202307007

(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 202307007 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：111116718 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 05 月 03 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/46 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
C07K16/22 (2006.01) *A61K39/395 (2006.01)*
C12N15/13 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*
C12N15/64 (2006.01) *A61P3/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/05/04 美國 63/183,976
2022/04/21 美國 63/333,293

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：艾維盧 那伽 AVVARU, NAGA SUHASINI (IN)；戴維斯 塞繆爾 DAVIS, SAMUEL (US)；李安徽 LEE, ANN-HWEE (KR)；林 家楊 LIN, CHIA-YANG (US)；沈 揚 SHEN, YANG (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：63 項 圖式數：24 共 241 頁

(54)名稱

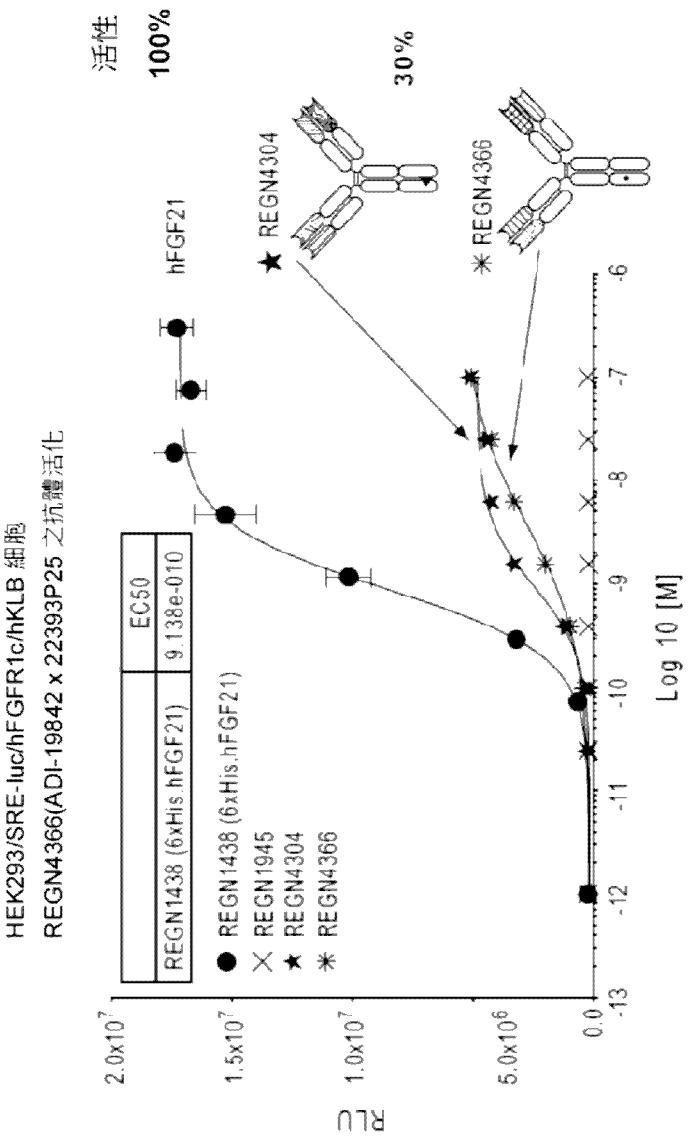
多特異性 FGF21 受體促效劑及其等用途

(57)摘要

本發明係關於包括至少三個與 FGR1c、Klotho β (「KLB」)之 GH1 結構域和 KLB 之 GH2 結構域結合的抗原結合位之多特異性結合分子(MBM)，含有該等 MBM 之醫藥組成物，使用該等 MBM 和醫藥組成物供治療代謝性疾病之方法，編碼該等 MBM 之核酸，經工程改造用以表現該等 MBM 之細胞和製造該等 MBM 之方法。

Multispecific binding molecules (MBMs) comprising at least three antigen binding sites that bind to FGR1c, the GH1 domain of Klotho beta (“KLB”), and the GH2 domain of KLB, pharmaceutical compositions containing the MBMs, methods of using the MBMs and pharmaceutical compositions for treating metabolic diseases, nucleic acids encoding the MBMs, cells engineered to express the MBMs, and methods of producing MBMs.

指定代表圖：


HEK293/SRE-luc/hFGFR1c/hKLB 細胞
REGN4366(ADI-19842 x 22393P25 之抗體活化
活性
100%
30%
hFGF21
REGN4304
REGN4366
EC50
REGN1438 (6xHis.hFGF21)
9.138e-010
REGN1438 (6xHis.hFGF21)
REGN1945
REGN4304
REGN4366
RLU
2.0x10^7
1.5x10^7
1.0x10^7
5.0x10^6
0.0
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log 10 [M]

【圖4】

20230[illegible]
20250[illegible]
專利案號：111116718

【發明摘要】

【中文發明名稱】多特異性FGF21受體促效劑及其等用途

【英文發明名稱】MULTISPECIFIC FGF21 RECEPTOR AGONISTS AND THEIR USES

【中文】

本發明係關於包括至少三個與FGR1c、Klotho β (「KLB」)之GH1結構域和KLB之GH2結構域結合的抗原結合位之多特異性結合分子(MBM)，含有該等MBM之醫藥組成物，使用該等MBM和醫藥組成物供治療代謝性疾病之方法，編碼該等MBM之核酸，經工程改造用以表現該等MBM之細胞和製造該等MBM之方法。

【英文】

Multispecific binding molecules (MBMs) comprising at least three antigen binding sites that bind to FGR1c, the GH1 domain of Klotho beta (“KLB”), and the GH2 domain of KLB, pharmaceutical compositions containing the MBMs, methods of using the MBMs and pharmaceutical compositions for treating metabolic diseases, nucleic acids encoding the MBMs, cells engineered to express the MBMs, and methods of producing MBMs.

【指定代表圖】　　圖4

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】多特異性FGF21受體促效劑及其等用途

【英文發明名稱】MULTISPECIFIC FGF21 RECEPTOR AGONISTS AND THEIR USES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於包括至少三個與FGR1c、Klotho β (「KLB」)之GH1結構域和KLB之GH2結構域結合的抗原結合位之多特異性結合分子(MBM)，含有該等MBM之醫藥組成物，使用該等MBM和醫藥組成物供治療代謝性疾病之方法，編碼該等MBM之核酸，經工程改造用以表現該等MBM之細胞和製造該等MBM之方法。

相關申請案之交互參照

【0002】 本申請案聲請2021年5月4日申請的美國臨時申請案號63/183,976和2022年4月21日申請的美國臨時申請案號63/333,293之優先權，其各自的內容係以全文引用的方式併入文中。

序列表

【0003】 本申請案含有已以電子ASCII型式提交並以全文引用的方式併入文中之序列表。該ASCII文本係於2022年4月28日建立，命名為RGN-004TW_SL.txt及檔案大小為103,195位元組(byte)。

【先前技術】

【0004】 纖維母細胞生長因子21 (FGF21)為在高度在肝臟合成的蛋白，其係在許多組織中進行能量恆定之許多方面的旁分泌和內分泌控制。FGF21係作用在包括下列二種蛋白之細胞表面受體複合物：FGF受體(FGFR)和共受體蛋白，稱為β-Klotho (KLB)。FGF21直接與這二個蛋白結合用以活化FGFR訊號傳遞活性(Kuro-O, 2018,

Nature 552:409-410; Lee *et al.*, 2018, Nature 553:501-505)。

【0005】 FGF受體為帶有三個胞外免疫球蛋白-型結構域(D1–D3)和一個胞內酪胺酸激酶結構域之單行程跨膜受體蛋白。KLB為由一訊號序列、大的胞外配體結合區、單一跨膜結構域和小的細胞質域組成之第I型膜蛋白(Kuro-O, 2012, Adv Exp Med Biol 728:25–40)。KLB的胞外配體結合區係由帶有類似糖苷水解酶家族1酵素，所謂的切糖酵素之胺基酸序列，稱為GH1和GH2的銜接重複體所組成，且係與FGF21的C-端尾部結合(Lee *et al.*, 2018, Nature 553:501-505)。

【0006】 在活體外，FGF21可經由與任何FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c同功型複合之KLB加以作用。然而，就對FGFR1或FGFR1/KLB複合物具特異性的活化抗體之基因剔除(KO)分析和研究顯示，FGFR1c可能對於活體內FGF21的作用特別重要(Adams *et al.*, 2012, Molecular Metabolism 2:31-37；Foltz *et al.*, 2012, Science Translational Medicine 4:162ra153；Kolumam *et al.*, 2015, EBioMedicine 2:730-743；Lan *et al.*, 2017, Cell Metabolism 26:709-718；Wu *et al.*, 2011, Science Translational Medicine 3:113ra126)。

【0007】 在肥胖症和第2型糖尿病的臨床前模型中，以FGF21治療改善了葡萄糖代謝並促進減重，且因此，作為治療人類之代謝症候群的治療性藥物，FGF21已引起相當大的關注(參見，例如Lewis *et al.*, 2019, Trends in Endocrinology & Metabolism 30:491-504)。

【0008】 經工程改造的FGF21類似物，在藥理學層級上，在動物模型中於代謝症侯群基因型上顯示相當大的改善。然而，在人類中僅見到某些的效用(降低血脂異常和體重)(參見，例如Zhang *et al.*, 2015, Frontiers in Endocrinology 6:168)。就克服這些缺點，已產生與KLB和FGFR1結合的雙特異性抗體作為替代的FGF21促效劑(參見，例如Kolumam *et al.*, 2015, EBioMedicine 2(7): 730–743；美國專利第9,884,919號；Smith *et al.*, 2013, PLoS One 8:e61432)。然而，如文中所展現的，雙特異性抗體

僅具有一小部分的FGF21促效劑活性。

【0009】　因此，在本項技術中對於更有效的FGF21促效劑仍有需求。本揭示文係解決本項技術中之此項和其他需求。

【發明內容】

【0010】　本揭示文係提供含有至少3個抗原-結合位(「ABS」)之多特異性結合分子(「MBM」)，第一個結合位(「ABS1」)係與FGFR1c結合，第二個結合位(「ABS2」)係與KLB的GH2結構域結合，而第三個結合位(「ABS3」)係與KLB的GH2結構域結合。不受限於理論，咸信在MBM中除了FGFR1c抗原結合位之外，納入二個抗KLB抗原結合位，一個抗GH1結構域及另一個抗GH2結構域，係引起KLB-FGFR1c-MBM複合物，其化學計量造成大於雙特異性抗體所能達到的FGFR1c促效作用。例如，MBM在某些具體實例中就與標靶分子結合可具有較低的KD及/或在細胞為基礎的結合分析中具有比對應的親代單特異性抗體或雙特異性抗體更強力之EC50值(例如，如7.5章節中所述)。本揭示文之示例的MBM係描述於下文之6.2章節和特定具體實例181至326中。

【0011】　本揭示文進一步係提供編碼本揭示文之MBM的核酸。編碼該等MBM的核酸可為單一核酸(例如編碼一MBM之所有多肽鏈的載體)或多數個核酸(例如，編碼一MBM之不同多肽鏈的二或更多個載體)。本揭示文進一步係提供經工程改造用以表現本揭示文之核酸和MBM的宿主細胞和細胞株。本揭示文進一步係提供製造本揭示文之MBM的方法。作為例示的核酸、宿主細胞、細胞株和製造MBM之方法係描述於下文6.4章節和特定具體實例348和353中。

【0012】　本揭示文進一步係提供包括本揭示文之MBM的醫藥組成物。作為例示的醫藥組成物係描述於下文6.5章節和特定具體實例327中。

【0013】　文中進一步係提供使用本揭示文之MBM和醫藥組成物之方法，例如用

於治療代謝症狀及/或改善代謝。作為例示的方法係描述於下文6.6章節和特定具體實例1至180及328至347中。在某些方面，此等方法係利用如6.2章節和特定具體實例181至326中所描述的MBM。

【圖式簡單說明】

【0014】 **圖1**：由FGF21所調控的代謝路徑之示意圖，FGF21為一作為內分泌荷爾蒙之FGF家族的成員。

【0015】 **圖2**：新穎的KLB和FGFR1c結合劑之示意圖，22414、22401及22393係與KLB的GH1結構域結合；22532係與KLB的GH2結構域結合；及ADI-19842係與FGFR1c的D3結構域結合。

【0016】 **圖3**：與雙特異性結合分子(BBM) REGN4355、REGN 4366、REGN 4370、REGN 4376和REGN 4304結合的FGFR1c/KLB之FGFR1受體/共受體複合物內的結構域示意圖。REGN4304係以FGFR1c D2和KLB GH2為標靶，而其餘的雙特異性結合分子係以FGFR1c D3和KLB GH1結構域為標靶。

【0017】 **圖4**：展示相較於FGFR21在HEK293/SRE-luc/hFGFR1c/hKLB細胞中雙特異性結合分子(BBM) REGN4366和REGN4304之適度活化的圖示。

【0018】 **圖5**：**圖5**係顯示含有三個抗原結合部分之示例的三特異性結合分子組態(以“1”、“2”、“3”表示)。順時針從左上方開始：含有N-端scFv結構域之三特異性變體(2+1 N-scFv組態)；含有C-端scFv結構域之三特異性變體(2+1 C-scFv組態)；含有C-端Fab結構域之三特異性變體(2+1 C-Fab組態)；含有N-端Fab結構域之三特異性變體(2+1 N-Fab 組態)。三個抗原結合部分共同具有三個抗原結合位，其(不按特定順序)係與KLB的GH1結構域、KLB的GH2結構域和FGFR1c結合(例如，在D1、D2或D3結構域)。

【0019】 **圖6A-6B**：**圖6A**係顯示以KLB的GH1結構域和FGFR1c的D3結構域為標

靶的REGN4366之三特異性變體，其係藉由在分子的不同位置加入一GH2結合臂所製造。順時針從左上方開始：含有N-端scFv 結構域之三特異性變體(2+1 N-scFv組態)；含有C-端scFv結構域之三特異性變體(2+1 C-scFv組態)；含有C-端Fab結構域之三特異性變體(2+1 C-Fab組態)；含有N-端Fab結構域之三特異性變體2+1 N-Fab組態)。**圖6B**：顯示與連接子長度變化有關的活性之長條圖。

【0020】 **圖7A-7B**：**圖7A**為展現相較於親代REGN4366以及RGN4304，在HEK293.SREIluc.hFGFR1c.hKLB細胞報導子分析中F1K_scFv6和F1K_Fab6之增強活性的圖示。圖7A中實心圓係描繪作為正對照之人類FGF21數據點。**圖7B**為以GH2結構域為標靶的示意圖及其與較佳促效作用之相關性為何。

【0021】 **圖8A-8B**：**圖8A**為篩選2+1 N-scFv形式之變體，包括連接子變體(I)；同型變體(II)；具有替代GH2-結合序列之變體(III)；和具有替代GH1結合序列之變體的示意圖。圖8A以出現順序分別係揭示SEQ ID NOS：55、24、73、57、74-75和44。**圖8B**為篩選2+1 N-scFv形式之結合臂排列、距離和向位變體的示意圖。

【0022】 **圖9**：**圖9**係顯示評估六種指定scFv6分子之連接子長度的變體研究結果(在(1)位置含有稱為22393(或393)之GH1結合劑，在(2)位置含有稱為ADI-19842或842之FGFR1結合劑，及在(3)位置含有稱為22532(或532) scFv模式之GH2結合劑)。該等分子係在FGFR1結合結構域和N-端532 scFv結構域組份之間含有7至45個胺基酸的連接子。該scFv係以VL-VH順序配置，而連接子命名「L20H7」、「L20H15」、「L20H22」、「L20H30」、「L20H37」和「L20H45」係指20個胺基酸的連接子隔開scFv的VL和VH及在scFv的C-端一7個、15個、22個、30個、37個或45個胺基酸的連接子隔開scFv與毗鄰的VH。所有連接子長度之三特異性結合分子展現大於對照雙特異性結合分子REGN4304的活性。

【0023】 **圖10A-10B**：F1K_scFv6 (30個胺基酸的連接子)和scFv6_LK7 (7個胺基酸的連接子)在穩定表現hFGFR1c和hKLB的HEK293細胞中強力地活化FGFR1c訊

號傳遞。**圖10A**：展現經由ERK和PLCγ磷酸化作用之藥物濃度依賴的FGFR1c訊號傳遞之西方墨點，為血清飢餓16小時接著以1 nM和10 nM濃度的藥物處理15 min之結果。**圖10B**：展現經由ERK和PLCγ磷酸化作用之時間依賴的FGFR1c訊號傳遞之西方墨點，為血清飢餓16小時接著以10 nM濃度的藥物處理15、30 min以及1、2、4和6-hr培養期之結果。除非另有說明，否則術語「F1K_scFv6」在圖示中並無加入連接子長度作為字尾。10A-10B和說明書的他處係指在scFv結構域(圖5中的ABS3)和Fab結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_scFv6-LK30。

【0024】 **圖11A-11C**：在原代人類脂肪細胞中F1K_scFv6和Fab6活化ERK路徑。**圖11A**：展現在原代人類脂肪細胞中經由ERK和PLCγ磷酸化作用之FGFR1c訊號傳遞之西方墨點。將脂肪細胞分化8天，然後血清飢餓4小時並以濃度10 nM的藥物處理15分鐘。**圖11B和11C**：展現使用FRET-為基礎的p-ERK免疫-捕捉分析，相對於REGN1945和REGN4366，F1K_scFv6和F1K_Fab6提升的ERK活性之圖式。將分化的人類皮下脂肪細胞培養1天進行回收，然後血清飢餓4小時並以藥物處理15-60分鐘。除非另有說明，否則術語「F1K_scFv6」在圖示中並無加入連接子長度作為字尾。11A-11C和說明書的他處係指在scFv結構域(圖5中的ABS3)和Fab結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_scFv6-LK30。除非另有說明，否則術語「F1K_Fab6」在圖示中並無加入連接子長度作為字尾。11B-11C和說明書的他處係指在ABS3的Fab結構域(如在圖5中以「3」表示)和Fc結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_Fab6-LK30。

【0025】 **圖12A-12B**：FGFR1c、KLB和FGF21之集叢如何形成活性複合物的示意圖(圖12A)及FGFR1c和KLB受體之間形成的潛在化學計量複合物以及三特異性F1K_scFv6或F1K_Fab6與雙特異性和單特異性對照組相比較(圖12B)。除非另有說明，否則術語「F1K_scFv6」在圖12B中並無加入字尾以及在說明書的他處係指在

scFv結構域(圖5中的ABS3)和Fab結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_scFv6-LK30。除非另有說明，否則術語「F1K_Fab6」在圖12B中並無加入字尾以及在說明書的他處係指在ABS3的Fab結構域(如在圖5中以「3」表示)和Fc結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_Fab6-LK30。

