3）。B 顯示於該 CTLA4 VLD 中之結合環置換之位置，其中 BL1 係以 X_{n1} 稱呼、BL2 係以 X_{n2} 稱呼且 BL3 係以 X_{n3} 稱呼，其中 X 係任何胺基酸且 n 係介於 5 與 15 間之數字。C 顯示抑硬素人類 VLD 支架之序列，其中其結合環區域之序列被加底線。

【0104】 圖 2 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之抗體-VLD 雙專一性分子之示意圖。該抗體通過其之重鏈與輕鏈 V 功能域與目標 A 結合。接附至該抗體重鏈之 C 端 CH3 恆定功能域之 VLD 與目標 B 結合。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

【0105】 圖 3 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之抗體-VLD 雙專一性分子之示意圖。該抗體通過其之重鏈與輕鏈 V 功能域與目標 A 結合。VLD 係接附於其之輕鏈之各恆定功能域（恆定輕，CL）之 C 端並與目標 B 結合。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

【0106】 圖 4 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之抗體-VLD 三專

一性分子之示意圖。該抗體通過其之重鏈與輕鏈 V 功能域與目標 A 結合。VLD 係接附至各輕鏈恆定功能域 (CL) 與重鏈恆定功能域 (CH3) 之 C 端。該三專一性物可與目標 A 與 B 及 C 個別或同時結合或於該三個目標之組合 (例如目標 A 與 B 或目標 A 與 C 或目標 B 與 C) 中與之結合。

【0107】 圖 5 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之 Fab-VLD 雙專一性分子之示意圖。其之 Fab 通過其之重鏈與輕鏈 V 功能域與目標 A 結合。VLD 係接附至其之重鏈恆定功能域 (CH1) 之 C 端並與目標 B 結合。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

【0108】 圖 6 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之 Fab-VLD 雙專一性分子之示意圖。其之 Fab 通過其之重鏈與輕鏈 V 功能域與目標 A 結合。VLD 係接附至其之輕鏈恆定功能域 (CL) 之 C 端並與目標 B 結合。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

【0109】 圖 7 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之 Fab-VLD 三專一性分子之示意圖。其之 Fab 通過其之重鏈與輕鏈 V 功能域與目標 A 結合。一個 VLD 係接附至其之輕鏈恆定功能域 (CL) 之 C 端並與目標 B 結合且一個 VLD 係接附至其之重鏈恆定功能域 (CH1) 之 C 端並與目標 C 結合。該三專一性物可與目標 A 與 B 與 C 個別或同時結合或於該三個目標之組合 (例如目標 A 與 B 或目標 A 與 C 或目標 B 與 C) 中與之結合。

【0110】 圖 8 顯示在非還原條件下親本 D1.3 Fab 與雙專一性及三專一性變體之表現 (SDS PAGE)。D1.3 Fab 係抗溶菌酶 Fab ; D1.3 FabVLDx1 (HC) 係具有融合至其之重鏈之 CH1 功能域之 VLD 之抗溶菌酶 Fab ; D1.3 Fab-VLDx1 (LC) 係具有融合至其之輕鏈之 CL 功能域之 VLD 之抗溶菌酶

Fab ; D1.3 Fab-VLDx2 (HC+LC)係具有融合至其之重鏈之 CH1 功能域與輕鏈之 CL 功能域之 VLD 之抗溶菌酶 Fab。

【0111】 圖 9 顯示在還原條件下親本 D1.3 Fab、其雙專一性與三專一性變體之 SDS PAGE 表現分析。D1.3 Fab 係抗溶菌酶 Fab ; D1.3 FabVLDx1 (HC)係具有融合至其之重鏈之 CH1 功能域之 VLD 之抗溶菌酶 Fab ; D1.3 VLDx1 (LC)係具有融合至其之輕鏈之 CL 功能域之 VLD 之抗溶菌酶 Fab ; D1.3 VLDx2 (HC+LC)係具有融合至其之重鏈之 CH1 功能域與輕鏈之 CL 功能域之 VLD 之抗溶菌酶 Fab。

【0112】 圖 10 顯示雙專一性物[IgG VLDx2 (HC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對 B7.1-Fc 之第二結合之 BLitz[®] 分析。該雙專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈之 B7-1 結合性 VLD。曲線 1 係 D1.3 抗溶菌酶抗體對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 2 係 D1.3 抗溶菌酶抗體對溶菌酶之結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。曲線 3 係雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (HC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 4 係雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (HC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。此感應圖 (sensogram) 展示對溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。

【0113】 圖 11 顯示雙專一性物[IgG VLDx2 (LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對 B7-1-Fc 之第二結合之 BLitz[®] 分析。該雙專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]輕鏈之 B7-1 結合性 VLD。

曲線 1 係 D1.3 抗溶菌酶抗體對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 2 係 D1.3 抗溶菌酶抗體對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。曲線 3 係雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 4 係雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。該感應圖展示對溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。

【0114】 圖 12 顯示三專一性物[IgG VLDx4 (HCLC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對 B7-1-Fc 之第二結合之 BLitz[®]分析。該三專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈與輕鏈兩者之 B7-1 結合性 VLD。曲線 1 係 D1.3 抗溶菌酶抗體對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 2 係 D1.3 抗溶菌酶抗體對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。曲線 3 係三專一性物 D1.3 IgG-VLDx4 (HCLC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 4 係三專一性物-D1.3 IgG-VLDx4 (HCLC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。該感應圖展示對溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。

【0115】 圖 13 顯示展示 B7-1-Fc 相較於雙專一性物被三專一性物結合增加之 BLitz[®]分析。相等數目之抗體、雙專一性與三專一性分子在接附至生物感應器表面之經生物素標記溶菌酶上被捕捉接著添加緩衝劑或 B7-1-Fc

(於點 1) 以展示相較於該雙專一性物該三專一性物之增加的結合能力。曲線 1 係用於構築該雙專一性物與三專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]。所結合之抗體係伴隨於點 1 之單獨緩衝劑之注射顯示。曲線 2 係 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]，其係伴隨於點 1 之 B7-1-Fc 之注射顯示 於點 2，B7-1-Fc 係以緩衝劑置換。曲線 3 係具有融合至其之抗體 CL 鏈之 VLD 之雙專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[雙專一性物-D1.3 IgGVLDx2 (LC)]。所捕捉之雙專一性物被顯示與於點 1 注射之 B7-1-Fc 結合。於點 2，B7-1-Fc 係以緩衝劑置換。曲線 4 係具有融合至其之抗體 CH 與 CL 鏈之 VLD 之三專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[三專一性物-D1.3 IgG-VLDx4 (HC+LC)]。所捕捉之雙專一性物被顯示與於點 1 注射之 B7-1-Fc 結合。於點 2，B7-1-Fc 係以緩衝劑置換。

【0116】 圖 14 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其等顯示雙專一性物[IgG VLDx2 (HC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc (50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 µg/ml) 之第二結合。該雙專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈之 B7-1 結合性 VLD。

【0117】 圖 15 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其等顯示雙專一性物[IgG VLDx2 (LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc (50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 µg/ml) 之第二結合。該雙專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]輕鏈之 B7-1 結合性 VLD。

【0118】 圖 16 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其等顯示三專一性物[IgG VLDx4 (HC+LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記

溶菌酶之最初結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc (50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$) 之第二結合。該三專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈與輕鏈兩者之 B7-1 結合性 VLD。

【0119】 圖 17 顯示重疊之 SPR 結合感應圖，其等顯示雙專一性物 [Fab-VLDx1 (HC)]對溶菌酶之結合接著一濃度系列之 B7-1Fc (25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{g/ml}$) 之同時結合。該雙專一性物具有融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]重鏈之 B7-1 結合性 VLD。

【0120】 圖 18 顯示重疊之 SPR 結合感應圖，其等顯示雙專一性物 [Fab-VLDx1 (LC)]對溶菌酶之結合接著一濃度系列之 B7-1Fc (25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{g/ml}$) 之同時結合。該雙專一性物具有融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]輕鏈之 B7-1 結合性 VLD。

【0121】 圖 19 顯示重疊之 SPR 結合感應圖，其等顯示三專一性物 [FabVLDx2 (HC+LC)]與溶菌酶之結合接著一濃度系列之 B7-1-Fc (25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{g/ml}$) 之同時結合。該三專一性物具有融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]重鏈與輕鏈兩者之 B7-1 結合性 VLD。

【0122】 圖 20 顯示以由針對雙專一性與三專一性抗體-VLD 分子與 B7-1-Fc 之結合之 SPR 分析測定之 R_{MAX} (最大能力) 之百分比測定之結合化學計量。

【0123】 圖 21 顯示以由針對雙專一性與三專一性 Fab-VLD 分子與 B7-1-Fc 之結合之 SPR 分析測定之 R_{MAX} 之百分比測定之結合化學計量。

【0124】 圖 22 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其等展示三專一性物[IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)]與經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物

素標記溶菌酶之最初結合接著與 B7-1-Fc 和抑硬素之相繼及同時結合。該三專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈之抑硬素 (Sc1) 結合性 VLD 與融合至其之輕鏈之 B7-1 結合性 VLD。僅僅 B7-1-Fc 之曲線係該三專一性物之感應圖，其顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合接著 B7-1-Fc 之添加。該感應圖展示與溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。僅僅抑硬素之曲線係三專一性物之感應圖，其顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合接著抑硬素之添加。該感應圖展示與溶菌酶及抑硬素之同時雙重目標結合。B7-1-Fc 與抑硬素曲線係該三專一性物之感應圖，其顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合接著 B7-1-Fc 之添加、與再接著抑硬素之添加。該感應圖展示與溶菌酶及 B7-1-Fc 及抑硬素之同時三目標結合。

注射三專一性物：IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被添加之點。曲線顯示 B7-1Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)之結合。

注射緩衝劑 2：B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶接附之 IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)之解離

注射抑硬素：第三分析物抑硬素被添加之點。曲線顯示抑硬素對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 IgG VLDx4 (Scl-HC)(B7-LC)之結合，而 IgG VLDx4 (Scl-HC)(B7-LC)仍同時結合 B7-1-Fc。

注射緩衝劑 3：抑硬素之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示抑硬素自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶接附之 IgG VLDx4 (Scl-HC)(B7-LC)之解離。

【0125】 圖 23 顯示展示三專一性物[Fab VLDx2 (B7-HC)(Scl-LC)]與經鍵黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著與 B7-1-Fc 和抑硬素之相繼及同時結合之 BLitz®結合分析。該三專一性物具有一個融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]輕鏈之抑硬素結合性 VLD 與一個融合至其之重鏈之 B7-1 結合性 VLD。曲線顯示該三專一性物對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合接著 B7-1-Fc 之添加。該結合曲線展示與溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。抑硬素被添加以展示與溶菌酶及 B7-1-Fc 及抑硬素之同時三目標結合。

添加三專一性物：Fab VLDx2 (B7-l-HC)(Scl-LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 Fab VLDx2 (B7-l-HC)(Scl-LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

添加 B7-1-Fc：B7-1-Fc 被添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 Fab VLDx2 (B7l-HC)(Scl-LC)之結合。

添加抑硬素：抑硬素被添加之點。曲線顯示抑硬素對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 Fab VLDx2 (B7l-HC)(Scl-LC)之結合而 Fab VLDx2 (B7l-HC)(Scl-LC)仍同時結合 B7-1-Fc。

添加緩衝劑：抑硬素係以緩衝劑置換之點。

【0126】 圖 24 顯示顯示展示三專一性物[Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-LC)]與經鍵黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著與 B7-1-Fc 和抑硬素之相繼及同時結合之 BLitz[®]結合分析。該三專一性物具有一個融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]重鏈之抑硬素結合性 VLD 與一個融合至其之輕鏈之 B7-1 結合性 VLD。曲線顯示該三專一性物對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合接著 B7-1-Fc 之添加。該結合曲線展示與溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。抑硬素被添加以展示與溶菌酶及 B7-1-Fc 及抑硬素之同時三目標結合。

添加三專一性物：Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

添加 B7-1-Fc：B7-1-Fc 被添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-LC)之結合。

添加抑硬素：抑硬素被添加之點。曲線顯示抑硬素對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-LC)之結合而 Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-LC)仍同時結合 B7-1-Fc。

添加緩衝劑：抑硬素係以緩衝劑置換之點。

【0127】 圖 25 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之與 VLD 耦合之蛋白質（一般表現）之示意圖。該蛋白質與目標 A 結合。VLD 係接附至該蛋白質多肽之 C 端並與目標 B 結合。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

【0128】 圖 26 顯示使用抗 His 辣根過氧化酶（HRP）之經純化人類血清白蛋白（HAS）- VLD 融合蛋白質之西方墨點轉漬分析與偵測。第 1 道係具有融合至其之 C 端之 VLD 之 HSA；第 2 道係具有融合至其之 N 端之 VLD 之 HSA；第 3 道係具有融合至其之 N 端與 C 端兩者之 VLD 之 HSA。

【0129】 圖 27 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示 HSA-VLD 融合蛋白質與 B7-2-Fc 之結合之分析。曲線 1 對應於呈接附至 HSA 之 C 端之 B7-2 結合性 VLD 之 HSA-VLD 融合蛋白質。曲線 2 對應於具有接附至 HSA 之 N 與 C 端兩者之 B7-2 結合性 VLD 之 VDL-HSA-VLD 構築體。點 1 對應於緩衝劑之添加。

【0130】 圖 28 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示 HSA-VLD 與 CD3 之結合之分析。所顯示之曲線對應於該分子與 CD3de 之結合。點 1 對應於緩衝劑之添加。

【0131】 圖 29 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示 HSA-VLD 融合蛋白質與抗 HSA 親和體（affibody）及 B7-2-Fc 之結合之分析。所顯示之曲線對應於該分子與抗 HSA 親和體之結合。點 1、2 與 3 對應於緩衝劑之添加。

序列表之解釋

【0132】 SEQ ID NO:1 人類天然 CTLA4 支架（細胞外功能域）之序列

【0133】 SEQ ID NO:2 CTLA4 之暴露之結合環 1 之序列

【0134】 SEQ ID NO:3 CTLA4 之暴露之結合環 2 之序列

- 【0135】 SEQ ID NO:4 CTLA4 之暴露之結合環 3 之序列
- 【0136】 SEQ ID NO:5 BDM VLD 支架之序列
- 【0137】 SEQ ID NO:6 BDM VLD 支架之序列
- 【0138】 SEQ ID NO:7 結合環 1 序列
- 【0139】 SEQ ID NO:8 訊號胜肽序列
- 【0140】 SEQ ID NO:9 結合環 3 序列
- 【0141】 SEQ ID NO:10 結合環 1 序列
- 【0142】 SEQ ID NO:11 結合環 2 序列
- 【0143】 SEQ ID NO:12 結合環 3 序列
- 【0144】 SEQ ID NO:13 B7-1 結合性 VLD 支架之序列
- 【0145】 SEQ ID NO:14 抑硬素結合性 VLD 支架之序列
- 【0146】 SEQ ID NO:15 連接子序列
- 【0147】 SEQ ID NO:16 連接子序列
- 【0148】 SEQ ID NO:17 連接子序列
- 【0149】 SEQ ID NO:18 抗溶菌酶 IgG1 重鏈之序列
- 【0150】 SEQ ID NO:19 藉由連接子與 B7-1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌
酶 IgG1 重鏈之序列
- 【0151】 SEQ ID NO:20 抗溶菌酶 IgG κ 輕鏈之序列
- 【0152】 SEQ ID NO:21 藉由連接子與 B7-1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌
酶 IgG κ 輕之序列
- 【0153】 SEQ ID NO:22 藉由連接子與 B7-1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌
酶 Fab κ 輕鏈之序列

【0154】 SEQ ID NO:23 藉由連接子與 B7-1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌酶 Fab 重鏈之序列

【0155】 SEQ ID NO:24 具有 C 端組胺酸與 myc 標籤之抗溶菌酶 Fab 重鏈之序列

【0156】 SEQ ID NO:25 融合至抗抑硬素 VLD 之抗溶菌酶 IgG1 重鏈之序列

【0157】 SEQ ID NO:26 融合至人類血清白蛋白之 C 端之 B7-2 結合性 VLD 之序列

【0158】 SEQ ID NO:27 融合至人類血清白蛋白之 N 端之 B7-2 結合性 VLD 之序列

【0159】 SEQ ID NO:28 融合至人類血清白蛋白之 N 端與 C 端兩者之 B7-2 結合性 VLD 之序列

【0160】 SEQ ID NO:29 融合至人類血清白蛋白之 C 端之 CD3 結合性 VLD 之序列

【0161】 SEQ ID NO:30 BDM VLD 支架之核苷酸序列。

【實施方式】

一般

【0162】 於本說明書通篇，除非明確地另外陳述或前後文要求另外者，提及一個單步驟、物質之組成物、步驟之群組或物質之組成物之群組應被理解成涵蓋一個與複數個（即一或多個）該等步驟、物質之組成物、步驟之群組或物質之組成物之群組。

【0163】 所屬技術領域中具有通常知識者會領會到本文之揭示內容容許該等具體描述者以外之變化與修飾。應瞭解本文之揭示內容包括所有如此變化與修飾。本文之揭示內容亦包括於此說明書中個別或共同地提及或指出之步驟、特徵、組成物與化合物之所有者、以及該等步驟或特徵之任二或多者之任何及所有組合。

【0164】 本文之揭示內容之任何實例或實施方式應被理解成準用於本文之揭示內容之任何其他實例，除非明確地另外陳述。

【0165】 除非明確地另外定義，於本文中使用的所有技術與科學術語應被理解成具有與所屬技術領域中（例如，於細胞培養、分子遺傳學、免疫學、免疫組織化學、蛋白質化學、與生物化學中）具有通常知識者所通常瞭解者相同之意義。

【0166】 除非另外指出，於本文之揭示內容中利用之重組蛋白質、細胞培養、與免疫技術係標準程序，對所屬技術領域中具有通常知識者而言係廣為人知。如此技術係在諸如以下者之來源中之文獻通篇中描述與解釋：J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook 等人 Molecular Cloning: A Laboratory Manual，冷泉港實驗室出版社(1989)、T.A. Brown (編者), Essential Molecular Biology: A Practical 15 Approach, 第1及2冊, IRL Press (1991)、D.M. Glover與B.D. Hames (編者), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1-4冊, IRL Press (1995與1996)、與F.M. Ausubel 等人(編者), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988，包含迄今之所有更新)、Ed Harlow與David Lane (編者) Antibodies: A Laboratory Manual，冷泉港實驗室，(1988)、

與 J.E. Coligan 等人(編者) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons
(包含迄今之所有更新)

【0167】 於本文中可變區域及其部分、免疫球蛋白、抗體及其片段之描述與定義可藉由於以下者中之討論進一步澄清: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, 國家衛生研究院, 貝什斯達, Md., 1987 與 1991、Bork 等人, J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994、Chothia 與 Lesk J. Mol Biol. 196:901-917, 1987、Chothia 等人 Nature 342, 877-883, 1989 及/或或 Al-Lazikani 等人, J Mol Biol 273, 927-948, 1997

【0168】 術語「及/或」, 例如「X 及/或 Y」應被理解成意謂「X 與 Y」或「X 或 Y」且應被理解成對於兩者皆之意義或對於任一者之意義提供明確之支持。

【0169】 用於本文中, 「一 (a)」或「一 (an)」意謂「至少一個」或「一或多個」, 除非前後文暗示其他者。

【0170】 於本說明書通篇, 字詞「包含 (comprise)」或諸如「包含 (comprises)」或「包含 (comprising)」之變體會被理解成暗示包含所陳述之元件、整數或步驟、或元件、整數或步驟之群組, 但不排除任何其他元件、整數或步驟、或元件、整數或步驟之群組。

所選定義

【0171】 用於本文中之胺基酸序列中之字母「x」係意欲指示二十種標準胺基酸之任一者可被置於此位置, 除非明確地指明其他者。

【0172】 用於本文中, 「一致性」意謂當二或多個序列被排比以使序

列吻合最大化（即考慮到間隙與插入）時於該等序列中於相對應位置之完全相同之核苷酸或胺基酸殘基之百分比。一致性可藉由已知方法輕易地計算，該等方法包括但不限於該等於以下者中描述者：Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., 牛津大學出版社，紐約，1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press，紐約，1993；Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M.、與 Griffin, H. G., eds., Humana Press，新澤西，1994；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987；與 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.與 Devereux, J., eds., M Stockton Press，紐約，1991；與 Carillo, H.、與 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 15 1073 (1988)。用於測定一致性之方法係經設計以於所測試之序列間給出最大之吻合。此外，用於測定一致性之方法被編成公眾可得之電腦程式。用於測定二序列間之一致性之電腦程式方法包括（但不限於）GCG 套裝程式（Devereux, J.、等人，Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、與 FASTA（Altschul, S. F.等人，J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)與 Altschul 等人 Nuc. Acids Res. 25: 3389- 3402 (1997))。BLAST X 程式係公眾可得自 NCBI 與其他來源（BLAST 手冊，Altschul, S.、等人，NCBI NLM NIH 貝什斯達，Md. 20894；Altschul, S.、等人，J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)。

【0173】 術語「序列一致性」用於本文中意調在排比本文之揭示內容之多肽之序列與討論中之序列後有關於此等二個序列中之較長者之殘基數目之配對上完全相同殘基之百分比。一致性係藉由完全相同殘基之數目除以殘基之總數並將結果乘以 100 來測量。因此，二序列間之一致性典型會

以百分比表現。

【0174】 術語「免疫球蛋白」係關於一個多肽之家族，該等多肽保有抗體分子之免疫球蛋白折疊特徵，其含有二個 β 褶板且通常含有保留之二硫鍵。Ig 超家族之成員包括抗體、T 細胞受體分子與類似者、ICAM 分子（其等涉及細胞黏著）、受體分子，諸如涉及細胞內之傳訊之 PDGF 受體。較佳地，本發明係關於抗體。

【0175】 「似免疫球蛋白功能域」係關於一種於具有多樣之功能之蛋白質（包括（例如）細胞外基質蛋白質、肌肉蛋白質、免疫蛋白質、細胞表面受體與酵素）中找到之 β 三明治摺疊結構模體。似 Ig 功能域成員已被區分成種種超家族，包括（例如）免疫球蛋白、第 III 類纖維接合素與鈣黏蛋白超家族。其他含有該似 Ig 功能域結構模體之超家族包括（例如）PKD 功能域、 β -半乳糖苷酶/葡萄糖醛酸酶功能域、轉麩醯胺酸酶二 C 端功能域、似放射黃質素（actinoxanthin）、似 CuZn 過氧化物歧化酶、似 CBD9、核片層蛋白 A/C 球狀尾部功能域、格形蛋白連接物附加物功能域、整聯蛋白功能域、似 PapD、紫色酸性磷酸酶 N 端功能域、似過氧化物還原酶、硫醇:二硫化物互變蛋白 DsbD N 端功能域與 invasin/intimin 細胞黏著片段超家族之成員。無論重要序列一致性，似 Ig 功能域結構相似性係於不同超家族之成員間維持。該術語係意欲包括各超家族內與跨各超家族之似 Ig 功能域成員。因此，術語「含似免疫球蛋白（似 Ig）功能域超家族」係意欲關於此等超家族之任一者內之含似 Ig 功能域成員多肽以及其他所屬技術領域中已知者。關於不同的含似 Ig 功能域超家族之描述可（例如）於 Clarke 等人，Structure Fold. Des. 7:1145-53 (1999) 中與於結構資料庫（諸如 URL

pdb.weizmann.ac.il/scop/data/scop.b.c.b.html) 內找到。

【0176】 術語「抗體」可包括所有種類，例如 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE 或次種類，例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 與 IgA₂，無論是衍生自任何天然會製造抗體之物種或藉由重組 DNA 技術創造，無論是自血清、B 細胞，融合瘤、轉染瘤 (transfectoma)、酵母菌或細菌分離或合成地製造。術語「抗體」涵蓋單株抗體、多株抗體、人類抗體、人化抗體、嵌合抗體、靈長類化抗體或類人化 (synhumanized) 抗體。術語「人類抗體」係關於含有人類來源之序列 (除了可能之非人類 CDR 區域) 且於人類中具有最小之致免疫性之抗體。

【0177】 術語「全長抗體」用於本文中係意欲關於一種呈其實質上完整無缺之形式之抗體，其與抗體之抗原結合片段相反。其可經分離或重組。特別地，完整抗體包括該等具有重鏈與輕鏈包括 Fc 區域者。恆定功能域可為野生型序列恆定功能域 (例如人類野生型序列恆定功能域) 或其胺基酸序列變體。該抗體蛋白質包含由複數個多肽鏈 (例如一個包含輕鏈可變區域 (VL) 之多肽與一個包含重鏈可變區域 (VH) 之多肽) 構成之可變區域。抗體亦包含恆定功能域，其等中之一些可被佈置成恆定區域，其包括恆定片段或可結晶片段 (Fc) (於重鏈之實例中)。VH 與 VL 交互作用以形成包含能夠專一性地與一個或一些密切相關之抗原結合之抗原結合區域之 Fv。該抗體與抗原之結合交互作用可以與互補決定區域 (CDR) 之一或多個胺基酸殘基之分子間接觸表明。大體而言，來自哺乳類動物之輕鏈係 κ 輕鏈或 λ 輕鏈且來自哺乳類動物之重鏈係 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、或 μ 。抗體可係任何類型 (例如、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、與 IgY)、種類 (例如、IgG1、

IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 與 IgA2) 或次種類。該抗體可係人類、人化、或嵌合抗體。於又另一個實例中，該抗體係鮫、駱駝科、貓或犬抗體。

【0178】 術語「免疫球蛋白抗原結合片段」用於本文中係意欲關於一種抗體之片段，該片段包括具有互補決定區域 (CDR) 之輕鏈可變區域與重鏈可變區域。該術語涵蓋 Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、二-scFv、或經化學連接之 F(ab')₂。

【0179】 術語「Fab 被理解成係關於一種抗體之區域，其結合抗原且係由其之重鏈與輕鏈之各者之一個恆定功能域與一個可變功能域構成。

【0180】 術語「互補」係關於形成同源對之免疫球蛋白功能域。例如，抗體之 VH 與 VL 功能域係互補的，二 VH 功能域並非互補的且二 VL 功能域並非互補。

【0181】 術語「功能域」係關於一種折疊之蛋白質結構，其獨立於該蛋白質之剩下的部分保有其之三級結構。

【0182】 術語「CDR」或「互補決定區域」係意欲意謂抗體或抗體片段內之重鏈與輕鏈多肽兩者之可變區域內找到的非連續性抗原組合位置 (其與抗原結合)。此等特殊之區域已被以下者描述：Kabat 等人，J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977)；Kabat 等人，美國衛生與人群服務部，“Sequences of proteins of immunological interest” (1991)；Chothia 等人，J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)；與 MacCallum 等人，J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)，其中該定義包括當彼此比較時重疊之胺基酸殘基或胺基酸殘基之子集。無論如何，於本文中定義與使用，應用該等定義之一以提及抗體或接枝抗體或其之變體之 CDR 係意欲落入該術語之範圍。

【0183】 「結合功能域分子（BDM）」係關於一種單體功能域，其與抗體之可變重（VH）鏈或可變輕（VL）鏈具有類似之結構特徵。此等類似之結構特徵包括 BL（結合環）序列，其等係以與抗體可變功能域中與特定抗原結合之互補決定區域（CDR）類似之方式起作用之表面多肽環結構或區域。該 BDM 支架係由內含之一個架構序列與三個 BL 序列組成。於本文中之 BDM 並非抗體可變功能域。BDM 支架係於本文中描述，包括例如 CTLA-4、lipocallin、纖維接合素、ICOS 與 CD28。

【0184】 「BL 序列」係表面多肽環結構或區域，其以與抗體可變功能域中與特定抗原結合之互補決定區域（CDR）類似之方式起作用。三個抗原結合環序列（於本文中分別稱為 BL-1、BL-2 與 BL-3）出現在該 BDM 中且其等座落於提供該等環序列所需之三度空間構形之支架序列內。天然 BL 序列可以一或多個可被接枝至該支架上之相對應抗體 CDR 置換。多樣性可被引入該 BDM 之 BL 位置內，此係藉由隨機化該支架之特定環之胺基酸序列，例如藉由引入 NNK 密碼子接著藉由使用（例如）展示技術選擇所欲之結合特徵。此機制係類似於高親和力抗原專一性抗體之天擇。

【0185】 術語「結合專一性」於蛋白質、多肽或胜肽之前後文中係關於該蛋白質或胜肽及/或 BDM 與其之個別的目標抗原或表位結合之能力，其係依賴在該目標抗原或表位上特殊之結構（例如抗原決定位或表位）之存在。例如，蛋白質及/或 BDM 辨識一個特定蛋白質結構並與之結合而非廣泛地辨識蛋白質並與其等結合。舉例而言，若蛋白質與表位「A」結合，含有表位「A」之分子（或自由未經標記之「A」）之存在於含有經標記「A」與該蛋白質之反應中會減少與該蛋白質結合之經標記「A」之量。該術語亦

應被理解成包括與目標抗原「專一性地結合」之藥理活性蛋白質或胜肽及/或 BDM。術語「專一性地結合 (specifically binds 或 binds specifically)」應被理解成意謂本文之揭示內容之藥理活性蛋白質 (或在抗體之例子中為其抗原結合功能域) 或胜肽及/或 BDM 更頻繁地、更快速地、以更長的持續期間及/或以更大的親和力與特殊之目標抗原反應或聯結 (相較於其與替代的天然目標抗原之結合)。提及「結合」對術語「專一性結合」提供明確之支持且反之亦然。典型地, 該術語係用於描述一個部分 (即本文中之蛋白質或 BDM) 對給定目標抗原之親和力。於一些情況下, 在毒性可能係問題時, 有低親和力結合可係所欲的。於其他情況下, 具有高親和力結合以最小化與其他目標抗原之交叉作用性可係所欲的。於一個實例中, 該結合係於本文中定義之專一性結合。

【0186】 術語「選擇性結合」係於本文之其他部分更詳細描述。

【0187】 術語該分子 (即該蛋白質或 BDM) 之一個部分對所選目標之「結合親和力」或「親和力」可被測量。術語「親和力」係關於二個劑之可逆結合之平衡常數且係以解離常數 (K_d) 或平衡解離常數 (K_D) 表現。

【0188】 用於本文中, 術語「結合性」係關於二或多個劑組成之複合物於稀釋後對解離之抗性。

【0189】 術語「抗原」用於本文中意謂一種物質, 而該藥理活性蛋白質或胜肽或 BDM 與其結合。抗原典型會包含一或多個抗原性表位, 其等被該 BDM 或蛋白質或胜肽辨識。該蛋白質抗原可係可溶性蛋白質或膜結合性蛋白質。可溶性蛋白質之實例包括 (但不限於) 轉錄因子、抗體、生長因子、血液蛋白質 (例如白蛋白)、或藥物 (例如類固醇、醫藥藥物、等等)。

膜結合性蛋白質之類型包括生長因子受體、腫瘤標記、細胞表面標記、或介導至細胞內之運輸之標記（例如運鐵蛋白）、或 Fc 受體。其典型係關於一種物質，其能夠於活體內引發免疫反應。其可係多肽、蛋白質、核酸（例如 DNA、RNA 或 DNA 與 RNA 之組合）或其他分子。

【0190】 用於本文中，術語「表位」（同義詞「抗原決定位」）應被理解成意謂蛋白質（或抗體或免疫球蛋白抗原結合片段之抗原結合功能域）與其結合或本文之揭示內容之 BDM 與其結合之區域。習用地，該術語係關於一種被免疫球蛋白 VH/VL 對結合之結構。表位定義抗體或似抗體功能域（例如 BDM）之最小結合位置。此術語並不必然限於蛋白質及/或該分子之 BDM 與之接觸之特定殘基或結構。例如，此術語包括分別與該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段之 CDR 或該 BDM 之 BL 序列接觸之跨區域胺基酸，與此區域外之 5-10 個（或更多個）或 2-5 個或 1-3 個胺基酸。於一些實例中，該表位包含一系列之不連續之胺基酸，其等當多肽折疊時位於另一者之附近且（例如）與另一個多肽聯結，即「構形性表位」。該術語包括該等由線性胜肽序列構成者（即「連續性」）或該等由非連續的胺基酸序列構成者（即「構形性」或「不連續性」）。

【0191】 術語「目標」用於本文中係關於抗原或表位。於某些實例中，該目標係關於細胞表面蛋白質（例如受體）或病毒外套蛋白質。於其他實例中，該目標係分泌之蛋白質。

【0192】 用於本文中，於抗體或免疫球蛋白抗原結合片段之前後文中之術語「抗原結合功能域」應被理解成意謂抗體或免疫球蛋白抗原結合片段之區域，其能夠專一性地與抗原（更具體言之，出現在抗原上之表位）

結合。於抗體中，該抗原結合功能域對應於 V_H 與 V_L 。於該 V_H 與 V_L 區域內者為與該表位接觸之 CDR。

【0193】 術語「位置 (position)」或「位置 (positions)」用於本文中意謂於本文中描寫之胺基酸序列內之胺基酸位置，典型係從該序列之左邊或 5' 端算起。術語「相對應」用於本文中於 BDM 之胺基酸序列位置之前後文中係關於胺基酸參考天然或「野生型」BDM 序列之位置。較佳地，該等位置會係分別對應於天然 BDM 序列中之 BLS1、及/或 BLS2 及/或 BLS3 之胺基酸。

【0194】 用於本文中，術語「天然序列」係意欲關於一種序列，其與衍生自自然之相對應多肽具有相同的胺基酸序列。因此，「天然 BDM」係關於具有與衍生自自然之相對應多肽之胺基酸序列相同之胺基酸序列之多肽。如此天然序列多肽可藉由重組或合成方法製造。

【0195】 術語「蛋白質」應被理解成包括單一連續與不分支之多肽鏈，即藉由胜肽鍵連接之一系列之連續的胺基酸或彼此共價或非共價連接之一系列之多肽鏈（即多肽複合物）。例如，該系列之多肽鏈可使用適合的化學物或二硫化鍵共價連接。非共價鍵之實例包括氫鍵、離子鍵、凡得瓦爾力、與疏水性交互作用。

【0196】 術語「胜肽」用於本文中被理解成係關於一短鏈（典型約 50 個胺基酸或更少）之藉由胜肽（醯胺）鍵連接之胺基酸單體。

【0197】 術語「分離的」用於本文中係關於一種多肽、抗體、蛋白質、等等，其已被鑑認並自其之天然環境之組份或從該處其已被製造之環境分開及/或回收。其之天然環境之污染物組份係會干擾該多肽之治療用途之物

質，且可包括（例如）酵素、激素、與其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。於一個實例中，該多肽會被純化（1）至大於 80%、85%、90%、95%、或 99% 以重量計，如由勞立法測定的，（2）至足以藉由使用轉杯式定序儀（spinning cup sequenator）獲得 N 端或內部胺基酸序列之至少 15 個殘基之程度，及/或（3）至均勻，其係按照 SDS-PAGE 在還原或非還原條件下使用考馬斯藍或銀染色。術語「分離的多肽」於其範圍內包括於在重組細胞原位內之多肽，因為該多肽天然環境之至少一種組份不會出現。大體而言，該多肽之分離會包括至少一個純化步驟。

【0198】 術語「重組體」應被理解成意謂人工遺傳重組之產物。重組多肽亦涵蓋藉由人工重組方法表現之多肽，當該多肽係於細胞、組織或對象（例如於其中該多肽被表現者）中時。

【0199】 術語「偵測（detect）」或「偵測（detecting）」用於本文中係就定量性水平與定性性水平、以及其等之組合來理解。其因此包括所關注之分子之定量性、半定量性與定性性測量。

【0200】 用於本文中，術語「對象」應被理解成意謂任何動物（包括人類），例如哺乳類動物。例示性對象包括但不限於人類與非人類靈長類動物。例如，該對象係人類。術語「對象」亦意欲包括非人類對象，諸如（例如）倉鼠、大鼠、兔、貓、狗與馬。

結合功能域分子（BDM）

【0201】 本文之揭示內容之結合功能域分子（BDM）較佳含有蛋白質支架，其具有三個暴露之結合環（BL）。該等 BL 可被改變，即透過胺基

酸取代來置換或修飾以賦予該 BDM 對給定目標抗原之結合專一性。本文之揭示內容之 BDM 支架可選自由含似免疫球蛋白(似 Ig)功能域超家族成員、i-體、VNAR 或 VHH 所組成之群組。

【0202】 該含似 Ig 功能域之超家族成員可選自由以下者組成之群組：似 V 功能域(例如 VLD)，諸如 CTLA-4、C-set 功能域、ThyOx 家族成員多肽、T 細胞受體、CD2、CD4、CD8、第 I 類 MHC、第 II 類 MHC、CD1、細胞介素受體、G-CSF 受體、GM-CSF 受體、激素受體、生長激素受體、促紅血球形成素受體、干擾素 γ 受體、泌乳素受體、NCAM、VCAM、ICAM、N-鈣黏蛋白、E-鈣黏蛋白、纖維接合素、生腱蛋白、與含 I-set 功能域多肽或其等之功能性片段。

【0203】 根據本文之揭示內容之 BDM 之實例包括 lipocalin、蛋白質 A 衍生性分子，諸如蛋白質 A 之 Z 功能域(親和體，SpA)、親和體、adnectin(例如纖維接合素)或錨蛋白重複蛋白(DARPin)。

【0204】 本文之揭示內容之 BDM 具有以下優點：於該支架功能域結構以及接受廣大範圍之異源性結合環序列之能力兩者之方面係穩定的且模組化的。此外，該 BDM 支架可從人類來源輕易地獲得，使得當用作為人類治療物時其等之致免疫性可忽略。該 BDM 支架亦可被輕易地構築成含有或省略天然發生之多醣鏈。

【0205】 異源性結合環序列至該 BDM 支架中之連結可藉由(例如)化學、生物化學或重組方法執行。

【0206】 較佳地，本文之揭示內容之 BDM 係關於一種除了如由 B 細胞製造之人類抗體以外之分子。本文之揭示內容之 BDM 分子亦意欲排除大

於互補決定區域（CDR）之抗體片段。因此，大於約 50、75、100 或 110 個胺基酸之人類抗體可變區域片段不被術語 BDM 涵蓋。此外，BDM 不包括抗體可變區域，諸如 dAb、VH-VH 或 VL-VL 結構。

【0207】 術語「支架」係意欲意調一種支持性多肽架構，其被用於組織、定向與攜帶賦予對給定目標之結合專一性之異源性結合環或經改變之胺基酸序列。支架可於結構上與賦予結合專一性之胺基酸序列分開。支架之結構上可分開之部分可包括各種各樣之不同的結構模體，包括（例如） β 三明治摺疊、 β 褶板、 α 螺旋、 β 桶形、捲曲螺旋與其他所屬技術領域中已知之多肽二級與三級結構。本文之揭示內容之支架亦會含有一或多個於胺基酸序列上可改變而不會實質上減少該支持性架構結構之穩定性之區域。例示性之可被改變之區域包括連結 β 三明治摺疊或 β 褶板之二股之結合環節段。

【0208】 本文之揭示內容之 BDM 支架較佳展現少於約 50% 之與人類免疫球蛋白可變重鏈或輕鏈序列之胺基酸一致性。大體而言，該支架會展現（例如）少於約 45%、約 40%、約 30%、約 20%、約 15%、或約 10% 之相較於人類免疫球蛋白可變重鏈或輕鏈胺基酸序列之胺基酸序列一致性。

【0209】 可被改變之支架之殘基於本文中被稱為外部結合環或結合環序列（於本文中分別被設計成 BL-1、BL-2 與 BL-3）。賦予二級或三級結構特徵之殘基可被保持、修飾或保留，只要該支架之整體結構被維持。所屬技術領域中具有通常知識者知道或可測定哪些殘基於多肽支架之結構穩定性上起作用以及此等殘基可被修飾至何種程度。

【0210】 於一個實例中，該 BDM 支架係似 V 功能域（VLD）蛋白質。

【0211】 VLD 典型與抗體或 T 細胞受體之該等有區別，因為其等不具有連結在一起以成為 Fv 類型分子之傾向。VLD 係於以下者中討論：The Leucocyte Antigen Facts Book 1993, Eds Barclay 等人，Academic Press，倫敦；與 CD Antigens 1996 (1997) Immunology Today 18, 100 – 101、與 Arlene H Sharpe 與 Gordon J Freeman, (2002) Nature Reviews Immunology 2, 116-126，其等之完整內容係以引用方式納入本文中。

【0212】 本文之揭示內容之標的所屬技術領域中具有通常知識者可例如藉由實施 Uniprot 資料庫 (www.uniprot.org) 之搜尋來輕易地決定適合用於本文中之適當之含 VLD 蛋白質。

【0213】 含 VLD 蛋白質 (諸如 CTLA-4) 可提供替代性架構以用於開發對目標分子具有高親和力之新穎結合部分。衍生自此等新穎部分之單功能域似 V 結合分子係可溶的且因此係所欲的。含有 VLD 之適合的新穎部分之實例係 CTLA-4、CD28 與 ICOS (Hutloff A 等人, (1999) Nature 397 (6716):263-6)。

【0214】 細胞毒性 T 淋巴球相關性抗原 4 (CTLA-4) 與同源性細胞表面蛋白質 CD28 及 ICOS 係於免疫反應期間涉及 T 細胞調節。CTLA-4 係主要且短暫地在經活化 T 細胞之表面上表現之 44 kDa 同元二聚體，於該處其與抗原呈現細胞上之 CD80 與 CD86 表面抗原交互作用以達成免疫反應之調節 (Waterhouse 等人 (1996) Immunol Rev 153:183-207、van der Merwe 等人 (1997) J Exp Med 185 (3):393-403)。

【0215】 CD28 係一個 44kDa 同元二聚體，其主要於 T 細胞上表現且 (與 CTLA-4 類似) 和於抗原呈現細胞上之 CD80 與 CD86 表面抗原交互作

用以達成免疫反應之調節 (Linsley 等人(1990) J Immunol 182 (5):2559-63)。目前之理論建議 CTLA-4 與 CD28 間對可用配體之競爭控制免疫反應之水平，例如於基因剔除小鼠中 CTLA-4 之基因刪除造成經活化 T 細胞之大量過度增殖 (Waterhouse 等人(1995) Science 270 (5238):985-8)。

【0216】 各 CTLA-4 單體次單元係由 N 端細胞外功能域、跨膜區域與 C 端細胞內功能域組成。該細胞外功能域包含 N 端似 V 功能域 (VLD；基於與免疫球蛋白超家族之同源性預測分子量大約 14 kDa) 與使該 VLD 與該跨膜區域連結之約 10 個殘基之柄部。該 VLD 包含分別對應於 BL-1、BL-2 與 BL-3 之表面環 (Metzler WJ 等人(1997) Nat Struct Biol 4 (7):527-31)，其與 CD80 及/或 CD86 結合。人類 CTLA-4 之序列先前已被測定 (US 5,434,131；US 5,844,095；US 5,851,795)。

【0217】 對 CTLA-4 之結構與突變研究建議與 CD80 與 CD86 之結合係透過自 A' GFCC' 似 V β 股及亦自 BL-3 中之高度保留之 MYPPPPYY 序列形成之 VLD 表面發生。CTLA-4 單體間之二聚化係透過二個柄部中之半胱氨酸殘基 (Cys¹²⁰) 間之二硫鍵發生，該二硫鍵造成二個細胞外功能域之拴接，但無任何似 V 功能域間之明顯直接連結 (Metzler WJ 等人(1997) Nat Struct Biol 4 (7):527-31)。二聚化似乎專門對增加對配體之結合性有貢獻。

【0218】 CD278 或 ICOS (可誘發性 T 細胞共刺激物) 係一種免疫檢查點蛋白質，其係由 ICOS 基因編碼。其係於經活化之 T 細胞上表現。該蛋白質屬於 CD28 與 CTLA-4 細胞表面受體家族。其形成同元二聚體並於傳訊、免疫反應及細胞增殖之調節扮演一個角色。

【0219】 人類 CTLA4、CD28 與 ICOS 之序列可於公眾可使用之資料

庫上得到。

【0220】 CTLA-4 之人類序列可以 UniProt 參考號 P16410 得到。CTLA-4 之細胞外功能域對應於該序列之位置 36-161（其中該 CTLA-4 具有 126 個胺基酸之總長）。胺基酸殘基 1-35 對應於其訊號勝肽。

【0221】 CD28 之人類序列可以 UniProt 參考號 P10747 得到。其細胞外功能域對應於該序列之位置 19-152。

【0222】 ICOS 之人類序列可以 UniProt 參考號 Q9Y6W8 得到。其似 Ig VLD 對應於該序列之位置 30-132。

【0223】 於一個實例中，該 BDM 係免疫球蛋白 C-set 功能域蛋白，更佳係 C1-set 功能域蛋白。C-set 功能域係典型的類似抗體恆定功能域之似 Ig 功能域且幾乎僅僅於涉及免疫系統之分子（包括第 I 與 II 類主要組織相容性複合物（MHC）複合物分子）中及種種 T 細胞受體中找到。

【0224】 本文之揭示內容之標的所屬技術領域中具有通常知識者可輕易地確定適合用於本文中之含有 C-set 功能域之蛋白質。例如，對 uniprot 資料庫（www.uniprot.org）之搜尋顯露超過 300 種人類蛋白質。

【0225】 諸如 basigin 之蛋白質含有 C-set 功能域（Xiao-Ling Yu 等人 (2008) JBC vol 283 (26):18056-18065）。C-set 功能域之其他實例包括 ROR1 細胞外功能域、CEA 家族成員，諸如 CEACAM1-8。

【0226】 BDM 可使用已知之挑選及/或突變誘發方法使之親和力成熟。親和力成熟之 BDM 可具有為起始 BDM 之二倍、五倍、十倍、二十倍、三十倍或更大之親和力。表觀親和力可藉由諸如 ELISA 或其他所屬技術領域中具有通常知識者所熟悉之技術（例如表面電漿子共振技術）之方法測

定。

【0227】 i-體係一種人類來源之單一功能域似抗體分子。i-體之架構類似來自鯨之單功能域抗體且因此與鯨抗體共有有利的生物物理及靶向特徵。其等係於例如 US 7,977,071 中描述。

【0228】 VNAR（可變新抗原受體）係關於一種單可變區域功能域片段，其衍生自鯨免疫球蛋白新抗原受體抗體（IgNAR）。其等係於例如 Griffiths K 等人（2013）antibodies 2(1):66-81 中描述。

【0229】 VHH（重鏈之可變功能域）功能域或奈米體（nanobody）係關於一種衍生自駱駝科抗體之單一單體可變抗體功能域。其等係於（例如）Harmsen MM 與 HJ De Haard (2007) Appl Microbiol Biotechnol. 77 (1):13-22 中描述。

【0230】 該 BDM 與該分子之藥理活性蛋白質部分之結合專一性可被利用以允許該分子與一或多種不同的目標抗原或表位，較佳係至少二種不同的目標抗原或表位結合。於一個實例中，該蛋白質具有對第一目標抗原之結合專一性且該至少一個 BDM 具有對於第二目標抗原之結合專一性。

【0231】 於複數個 BDM 係與一個蛋白質耦合之實例中，該蛋白質可具有對第一目標抗原之結合專一性，且該 BDM 可具有對第二目標抗原之結合專一性，且一個另外的 BDM（若存在）可具有對第三目標抗原之結合專一性。於其中該蛋白質係抗體或免疫球蛋白抗原結合片段之其他實例中，該抗體或抗原結合片段可具有對第一目標抗原之結合專一性，且 BDM（或若例如各重鏈或各輕鏈上存在一個 BDM 則為 BDM 對）可具有對第二目標抗原之結合專一性，且一個另外的 BDM（或 BDM 對）可具有對第三目標

抗原之結合專一性。

【0232】 本文之揭示內容之分子可與至少一種目標抗原、至少二種不同的目標抗原、至少三種不同的目標抗原、至少四種不同的目標抗原或至少五種不同的目標抗原結合。

【0233】 較佳地，該分子與一種目標抗原、二種不同的目標抗原或三個不同的目標抗原結合。種種非限制性實例被考慮，包括：

- (i)該蛋白質或胜肽與第一目標抗原結合，該第一目標抗原係與該 BDM 所結合之第二目標抗原相同或不同；
- (ii)該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段與第一目標抗原結合，該第一目標抗原係與該 BDM 所結合之第二目標抗原相同；
- (iii)該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段與第一目標抗原結合，該第一目標抗原係與該 BDM 所結合之第二目標抗原不同；
- (iv)該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段與第一目標抗原結合，一個 BDM 與第二目標抗原結合，該第二目標抗原係與該第一目標抗原相同，且一個另外的 BDM 與第三目標抗原結合，該第三目標抗原係與該第一與第二目標抗原不同；
- (v)該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段與第一目標抗原結合，一個 BDM 與另一個 BDM 分別與第二與第三目標抗原結合，其中該第二與第三目標抗原可係相同或不同，但其中該第二與第三目標抗原係與該第一目標抗原不同；
- (vi)該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段與第一目標抗原結合，一個 BDM 與第二目標抗原結合，且一個另外的 BDM 與第三目標抗原結合，其中該第一、第二與第三目標抗原係不同的。

【0234】 咸會領會到當二或多個 BDM 被連接在一起時，可被該分子結合之有效目標之數目可增加。

BDM 之產生

【0235】 如於本文中顯示的，於該 BDM 功能域（例如 CTLA-4）中以抑硬素或 CD3 之異源性結合環序列置換一或多個結合環結構造成使用細菌表現系統之可溶性單體未經醮化之結合分子之產生。該似 V 功能域因此提供用於構築可溶性單功能域分子之基本架構，其中該分子之結合專一性可藉由修飾結合環結構來設計。

【0236】 該 BDM 之架構殘基可根據於駱駝科抗體中出現之結構特徵修飾。駱駝重鏈免疫球蛋白因為由單一 VH 功能域組成而與慣例抗體結構不同。

【0237】 於暴露之架構殘基之許多非慣例取代（主要為本質上由疏水性變成極性）減少疏水性表面，同時維持內部 β 褶板架構結構（Desmyter 等人(1996) Nat Struct Biol 3:803-811）。於三個結合環內，數個結構特徵補償抗原結合表面（通常由 VL 功能域提供）之喪失。雖然 BL2 環與其他 VH 功能域並非差異很大，BL1 與 BL3 採取非標準構形，其於長度方面係極度相異的。例如，H1 環可含有 2 - 8 個間之任何數目之殘基（相較於在 Ig 分子中通常為五個）。然而，展現最大之變化者係 BL3：於 17 個被報導之駱駝抗體序列中，此區域之長度於 7 與 21 個殘基間變化（Muyldermans 等人(1994) Protein Eng 7:1129-1135）。第三，許多駱駝科 VH 功能域具有使 BL1 與 BL3 相互連結（於駱駝之例子中）及使 CDR-1 與 CDR-2 相互連結（於美洲駝之

例子中)之二硫連接(Vu 等人 1997)。此結構特徵之功能似乎係環穩定性之維持與提供輪廓更明顯的(與平面有區別的)環構形,其允許與抗原內之口袋結合及給予增加之表面積兩者。然而,並非所有的駱駝科抗體皆具有此二硫鍵,暗示其並非絕對結構需要。

【0238】 此等上述特徵已使駱駝科 V 功能域能夠於活體內以可溶性分子存在與具有足夠高之親和力以對各種各樣之目標抗原形成有效之免疫反應。

【0239】 用於產生並挑擇對目標分子具有新穎之結合親和力之單 VLD 分子之方法已於 US 7,166,697 中描述,其之完整內容係以引用方式納入。該方法涉及應用對於衍生自免疫球蛋白超家族之成員之似 V 功能域而言係廣為人知的分子演化技術。該方法可涉及產生噬菌體或核糖體展示文庫以篩選大量之經突變似 V 功能域。

【0240】 絲狀 fd 噬菌體基因組被工程設計以使得噬菌體於其等之表面上展示由噬菌體內所含之 DNA 編碼之蛋白質,諸如似 Ig 蛋白質(Fab)(Smith, 1985; Huse 等人, 1989; McCafferty 等人, 1990; Hoogenboom 等人, 1991)。蛋白質分子可被展示在 Fd 噬菌體之表面上,共價地與由基因 III 或較不常見地由基因 VIII 編碼之噬菌體外套蛋白質耦合。將抗體基因插入基因 III 外套蛋白質中給出每噬菌體 3-5 個重組蛋白質分子之表現,位於末端。相反地,將抗體基因插入至基因 VIII 中具有展示每噬菌體顆粒約 2000 個複本之重組蛋白質之潛力,然而此係多價系統,其可遮蔽單一所展示蛋白質之親和力。亦使用 Fd 噬粒(phagemid)載體,因為其等可被輕易地從於 Fd-噬菌體之表面上展示功能性似 Ig 片段切換成於大腸桿菌中分泌可溶

性似 Ig 片段。與基因 III 外套蛋白質之 N 端融合之經噬菌體展示之重組蛋白質係藉由策略性地置於二個蛋白質基因間之琥珀密碼子成為可能。於大腸桿菌之琥珀抑制子品系中，所得之 Ig 功能域-基因 III 融合物變得被固定於噬菌體外套中。

【0241】 可將基於蛋白質親和力之挑選程序應用至任何高親和力結合試劑，諸如抗體、抗原、受體與配體（參見（例如）Winter 與 Milstein, (1991) Nature 349:293-299，其之完整內容係以引用方式納入本文中）。因此，於噬菌體上展示之最高親和力結合蛋白之挑選係與編碼該蛋白質之基因之回收連結。Ig 展示性噬菌體可以與 ELISA 或固相放射免疫分析類似之方式藉由與和珠粒共價地耦合或吸附至塑膠表面之同源結合作伙伴結合來親和力挑選。雖然幾乎任何塑膠表面皆會吸附蛋白質抗原，一些商業產品被特別調配用於此目的，諸如 Nunc 免疫管。

【0242】 核糖體展示文庫涉及於無細胞轉譯系統中重新合成並於核糖體之表面上展示多肽以用於挑選目的（Hanes 與 Pluckthun, (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942；He 與 Taussig, (1997) Nucl Acids Res 25:5132-5134）。「無細胞轉譯系統」包含核糖體、蛋白質合成所需之可溶性酵素（通常與該等核糖體來自相同的細胞）、轉送 RNA、腺嘌呤核苷三磷酸、鳥糞嘌呤核苷三磷酸、核糖核苷三磷酸再生系統（諸如磷烯醇丙酮酸與丙酮酸激酶）、與合成由外源性 mRNA 編碼之蛋白質所需之鹽及緩衝劑。可使多肽之轉譯在維持完整無缺之聚核糖體之條件（即核糖體、mRNA 分子與所轉譯之多肽被聯結在單一複合物中者）下發生。此有效地導致所轉譯之多肽之「核糖體展示」。

【0243】 對於挑擇，所轉譯之多肽（與相對應核糖體複合物聯結）係與目標分子混合，該目標分子係與基質（例如 Dynabead）結合。該目標分子可係任何所關注之化合物（或其之一部分），諸如 DNA 分子、蛋白質、受體、細胞表面分子、代謝物、抗體、激素或病毒。展示所轉譯之多肽之核糖體會結合該目標分子且此等複合物可被挑擇且其 mRNA 可使用 RT-PCR 再擴增。

【0244】 雖然有數種修飾結合分子之替代性方法，用於所有所展示之蛋白質之一般方法遵照一種模式，其中個別的結合性試劑係藉由對其等之同源受體之親和力自展示文庫挑選。編碼此等試劑之基因係藉由一些活體內與試管內突變策略之任一者或組合經修飾並構築成一個新基因池以用於展示與選擇最高親和力結合分子。

BDM 二聚體

【0245】 於一個實例中，該分子之 BDM 部分係 BDM 單體之二聚體。二聚體形式可天然地發生或透過藉由使用連接子促進而發生。例如，於該 BDM 係 CTLA-4 VLD 之情況，二聚化可透過其二個柄部中之半胱胺酸殘基（Cys¹²⁰）間之二硫鍵發生（若此等序列被保有）。

【0246】 供選擇地，可使用連接子以將 BDM 單體（例如 CTLA-4 單體）耦合在一起。亦可使用相同之原則以將一些 BDM 單體串接在一起以形成一串。該連接子可促進增強之可撓性及/或減少任何二個單體間之立體阻礙。該連接子可係出自天然來源。

【0247】 其他可使用之連接子類型係該等於以下進一步描述者，包括

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n 連接子。

CTLA-4 之可溶形式之試管內表現

【0248】 人類 CTLA-4 分子之細胞外功能域與似 V 功能域 (VLD) 皆尚未於細菌細胞中成功地以可溶性單體表現，據推測係由於所表現之蛋白質之聚集 (Linsley PS 等人, (1995) J. Biol. Chem 270:15417-24)。於大腸桿菌中細胞外 N 端功能域 (Met1 至 Asp124, 包含 Cys120) 之表現造成二聚性 28 kDa MW 蛋白質之生產，於該蛋白質中二個 CTLA-4 似 V 功能域係藉由於 Cys120 之二硫連接連結。於 Val114 之截斷移除此等半胱胺酸且係意欲去使呈可溶性單體形式之 14 kDa VLD 之表現成為可能。然而，產物聚集且結論為疏水性位置 (其正常被醣化遮蔽) 現被暴露且造成聚集 (Linsley PS 等人, (1995) J. Biol. Chem 270:15417-24)。

【0249】 已有一些於真核生物表現系統 (即 CHO 細胞與酵母菌巴斯德畢赤酵母菌 (*Pichia pastoris*)) 中單體經醣化 CTLA-4 細胞外功能域被成功地表現之報導 (Linsley PS 等人, (1995) J. Biol. Chem 270:15417-24; Metzler WJ 等人(1997) Nat Struct Biol 4 (7):527-31; Gerstmayer B 等人(1997) FEBS Lett 407(1):63-8)。於此等真核生物表現系統中之醣化被推定係於該 VLD 中之二個 N 連接之醣化位置 (Asn76 與 Asn108) 發生。然而，高產量僅已針對編碼融合至 Ig-CH2/CH3 功能域之 CTLA-4 VLD 之基因 (其製造具有接附至一個 Fc 次單元之 2 個 CTLA-4 VLD 之二聚體重組蛋白質) 之表現描述 (WO 95/01994 與 AU 16458/95)。AU 60590/96 描述具有 MYPPPY 表面環中之第一個酪胺酸 (Y) 之單一胺基酸置換之 CTLA-4 VLD 之突變形式，其保有與修

飾對天然 CD80 與 CD86 配體之親和力。AU 60590/96 描述呈於真核生物細胞中表現之重組 CTLA-4/Ig 融合蛋白質之 CTLA-4 VLD 之較佳之可溶形式且並未解決於原核生物表現系統中之聚集問題。EP 0757099A2 描述 CTLA-4 突變分子之使用，例如 BL 序列中之突變之改變對配體結合性之功效。

B7-1 (CD80) 蛋白質與 B7-2 (CD86) 蛋白質

【0250】 B7 蛋白質係在經活化抗原呈現細胞 (APC) 上找到之周邊膜蛋白質，其當與 T 細胞上之 CD28 或 CD152 (CTLA-4) 表面蛋白質配對時，可產生共刺激性訊號或共抑制性訊號以分別增強或減少該 APC 與該 T 細胞間之 MHC-TCR 訊號之活性。不但於經活化之 APC 上出現，B7 亦於 T 細胞上找到。

【0251】 B7 蛋白質包含一些家族成員，其包括 B7-1、B7-2、B7DC、B7-H1 至 B7-H7。B7-1 蛋白質亦被稱為 CD80 且與 CD28 及 CTLA-4 (細胞毒性 T 淋巴球關連性蛋白 4) 結合。人類序列之 UniProt 參考號係 P33681。

【0252】 於一個實例中，該 BDM 與 B7-1 人類蛋白質結合。於一個實例中，該 BDM 與 B7-2 蛋白質結合。

抑硬素

【0253】 抑硬素係一種被分泌之醣蛋白，及具有 C 端似半胱胺酸結功能域及與骨成形性蛋白 (bone morphogenic protein, BMP) 拮抗劑之 DAN (以差示篩選來挑選之於神經胚細胞瘤基因中畸變之基因 (differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma)) 家族之序列相似性。抑硬

素係由骨細胞製造且具有骨骼形成之抗同化功效。人類序列之 UniProt 參考號係 Q9BQB4。

【0254】 於一個實例中，該 BDM 與抑硬素人類蛋白質結合。

藥理活性蛋白質

【0255】 於本文之揭示內容中完成之蛋白質之類型係該等為藥理上有活性者。如此蛋白質包括如於本文中描述之抗體（例如全長抗體）或免疫球蛋白抗原結合片段或非抗體蛋白質。

【0256】 術語「藥理上有活性」意謂一種物質，其被測定為具有影響醫學參數或疾病狀態或造成涉及免疫反應之細胞之活化之活性。該蛋白質可為促效劑蛋白質、拮抗劑蛋白質或擬似物。該蛋白質亦可係治療性抗體。

【0257】 術語「擬似物」或「促效劑」係關於具有可與天然蛋白質（例如 EPO 或 G-CSF）相比之生物活性之蛋白質（或胜肽）。

【0258】 適用於根據本文之揭示內容之例示性蛋白質包括（但不限於）凝血因子、抗運載蛋白、類毒素、人類血清白蛋白、膠原結合蛋白、TNF- α 受體結合蛋白、整聯蛋白結合蛋白、VEGF 或其擬似物、EPO 或其擬似物、C4 結合蛋白、尿激酶受體拮抗劑、淋巴激素、細胞介素、護骨素（OPG）、或選自計畫性細胞死亡 1 蛋白質（PD1）、計畫性死亡配體 1（PD-L1）、NKG2D、與第 I 類 MHC 多肽相關之序列 A（MICA）、與第 I 類 MHC 多肽相關之序列 B（MICB）、UL16 結合蛋白（ULBP）之蛋白質之細胞外功能域。

【0259】 凝血因子係所屬技術領域中已知的，實例包括因子 VIII 與

因子 IX，其等與血友病有關。

【0260】 於一個實例中，該類毒素係肉毒桿菌類毒素。該類毒素可為 A 型肉毒桿菌或 B 型肉毒桿菌。肉毒桿菌類毒素之合成形式亦被考慮。

【0261】 於一個實例中，該淋巴激素係 IL-2 或 GM-CSF 或其擬似物。

【0262】 於一個實例中，該細胞介素係 G-CSF 或其擬似物或幹細胞因子或其擬似物。

【0263】 於一個實例中，該蛋白質係與和人類血清白蛋白結合之 BDM 耦合已使得該蛋白質之半生期於活體內相較於相同 BDM 不存在之相同蛋白質被延長。

抗體

【0264】 於某些實例中，該多重專一性分子包含全長抗體。於一個實例中，該抗體係經人化抗體。於另一個實例中，該抗體係人類抗體。於另一個實例中，該抗體係嵌合抗體。

【0265】 術語「經人化抗體」應被理解成係關於一個嵌合抗體之次種類，其具有衍生自來自非人類物種之抗體之抗原結合位置或可變區域與基於人類抗體之結構及/或序列之剩下的抗體結構。於經人化抗體中，抗原結合位置大體而言包含被接枝至人類抗體之可變區域之適當架構區域（FR）上之來自非人類抗體之互補決定區域（CDR）與來自人類抗體之剩下的區域。抗原結合位置可係野生型（即與非人類抗體所具有者完全相同）或藉由一或多個胺基酸取代修飾。於一些實例中，人類抗體之 FR 殘基係以相對應非人類殘基置換。一般而言，經人化抗體會包含至少一個且典型為二個

可變功能域之實質上所有者，其中其 CDR 區域之所有或實質上所有者係對應於非人類免疫球蛋白所具有者且其 FR 區域之所有或實質上所有者係人類免疫球蛋白共通序列所具有者。

【0266】 本文之揭示內容之經人化抗體亦會含有免疫球蛋白恆定區域 (Fc)，典型係人類免疫球蛋白所具有者 (Jones 等人，(1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann 等人，(1988) *Nature*, 332:323-329; 與 Presta，(1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596)。

【0267】 用於人化非人類抗體或其之部分 (例如可變區域) 之方法係所屬技術領域中已知的。人化實質上可按照 Winter 與同事之方法 (Jones 等人，*Nature*, 321:522 525 (1986); Riechmann 等人，*Nature*, 332:323 327 (1988)); Verhoeyen 等人 *Science*, 239:1534 1536 (1988)) 或於 US5225539 或 US5585089 描述之方法執行。其他用於人化抗體之方法不被排除。