【0026】 **圖13A-13D**：相較於三特異性mAb(F1K_scFv6 IgG1和F1K_Fab6 IgG1)，單特異性(抗-KLB；REGN4661)和雙特異性結合分子(抗-KLBxFGFR1c；REGN4304)以不同的化學計量結合KLB/FGFR1c。**圖13A**：以不對稱流場流分離結合多角度光散射(A4F-MALS)分析REGN4661：KLB複合物(實線)。亦覆蓋來自REGN4661(虛線)和KLB(點線)之個別樣本的分形圖。顯示各樣本在215 nm的相對UV吸收度作為滯留時間的函數並顯示解析波峰之實測的莫耳質量。**圖13B**：以不對稱流場流分離結合多角度光散射(A4F-MALS)分析REGN4303：KLB複合物(粗實線)和REGN4303：KLB：FGFR1c複合物(細實線)。亦覆蓋來自REGN4303(虛線)、KLB (點線)和FGFR1c (灰色點線)之個別樣本的分形圖。顯示各樣本在215 nm的相對UV吸收度作為滯留時間的函數並顯示解析波峰之實測的莫耳質量。**圖13C**：以不對稱流場流分離結合多角度光散射(A4F-MALS)分析F1K_scFv6 IgG1：KLB複合物(粗實線)和F1K_scFv6 IgG1：KLB：FGFR1c複合物(0.2 μM：0.2 μM：0.2 μM，細實線)。顯示各樣本在215 nm的相對UV吸收度作為滯留時間的函數並顯示解析波峰之實測的莫耳質量。**圖13D**：以不對稱流場流分離結合多角度光散射(A4F-MALS)分析F1K_Fab6 IgG1：KLB複合物(粗實線)和F1K_Fab6 IgG1：KLB：FGFR1c複合物(0.2 μM：0.2 μM：0.2 μM，細實線)。顯示各樣本在215 nm的相對UV吸收度作為滯留時間的函數並顯示解析波峰之實測的莫耳質量。除非另有說明，否則術語「F1K_scFv6」在圖13C中並無加入字尾以及在說明書的他處係指在scFv結構域(圖5中的ABS3)和Fab結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_scFv6-LK30。除非另有說明，否則術語「F1K_Fab6」在圖13D中並無加入字尾以及在說明書的他處係指在

ABS3的Fab結構域(如在圖5中以「3」表示)和Fc結構域之間帶有30-個胺基酸的連接子之分子且有時候稱為F1K_Fab6-LK30。

【0027】 **圖14：圖14**係描繪人類IgG1重鏈恆定區之野生型序列(人類IGHG1重鏈恆定區；UniProt登錄號P01857)。CH1=胺基酸1-98；上絞鏈=胺基酸99-108；核心絞鏈=109-112；下絞鏈=113-121；CH2=120-223；CH3=224-330。所顯示的胺基酸編號為相對於該描繪的序列。上絞鏈區、核心絞鏈區和下絞鏈區係加邊框標示。如圖中所示，下絞鏈的最後二個胺基酸係相當於CH2區的前二個胺基酸。圖14係揭示SEQ ID NO：76。

【0028】 **圖15：圖15**係描繪人類IgG2重鏈恆定區之野生型序列(人類IGHG2重鏈恆定區；UniProt登錄號P01859)。CH1=胺基酸1-98；上絞鏈=胺基酸99-109；核心絞鏈= 106-109；下絞鏈= 110-117；CH2 = 116-219；CH3 = 220-326。所顯示的胺基酸編號為相對於該描繪的序列。如圖中所示，下絞鏈的最後二個胺基酸係相當於CH2區的前二個胺基酸。圖15係揭示SEQ ID NO：77。

【0029】 **圖16：圖16**係描繪人類IgG4重鏈恆定區之野生型序列(人類IGHG4重鏈恆定區；UniProt登錄號P01861)。CH1=胺基酸1-98；上絞鏈=胺基酸99-105；核心絞鏈= 106-109；下絞鏈= 110-118；CH2 = 117-220；CH3 = 221-227。所顯示的胺基酸編號為相對於該描繪的序列。如圖中所示，下絞鏈的最後二個胺基酸係相當於CH2區的前二個胺基酸。圖16係揭示SEQ ID NO：78。

【0030】 **圖17：圖17**係描繪標註的嵌合IgG重鏈恆定區結構的上絞鏈、核心絞鏈、下絞鏈、CH2和CH3之胺基酸序列排列。所顯示的胺基酸編號為EU編號。下絞鏈中加陰影的格子係表示亦相當於CH2區最前面的胺基酸。

【0031】 **圖18：圖18**係描繪穩定表現於中國倉鼠卵巢(CHO)細胞後，驗證所描繪的F1K_scFv6連接子長度變體之抗體效價的代表性數據，而該連接子長度變體包括

IgG4 S108P/IgG4 S108P Star (H315R、Y316F)或IgG1 PVA/IgG1 PVA Star (H315R、Y316F)之異二聚體。檢測了各種不同長度的Fab和scFv間的連接子。

【0032】 **圖19A-19G：圖19A-19G**係描繪酵素連接的免疫吸附分析(ELISA)數據，其係驗證所標註的對照組和抗體與hFCRγ1(圖19A)；hFCRγ2A(H131)(圖19B)；hFCRγ2A (R131)(圖19C)；hFCRγ2B (圖19D)；hFCRγ3A (V158)(圖19E)；hFCRγ3A (F158)(圖19F)；及hFCRγ3B (圖19G)之結合。對照組和試驗抗體之說明係提供於表7中。

【0033】 **圖20：圖20**係描繪來自替代抗體依賴的細胞媒介細胞毒性(ADCC)分析之代表性結果，其中係檢測帶有不同Fc區之該所指F1K_Fab6變體以及對照組。

【0034】 **圖21：圖21**係描繪來自替代物ADCC分析之代表性結果，其中係檢測帶有不同Fc區之該所指F1K_Fab6變體以及對照組。

【0035】 **圖22：圖22**係描繪來自螢光素酶報導子分析之代表性結果，其係驗證帶有不同Fc區之F1K_Fab6變體以及對照組造成HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB細胞活化。

【0036】 **圖23：圖23**係描繪來自螢光素酶報導子分析之代表性結果，其係驗證帶有不同Fc區和連接子長度之F1K_Fab6變體以及對照組造成HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB細胞活化。

【0037】 **圖24：圖24**係描繪來自磷酸化-ERK活化分析之代表性結果，其係驗證帶有IgG4 S108P 或IgG1 PVA Fc區或His.hFGF21之F1K_scFv6和Fab6結構造成原代人類脂肪細胞之活化。

【實施方式】

6.1 定義

【0038】 如文中所用，下列術語希望具有下列意義：

【0039】 **抗原結合位或ABS**：術語「抗原結合位」或「ABS」如文中所用係指能特異性、非共價和可逆性結合一標靶分子的MBM部分。本揭示文之MBM係包括一第一ABS (「ABS1」)，一第二ABS(「ABS2」)和一第三ABS(「ABS3」)。

【0040】 **連結**：術語「連結」在MBM的情況下係指二或更多條多肽鏈之間的功能關係。特言之，術語「連結」係指二或更多條多肽係彼此，例如經由分子相互作用非共價連結，或經由一或更多個雙硫鍵或化學交聯共價連結，用以產生其中ABS1、ABS2和ABS3可結合其個別標靶的功能性MBM。可存在本揭示文之MBM中的連接之實例包括(但不限於)Fc區中同二聚體或異二聚體Fc結構域之間的連結，Fab或scFvE中VH和VL區之間的連結，Fab中CH1和CL之間的連結，以及結構域經取代的Fab中CH3和CH3之間的連結。

【0041】 **互補決定區或CDR**：術語「互補決定區」或「CDR」如文中所用，係指在抗體可變區內賦予抗原特異性和結合親和力的胺基酸序列。一般而言，在各重鏈可變區中有三種CDR(CDR-H1、CDR-H2、HCDR-H3)及在各輕鏈可變區中有三種CDR(CDR1-L1、CDR-L2、CDR-L3)。可用於鑑別CDR界線的示例約定包括，例如Kabat定義，Chothia定義，ABS定義和IMGT定義。參見，例如Kabat, 1991, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (Kabat numbering scheme)；Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273：927-948 (Chothia numbering scheme)；Martin et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86：9268-9272 (ABS numbering scheme)；及Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27：55-77 (IMGT numbering scheme)。亦可取得公開資料庫供鑑別抗體內的CDR。

【0042】 **衍生自**：如文中所用，術語「衍生自」係指第一和第二分子之間的關係。其一般係指第一和第二分子之間的結構類似性且並非意味著或包括對於衍生自第二分子之第一分子的方法或來源限制。

【0043】 **EC50**：術語「EC50」係指在特定的暴露時間之後引發介於基線和最大之間一半反應的抗體或MBM之半數最大效應濃度。EC50基本上係代表其中觀察到50%的其最大效應之抗體或MBM的濃度。在特定的具體實例中，EC50值，例如藉由結合分析所測，係等於得到與表現標靶分子之細胞半數最大結合的抗體或MBM濃度，而該標靶分子可與抗體或MBM特異性結合。因此，隨著EC50或半數最大有效濃度值增加，觀察到降低或越弱的結合。在某些具體實例中，本揭示文MBM之EC50值的特徵為約10^{-5}M或更低(例如低於10^{-5}M，低於10^{-6}M，低於10^{-7}M，低於10^{-8}M，或低於10^{-9}M)之EC50值。

【0044】 **表位**：表位或抗原決定位為被如文中所述的抗體或其他抗原結合部分所辨識的抗原之一部分(例如，標靶分子)。表位可為線性或構型。

【0045】 **Fab**：術語「Fab」在本揭示文MBM之內容中係指一對多肽鏈，第一多肽鏈係包括抗體N-端之可變重鏈(VH)區與第一恆定區(在文中係稱為C1)連接，及第二多肽鏈係包括抗體N端的可變輕鏈(VL)區與能和第一恆定區配對的第二恆定區(在文中係稱為C2)連接。在原生的抗體中，VH為N-端連接重鏈的第一恆定區(CH1)，及VL為N-端連接輕鏈(CL)的恆定區。本揭示文之Fab可根據原生的方向排列或包括結構域取代或交換，促進正確的VH和VL配對，尤其是當本揭示文之MBM係包括不相同的Fab時。例如，可能以一對CH3-區置換Fab中的CH1和CL區對，用以促進異二聚體MBM中正確的修飾Fab-鏈配對。亦可能顛倒CH1和CL，使得CH1與VL連接，而CL係與VH連接，一種一般稱為Crossmab的組態。另一種選擇，或除此之外，使用取代或交換恆定區，藉由使用可與本揭示文之異二聚體MBM的二個可變區配對之通用輕鏈，可達到正確的鏈配對。

【0046】 **FGF受體1c和FGFR1c**：除非另有指出，否則術語「FGF受體1c」、「FGFR1c」及類似術語係指來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，例如靈長類(例如，人類、食蟹獼猴(cyno))、狗和嚙齒類(例如，小鼠和大鼠)之任何原生纖維母細

胞生長因子受體。此術語係涵蓋「全長」未經處理的FGFR1c以及任何由細胞中處理所產生的FGFR1c形式。此術語亦涵蓋天然生成的FGFR1c變體，例如剪接變體或等位基因變體。作為例示的人類FGFR1c之胺基酸序列為：

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDL
LQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYA
CVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVA
PYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDRI
GGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPH
RPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPD
NLPYVQILKTAGYNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHS
AWLTVLEALEERPAVIVITSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKS
GTKKSDFHSQMAVEIKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLS
SSGTPMLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGL
DKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKMIGKEIKNIINLLG
ACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKD
LVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIH
HIDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTIGGS
PYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQ
LVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPDTRSSTCSSGEDSVFSHE
PLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR (SEQ ID NO：1)

【0047】　**半抗體**：術語「半抗體」係指包括至少一ABS或ABS鏈(例如，Fab之一鏈)並可與包括一ABS或ABS鏈之另外的分子經由，例如雙硫橋或分子相互作用(例如，Fc異二聚體間的旋鈕入孔洞(knob-in-hole)相互作用)相連結之分子。半抗體可

由一條多肽鏈或一條以上的多肽鏈(例如，Fab的二條多肽鏈)所組成。在一較佳的具體實例中，半抗體係包括一Fc結構域。

【0048】 **宿主細胞**：術語「宿主細胞」如文中所用係指將本揭示文之核酸導入其中的細胞。術語「宿主細胞」和「重組的宿主細胞」在文中可交換使用。請了解，此等術語係指特定的主體細胞和此細胞的子代或潛在的子代。因為在繼代中由於突變或環境影響，可能發生特定的修飾，此等子代事實上可能與親代細胞不同，但仍包括在如文中所用之術語的範圍內。典型的宿主細胞為真核細胞，例如哺乳動物宿主細胞。作為例示的真核宿主細胞包括酵母菌和哺乳動物細胞，例如脊椎動物細胞，如小鼠、大鼠或人類細胞株，例如，HKB11細胞、PER.C6細胞、HEK細胞或CHO細胞。

【0049】 Beta (β) klotho、klotho β和KLB：除非另有指出，否則術語「beta (β) klotho」、「klotho β」、「KLB」和類似術語係指多肽或來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，例如靈長類(例如，人類、食蟹獼猴(cyno))、狗和嚙齒類(例如，小鼠和大鼠)之任何原生β klotho，且在特定的具體實例中，包括相關的β klotho多肽，包括其SNP變體。β klotho係包括二個結構域β klotho 1 (KLB1)和β klotho 2 (KLB2)。各β klotho結構域係包括一糖基水解酶區。例如，人類β klotho之KLB1結構域係包括胺基酸殘基1-508，其中第一糖基水解酶區(文中稱為GH1)係包括胺基酸殘基77-508，而人類β klotho之KLB2結構域係包括胺基酸殘509-1044，其中第二糖基水解酶區(文中稱為GH2)係包括胺基酸殘基517-967。術語「beta (β) klotho」、「klotho β」和「KLB」係涵蓋「全長」未經處理的KLB以及任何由細胞中處理所產生的KLB形式。此術語亦涵蓋天然生成的KLB變體，例如剪接變體或等位基因變體。作為例示的人類KLB之胺基酸序列為：

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKK

DGKGPSIWDEIFIHTEILKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQ

FSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPL
ALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIEINPYLVAWHG
YGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWEINYNTEIFRPHQKGWLS
ITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKK
LFSVLPIFSEAEKEIEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNL
REALNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQA
IRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSA
HYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFS
DPEILYVWNATGNRLLEIRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKV
THYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYP
THAEILGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINE
PNRLSDIYNRSGNDTYGAAEINLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSL
HADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIAS
KEIRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNEIFTTRFVMHEQLAGSR
YDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS
GIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKP
RFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLF
LVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGK RVVS
(SEQ ID NO：2)

【0050】 **代謝症狀**：術語「代謝症狀」如文中所用係指代謝病症以及其中代謝指標(例如，體重或身體質量指數、HDL膽固醇、LDL膽固醇、血液三酸甘油酯、血糖)在醫療人員一般所接受的正常或健康範圍之外的狀況。代謝病症的實例包括代謝症候群、肥胖症、脂肪肝、高胰島素血症、第2型糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎(「NASH」)、非酒精性脂肪肝疾病(「NAFLD」)、高膽固醇血症和高血糖。

【0051】 **多特異性結合分子或MBM**：術語「多特異性結合分子」或「MBM」如文中所用係指包括二個半抗體且其係與至少二個不同的表位(且在某些情況下為三個或更多個不同的表位)特異性結合以及包括一ABS1、ABS2和ABS3之分子(例如，多條多肽鏈之組合體)。

【0052】 **操作上連接**：術語「操作上連接」如文中所用係指多肽鏈之二或更多個區間的功能關係，其中該二或更多個區係相連接而得以產生一功能性多肽。

【0053】 **胜肽、多肽和蛋白**：術語「胜肽」、「多肽」和「蛋白」在文中可交換使用且係指包括由胜肽鍵共價連接之胺基酸殘基的分子或化合物。胜肽、多肽和蛋白必須含有至少二個胺基酸且分子或化合物中最大胺基酸數目並無設限。因此，這些術語係指，例如在本項技術中通常亦稱為胜肽、寡肽和寡聚物之短鏈，以及在本項技術中通常稱為蛋白或多肽，有許多類型之長鏈。

【0054】 **單鏈Fv或scFv**：術語「單鏈Fv」或「scFv」如文中所用係指包括抗體之VH和VL區的多肽鏈，其中這些區係以單一多肽鏈存在。

【0055】 **特異性(或選擇性)結合**：術語「特異性(或選擇性)結合」如文中所用係指MBM或其抗原結合位(「ABS」)與標靶分子(例如，KLB或FGFR1c)形成一複合物，其在生理狀況下為相當穩定的。特異性結合其特徵可為約$5x10^{-2}$M或更低(例如，低於$5x10^{-2}$M，低於10^{-2}M，低於$5x10^{-3}$M，低於10^{-3}M，低於$5x10^{-4}$M，低於10^{-4}M，低於$5x10^{-5}$M，低於10^{-5}M，低於$5x10^{-6}$M，低於10^{-6}M，低於$5x10^{-7}$M，低於10^{-7}M，低於$5x10^{-8}$M，低於10^{-8}M，低於$5x10^{-9}$M，低於10^{-9}M或低於10^{-10}M)之KD。測定抗體或抗體片段，例如MBM或ABS與標靶分子之結合親和力的方法已為本項技術所熟知並包括，例如平衡透析、表面電漿共振(例如Biacore分析)、螢光活化細胞分類(FACS)結合分析及類似方法。然而，與來自一物種之標靶分子特異性結合的MBM或其ABS抗體對於來自一或多種其他物種的標靶分子可能具有與交叉反應性。

【0056】 **對象**：術語「對象」係包括人類和非人類動物。非人動物包括所有的脊椎動物，例如哺乳動物和非哺乳動物，例如非人類靈長類、綿羊、牛、雞、兩棲類和爬蟲類。除非有標註，否則術語「病患」或「對象」在文中可交換使用。

【0057】 **四價**：術語「四價」如文中所用係指具有四個抗原結合位，例如ABS1、ABS2和ABS3及第四個抗原結合位(ABS4)之MBM。一般而言，四個抗原結合位可與相同的表位或不同的表位結合，但在本揭示文之MBM的較佳具體實例中，ABS1、ABS2和ABS3為FGR1c、GH1和GH2結合位，且ABS4可為FGR1c、GH1、GH2或其他結合位。在某些具體實例中，四價MBM為三特異性且僅與FGFR1c、GH1和GH2結合。