【0268】 術語「人類抗體」用於本文中係關於具有衍生自或對應於人類中 (例如於人類生殖系列或體細胞中) 找到之序列之可變區域 (例如 VH、VL) 及視需要之恆定區域之抗體。「人類」抗體可包括未被人類序列編碼之胺基酸殘基，例如藉由試管內隨機或定點突變引入之突變 (尤其係涉及保守性取代之突變或於小數目之該抗體之殘基，例如於 1、2、3、4、5 或 6 個該抗體之殘基，例如於 1、2、3、4、5 或 6 個構成該抗體之一或多個 CDR 之殘基之突變)。此等「人類抗體」不需實際上由人類製造，反之，其等可使用重組方法製造及/或自包含編碼人類抗體恆定及/或可變區域之核酸 (例如如於以上描述者) 之基因轉殖動物 (例如小鼠，其中內源性免疫球蛋白基因已被部分或完全地失活) 分離。人類抗體可使用種種所屬技術

領域中已知之技術（包括噬菌體展示文庫）製造（例如如於 US5885793 中描述者）。

【0269】 辨識所選表位之人類抗體亦可使用稱為「導向性挑選（guided selectionion）」之技術產生。於此方法中，使用所選非人類單株抗體（例如小鼠抗體）以引導辨識相同表位之完全人類抗體之挑選（例如如於 US5,565,332 中描述的）。

【0270】 經人化免疫球蛋白（包括經人化抗體）已藉由遺傳工程設計構築。大部分先前已描述之經人化免疫球蛋白已包含與特定人類免疫球蛋白鏈（即接受體或接受者）之架構完全相同之架構與三個來自非人類（供體）免疫球蛋白鏈之 CDR。人化亦可包括一些標準，按其等經人化免疫球蛋白鏈之架構中數目有限之胺基酸被鑑認並挑選為與位於該等在供體中而非在接受體中之位置之胺基酸相同，以增加包含該經人化免疫球蛋白鏈之抗體之親和力。

【0271】 對用於人類治療而言，經人化抗體相較於小鼠或嵌合抗體大體而言具有至少三個潛在優點。因為抗體之效應部分係人類，咸相信其與人類免疫系統之其他部分交互作用較佳（例如藉由補體依賴性細胞毒性（CDC）或抗體依賴性細胞性細胞毒性（ADCC）更有效率地摧毀其目標細胞）。此外，人類免疫系統不應把經人化抗體之架構或恆定區域辨識成外來，且因此對如此所注射抗體之抗體反應應小於對完全外來小鼠抗體或部分外來嵌合抗體者。最後，已知小鼠抗體於人類循環中會具有遠比人類抗體之半生期短之半生期。據推測，經人化抗體可具有較類似於天然發生之人類抗體之半生期，允許給予較小與較低頻率之劑量。

【0272】 咸會領會到任何與所欲之目標結合之全長抗體可被用於本文之揭示內容中。於一個實例中，該全長抗體在與該 BDM 耦合前被進一步親和力成熟。

【0273】 於另一個實例中，該全長免疫球蛋白係非人類免疫球蛋白。於一個實例中，該免疫球蛋白係小鼠、大鼠、倉鼠、貓、狗、馬或母牛免疫球蛋白。

【0274】 可使用慣例方法以製備抗體。例如，藉由使用胜肽或全長目標蛋白質，可使用標準方法製造多株抗血清或單株抗體。哺乳類動物（例如小鼠、倉鼠、或兔）可以於哺乳類動物中引發抗體反應之胜肽之致免疫形式致免疫。用於賦予增強之對胜肽之致免疫性之技術包括共軛至載體或其他所屬技術領域中廣為人知之技術。例如，該蛋白質或胜肽可於佐劑之存在下投予。致免疫之進程可藉由偵測血漿或血清中之抗體力價來監視。可以免疫原作為抗原來使用標準 ELISA 或其他免疫分析程序以評估抗體之水平。於致免疫後，可獲得抗血清且可（若所欲）自血清分離多株抗體。

【0275】 該抗體可於細胞培養物、噬菌體、或種種動物中產生，該等動物包括但不限於母牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠、綿羊、狗、貓、猴、黑猩猩、猿。因此，有用於本文之揭示內容之抗體典型係哺乳類動物抗體。可使用噬菌體技術以分離初級抗體或以產生具有經改變之專一性或結合性特徵之變體。如此技術於所屬技術領域中係例行且廣為人知的。於一個實例中，該抗體係藉由所屬技術領域中已知之重組方法製造者。例如，重組抗體可藉由以包含編碼該抗體之 DNA 序列之載體轉染宿主細胞來製造。可使用一或多種載體以轉染於該宿主細胞中表現至少一個 VL

與一個 VH 區域之 DNA 序列。抗體產生與製造之重組方法之例示性描述包括：Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997)；Shephard、等人，*Monoclonal Antibodies* (牛津大學出版社，2000)；與 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Academic Press, 1993)。

【0276】 針對效應功能修飾該抗體以增強該抗體於活體內之有效性可能係所欲的。例如，半胱胺酸殘基可被引入至 Fc 區域中，藉此允許於此區域中之鏈間二硫鍵形成。由此產生之抗體可具有改善之內化能力及/或增加之補體介導性細胞殺死與抗體依賴性細胞性細胞毒性 (ADCC)。參見 Caron 等人，(1992) *J. Exp Med.*, 176: 1191-1195 與 Shopes, (1992) *J. Immunol.*, 148: 2918-2922。

抗體片段

【0277】 抗體片段包含完整之抗體之部分且可包括完整之抗體之抗原結合區域或可變區域。適合用於本文之揭示內容之抗體片段之實例包括 Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、二-scFv、或經化學連接之 F(ab')₂。於一特殊之實例中，該抗體片段係 Fab。

【0278】 Fv 係關於含有完整抗原辨識與結合位置之抗體片段。此區域係由呈緊密非共價連結之一個重鏈可變功能域與一個輕鏈可變功能域之二聚體組成。因為呈此組態，所以各可變功能域之三個 CDR 交互作用以定義於該 VH-VL 二聚體之表面上之抗原結合位置。共同地，該等六個 CDR 賦予該抗體片段抗原結合性專一性。

【0279】 Fab 片段含有 Fv 且亦含有輕鏈之恆定功能域與重鏈之第一

恆定功能域 (CH1)。Fab 片段與 Fab' 片段之不同處在於添加一些殘基於重鏈 CH1 功能域之羧基端包括來自抗體鉸鏈區域之一或多個半胱胺酸。F(ab')₂ 片段被製造成於其等間具有鉸鏈半胱胺酸之 Fab' 片段之對。

【0280】 經化學連接之 F(ab')₂ 係藉由將二個不同的 Fab' 片段配對在一起而形成之雙專一性分子，該等 Fab' 片段各具有不同的結合專一性。用於自抗體片段產生雙專一性抗體之技術已於文獻中描述。例如，雙專一性抗體可使用化學連接製備。Brennan 等人(1985) Science 229:81 描述一種程序，其中完整的抗體被蛋白分解性切裂以產生 F(ab')₂ 片段。此等片段於二硫醇錯合劑亞砷酸鈉之存在下被還原以穩定鄰位之二硫醇並預防分子間二硫形成。所產生之 Fab' 片段接著被轉變成硫代硝苯甲酸 (TNB) 衍生物。Fab' -TNB 衍生物之一接著係藉由以巯乙胺還原來再轉變成 Fab' -硫醇並與等莫耳量之其他 Fab' -TNB 衍生物混合以形成該雙專一性抗體。

多重專一性分子之製造

【0281】 本文之揭示內容亦提供用於製造本文之揭示內容之多重專一性分子之方法。

【0282】 該等分子之表現可係於原核生物或真核生物細胞中。原核生物最常由種種品系之細菌代表。該等細菌可係革蘭氏陽性或革蘭氏陰性。典型地，革蘭氏陰性細菌（諸如大腸桿菌）係較佳者。亦可使用其他微生物品系。

【0283】 編碼該等分子之序列可被選殖入被設計成用於在原核生物細胞（諸如大腸桿菌）中表現外來序列之載體中。此等載體可包括一般使

用之原核生物控制序列，其於本文中被定義成包括用於轉錄起始之啟動子，視需要地加上操作子、以及核糖體結合位置序列，包括該等一般使用之啟動子，如 β 內醯胺酶（青黴素酶）與乳糖（lac）啟動子系統（Chang、等人，(1977) *Nature* 198:1056）、色胺酸（trp）啟動子系統（Goeddel、等人，(1980) *Nucleic acids Res.* 8:4057）與 λ 衍生性 PL 啟動子與 N 基因核糖體結合位置（Shimatake、等人，(1981) *Nature* 292:128）。

【0284】 如此表現載體亦會包括複製起點與可篩選標記，諸如 β 內醯胺酶或新黴素磷酸轉移酶基因（其賦予對抗生素之抗性），以使得該載體可於帶有該質體之細菌與細胞中複製當於諸如胺苄青黴素或康黴素之抗生素之存在下生長時可被篩選。

【0285】 抗體於諸如大腸桿菌與酵母菌之單細胞生物中之表現已於所屬技術領域中被充分建立。關於回顧，參見例如 André Frenzel 等人(2013) *Front Immunol* 4:217。於培養中於真核生物細胞中之表現亦以用於製造於本文中描述之雙專一性分子之選項為所屬技術領域中具有通常知識者所知，關於最近之回顧，參見（例如）Raff、M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576；Trill J.J.等人(1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560。

【0286】 用於達成此等目標之分子選殖技術係所屬技術領域中已知的並於（例如）以下者中描述：Ausubel 等人，(編者), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience（1988，包括所有迄今之更新）或 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，冷泉港實驗室出版社(1989)。各種各樣之選殖與試管內擴增方法係適合用於構築重組核酸。製造重組抗體之方法亦於所屬技術領域中已知，參見（例

如) US4816567 或 US5530101。

【0287】 用於在各種各樣之不同宿主細胞中選殖與表現多肽之系統係廣為人知的。適合的宿主細胞包括細菌、哺乳類動物細胞，酵母菌與桿狀病毒系統。適合的宿主細胞包括細菌、哺乳類動物細胞、酵母菌與桿狀病毒系統。於所屬技術領域中可得之用於表現異源性多肽之哺乳類動物細胞系包括中國倉鼠卵巢細胞、HeLa 細胞、人類胚胎腎臟細胞，嬰兒倉鼠腎臟細胞，NSO 小鼠黑色素瘤細胞與許多其他者。適合的宿主會基於例如以下者之考量來選擇：其等與所選載體之相容性、其等之分泌特徵、其等正確地折疊蛋白質之能力、與其等之發酵需求、以及由欲表現之 DNA 序列編碼之產物對宿主之毒性、與表現產物之純化之容易性。

【0288】 於分離後，該核酸被可操作地插入連接至表現構築體或表現載體中之啟動子以用於進一步選殖（DNA 之擴增）或以用於在無細胞系統中或在細胞中表現。載體可係質體、病毒，例如「噬菌體、或噬粒，按適合者。

【0289】 為製造本文之揭示內容之載體構築，編碼於本文中描述之抗體輕鏈序列、重鏈序列、與連接子序列與 BDM 序列之核酸序列係藉由標準方法選殖入適合的載體中。

【0290】 於一些實例中，該 BDM 會被選殖至該抗體輕鏈序列之 C 端。於一些實例中，該 BDM 會被選殖至該抗體重鏈序列之 C 端。於一些實例中，該 BDM 會被選殖至該抗體輕鏈序列之 N 端。於一些實例中，該 BDM 會被選殖至該抗體重鏈序列之 N 端。於一些實例中，BDM 會被選殖至該抗體輕鏈序列之 N 端與 C 端兩者。於一些實例中，BDM 會被選殖至該抗體重

鏈序列之 N 端與 C 端兩者。於一些實例中，BDM 會被選殖至該抗體輕鏈序列與重鏈序列兩者之 N 端與 C 端兩者。於一些實例中，編碼該抗體重鏈或輕鏈與 BDM 之核酸序列係於一個載體中提供且其他抗體鏈係於另一個載體上提供。於其他實例中，編碼抗體輕鏈序列、連接子序列與 BDM 序列之核酸序列被選殖至一個載體中且編碼抗體重鏈序列、連接子序列與 BDM 序列之核酸序列被選殖至另一個載體中。供選擇地，可使用雙順反子載體，藉此抗體輕鏈與重鏈兩者皆在相同之載體上表現。於某些實例中，重鏈與輕鏈編碼序列（其等之一亦會包括該 BDM）可位於單一載體上，例如於相同載體中之二個表現匣中。

【0291】 編碼該等分子之核酸序列亦可被插入至經設計以用於在真核生物宿主中表現外來序列之載體中。該載體之調節元件可根據特殊之真核生物宿主變化。

【0292】 有用之表現載體（例如）可由染色體、非染色體與合成性 DNA 序列之節段組成。適合的載體包括 SV40 之衍生物與已知之細菌質體，例如大腸桿菌質體 col E1、Pcr1、Pbr322、Pmb9 及其等之衍生物、諸如 RP4 之質體；噬菌體 DNA，例如噬菌體 λ 之為數眾多之衍生物，例如 NM989、與其他噬菌體 DNA，例如 M13 與絲狀單股噬菌體 DNA；酵母菌質體，諸如 2u 質體或其之衍生物；有用於真核生物細胞之載體，諸如有用於昆蟲或哺乳類動物細胞之載體；衍生自質體與噬菌體 DNA 之組合之載體，諸如已經修飾以利用噬菌體 DNA 或其他表現控制序列之質體；與類似者。

【0293】 編碼該等分子之核酸序列可併入至真核生物宿主細胞之基因組內並隨著宿主基因組複製而複製。供選擇地，帶有該等核酸序列之載

體可含有允許染色體外複製之複製起點。

【0294】 用於本文中，術語「啟動子」應以其之最廣的脈絡理解且包括基因組基因之轉錄調節序列，包括 TATA 盒或起始子元件，其對於精確之轉錄起始係所需的，伴隨或不伴隨改變核酸之表現之另外的調節元件（例如，上游活化序列、轉錄因子結合位置、增強子與減默子），例如對發育性及/或外部刺激反應，或以組織專一性之方式。於此前後文中，術語「啟動子」亦係用於描述重組、合成性或融合核酸、或衍生物，其賦予、活化或增強其可操作地連接之核酸之表現。例示性啟動子可含有額外複本之一或多個特殊調節元件以進一步增強該核酸之表現及/或改變該核酸之空間表現及/或時間表現。

【0295】 用於本文中，術語「可操作地連接至」意謂相較於核酸放置啟動子以使得該核酸之表現被該啟動子控制。

【0296】 許多用於細胞內表現之載體係可得的。其等之載體組份大體而言包括（但不限於）以下者之一或多者：訊號序列、編碼蛋白質之序列（例如衍生自本文中所提供之資訊）、增強子元件、啟動子、多腺苷酸化序列與轉錄終止序列。所屬技術領域中具有通常知識者會察覺到適合用於表現蛋白質之序列。例示性訊號序列包括原核生物分泌訊號（例如 pelB、鹼性磷酸酶、青黴素酶、Ipp、或熱穩定性腸毒素 II）、酵母菌分泌訊號（例如反轉酶前導子、 α 因子前導子、或酸磷酸酶前導子）或哺乳類動物分泌訊號（例如單純疱疹 gD 訊號）。

【0297】 於哺乳類動物細胞中有活性之例示性啟動子包括細胞巨大病毒立即早期啟動子（CMV-IE）、人類延伸因子 1- α 啟動子（EF1）、小型

細胞核 RNA 啟動子 (U1a 與 U1b)、 α 肌凝蛋白重鏈啟動子、猴病毒 40 啟動子 (SV40)、勞斯氏肉瘤病毒啟動子 (RSV)、腺病毒主要晚期啟動子、 β 肌動蛋白啟動子；包含 CMV 增強子/ β -肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子或其之活性片段之雜合調節元件。有用之哺乳類動物宿主細胞系之實例係以 SV40 轉形之猴腎臟 CV1 品系 (COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎臟品系 (次選殖以於懸浮培養物中生長之 293 或 293 細胞；嬰兒倉鼠腎臟細胞 (BHK, ATCC CCL 10)；或中國倉鼠卵巢細胞 (CHO)。

【0298】 用於將分離的核酸或包含其之表現構築體引入至宿主細胞中以供表現的方法對所屬技術領域中具有通常知識者而言係已知的。用於給定細胞之技術依賴已知的成功技術。用於將重組 DNA 引入至細胞中之方法包括微注射、由 DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、由脂質體介導之轉染，諸如藉由使用 lipofectamine (Gibco, MD, USA) 及/或 cellfectin (Gibco, MD, USA)、PEG 介導性 DNA 攝取、反轉錄病毒轉導、電穿孔與微粒轟擊，諸如藉由使用塗覆 DNA 之鎢或金顆粒 (Agracetus Inc., WI, USA) 以及其他。

【0299】 引入後可接著引起或允許從核酸之表現，例如藉由於供表現之條件下培養宿主細胞。

【0300】 本文之揭示內容亦提供一種方法，其包含於表現系統中使用如以上陳述之構築體以表現該抗體或免疫球蛋白抗原結合片段鏈與 BDM。

【0301】 本文之揭示內容亦提供重組宿主細胞，其包含一或多個於本文中描述之核酸序列。用於製造該蛋白質之宿主細胞可於各種各樣之培養基中培養，取決於所使用之細胞類型。諸如 Ham's F10 (Sigma)、最低之必須培養基 ((MEM), (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、與 Dulbecco 氏經修改

Eagle 氏培養基 ((DMEM)、Sigma) 之商業上可得之培養基係適合用於培養哺乳類動物細胞。用於培養其他於本文中討論之細胞類型之培養基係所屬技術領域中已知的。

【0302】 可將各種各樣之宿主/表現載體組合用於表現本文之揭示內容之核酸序列。有用之表現載體 (例如) 可由染色體、非染色體與合成性 DNA 序列之節段組成。適合的載體包括 SV40 之衍生物與已知細菌質體, 例如大腸桿菌質體 col El、Perl、Pbr322、Pmb9 與其等之衍生物、質體, 諸如 RP4; 噬菌體 DNA, 例如為數眾多之噬菌體之衍生物, 例如 NM989、與其他噬菌體 DNA, 例如 M13 與絲狀單股噬菌體 DNA; 酵母菌質體, 諸如 2u 質體或其之衍生物; 有用於真核生物細胞之載體, 諸如有用於昆蟲或哺乳類動物細胞之載體; 衍生自質體與噬菌體 DNA 之組合之載體, 諸如已經修飾以利用噬菌體 DNA 或其他表現控制序列之質體; 與類似者

【0303】 亦於本文中提供者係重組宿主細胞, 其包含一或多個於本文中描述之多核苷酸。

【0304】 各種各樣之表現控制序列 (控制與其操作性地連接之核酸序列之表現之序列) 之任一者可於此等載體中利用以表現該等核酸序列。如此有用之表現控制序列包括 (例如) SV40、CMV、牛痘、多瘤或腺病毒之早期或晚期啟動子、lac 系統、tip 系統、TAC 系統、TRC 系統、LTR 系統、噬菌體 λ 之主要操作子與啟動子區域、fd 外套蛋白質之控制區域、3-磷酸甘油酸激酶或其他解糖酵素之啟動子、酸性磷酸酶之啟動子 (例如 Pho5)、酵母菌交配因子之啟動子、與其他已知控制原核生物或真核生物細胞或其等之病毒之基因之表現之序列、與種種其等之組合。

【0305】 所屬技術領域中具有通常知識者會無須過度實驗就能夠選擇適當的載體、表現控制序列、與宿主以實現所欲之表現而無偏離本文之揭示內容之範圍。例如，於選擇載體，宿主必須需被考慮，因為該載體必須於其中起作用。該載體之複本數目、控制該複本數目之能力、與任何其他由該載體編碼之蛋白質（諸如抗生素標記）之表現亦會被考慮。所屬技術領域中具有通常知識者可選擇適當的載體、表現控制序列、與宿主以實現所欲之表現而無偏離本申請案之範圍。例如，於選擇載體，宿主被考慮，因為該載體必須於其中起作用。該載體之複本數目、控制該複本數目之能力、與任何其他由該載體編碼之蛋白質（諸如抗生素標記）之表現亦可被考慮。

【0306】 本文之揭示內容提供編碼如於本文中描述之多肽之分離的多核苷酸（核酸）、含有如此多核苷酸之載體、與用於轉錄及轉譯如此多核苷酸成多肽之宿主細胞及表現系統。

【0307】 本文之揭示內容亦提供呈如本文之其他處描述之質體、載體、轉錄或表現匣之形式之構築體，其包含至少一個如上之多核苷酸。

【0308】 本文之揭示內容亦提供宿主細胞，其含有一或多個如於本文中揭示之多核苷酸。

【0309】 在藉由表現來製造後，該分子可使用任何適合的技術分離及/或純化。於本文中描述之編碼性核酸分子與載體可以以下者提供：經分離及/或純化，例如自其等之天然環境，以實質上純的或均質的形式，或（於核酸之例子中）不含或實質上不含除了編碼具有所需功能之多肽之序列以外之核酸或基因來源。核酸可包含 DNA 或 RNA 且可係完全或部分合成性。

【0310】 對於在啤酒釀母菌中表現該等核酸序列，可使用來自內源性酵母菌質體之複製起點 2 μ 環。(Broach, (1983) Meth. Enz. 101:307)。供選擇地，可使用來自酵母菌基因組能夠促進獨立複製之序列（參見（例如）Stinchcomb 等人，(1979) Nature 282:39）；Tschemper 等人，(1980) Gene 10:157；與 Clarke 等人，(1983) Meth. Enz. 101:300）。

【0311】 用於酵母菌載體之轉錄控制序列包括用於合成解糖酵素之啟動子（Hess 等人，(1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149；Holland 等人，(1978) Biochemistry 17:4900）。其他所屬技術領域中已知之啟動子包括於 CDM8 載體中提供之 CMV 啟動子（Toyama 與 Okayama, 1990）FEBS 268:217 - 221）；用於 3-磷酸甘油酸激酶之啟動子（Hitzeman 等人，(1980) J. Biol. Chem. 255:2073）、與該等用於其他解糖酵素者。

【0312】 該等多肽之表現可藉由所屬技術領域中已知之方法偵測。例如，該等分子可藉由考馬斯染色 SDS-PAGE 凝膠與使用和抗體、免疫球蛋白抗原結合片段或 BDM 結合之抗體之免疫轉漬偵測。蛋白質回收可使用標準蛋白質純化方法（例如親和力層析術或離子交換層析術）執行以產生實質上純的產物（R. Scopes 於：“Protein Purification, Principles and Practice”，第三版，Springer-Verlag (1994)）。

【0313】 本文之揭示內容亦提供製造本文之揭示內容之多重專一性分子之方法，該方法包含以下步驟：

- (i)提供一或多個包含編碼該蛋白質（例如抗體）與 BDM 之多核苷酸之載體；
- (ii)以該載體轉形哺乳類動物宿主細胞（例如 CHO）；
- (iii)在有助於將該等蛋白質自該宿主細胞分泌至培養基中之條件下培養步

驟 (b) 之宿主細胞；與

(iv)回收步驟 (iii) 之被分泌之蛋白質。

【0314】 於一個實例中，該方法包含：

(i)提供編碼該多重專一性分子之重鏈之第一載體；

(ii)提供編碼該多重專一性分子之輕鏈之第二載體；與

(iii)以該等第一與第二載體轉形哺乳類動物宿主細胞（例如 CHO）。

合成性生產

【0315】 編碼本文之揭示內容之多肽之核酸可被合成性地製備，除了選殖地製備外或並非選殖地製備。該核酸可被設計成具有對於該多肽部分（例如免疫球蛋白與 BDM）為適當之密碼子。一般而言，若該序列會被用於表現，咸會選擇對於意欲之宿主較佳之密碼子。一般而言，若該序列會被用於表現，咸會選擇對於該意欲之宿主較佳之密碼子。完整之多核苷酸可自藉由標準方法製備之重疊之寡核苷酸集合並集成完整之編碼序列。參見（例如）Edge, Nature, 292:756 (1981)；Nambair 等人，Science, 223:1299 (1984)；Jay 等人，J. Biol. Chem., 259:6311 (1984)。

蛋白質之分離

【0316】 用於分離多肽之方法係所屬技術領域中已知及/或於本文中描述的。

【0317】 在多肽被分泌至培養基之情況中，來自如此表現系統之上清液可首先使用商業可得之蛋白質濃縮過濾器（例如 Amicon 或 Millipore

Pellicon 超過濾單元)濃縮。上述步驟之任一者中可包括蛋白酶抑制劑(諸如 PMSF)以抑制蛋白質水解且可包括抗生素以預防附加性污染物之生長。供選擇地,或此外,可(例如)使用連續離心自表現該多肽之細胞過濾上清液及/或分開其。

【0318】 自該宿主細胞製備之多肽可使用(例如)以下者來純化:離子交換、羧基磷灰石層析術、疏水性交互作用層析術、凝膠電泳、透析、親和力層析術(例如蛋白質 A 親和力層析術或蛋白質 G 層析術)、或任何上述者之組合。此等方法於所屬技術領域中係已知的且係於(例如)WO99/57134 或 Ed Harlow 與 David Lane (編者)Antibodies: A Laboratory Manual, 冷泉港實驗室,(1988)中描述。

【0319】 於一些實例中,本文之揭示內容之多肽係與異源性胺基酸序列(諸如例如訊號序列或親和力標籤)融合,而無影響其生物活性(即與其之目標之結合)。

【0320】 所屬技術領域中具有通常知識者亦會查知多肽可經修飾以包括親和力標籤以幫助純化或偵測,例如聚組胺酸標籤,例如六組胺酸標籤、或流行性感冒病毒血球凝集素(HA)標籤、或猴病毒 5 (V5)標籤、或 FLAG 標籤、或麩胱甘肽 S 轉移酶(GST)標籤。所得之多肽接著係使用所屬技術領域中已知之方法(諸如親和力純化)來純化。例如,包含六 his 標籤之多肽係藉由以下者純化:使包含該多肽之樣本與固定在固體或半固體撐體上之專一性地結合六 his 標籤之鎳-氨基三醋酸(Ni-NTA)接觸、洗滌該樣本以移除未結合之蛋白質、與隨後洗提所結合之蛋白質。

該藥理活性蛋白質與 BDM 之耦合

【0321】 根據本文之揭示內容之藥理活性蛋白質或胜肽與至少 BDM 之耦合可化學連接 (Brennan 等人(1985) Science 229:81) 或化學耦合 (Shalaby 等人(1992) J Exp Med 175:217-225) 或基因融合製備。

【0322】 此外，蛋白質 (例如抗體) 與 BDM 間之融合或連接可藉由常見共價或離子鍵、蛋白質融合、或異雙功能性交互連接子 (例如碳二亞胺、戊二醛、與類似者) 達成。亦可使用常見惰性連接子序列 (例如胜肽連接子)，其簡單地提供該蛋白質與 BDM 間所欲量之空間。如此連接子之設計對所屬技術領域中具有通常知識者係廣為人知的且係於例如 US 8,580,922；US 5,525,491；與 US 6,165,476 中描述。

【0323】 可將種種耦合或交聯劑用於共價共軛蛋白質。交聯劑之實例包括蛋白質 A、碳二亞胺、N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基-硫乙酸酯 (SATA)、5,5'-二硫雙 (2-硝基甲酸) (DTNB)、鄰仲苯基二順丁烯二亞醯胺 (oPDM)、N-琥珀醯亞胺基-3- (2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (SPDP)、與 4- (N-順丁烯二亞醯胺基甲基) 環己-1-甲酸磺酸基琥珀醯亞胺酯 (磺酸基-SMCC) (參見 (例如) Karpovsky 等人(1984) J. Exp. Med 160 1686、Liu, MA 等人(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 8648)。其他方法包括該等於 Paulus (1985) Behring Ins Mitt No 78, 1 18-132、Brennan 等人(1985) Science 229 81-83 與 Glennie 等人(1987) J Immunol 39 2367-2375) 中描述者。

【0324】 該連接子可促進增強之可撓性、及/或減少任二個蛋白質間之立體位阻。該連接子可來自天然來源，諸如被測定為以隨機捲曲存在於一個蛋白質之二個功能域間之序列。一個例示性連接子序列係於 RNA 聚合

酶 α 次單元之 C 端與 N 端功能域間找到之連接子。其他天然發生之連接子之實例包括於 1CI 及 LexA 蛋白質中找到之連接子。

【0325】 於連接子內，其胺基酸序列可基於該連接子之如憑經驗地判定或如藉由建模顯露之較佳特徵變化。於選擇連接子之考慮包括該連接子之可撓性、該連接子之電荷、與於天然發生之子單元中該連接子之一些胺基酸之存在。該連接子亦可經設計以使得該連接子中之殘基接觸 DNA，藉此影響結合親和力或專一性，或以與其他蛋白質交互作用。於一些實例中，特別是在子單元間必須跨越較長的距離時或在該等功能域必須被維持在特殊之組態下時，該連接子可視需要地含有另外的經折疊功能域。

【0326】 於一些實例中，較佳者係連接子之設計涉及功能域之佈置，其要求該連接子跨越相對短之距離，較佳係少於約 10 埃 (Å)。然而，於某些實施方式中，連接子跨越至多達約 50 Å 或更長之距離。

【0327】 術語「胜肽連接子」係關於一種短胜肽片段，其連結或耦合該多重專一性分子之多肽之蛋白質與 BDM 部分。該連接子較佳係由藉由胜肽鍵連接在一起之胺基酸構成。例如，該胜肽連接子可包含小型胺基酸殘基或親水性胺基酸殘基（例如甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、脯胺酸、天門冬胺酸、天門冬醯胺酸、等等）。例如，該等胜肽連接子係具有長度為至少 5 個胺基酸、或長度為約 5 個至約 100 個胺基酸、或長度為約 10 個至 50 個胺基酸、或長度為約 10 個至 15 個胺基酸之胺基酸序列之胜肽。

【0328】 於一個實例中，該連接子係由大部分之非空間位阻性胺基酸（諸如甘胺酸與丙胺酸）構成。因此於另一個實例中，該連接子係聚甘胺酸、聚丙胺酸或聚絲胺酸。

【0329】 所屬技術領域中具有通常知識者會領會到許多一般使用之胜肽連接子可用於本文之揭示內容之實施方式中。於某些實施方式中，該短胜肽連接子可包含重複單元以增加該連接子之長度。例如，二、三或四重複連接子。於一個實例中，該連接子包含式 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n 或包含式 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) n Ser，其中 n 係 3 至 6 之數字。

【0330】 於一個實例中，該連接子包含或係由以下序列組成：SGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16) 或 SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:17)。

【0331】 非胜肽連接子亦為可能。例如，可使用烷基連接子，諸如 -NH-(CH₂) s -C(O)-，其中 $s = 2-20$ 。此等烷基連接子可進一步以任何非空間位阻性基團（諸如低碳數烷基（例如 C₁-C₆）、低碳數鹽基、鹵素（例如 Cl、Br）、CN、NH₂、苯基）取代。一個例示性非胜肽連接子係具有 100 至 5000kD，較佳為 100 至 500kD 之分子量之 PEG 連接子。

【0332】 其他適用之連接子之實例包括 GSTVAAPS、TVAAPSGS 或 GSTVAAPSGS 或如此連接子之多聚體。其他實例包括 (TVSDVP) n (GS) m ，其中 $n=1$ 且 $m=1$ 或其中 $n=2$ 與 $m=1$ 或其中 $n=2$ 與 $m=0$ 。

【0333】 於另一個實例中，該連接子係 GS。

分析多肽活性

【0334】 本文之揭示內容之蛋白質（或胜肽）與 BDM 部分可根據已知方法藉由種種方式分析。此等分析可包括功能分析（例如細胞殺死分析、cAMP 或鈣流量分析）或結合分析（例如 ELISA 或競爭分析）。

【0335】 所利用之功能分析之類型會取決於該多肽之蛋白質或胜肽與 BDM 部分所結合之目標。

【0336】 亦可利用半生期分析。如此方法係所屬技術領域中已知的。二個一般用於測定蛋白質之半生期之方法係放射性短暫標記分析與環己亞醯胺追蹤 (Zhou P (2004) Methods Mol. Biol. 284:67-77)。

測量結合親和力

【0337】 表位之結合可藉由常見藉由常見抗原結合分析 (諸如 ELISA)、藉由基於螢光之技術 (包括 FRET)、或藉由諸如表面電漿子共振 (其測量分子之質量) 之技術測量。抗原結合蛋白 (例如 BDM) 對抗原或表位之專一性結合可藉由包括 (例如) 以下者之適合的分析測定: Scatchard 分析及/或競爭性結合分析, 諸如放射免疫分析 (RIA)、酵素免疫分析, 諸如 ELISA 與三明治競爭分析。

【0338】 可使用諸如表面電漿子共振分析之競爭分析以測定已經工程設計以與特殊之目標結合之 BDM 是否能夠與該特殊之目標結合。用於闡明, BDM 可經工程設計以與幹細胞因子受體 (CSFR 或 c-kit 受體) 結合與經測試其與天然配體 (c-kit) 之結合競爭之能力。用於測定經修飾之 BDM 競爭對目標之結合之能力以及測定其解離常數 (K_D) 之試管內競爭分析於所屬技術領域中係已知的。

【0339】 該多肽之蛋白質或 BDM 部分與其等個別之目標間之交互作用之結合親和力或解離常數 (K_D) 可藉由一些所屬技術領域中已知之方法測量。如此方法包括 (但不限於) 螢光滴定、競爭 ELISA、量熱方法, 諸

如等溫滴定量熱法 (ITC) 與表面電漿子共振 (BIAcore) 或生物-層 (Bio-layer) 干涉法 (例如 Blitz 系統 (ForteBio))。

【0340】 一個較佳之表面電漿子共振分析係 BIAcore，其係所屬技術領域中已知的。

【0341】 大部分結合部分具有範圍在低微莫耳每公升 (10^6) 至毫微莫耳每公升 (10^7 至 10^9) 之 K_D 值。大體而言，高親和力結合部分被視為係在低毫微莫耳每公升範圍 (10^9) 且極高親和力結合部分被視為係在微微莫耳每公升 (10^{12}) 範圍。

【0342】 分別之部分與其之目標間之複合物形成係被諸如以下者之許多不同的因子影響：分別之結合作伙伴之濃度、競爭者之存在。所使用之緩衝劑系統之 pH 與離子強度、與用於測定 K_D 之實驗方法 (例如，螢光滴定、競爭 ELISA 或表面電漿子共振) 或甚至是用於評估實驗數據之數學演算法。

【0343】 因此，對於所屬技術領域中具有通常知識者而言以下者係明顯的： K_D 值可於某個實驗範圍內變化，取決於用於測定特殊之免疫球蛋白或 BDM 對給定目標之親和力之方法與實驗設置。此意謂於所測量之 K_D 值可能存在有微小的誤差或容許範圍，取決於該 K_D 值是否係藉由表面電漿子共振 (Biacore)、藉由競爭 ELISA 或藉由「直接 ELISA」測定。

【0344】 於一個較佳之實例中，該 K_D 值係藉由使用對固定之目標之表面電漿子共振分析 (例如使用 BIAcore 表面電漿子共振 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 來測定。

【0345】 親和力可比該蛋白質或該 BDM 對不相關之胺基酸序列之親

和力大至少 1 倍、大至少 2 倍、大至少 3 倍、大至少 4 倍、大至少 5 倍、大至少 6 倍、大至少 7 倍、大至少 8 倍、大至少 9 倍、大至少 10 倍、大至少 20 倍、大至少 30 倍、大至少 40 倍、大至少 50 倍、大至少 60 倍、大至少 70 倍、大至少 80 倍、大至少 90 倍、大至少 100 倍、或大至少 1000 倍、或更多。蛋白質或 BDM 對目標（例如蛋白質抗原）之親和力可係（例如）約 100 毫微莫耳每公升（nM）至約 0.1 nM、約 100 nM 至約 1 微微莫耳每公升（pM）、或約 100 nM 至約 1 毫微微莫耳每公升（fM）或更大。

【0346】 於一個實例中，該蛋白質具有以 KD 測量約 200nM 或更小、約 100nM 或更小、約 50 nM 或更小、約 25 nM 或更小、約 10nM 或更小、約 5nM 或更小、約 1nM 或更小或約 0.5nM 或更小之親和力。

【0347】 於一個實例中，該 BDM 具有以 KD 測量約 200nM 或更小、約 100nM 或更小、約 50 nM 或更小、約 25 nM 或更小、10nM 或更小、約 5nM 或更小、約 1nM 或更小或約 0.5nM 或更小之親和力。

【0348】 生物-層干涉法係用於測量分子互動組內之生物分子交互作用之無標記技術。其係分析自二個表面（生物感應器尖端上之固定蛋白質之層與內部參考層）反射之白光之干涉圖形之光學分析技術。任何於與生物感應器尖端結合之分子之數目之改變皆造成於干涉圖形之變動，其可被即時測量。

【0349】 於溶液中固定在生物感應器尖端表面之配體與分析物間之結合產生在於生物感應器尖端之光學厚度之增加，其造成波長變動（ $\Delta\lambda$ ），其係生物層之厚度之改變之直接度量。交互作用係以即時測量，提供監視結合專一性、締合與解離之速率、或濃度之能力，有精確性與正確性。

【0350】 只有與生物感應器結合或自生物感應器解離之分子可變動干涉圖形並產生一個反應輪廓。未結合之分子、周遭之培養基之折射率之改變、或流率之改變不會影響干涉圖形。此係一個生物-層干涉法之獨特的特徵且延伸其之能力以在用於蛋白質-蛋白質交互作用、定量、親和力、與動力學之應用之粗樣本中執行。

目標

【0351】 根據本文之揭示內容之目標較佳係抗原。該抗原可選自蛋白質、聚糖、脂質、脂蛋白質或核酸。該蛋白質可係人類蛋白質、非人類蛋白質（例如靈長類動物、犬、貓、等等）、病毒蛋白質、酵母菌蛋白質、細菌蛋白質、藻類蛋白質、植物蛋白質或原生動物蛋白質。該蛋白質可係可溶性蛋白質或膜結合性蛋白質。可溶性蛋白質之實例包括（但不限於）轉錄因子、抗體、生長因子、血液蛋白質（例如白蛋白）、或藥物（例如類固醇、醫藥藥物、等等）。膜結合性蛋白質之類型包括生長因子受體、腫瘤標記、或介導至細胞內之運輸之標記（例如運鐵蛋白）、或 Fc 受體。

【0352】 該核酸目標可係 DNA、RNA 或 DNA 與 RNA 之組合。

【0353】 更明確言之，該目標係存在於該抗原上之表位。所屬技術領域中具有通常知識者會領會到抗原可包含一些獨特的表位，其等各自會被蛋白質（例如抗體）或 BDM 辨識。

【0354】 本文之揭示內容之多肽可與不同的目標結合。於一個實例中，該不同的目標係二或三個不同的抗原。各個抗原可存在於不同的細胞上。於另一個實例中，該多肽可與相同抗原上之二或三個不同的目標（例

如表位) 結合。較佳地, 蛋白質所結合之目標係與該 BDM 所結合之目標不同。

【0355】 根據本文之揭示內容之「目標抗原」可係蛋白質、胜肽、醣蛋白、多醣、聚糖、脂質、脂蛋白質或核酸。根據本文之揭示內容之目標抗原可被分泌或係膜結合性。如此抗原可衍生自細菌、哺乳類動物(人類與非人類)、真菌、藻類、原生動物來源。該蛋白質可係人類蛋白質、非人類蛋白質(例如靈長類動物、犬、貓、等等)、病毒蛋白質、酵母菌蛋白質、細菌蛋白質、藻類蛋白質、植物蛋白質或原生動物蛋白質。

【0356】 為相同之對於「第一目標抗原」、「第二目標抗原」、等等之提及會被理解成意謂該藥理活性蛋白質與該至少一個 BDM 部分與相同抗原結合但可與存在於該抗原上之不同表位結合。

【0357】 為不同之對於「第一目標抗原」、「第二目標抗原」、等等之提及會被理解成意謂該藥理活性蛋白質部分與該至少一個 BDM 部分與不同抗原且因此存在不同細胞上之不同表位結合。

(i)細菌抗原

【0358】 該抗原可衍生自細菌, 包括(但不限於)幽門螺旋桿菌、肺炎披衣菌、沙眼披衣菌、溶尿尿漿菌(*Ureaplasma urealyticum*)、肺炎黴漿菌、葡萄球菌屬物種、金黃色葡萄球菌、鏈球菌屬物種、釀膿鏈球菌、肺炎鏈球菌、草綠色鏈球菌、糞腸球菌、腦膜炎雙球菌、淋病雙球菌、炭疽桿菌、沙氏桿菌屬物種、傷寒沙氏桿菌、霍亂弧菌、鼠疫巴氏桿菌、銅綠假單胞菌、曲桿菌屬物種、空腸曲桿菌、芽胞梭菌屬物種、難養芽胞梭菌、分枝

桿菌屬物種、結核分枝桿菌、螺旋體屬物種、疏螺旋體屬物種、Burgdorferi 氏疏螺旋體、鉤端螺旋體屬物種、杜氏嗜血桿菌、白喉桿菌、百日咳博德氏桿菌、副百日咳博德氏桿菌 (*Bordetella parapertussis*)、支氣管敗血性博德氏桿菌、流行性感感冒嗜血桿菌、大腸桿菌、志賀桿菌屬物種、艾利希體屬物種、與立克次體屬物種。

(ii)病毒抗原

【0359】 該抗原可係衍生自病毒，包括(但不限於)流行性感感冒病毒、副流行性感感冒病毒、腮腺炎病毒、腺病毒、呼吸道融合病毒、艾司坦氏-巴爾氏病毒、鼻病毒、脊髓灰白質炎病毒、柯薩奇病毒、伊科病毒、麻疹病毒、德國麻疹病毒、水痘帶狀疱疹病毒、疱疹病毒(人類與動物)、單純疱疹病毒、小病毒(人類與動物)、細胞巨大病毒、肝炎病毒、人類乳頭狀瘤病毒、 α 病毒、黃病毒、布尼亞病毒、狂犬病病毒、沙狀病毒、絲狀病毒、HIV 1、HIV 2、HTLV-1、HTLV-II、FeLV、牛 LV、FeIV、犬瘟熱病毒、犬接觸傳染性肝炎病毒、貓杯狀病毒、貓鼻氣管炎病毒、TGE 病毒(豬)、與口蹄疫。

(iii)腫瘤抗原

【0360】 該目標抗原可係腫瘤相關性抗原。如此腫瘤相關性抗原包括(但不限於)MUC-1 與其之胜肽片段、蛋白質 MZ2-E、多形性上皮黏蛋白、葉酸結合蛋白 LK26、MAGE-1 或 MAGE-3 與其之胜肽片段、人類絨毛膜促性腺激素(HCG)與其之胜肽片段、癌胚抗原(CEA)與其之胜肽片段、 α

胎蛋白（AFP）與其之胜肽片段、胰臟癌胚抗原與其之胜肽片段、CA 125、15-3、19-9、549、195 與其之胜肽片段、前列腺專一性抗原（PSA）與其之胜肽片段、前列腺專一性膜抗原（PSMA）與其之胜肽片段、鱗狀細胞癌抗原（SCCA）與其之胜肽片段、卵巢癌抗原（OCA）與其之胜肽片段、胰臟癌相關性抗原（PaA）與其之胜肽片段、Her1/neu 與其之胜肽片段、gp-100 與其之胜肽片段、突變 K-ras 蛋白與其之胜肽片段、突變 p53 與其之胜肽片段、非突變 p53 與其之胜肽片段、經截斷表皮生長因子受體（EGFR）、嵌合蛋白質 p210BCR-ABL、端粒酶與其之胜肽片段、存活素與其之胜肽片段、Melan-A/MART-1 蛋白與其之胜肽片段、WT1 蛋白與胜肽片段、LMP2 蛋白與胜肽片段、HPV E6 E7 蛋白與胜肽片段、個體遺傳型蛋白與胜肽片段、NY-ESO-1 蛋白與胜肽片段、PAP 蛋白與胜肽片段、癌症睪丸蛋白與胜肽片段、與 5T4 蛋白與胜肽片段。

其他哺乳類動物抗原

【0361】 該目標抗原可係存在於位於心臟、血液系統、肺臟、腸、胃、直腸、前列腺、甲狀腺、肝臟或食道內之細胞上之抗原或表位。該目標抗原可係存在於經分泌蛋白質上之抗原或表位。經分泌蛋白質之實例包括（但不限於）激素、酵素、毒素與抗微生物劑、胜肽。供選擇地，該抗原或表位係存在於非膜結合性蛋白質上。

選擇性結合

【0362】 於一個實例中，相較於僅僅表現該等目標抗原之一者之細

胞，該分子可與表現該多重專一性分子之不同目標抗原之二或多者之細胞選擇性結合。

【0363】 如此細胞選擇性可藉由以下者達成：滴定該雙專一性物或三專一性物上之各個部分（例如蛋白質或 BDM）之結合親和力，以使得各個個別的部分與其之目標之結合在缺乏其他該雙專一性物或三專一性物所結合之目標下不足以使表現該目標之細胞之螢光活化性細胞分選（FACS）或免疫螢光標記或細胞殺死成為可能，但其中該等弱結合部分之組合促使該雙專一性物或三專一性物之充分結合以使共表現該等相關目標分子之細胞相較於僅僅表現一個如此目標之細胞之選擇性結合成為可能，以使得選擇性 FACS 分選、免疫螢光標記或細胞殺死可被達成。

組成物

【0364】 當與醫藥上可接受之載劑或賦形劑組合時，本文之揭示內容之多重專一性分子可被用作為組成物。如此醫藥組成物係有用於活體內投予至一個對象。

【0365】 醫藥上可接受之載劑對於被投予之患者而言係生理上可接受的且保有其與之一起投予之分子之治療特徵。醫藥上可接受之載劑與其等之調配係於（例如）Remington' pharmaceutical Sciences 18th edn. Ed. A Gennaro, Mack Publishing Co., Easton PA 1990）中一般地描述。一個例示性載劑係生理食鹽水。語詞「醫藥上可接受之載劑」用於本文中意謂一種醫藥上可接受之材料、組成物或媒劑，諸如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、溶劑或封膠囊材料，其涉及自一個器官或身體之部分之投予位置攜帶

或運輸該多肽至另一個器官或身體之部分。各載劑在與該調配物之其他成分相容且對患者非有害之意義上必須係可接受的。

【0366】 該醫藥上可接受之賦形劑可包括防腐劑或冷凍保存劑。

【0367】 醫藥組成物可被調配成與特定投予途徑（全身性或局部性）相容。

【0368】 於一個實例中，於本文中描述之組成物可被口部地、非經腸地、藉由吸入噴霧、吸附、吸收、外用地、直腸地、鼻部地、頰部地、陰道地、室內地、經由呈含有常見非毒性醫藥上可接受之載劑之劑量調配物之經植入儲器、或藉由任何其他便利之劑量形式投予。術語「非經腸」用於本文中包括皮下、靜脈內、肌肉內、腹膜內、鞘內、室內、胸骨內、與顱內注射或灌注技術。

【0369】 用於將分子製備成適合用於投予至一個對象之形式（例如醫藥組成物）之方法係所屬技術領域中已知的且包括（例如）如於 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) 與美國醫典：國家處方集（Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1984）中描述之方法。

【0370】 本文之揭示內容之醫藥組成物係特別有用於非經腸投予，諸如靜脈內投予或投予至體腔或器官或關節之內腔中。該用於投予之組成物一般會包含多肽溶解於醫藥上可接受之載劑（例如水性載劑）之溶液。可使用各種各樣之水性載劑，例如經緩衝鹽水與類似者。該組成物可含有接近生理條件所需之醫藥上可接受之輔助物質，諸如 pH 調整劑與緩衝劑、毒性調整劑與類似者，例如醋酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉與類

似者。本文之揭示內容之蛋白質於此等調配物中之濃度可廣範圍地變化，且主要會基於流體體積、黏性、體重與類似者根據所選之特殊投予模式與患者之需要來選擇。例示性載劑包括水、鹽水、林格氏溶液、右旋糖溶液、與 5% 人類血清白蛋白。亦可使用非水性媒劑，諸如混合之油與油酸乙酯。亦可使用脂質體作為載劑。該媒劑可含有小量之增強等滲性與化學穩定性（例如緩衝劑、防腐劑或添加劑）之添加劑。

【0371】 於調配後，本文之揭示內容之多肽會以與該劑量調配物相容之方式且以治療上/預防上有效之量投予。調配物係以各種各樣之劑量形式輕易地投予，該等劑量形式諸如以上描述之可注射溶液之型式，但其他醫藥上可接受之形式亦被考慮，例如錠劑、丸劑、膠囊或其他用於口部投予之固體、栓劑、子宮托、鼻部溶液或噴霧、氣溶膠、吸入劑、脂質體形式與類似者。亦可使用醫藥之「緩慢釋放」膠囊或組成物。緩慢釋放調配物大體而言被設計成在長期時間期間給予恆定藥物水平且可用於遞送本文之揭示內容之化合物。

【0372】 對於靜脈內投予，適合的載劑包括生理食鹽水、抑菌水、Cremophor EL™（BASF, Parsippany, N.J.）或磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）。該載劑可係含有（例如）以下者之溶劑或分散介質：水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、與液體聚乙二醇、與類似者）、與適合的其等之混合物。流動性可藉由（例如）以下者維持：使用諸如卵磷脂之塗層、於分散液之例子中維持所需之顆粒大小與使用表面活性劑。抗細菌劑與抗真菌劑包括（例如）對羥苯甲酸酯類、氯丁醇、酚、抗壞血酸與乙汞硫柳酸鈉。可於該組成物中包括等張劑，例如糖、多元醇，諸如甘露糖醇、山梨糖醇、與氯化

鈉。所得之溶液可被包裝以以其本身使用或被凍乾；該經凍乾製劑之後可於投予前與無菌溶液結合。

【0373】 醫藥上可接受之載劑可含有穩定、增加或延遲吸收或清除之化合物。如此化合物包括（例如）碳水化合物，諸如葡萄糖、蔗糖、或聚葡萄糖；低分子量蛋白質；減少胜肽之清除或水解之組成物；或賦形劑或其他穩定劑及/或緩衝劑。延遲吸收之劑包括（例如）單硬脂酸鋁與明膠。亦可使用清潔劑以穩定或以增加或減少該醫藥組成物之吸收，包括脂質體載劑。為保護其免於消化，該化合物可與組成物複合以給予其對酸性及酵素性水解之抗性，或該化合物可複合在適當之抗性載劑（諸如脂質體）中。保護多肽免於消化之方法係所屬技術領域中已知的（參見（例如）Fix (1996) Pharm Res. 13:1760 1764；Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol. 48:119 135；與 U.S. Pat. No. 5,391,377，其等描述用於口部遞送治療劑之脂質組成物）。

【0374】 可使用生物可降解生物相容的聚合物，諸如乙烯/醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚羥乙酸、膠原、聚原酸酯（polyorthoester）、與聚乳酸。用於製備如此調配物之方法對所屬技術領域中具有通常知識者而言係已知的。該等材料亦可自 Alza Corporation 與 Nova Pharmaceuticals, Inc 商業地獲得。脂質體懸浮液（包括使用抗體或病毒外套蛋白質靶向細胞或組織之脂質體）亦可被用作為醫藥上可接受之載劑。此等可根據所屬技術領域中已知之方法製備，例如如於 U.S. Pat. Nos. 4,235,871；4,501,728；4,522,811；4,837,028；6,110,490；6,096,716；5,283,185；5,279,833；Akimaru (1995) Cytokines Mol. Ther. 1:197 210；Alving (1995) Immunol. Rev. 145: 5 31；與 Szoka (1980) 10 Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467）中描述的。能夠持續遞送包括胜肽之小型

分子之生物可降解的微球或膠囊或其他生物可降解的聚合物組態係所屬技術領域中已知的（參見（例如）Putney (1998) Nat. Biotechnol. 16:153 157）。

【0375】 本文之揭示內容之分子可於微胞內併入（參見（例如）Suntres (1994) J. Pharm. Pharmacol. 46:23 28；Woodle (1992) Pharm. Res. 9:260 265）。該分子可被接附至脂質單層或雙層之表面。例如，分子可被接附至含有醯肼-PEG-（二硬脂醯基磷脂醯基）乙醇胺脂質體（參見（例如）Zalipsky (1995) Bioconjug. Chem. 6: 705 708）。供選擇地，可使用任何脂質膜之形式，諸如平面脂質膜或完整細胞（例如紅血球）之細胞膜。脂質體與含脂質調配物可以任何方式（包括（例如）靜脈內、跨皮（參見（例如）Vutla (1996) J. Pharm. Sci. 85:5 8）、跨黏膜、或口部投予）遞送。

【0376】 本文之揭示內容之組成物可與其他如本文中所提供之治療部分或成像/診斷部分組合。治療部分及/或成像部分可以分開之組成物或以共軛之部分提供。連接子可視需要包含在共軛部分中且已於本文之其他部分描述。

【0377】 於本文中揭示之分子亦可被調配成免疫脂質體。含有該多肽之脂質體係藉由諸如於以下者描述之所屬技術領域中已知之方法製備：Epstein 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985)；Hwang 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)；與 U.S. Pat. Nos. 4,485,045 與 4,544,545。具有增強之循環時間之脂質體係於 U.S. Pat. No. 5,013,556 中揭示。

【0378】 用於活體內投予之調配物係無菌的。滅菌可輕易地藉由通過無菌過濾膜過濾來實現。

【0379】 本文之揭示內容之組成物可與其他治療劑（例如化學治療

劑)一起投予。化學治療劑係所屬技術領域中已知的且包括細胞毒性藥物與細胞生長抑制性藥物。非限制性實例包括太平洋紫杉醇、順鉑、胺甲喋呤、多柔比星 (doxorubicin)、氟達拉濱 (fludarabine)、等等。取決於欲治療之病況，亦考慮其他治療劑。

【0380】 本文之揭示內容之一個實施方式考慮使用本文之揭示內容之醫藥組成物之任一者以製造用於治療失調之醫藥品。醫藥品可被包裝在具有適當之標籤之適合的醫藥包裝內，其中該標籤係用於指示於一個對象中治療失調。

標記與偵測

【0381】 本文之揭示內容提供於本文中描述之以一個劑標記之分子。於一實例中，該劑係成像/可偵測部分。於另一個實例中，該劑係治療性部分。用於標記多肽之方法會係所屬技術領域中具有通常知識者所熟悉的。

【0382】 術語「標記」或「經標記」係意欲去涵蓋藉由將可偵測物質耦合耦合 (即物理地連接) 至該蛋白質或 BDM 而直接標記該蛋白質 (例如抗體) 或 BDM、以及藉由與被直接地標記之另一個試劑之反應性間接地標記。該術語亦包括共價或非共價耦合。

【0383】 於一個實例中，該分子可以毒素、放射性核種、與鐵相關之化合物、染料、成像劑或螢光標記或化學治療劑標記。

【0384】 供選擇地，該分子可以可偵測標記 (諸如放射性核種、與鐵相關之化合物、染料、成像劑或用於免疫偵測目標抗原之螢光劑) 標記。

【0385】 放射性標記之非限制性實例包括)例如) ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{71}Ge 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{77}As 、 ^{81}Rb / ^{81}MKr 、 ^{87}MSr 、 ^{90}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{100}Pd 、 ^{101}Rh 、 ^{103}Pb 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{119}Sb 、 ^{121}Sn 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{128}Ba 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{131}Cs 、 ^{143}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Eu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{191}Os 、 ^{193}Pt 、 ^{194}Ir 、 ^{197}Hg 、 ^{199}Au 、 ^{203}Pb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 與 ^{213}Bi 。

【0386】 各種各樣之放射性核種係可用於製造經放射性共軛之蛋白質。實例包括(但不限於)低能放射性核種(例如適合用於診斷目的),諸如 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、與類似者。例如,該放射性核種係 γ 、光子、或正電子發射性放射性核種,其具有適合用於允許於投予之間之經過時間後之活性或偵測以及定位至成像位置之半生期。本文之揭示內容亦涵蓋高能放射性核種(例如用於治療性目的),諸如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 與 ^{188}Re 。此等同位素典型地產生高能 α 粒子或 β 粒子,其等具有短的路徑長度。如此放射性核種殺死其等靠近之細胞、例如該共軛物已接附或已進入至之贅生物細胞。其等對非局部性細胞有很小的功效或無功效且實質上係非致免疫性。供選擇地,高能同位素可藉由熱照射一個否則會穩定之同位素產生,例如如於硼中子捕捉治療(Guan 等人,1998)。其他可為適合的同位素係於以下者中描述:Carter. (2001) Nature Reviews Cancer 1, 118-129、Goldmacher 等人(2011) Therapeutic Delivery 2;397-416、Payne (2003) Cancer Cell 3, 207 - 212、Schrama 等人,(2006) Nature Rev. Drug Discov. 5, 147 - 159、Reichert 等人(2007) Nature Reviews Drug Discovery 6; 349-356。

【0387】 毒素包括任何對細胞有害（例如殺死）之劑。其他與製備抗體免疫毒素共軛物有關之技術係於例如 US 5,194,594 中提供且可被用於本文之揭示內容中。毒素之非限制性實例包括（例如）白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素 A 鏈（來自銅綠假單胞菌）、蓖麻毒素 A 鏈、想思子素 A 鏈、葫蘆根毒素（modeccin）A 鏈、 α -sarcin、桐油樹（*Aleurites fordii*）蛋白質、石竹素（dianthin）蛋白、美洲商陸蛋白質（PAPI、PAPII、與 PAP-S）、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白（curcin）、巴豆毒素、肥皂草（*sapaonaria officinalis*）抑制劑、gelonin、mitogellin、局限麴菌素（restrictocin）、酚霉素（phenomycin）、enomycin、新月毒素、產氣莢膜芽胞梭菌磷脂酶 C（PLC）、牛胰臟核糖核酸酶（BPR）、抗病毒蛋白質（PAP）、想思子素、眼鏡蛇毒因子（CVF）、gelonin（GEL）、皂草素（Saporin，SAP）viscumin。

【0388】 與鐵相關之化合物之非限制性實例包括（例如）磁性氧化鐵顆粒、三價鐵或二價鐵顆粒、Fe₂O₃ 與 Fe₃O₄。與鐵相關之化合物及標記多肽、蛋白質與胜肽之方法可（例如）於 U.S.專利案 4,101,435 與 4,452,773、以及 U.S.公開申請案 20020064502 與 20020136693 中找到，其等之每一者特此以其等之完整內容以引用方式納入。

【0389】 於某些實例中，該分子可被標記至細胞毒素或其他細胞增殖抑制化合物，以將該劑之遞送定位至腫瘤細胞。例如，該劑可選自由劑、酵素抑制劑、增殖抑制劑、溶胞劑、DNA 或 RNA 合成抑制劑、膜滲透性修改劑、DNA 代謝物、氯乙硫醚衍生物、蛋白質製造抑制劑、核糖體抑制劑、凋亡誘發劑、與神經毒素所組成之群組。

【0390】 於一個實例中，如於本文中描述之分子包含一或多個可偵測

標記以幫助偵測及/或分離。例如，該多肽包含螢光標記，諸如（例如）螢光素（FITC）、5,6-羧基甲基螢光素、德克薩斯紅（Texas red）、硝基苯并-2-噁-1,3-二唑-4-基（NBD）、香豆素、丹磺醯氯、玫瑰紅、4'-6 二甲脒基-2-苯基吡啶（DAPI）、與花青染料 Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 與 Cy7、螢光素（5-羧基螢光素-N-羥基琥珀醯亞胺酯）、玫瑰紅（5,6-四甲基玫瑰紅）。此等螢光劑之吸收與放射最大值分別係：FITC（490 nm；520 nm）、Cy3（554 nm；568 nm）、Cy3.5（581 nm；588 nm）、Cy5（652 nm；672 nm）、Cy5.5（682 nm；703 nm）與 Cy7（755 nm；778 nm）。

【0391】 於某些實例中，該分子可與有用於成像腫瘤之劑耦合。如此劑包括：金屬；金屬螯合劑；鏷系元素；鏷系元素螯合劑；放射性金屬；放射性金屬螯合劑；正電子放出性核種；微氣泡（用於超音波）；脂質體；被封微膠囊於脂質體或奈米球中之分子；單晶氧化鐵奈米化合物；磁共振成像對比劑；光吸收、反射及/或散射劑；膠態顆粒；螢光團，諸如近紅外光螢光團。於許多實例中，如此第二官能性/部分會係相對大的，例如大小係至少 10 amu，且於許多實例中大小可係至少 50、100 或 250 amu。於某些實例中，該第二官能性係螯合金屬之螯合物部分，例如對於放射性金屬或順磁性離子之螯合劑。於其他實例中，其係對於有用於放射性治療或成像程序之放射性核種之螯合劑。

【0392】 供選擇地，或此外，該分子可以（例如）諸如以下者之磁性或順磁性化合物標記：鐵、鋼、鎳、鈷、稀土物質、釹-鐵-硼、二價鐵-鈷-鎳-二價鐵、鈷-鈷、或亞鐵酸鋇。

【0393】 於另一個實例中，該分子係與「受體」（諸如鏈黴抗生物素

蛋白) 共軛以用於細胞預靶向，其中該共軛物被投予至患者，接著使用清除劑自循環移除未結合之共軛物並接著投予與治療劑(例如放射性核苷酸) 共軛之「配體」(例如抗生物素蛋白)。

【0394】 例示性治療劑包括(但不限於)抗血管生成劑、抗新血管生成及/或其他血管形成劑、抗增殖劑、促凋亡劑、化學治療劑、抗有絲分裂劑(例如抗有絲分裂劑奧里斯他汀(Auristatin)，(MMAF/MMAE 根據 Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 1 - 6) 或治療性核酸。

【0395】 可用作為本文中之劑之化學治療劑包括細胞毒性藥物與細胞生長抑制藥物。化學治療劑可包括該等對細胞具有其他功效(諸如將經轉形狀態逆轉成經分化狀態)者或該等抑制細胞複製者。有用於本發明之已知之細胞毒性劑之實例係於例如 Goodman 等人，“The Pharmacological Basis of Therapeutics”，第六版，A.B. Gilman 等人，eds./Macmillan Publishing Co. 紐約，1980 列舉。此等包括紫杉烷，諸如太平洋紫杉醇與多烯紫杉醇；氮，諸如甲基二(氯乙基)胺、黴法蘭(melphalan)、尿嘧啶芥子與氯芥苯丁酸；伸乙亞胺衍生物，諸如沙奧特帕(thiotepa)；磺酸烷酯，諸如硫酸布他卡因(busulfan)；亞硝基尿素，諸如環己亞硝(lomustine)、司莫司汀(semustine)與鏈尿佐菌素(streptozocin)；三氮烯，諸如達卡巴仁(dacarbazine)；葉酸類似物，諸如胺甲喋呤；嘧啶類似物，諸如氟尿嘧啶、阿拉伯糖基胞嘧啶(cytarabine)與阿紫立平(azaribine)；嘌呤類似物，諸如巯基嘌呤與硫鳥糞嘌呤；長春花屬生物鹼，諸如長春花鹼與長春新鹼；抗生素，諸如放線菌素、道諾黴素、多柔比星(doxorubicin)、與絲裂黴素；酵素、鉑配位錯合物，諸如順鉑；經取代之尿素，諸如羥基尿素；甲基胍衍生物，諸如丙卡

巴肼（procarbazine）；腎上腺皮質抑制劑，諸如米托坦（mitotane）；激素與拮抗劑，諸如腎上腺皮質類固醇（普賴蘇（prednisone））、助孕素（經基助孕酮己酸鹽、醋酸鹽與 megestrol 醋酸鹽）、動情素（二乙基二苯乙烯雌酚與乙炔雌二醇）、與雄性素（辜固酮丙酸鹽與氟經甲基辜酮）。

【0396】 於一個實例中，如於本文中描述之多重專一性分子係與另一個蛋白質（例如人類血清白蛋白或 HSA）進一步共軛或連接。於另一個實例中，該非抗體蛋白質係 HSA。

【0397】 該分子亦可與治療劑或脂質體（例如含藥物脂質體）共軛或連接。

【0398】 亦可使用干擾蛋白質合成之藥物；如此藥物對所屬技術領域中具有通常知識者係已知的且包括嘌呤黴素、環己亞醯胺、與核糖核酸酶。

【0399】 此外，本文之揭示內容考慮其他標記，諸如生物素接著鏈黴抗生物素蛋白-鹼性磷酸酶（AP）、辣根過氧化酶。

【0400】 本文之揭示內容之分子可經修飾以含有另外的非蛋白質性部分，其係所屬技術領域中已知的且可輕易獲得。例如，適合用於衍生該蛋白質之部分係生理上可接受之聚合物，例如水可溶性聚合物。水可溶性聚合物之非限制性實例包括（但不限於）聚乙二醇（PEG）、聚乙烯醇（PVA）、或聚丙二醇（PPG）。