【0058】 **治療**：如文中所用，術語「治療」係指因投予一或多種本揭示文之MBM所產生之降低或改善代謝症狀的進程、嚴重性及/或持續時間，或改善代謝症狀之一或多個症候(較佳地，一或多個可辨別的症候)。在特定的具體實例中，術語「治療」係指改善至少一個可測量的代謝症狀之身體參數，並不一定可由病人辨別，例如體重下降，循環的HGL膽固醇下降，循環的LDL膽固醇增加，血液三酸甘油酯下降及血糖下降係視為代謝改善。在其他的具體實例中，術語「治療」係指在身體上，藉由，例如穩定可辨別的症候，在生理上，藉由穩定生理參數，或二者，抑制代謝症狀的進程。在其他的具體實例中，術語「治療」係指穩定代謝症狀。本揭示文之MBM和醫藥組成物可以有效在一對象中治療代謝症狀及/或改善代謝作用之量投予該對象。

【0059】 **三特異性結合分子**：術語「三特異性結合分子」或「TBM」如文中所用係指與三個表位特異性結合並包括三或更多個抗原結合位之分子。本揭示文之TBM係與FGFR1c、GH1和GH2結合。抗原結合位可各自獨立地為抗原片段(例如，scFv、Fab、奈米抗體)或非抗體衍生的結合劑(例如，纖連蛋白(fibronectin)、Fynomer、DARPin)。

【0060】 **三價**：術語「三價」如文中所用指具有三個抗原結合位，例如ABS1、ABS2和ABS3之MBM。一般而言，三個抗原結合位可與相同的表位或不同的表位結合，但在本揭示文之MBM的較佳具體實例中，三個抗原結合位係包括GH1抗原結合位、GH2抗原結合位和FGR1c抗原結合位。

【0061】 **通用輕鏈**：術語「通用輕鏈」如文中所用，在MBM之內容中係指能與Fab1的重鏈區配對形成Fab1及能與Fab2的重鏈區配對形成Fab2之輕鏈多肽。通用輕鏈亦稱為「普通輕鏈」。

【0062】 **VH**：術語「VH」係指抗體的免疫球蛋白重鏈之可變區，包括scFv或Fab之重鏈。

【0063】 **VL**：術語「VL」係指免疫球蛋白輕鏈之可變區，包括scFv或Fab之輕鏈。

【0064】 **Fc結構域和Fc區**：術語「Fc結構域」係指與另一重鏈之對應部分配對的重鏈部分。術語「Fc區」係指以抗體為基礎的結合分子之區域，其係藉由連結二個重鏈Fc結構域所形成。在Fc區內的二個Fc結構域彼此可為相同或不同。在一原生抗體中，Fc結構域典型地為相同的，但就製造本揭示文MBM之目的而言，一或二個Fc結構域有利地可經修飾以便得以異二聚化。

6.2 多特異性結合分子(MBM)

6.2.1. KLB 和 FGFR1c ABS

【0065】 本揭示文之MBM係含有一與FGFR1c結合之ABS1，與KLB的GH2結構域結合之ABS2，及與KLB的GH2結構域結合之ABS3。不受限於理論，咸信MBM與這三個結合結構域之結合係促效此受體複合物並造成如圖1中所示之利益。ABS1、ABS2和ABS3可衍生自一或多種適合的抗FGFR1c、抗-GH1結構域和抗-GH2結構域或非免疫球蛋白為基準的抗原結合位。來自一或多種ABS1、ABS2和ABS3之抗體有時候在文中係稱為「親代」抗體。

【0066】 KLB和FGFR1c親代抗體可為單株抗體(例如，鼠類或兔單株抗體)、嵌合抗體、人源化抗體、人類抗體、靈長類化抗體、雙特異性抗體、單鏈抗體等。在各種具體實例中，本揭示文之MBM係包括所有或一部分衍生的親代恆定區。在某些具體實例中，恆定區為選自下列之同型：IgA (例如，IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG (例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)和IgM。

【0067】 術語「單株抗體」如文中所用不限於經由融合瘤技術所產製造的抗體。單株抗體係藉由任何本項技術可取得或已知的方法衍生自單一選植株，包括任何真核細胞、原核細胞或噬菌體選植株。

【0068】 可用作為KLB和FGFR1c ABS來源之單株抗體可使用廣泛的各種本項技術中已知的技術來製備，包括融合瘤、重組和噬菌體展現技術或其組合。

【0069】 術語「嵌合」抗體如文中所用係指具有衍生自非人類免疫球蛋白之可變序列，例如兔、大鼠或小鼠抗體，以及人類免疫球蛋白恆定區，典型地選自人類免疫球蛋白模板的的抗體。用於製造嵌合抗體的方法已為本項技術所知。參見，例如，Morrison, 1985, Science 229(4719)：1202-7；Oi et al., 1986, BioTechniques 4：214-221；Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125：191-202；美國專利編號5,807,715；4,816,567；和4,816397，其係以全文引用的方式併入本文中。

【0070】 非人類 (例如，鼠類)抗體之「人源化」形式為含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合免疫球蛋白。一般而言，人源化抗體將包括實質上所有的至少一個，及典型地二個可變區，其中所有或實質上所有的CDR區係相當於該等非人類免疫球蛋白之CDR區且所有或實質上所有的FR區為該等人類免疫球蛋白序列的FR區。人源化抗體亦可包括至少一部份的免疫球蛋白恆定區(Fc)，典型地人類免疫球蛋白共通序列。抗體人源化的方法已為本項技術所知。參見，例如，Riechmann et al., 1988, Nature 332：323-7；Queen 等人之美國專利編號5,530,101；5,585,089；5,693,761；5,693,762；和6,180,370；EP239400；PCT公開案WO 91/09967；美國專

利編號5,225,539；EP592106；EP519596；Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28：489-498；Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7：805-814；Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91：969-973；及美國專利編號5,565,332，其全部係以全文引用的方式併入本文中。

【0071】 「人類抗體」係包括具有人類免疫球蛋白之胺基酸序列的抗體及包括分離自人類免疫球蛋白庫或來自就一或多個人類免疫球蛋白基因轉殖的動物且不會表現內生性免疫球蛋白的抗體。人類抗體可藉由各種本項技術已知的方法來製造，包括使用衍生自人類免疫球蛋白序列之抗體庫的噬菌體展示法。參見，美國專利編號4,444,887和4,716,111；及PCT公開案WO 98/46645；WO 98/50433；WO 98/24893；WO 98/16654；WO 96/34096；WO 96/33735；和WO 91/10741，其各自係以全文引用的方式併入本文中。人類抗體亦可使用無法表現功能性內生性免疫球蛋白但可表現人類免疫球蛋白基因之基因轉殖小鼠來製造。參見，例如，PCT公開案WO 98/24893；WO 92/01047；WO 96/34096；WO 96/33735；美國專利編號5,413,923；5,625,126；5,633,425；5,569,825;5,661,016；5,545,806；5,814,318；5,885,793；5,916,771；和5,939,598，其係以全文引用的方式併入本文中。使用稱為「引導選擇」之技術可產生辨識一所選表位之全人類抗體。在此方法中，所選的非人類單株抗體，例如小鼠抗體，係用於引導選擇一辨識相同表位之全人類抗體(參見，Jespers et al., 1988, Biotechnology 12：899-903)。

【0072】 「靈長類化抗體」係包括猴可變區和人類恆定區。用於製造靈長類化抗體之方法已為本項技術所知。參見，例如，美國專利編號5,658,570；5,681,722；和5,693,780，其係以全文引用的方式併入本文中。

【0073】 在某些具體實例中，用於本揭示文之MBM的親代抗體係使用VELOCIMMUNE®技術所產生(參見，例如，US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®)。起初可分離出具有人類可變區和小鼠恆定區，對FGFR1c、GH2結構域、GH2結構域或其任何組合具高親和力的嵌合親代抗

體。VELOCIMMUNE®技術係涉及產生一基因轉殖小鼠，該小鼠係具有包括人類重鏈和輕鏈可變區操作上連接內生性小鼠恆定區基因座之基因體，使得該小鼠回應抗原刺激，產生包括人類可變區和小鼠恆定區之抗體。將編碼該抗體之重鏈和輕鏈可變區的DNA分離出並操作上連接編碼人類重鏈和輕鏈恆定區的DNA。然後將該DNA置於能表現全人類抗體的細胞中表現。

【0074】　一般而言，係將VELOCIMMUNE®小鼠施以感興趣抗原，並從表現抗體的小鼠回收淋巴細胞(例如B細胞)。淋巴細胞可與骨髓瘤細胞株融合，用以製備永生化融合瘤細胞株，並篩選和選擇此等融合瘤細胞株，用以鑑定製造對感興趣抗原具特異性的抗體之融合瘤細胞株。可將編碼重鏈和輕鏈可變區的DNA分離出並連接所欲的同型重鏈和輕鏈之恆定區。可於一細胞，例如CHO細胞中製造此一抗體蛋白。另一種選擇，可直接從抗原特異性淋巴細胞分離出編碼此抗原特異性的嵌合抗體或輕鏈和重鏈之可變區的DNA。

【0075】　亦可從小鼠B細胞分離感興趣抗體。簡言之，從各小鼠收取脾細胞並藉由FACS，使用感興趣抗原作為結合和辨識反應性抗體之分選試劑(抗原-陽性B細胞)，分選出B細胞(例如，如US 2007/0280945A1中所述)。各種鑑別和分選抗原陽性B細胞，以及藉由PCR建構免疫球蛋白基因表現匣用於製備表現重組抗體之細胞的方法已為本項技術所熟知。參見，例如WO20141460741，美國專利編號7884054B2，及Liao, et al., 2009, J Virol Methods 158(1-2)：171-9。

【0076】　起初，將具有人類可變區和小鼠恆定區的高親和力嵌合抗體分離。將抗體定性並就所欲的特性，包括親和力、選擇性、表位等作選擇。以所欲的人類恆定區的置換小鼠恆定區，產生本發明之全人類抗體，例如野生型或修飾的IgG1或IgG4。當根據特定用途所選的恆定區可能各不相同的同時，高親和力抗原結合和標靶特異性特徵仍留在可變區內。

【0077】 揭示用於本揭示文之MBM抗-FGFR1c及/或抗-KLB親代抗體的刊物文獻之實例係包括，但不限於美國專利公開案號US 2015/0218276和US 2011/0135657；美國專利編號9,738,716、9,085,626、8,263,074；Min et al., 2018, J. Biol. Chem. 293：14678；及Foltz et al., 2012, Sci. Transl. Med. 4：162ra153。

【0078】 在某些具體實例中，可併入本揭示文之MBM中的FGFR1c結合劑和FGFR1c結合劑序列係分別載錄於表1A和1B中。某些FGFR1c的同功型由於選擇性剪接而缺乏FGFR1c的D1環。因此，較佳的ABS1係與FGFR1c的D2環或D3環結合。

表 1A
FGFR1c 結合劑

名稱	表位	參考文獻	專利文獻中的序列
YW182.5_YGDY (Genentech)	D2 環	US 2015/0218276	重鏈：Seq ID No. 133； 輕鏈：Seq ID No. 135
R1Mab1 (Genentech)	D2 環	US 9,085,626	重鏈：Seq ID No. 2； 輕鏈：Seq ID No. 6
R1Mab2 (Genentech)	D2 環	US 9,085,626	重鏈：Seq ID No. 3； 輕鏈：Seq ID No. 6
R1Mab3 (Genentech)	D2 環	US 9,085,626	重鏈：Seq ID No. 4； 輕鏈：Seq ID No. 6
FR1-H7 (ImClone/Eli Lilly)	D2 環	US 8,263,074	重鏈：圖 1A； 輕鏈：圖 1B
FR1-A1 (ImClone/Eli Lilly)	D3 環	US 8,263,074	重鏈：圖 2A； 輕鏈：圖 2B

表 1B
FGFR1c 結合劑- VH 和 VL 序列

結合劑	鏈	序列	SEQ ID NO：
FR1-H7 (ImClone/Eli Lilly)	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFTDYYMHWV QQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTST DTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDYMDVWGKGTLVTV SS	3
	VL	ETTLTQSPDTLSLSPGEGATLSCRASQSVSGSALAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGVPDRFSGSGSGADFSLTISRLEP EDFAVYSCQQYGSSPLTFGPGTKVDVK	4
FR1-A1 (ImClone/Eli Lilly)	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGQTFTGYYMHWV RQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGGDIGGMDVWGQG	5

表 1B FGFR1c 結合劑- VH 和 VL 序列			
結合劑	鏈	序列	SEQ ID NO：
	VL	EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLRHSNGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQALQIPPTFGPGTKVDK	6
R1Mab1 (Genentech)	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTWISWVPG KGLEWVGEIDPYDGDTYYADSVKGRFTISADTSKNLQM NSLRAEDTAVYYCASSGYGGSDYAMDYWGQ	7
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKWEIK	8
R1Mab2 (Genentech)	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNYIHWVPG KGLEWVADIYPNDGDTDYADSVKGRFTISADTSKNLQM NSLRAEDTAVYYCAREHFDAWVHYYVMDYWGQ	9
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKWEIK	8
R1Mab3 (Genentech)	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNWISWVPG KGLEWVAEIDPYDGATDYADSVKGRFTISADTSKNLQM NSLRAEDTAVYYCATGTDWMDYWGQ	10
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKWEIK	8

【0079】 在另外的具體實例中，可併入本揭示文之MBM的GH1結構域結合劑和GH1結構域結合劑序列係分別載錄於表2A和2B中。

表 2A GH1 結構域結合劑		
名稱	參考文獻	專利文獻中的序列
39F7 (Amgen)	US 8,263,074；Min *et al.*, 2018, J. Biol. Chem. 293：14678	重鏈：Seq ID No. 82； 輕鏈：Seq ID No. 27

表 2B GH1 結構域結合劑- VH 和 VL 序列		
結合劑	鏈	序列
39F7 (Amgen)	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRAAAGLHYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO：11)
	VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSGSSPLTFGGGT EVEIK (SEQ ID NO：12)

【0080】　在另外的具體實例中，可併入本揭示文之MBM中的GH2結構域結合劑和GH2結構域結合劑序列係分別載錄於表3A和3B中。

表 3A
GH2 結構域結合劑

名稱	參考文獻	專利文獻中的序列
8C5.K4H3.M4L.KNV (Genentech)	US 2015/0218276	重鏈：Seq ID No. 129； 輕鏈：Seq ID No. 131
5H23_人源化(NGM)	US 9,738,716	重鏈：Seq ID No. 317； 輕鏈：Seq ID No. 319

表 3B
GH2 結構域結合劑-VH 和 VL 序列

結合劑	鏈	序列
5H23 (NGM)	VH (vH3)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWI GWIYPGDGSTKYNEKFKGKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCA RSDYYGSRSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：13)
	VL (vL2)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYVYMHWYQQKPGQPP KLLIYLASYLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQHSRDL TFPFGGGTKLEIK (SEQ ID NO：14)

【0081】　另外的KLB結合劑已為本項技術所知(例如，mimAb1 (Amgen)；參見，例如，US 2011/0135657和Foltz et al., 2012, Sci. Transl. Med. 4：162ra153)。KLB結合劑之結合特性，例如其是否與GH1結構域或GH2結構域中的表位結合可由熟習技術者使用本項技術中已知的方法容易地確認。鑑別KLB-結合抗體在KLB上的結合位可經由已知的技術來進行，包括，例如，陣列為基礎的寡肽掃描、交聯結合質譜、高通量散彈槍致突變表位定位、氫-氘交換、定點突變定位、X-光共-結晶學和低溫電子顯微術。另一種選擇，可藉由，例如免疫分析，例如酵素連接的免疫吸附分析(ELISA)、Luminix微珠-為基礎的分析、meso scale discovery (MSD)、AlphaLISA和流式細胞術來偵測KLB結合劑與GH1結構域或GH2結構域之結合。

【0082】　較佳地，本揭示文之MBM與GH1和GH2結構域之結合為非競爭性和非阻斷性，亦即與GH1結構域結合的ABS和與GH2結構域結合的ABS不會競爭和KLB

結合。用於測量抗體和抗體片段間的結合競爭之分析已為本項技術所知並包括，例如酵素連接的免疫吸附分析(ELISA)、螢光活化的細胞分選(FACS)分析和表面電漿共振分析。

【0083】　與標靶分子結合之競爭可，例如使用即時、無標定生物膜干涉分析於Octet HTX生物感測器平台(Pall ForteBio Corp.)上測定。在此分析之一特定的具體實例中，整個分析係於25°C，在10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、1 mg/mL BSA、0.05% v/v界面活性劑Tween-20, pH 7.4之緩衝液(HBS-EBT緩衝液)中，以速度1000 rpm震盪的盤中進行。就評估二種抗體或其抗原結合片段是否能相互競爭與其特定標靶抗原上的個別表位結合，係藉由將生物感測器浸入含有經五-His標定的(SEQ ID NO：41)標靶抗原之孔槽中，先將經五-His標定的(SEQ ID NO：41)標靶抗原捕捉至塗覆抗-五-His(SEQ ID NO：41)抗體的Octet生物感測器尖端(Fortebio Inc, # 18-5122)。然後將捕捉抗原的生物感測器尖端以第一抗體或其抗原結合片段(後續稱為Ab-1)，藉由浸入含有Ab-1溶液(例如，50 μg/mL溶液)的孔槽使其飽和。隨後將生物感測器尖端浸入含有第二抗體或其抗原結合片段(後續稱為Ab-2)溶液(例如，50 μg/mL溶液)的孔槽。在分析的每個步驟之間以HBS-EBT緩衝液沖洗生物感測器尖端。在整個分析期間可監測即時結合反應並可在每個步驟結束時記錄結合反應。可比較Ab-2與預先複合Ab-1之標靶抗原相結合的反應並可測定不同抗體/抗原結合片段對於相同標靶抗原之競爭/非競爭行為。

【0084】　本揭示文之MBM因此可包括，例如任何前述抗-FGFR1c或抗-KLB抗體，例如任何分別於表1A和1B (就FGFR1c/ABS1而言)，表2A和2B (就KLB GH1結構域/ABS2而言)，表3A和3B (就KLB GH2結構域/ABS3而言)中所提供的抗-FGFR1c、抗-GH1結構域或抗-GH2結構域抗體之CDR或VH及/或VL序列。

【0085】　本揭示文之MBM的抗原結合位可從免疫球蛋白為基礎和非免疫球蛋白為基礎的結合結構域來選擇。

【0086】 在某些具體實例中，一或多個ABS係衍生自免疫球蛋白，例如包括或由Fab(如0章節中所述)，scFv(如0章節中所述)或另外的免疫球蛋白為基礎的形式，例如Fv、dsFv、(Fab')2、單域抗體(SDAB)、VH或VL結構域，或駱駝VHH結構域(亦稱為奈米抗體)所組成。

【0087】 ABS可衍生自由單一VH或VL結構域所組成、對抗原具有足夠親和力的單域抗體。在一特定的具體實例中，該單域抗體為駱駝VHH結構域(參見，例如，Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231：25-38；WO 94/04678)。

【0088】 在特定的具體實例中，一或多個ABS係衍生自非抗體支架蛋白(包括，但不限於，設計錨蛋白重複蛋白(DARPin)、Avimer(親和多聚體之簡稱)、Anticalin/Lipocalin、Centyrin、Kunitz結構域、Adnexin、Affilins、Affitin(亦稱為Nonfitin)、Knottins、Pronectin、Versabody、Duocalin和Fynomer)、配體、受體、細胞激素或趨化素。

【0089】 可用於本揭示文之MBM的非免疫球蛋白支架包括該等列於Mintz和Crea, 2013, Bioprocess International 11(2)：40-48之表3和4；Vazquez-Lombardi et al., 2015, Drug Discovery Today 20(10)：1271-83之圖1、表1和圖I；Skrlec et al., 2015, Trends in Biotechnology 33(7)：408-18之表1和表格2。Mintz和Crea, 2013, Bioprocess International 11(2)：40-48之表3和4；Vazquez-Lombardi et al., 2015, Drug Discovery Today 20(10)：1271-83之圖1、表1和圖I；Skrlec et al., 2015, Trends in Biotechnology 33(7)：408-18之表1和表格2的內容(統稱為「支架揭示文」)。在一特定的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Adnexin之揭示以引用的方式併入。在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Avimer之揭示以引用的方式併入。在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Affibody之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Anticalin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關DARPin之揭示以引用的方式併入。又在

另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Kunitz結構域之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Knottin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Pronectin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Nanofitin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Affilin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Adnectin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關ABD之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Adhiron之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Affimer之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Alphabody之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Armadillo重複蛋白之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Atrimer/Tetranectin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Obody/OB-fold之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Centyrin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Repebody之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Anticalin之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Atrimer之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關雙環胜肽之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關cys-knot之揭示以引用的方式併入。又在另外的具體實例中，該支架揭示文係就其有關Fn3支架(包括Adnectin、Centryrin、Pronectin和Tn3)之揭示以引用的方式併入。

6.2.2. MBM形式

【0090】　在各種不同方面，本揭示文之MBM係包括二個半抗體，其中一個半抗體係包括二個ABS而另一個係包括一ABS，二個半抗體係經由一Fc區配對。

【0091】　在一方面，第一半抗體係包括一個scFv和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括一個Fab、一個scFv和一個Fc結構域。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。在各種具體實例中，第二半抗體中的scFv結構域可以N-端連接Fab結構域或以C-端連接Fc結構域。

【0092】　在另外方面，第一半抗體係包括二個Fab結構域和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括一個Fab結構域和一個Fc結構域。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。在各種具體實例中，第一半抗體中的第二Fab結構域可以N-端連接第一Fab結構域(一種稱為2+1 N-Fab的組態)或以C-端連接Fc結構域(一種稱為2+1 C-Fab的組態)。

【0093】　在另外方面，第一半抗體係包括一個Fab、一個scFv和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括一個Fab結構域和一個Fc結構域。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。在各種具體實例中，第一半抗體中的scFV結構域可以N-端連接Fab結構域(一種稱為2+1 N-scFv的組態)或以C-端連接Fc結構域(一種稱為2+1 C-scFv的組態)。

【0094】　在另外方面，第一半抗體係包括一個scFv和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括二個Fab結構域和一個Fc結構域。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。在各種具體實例中，第二半抗體中的第二Fab結構域可以N-端連接第一Fab結構域或以C-端連接Fc結構域。

【0095】　在另外方面，第一半抗體係包括二個Fab結構域和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括一個非免疫球蛋白為基礎的ABS和一個Fc結構域。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。在各種具體實例中，第一半抗體中的第二Fab結構域可以N-端連接第一Fab結構域或以C-端連接Fc結構域。

【0096】　在另外方面，第一半抗體係包括一個Fab，一個scFv和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括一個非免疫球蛋白為基礎的ABS和一個Fc結構域。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。第一半抗體中的scFV結構域可以N-端連接Fab結構域或以C-端連接Fc結構域。

【0097】　在另一方面，第一半抗體係包括一個scFv和一個Fc結構域，而第二半抗體係包括一個scFv、一個Fc結構域和一個第二scFv。第一和第二半抗體係經由Fc結構域形成一Fc區相連結。在各種具體實例中，第二半抗體中的第二scFV結構域可以N-端連接第一scFV結構域或以C-端連接Fc結構域。

【0098】　另一種選擇，MBM可為單鏈。例如，MBM可包括三個經由連接子相連接的scFV結構域。

【0099】　在某些具體實例中，該MBM揭示物為或包括以2+1 N-scFv模式配置的抗原結合部分。因此，該揭示物係提供包括下列之MBM：

(a) 一第一多肽鏈，其由N-端至C-端方向，係包括(i)一scFv，其操作上連接(ii)一第一Fab之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一Fc區；

(b) 一第二多肽鏈，其由N-端至C-端方向，係包括(i)一第二Fab之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一Fc區；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一Fab的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二Fab的第二輕鏈。

【0100】　scFv可為VH-VL方向或VL-VH方向。

【0101】　在某些具體實例中，ABS1為第一Fab，ABS2為scFv，且ABS3為第二Fab。

【0102】　在其他的具體實例中，ABS1為第一Fab，ABS3為scFv，且ABS2為第二Fab。

【0103】　在某些具體實例中，ABS2為第一Fab, ABS1為scFv，而ABS3為第二Fab。

【0104】 在其他的具體實例中，ABS2為第一Fab，ABS3為scFv，而ABS1為第二Fab。

【0105】 在某些具體實例中，ABS3為第一Fab，ABS2為scFv，而ABS1為第二Fab。

【0106】 在其他的具體實例中，ABS3為第一Fab，ABS1為scFv，而ABS2為第二Fab。

【0107】 scFv可經由一連接子，例如，(a)長度至少5個胺基酸，至少6個胺基酸，至少7個胺基酸；及視需要(b)長度至高30個胺基酸，至高40個胺基酸，至高50個胺基酸，至高60個胺基酸的胜肽連接子與第一重鏈相連接。在各種具體實例中，該連接子為長度5個胺基酸至50個胺基酸，長度5個胺基酸至45個胺基酸，長度5個胺基酸至40個胺基酸，長度5個胺基酸至35個胺基酸，長度5個胺基酸至30個胺基酸，長度5個胺基酸至25個胺基酸，長度5個胺基酸至20個胺基酸；長度6個胺基酸至50個胺基酸；長度6個胺基酸至45個胺基酸；長度6個胺基酸至40個胺基酸；長度6個胺基酸至35個胺基酸；長度6個胺基酸至30個胺基酸；長度6個胺基酸至25個胺基酸；長度6個胺基酸至20個胺基酸；長度7個胺基酸至40個胺基酸；長度7個胺基酸至35個胺基酸；長度7個胺基酸至30個胺基酸；長度7個胺基酸至25個胺基酸；長度7個胺基酸至20個胺基酸。

【0108】 胜肽連接子可包括GnS (SEQ ID NO：15)或SGn (SEQ ID NO：16)之多聚體，例如其中n為1至7之整數(例如，G4S之多聚體(SEQ ID NO：17))，及/或甘胺酸之多聚體(例如，二個連續的甘胺酸(2Gly)，三個連續的甘胺酸(3Gly，四個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，五個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，六個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，七個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，八個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或九個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23)))。

【0109】 在某些具體實例中，該MBM揭示物為或包括以2+1 N-Fab模式配置的抗原結合部分。因此，該揭示物進一步係提供包括下列之MBM：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(ii)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 區；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第三 Fab 之第三重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 區；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第三重鏈區配對形成第三 Fab 的第三輕鏈。

【0110】 在某些具體實例中，ABS1為第二Fab，ABS2為第一Fab，而ABS3為第三Fab。

【0111】 在其他的具體實例中，ABS1為第二Fab，ABS3為第一Fab，而ABS2為第三Fab。

【0112】 在某些具體實例中，ABS2為第二Fab，ABS1為第一Fab，而ABS3為第三Fab。

【0113】 在其他的具體實例中，ABS2為第二Fab，ABS3為第一Fab，而ABS1為第三Fab。

【0114】 在某些具體實例中，ABS3為第二Fab，ABS2為第一Fab，而ABS1為第三Fab。

【0115】 第一和第二Fab，例如，第一Fab的第一重鏈區和第二Fab的第二重鏈區，經由一連接子連接，例如(a)長度至少5個胺基酸，至少6個胺基酸或長度至少7個胺基酸；及視需要(b)長度至高30個胺基酸，至高40個胺基酸，至高50個胺基酸，至高60個胺基酸的胜肽連接子。在各種具體實例中，該連接子為長度5個胺基酸至50個胺基酸，長度5個胺基酸至45個胺基酸，長度5個胺基酸至40個胺基酸，長度5

個胺基酸至35個胺基酸，長度5個胺基酸至30個胺基酸，長度5個胺基酸至25個胺基酸，長度5個胺基酸至20個胺基酸；長度6個胺基酸至50個胺基酸；長度6個胺基酸至45個胺基酸；長度6個胺基酸至40個胺基酸；長度6個胺基酸至35個胺基酸；長度6個胺基酸至30個胺基酸；長度6個胺基酸至25個胺基酸；長度6個胺基酸至20個胺基酸；長度7個胺基酸至40個胺基酸；長度7個胺基酸至35個胺基酸；長度7個胺基酸至30個胺基酸；長度7個胺基酸至25個胺基酸；長度7個胺基酸至20個胺基酸。胜肽連接子可包括GnS之多聚體(SEQ ID NO：15)或SGn之多聚體(SEQ ID NO：16)，例如其中n為1至7之整數(例如，G4S之多聚體(SEQ ID NO：17))，及/或甘胺酸之多聚體(例如，二個連續的甘胺酸(2Gly)，三個連續的甘胺酸(3Gly)，四個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，五個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，六個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，七個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，八個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或九個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23)))。

【0116】　在前述的具體實例中，Fab可為任何如章節6.2.4中所述的Fab而scFv可為任何如章節6.2.3中所述的scFv。

【0117】　較佳地，本揭示文之MBM係包括Fc異二聚體，例如，如章節6.2.7.2中所述，且亦可包括一或多個降低效應子功能之突變，例如，如章節6.2.7.1中所述。

【0118】　Fc異二聚體之實例係包括帶有星狀突變及/或帶有旋鈕入孔洞(knob-in-hole)突變之Fc區。例如，在某些具體實例中，Fc結構域係包括旋鈕(knob)突變而第二Fc結構域係包括孔洞(hole)突變和星狀突變。在2+1 N-scFv及/或2+1 C-scFv模式中，帶有孔洞和星狀突變的Fc結構域可在含有scFv鏈或含有非scFv鏈上。在其他的具體實例中，一Fc結構域係包括旋鈕突變和星狀突變而第二Fc結構域係包括孔洞突變。在2+1 N-scFv及/或2+1 C-scFv模式中，帶有孔洞突變的Fc結構域可在含有scFv鏈或含有非scFv鏈上。同樣地，在2+1 N-Fab及/或2+1 C-Fab模式中，

帶有孔洞突變和星狀突變的Fc結構域可在包括二個Fab結構域的半抗體上或在包括單一Fab結構域的半抗體上。在其他的具體實例中，一Fc結構域係包括旋鈕突變和星狀突變而第二Fc結構域係包括孔洞突變。在2+1 N-Fab及/或2+1 C-Fab模式中，帶有孔洞突變的Fc結構域可在包括二個Fab結構域的半抗體上或在包括單一Fab結構域的半抗體上。

【0119】　在某些具體實例中，本揭示文之MBM具有一對如章節6.3中所述及/或如特定具體實例126至165中所定義的恆定區。

6.2.3 scFv

【0120】　單鏈Fv或「scFv」抗體片段係包括單一多肽鏈抗體的VH和VL結構域，能以單鏈多肽表現且保留衍生該等單鏈Fv或「scFv」抗體片段之完整抗體的特異性。一般而言，此scFv多肽進一步係包括一介於VH和VL結構域之間的多肽連接子，其能使scFv形成用於標靶結合之所欲結構。適合連接scFV之VH和VL鏈的連接子之實例為章節6.2.5中所確立的連接子。

【0121】　除非有指出，否則如文中所用，scFv可具有任一順序的VL和VH可變區，例如就多肽的N-端和C-端而言，scFv可包括VL-連接子-VH或可包括VH-連接子-VL。

【0122】　此scFv可包括來自任何適合物種的VH和VL序列，例如鼠類、人類或人源化VH和VL序列。

【0123】　就製造一scFv-編碼核酸，VH和VL-編碼DNA片段係操作上連接另一編碼連接子之片段，例如編碼任何如章節05中所述的連接子(典型地含有胺基酸甘胺酸和絲胺酸之重複序列，例如胺基酸序列$(Gly4\sim Ser)_3$(SEQ ID NO：24)，使得VH和VL序列可以連續的單鏈蛋白表現，其中VL和VH區係藉由彈性連接子連結(參見，例如，Bird et al., 1988, Science 242：423-426；Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：5879-5883；McCafferty et al., 1990, Nature 348：552-554)。

6.2.4 Fab

【0124】 本揭示文之MBM可包括一或多個Fab結構域，且典型地係在各半抗體中包括至少一個Fab結構域。Fab結構域傳統上係使用酵素，例如木瓜酵素，藉由免疫球蛋白分子的蛋白裂解來製造。在本揭示文之MBM中，此Fab結構域係經重組表現作為大分子的部分。

【0125】 Fab結構域可包括來自任何適合物種的恆定區和可變區序列，且因此可為鼠類、嵌合、人類或人源化。

【0126】 Fab結構域典型地係包括連附VH結構域之CH1結構域，而該結構域係與連附VL結構域的CL結構域配對。在一野生型的免疫球蛋白中，VH結構域係與VL結構域配對用以建構Fv區，而CH1結構域係與CL結構域配對進一步安定該結合模組。二個恆定區域之間的雙硫鍵可進一步安定該Fab結構域。

【0127】 就本揭示文之MBM，尤其是當輕鏈並非普通或通用輕鏈時，有利的係使用Fab異二聚化策略以允許屬於相同ABS之Fab結構域正確結合並讓屬於不同ABS的Fab就本揭示文之ABM，尤其是當輕鏈並非普通或通用輕鏈時，有利的係使用Fab異二聚化策略以允許屬於相同ABS之Fab區正確結合並讓屬於不同ABS的Fab結構域之異常配對最小化。例如，可使用下表4中所示的Fab異二聚化策略：

表 4
Fab 異二聚化策略

策略	VH	CH1	VL	CL	參考文獻
CrossMabCH1-CL	WT	CL 結構域	WT	CH1 結構域	Schaefer *et al.*, 2011, Cancer Cell 2011；20：472-86；PMID：22014573.
正交 Fab VHVRD1CH1CRD2 - VLVRD1CλCRD2	39K, 62E	H172A, F174G	1R, 38D, (36F)	L135Y, S176W	Lewis *et al.*, 2014, Nat Biotechnol 32：191-8
正交 Fab VHVRD2CH1wt - VLVRD2Cλwt	39Y	WT	38R	WT	Lewis *et al.*, 2014, Nat Biotechnol 32：191-8
TCR CαCβ	39K	TCR Cα	38D	TCR Cβ	Wu *et al.*, 2015,

表 4 Fab 異二聚化策略					
策略	**VH**	**CH1**	**VL**	**CL**	**參考文獻**
					MAbs 7：364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K, S114A	Golay *at al.*, 2016, J Immunol 196：3199-211.
MUT4	WT	L143Q, S188V	WT	V133T, S176V	Golay *at al.*, 2016, J Immunol 196：3199-211.
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor *et al.*, 2015, MAbs 7：377-89；Mazor *et al.*, 2015, MAbs 7：461-669.
結構域交換	WT	CH3+旋鈕 或孔洞突變	WT	CH3+孔洞 或旋鈕突變	Wozniak-Knopp *et al.*, 2018, PLoSONE13(4)：e0195442

【0128】　因此，在特定的具體實例中，二個Fab之多肽間的正確連結可藉由相互交換Fab的VL和VH結構域或相互交換CH1和CL結構域來提升，例如，如WO 2009/080251中所述。

【0129】　正確的Fab配對亦可藉由在CH1結構域中導入一或多個胺基酸修飾或在Fab之CL結構域中導入一或多個胺基酸修飾及/或在VH結構域中導入一或多個胺基酸修飾和在VL區中導入一或多個胺基酸修飾，加以提升。經修飾的胺基酸典型地為VH：VL和CH1：CL界面的部份，使得Fab組份相互優先配對，而不是與其他Fab的組份配對。

【0130】　在一具體實例中，此一或多個胺基酸修飾係局限於如Kabat殘基之編號所示的可變(VH、VL)和恆定結構域(CH1、CL)區之保守性框架殘基。Almagro, 2008, Frontiers In Bioscience 13：1619-1633提供了以Kaba、Chothia和IMGT編號排列為基礎之框架殘基的定義。

【0131】　在一具體實例中，在VH和CH1及/或VL和CL結構域中所導入的修飾為彼此互補的。在重鏈和輕鏈界面的互補性可以立體和疏水性接觸、靜電/電荷相互

作用或各種相互作用的組合為基礎來達成。蛋白界面間的互補性係就鎖和鑰匙配合，旋鈕(knob)入孔洞(hole)，突出和凹洞，供體和受體等方面，廣泛地描述於文獻中，全部皆意味著二個相互作用界面間結構和化學匹配的性質。

【0132】　在一具體實例中，此一或多個導入的修飾係導入一跨越Fab組份之界面的新氫鍵。在一具體實例中，此一或多個導入的修飾係導入一跨越Fab組份之界面的新鹽橋。作為例示的取代係描述於WO 2014/150973和WO 2014/082179中，其內容係以引用的方式併入。

【0133】　在某些具體實例中，Fab結構域係包括一CH1結構域中的192E取代和CL結構域中的114A和137K取代，其係在CH1和CL結構域之間導入一鹽橋(參見，例如，Golay et al., 2016, J Immunol 196：3199-211)。

【0134】　在某些具體實例中，Fab結構域係包括CH1結構域中的143Q和188V取代及CL結構域中的113T和176V取代，其係用於交換CH1和CL結構域之間接觸的疏水和極性區(參見，例如，Golay et al., 2016, J Immunol 196：3199-211)。