用途

【0401】 於一個實例中，本文之揭示內容之分子可用於帶有該蛋白質（或胜肽）及/或 BDM 與其結合之表位之所欲之抗原之親和力純化或偵測。

【0402】 本文之揭示內容亦提供偵測該多肽之蛋白質與 BDM 之一或兩者與其結合之目標之方法。如此方法可（例如）利用如於以上描述之可偵測標記之使用。於一個實例中，不同的標記可被利用於該蛋白質與該 BDM 以鑑認該被結合之目標是否係被該蛋白質或該 BDM 結合者。

【0403】 可利用各種各樣之形式以測定一個樣本是否含有與該蛋白質或胜肽及/或 BDM 結合之目標（例如蛋白質）。如此形式之實例包括（但不限於）酵素免疫分析（EIA）、放射免疫分析（RIA）、西方墨點轉漬分析與酵素連接免疫吸附分析（ELISA）。

【0404】 於一個形式中，該多肽可被用於諸如西方墨點轉漬或免疫螢光技術之方法中以偵測目標。

【0405】 該蛋白質（或胜肽）或 BDM 與其結合之多肽或目標抗原可被固定在固體撐體上。供選擇地，該多重專一性分子可與固體撐體結合。適合的固相撐體或載劑包括任何能夠結合抗原（即目標）或免疫球蛋白或 BDM 之撐體。廣為人知之撐體或載體包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚葡萄糖、尼龍、澱粉酶、天然與經修飾纖維素、聚丙烯醯基醯胺、輝長石、與磁鐵礦。所屬技術領域中具有通常知識者會知道許多其他適合用於結合該蛋白質、BDM 或目標抗原的載體，且會能夠改造如此撐體以用於本文之揭示內容。例如，目標蛋白質可於聚丙烯醯基醯胺凝膠電泳上跑膠並固定至固相撐體（諸如硝基纖維素）上。該撐體可接著以適合的緩衝劑洗滌然後以經可偵測標記之多肽處理。該固相撐體可接著以緩衝劑洗滌第二次以移除未結合之多肽。該固體撐體上經結合標記之量可接著藉由常用方式偵測。

【0406】 於一個實例中，本文之揭示內容之分子可被用作為醫藥品。

本文之揭示內容之多重專一性分子之優點

【0407】 關於非抗體蛋白質，將該 BDM 加至如此蛋白質可協助增加該蛋白質之穩定性、循環時間及/或生物活性。例如，可使因子 VIII 蛋白質與和人類血清白蛋白結合之 VLD 耦合以使得該蛋白質之半生期增加。此對於患有血友病之對象具有在以較低頻率給藥之方面之明顯優點。

【0408】 關於抗體，根據本文之揭示內容之分子提供相較於基於雙專一性抗體之治療劑之優點。用於改善抗體之一或多個特徵（例如差的治療性抗體）之簡單且效率高的方法係去使一或多個與特定治療目標結合之單結合功能域分子（BDM）與對所關注之目標有專一性之抗體或免疫球蛋白抗原結合片段接附。

【0409】 使用此雙專一性方法之優點係：簡單且高度有效率之雙專一性抗體產生；該方法可應用於任何抗體序列；親本抗體保有其原本之結合位置與專一性；親本抗體保有原本之結合性；親本抗體保有其原本之結構與功能且對於挑選應用而言抗體介導性效應功能被保留；包括血清半生期之抗體藥動學被保留；該雙專一性產物無縫地併入至現存 IgG 生產程序（諸如製造、純化、調配與所有其他基於標準 IgG 程序之程序）中。

【0410】 於挑選應用，由於基於抗體 Fab 片段之雙專一性物相較於完整抗體之較小的分子量、於血流中較短的半生期與改善的分子量對結合位置比率，其等亦會係所欲的。

【0411】 作為一個實例，傳統上已以完整抗體處理之毒性物質之中和

可以 Fab 更有效地處理。由於抗體相較於毒性物質（典型地少於 1 kDa）之相對地大的分子量（150kDa），需要大量的抗體以化學計量地與毒素結合。由於於本文中描述之雙專一性或三專一性 Fab 給予複數個結合位置，該雙專一性物或三專一性物可以較低的劑量使用。Fab 相較於抗體之小尺寸使毒性物質-Fab 複合物透過腎臟快速地排出。再次地，用於產生基於 Fab 之雙專一性物之高效率且簡單的方法係使與特定目標結合之 BDM 接附至對所關注之目標有專一性之現存 Fab。

套組

【0412】 本文之揭示內容亦提供包含於本文中描述之多重專一性分子加上供使用之用法說明之套組。於該組成物被凍乾之情況下，該套組可含有其他溶液之製劑以復水該等製劑。該用法說明可於「印刷品」上，該「印刷品」（例如）於在該套組內或貼在該套組上之紙或硬紙板上、或於固定至該套組或包裝材料之標籤上、或接附至含有該套組之組份之小瓶或管。

【0413】 此外，該套組可進一步包括本文中所提供之其他部分之任一者，諸如（例如）化學治療劑。

【0414】 該套組可進一步包括用於本文中所提供之分析（例如 ELISA 分析）之組份。

【0415】 該套組可進一步包括明確說明（例如）產物描述、投予之模式與治療之適應症之標記。該標記或包裝插入物可包括適當之書面用法說明。

【0416】 所屬技術領域中具有通常知識者會領會到可對以上描述之實施方式作為數眾多之變化及/或修飾，而無偏離本文之揭示內容之廣泛一般性範圍。本文之實施方式因此應於所有方面皆被視為係闡明性且非係限制性。

實施例 1 抗體雙專一性與三專一性分子之產生

i)載體產生

【0417】 CTLA-4 BDM 之基因構築與選殖係藉由標準且被充分描述之技術且進一步係如於 US 7,166,697 中先前描述的。該 CTLA-4 BDM 係獲自文庫（Geneart）。基因文庫 1696327 係使用合成性同義寡核苷酸集合，其目標為於對應於結合環區域之 DNA 序列中含有不同的取代。

【0418】 於此等實施例中使用之 CTLA-4 序列包含天然序列之 C 端修飾，其中該天然序列 PEPCPDSDGSTG 係以 PEPSPDSN 置換。此等序列不含允許該 BDM 維持單體形式之 C 端 Cys 殘基。

【0419】 製造編碼以下者之核酸構築體：融合至 B7-1 結合性 CTLA-4 似 V 功能域序列之抗溶菌酶 IgG1 重鏈序列（被稱為 D1.3 IgG-VLDx2 (HC)）與融合至 B7-1 結合性似 V 功能域序列之抗溶菌酶 IgG κ 輕鏈序列（被稱為 D1.3 IgG-VLDx2 (LC)）。該 VLD 係透過 Gly-Ser 連接子序列分別與該抗體重（H）或輕（L）鏈耦合。所有的 DNA 構築體皆藉由限制分析與 DNA 定序確認並藉由標準且為人熟知之技術測試重組蛋白質之表現。

【0420】 此等構築體之序列係於以下顯示。抗原結合性環係於有關處加底線：

【0421】 B7-1 結合性似 V 功能域 (VLD) 之序列 (SEQ ID NO:13)

KAMHVAQPAVVLASSRGIA SFVCEY ASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCA
ATYMTGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP
YYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN

VLD 之結合環被加底線。

【0422】 連接子序列 (SEQ ID NO:16)

SGGGGSGGGGSGGGGS

【0423】 連接子序列 (SEQ ID NO:17)

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

【0424】 用於抗體 - VLD 融合物之抗溶菌酶 IgG1 重鏈序列 (SEQ ID NO:18)

EVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMW
GDGNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRL
DYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0425】 藉由連接子與 B7-1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌酶 IgG1 重鏈
之序列 (D1.3 IgG-VLDx2 (HC)) (SEQ ID NO:19)

EVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMIW
 GDGNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRL
 DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGKAM
 HVAQPAVVLASSRGIA SFVCEY ASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY
MTGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL
 GIGNGTQIYVIDPEPSPDSN

VLD 之結合環被加底線。

【0426】 抗溶菌酶 IgG κ 輕鏈 (SEQ ID NO:20)

DIELTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYYTTT
 LADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSPTPTFGGGTKLEL
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC

【0427】 以 21 aa Gly-Ser 連接子與 B7-1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌酶
 IgG κ 輕鏈 (被稱為 D1.3 IgG-VLDx2 (LC)) (SEQ ID NO:21)

DIELTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYYTTT

LADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSPTPRTFGGGTKLEL
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGKAMHVAQPAVVLAASSRGIA SFVCEYAS
PGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMTGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNL
TIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN
VLD 之結合環被加底線。

【0428】 以 21aa Gly-Ser 連接子與 B7.1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌酶
Fab κ 輕鏈（被稱為 D1.3 Fab-VLDx1 (LC) (SEQ ID NO:22))
DIELTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKGKSPQLLVYYTTT
LADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSPTPRTFGGGTKLEL
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGKAMHVAQPAVVLAASSRGIA SFVCEYAS
PGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMTGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNL
TIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN
VLD 之結合環被加底線。

【0429】 以 21aa Gly-Ser 連接子與 B7.1 結合性 VLD 耦合之抗溶菌酶
Fab 重鏈（被稱為 D1.3 Fab-VLDx1 (HC) (SEQ ID NO:23))
EVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMW
GDGNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRL
DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV

SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGKAMHVAQPAVVLASSRGI
 ASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMTGNELTFLDDSICTG
 TSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPSP
 DSN

VLD 之結合環被加底線。

【0430】 抗溶菌酶 Fab 重鏈（具有 C 端 His₆與 myc 標籤）（SEQ ID NO:24）

EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMW
 GDGNTDYNALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRL
 DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKRVEPKSCAAAGLGHHHHHHGAAEQKLISEEDL

ii)雙專一性與三專一性分子之製造

【0431】 將編碼抗體-VLD 或 Fab-VLD 序列之個別重鏈與輕鏈選殖入表現載體 pcDNA3.4（Thermo Fisher）中。該載體係於大腸桿菌細胞（來自 Agilent Technologies 之 Electro Ten Blue）中製造/擴增。

【0432】 根據本文之揭示內容之雙專一性與三專一性分子之示意圖經由圖解於圖 2-4 針對抗體-VLD 分子顯示並於圖 5-7 針對 Fab-VLD 分子顯示。

【0433】 圖 2 顯示藉由以下者創造之根據一個實例之抗體-VLD 雙專

一性分子[D1.3 IgG-VLDx2 (HC)]之示意圖：耦合目標專一性 VLD（例如與目標 B 結合者）與抗溶菌酶 IgG1 抗體重鏈之各恆定重（CH3）鏈序列之末端。該抗體分子通過該抗體重鏈與輕鏈可變區域與目標 A 結合且通過該重鏈上之 VLD 與目標 B 結合。

【0434】 圖 3 顯示藉由以下者創造之根據一個實例之抗體-VLD 雙專一性分子[D1.3 IgG-VLDx2 (LC)]之示意圖：耦合目標專一性 VLD（例如與目標 B 結合者）與抗溶菌酶 IgG1 抗體輕鏈之各恆定輕（CL）鏈序列之末端。該分子通過該抗體重鏈與輕鏈可變區域與目標 A 結合且通過該輕鏈上之 VLD 與目標 B 結合。

【0435】 圖 4 顯示藉由以下者創造之根據一個實例之抗體-VLD 三專一性分子 D1.3 IgG-VLDx4 (LC+HC)之示意圖：耦合目標專一性 VLD（例如與目標 B 結合者）與重鏈與輕鏈兩者，其中 VLD 係與末端 CL 序列耦合且亦與重鏈 CH3 序列之末端耦合。該分子通過該抗體重鏈與輕鏈可變區域與目標 A 結合、通過該輕鏈上之 VLD 與目標 B 結合且與通過和目標 B 結合者相同之 VLD 或不同之 VLD 與目標 C 結合。該三專一性物可與目標 A、B 與 C 個別或同時結合或與該三個目標之組合（例如目標 A 與 B 或目標 A 與 C 或目標 B 與 C）結合。

【0436】 圖 5 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之雙專一性 Fab-VLD 分子（D1.3 Fab-VLDx1 (HC)）之示意圖。於此示意圖中，該雙專一性物係藉由以下者創造：融合目標專一性 VLD（例如於此實例中該 VLD 對目標 B 有專一性）與和目標 A 結合之 Fab 之恆定區域（CH1）序列之末端（例如於此實例中該 Fab 對目標 A 有專一性）。該雙專一性可與目標 A 與 B

兩者個別或同時結合。

【0437】 圖 6 顯示根據本文之揭示內容之一個實例之雙專一性 Fab-VLD 分子 (D1.3 Fab-VLDx1 (LC)) 之示意圖。於此示意圖中，該雙專一性物係藉由以下者創造：融合目標專一性 VLD (例如於此實例中該 VLD 對目標 B 有專一性) 與和目標 A 結合之 Fab 之 CL 序列之末端 (例如於此實例中該 Fab 對目標 A 有專一性)。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

【0438】 圖 7 顯示根據本文之揭示內容之三專一性物 Fab-VLD 分子 (D1.3 Fab-VLDx2 (LC + HC)) 之示意圖。於此示意圖中，該三專一性物係藉由以下者創造：融合目標專一性 VLD (例如於此實例中該 VLD 對目標 B 有專一性) 與 Fab CL 序列之末端以及融合第二目標專一性 VLD (例如於此實例中該 VLD 對目標 C 有專一性) 和與目標 A 結合之 Fab CH3 序列之末端 (例如於此實例中該 Fab 對目標 A 有專一性)。該三專一性物可與目標 A 與 B 與 C 個別或同時結合或與該三個目標之組合 (例如目標 A 與 B 或目標 A 與 C 或目標 B 與 C) 結合。

【0439】 細菌之載體轉形係根據標準技術使用 2 ng 之 DNA 使用電穿孔勝任細胞系 (例如 ElectroTen-Blue Cell, Stratagene Cat #200159) 執行。

【0440】 於載體擴增後，DNA 係使用 Qiagen HiSpeed 質體 Maxi 套組 (Cat # 12663) 或 Qiafilter 質體 Mega 套組 (Cat # 12281) 萃取與製備。DNA 於無核酸酶純水中洗提。

iii) 將 DNA 轉染入哺乳類動物細胞中以用於蛋白質表現

【0441】 生存力>95%之~2x10⁶ Expi293 個細胞/mL 哺乳類動物細胞之轉染係使用 Expi293 表現系統（ThermoFisher Science）執行。雙專一性或三專一性 DNA 載體係以 1:3 比率之 HC:LC DNA 製備。將 DNA 加熱至 65°C 共 5min 並允許其冷卻至室溫，之後添加 Opti-MEM I（Life Technologies Cat #31985070）與 ExpiFectamine 293 試劑（ThermoFisher Cat # A14525）並於室溫下培養共 30min。將該轉染複合物加至細胞並於 37°C，5% CO₂ 下以 120rpm 培養。於大約 4-5 日後收穫含蛋白質之上清液。

【0442】 測定獲自使用 Expi293 表現系統之轉染之抗體-VLD 和 Fab-VLD 親本抗溶菌酶 D1.3 抗體、雙專一性與三專一性變體之蛋白質表現水平分別於表 1 與 2 顯示。該抗體或 Fab 與溶菌酶結合且該 VLD 與 B7.1 結合。

表 1 於雙專一性與三專一性抗體-VLD 變體之蛋白質表現水平

樣本	Ab-VLD 融合	總經純化產量 (mg)
單獨 D1.3 IgG (全長)	無	0.45
D1.3 IgG-VLDx2 (HC)	重鏈	0.36
D1.3 IgG-VLDx2 (LC)	輕鏈	0.71
D1.3 IgG-VLDx4 (HC + LC)	重鏈與輕鏈	0.29

表 2 於雙專一性與三專一性 Fab-VLD 變體之蛋白質表現水平

樣本	Fab-VLD 融合	總經純化產量 (mg)
單獨 D1.3 Fab	無	0.41
D1.3 Fab-VLDx1 (HC)	CH1	0.31
D1.3 Fab-VLDx1 (LC)	輕鏈	0.40
D1.3 Fab-VLDx2 (HC + LC)	重鏈與輕鏈	0.14

iv)純化

【0443】 將 ProsepA 純化用於純化該等雙專一性及三專一性分子。以 5 倍管柱體積之 PBS/Tris (2 mM Tris , pH 8) 平衡 ProsepA 管柱。將 pH 8 之含有該雙專一性分子之經轉染細胞上清液裝載至該管柱上並以 10 倍管柱體積之 PBS , 2 mM Tris , pH 8 洗滌該管柱。以 0.1 M 甘胺酸 pH 3 洗提蛋白質。以 1 M Tris , pH 8 將所洗提之蛋白質流份中和至~pH 7。並根據標準方法透析。

【0444】 藉由 SDS PAGE 測定該等變體之蛋白質表現水平。自 30ml 通過親和力層析術純化之表現培養物獲得數值 (未顯示)。

實施例 2 Fab 分子之表現

【0445】 藉由 SDS PAGE 在非還原與還原條件下分析於非理想標準 Expi293 表現系統中表現之親本 D1.3 Fab、與其之雙專一性物及三專一性變體之表現。自 30ml 通過親和力層析術純化之表現培養物獲得數值。親本 Fab 係 D1.3 Fab，雙專一性物係 D1.3 Fab-VLDx1 (HC) (其係 D1.3 Fab 加上融合

至 D1.3 Fab 之 CH 序列之末端之 VLD) 與 D1.3 Fab-VLDx1 (CL) (其係 D1.3 Fab 加上融合至 D1.3 Fab 之 CL 序列之末端之 VLD)。三專一性物係 D1.3 Fab-VLDx2 (HC+LC) (其係 D1.3 Fab 加上融合至 D1.3 Fab 之 CH 序列與 CL 序列之末端兩者之 VLD。在非還原條件下之結果係於圖 8 中顯示。在還原條件下之結果係於圖 9 中知道。分析指出適當之重鏈與輕鏈融合係在所預期之大小範圍。

實施例 3 雙專一性與三專一性分子之結合之評估

【0446】 經純化之雙專一性與三專一性分子之結合特性係使用 ForteBio Blitz 生物感應器使用標準化學與試劑界定其特徵。

【0447】 使用經親和力層析術純化之抗體、抗體-VLD 雙專一性及抗體-VLD 三專一性分子以及商業可得之溶菌酶 (Sigma Aldrich cat# L4919) 與 B7-1-Fc (R&D Systems Cat # 140-B1)。使用鏈黴抗生物素蛋白捕捉性表面 (SA Sensor ForteBio cat# 18-5019, 或 Sensor Chip SA、GE Cat# BR-1000-32) 以捕捉經生物素標記溶菌酶。使該等抗體、抗體-VLD 雙專一性與抗體-VLD 三專一性分子通過在生物感應器表面上捕捉之目標以產生結合感應圖 (即第一專一性)。對於相同的目標, 於解離階段期間, 使 B7-1-Fc 通過已結合之抗體、抗體-VLD 雙專一性與抗體 VLD 三專一性分子 (即第二專一性) 以展示第二結合交互作用。

【0448】 圖 10 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示雙專一性物 [IgG VLDx2 (HC)] 對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之結合接著對 B7.1-Fc 之第二結合之初步分析。該雙專一性物具有與 D1.3 抗體 [D1.3 IgG]

重鏈耦合之 B7-1 結合性 VLD。曲線 1 係用於構築該雙專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]之感應圖。該抗體被顯示與對固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 2 係用於構築該雙專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]之感應圖。該抗體被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。曲線 3 係具有與其抗體恆定重（CH）鏈耦合之 VLD 之雙專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (HC)]之感應圖。該雙專一性物被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 4 係具有與其抗體 CH 鏈耦合之 VLD 之雙專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (HC)]之感應圖。該雙專一性物被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。

【0449】 圖 11 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示雙專一性物 [IgG VLDx2 (LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之結合接著對 B7-1-Fc 之第二結合之初步分析。該雙專一性物具有與 D1.3 抗體[D1.3 IgG]輕鏈耦合之 B7-1 結合性 VLD。曲線 1 係用於構築該雙專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]之感應圖。該抗體被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 2 係用於構築該雙專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]之感應圖。該抗體被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。曲線 3 係具有與其抗體恆定輕（CL）鏈耦合之 VLD 之雙專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (LC)]之感應圖。該雙專一性物被

顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 4 係具有與其抗體 CL 鏈耦合之 VLD 之雙專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (LC)]之感應圖。該雙專一性物被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。

【0450】 圖 12 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示三專一性物 [IgG VLDx4 (HC+LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之結合接著對 B7-1-Fc 之第二結合之初步分析。該三專一性物具有與 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈與輕鏈兩者耦合之 B7-1 結合性 VLD。曲線 1 係用於構築該雙專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]之感應圖。該抗體被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 2 係用於構築該雙專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]之感應圖。該抗體被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。曲線 3 係具有與其抗體 CH 與 CL 鏈耦合之 VLD 之三專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[三專一性物-D1.3 IgG-VLDx4 (HCLC)]之感應圖。該三專一性物被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加緩衝劑。曲線 4 係具有與其抗體 CH 與 CL 鏈耦合之 VLD 之三專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[三專一性物-D1.3 IgG-Imx4 (HC+LC)]之感應圖。該三專一性物被顯示與固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合，接著於點 1 添加 B7-1-Fc。B7-1-Fc 係於點 2 以緩衝劑置換。

【0451】 圖 13 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示相較於雙專一性分子三專一性分子之增加的結合之初步分析。此圖展示該三專一性物

相較於該雙專一性物對 B7-1-Fc 之增加的結合水平。相等數目之抗體、雙專一性與三專一性分子在接附至生物感應器表面之經生物素標記溶菌酶上被捕捉接著添加緩衝劑或 B7-1-Fc（於點 1）以展示相較於該雙專一性物該三專一性物之增加的結合能力。曲線 1 係用於構築該雙專一性物與三專一性物之 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]。所結合之抗體係伴隨於點 1 之單獨緩衝劑之注射顯示。曲線 2 係 D1.3 抗溶菌酶抗體[D1.3 IgG]，其係伴隨於點 1 之 B7-1-Fc 之注射顯示於點 2，B7-1-Fc 係以緩衝劑置換。曲線 3 係具有融合至其之抗體 CL 鏈之 VLD 之雙專一性物 D1.3 抗溶菌酶抗體[雙專一性物-D1.3 IgG-VLDx2 (LC)]。所捕捉之雙專一性物被顯示與於點 1 注射之 B7-1-Fc 結合。於點 2，B7-1-Fc 係以緩衝劑置換。曲線 4 係具有融合至其之抗體 CH 與 CL 鏈之 VLD 之三專一性 D1.3 抗溶菌酶抗體[三專一性物-D1.3 IgG-VLDx4 (HCLC)]。所捕捉之雙專一性物被顯示與於點 1 注射之 B7-1-Fc 結合。於點 2，B7-1-Fc 係以緩衝劑置換。

實施例 4 以表面電漿子共振（SPR）測定之分子對 B7.1-Fc 之結合親和力

【0452】 此節中之結合分析係於 Biacore X100 SPR 儀器（GE）上使用標準化學與試劑執行。濃度系列曲線已被疊在一起且所有的數據皆以減去來自不含有溶菌酶之參考表面之反應後之反應單位（RU）呈現。

【0453】 圖 14 顯示雙專一性物[IgG VLDx2 (HC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc（50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$ ）之第二結合，係藉由 SPR 分析測定，而濃度系列之 SPR 結合感應圖被疊在一起。該雙專一性物具有融合至 D1.3 抗

體[D1.3 IgG]重鏈之 B7-1 結合性 VLD，如於圖 2 中闡明的。

注射雙專一性物：係 IgG VLDx2 (HC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 IgG VLDx2 (HC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：IgG VLDx2 (HC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 IgG VLDx2 (HC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離。

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被以所具體指明之濃度（50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$ ）添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對與仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 IgG VLDx2 (HC)之結合。

注射緩衝劑 2：B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶接附之 IgG VLDx2 (HC)之解離。

【0454】 圖 15 顯示雙專一性物[IgG VLDx2 (LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc（50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$ ）之第二結合，係以 SPR 分析測定，而濃度系列之 SPR 結合感應圖被疊在一起。該雙專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]輕鏈之 B7-1 結合性 VLD，如於圖 3 中闡明的。

注射雙專一性物：IgG VLDx2 (LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 IgG VLDx2 (LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：IgG VLDx2 (LC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 IgG VLDx2 (LC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離。

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被以所具體指明之濃度（50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$ ）添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 IgG VLDx2 (LC)之結合。

注射緩衝劑 2: B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶依附之 IgG VLDx2 (LC)之解離。

【0455】 圖 16 顯示三專一性物[IgG VLDx4 (HC+LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc (於 25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$) 之第二結合，係藉由 SPR 分析測定，而濃度系列之 SPR 結合感應圖被疊在一起。該三專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈與輕鏈兩者之 B7-1 結合性 VLD，如於圖 4 中闡明的。

注射三專一性物：IgG VLDx4 (HC+LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 IgG Imx4 (HCLC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：IgG VLDx4 (HC+LC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 IgG VLDx4 (HC+LC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被以所具體指明之濃度 (25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$) 添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 IgG VLDx4 (HC+LC)之結合。注射緩衝劑 2: B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍依附至固定在生物感應器表面上之溶菌酶之 IgG VLDx4 (HC+LC)之解離

【0456】 經純化之 Fab、Fab-VLD 雙專一性與三專一性分子之結合特性亦使用表面電漿子共振 (SPR) 界定特徵。

【0457】 圖 17 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其展示雙專一性物[Fab-VLDx1 (HC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc (25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$) 之第二結合。該雙專一性物具有融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]重鏈之

B7-1 結合性 VLD，如於圖 5 中闡明的。

注射雙專一性物：Fab-VLDx1 (HC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 Fab-VLDx1 (HC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：Fab-VLDx1 (HC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 Fab-VLDx1 (HC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被以所具體指明之濃度（25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 ug/ml）添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 Fab-VLDx1 (HC)之結合。

注射緩衝劑 2：B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶接附之 Fab-VLDx1 (HC)之解離。

【0458】 圖 18 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其展示雙專一性物[Fab-VLDx1 (LC)]對經鍵黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc（於 25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 ug/ml）之第二結合。該雙專一性物具有融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]輕鏈之 B7-1 結合性 VLD，如於圖 6 中闡明的。

注射雙專一性物：Fab-VLDx1 (LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 Fab-VLDx1 (LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：Fab-VLDx1 (LC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 Fab-VLDx1 (LC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離。

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被以所具體指明之濃度（25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 ug/ml）添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 對仍和固定在生物感應器表面上之溶菌酶結合之 Fab-VLDx1 (LC)之結合。

注射緩衝劑 2: B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶依附之 Fab-VLDx1 (LC)之解離。

【0459】 圖 19 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其展示三專一性物[Fab-VLDx2 (HC+LC)]對經鍵黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對一濃度系列之 B7-1-Fc (25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 µg/ml) 之第二結合。該三專一性物具有融合至 D1.3 Fab [D1.3 Fab]重鏈與輕鏈兩者之 B7-1 結合性 VLD，如於圖 7 中闡明的。

注射三專一性物：Fab-VLDx2 (HC+LC)被添加至感應器表面之點。曲線顯示 Fab-VLDx2 (HC+LC)對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合。

注射緩衝劑 1：Fab-VLDx2 (HC+LC)之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 Fab-VLDx2 (HC+LC)自固定在生物感應器表面上之溶菌酶之解離

注射 B7-1-Fc：第二分析物 B7-1-Fc 被以所具體指明之濃度 (25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 µg/ml) 添加之點。曲線顯示 B7-1-Fc 與仍和固定在生物感應器表面上之 Fab-VLDx2 (HC+LC)結合。

注射緩衝劑 2: B7-1-Fc 之注射被停止並以緩衝劑置換之點。曲線顯示 B7-1-Fc 自仍與固定在生物感應器表面上之溶菌酶依附之 Fab-VLDx2 (HC+LC)之解離。

實施例 5 分子之結合化學計量

【0460】 雙專一性物 [IgG VLDx2 (HC)] 與三專一性 [IgG Imx4 (HC+LC)]對於 B7-1-Fc 之結合化學計量亦係藉由 SPR 測定 (圖 20)。動力學分析係針對 IgG-VLDx2 (HC)、IgG-VLDx2 (LC)與 IgG-VLDx4 (HCLC)藉由在

生物素-溶菌酶表面上之捕捉並以一系列之濃度之 B7-1-Fc (50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 與 0 $\mu\text{g/ml}$) 作為分析物來執行。分析物之理論最大結合訊號 (R_{max}) 係基於所捕捉之 IgG-VLD 蛋白質之量計算，說明分析物與配體之分子量。

【0461】 對所有樣本假設 1:1 化學計量，分析物與配體之結合性水平係針對各個濃度作圖成 R_{max} 值之百分比。隨著分析物濃度增加至 25 $\mu\text{g/ml}$ ，結合水平靠近飽和或平衡水平。四價蛋白質 IgG-VLDx4 (HC+LC) 之平衡結合水平 (R_{max} 之 103.9%) 係大約二價蛋白質 IgG-VLDx2 (HC) 之水平 (56.7%) 與 IgG-VLDx2 (LC) 之水平 (51.4%) 之兩倍。此暗示 IgG-VLDx4 (HC+LC) 能夠同時透過與重鏈和輕鏈融合之 VLD 功能域結合 B7.1-Fc。

【0462】 雙專一性物 [Fab-VLDx1 (HC)]、[Fab-VLDx1 (LC)] 與 [Fab-VLDx2 (HC+LC)] 對 B7-1-Fc 之結合化學計量係於圖 21 中顯示。結果暗示 Fab-VLDx2 (HC+LC) 能夠同時透過與重鏈和輕鏈融合之 VLD 功能域結合 B7.1。

實施例 6 分子對 B7.1-Fc 之結合親和力

【0463】 抗體-VLD 雙專一性與三專一性分子與 Fab-VLD 雙專一性與三專一性分子之結合動力學係藉由表面電漿子共振測定。締合常數 (K_a)、解離常數 (K_d) 與平衡解離常數/結合常數 K_D 係分別於表 3 與 4 顯示。

表 3 抗體-VLD 分子對 B7.1-Fc 之親和力

配體	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D (nM)
IgG VLDx2 (HC)	5.16 x 10 ⁵	2.80 x 10 ⁻³	5.44
IgG VLDx2 (LC)	1.63 x 10 ⁵	4.00 x 10 ⁻³	24.5
IgG VLDx4 (HC+LC)	5.30 x 10 ⁵	2.90 x 10 ⁻³	5.47

【0464】 結果展示三專一性分子 IgG VLDx4 10 (HC+LC)與雙專一性分子 IgG VLDx2 (HC)對 B7-1-Fc 之結合親和力係可比較的。

表 4 Fab-VLD 分子對 B7.1-Fc 之親和力

配體	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D (nM)
Fab VLDx1 (HC)	5.26 x 10 ⁵	2.85 x 10 ⁻³	5.41
Fab VLDx1 (LC)	2.18 x 10 ⁵	2.96 x 10 ⁻³	13.6
Fab VLDx2 (HC+LC)	4.45 x 10 ⁵	4.33 x 10 ⁻³	9.73

【0465】 結果展示三專一性分子 Fab VLDx4 15 (HC+LC)與雙專一性分子 Fab VLDx1 (HC)對 B7-1-Fc 之結合親和力係可比較的。

實施例 7 三專一性結合之分析

【0466】 修飾 IgG VLDx4 (HCLC)構築體，藉此抑硬素 (Scl) 結合性 VLD 係與抗溶菌酶抗體 D1.3 之重鏈之 C 端耦合且 B7-1 結合性 VLD 係與抗

溶菌酶抗體之抗體恆定輕 (CL) 鏈耦合。此三專一性分子被稱為[IgG VLDx4 (Sc1-HC)(B7-LC)]。

【0467】 與抗抑硬素 VLD 融合之抗溶菌酶 IgG1 重鏈「1E1」之序列係於以下顯示 (SEQ ID NO:25)：

EVKLQESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMW
GDGNTDYNALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRL
DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSKAM
HVAQPAVVLASSRGIAFVCEYTVSWVDMEVRVTVLRQADSQVTEVCAATY
WNGRWLTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVQLDPSWGY
YWQGYEGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN

【0468】 抗抑硬素 VLD 之序列係於以下顯示：

KAMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYTVSWVDMEVRVTVLRQADSQVTEVC
AATYWNGRWLTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVQLDPS
WGYYWQGYEGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN (SEQ ID NO:14)

SEQ ID NO:25 與 SEQ ID NO:14 之 VLD 結合環被加底線。

【0469】 為了分析溶菌酶、B7-1 與抑硬素之同時三重結合性，分析

係於 Biacore X100 SPR 儀器(GE)上執行。抗體-Imunexin 蛋白質被以 35 μ g/ml 注射到鏈黴抗生物素蛋白感應晶片表面上，於該表面上經生物素化溶菌酶已於流動槽 2 上被捕捉(大約 200 RU)。注射抗體-Imunexin 蛋白質，接著一個穩定期。第一分析物 B7.1-Fc 係以 25 μ g/ml 之濃度注射。執行一個對照循環，其中僅僅緩衝劑被注射來取代 B7.1-Fc。接著立即以 15 μ g/ml 注射第二分析物抑硬素(R&D Systems 目錄編號 1406ST/CF)共 60s，解離時間 120s。執行一個對照循環，其中僅僅緩衝劑被注射來取代抑硬素。

【0470】 表面係藉由注射 pH 2.1 之 10mM 甘胺酸緩衝劑共 30 秒來再生。

【0471】 所有的數據皆以減去來自不含有溶菌酶之參考表面(流動槽 1)之反應後之反應單位(RU)表現。

(a)全長抗體構築體之三專一性結合之分析

【0472】 圖 22 顯示被疊在一起之一系列之 SPR 結合感應圖，其展示三專一性物[IgG VLDx4 (Scl-HC)(B7-LC)]對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對 B7-1-Fc 及抑硬素之同時結合。該三專一性物具有融合至 D1.3 抗體[D1.3 IgG]重鏈之抑硬素結合性 VLD 及融合至其之輕鏈之 B7-1 結合性 VLD。

【0473】 僅僅 B7-1-Fc 之曲線係一個該三專一性物之感應圖，其顯示對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著 B7-1-Fc 之添加。該感應圖展示對溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。

【0474】 僅僅抑硬素之曲線係一個該三專一性物之感應圖，其顯示對

固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著抑硬素之添加。該感應圖展示對溶菌酶及抑硬素之同時雙重目標結合。

【0475】 B7-1-Fc 及抑硬素曲線係一個該三專一性物之感應圖，其顯示對固定在生物感應器表面上之溶菌酶之結合，接著 B7-1-Fc 之添加，與再接著抑硬素之添加。該感應圖展示對溶菌酶及 B7-1-Fc 及抑硬素之同時三目標結合。

【0476】 該分子對 B7-1 及抑硬素之結合係藉由 SPR 檢查，如於圖 22 中顯示的。結果顯示該三專一性物能夠同時與 B7-1 及抑硬素結合。

(b) Fab 構築體之三專一性結合之分析

【0477】 修飾 Fab VLDx2 (HC+LC)構築體，藉此 B7-1 結合性 VLD 係與抗溶菌酶 Fab D3.1 之重鏈之 C 端耦合且抑硬素 (Sc1) 結合性 VLD 係與抗溶菌酶 Fab 之 Fab 恆定輕 (CL) 鏈耦合。此三專一性分子被稱為[Fab VLDx2 (B7-1-HC)(Sc1-LC)]。製作第二構築體，藉此抑硬素結合性 VLD 係與抗溶菌酶 Fab D3.1 之重鏈之 C 端耦合且 B7-1 結合性 VLD 係與抗溶菌酶 Fab 之 Fab 恆定輕 (CL) 鏈耦合。此三專一性分子被稱為[Fab VLDx2 (Sc1-HC)(B7-1-LC)]

【0478】 圖 23 顯示三專一性物 Fab VLDx2 (B7-1-HC)(Sc1-LC)之結合分析且圖 24 顯示三專一性物 Fab VLDx2 (Sc1-HC)(B7-1-LC)之結合分析。結合分析係使用 ForteBio Blitz 執行。結合曲線展示該等三專一性物（於圖 23 為 Fab VLDx2 (B7-HC)(Sc1-LC)且於圖 24 為 Fab VLDx2 (Sc1-HC)(B7-1LC)）對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記溶菌酶之最初結合接著對 B7-1-Fc 和抑硬素之相繼及同時結合。生物感應器曲線顯示該等三專一性物對固定在生

物感應器表面上之溶菌酶之最初結合接著對 B7-1-Fc (B7-1-Fc 係於所指示之點添加) 之結合。結合曲線展示對溶菌酶及 B7-1-Fc 之同時雙重目標結合。抑硬素係隨後於所指示之點添加且生物感應器曲線顯示 Fab VLDx2 (B7-1-HC)(Scl-LC) 與 Fab VLDx2 (Scl-HC)(B7-1-LC) 分子兩者對溶菌酶及 B7-1Fc 及抑硬素之同時三目標結合。最後，抑硬素被以緩衝劑置換以顯示解離率。

實施例 8 人類血清白蛋白-VLD 融合蛋白質之產生

方法

【0479】 圖 25 顯示根據本文之揭示內容之一個實例與 VLD 耦合之蛋白質之示意圖。該雙專一性物可與目標 A 與 B 兩者個別或同時結合。

載體產生

【0480】 製造編碼融合至一或二個 VLD 之人類血清白蛋白 (HSA) 之序列，其包括經強調之 16 個胺基酸之連接子序列 (SGGGSGGGSGGGGS) 與 C 端組胺酸標籤。該序列被選殖入哺乳類動物表現載體中。所使用之載體係 pcDNA3.4 載體 (Thermo Fisher)。該等序列係加上訊號胜肽來選殖以允許該蛋白質被分泌。該胜肽之序列係如下：MAWMMLLLGLLAYGSG (SEQ ID NO:8)。

【0481】 細菌之載體轉形係根據標準技術使用電穿孔勝任細胞 (例如 ElectroTen-Blue Cell, Stratagene Cat #200159) 執行。

【0482】 於載體擴增後，使用 Qiagen HiSpeed 質體 Maxi 套組 (Cat #

12663) 或 Promega PureYield™ 質體 Midiprep 系統 (Cat # A2492) 萃取與製備質體 DNA。於無核酸酶純水中洗提 DNA。

轉染

【0483】 3-5x10⁶ 個細胞/mL 之密度與 > 95% 之生存力之 Expi293 哺乳類動物細胞之轉染係使用 Expi293 表現系統 (ThermoFisher Science Cat # A14635) 執行。將 DNA 載體加至 Opti-MEM I 減少血清培養基 (LifeTechnologies Cat #31985070) 與 ExpiFectamine 293 試劑 (ThermoFisher Cat # A14525) 並於室溫下培養共 20 min。將轉染複合物加至細胞並於 37°C, 5% CO₂ 下於 120rpm 培養。於 20 個小時後, 將 Expifectamine 293 轉染增強劑 1 與 2 (ThermoFisher Cat # A14525) 加至細胞。於大約 4-5 日後收穫含蛋白質之上清液。

純化

【0484】 蛋白質係藉由親和力層析術使用鎳 Sepharose Excel (GE, Cat # 17-3712-01) 純化。以 5 倍管柱體積之 20mM 磷酸鈉、0.5 M NaCl, pH7.4 平衡鎳 Sepharose 管柱。將含有以 His 標記之 HSA-VLD 蛋白質之經轉染細胞培養物上清液裝載至該管柱上, 並以 10 倍管柱體積之 20mM 磷酸鈉、0.5 M NaCl、5mM 咪唑, pH7.4 洗滌該管柱。以 20mM 磷酸鈉、0.5 M NaCl、500mM 咪唑 pH7.4 洗提蛋白質。將所洗提出之流份倒在一起並使用 PBS 根據標準方法透析。

【0485】 圖 26 顯示使用抗 His HRP (Sigma Aldrich, Cat # 11965085001)

之經純化之 HSA 融合蛋白質之西方墨點轉漬分析與偵測，該等蛋白質包含融合至 HSA 之 C 端、N 端、或 C 端與 N 端兩者之 VLD。該等蛋白質之估計大小分別係：67 kDa（預測之大小：81.9 kDa）；69.3 kDa（預測之大小：81.8 kDa）；與 94.4 kDa（預測之大小：96.2 kDa）。

結合之評估

【0486】 經純化之分子之結合特性係使用 ForteBio Blitz 生物感應器使用標準化學與試劑界定特徵。

【0487】 經親和力純化之分子係以商業可得之 B7.2-Fc 蛋白質（R&D Systems, Cat# 141-B2）、CD3（Acrobiosystems, Cat# CDD-H52W3）、與經生物素化抗 HSA 親和體（Abcam, Cat# 31898）測試。

【0488】 CD3 與 B7.2Fc 蛋白質係以 1:1 莫耳每公升比率使用 EZ-Link 磺酸基-NHS-LC-生物素（ThermoFisher, Cat # 21327）根據標準方法生物素化。

【0489】 使用鏈黴抗生物素蛋白捕捉性表面（SA Sensor, ForteBio cat# 18-5019）以捕捉經生物素標記蛋白質。使 HSA-VLD 分子通過在生物感應器表面上被捕捉之目標以產生結合性感應圖。

【0490】 圖 27 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示 HSA-VLD 分子對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記 B7.2-Fc 之結合之分析。曲線 1 係具有接附至 C 端之 B7 結合性 VLD 之 HSA-VLD 融合蛋白質之感應圖。曲線 2 係具有接附至 N 端與 C 端兩者之 B7 結合性 VLD 之 VLD-HSA-VLD 融合蛋白質之感應圖。顯示該等分子對固定在生物感應器表面上 B7.2-Fc 之結合，接著於點 1 之緩衝劑之添加。

【0491】 圖 28 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示 HSA-VLD 分子對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記 CD3 δ/ϵ (de) 異元二聚體之結合之分析。所顯示之曲線係具有接附至 C 端之 CD3 結合性 VLD 之 HSA-VLD 融合蛋白質之感應圖。顯示分子對固定在生物感應器表面上之 CD3de 之結合，接著於點 1 之緩衝劑之添加。

【0492】 圖 29 顯示使用 ForteBio Blitz 生物感應器以展示 HSA-VLD 分子對經鏈黴抗生物素蛋白捕捉生物素標記抗 HSA 親和體之結合之分析。所顯示之曲線係具有接附至 C 端之 B7 結合性 VLD 之 HSA-VLD 融合蛋白質之感應圖。顯示該分子對固定在生物感應器表面上之抗 HSA 親和體之結合，接著於點 1 之緩衝劑之添加。於點 2，B7.2Fc 蛋白質被允許與感應器表面上所捕捉之分子結合。接著於點 3 以緩衝劑置換 B7.2Fc。

結果

(i) CTLA4 VLD 於人類血清白蛋白之 C 端、N 端或 C 與 N 端兩者融合至 HSA。

【0493】 序列係於以下顯示：

【0494】 融合至 HSA 之 C 端之 B7-2 結合性 VLD (SEQ ID NO: 26)：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
QHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL
FFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKF
GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDR
ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV

ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCC
AAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK
KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF
AEEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSKAMHVAQPAVVLASSRG
IASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICT
GTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPS
PDSAAAHHHHHH

【0495】 融合至 HSA 之 N 端之 B7-1 結合性 VLD (SEQ ID NO: 27) :

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP
YYLGINGTQIYVIDPEPSPDSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLG
EENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLH
TLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRP
EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ
AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA FKAWAVARLSQ
RFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS
KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
VFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR
NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE

SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAA
LGLAAAHHHHHH

【0496】 融合至 HSA 之 N 端與 C 端兩者之 B7-2 結合性 VLD(SEQ ID
NO: 28) :

KAMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP
YYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSGGGGSGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLG
EENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLH
TLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRP
EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQ
AADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA FKAWAVARLSQ
RFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS
KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
VFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR
NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE
SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL
VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAA
LGLSGGGSGGGSGGGGSKAMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKAT
EVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGL
RAMDTGLYICKVELMYPPPY YLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSAAAHHHHHH

(ii)融合至人類血清白蛋白之 C 端 CD3 結合性 VLD (稱為 AF3)

【0497】 序列係於以下顯示：

【0498】 融合至 HSA 之 C 端之 CD3 結合性 VLD¹ AF3 (SEQ ID NO: 29):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
 CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
 QHKDDNPPLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL
 FFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKF
 GERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDR
 ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV
 ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCC
 AAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK
 KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
 EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
 EKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF
 AEEGKKLVAASQAALGLSGGGGSGGGGSGGGGSGKAMHVAQPAVV LASSRG
 IASFVCEYLLDIEPEFVRVTVL RQADSQVTEVCAATYQLQWMLTFLDDSICTG
 TSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVEWSREWGRQGLGIGNGTQIYVIDPEP
 SPDSAAAHHHHHH

【符號說明】

無

序列表

<110> 伊莫納瑟斯有限公司

<120> 多重專一性分子

<130> 524290

<140> 2016900709

<141> 2017-02-27

<160> 30

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
115 120 125

<210> 2

56361.seq.txt

<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Met Gly Asn Glu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr
1 5

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BDM支架序列

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (26)..(26)
<223> X係介於5與15個間之任何胺基酸

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (48)..(48)
<223> X係介於5與15個間之任何胺基酸

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (86)..(86)
<223> X係介於5與15個間之任何胺基酸

56361.seq.txt

<400> 5

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Xaa Val Arg Val Thr Val Leu
20 25 30

Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Xaa
35 40 45

Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn
50 55 60

Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Lys Val Xaa Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr
85 90 95

Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
100 105

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BDM支架序列

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (26)..(26)
<223> X係介於5與15個間之任何胺基酸

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (49)..(49)
<223> X係介於5與15個間之任何胺基酸

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (87)..(87)
<223> X係介於5與15個間之任何胺基酸

56361.seq.txt

<400> 6

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Xaa Glu Val Arg Val Thr Val
20 25 30

Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr
35 40 45

Xaa Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly
50 55 60

Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly
65 70 75 80

Leu Tyr Ile Cys Lys Val Xaa Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr
85 90 95

Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
100 105

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu
1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 單一胜肽

<400> 8

Met Ala Trp Met Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala Tyr Gly Ser Gly
1 5 10 15

56361.seq.txt

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu
1 5 10

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Thr Val Ser Trp Val Asp Met Glu
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Trp Asn Gly Arg Trp
1 5

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Gln Leu Asp Pro Ser Trp Gly Tyr Tyr Trp Gln Gly Tyr Glu
1 5 10

<210> 13
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

56361.seq.txt

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Thr Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
115 120 125

<210> 14
<211> 130
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Thr Val Ser Trp Val Asp Met
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Trp Asn Gly Arg Trp Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

56361.seq.txt

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Gln Leu Asp Pro Ser Trp Gly Tyr Tyr Trp Gln Gly Tyr Glu Gly Ile
100 105 110

Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp
115 120 125

Ser Asn
130

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (6)..(6)
<223> X意指任何數字，即SGGGG之多重複

<400> 15

Ser Gly Gly Gly Gly Xaa Ser
1 5

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

56361.seq.txt

<220>

<223> 連接子序列

<400> 17

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 18

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 18

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu His Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

56361.seq.txt

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

56361.seq.txt

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 19
<211> 589
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 19

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

56361.seq.txt

Lys Met Asn Ser Leu His Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

56361.seq.txt

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys
450 455 460

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
465 470 475 480

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu
485 490 495

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
500 505 510

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Thr Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
515 520 525

56361.seq.txt

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
530 535 540

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
545 550 555 560

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
565 570 575

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
580 585

<210> 20
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 20

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

56361.seq.txt

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 361
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 21

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

56361.seq.txt

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ala Met His Val
225 230 235 240

Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe
245 250 255

Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr
260 265 270

Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr
275 280 285

56361.seq.txt

Tyr Met Thr Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
290 295 300

Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg
305 310 315 320

Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro
325 330 335

Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile
340 345 350

Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
355 360

<210> 22
<211> 361
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 22

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg
85 90 95

56361.seq.txt

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ala Met His Val
225 230 235 240

Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe
245 250 255

Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr
260 265 270

Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr
275 280 285

Tyr Met Thr Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
290 295 300

Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg
305 310 315 320

56361.seq.txt

Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro
325 330 335

Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile
340 345 350

Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
355 360

<210> 23
<211> 366
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 23

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu His Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

56361.seq.txt

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
245 250 255

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr
260 265 270

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
275 280 285

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Thr Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
290 295 300

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
305 310 315 320

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
325 330 335

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
340 345 350

56361.seq.txt

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Asn
 355 360 365

<210> 24
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 24

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu His Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

56361.seq.txt

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Ala Ala Ala Gly Leu
210 215 220

Gly Gly His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile
225 230 235 240

Ser Glu Glu Asp Leu
245

<210> 25
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 25

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu His Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala

56361.seq.txt

85

90

95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

56361.seq.txt

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys
450 455 460

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
465 470 475 480

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Thr Val Ser Trp Val Asp Met Glu
485 490 495

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
500 505 510

Cys Ala Ala Thr Tyr Trp Asn Gly Arg Trp Leu Thr Phe Leu Asp Asp
515 520 525

56361.seq.txt

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
530 535 540

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Gln
545 550 555 560

Leu Asp Pro Ser Trp Gly Tyr Tyr Trp Gln Gly Tyr Glu Gly Ile Gly
565 570 575

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser
580 585 590

Asn

<210> 26
<211> 735
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 26

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

56361.seq.txt

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

56361.seq.txt

Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg
				325					330					335	
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr
			340					345					350		
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu
		355					360					365			
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro
	370					375					380				
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu
385					390					395					400
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro
				405					410					415	
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
			420					425					430		
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys
		435					440					445			
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His
	450					455					460				
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser
465					470					475					480
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr
				485					490					495	
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp
			500					505					510		
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala
		515					520					525			
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu
	530					535					540				

56361.seq.txt

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln
595 600 605

Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys
610 615 620

Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu
625 630 635 640

Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met
645 650 655

Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr
660 665 670

Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met
675 680 685

Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro
690 695 700

Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro
705 710 715 720

Glu Pro Ser Pro Asp Ser Ala Ala Ala His His His His His His
725 730 735

<210> 27
<211> 734
<212> PRT
<213> 人工序列

56361.seq.txt

<220>

<223> 人工序列

<400> 27

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys
130 135 140

Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys
145 150 155 160

Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe
165 170 175

Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr
180 185 190

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr
195 200 205

56361.seq.txt

Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
210 215 220

Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu
225 230 235 240

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val
245 250 255

Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu
260 265 270

Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr
275 280 285

Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
290 295 300

Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
305 310 315 320

Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
325 330 335

Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
340 345 350

Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
355 360 365

Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
370 375 380

Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
385 390 395 400

Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
405 410 415

Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu

56361.seq.txt

420

425

430

Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
435 440 445

Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
450 455 460

Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp
465 470 475 480

Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr
485 490 495

Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
500 505 510

Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile
515 520 525

Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln
530 535 540

Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
545 550 555 560

Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr
580 585 590

Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro
595 600 605

Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg
610 615 620

Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys
625 630 635 640

56361.seq.txt

Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu
645 650 655

Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu
660 665 670

Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met
675 680 685

Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys
690 695 700

Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln
705 710 715 720

Ala Ala Leu Gly Leu Ala Ala Ala His His His His His His
725 730

<210> 28
<211> 875
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 28

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val

56361.seq.txt

85

90

95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys
130 135 140

Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys
145 150 155 160

Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe
165 170 175

Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr
180 185 190

Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr
195 200 205

Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
210 215 220

Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu
225 230 235 240

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val
245 250 255

Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu
260 265 270

Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr
275 280 285

Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala
290 295 300

56361.seq.txt

Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro
 305 310 315 320
 Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln
 325 330 335
 Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys
 340 345 350
 Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe
 355 360 365
 Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu
 370 375 380
 Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys
 405 410 415
 Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu
 420 425 430
 Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp
 435 440 445
 Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
 450 455 460
 Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp
 465 470 475 480
 Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr
 485 490 495
 Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys
 500 505 510
 Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile
 515 520 525

56361.seq.txt

Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln
 530 535 540
 Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr
 545 550 555 560
 Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr
 580 585 590
 Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro
 595 600 605
 Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg
 610 615 620
 Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys
 625 630 635 640
 Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu
 645 650 655
 Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu
 660 665 670
 Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met
 675 680 685
 Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys
 690 695 700
 Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln
 705 710 715 720
 Ala Ala Leu Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 725 730 735
 Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val
 740 745 750

56361.seq.txt

Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser
755 760 765

Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp
770 775 780

Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu
785 790 795 800

Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn
805 810 815

Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu
820 825 830

Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly
835 840 845

Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Ser Pro
850 855 860

Asp Ser Ala Ala Ala His His His His His His
865 870 875

<210> 29
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 29

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

56361.seq.txt

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

56361.seq.txt

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

56361.seq.txt

485

490

495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln
595 600 605

Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys
610 615 620

Glu Tyr Leu Leu Asp Ile Glu Pro Glu Phe Val Arg Val Thr Val Leu
625 630 635 640

Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Gln
645 650 655

Leu Gln Trp Met Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr
660 665 670

Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met
675 680 685

Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Trp Ser Arg Glu Trp Gly
690 695 700

56361.seq.txt

Arg Gln Gly Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp
705 710 715 720

Pro Glu Pro Ser Pro Asp Ser Ala Ala Ala His His His His His His
725 730 735

<210> 30
<211> 332
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> BDM支架序列

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (85)..(85)
<223> n係編碼一第一結合環之核苷酸之長度

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (139)..(139)
<223> n係編碼一第二結合環之核苷酸之長度

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (149)..(149)
<223> n係a、c、g、或t

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (251)..(251)
<223> n係編碼一第三結合環之核苷酸之長度

<220>
<221> 雜項特徵
<222> (261)..(261)
<223> n係a、c、g、或t

<400> 30
gccatggcaa aagcaatgca tgttgcacag cctgcagttg ttctggcaag cagccgtggt 60
attgccagct ttgtttgtga gtatngtgcg cgtgaccgtt ctgcgtcagg cagatagcca 120
ggttaccgaa gtttgtgcag caacctatnc tgacctttct ggatgatagc atttgtaccg 180
gcaccagcag cggtaatcag gttaatctga ccattcaggg tctgcgtgca atggataccg 240
gtctgtatat ttgcaaagtt nctgggcatt ggcaatggca cccagattta tgttattgat 300
cctgaaccgt caccggatag caatgcggcc gc 332

56361.seq.txt

發明摘要

※ 申請案號：106106646

※ 申請日： 106/03/01

※IPC 分類：~~C07K 14/705~~ (2006.01)
~~A61K 39/00~~ (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

多重專一性分子

Multi-specific Molecules

【中文】

本文之揭示內容係關於多重專一性分子，其等能夠同時結合至少二種不同的目標抗原或表位。該等分子包含至少一個與第一目標抗原或表位結合之結合功能域分子（BDM），該 BDM 係經修飾以與異源性目標選擇性結合，與為和第二目標抗原或表位結合之抗體或其抗原結合片段或非抗體蛋白質或胜肽之藥理活性蛋白質或胜肽耦合，該等 BDM 係與該藥理活性蛋白質或胜肽內出現之多肽之 C 端耦合。

【英文】

The present disclosure relates to multi-specific molecules which are capable of simultaneously binding at least two different target antigens or epitopes. The molecules comprise at least one binding domain molecule (BDM) which binds to a first target antigen or 5 epitope, the BDM being modified for selective binding to a heterologous target, coupled to a pharmacologically active protein or peptide which is an antibody or antigen-binding fragment thereof or a non-antibody protein or peptide which binds to a second target antigen or epitope, the BDMs being coupled

to a C-terminus of a polypeptide present within the pharmacologically active protein or peptide.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1.一種能夠與二或多種不同的目標抗原或表位結合之多重專一性分子，該分子包含：

(i)至少一個與第一目標抗原或表位結合之結合功能域分子(BDM)，該 BDM 包含似 V 功能域(V-like domain, VLD) 支架，其內含有三個暴露之結合環(BL) 且其中該三個 BL 之至少二者相較於其等之支架中的相對應天然序列係經修飾或置換以與異源性目標抗原或表位選擇性結合；與

(ii)藥理活性蛋白質或胜肽，其係與第二目標抗原或表位結合之抗體或其抗原停留片段或非抗體蛋白質或胜肽；

其中至少一個 BDM 係與該藥理活性蛋白質或胜肽內出現之多肽之 C 端耦合。

2.根據申請專利範圍第 1 項之分子，其中至少一個 BDM 係與抗體重鏈多肽之 C 端耦合。

3.根據申請專利範圍第 1 或 2 項之分子，其中至少一個 BDM 係與抗體輕鏈多肽之 C 端耦合。

4.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中至少一個 BDM 係與所有抗體重鏈與輕鏈多肽之 C 端耦合。

5.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該藥理活性蛋白質係全長抗體。

6.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中抗體鏈對 BDM 之比率係 $4:2^n$ ，其中 n 係介於 1 與 5 間之數字。

7.根據申請專利範圍第 1 至 5 項中之任一項之分子，其中該藥理活性蛋

白質係抗原結合片段係選自由 Fab、Fab'、F(ab')₂ 或經化學連接之 F(ab')₂ 所組成之群組。

8.根據申請專利範圍第 7 項之分子，其中抗原結合片段鏈對 BDM 之比率係 2:n，其中 n 係介於 1 與 16 間之數字。

9.根據申請專利範圍第 1 至 6 項中之任一項之分子，其中至少一個 BDM 係與該重鏈多肽之 CH1、CH2 或 CH3 功能域之 C 端耦合。

10.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中至少一個 BDM 係與該非抗體蛋白質或多肽之各多肽鏈之 C 端耦合。

11.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該 VLD 支架包含人類 CTLA4、ICOS 或 CD28 之細胞外部分。

12.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該藥理活性蛋白質與其之天然目標抗原或表位結合。

13.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該第一目標抗原與該第二目標抗原係不同的。

14 根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該第一目標表位與該第二目標表位係在相同或不同的抗原上。

15.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該分子係雙專一性物或三專一性物。

16.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該分子包含一、二、三、四、五或六個 BDM。

17.根據申請專利範圍第 1 至 6 項中之任一項之分子，其中該分子包含一對或二對 BDM，其中於該對中之該等 BDM 係完全相同的。

18.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該至少一個 BDM 係與一或多個另外的 BDM 連接。

19.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該分子包含最少二個 BDM、或至少一對 BDM，其中各 BDM（或 BDM 對）與不同的目標抗原或表位結合。

20.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中各 BDM 與和該藥理活性蛋白質或多肽所結合之目標抗原表位不同之目標抗原或表位結合。

21.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該非抗體蛋白質或胜肽係選自由以下者所組成之群組：凝血因子、抗運載蛋白(anticalin)、類毒素、膠原結合蛋白、人類血清白蛋白（HSA）、TNF- α 受體結合蛋白、整聯蛋白結合蛋白、VEGF 或其擬似物、EPO 或其擬似物、C4 結合蛋白、尿激酶受體拮抗劑、淋巴激素、細胞介素、護骨素（osteoprotegerin，OPG）或選自計畫性細胞死亡 1 蛋白質（PD1）、計畫性死亡配體 1（PD-L1）、NKG2D、與第 I 類 MHC 多肽相關之序列 A（MICA）、與第 I 類 MHC 多肽相關之序列 B（MICB）、UL16 結合蛋白（ULBP）之蛋白質之細胞外功能域。

22.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該 VLD 支架係選自由細胞外功能域人類 CTLA4、CD28 或 ICOS 所組成之群組。

23.根據申請專利範圍第 22 項之分子，其中該 VLD 支架係由對應於在以下提出之 SEQ ID NO:1 之殘基 1 至 25、34 至 54、60 至 97 與 106 至 126 之架構序列組成：

KAMHVAQPAVVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCA
ATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPP

YYLGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN。

24.根據申請專利範圍第 23 項之分子，其中該 VLD 支架包含與 SEQ ID NO:1 之殘基 1 至 25、34 至 54、60 至 97 與 106 至 126 有至少約 70%序列一致性之序列。

25.根據申請專利範圍第 23 或 24 項之分子，其中位於 SEQ ID NO:1 之位置 26 至 33、及/或位置 55 至 59 及/或位置 98 至 105 之胺基酸殘基係經修飾或經異源性序列置換。

26.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該 BDM 包含於以下提出之序列或係由其組成：

KAMHVAQPAVVLASSRGIA SFVCEYX_{n1}VRVTVL RQADSQVTEVCAATYX_{n2}
LTFLLDDSICTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVX_{n3}LGIGNGTQIYVIDPE
PSPDSN (SEQ ID NO:5)

其中 X、X 與 X 係任何胺基酸殘基且 n 係介於 5 與 15 間之數字且 1、2、3 分別指示 BL 1、2 與 3。

27.根據申請專利範圍第 26 項之分子，其中 X_{n1}係介於 5 與 8 個之間的胺基酸，X_{n2}係介於 5 與 8 個之間的胺基酸，且 X_{n3}係介於 10 與 15 個之間的胺基酸。

28.根據申請專利範圍第 26 或 27 項之分子，其中 X_{n1}係 8 個胺基酸。

29.根據申請專利範圍第 26 或 27 項之分子，其中 X_{n2}係 5 個胺基酸。

30.根據申請專利範圍第 26 或 27 項之分子，其中 X_{n3}係介於 10 與 15 個之間的胺基酸。

31.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該至少一個 BDM 係

呈單體、二聚體或一系列連接在一起之 BDM 單體。

32.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該至少一個 BDM 與該藥理活性蛋白質或胜肽之耦合係藉由連接子、藉由直接融合、藉由共軛或藉由共價或非共價鍵結。

33.根據申請專利範圍第 32 項之分子，其中該連接子係 Gly-Ser 胜肽連接子。

34.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該目標抗原係蛋白質、醣蛋白、聚糖、脂質、脂蛋白質或核酸。

35.根據前述申請專利範圍中之任一項之分子，其中該分子選擇性地與表現被該分子之個別 BDM 與醫藥活性蛋白質部分辨識之二或多種不同的目標抗原或表位之細胞結合但不與僅僅表現該等目標抗原或表位之一者之細胞結合。

36.根據前述者之任一者之分子，其係多肽。

37.根據申請專利範圍第 34 項之分子，其中該多肽係選自由 SEQ ID NO: 5、6、13、14、19、21、22、23、24、25、27、28 或 29 所組成之群組。

38.根據申請專利範圍第 1 至 37 項中之任一項之分子，其係核酸。

39.一種宿主細胞，其經根據申請專利範圍第 38 項之核酸轉形。

40.一種醫藥組成物，其包含根據申請專利範圍第 1 至 37 項中之任一項之分子、加上醫藥上可接受之載劑及/或賦形劑。

41.根據申請專利範圍第 40 項之組成物，其係用於製造醫藥品。

42.根據申請專利範圍第 1 至 37 項中之任一項之分子，其中該分子係以劑標記以幫助偵測。

43.一種根據申請專利範圍第 1 至 37 項中之任一項之分子之用途，其係用於偵測一或多個該分子與之結合之目標抗原。

圖式

A. 天然人類CTLA4 VLD支架

1 KAMHVAQPAVWVLASSRGIA²⁵SVCEY³⁴ASPGKATE⁵⁴VRVTVLROADSQVTEVCAATY⁶⁰MMGNELTFLD^{BL2}DSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTG
LYICKVELMYPPPPYYL⁹⁶GIGNGTQIYVIDPEPSPDSN¹⁰⁶
LYICKVQLDPSWGWY^{BL3}WQGYEGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN¹²⁶

架構

架構

架構

(SEQ ID NO:1)

B. CTLA4 VLD結合環置換

KAMHVAQPAVWVLASSRGIA²⁵SVCEY³⁴Xn₁VRVTVLROADSQVTEVCAATY⁵⁴Xn₂LTFLD^{BL2}DSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKV

(SEQ ID NO:5)

C. 抑制素人類VLD支架

KAMHVAQPAVWVLASSRGIA²⁵SVCEY³⁴TVSWVDME⁵⁴VRVTVLROADSQVTEVCAATY⁶⁰WNGRWL^{BL2}TFLD^{BL2}DSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVQLDPSWGWY^{BL3}WQGYEGIGNGTQIYVIDPEPSPDSN