【0135】　在某些具體實例中，Fab結構域可在某些或所有的VH、CH1、VL、CL結構域中包括修飾用以導入正交Fab界面，提升正確的Fab結構域裝配(Lewis et al., 2014 Nature Biotechnology 32：191-198)。在一具體實例中，係在VH結構域中導入39K、62E修飾，在CH1結構域中導入H172A、F174G修飾，在VL結構域中導入1R、38D、(36F)修飾，及在CL結構域中導入L135Y、S176W修飾。在另外的具體實例中，係在VH結構域中導入39Y修飾及在VL結構域中導入38R修飾。

【0136】　Fab結構域亦可經修飾以一工程改造的雙硫鍵置換原生的CH1：CL雙硫鍵，藉此增加Fab組份配對的效率。例如，工程改造的雙硫鍵可藉由在CH1結構域中導入一126C及在CL結構域中導入一121C來導入(參見，例如，Mazor et al., 2015, MAbs 7：377-89)。

【0137】 Fab結構域亦可藉由以提升正確裝配之替代結構域置換CH1結構域和CL結構域來加以修飾。例如，Wu et al., 2015, MAbs 7：364-76描述了以T細胞受體的恆定結構域取代CH1結構域，及以T細胞受體的b結構域取代CL結構域，並藉由在VL結構域中導入一38D修飾和在VH結構域中導入一39K修飾，以VL和VH結構域之間的另外電荷-電荷相互作用與這些區域取代配對。

【0138】 替代的，或除此之外，使用Fab異二聚化策略提升正確的VH–VL配對，普通輕鏈(亦稱為通用輕鏈)的VL可用於本揭示文MBM的各Fab VL區。在各種具體實例中，相較於應用原來的同源VL，應用如文中所述的普通輕鏈降低了不適當的MBM種類的數目。在各種具體實例中，MBM之VL結構域係從包括一普通輕鏈之單特異性抗體來鑑別。在各種具體實例中，MBM的VH區係包括在活體內於小鼠B細胞內重排之人類重鏈可變基因片段，其先前已經工程改造用以表現一限制人類輕鏈組庫或單一人類輕鏈，與人類重鏈同源及回應暴露於感興趣抗原，產生含有多數個與其中一個或二個可能的人類VL同源的人類VH之抗體組庫，其中該抗體組庫對感興趣抗原係具有特異性。普通輕鏈為該等衍生自重排的人類Vκ1-39Jκ5序列或重排的人類Vκ3-20Jκ1序列之輕鏈，並包括體細胞突變(例如，親和力成熟)版本。參見，例如，美國專利第10,412,940號。

6.2.5. 連接子

【0139】 在特定方面，本揭示文係提供MBM其中二或更多個ABS組份(例如，scFv的VH和VL)，二或更多個ABS(例如，半抗體之scFv和Fab)，或ABS和非-ABS組份(例如，Fab或scFv和Fc結構域)係藉由一胜肽連接子此相連接。此等連接子在文中有時候係稱為「ABS連接子」。

【0140】 胜肽連接子範圍可從2個胺基酸至60或更多個胺基酸，且在特定的方面，一胜肽連接子長度範圍係從3個胺基酸至50個胺基酸，從4個至30個胺基酸，從

5個至25個胺基酸，從10個至25個胺基酸，10個胺基酸至60個胺基酸，從12個胺基酸至20個胺基酸，從20個胺基酸至50個胺基酸，或從25個胺基酸至35個胺基酸。

【0141】 在特定方面，胜肽連接子，例如隔開scFv和重鏈連接其C-端的胜肽連接子，長度為至少5個胺基酸，至少6個胺基酸，至少7個胺基酸，至少8個胺基酸，及視需要長度為至高30個胺基酸，至高40個胺基酸，至高50個胺基酸或至高60個胺基酸。

【0142】 在某些具體實例中，連接子長度範圍係從5個胺基酸至50個胺基酸，例如長度範圍從5個至50個，從5個至45個，從5個至40個，從5個至35個，從5個至30個，從5個至25個，或從5個至20個胺基酸。在前述其他的具體實例中，連接子長度範圍係從6個胺基酸至50個胺基酸，例如長度範圍從6個至50個，從6個至45個，從6個至40個，從6個至35個，從6個至30個，從6個至25個，或從6個至20個胺基酸。又在前述其他的具體實例中，連接子長度範圍係從7個胺基酸至50個胺基酸，例如長度範圍從7個至50個，從7個至45個，從7個至40個，從7個至35個，從7個至30個，從7個至25個或從7個至20個胺基酸。

【0143】 帶電(例如，帶電親水性連接子)及/或彈性連接子為特佳的。

【0144】 可用於本揭示文MBM之彈性ABS連接子的實例包括該等由Chen et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10)：1357-1369和Klein et al., 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27(10)：325-330所揭示的實例。特別有用的彈性連接子為或包括甘胺酸和絲胺酸重複單元，例如G_nS(SEQ ID NO：25)或SG_n(SEQ ID NO：26)之單體或多聚體，其中n為1至10之整數，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一具體實例中，該連接子為或包括G_4S(SEQ ID NO：17)之單體或多聚體，例如$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO：17)。

【0145】 聚甘胺酸連接子適合地可用於本揭示文之MBM。在某些具體實例中，該胜肽連接子，例如隔開一scFV結構域和一重鏈例如ABS1的scFV結構域和ABS2

的重鏈可變區之胜肽連接子，係包括二個連續的甘胺酸(2Gly)，三個連續的甘胺酸(3Gly)，四個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，五個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，六個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，七個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，八個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或九個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23))。

6.2.6 絞鏈區

【0146】 本揭示文之MBM亦可包括絞鏈區，例如連接ABS模組與Fc區。絞鏈區可為原生的或經修飾的絞鏈區。絞鏈區典型地係在Fc區的N-端發現。

【0147】 原生的絞鏈區為一般可在天然生成抗體中Fab和Fc結構域之間發現的絞鏈區。

【0148】 術語「絞鏈區」，除非內容中另有指出，否則係指天然生成(或原生的)或非天然生成的絞鏈序列，其在單一或單體多肽鏈的情況下為單體絞鏈結構域，而在多聚體多肽的情況下(例如，本揭示文之MBM)係包括至少2條個別多肽鏈與絞鏈序列相連結。有時候，當描述單一多肽之絞鏈序列時，該絞鏈區係稱為絞鏈「結構域」。典型地，在包括二條相連結的絞鏈序列之多聚體多肽中，二條相連結的絞鏈序列為相同的。

【0149】 絞鏈區係由上絞鏈、核心絞鏈和下絞鏈所組成。

【0150】 在人類IgG1中，上絞鏈係相當於圖14中所述序列之胺基酸99-108，核心絞鏈係相當於圖14中所述序列之胺基酸109-112，而下絞鏈係相當於圖14中所述序列之胺基酸113-121。整條人類IgG1之絞鏈序列係如SEQ ID NO：68所示。如圖14中所示，下絞鏈的最後二個胺基酸係相當於CH2結構域的前二個胺基酸。

【0151】 在人類IgG2中，上絞鏈係相當於圖15中所述序列之胺基酸99-105，核心絞鏈係相當於圖15中所述序列之胺基酸106-109，而下絞鏈係相當於圖15中所述序

列之胺基酸110-117。整條人類IgG2之絞鏈序列係如SEQ ID NO：69所示。如圖15中所示，下絞鏈的最後二個胺基酸係相當於CH2結構域的前二個胺基酸。

【0152】 在人類IgG4中，上絞鏈係相當於圖16中所述序列之胺基酸99-105，核心絞鏈係相當於圖16中所述序列之胺基酸106-109，而下絞鏈係相當於圖16中所述序列之胺基酸110-118。整條人類IgG4之絞鏈序列係如SEQ ID NO：72所示。如圖16中所示，下絞鏈的最後二個胺基酸係相當於CH2結構域的前二個胺基酸。

【0153】 修飾的絞鏈區為長度及/或組成與原生絞鏈區不相同的任何絞鏈。此等絞鏈可包括來自其他物種的絞鏈區，例如人類、小鼠、大鼠、兔、鯊、豬、倉鼠、駱駝、大羊駝或山羊絞鏈區。其他修飾的絞鏈區可包括衍生自不同類型或亞型抗體之重鏈Fc區的完整絞鏈區。另一種選擇，此修飾的絞鏈區可包括部分天然絞鏈或其中各重複的單元係衍生自天然絞鏈區的重複單元。在另一替代的選擇中，天然絞鏈區可藉由將一或多個半胱胺酸或其他殘基轉變成中性殘基，例如絲胺酸或丙胺酸來改變，或藉由將適當置入的殘基轉變成半胱胺酸殘基來改變。藉由此等方法，絞鏈區中的半胱胺酸殘基數目可增加或減少。其他修飾的絞鏈區可完全為合成的或可經設計而具有所欲的性質，例如長度、半胱胺酸組成和彈性。

【0154】 許多修飾的絞鏈區已描述於，例如美國專利編號5,677,425、WO99/15549、WO2005/003170、WO2005/003169、WO 2005/003170、WO98/25971和WO2005/003171中且這些專利係以引用的方式併入本文中。

【0155】 在一具體實例中，本揭示文之其一或二個半抗體的Fc區係在其N-端具有完整的絞鏈區。

【0156】 在各種具體實例中，絞鏈區內的位置233-236可為G、G、G及空位；G、G、空位的和空位；G、空位、空位和空位；或全部為空位，其中位置號碼係以EU編號。

【0157】 在某些具體實例中，本揭示文之ABM係包括一相對於相同同型(例如，人類IgG1或人類IgG4)之野生型絞鏈區，對Fcγ受體之結合親和力降低的修飾絞鏈區。

【0158】 在一具體實例中，本揭示文ABM之其一或二條鏈的Fc區係在其N-端具有完整的絞鏈結構域。在其N-端包括一絞鏈結構域之Fc區在文中稱為「恆定結構域」。作為例示的恆定結構域係描述於文中及6.3章節中。

【0159】 在一具體實例中，本揭示文之ABM的Fc區和絞鏈區係衍生自IgG4且該絞鏈區係包括修飾的CPPC序列 (SEQ ID NO：27)。相較於含有CPPC序列 (SEQ ID NO：27)的IgG1，人類IgG4之核心絞鏈區係含有CPSC序列(SEQ ID NO：28)。存在IgG4序列中的絲胺酸殘基使得此區的彈性增加，且因此一定比例的分子在相同蛋白鏈內形成雙硫鍵(鏈內雙硫鍵)，而不是與IgG分子中的另一重鏈橋連而形成鏈間雙硫鍵(Angel et al., 1993, Mol Immunol 30(1)：105-108)。將絲胺酸殘基換成脯胺酸得到如同IgG1的相同核心序列，得以在IgG4絞鏈區中完全形成鏈間雙硫鍵，因此降低純化產物的異質性。此經改變的同型係稱為IgG4P(有時候稱為IgG4 S108P)。

【0160】 可併入本揭示文之MBM中之作為例示的絞鏈序列係如圖17中所述，例如任一SEQ ID NO 66至72的絞鏈序列。

6.2.6.1. 嵌合絞鏈序列

【0161】 絞鏈區可為嵌合絞鏈區。

【0162】 例如，嵌合絞鏈可包括衍生自人類IgG1、人類IgG2或人類IgG4絞鏈區之「上絞鏈」序列與衍生自人類IgG1、人類IgG2或人類IgG4絞鏈區之「下絞鏈」序列組合。

【0163】 在特定的具體實例中，嵌合絞鏈區係包括胺基酸序列EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO：29)(之前揭示為WO2014/121087之SEQ ID NO：8，其係以全文引用的方式併入本文中)或ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID

NO：30)(之前揭示為WO2014/121087之SEQ ID NO：9)。此等嵌合的絞鏈序列可適當與gG4 CH2區連接(例如，藉由併入一IgG4 Fc結構域，例如人類或鼠類Fc結構域，其可進一步在CH2及/或CH3區中經修飾用以降低效應子功能，例如，如章節6.2.7.1中所述)。

【0164】 作為例示的嵌合絞鏈序列係如圖17中所述為SEQ ID NO：66，SEQ ID NO：67，SEQ ID NO：70和SEQ ID NO：71。

6.2.6.2. 具有降低的效應子功能之絞鏈序列

【0165】 在另外的具體實例中，絞鏈區可經修飾用以降低效應子功能，例如，如WO2016161010A2中所述(其係以全文引用的方式併入本文中)。在各種具體實例中，此修飾絞鏈區的位置233-236為G、G、G和空位；G、G、空位和空位；G、空位、空位和空位；或全部為空位，其中位置號碼係以EU編號(如WO2016161010A2的圖1中所示)。這些片段可以GGG-、GG--、G---或----表示，「-」係代表空位。

【0166】 在標準的人類IgG2中位置236為空位，但在其他標準的人類IgG同型中則為佔用的。在全部四種人類同型中，位置233-235係被G以外的殘基佔據(如WO2016161010A2之圖1中所示)。

【0167】 位置233-236內的絞鏈修飾可與被P佔據之位置228組合。位置228天然地在人類IgG1和IgG2中係被P佔據，但在人類IgG4中係被S佔據而在人類IgG3中係被R佔據。IgG4抗體中的S228P突變在穩定IgG4抗體和降低外生性和內生性抗體間的成對重鏈輕鏈之交換為有利的。較佳地位置226-229係分別被C、P、P和C佔據。

【0168】 作為例示的絞鏈區係具有殘基226-236，有時候稱為中(或核心)和下絞鏈，其係由指定為GGG-(233-236)、GG--(233-236)、G---(233-236)和無G(233-236)之修飾的絞鏈序列所佔據。視需要，此絞鏈區胺基酸序列係包括CPPCPAPGGG-GPSVF (SEQ ID NO：31)(之前揭示為WO2016161010A2之SEQ ID NO：1)，CPPCPAPGG--GPSVF (SEQ ID NO：32)(之前揭示為WO2016161010A2之

SEQ ID NO：2)，CPPCPAPG---GPSVF (SEQ ID NO：33)(之前揭示為WO2016161010A2之SEQ ID NO：3)或CPPCPAP----GPSVF (SEQ ID NO：34)(之前揭示為WO2016161010A2之SEQ ID NO：4)。

【0169】 上述之修飾絞鏈區可併入重鏈恆定區，而該重鏈恆定區典型地係包括CH2和CH3區，且可具有位於指定區側邊的另外絞鏈片段(例如，上絞鏈)。雖然此等存在的另外恆定區片段可為不同的同型之雜交體，但典型地為相同的同型，較佳地人類同型。此等另外的人類恆定區片段之同型較佳地為人類IgG4，但亦可為人類IgG1、IgG2或IgG3或其中結構域為不同之同型的其雜交體。作為例示的人類IgG1、IgG2和IgG4之序列係如WO2016161010A2之圖2-4中所示。

【0170】 在特定的具體實例中，此修飾的絞鏈序列可與IgG4 CH2區連接(例如藉由併入IgG4 Fc結構域，例如人類或鼠類Fc結構域，其可進一步在CH2及/或CH3區經修飾用以降低效應子功能，例如，如章節6.2.7.1中所述)。

6.2.7. Fc結構域

【0171】 本揭示文之MBM可包括衍生自任何適合物種的Fc區。在一具體實例中，此Fc區係衍生自人類Fc結構域。

【0172】 Fc結構域可衍生自任何適合種類的抗體，包括IgA(包括IgA1和IgA2亞型)、IgD、IgE、IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亞型)和IgM。在一具體實例中，此Fc結構域係衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一具體實例中，此Fc結構域係衍生自IgG1。在一具體實例中，此Fc結構域係衍生自IgG4。

【0173】 Fc區內的二個Fc結構域彼此可為相同或不同的。在原生抗體中，Fc結構域典型地為相同的，但就製造抗原結合分子，例如本揭示文MBM之目的而言，Fc結構域有利地應為不同的，用以允許異二聚化，如下文章節6.2.7.2中所述。

【0174】　在原生抗體中，IgA、IgD和IgG的重鏈Fc結構域係由二個重鏈恆定結構域(CH2和CH3)所組成，而IgE和IgM的重鏈Fc結構域係由三個重鏈恆定結構域(CH2、CH3和CH4)所組成。這些結構域二聚化而產生一Fc區。

【0175】　在本揭示文之MBM中，Fc區及/或其內的Fc結構域，可包括來自一或多種不同類別，例如一、二或三種不同類別之抗體的重鏈恆定結構域。

【0176】　在一具體實例中，此Fc區係包括衍生自IgG1的CH2和CH3結構域。

【0177】　在一具體實例中，此Fc區係包括衍生自IgG2的CH2和CH3結構域。

【0178】　在一具體實例中，此Fc區係包括衍生自IgG3的CH2和CH3結構域。

【0179】　在一具體實例中，此Fc區係包括衍生自IgG4的CH2和CH3結構域。

【0180】　在一具體實例中，此Fc區係包括來自IgM的CH4結構域。此IgM CH4結構域典型地係位於CH3結構域的C-端。

【0181】　在一具體實例中，此Fc區係包括衍生自IgG的CH2和CH3結構域和衍生自IgM的CH4結構域。

【0182】　應了解，用於製造本揭示文MBM之Fc區的重鏈恆定結構域可包括如上述之天然生成恆定結構域之變體。相較於野生型的恆定結構域，此等變體可包括一或多個胺基酸變異。在一實例中，本揭示文之Fc區係包括至少一個在序列上從野生型恆定結構域變化而來的恆定結構域。應了解，變體恆定結構域可能比野生型恆定結構域更長或更短。較佳地變體恆定結構域與野生型恆定結構域為至少60%相同或類似。在另外的實例中，此等變體恆定結構域為至少70%相同或相似。在另外的實例中，此等變體恆定結構域為至少80%相同或相似。在另外的實例中，此等變體恆定結構域為至少90%相同或相似。在另外的實例中，此等變體恆定結構域為至少95%相同或相似。

【0183】　IgM和IgA係在人類中天然生成的，為普通H2L2抗體單元之共價多聚體。當其併入J-鏈時，IgM生成為五聚體，或當其缺乏J-鏈時，則為六聚體。IgA係

以單體或二聚體型式生成。IgM和IgA的重鏈具有18個胺基酸延伸至C-端恆定結構域，稱為尾片(tailpiece)。尾片係包括一半胱胺酸殘基，在多聚體的重鏈間形成雙硫鍵，且咸信在多聚化中扮演著重要角色。尾片亦含有一糖基化位置。在特定的具體實例中，本揭示文之MBM不包括尾片。

【0184】 併入本揭示文MBM的Fc結構域可包括一或多個改變蛋白功能性質的修飾，例如與Fc-受體，例如FcRn或白細胞受體結合，與補體結合、修飾雙硫鍵結構，或改變的糖基化模式。

【0185】 帶有修飾雙硫鍵結構之Fc結構域係包括CH3(S-S)-工程改造的Fc結構域，例如藉由在其中一個CH3結構域導入E356C或S354C突變。視需要，係將Y349C突變導入另一個CH3結構域(根據EU編號)。