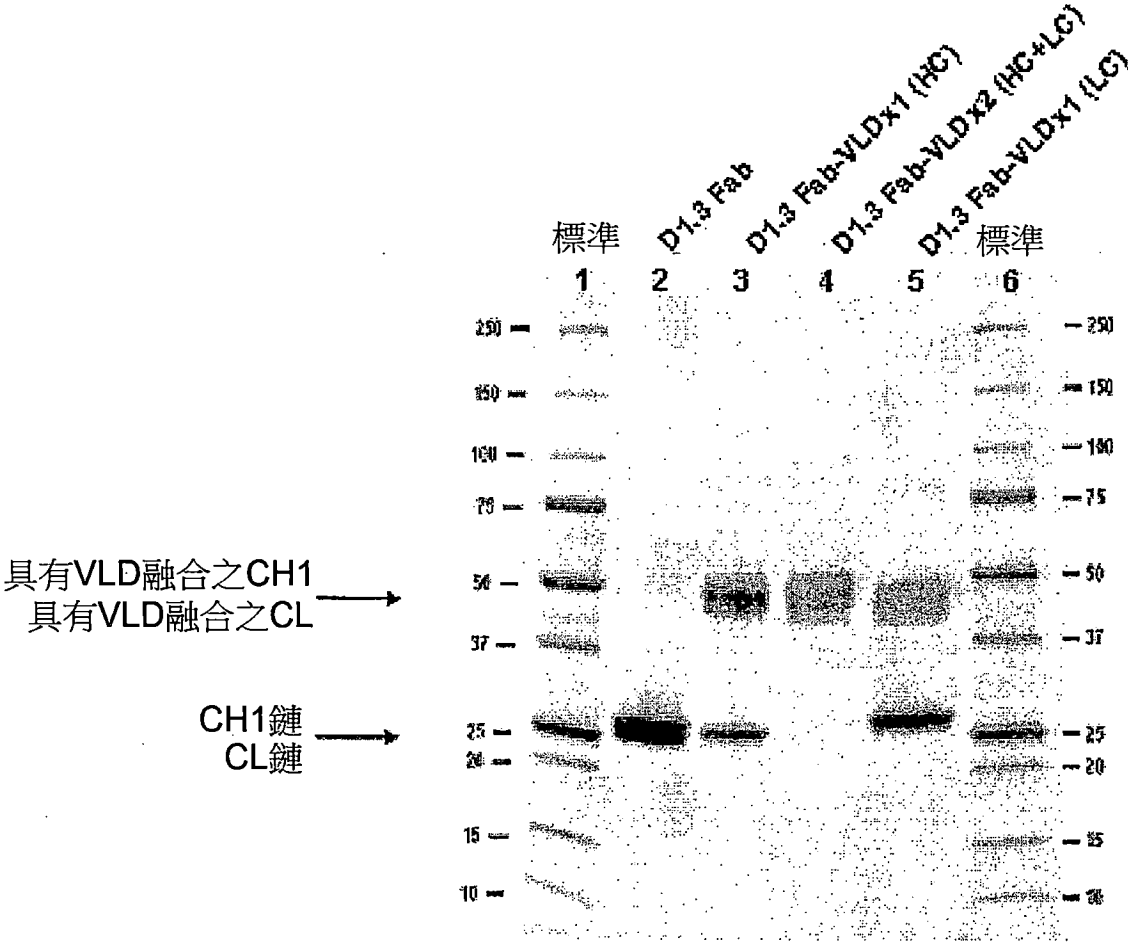


圖 9

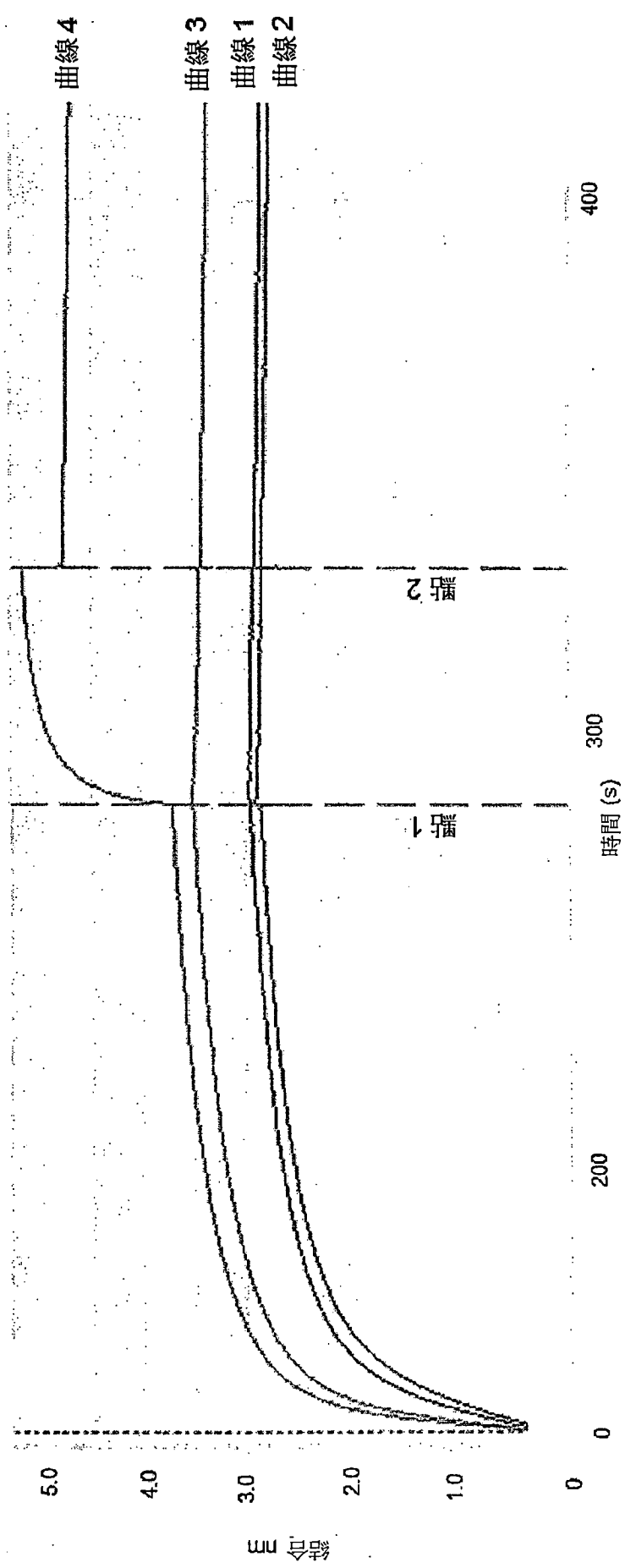


圖 10

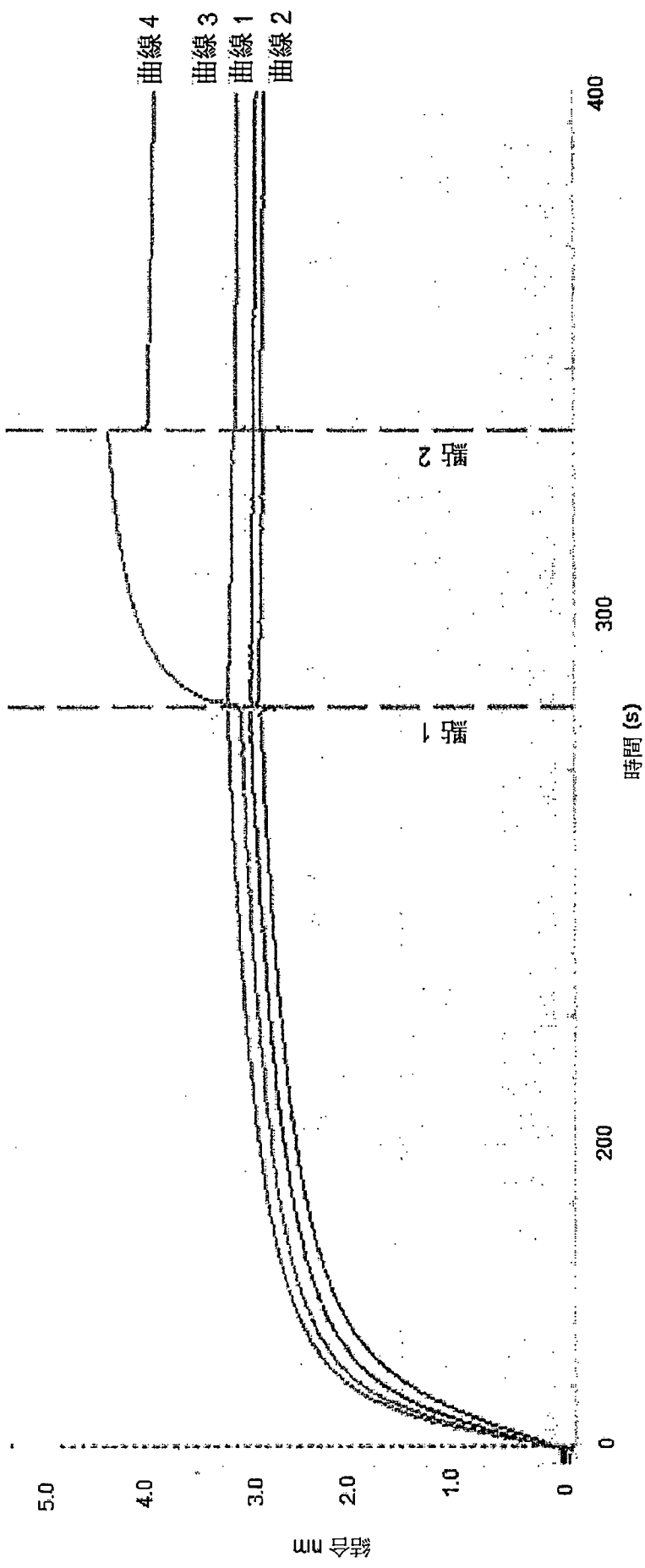


圖 11

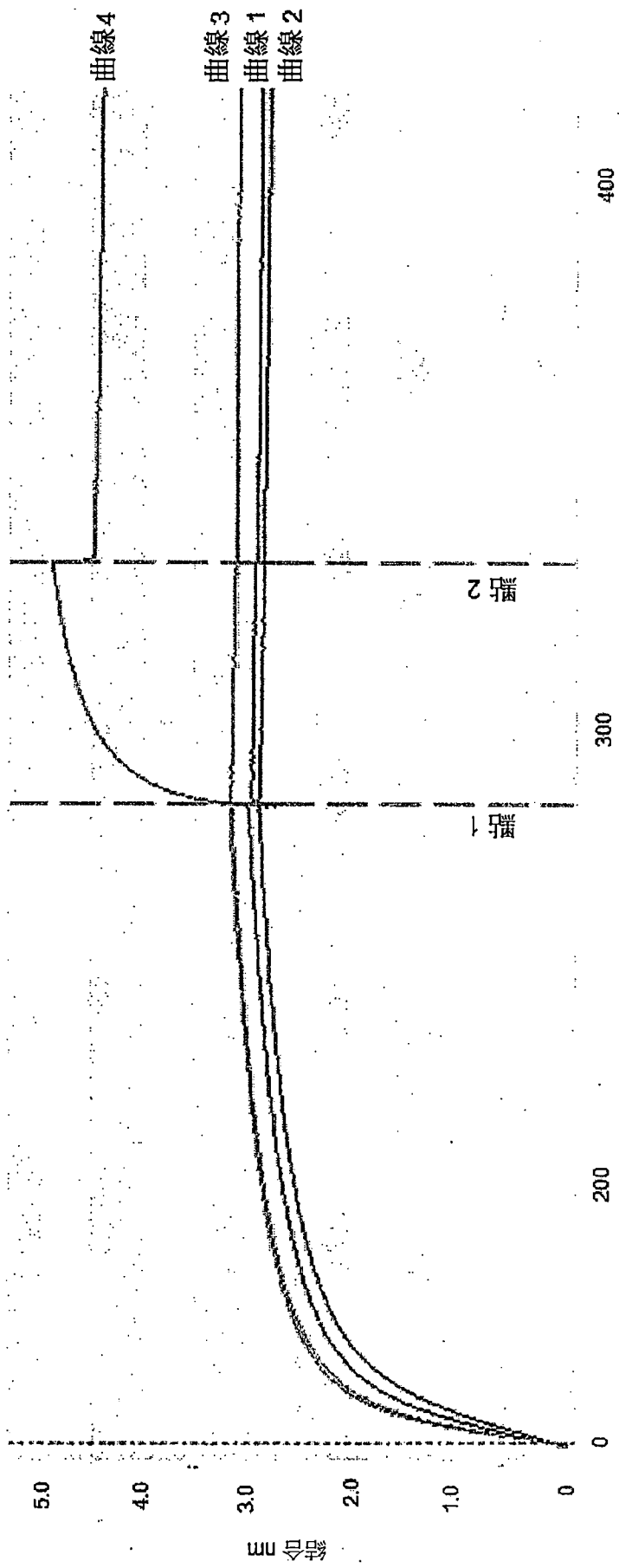


圖 12

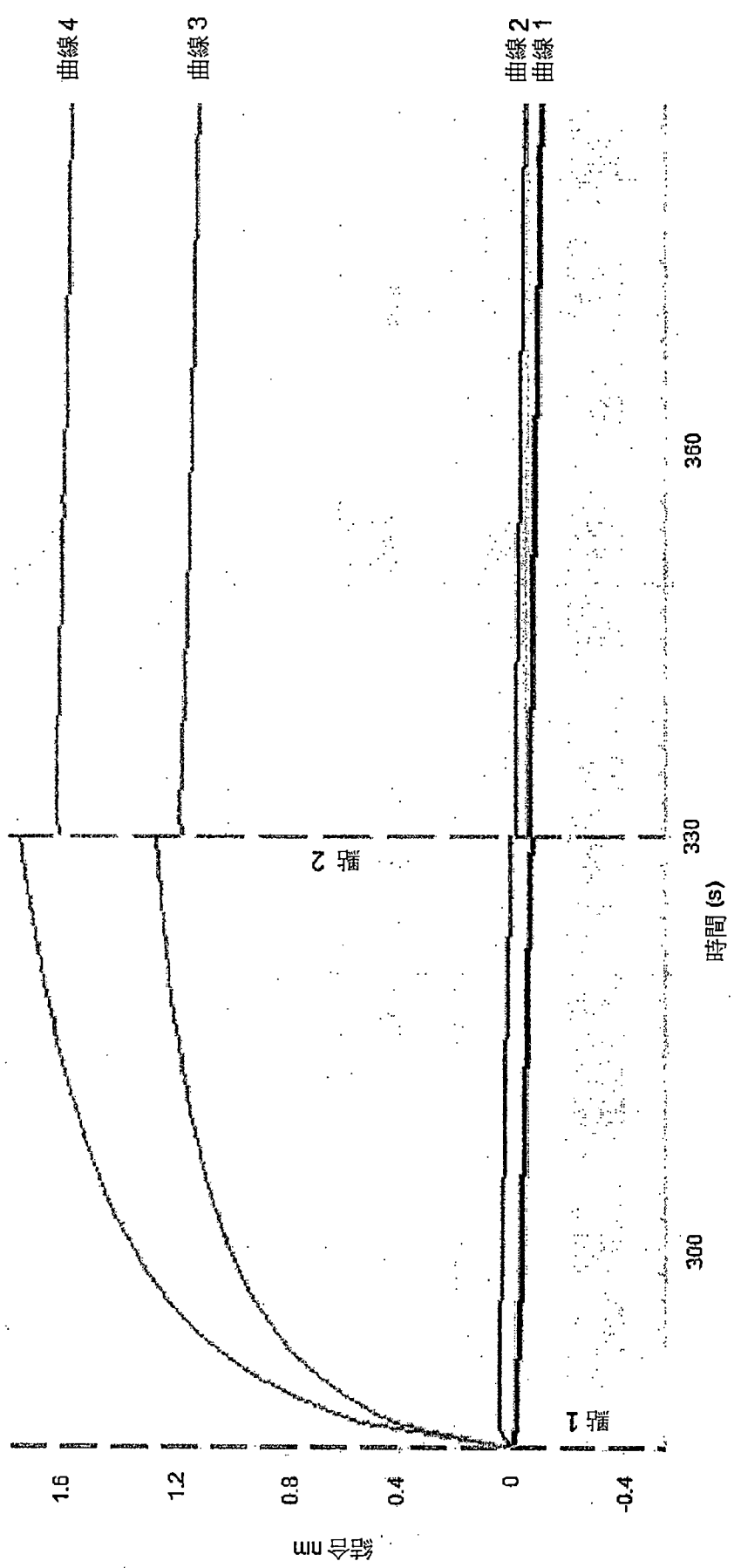


圖 13

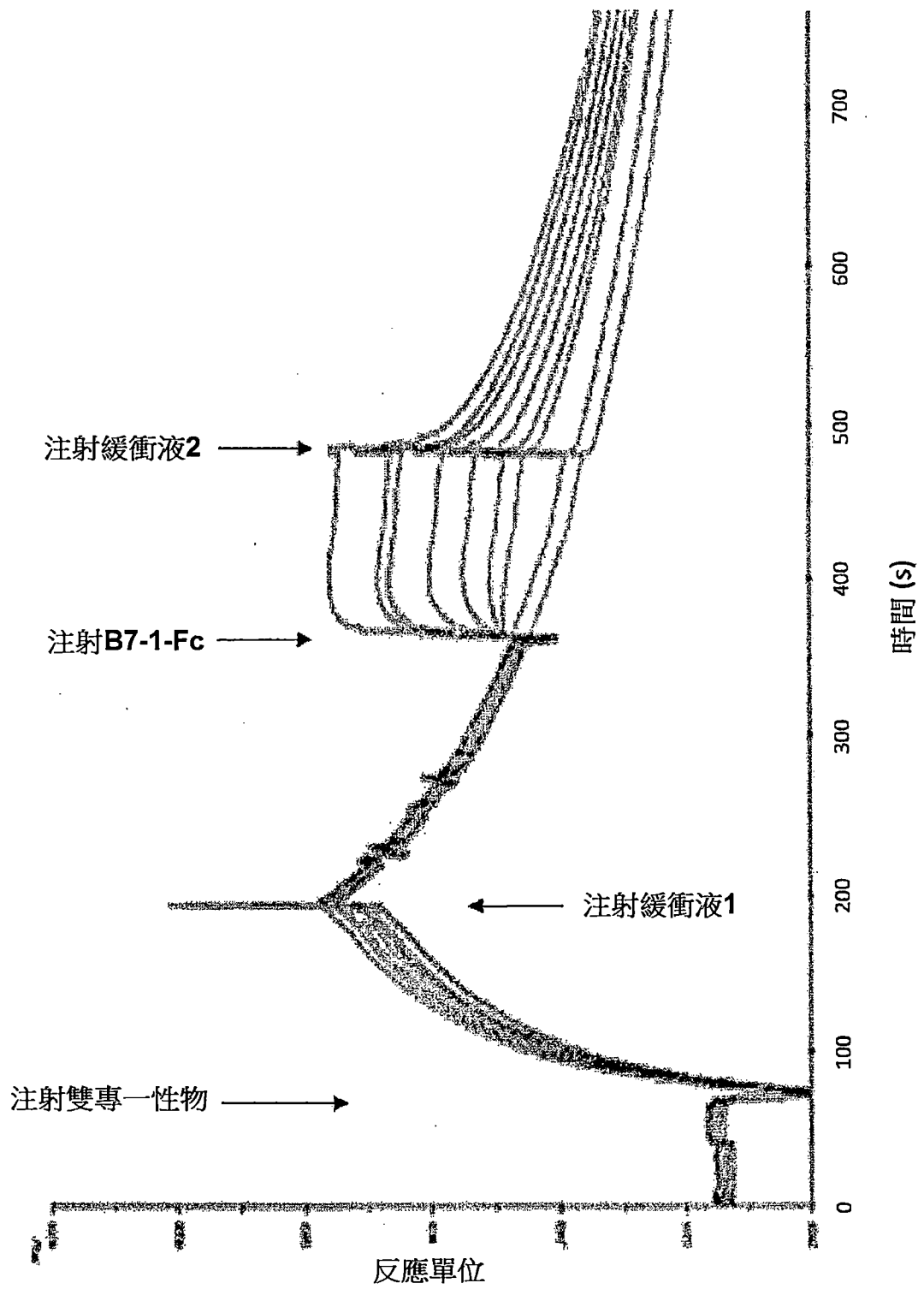


圖 14

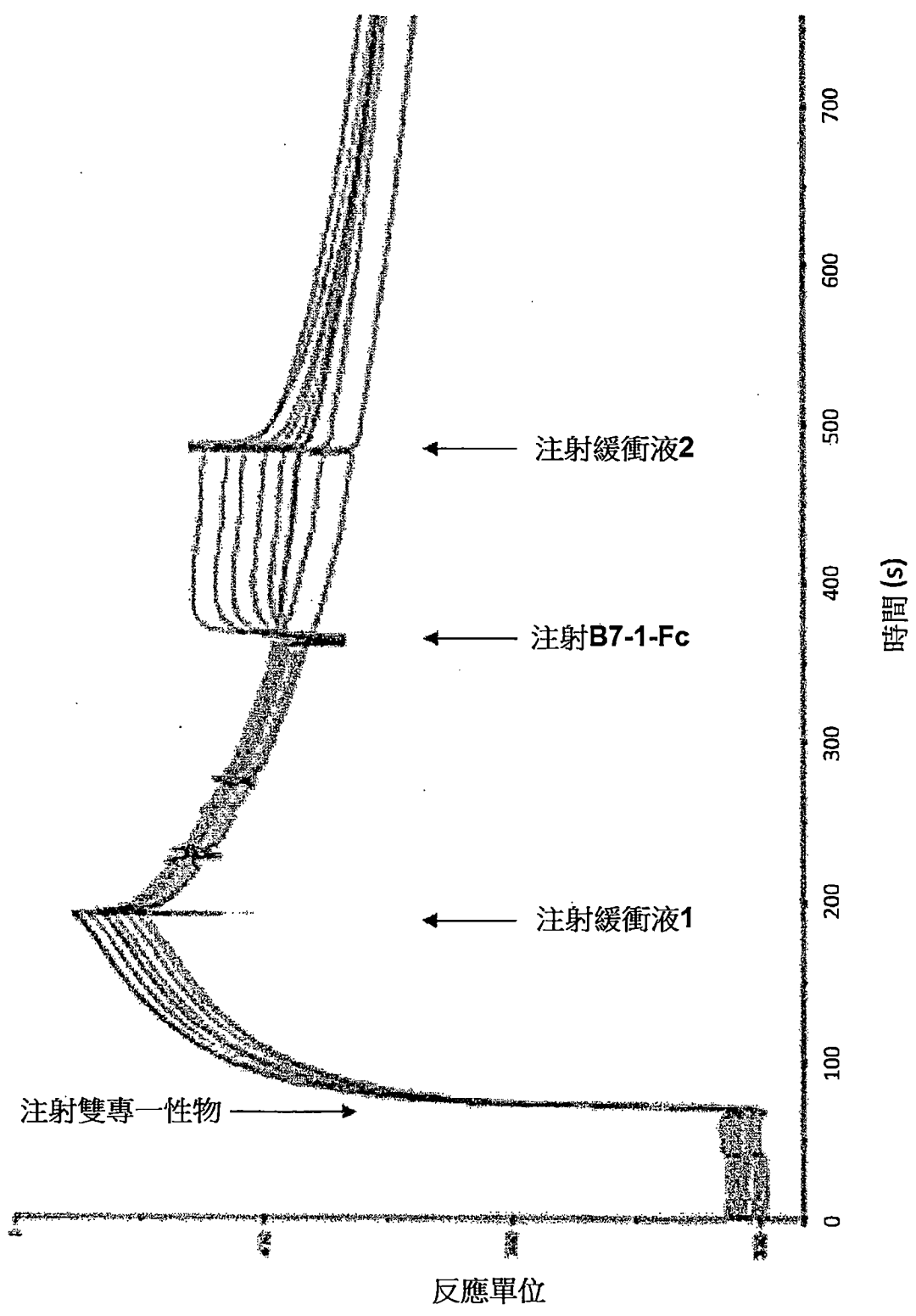


圖 15

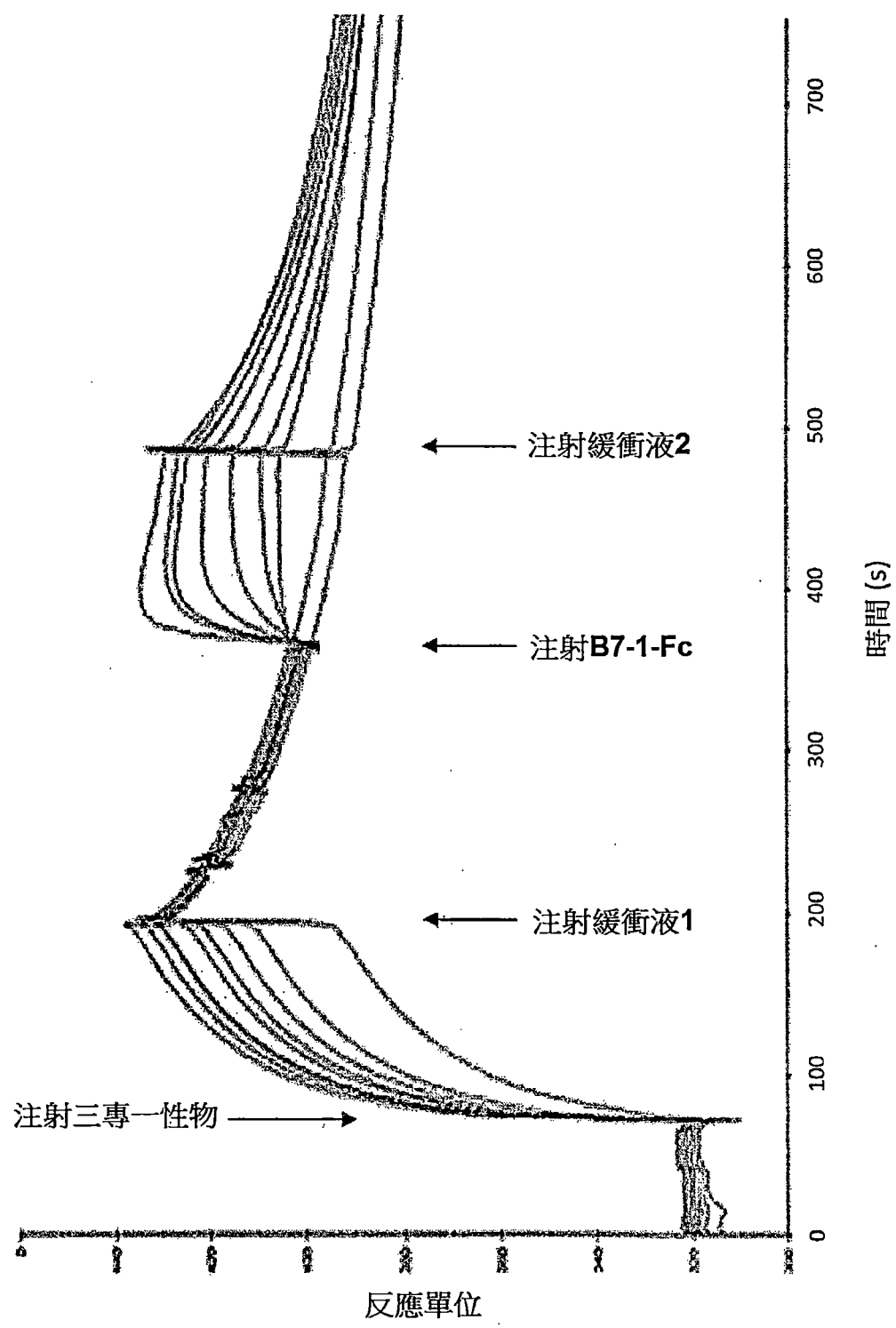


圖 16

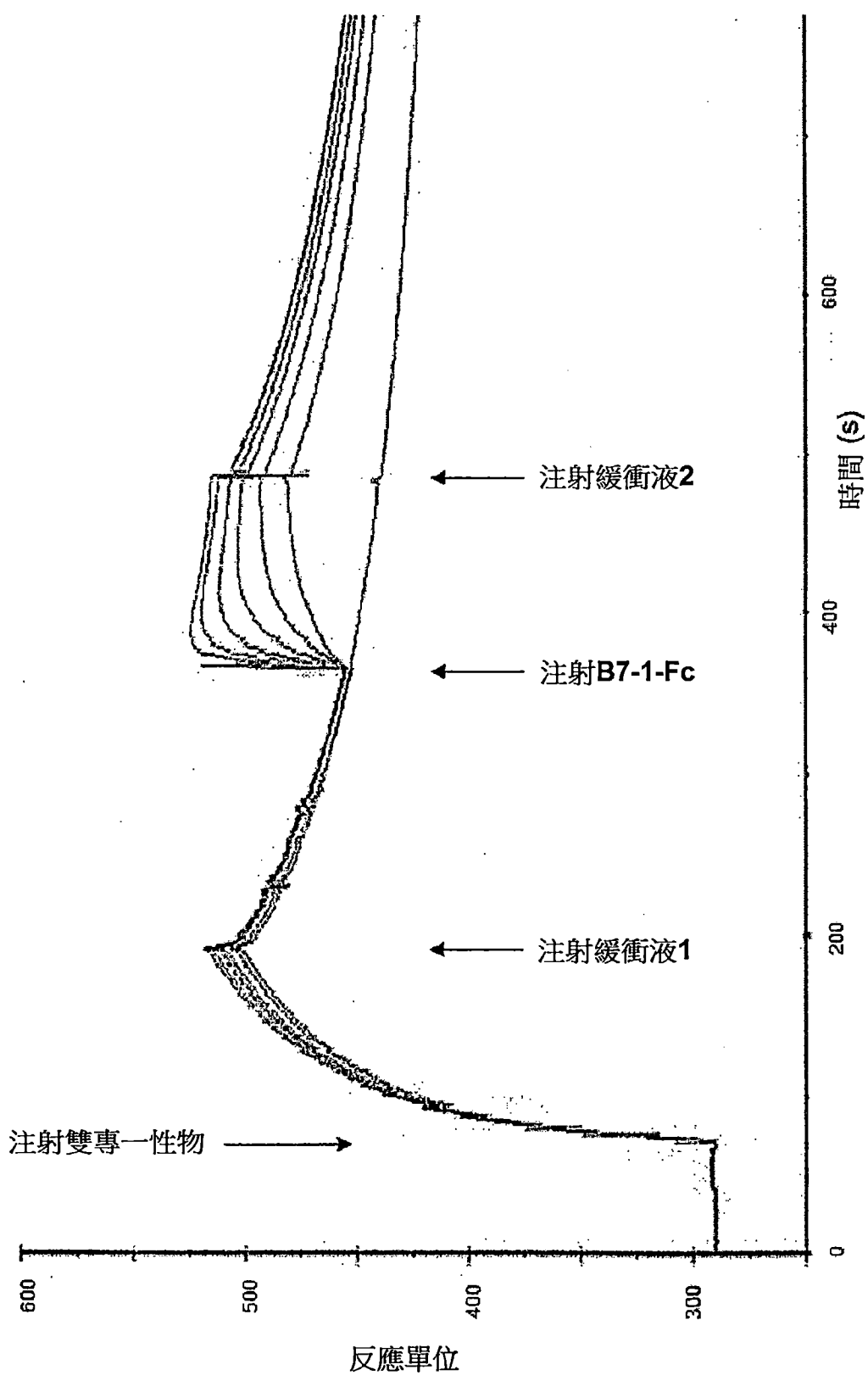


圖 17

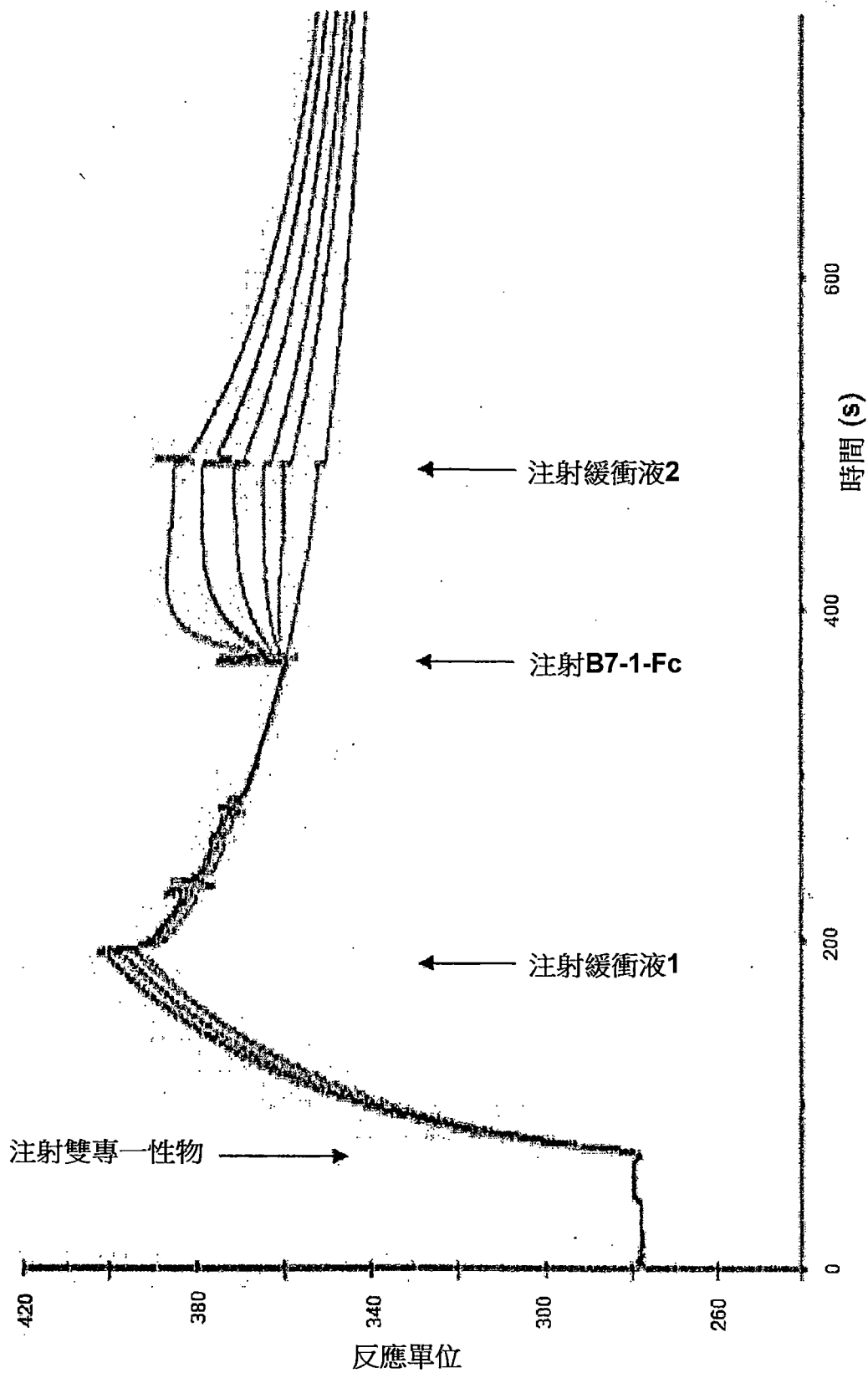


圖 18