【0186】 改變效應子功能之作為例示的Fc修飾係描述於6.2.7.1章節中。

【0187】 亦可改變Fc結構域用以包括改善不對稱MBM之可製造性的修飾，例如藉由允許異二聚化，其乃不相同的Fc結構域比相同的Fc結構域優先配對。異二聚化允許MBM之製造，其中不同的ABS係藉由含有序列上不同的Fc結構域之Fc區彼此相連接。異二聚化策略之實例係在章節6.2.7.2中舉例說明。

【0188】 應了解，任何上文所提及的修飾可以任何適合的方式組合以達到所欲的功能特性，及/或與其他的修飾組合用以改變MBM的性質。

6.2.7.1 帶有改變的效應子功能之Fc結構域

【0189】 在某些具體實例中，Fc結構域係包括一或多個降低與Fc受體結合及/或效應子功能之胺基酸取代。

【0190】 在一特定的具體實例中，此Fc受體為Fcγ受體。在一具體實例中，此Fc受體為人類Fc受體。在一具體實例中，此Fc受體為活化的Fc受體。在一特定的具體實例中，此Fc受體為一活化的人類Fcγ受體，更特言之人類FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa，最特定為人類FcγRIIIa。在一具體實例中，效應子功能係由下列一或多種

群族中選出：補體依賴的細胞毒性作用(CDC)、抗體依賴的細胞媒介細胞毒性作用(ADCC)、抗體依賴的細胞吞噬作用(ADCP)，以及細胞激素分泌作用。在一特定的具體實例中，此效應子功能為ADCC。

【0191】 在特定方面，此帶有降低的效應子功能之Fc區係在下列位置包括一胺基酸取代：S228、E233、L234、L235、D265、N297、P329和P331 (全部皆根據EU編號)。

【0192】 在S228之示例的取代係包括S228P。

【0193】 在E233之示例的取代係包括E233A和E233P。

【0194】 在L234之示例的取代係包括L234A。

【0195】 在L235之示例的取代係包括L235A和L235E。

【0196】 在D265之示例的取代係包括D265A。

【0197】 在N297之示例的取代係包括N297A和N297D。

【0198】 在P329之示例的取代係包括P329G或P329A。

【0199】 在P331之示例的取代係包括P331S。

【0200】 在某些具體實例中，Fc區包括一選自下列位置之群的胺基酸取代：L234、L235和P329(根據Kabat EU索引編號)。在某些具體實例中，Fc區係包括胺基酸取代L234A和L235A(根據Kabat EU索引編號)。在一此具體實例中，此Fc區為一Igd Fc區，特言之人類Igd Fc區。在一具體實例中，此Fc區係包括在位置P329之胺基酸取代。在一更特定的具體實例中，此胺基酸取代為P329A或P329G，特言之P329G(根據Kabat EU索引編號)。在一具體實例中，此Fc區係包括在位置P329之胺基酸取代和選自下列位置之另一胺基酸取代：E233、L234、L235、N297和P331(根據Kabat EU索引編號)。在一更特的具體實例中，此另外的胺基酸取代為E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特定的具體實例中，此Fc區係包括在位置P329、L234和L235之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。在更特

定的具體實例中，此Fc區係包括胺基酸突變L234A、L235A和P329G（「P329G LALA」、「PGLALA」或「LALAPG」)。

【0201】 典型地，在Fc區的二個Fc結構域中各自存有相同的一或多個胺基酸取代。因此，在一特定的具體實例中， Fc區的各Fc結構域係包括胺基酸取代L234A、L235A和P329G(Kabat EU索引編號)，亦即在各Fc區的第一和第二Fc結構域，位置234之白胺酸殘基係經丙胺酸殘基置換(L234A)，位置235之白胺酸殘基係經丙胺酸殘基置換(L235A)及位置329之脯胺酸殘基係經甘胺酸殘基置換(P329G)(根據Kabat EU索引編號)。

【0202】 適合降低效應子功能之另外的取代組合包括(1) D265A/P329A，(2) D265A/N297A，(3) L234/L235A和(4) P329A/L234A/L235A。

【0203】 在一具體實例中，此Fc結構域為gG1 Fc結構域，特言之人類IgG1 Fc結構域。

【0204】 典型地，相同的一或多個胺基酸取代係存在Fc區的各二個Fc結構域中。因此，在一特定的具體實例中，Fc區的各Fc結構域係包括胺基酸取代L234A、L235A和P329G (Kabat EU索引編號)，亦即Fc區中的各第一和第二Fc結構域，位置234之白胺酸殘基係經丙胺酸殘基置換(L234A)，位置235之白胺酸殘基係經丙胺酸殘基置換(L235A)及位置329之脯胺酸殘基係經甘胺酸殘基置換(P329G)(根據Kabat EU索引編號)。

【0205】 在一具體實例中，此Fc結構域為IgG1 Fc結構域，特言之人類IgG1 Fc結構域。在某些具體實例中，此IgG1 Fc結構域為包括D265A、N297A突變(EU編號)用以降低效應子功能的變體IgG1。

【0206】 在另外的具體實例中，此Fc結構域為一帶有降低的Fc受體結合之IgG4 Fc結構域。帶有降低的Fc受體結合之示例IgG4 Fc結構域可包括一選自下表5之胺基酸序列。在某些具體實例中，此Fc結構域僅包括下列所示序列之粗黑字體的部分：

表 5	
Fc 結構域	序列
WO2014/121087 之 SEQ ID NO：1	Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys (SEQ ID NO：35)
WO2014/121087 之 SEQ ID NO：2	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO：36)
WO2014/121087 之 SEQ ID NO：30	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn** **Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr**

表 5	
Fc 結構域	序列
	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO：37)
WO2014/121087 之 SEQ ID NO：31	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn** **Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys** (SEQ ID NO：38)
WO2014/121087 之 SEQ ID NO：37	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn** **Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys** (SEQ ID NO：39)
WO2014/121087 之	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser

表 5	
Fc 結構域	**序列**
SEQ ID NO：38	Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn** **Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys** (SEQ ID NO：40)

【0207】 在一特定的具體實例中，具有降低的效應子功能之IgG4係包括WO2014/121087之SEQ ID NO：31胺基酸序列的粗黑字體部分，有時候在文中稱為IgG4或hIgG4。

【0208】 就異二聚體ABM，可能併入上述的變體IgG4 Fc序列之組合，例如包括WO2014/121087之SEQ ID NO：30 (或其粗黑字體部分)和WO2014/121087之SEQ ID NO：37 (或其粗黑字體部分)的Fc區，或包括WO2014/121087之SEQ ID NO：31 (或其粗黑字體部分)和WO2014/121087之SEQ ID NO：38(或其粗黑字體部分)之組合的Fc區。

6.2.7.2. Fc異二聚化變體

【0209】 許多的多特異性分子型式在二個Fc結構域之間引起二聚化，與原生的免疫球蛋白不同，其係操上連接不相同的抗原-結合域(或其部分，例如Fab的VH或VH-CH1)。二個Fc區不適當異二聚化形成Fc結構域可能增加產生所欲多特異性分子之障礙且代表著純化上的挑戰。在本項技術中有各種可取得的方法可用於增進可能

存在本揭示文MBM中Fc結構域的異二聚化，例如揭示於EP 1870459A1；美國專利第5,582,996號；美國專利第5,731,168號；美國專利第5,910,573號；美國專利第5,932,448號；美國專利第6,833,441號；美國專利第7,183,076號；美國專利申請公開案號2006204493A1；及PCT公開案號W02009/089004A1中。

【0210】　本揭示文係提供包括Fc異二聚體之MBM，亦即包括異源、不相同Fc結構域之Fc區。異二聚化策略係用於增進操作上連接不同ABS (或其部分，例如Fab之VH或VH-CH1)之Fc區的二聚化，以及降低操作上連接相同ABS之Fc結構域的二聚化。典型地，Fc異二聚體中的各Fc結構域係包括抗體的CH3結構域。此CH3結構域係衍生自任何同型、類別或亞型，且較佳地為如前面章節中所述IgG (IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)類別之抗體的恆定區。

【0211】　在CH3結構域二條不同重鏈的異二聚化產生所欲的MBM，而相同重鏈的同二聚化將降低所欲的MBM之產率。因此，在一較佳的具體實例中，相結合而形成本揭示文MBM的二個半抗體將含有帶有修飾之CH3結構域，其相對於未經修飾的重鏈係偏好異二聚化結合。

【0212】　在一特定的具體實例中，該促進Fc異二聚物形成之修飾為所謂的「旋鈕入孔洞(knob-into-hole)」或「knob-in-hole」修飾，該修飾係包括在其中一個Fc結構域中的「旋鈕(knob)」修飾和在另一個Fc結構域中的「孔洞(hole)」修飾。此旋鈕入孔洞(knob-into-hole)技術係描述於美國專利第5,731,168號；US 7,695,936；Ridgway et al., 1996, Prot Eng 9：617-621，和Carter, 2001, Immunol Meth 248：7-15。一般而言，此方法係涉及在第一多肽的界面導入一突出(「旋鈕(knob)」)和在第二多肽界面的導入一對應腔洞(「孔洞(hole)」)，使得突出可置入腔洞中以便促進異二聚物的形成和阻礙同二聚物形成。突出係藉由以較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)取代來自第一多肽界面之小胺基酸側鏈來建構。藉由以較小的胺基酸側鏈(例如丙胺

酸或蘇胺酸)取代大的胺基酸側鏈，在第二多肽的界面製造與突出相同或類似大小的互補腔洞。

【0213】　因此，在某些具體實例中，在Fc結構域第一亞單元之CH3結構域的胺基酸殘基係以具有較大側鏈體積之胺基酸殘基取代，藉此在第一亞單元的CH3結構域內產生一突出，其可定位在第二亞單元之CH3結構域內的腔洞中，且Fc結構域第二亞單元之CH3結構域中的胺基酸殘基係以具有較小側鏈體積之胺基酸殘基取代，藉此在第二亞單元之CH3結構域內產生一腔洞，在其內可定位第一亞單元之CH3結構域內的突出。較佳地該具有較大側鏈體積之胺基酸殘基係由下列組成之群中選出：精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)和色胺酸(W)。較佳地該具有較小側鏈體積之胺基酸殘基係選由下列組成之群中選出：丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)和纈胺酸(V)。突出和腔洞可藉由改變編碼此多肽的核酸來製造，例如藉由定點突變或藉由胜肽合成。一示例的取代為Y470T。

【0214】　在一特定的此具體實例中，在第一Fc結構域中位置366的蘇胺酸殘基係以色胺酸殘基殘基取代(T366W)，及在此Fc結構域中位置407的酪胺酸殘基係以纈胺酸殘基取代(Y407V)及視需要位置366的蘇胺酸殘基係以絲胺酸殘基取代(T366S)及位置368的白胺酸殘基係以丙胺酸殘基取代(L368A)(根據Kabat EU索引編號)。在另一具體實例中，在第一Fc結構域中另外地位置354的絲胺酸殘基係以半胱胺酸殘基取代(S354C)或位置356的麩胺酸殘基係以半胱胺酸殘基取代(E356C)(特言之，位置354的絲胺酸殘基係以半胱胺酸殘基取代)，及在第二Fc結構域中另外地位置349的酪胺酸殘基係以半胱胺酸殘基取代(Y349C)(根據Kabat EU索引編號)。在一特定的具體實例中，第一Fc結構域係包括胺基酸取代S354C和T366W，及第二Fc結構域係包括胺基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V(根據Kabat EU索引編號)。

【0215】　在某些具體實例中，靜電轉向(例如，描述於Gunasekaran *et al.*, 2010, J Biol Chem 285(25)：19637-46中)可用於提升Fc結構域之第一和第二亞單元的結合。

【0216】　作為替代，或除了使用經修飾用以提升異二聚化之Fc結構域之外，Fc結構域可經修飾而使其允許能選擇Fc異二聚體之純化策略。在一此具體實例中，半抗體係包括一消除其與蛋白A結合之修飾的Fc結構域，因而能進行產生異二聚化蛋白之純化方法。參見，例如美國專利第8,586,713號。因此，MBM係包括一第一CH3結構域和一第二Ig CH3結構域，其中該第一和第二Ig CH3結構域彼此為至少一個胺基酸不同，且相較於缺乏此胺基酸差異的對應ABM，其中該至少一個胺基酸差異係降低了MBM與蛋白A的結合。在一具體實例中，第一CH3結構域係與蛋白A結合而第二CH3結構域係含有一降低或消除蛋白A結合之突變/修飾，例如H95R修飾(IMGT外顯子編號；EU編號為H435R)。第二CH3可進一步包括Y96F修飾(IMGT；EU為Y436F)。此類修飾在文中係稱為「星狀(star)」突變。

【0217】　在特定方面，本揭示文之MBM可包括旋鈕入孔洞突變和星狀突變用以幫助純化。在各種具體實例中，一半抗體係含有旋鈕或孔洞突變而另一個半抗體係含有對應地孔洞或旋鈕突變。因此，在某些具體實例中，一半抗體的Fc結構域係包括一或多個旋鈕突變，而另一個半抗體的Fc結構域係包括一或多個孔洞突變。在其他的具體實例中，一半抗體的Fc結構域係包括一或多個孔洞突變和一星狀突變，而另一個半抗體的Fc結構域係包括一或多個旋鈕突變。

6.3. 恆定結構域

【0218】　本揭示文之MBM一般而言係包括二個半抗體。典型地各半抗體係包括由CH2和CH3結構域所組成的恆定結構域(例如，如0章節之Fc結構域內容中所述)在其N-端帶有一絞鏈區(例如，如06章節中所述)。各恆定結構域可在其N-端融合一抗原結合位或其中一條其多肽鏈，例如Fab結構域的CH1部分。

【0219】　在某些具體實例中，恆定結構域係具有任何圖17中所述的組態或序列。在各種具體實例中，包括具有圖17中所述的絞鏈序列(例如，任一SEQ ID NO：66至72)之絞鏈的恆定結構域，係帶有野生型或修飾的CH2及/或CH3結構域，例如

經修飾用以降低效應子功能，幫助正確的異二聚體形成，經修飾用以幫助純化等。作為例示的修飾係如6.2.7章節中所述，包括其小節6.2.7.1和6.2.7.2小節。

【0220】 在某些具體實例中，本揭示文之MBM係包括一包含一根據SEQ ID NO：45胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：46胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：48胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：49胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：50胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：51胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：52胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：53胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：54胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：58胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：59胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：60胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：61胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：62胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：63胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：64胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，一包含一根據SEQ ID NO：65胺基酸序列之胺基酸序列的恆定結構域，或一包含與任何前述序列識別編號所提供的胺基酸序列具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或100%序列相同性之胺基酸的恆定結構域。

【0221】 在某些具體實例中，該恆定結構域為「嵌合的」，包括來自一個以上的免疫球蛋白同型之恆定結構域。在某些具體實例中，該嵌合的恆定結構域係具有來自不同IgG同型(例如，任二個IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)之序列。

【0222】　一作為例示的嵌合恆定結構域為文中稱為「IgG1 PVA」同型或類似術語之嵌合恆定結構域，其係包括一IgG1上絞鏈結構域，一IgG1核心絞鏈結構域及一在胺基酸位置233-236(EU編號)具有取代/刪除突變ELLG→PVA-(或「P-V-A-缺位」)(「ELLG」揭示為SEQ ID NO：79)的IgG1下絞鏈結構域，一IgG1 CH2結構域和一IgG1 CH3結構域。ELLG→PVA-(或「P-V-A-缺位」)(「ELLG」揭示為SEQ ID NO：79)修飾係將IgG2序列併入IgG1。在特定方面，該嵌合的恆定結構域係包括與SEQ ID NO：46 (hIgG1 PVA恆定結構域)具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%序列相同性之胺基酸序列。

【0223】　嵌合的恆定結構域可進一步經修飾，例如用以進一步改變效應子功能(例如，如07.1章節中所述)及/或幫助帶有不對稱半抗體之MBM的正確配對或純化(例如，如07.2章節中所述)。

【0224】　在特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括與SEQ ID NO：46 (hIgG1 PVA恆定結構域)具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，或至少98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a)　二個恆定結構域在胺基酸位置 233-236 (EU 編號)係包括 P-V-A-缺位序列，

(b)　一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c)　視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d)　二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【0225】　在一特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其功此二個恆定結構域係包括：

(a)　一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：58 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同

性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：58 具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：62 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：62 具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU編號)P-V-A-缺位)和孔洞突變 T366S、L368A 及 Y407V。

【0226】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：58 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：58 具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：63 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：63 具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU編號)之 P-V-A-缺位)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

【0227】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：59 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：59 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：62 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：62 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和孔洞突變 T366S、L368A 及 Y407V。

【0228】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：59 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：59 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：63 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：63 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

【0229】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：60 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：60 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C 和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：64 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：64 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C 以及孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V。

【0230】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：60 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：60 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C (或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：65 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：65 具有低於

100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C (或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

【0231】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：61 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：61 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C (或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，旋鈕突變 T366W 和星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：64 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：64 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C (或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V。

【0232】 在另外特定的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：61 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同

性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：61 具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C (或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，旋鈕突變 T366W 和星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：65 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：65 具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C (或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

【0233】 又在另外的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括與SEQ ID NO：49(hIgG1 N180G，亦稱為hIgG1 N297G)具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，或至少98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 N180G/N297G 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【0234】 又在另外的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括與SEQ ID NO：53 (hIgG4 S108P，亦

稱為hIgG4 S228P)具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，或至少98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【0235】 又在另外的具體實例中，本揭示文之MBM係包括二個包含Fc異二聚體之恆定結構域，其中此二個恆定結構域係包括與SEQ ID NO：54 (變體IgG4，帶有S108P，亦稱為hIgG4 S228P，取代和IgG1 CH2及CH3結構域)具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，或至少98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

6.4. 核酸和宿主細胞

【0236】 在另外方面，本揭示文係提供編碼本揭示文MBM之核酸。在某些具體實例中，MBM係由單一核酸所編碼。在其他具體實例中，MBM係由多數個(例如二、三或四個)核酸所編碼。

【0237】 單一核酸可編碼包括單一多肽鏈的MBM，包括二或多條多肽鏈的MBM，或包括二條以上多肽鏈的MBM之一部份(例如，單一核酸可編碼包括三、四或更多條多肽鏈之MBM的二條多肽，或包括四或更多條多肽鏈之MBM的三條多

肽)。就表現的個別控制而言，編碼二或更多條多肽鏈的開放閱讀框可在個別轉錄調節元件(例如，啟動子及/或增強子)之控制下。編碼二或更多條多肽鏈的開放閱讀框亦可藉由相同的轉錄調節元件控制，由內部核糖體進入位點(IRES)序列隔開供轉譯成個別的多肽。

【0238】 在某些具體實例中，包括二或多條多肽鏈的MBM係由二或更多核酸所編碼。編碼MBM的核酸數目可等於或低於MBM中多肽鏈的數目(例如，當一條以上的多肽鏈係由單一核酸所編碼時)。

【0239】 本揭示文之核酸可為DNA或RNA(例如，mRNA)。

【0240】 在另外方面，本揭示文係提供含有本揭示文核酸之宿主細胞和載體。此等核酸可存在單一載體中或存在相同宿主細胞或個別宿主細胞的個別的載體中，如下文更詳細說明。

6.4.1. 載體

【0241】 本揭示文係提供包括編碼文中所述之MBM或MBM組份，例如半抗體之一或二條多肽鏈的核苷酸序列之載體。此等載體係包括，但不限於病毒、質體、黏質體、λ噬菌體或酵母菌人工染色體(YAC)。

【0242】 有許多的載體系統可運用。例如，其中一種載體係利用衍生自動物病毒，例如，舉例而言，牛乳突病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、桿狀病毒、反轉錄病毒(勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma virus)、MMTV或MOMLV)或SV40病毒之DNA元件。另一類載體係利用衍生自RNA病毒，例如塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、東方馬腦炎病毒和黃熱病毒的RNA元件。

【0243】 另外，可藉由導入一或多個允許選擇轉染宿主細胞之標記來選擇已穩定整合DNA至其染色體中的細胞。此標記可提供，例如，質子移動作用給營養缺陷的宿主、殺微生物劑阻抗性(例如，抗生素)，或對重金屬，例如銅或諸如此類之阻抗性。可選擇標記基因可直接連接所欲表現的DNA序列，或藉由共轉化導入到

相同細胞。就mRNA之最佳合成亦可能需要另外的元件。這些元件可包括剪接訊號，以及轉錄啟動子、增強子和終止訊號。

【0244】　一但含有該結構的表現載體或DNA序列已備妥供表現，則表現載體可轉染或導入到適當的宿主細胞。此項可運用各種技術來完成，例如，舉例而言，原生質融合、磷酸鈣沉澱、電穿孔、反轉錄病毒轉導、病毒轉染、基因槍、脂質為基礎的轉染或其他習用的技術。用於培養所產生的轉染細胞和用於回收表現的多肽之方法和條件已為熟習本項技術者所知，且依照特定的表現載體和所用的哺乳動物細胞，以本說明書為基準，可變化或最佳化。

6.4.2. 細胞

【0245】　本揭示文亦提供包括本揭示文核酸之宿主細胞。

【0246】　在一具體實例中，此宿主細胞係經基因工程改造而包括一或多個文中所述的核酸。

【0247】　在一具體實例中，此宿主細胞細係藉由使用表現匣加以基因工程改造。詞語「表現匣」係指能在與此序列相容的宿主中使基因表現之核苷酸序列。此等表現匣可包括一啟動子，有或無內含子之開放閱讀框和終止訊號。亦可使用必要的或有助於進行表現之另外的因子，例如，舉例而言，誘導性啟動子。

【0248】　本揭示文亦提供包括文中所述之載體的宿主細胞。

【0249】　此細胞可為，但不限於，真核細胞、細菌細胞、昆蟲細胞或哺乳動物，例如人類細胞。適合的真核細胞包括，但不限於Vero細胞、HeLa細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞和MDCKII細胞。亦包括前述細胞類型的衍生物(例如，但不限於，Expi293，一種經改造用於較高密度生長之HEK293的衍生物)。適合的昆蟲細胞包括，但不限於Sf9細胞。

6.5. 醫藥組成物

【0250】　本揭示文之MBM可為包括MBM和一或多種載劑、賦形劑及/或稀釋劑之組成物形式。組成物可針對特定用途調配，例如用於獸藥用途或人類的醫藥用途。組成物的形式(例如，乾粉、液體調配物等)和所用的賦形劑、稀釋劑及/或載劑將依照所希望的MBM用途，及治療劑用途，給藥模式而定。

【0251】　就治療用途，組成物可以無菌、包括一醫藥上可接受載劑之醫藥組成物的部份來供應。此組成物可為任何適合的形式(依照將其投予病患之所欲方法而定)。此醫藥組成物可藉由各種路徑投予病患，例如口服、經皮、皮下、鼻內、靜脈內、肌肉內、鞘內或局部地。在任何特定案例中最適合的給藥路徑將依照特定對象和疾病性質及嚴重度以及該對象的身體狀況而定。典型的，此醫藥組成物將以靜脈內或皮下給藥。

【0252】　醫藥組成物方便地可以每劑含有預定量之本揭示文MBM的單位劑型存在。包括在單位劑量內的MBM之量將依照所欲治療的疾病以及本項技術中熟知的其他因子而定。此等單位劑型可為含有一適用於單一給藥之MBM量的凍乾粉末，或為液體形式。乾粉單位劑型可包裝成帶有注射器、適合量之稀釋劑及/或可用於給藥的其他組份之套組。液體形式的單位劑量方便地可以預充填一適用於單一給藥之MBM量的注射器形式來供應。

【0253】　醫藥組成物亦可以含有適用於多次給藥之MBM量的散裝形式來供應。

【0254】　醫藥組成物可藉由將具有所欲純度之MBM與視需要典型用於本項技術之醫藥上可接受載劑、賦形劑或安定劑(其全部在文中係稱為「載劑」)，亦即緩衝劑、安定劑、防腐劑、等張劑、非離子清潔劑、抗氧化劑和其他的各式各樣添加劑混合來製備供作為凍乾調配物或水溶液儲存。參見，Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980)。此等添加劑在所用的劑量和濃度上對於接受者應為無毒的。

【0255】　緩衝劑係幫助維持近似生理條件之範圍內的pH。其可以廣泛的各種濃度存在，但典型地將以從約2 mM至約50 mM之濃度範圍存在。適合本揭示文使用的緩衝劑包括有機和無機酸及其鹽類，例如檸檬酸鹽緩衝劑(例如，檸檬酸二氫鈉-檸檬酸二鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸二氫鈉混合物等)，琥珀酸鹽緩衝劑(例如琥珀酸-琥珀酸一鈉混合物、琥珀酸-氫氧化鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸二鈉混合物等)，酒石酸鹽緩衝劑(例如，酒石酸-酒石酸鈉混合物、酒石酸-酒石酸鉀混合物、酒石酸-氫氧化鈉混合物等)，延胡索酸鹽緩衝劑(例如，延胡索酸-延胡索酸一鈉混合物、延胡索酸-延胡索酸二鈉混合物、延胡索酸一鈉-延胡索酸二鈉混合物等)，葡萄糖酸鹽緩衝劑(例如，葡萄糖酸-葡萄糖酸鈉混合物、葡萄糖酸-氫氧化鈉混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸鉀混合物等)，草酸鹽緩衝劑(例如，草酸-草酸鈉混合物、草酸-氫氧化鈉混合物、草酸-草酸鉀混合物等)，乳酸鹽緩衝劑(例如，乳酸-乳酸鈉混合物、乳酸-氫氧化鈉混合物、乳酸-乳酸鉀混合物等)及乙酸鹽緩衝液(例如，乙酸-乙酸鈉混合物、乙酸-氫氧化鈉混合物等)。另外，可使用磷酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑和三甲基胺鹽類，例如Tris。

【0256】　可加入防腐劑延緩微生物生長，且可以範圍從約0.2%-1 %(w/v)之量加入。適合本揭示文使用的防腐劑包括酚、苯甲醇、間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化銨、苯紮氯銨鹵化物(benzalconium halide)(例如氯化物、溴化物和碘化物)、氯化六甲二銨(hexamethonium chloride)和對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或丙酯、鄰苯二酚、間苯二酚、環己醇和3-戊醇。等張劑，有時候稱為「安定劑」，可加入用以確保本揭示文之液體組成物的等張性，並包括多元糖醇，例如三元或更高級糖醇，例如甘油、赤蘚醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇。安定劑係指種類廣泛的賦形劑，其功能範圍係從填充劑至溶解治療劑或幫助防止變性或黏附在器壁之添加劑。典型的安定劑可為多元糖醇(列舉於上)；胺基酸，例如精胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天門

冬醯胺酸、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等，有機糖類或糖醇，例如乳糖、海藻糖、水蘇糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油及諸如此類，包括環醇類，例如肌醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，例如尿素、麩胱甘肽、硫辛酸、巰基乙酸鈉、硫甘油、a-巰基甘油和硫代硫酸鈉；低分子量多肽(例如10個或更少殘基的多肽)；蛋白，例如人類血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，例如聚乙烯吡咯酮，單醣類，例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；雙醣類，例如乳糖、麥芽糖、蔗糖和海藻糖；及三醣類，例如棉子糖；及多醣類，例如右旋糖酐。安定劑可以範圍從0.5至10 wt %之MBM重量之量存在。

【0257】　可加入非離子界面活性劑或清潔劑(亦稱為「濕化劑」)幫助溶解糖蛋白以及保護糖蛋白防止攪動引發的聚集作用，其亦允許調配物暴露於剪切表面應力而不會造成蛋白變性。適合的非離子界面活性劑包括聚山梨醇酯(20、80等)、泊洛沙姆(polyoxamer)(184、188等)及複合多元醇(pluronic polyol)。非離子界面活性劑可以約0.05 mg/mL至約1.0 mg/mL範圍存在，例如約0.07 mg/mL至約0.2 mg/mL。

【0258】　另外的各式各樣賦形劑包括體積膨脹劑(例如，澱粉)，螯合劑(例如，EDTA)，抗氧化劑(例如，抗壞血酸、甲硫胺酸、維生素E)和共溶劑。

6.6. 治療適應症

【0259】　本揭示文之MBM和醫藥組成物可用於一對象中治療代謝症狀及/或改善代謝。本揭示文之MBM和醫藥組成物可用於治療可藉由刺激、模擬及/或提升FGF21訊號傳遞而加以改善或減輕的任何疾病或症狀。此項一般而言係藉由以本揭示文之MBM促效(亦即，刺激) FGF21受體複合物來進行。本揭示文之MBM和醫藥組成物可用於治療或防止可藉由在一對象中降低血糖量、活化葡萄糖吸收或增加胰島素敏感性加以改善的任何疾病或症狀。

【0260】　在某些具體實例中，本揭示文之MBM和醫藥組成物可用於治療非酒精性脂肪性肝炎(「NASH」)，治療非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)，治療代謝疾病，降低循環的HDL膽固醇，增加循環的LDL膽固醇，降低血液三酸甘油酯，降低血糖，治療肥胖症和治療糖尿病。

【0261】　因此，在一方面，本揭示文係提供降低循環的HDL膽固醇之方法，該方法係包括投予患有升高的HDL量之對象一有效量的本揭示文之MBM或醫藥組成物。

【0262】　在另外方面，本揭示文係提供增加循環的LDL膽固醇之方法，該方法係包括投予患有低LDL量之對象一有效量的本揭示文之MBM或醫藥組成物。

【0263】　在另外方面，本揭示文係提供降低血液三酸甘油酯之方法，該方法係包括投予患有升高的三酸甘油酯量之對象一有效量的本揭示文之MBM或醫藥組成物。

【0264】　在另外方面，本揭示文係提供降低血糖之方法，該方法係包括投予患有升高的血糖量之對象一有效量的本揭示文之MBM或醫藥組成物。

【0265】　在另外方面，本揭示文係提供治療肥胖症之方法，該方法係包括投予患有肥胖症之對象一有效量的本揭示文之MBM或醫藥組成物。

【0266】　在另外方面，本揭示文係提供治療糖尿病之方法，該方法係包括投予患有糖尿病之對象一有效量的本揭示文之MBM或醫藥組成物。

7. 實例

7.1. 實例 1：本揭示文之結構

7.1.1 與 KLB 和 FGFR1c 結合的抗體

【0267】　進行抗體篩選操作用以鑑別與人類KLB結合的抗體其與人類FGFR1c結合的抗體。鑑別下列抗體：

【0268】 與KLB的GH1結構域結合之抗體：22414 (亦稱為414)；22401 (亦稱為401)；22393(亦稱為393)；17067。

【0269】 與KLB的GH2結構域結合之抗體：22532

【0270】 與FGFR1c結合的抗體：ADI-19842或19842，ADI-19851或19851，ADI-19839或19839，以及ADI-19863或19863。

【0271】 當與普通輕鏈配對時這些抗體係以P2字尾來指稱(例如，22414P2，22401P2，22393P2，17067P2，22532P2等)。

【0272】 抗體的結合結構域係描繪於圖2中。

【0273】 用於這些研究的另外抗體包括REGN4304，一種雙特異性抗-KLB、抗-FGFR1c抗體，其親代KLB結合臂係以抗-GH為基礎。

【0274】 用於這些研究的另外抗體包括：REGN17067，一種與BetV1(一種來自垂枝樺的花粉抗原)結合之非結合的對照抗體，以及為6His-FGF21之REGN1438。

7.1.2. 恆定結構域

【0275】 產生包括如下表6中所述之恆定結構域和連接子序列的抗體結構。結構係係描述於表7中。

表 6 –受試和對照結構之組份序列

說明	胺基酸序列	SEQ ID NO.
hIgG1 (216-447；EU 編號) hIgG1 絞鏈和 Fc.	EPKSCDKTHTCPPCPAPELIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	45
hIgG1 PVA： 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	46
hIgG1 PVA star： 變體 hIgG1 絞鏈和	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY	47

表 6 –受試和對照結構之組份序列		
說明	**胺基酸序列**	**SEQ ID NO.**
Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和和 IgG1 CH2 以及帶有星狀突變的 CH3	NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	
hIgG1s： 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG4 CH2 及 IgG1 CH3	DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	48
hIgG1 N180G， **亦稱為 N297G：** 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，在所描繪的序列中帶有 N180G 突變 (N297G，以 EU 編號)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	49
hIgG2 (216-447； **EU 編號)** hIgG2 絞鏈和根據 Uniprot P01859 之 Fc	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVE WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	50
hIgG2 (216-447； **EU 編號)** 變體 hIgG2 序列，在所述序列的位置 159 以 A 取代 S (DISVE 取代為 DIAVE)。除非另有指出，否則變體 hIgG2 序列係用於文中作為例示的結構中。	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	51
hIgG4 (216-447； **EU 編號)：**	ESKYGPPCPSCPAPEFIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	52
hIgG4 S108P： 變體 hIgG4 絞鏈和 Fc，帶有 S108P 突變 (S228P，以 EU 編號)。	ESKYGPPCPPCPAPEFIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	53

表 6 –受試和對照結構之組份序列		
說明	胺基酸序列	SEQ ID NO.
	WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
hIgG4s： 變體 hIgG4 絞鏈和 Fc,，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區具有 S108P 突變(S228P，以 EU 編號)和 IgG1 CH2 及 CH3	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	54
G_4S：	GGGGS	17
7 個-胺基酸連接子	GGGGSGG	55
15 個-胺基酸連接子	3x G_4S (亦即，GGGGSGGGGSGGGGS)	56
30 個-胺基酸連接子	6x G_4S (亦即，GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)	57
IgG1PVA_hinge-Fc knob 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有旋鈕突變 T366W 的 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	58
IgG1PVA_hinge-Fc knob_star 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有旋鈕突變 T366W 和星狀突變 H435R、Y436F 的 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	59
IgG1PVA_hinge-Fc knob_Cys 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有旋鈕突變 T366W 和 Cys 突變 S354C 的 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	60
IgG1PVA_hinge-Fc knob_Cys_star 變體 hIgG1 絞鏈和	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI	61

表 6 –受試和對照結構之組份序列		
說明	胺基酸序列	SEQ ID NO.
Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有旋鈕突變 T366W，Cys 突變 S354C 和星狀突變 H435R、Y436F 的 CH3	SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	
IgG1PVA_hinge-Fc Hole 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有孔洞突變 T366S、L368A、Y407V 的 CH3，	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	62
IgG1PVA_hinge-Fc Hole_star 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有孔洞突變 T366S、L368A、Y407V 和星狀突變 H435R、Y436F 的 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	63
IgG1PVA_hinge-Fc Hole_Cys 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1 CH2 及帶有孔洞突變 T366S、L368A、Y407V 和 Cys 突變 S354C 的 CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	64
IgG1PVA_hinge-Fc Hole_Cys_star 變體 hIgG1 絞鏈和 Fc，帶有以 IgG2-為基礎的絞鏈區和 IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW	65

表 6 –受試和對照結構之組份序列		
說明	胺基酸序列	SEQ ID NO.
CH2 及帶有孔洞突變 T366S、L368A、Y407V，Cys 突變 S354C 和星狀突變 H435R、Y436F 的 CH3	QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	

7.1.3. 結構說明

【0276】 包括各種雙特異性和特異性結合分子之受試和對照結構係描述於下表7中，其係提供用於整個文中所述研究中的各種對照和受試結構之說明。在三特異性結構中「ABS1標靶」係指在圖5的示意圖中標示為「1」之抗原結合模組的標靶。在三特異性結構中「ABS2標靶」係指在圖5的示意圖中標示為「2」之抗原結合模組的標靶。在三特異性結構中「ABS3標靶」係指在圖5的示意圖中標示為「3」之抗原結合模組的標靶。有關「ABS3連接子長度」係指隔開圖5之示意圖中標示為「3」的抗原結合模組與鄰接的Fab或Fc結構域(若適用)之連接子長度。

表 7							
名稱	模式	IgG 同型	ABS1 標靶	ABS2 標靶	ABS3 標靶	ABS3 連接子長度	親代抗體
REGN4355	標準 1+1 雙特異性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19839 (D3)
REGN4366	標準 1+1 雙特異性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3)
REGN4370	標準 1+1 雙特異性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19851 (D3)
REGN4376	標準 1+1 雙特異性	IgG4	GH1	D3	N/A	N/A	22393P2 (GH1), ADI-19863 (D3)
REGN4304	標準 1+1 雙特異性	IgG4s	GH2	D2	N/A	N/A	cKLB (GH2), cFGFR1c (D2)
F1K_scFv1	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv2	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv3	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2
F1K_scFv4	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv5	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv6	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv7	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv8	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv9	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv10	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv11	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv12	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*,	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3),

表 7							
名稱	模式	IgG 同型	ABS1 標靶	ABS2 標靶	ABS3 標靶	ABS3 連接子長度	親代抗體
		S-S					22532P2 (GH2)
F1K_scFv13	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv14	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv15	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_scFv16	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_scFv17	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_scFv18	2+1 C-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK7	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	7	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK15	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK22	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	22	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK30	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK37	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	37	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-LK45	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-hG4	2+1 N-scFv	IgG4 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-HL (重鏈/輕鏈交換)	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)