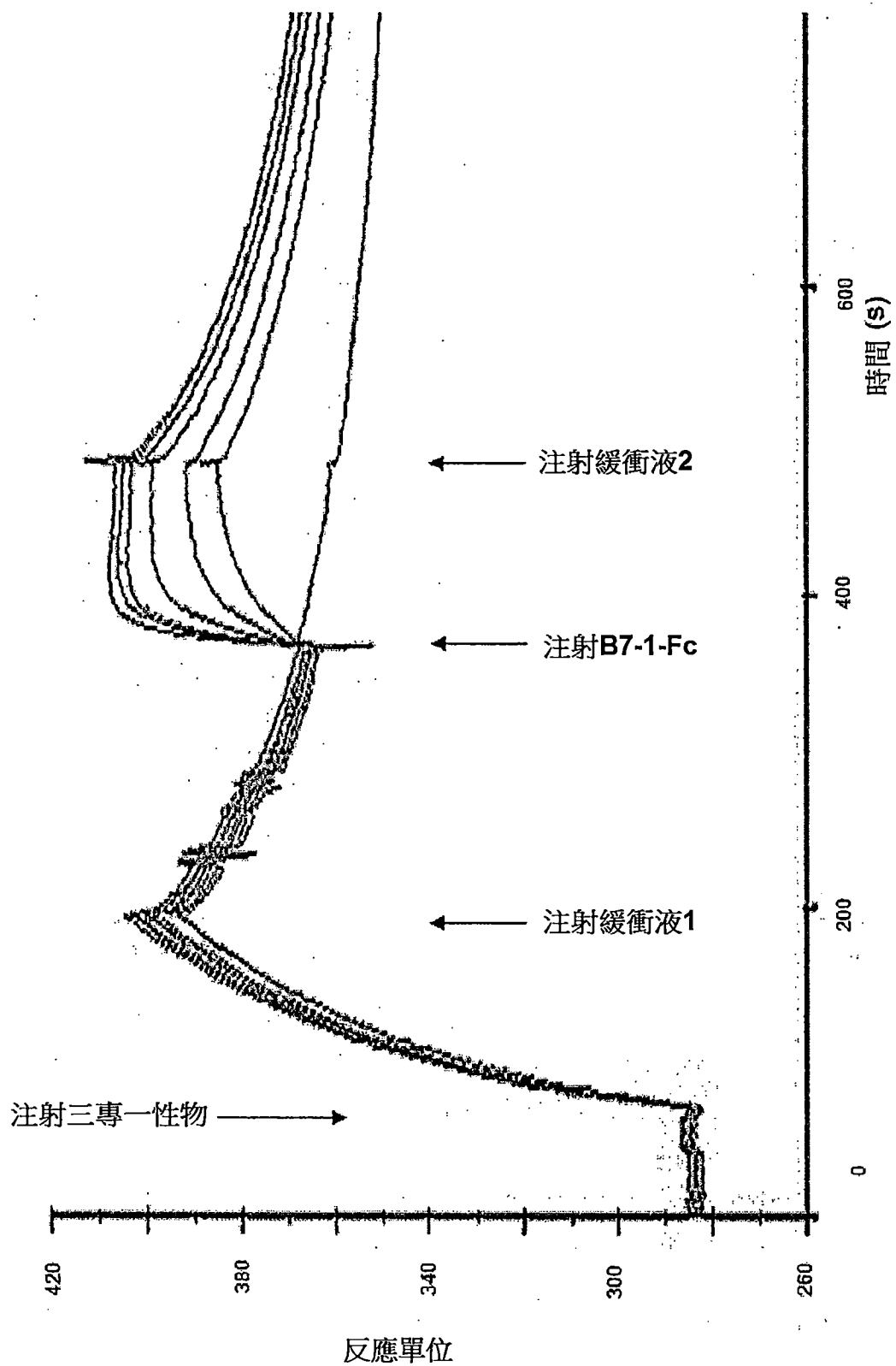


圖 19

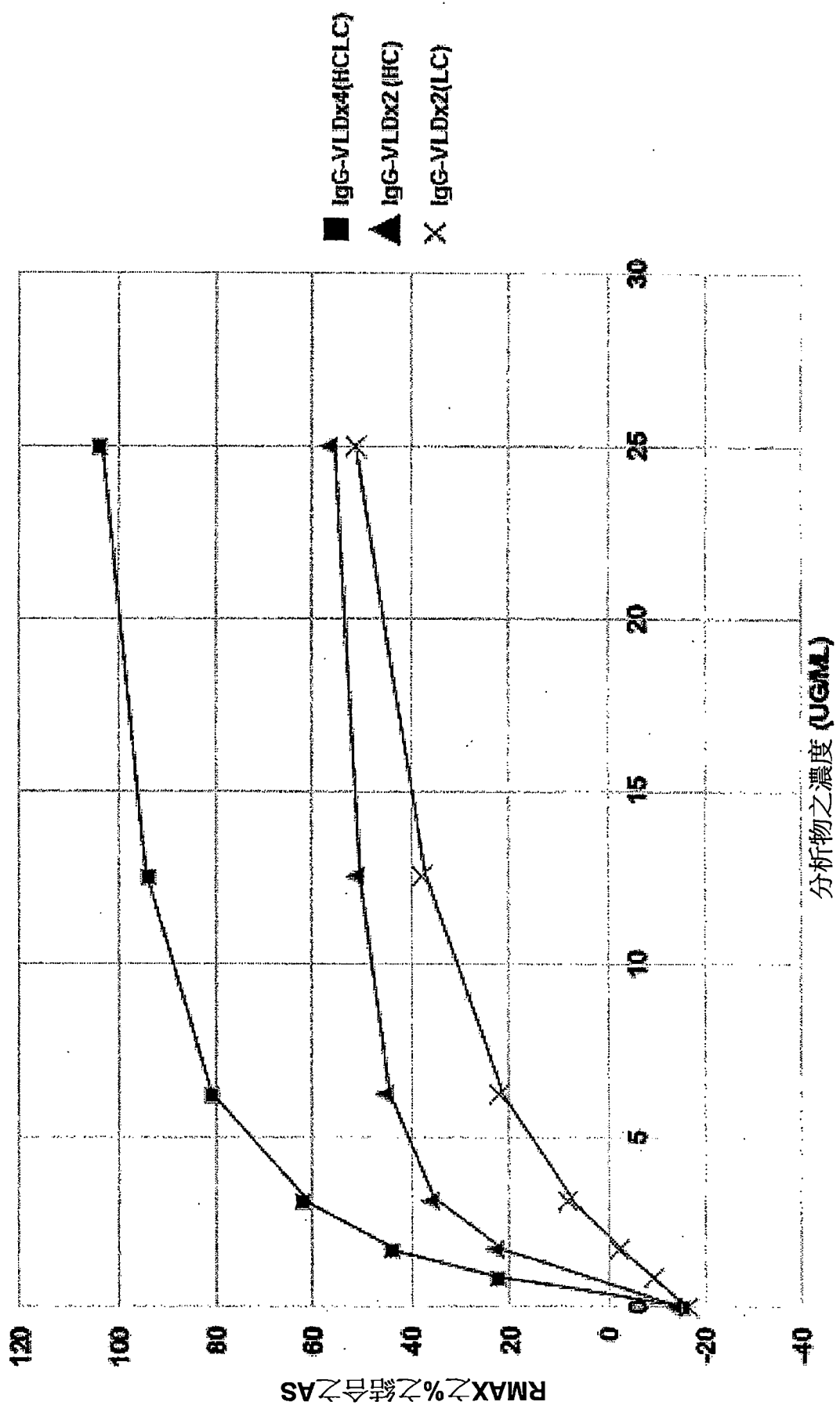


圖 20

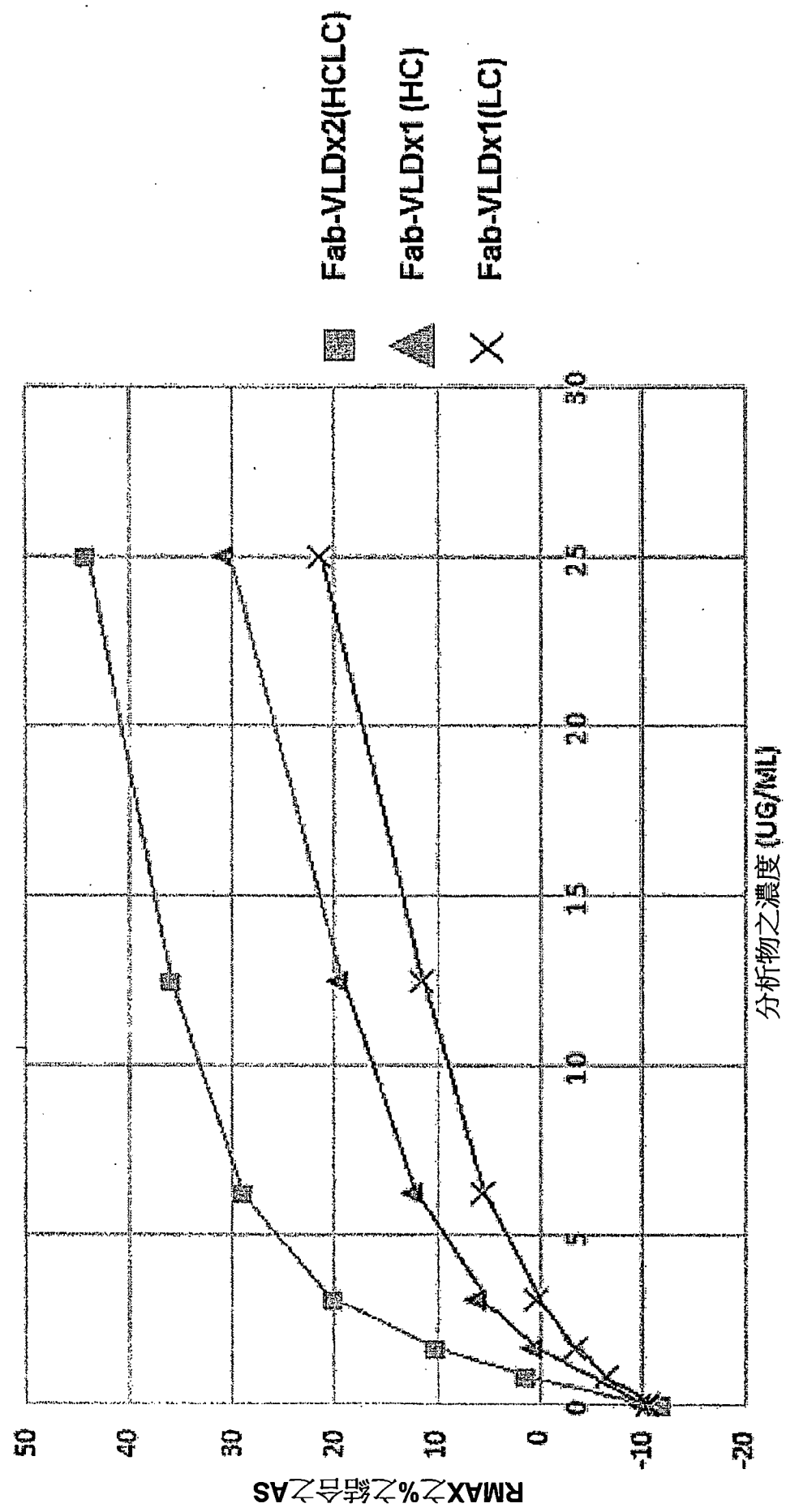


圖 21

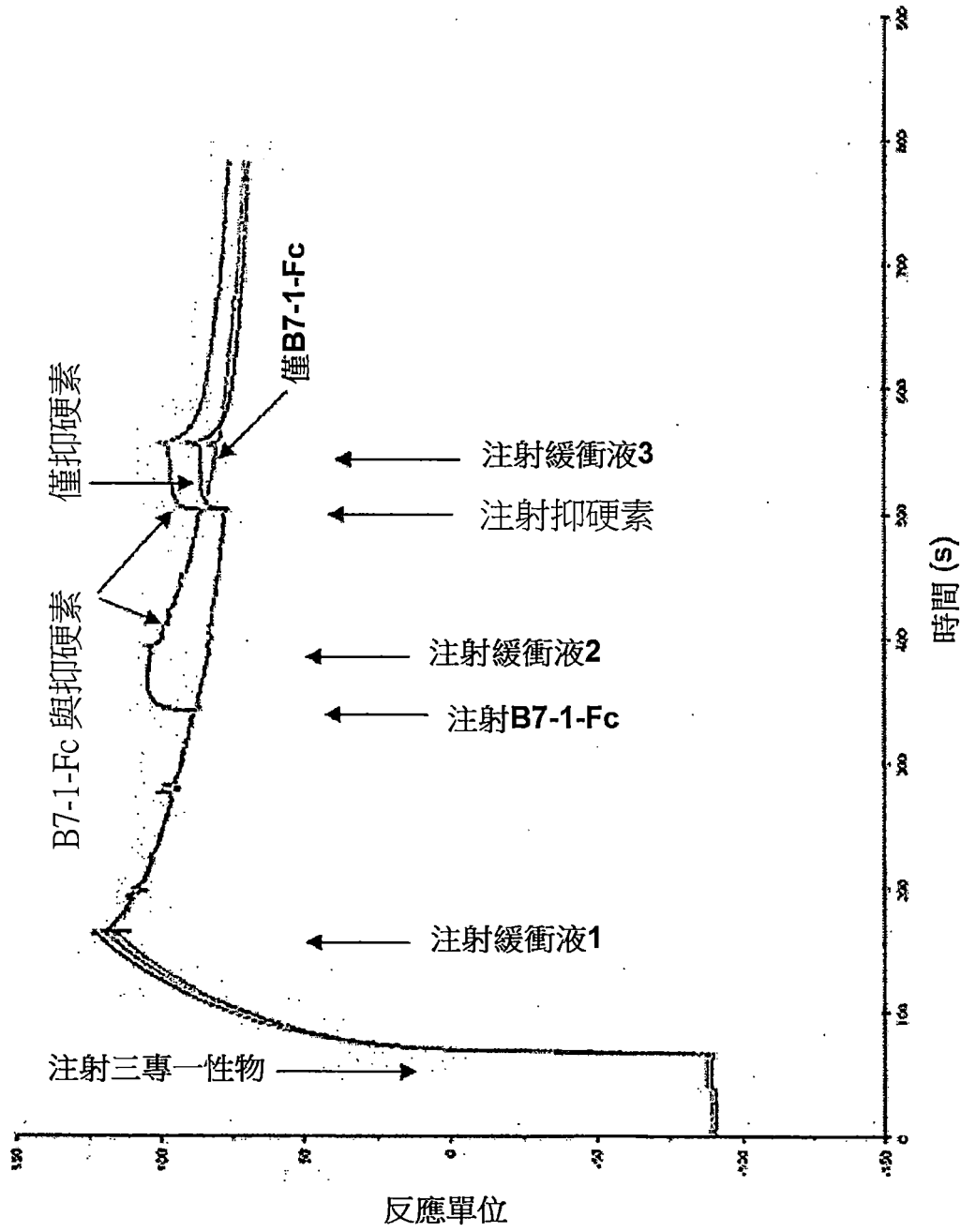


圖 22

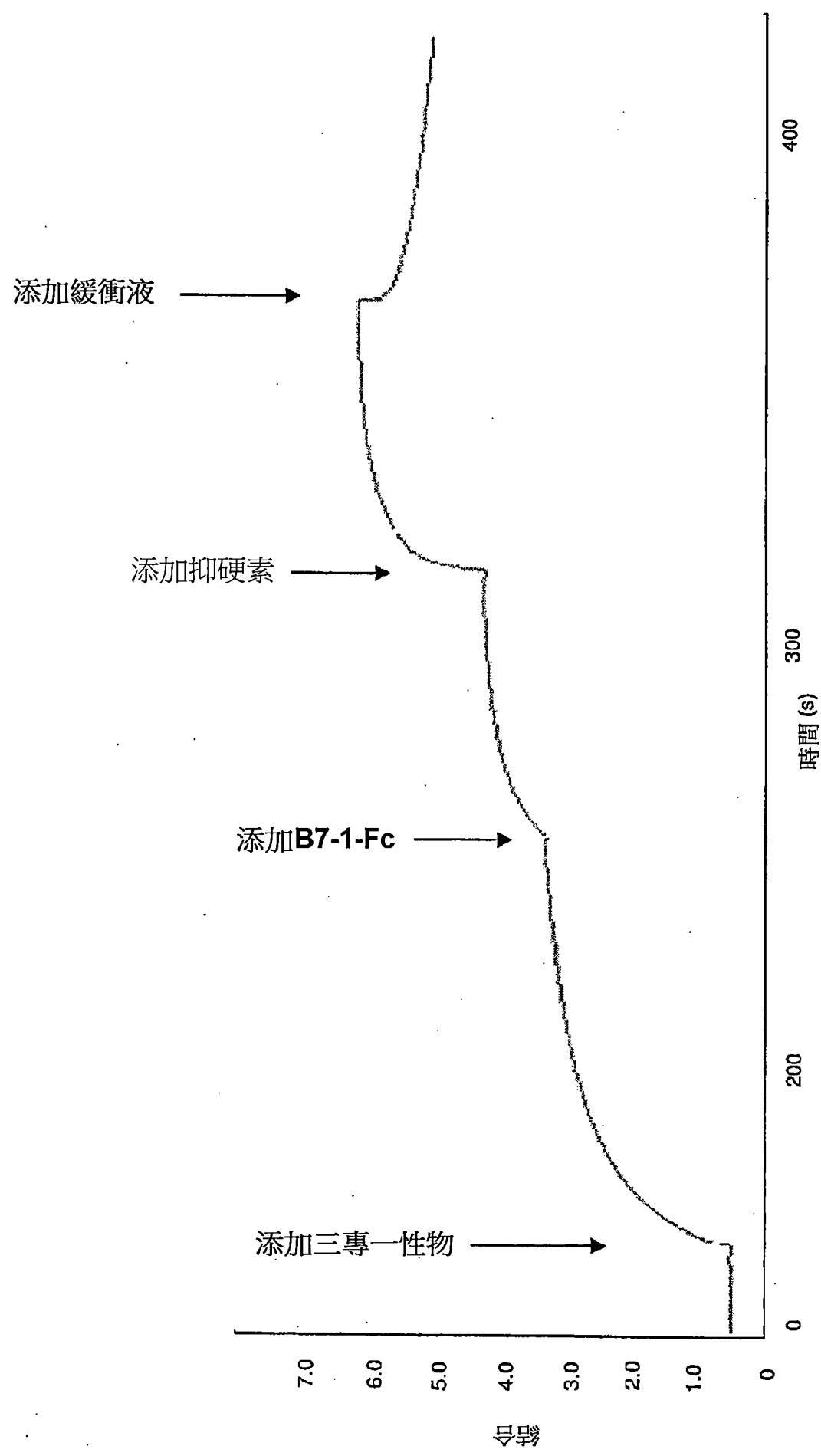


圖 23

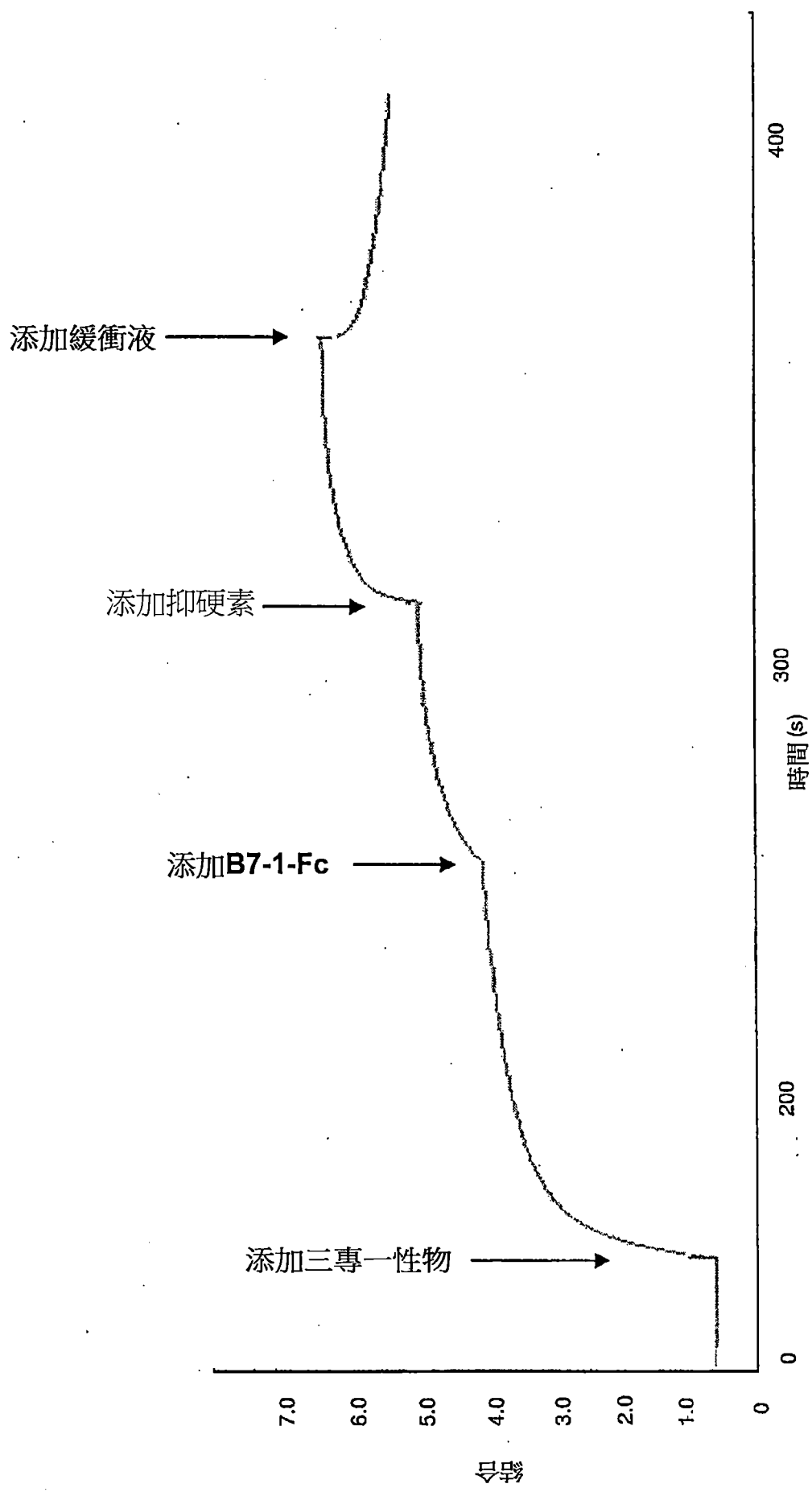


圖 24

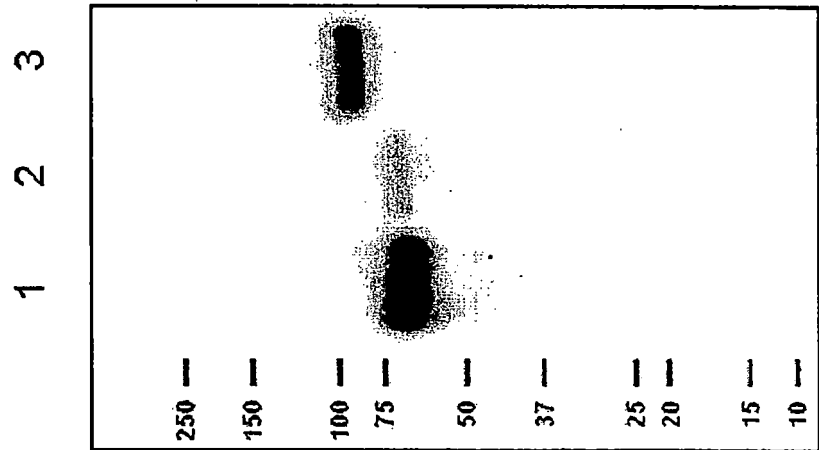


圖 26

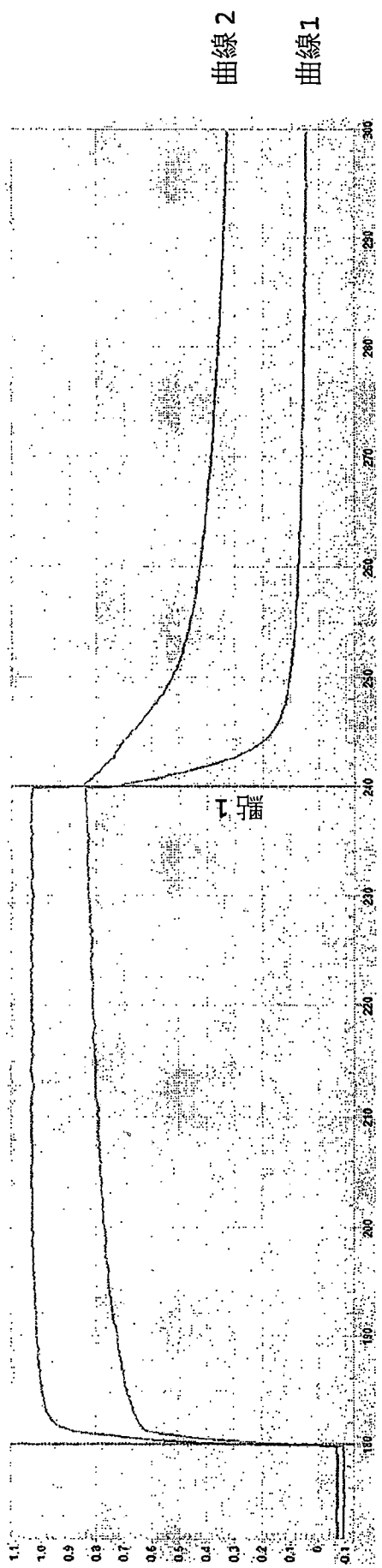


圖 27

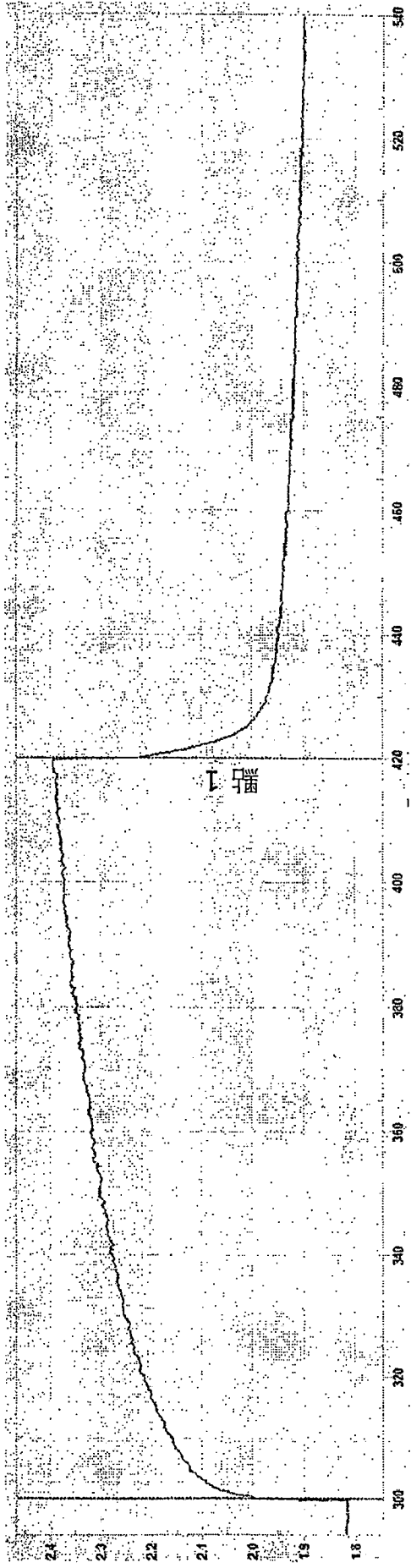


圖 28

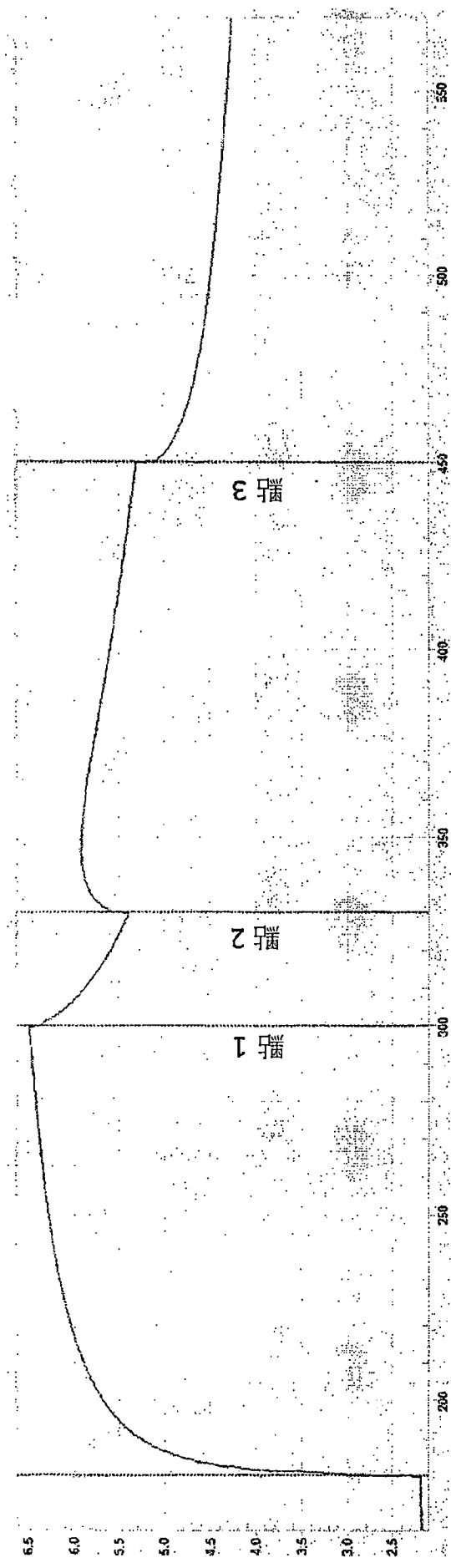


圖 29