表 7							
名稱	模式	IgG 同型	ABS1 標靶	ABS2 標靶	ABS3 標靶	ABS3 連接子長度	親代抗體
F1k-scFv19	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22477P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv20	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22401P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-RT1	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-RT2	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	D3	GH1	GH2	30	ADI-19842 (D3), 22393P2 (GH1), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6-RT3	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH1	GH2	D3	30	22393P2 (GH1), 22532P2 (GH2), ADI-19842 (D3)
F1k-scFv6-RT4	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH2	GH1	D3	30	22532P2 (GH2), 22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3)
F1k-scFv6-RT5	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	D3	GH2	GH1	30	ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2), 22393P2 (GH1)
F1k-scFv6-RT6	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, N180G	GH2	D3	GH1	30	22532P2 (GH2), ADI-19842 (D3), 22393P2 (GH1)
F1K_Fab1	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab 2	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab 3	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab 4	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab 5	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab 6	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab 7	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*,	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3),

表 7							
名稱	模式	IgG 同型	ABS1 標靶	ABS2 標靶	ABS3 標靶	ABS3 連接子長度	親代抗體
		S-S					22414P2 (GH1)
F1K_Fab 8	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab 9	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab 10	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab 11	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab12	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab13	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab14	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab15	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K_Fab16	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
F1K_Fab17	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH1	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22401P2 (GH1)
F1K_Fab18	2+1 C-Fab	IgG1 K/H*, S-S	GH1	D3	GH2	45	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
KFB-FabN	2+1 N-Fab	IgG1 K/H*, S-S	BetV1	D3	GH1	30	17067P2 (BetV1), ADI-19842 (D3), 22414P2 (GH1)
KBK-scFvN	2+1 N-scFv	IgG1 K/H*, S-S	GH1	BetV1	GH1	30	22393P2 (GH1), 17067P2 (BetV1), 22414P2 (GH1)
F1k-scFv6LK7 IgG1 PVA	2+1 N-scFv	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	7	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)

表 7							
名稱	**模式**	**IgG 同型**	**ABS1 標靶**	**ABS2 標靶**	**ABS3 標靶**	**ABS3 連接子長度**	**親代抗體**
F1k-scFv6LK7 IgG4 S108P	2+1 N-scFv	IgG4 S108P	GH1	D3	GH2	7	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6LK15 IgG1 PVA	2+1 N-scFv	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6LK15 IgG4 S108P	2+1 N-scFv	IgG4 S108P	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6 IgG1 PVA	2+1 N-scFv	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6, IgG4s S108P	2+1 N-scFv	IgG4 S108P	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6, IgG1 N180G	2+1 N-scFv	IgG1 N180G	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-scFv6 IgG1	2+1 N-scFv	IgG1	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-Fab6, IgG1 PVA	2+1 N-Fab	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1k-Fab6, IgG4s S108P	2+1 N-Fab	IgG4s S108P	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K-Fab6 IgG1 N180G	2+1 N-Fab	IgG1 N180G	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
F1K-Fab6 IgG1	2+1 N-Fab	IgG1	GH1	D3	GH2	30	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
IgG1 PVA	2+1 N-Fab	IgG1 PVA	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
IgG4s S108P	2+1 N-Fab	IgG4s S108P	GH1	D3	GH2	15	22393P2 (GH1), ADI-19842 (D3), 22532P2 (GH2)
IgG4s	三特異性	IgG4	用於 IgG4 對照組之不相關標靶				

7.2. 實例 2：評估雙特異性模式之 KLB 和 FGFR1c 抗體

7.2.1. 選殖和表現雙特異性結合分子及對照結合劑

【0277】 使用IgG4 Fc和星狀突變產生含有實例1中所載錄之抗體結合結構域之雙特異性結合分子用以選擇如下表8中所示之正確配對的異二聚體：

表 8

	抗-FCFR1c(IgG4*)	**抗-KLB (hIgG4)**
REGN4366	ADI-19842	22393 (22393 重鏈/P2 通用輕鏈)
REGN4370	ADI-19851	22393 (22393 重鏈/P2 通用輕鏈)
REGN4355	ADI-19839	22393 (22393 重鏈/P2 通用輕鏈)
REGN4376	ADI-19863	22393 (22393 重鏈/P2 通用輕鏈)

【0278】 經由NEBuilder HiFi DNA組裝套組(New England BioLabs Inc.)或限制消化和綁紮，依照New England BioLabs Inc公司所提供的標準分子選殖方法，經由直接DNA合成或次選殖，將編碼KLB或FGFR1c VH和VL結構域之DNA片段插入含有帶有星狀突變(H435R，Y436F，EU編號)之人類IgG4或人類IgG4骨架的哺乳動物表現載體。產生CHO穩定表現細胞株。使用哺乳動物表現及使用蛋白A親和力、抗星狀親和力和粒徑排阻層析純化，製造並純化雙特異性物供分析。

【0279】 REGN4304之選殖、表現和純化，除了下列差異之外，係與所述的產生雙特異性結合分子相類似：1.將各KLB和FGFR1c半抗體之VH結構域插入帶有旋鈕突變(S354C，T366W，EU編號)之人類IgG4 Fc和帶有孔洞突變(Y349C，T366S，L368A，Y407V)及星狀突變(H435R，Y436F)之人類IgG4 Fc。2. 分開表現以FGFR1c或KLB為標靶的半抗體並經由所述的氧化還原黏合(redox annealing)組裝(Williams et al., 2015, Biocatalysts and Bioreactor Design (31)-5)。

【0280】 REGN1438之選殖、表現和純化，除了下列差異之外，係與所述的產生雙特異性結合分子相類似：1.將帶有N-端六His標籤(SEQ ID NO：42)之人類FGF21 (H29-S209, L174P)插入表現載體；2.使用HisTrap親和力層析和粒徑排阻層析純化。

7.2.2. FGFR1c/KLB活化之報導子分析

【0281】 使用穩定表現人類FGFR1c和KLB以及螢光酶報導子基因之HEK293.SREluc.hFGFR1c/hKLB細胞，於含有血清反應元件(SRE)之啟動子的控制下，檢測抗體其促效活性。使用帶有6xHis標籤(SEQ ID NO：42)之重組的人類FGF2作為正對照，其中從FGF2所得到的最大報導子活性係定義為100%活性。將細胞以各抗體或6xHis-FGF21處理6小時，及然後進行螢光酶分析。由個別抗體引發的活性百分比係就FGF21所引發的最大活性進行正常化。進行劑量-反應分析用以測定EC50。使用抗FelD1同型對照抗體REGN1945作為負對照。

7.2.3.結果

【0282】 劑量反應分析結果係如圖4中所示。如圖中所示，雙特異性結合分子的活性在活化KLB-FGFR1c上幾乎低於FGF21一個數量級。

7.3. 實例3：評估三特異性結合分子之FGFR1c/KLB活化作用

7.3.1. 背景

【0283】 藉由於REGN4366中加入另外的結合結構域希望增加其FGFR1c/KLB共-受體複合物之促效作用，產生與KLB的GH1和GH2結構域二者結合的三特異性結合分子。REGN4366為以KLB的GH1結構域和FGFR1c的D3結構域為標靶的雙特異性結合分子。如圖6A中所示，在分子的不同位置加入Fab或scFv形式之GH2結合臂及在分子之REGN4366部分和GH2結合臂之間連接子長度從3至6至9個重複單元之G4S連接子(SEQ ID NO：43)(亦即，範圍從15至45個胺基酸)。

7.3.2. 選殖和表現三特異性結合分子

【0284】 DNA片段，其係編碼(i)KLB或FGFR1c或BetV1 scFvs，以VL(帶有一100C突變，Kabat編號)，連接子(4xG4S (SEQ ID NO：44))和VH(帶有一44C，Kabat編號)之方向，接著用於連接scFvs與FGFR1c結合Fab之各種長度的連接子，(ii)KLB或FGFR1c或BetV1結合Fab，及(iii)合成帶有形成旋鈕突變(S354C，T366W，EU編號)，孔洞突變(Y349C，T366S，L368A，Y407V，EU編號)，糖基化突變(N297G，

EU編號)和星狀突變(H435R，Y436F，EU編號)之IgG1 Fc結構域，係由Integrated DNA Technologies, Inc. (San Diego, California) 、 GenScript (Piscataway, NJ) 或 Life Technologies (Carlsbad, CA)合成。

【0285】 依照New England BioLabs Inc公司所提供的標準分子選殖方法，藉由NEBuilder HiFi DNA組裝套組(New England BioLabs Inc.)或限制消化，接著綁紮，製造個別重鏈之哺乳動物表現載體。某些DNA片段係在Life Technologies (Carlsbad, CA)之pcDNA3.4 Topo表現系統中作為即用型結構。就圖6A中所述和表9A中所列的表現分子，係依照製造商的方法將重鏈(「Hc1-Knob」和「Hc2-Hole*」)和通用輕鏈的DNA共轉染至Expi293細胞(ThermoFisher Scientific)。收取50 ml的細胞培養基並經由HiTrap蛋白A FF管柱(GE Healthcare)進行純化處理。就功能確認，係將所選的MBM擴增至200 ml並進行一系列的純化製程，包括粒徑排阻層析作為最後步驟。

7.3.3. 三特異性結合分子之活性評估和組裝

【0286】 以如7.2.2章節中所述之報導子分析評估三特異性結合分子。

【0287】 藉由高通量分析於Cliper LabChip GX上，依照製造商的方法(Perkin Elmer, Waltham, MA)分析三特異性結合分子之組裝。簡言之，藉由將7 ml的HT蛋白表現樣本緩衝液與240 µl BME(還原)或25 mM碘乙醯胺(IAM，用於非還原分析)混合，製備樣本緩衝液。以樣本緩衝液將樣本正常化至0.5 mg/ml及然後於70°C加熱10分鐘。將70 µl的水加入各樣本中，之後載入儀器。根據製造商說明製備晶片。使用LabChip GX軟體分析樣本的電泳圖。非還原電泳圖的波峰係表示完整抗體的%。

7.4. 結果

【0288】 下表9A係顯示各種三特異性分子之組裝與活性百分比而下表9B係顯示帶有不同連接子長度之雙特異性2+1 N-scFv分子的活性。圖6B為表9B數據之長條圖。

表 9A			
模式	分子	組裝百分比%	活性百分比%
N-scFv	F1K_scFv1	98.4	5
N-scFv	F1K_scFv2	94.3	6.2
N-scFv	F1K_scFv3	100	28.9
N-scFv	F1K_scFv4	78.3	4.7
N-scFv	F1K_scFv5	83.3	3
N-scFv	F1K_scFv6	100	54.1
N-scFv	F1K_scFv7	94.3	5.5
N-scFv	F1K_scFv8	77.2	4.2
N-scFv	F1K_scFv9	100	20.7
N-scFv	F1K_scFv10	100	34.6
N-scFv	F1K_scFv11	60.4	31.5
N-scFv	F1K_scFv12	73.6	60.8
C-scFv	F1K_scFv13	100	28.8
C-scFv	F1K_scFv14	25	37.2
C-scFv	F1K_scFv15	32.6	59.1
C-scFv	F1K_scFv16	29.7	14.7
C-scFv	F1K_scFv17	10.7	35.9
C-scFv	F1K_scFv18	43.6	47.8
N-Fab	F1K_Fab1	100	2.2
N-Fab	F1K_Fab2	79.2	3.5
N-Fab	F1K_Fab3	100	31.5
N-Fab	F1K_Fab4	100	2.7
N-Fab	F1K_Fab5	97.3	5.5
N-Fab	F1K_Fab6	93.6	38.2
N-Fab	F1K_Fab7	19.2	8.2
N-Fab	F1K_Fab8	81	8
N-Fab	F1K_Fab9	93.9	39.3
C-Fab	F1K_Fab10	93.5	11.5
C-Fab	F1K_Fab11	100	18.4
C-Fab	F1K_Fab12	100	25.5
C-Fab	F1K_Fab13	51.3	15.9
C-Fab	F1K_Fab14	39.8	23.6
C-Fab	F1K_Fab15	88.2	29.9
C-Fab	F1K_Fab16	100	13.7
C-Fab	F1K_Fab17	43.8	23.5
C-Fab	F1K_Fab18	27.2	37.8
REGN1945	REGN1945	100	0

表 9B	
連接子長度	**活性百分比%**
LK7	104.5
LK15	97.5
LK22	87.9
LK30	66.4
LK37	80.4
LK45	78.7
FGF21	100

【0289】 此結果顯示在N-端併入另外的結構域(2+1 N-scFv或2+1 N-Fab三特異性結合分子(TBM)模式)比在C-端併入另外的結構域(2+1 C-scFv或2+1 C-Fab三特異性結合分子(TBM)模式)提供了較佳的組裝，然而在C-端併入另外結構域的2+1 C-scFv造成更佳的活性。

7.5. 實例4：比較三特異性與雙特異性結合分子之促效活性

7.5.1. 材料和方法

【0290】 將包含實例3中所述的2+1 N-scFv (F1K_scFv6)和2+1 N-Fab (F1K_Fab6)三特異性分子之促效活性與實例2中所述的雙特異性分子(REGN4304和REGN4366)之促效活性使用7.2.2章節中所述的報導子分析相比較。

【0291】 HEK293.FGFR1c基因剔除細胞為穩定過度表現FGFR1c或KLB或FGFR1c+KLB。將細胞置於添加10%的FBS(Gibco, USA)之DMEM(Gibco, USA)中在標準條件下培養(37°C含有5% CO2之濕化大氣中)。就流式結合分析，係以1×10^5個細胞/100 μL/孔植入96孔盤中。使用添加1% FBS無Ca/Mg 之PBS作為染色緩衝劑供抗體稀釋及後續清洗。將細胞以特定量的初級抗體於4°C培養30 min。清洗二次後，於4°C進行二級抗體染色($F(ab')_2$ Fcγ片段特異性，Jackson immune research，109-136-098)。在後續清洗後，將細胞於室溫以2%三聚甲醛固定30 min。清洗固定的細胞並再懸浮於200 μL的染色緩衝液中供流式細胞分析。於流式細胞儀(Fortessa)

上獲得每個樣本至少10,000個單一細胞並分析數據及以FlowJo程式計算Max MFI。使用Graphpad Prism 軟體繪製圖式。

7.5.2. 結果

【0292】 結果係如下圖7A、表10 (報導子分析之活性%)和表11(對KLB和FGFR1c的結合親和力)中所示。

表 10

分子	說明	活性%	EC50(M)
REGN1438	6His-FGF21	100	2.9E-09
REGN4366	雙特異性結合分子	24.8	2.4E-08
F1K_scFv6	2+1 N-scFv	65.9	1.9E-09
F1K_Fab6	2+1 N-Fab	39.9	2.1E-09
REGN4304	雙特異性結合分子	23.5	7.2E-09

表 11

分子	hKLB 結合 KD (M)	hFGFR1c 結合 KD (M)
F1K_scFv6	1.47E-11	2.11E-06
F1K_Fab6	1.18E-11	2.29E-06
REGN4304	4.40E-11	1.09E-07
REGN4366	2.55E-08	5.39E-07

【0293】 圖7B係描繪雙-和三特異性結合分子與FGFR1c和KLB之結合。無受限於理論，咸信此實例之數據顯示hKLB之雙表位締合提升了抗體媒介的KLB/FGFR1c受體複合物相互作用及潛在的細胞表面叢集。

7.6. 實例5：三特異性模式之最適化

【0294】 進行三回合的篩選用以最適化三特異性結合分子之活性。

【0295】 在第一回合的篩選中，GH2結合部分係經取代及變換隔開GH2-結合部分和結合分子之其餘部分的連接子長度從15個胺基酸至45個胺基酸。如7.3.2章節所述建構及表現分子並將生成的分子以7.2.2章節中所述的報導子分析評估。結果係如下表12中所示：

表 12						
	1	**2**	**3**	**連接子**	**活性%**	**EC50**
REGN1945	IgG4 同型對照組					
REGN1438	6His-FGF21				100	3.4E-09
F1K_Fab1	22393	ADI-19842	22414	15	2.2	5.0E-10
F1K_Fab2	22393	ADI-19842	22401	15	3.5	1.9E-09
F1K_Fab3	22393	ADI-19842	22532	15	31.5	6.5E-10
F1K_Fab4	22393	ADI-19842	22414	30	2.7	8.5E-10
F1K_Fab5	22393	ADI-19842	22401	30	5.5	1.3E-09
F1K_Fab6	22393	ADI-19842	22532	30	38.2	6.2E-10
F1K_Fab7	22393	ADI-19842	22414	45	8.2	3.7E-08
F1K_Fab8	22393	ADI-19842	22401	45	8.0	3.6E-09
F1K_Fab9	22393	ADI-19842	22532	45	39.3	1.8E-09
KFB_FabN	17067	ADI-19842	22414	30	1.8	8.3E-10
F1K_scFv1	22393	ADI-19842	22414	L20H15	5.0	3.9E-09
F1K_scFv2	22393	ADI-19842	22401	L20H15	6.2	3.7E-08
F1K_scFv3	22393	ADI-19842	22532	L20H15	28.9	7.9E-09
F1K_scFv4	22393	ADI-19842	22414	L20H30	4.7	3.5E-09
F1K_scFv5	22393	ADI-19842	22401	L20H30	3.0	4.7E-08
F1K_scFv6	22393	ADI-19842	22532	L20H30	54.1	9.8E-10
F1K_scFv7	22393	ADI-19842	22414	L20H45	5.5	3.6E-09
F1K_scFv8	22393	ADI-19842	22401	L20H45	4.2	4.2E-08
F1K_scFv9	22393	ADI-19842	22532	L20H45	20.7	2.4E-09
KBK_scFvN	22393	17067	22414	L20H30	2.1	1.2E-09

7.7. 實例 6：三特異性模式之進一步最適化

【0296】 在另外回合的篩選中，以0.章節中所述的報導子分析評估圖8A (除了其他外，帶有連接子長度變體)和圖8B (帶有重新配置的GH1、GH2和FGFR1c結構域)中所示的變體。就指定為2和3結構域之間的連接子長度變體之結果係如圖9和下表13中所示：

表 13						
	1	**2**	**3**	**連接子**	**EC50**	**活性%**
REGN1438	6His-FGF21				5.7E-10	100.0
F1K_scFv6-LK7	22393	ADI-19842	22532	L20H7	1.7E-09	104.5
F1K_scFv6-LK15	22393	ADI-19842	22532	L20H15	1.6E-09	97.5
F1K_scFv6-LK22	22393	ADI-19842	22532	L20H22	1.3E-09	87.9
F1K_scFv6-LK30	22393	ADI-19842	22532	L20H30	2.0E-09	84.2
F1K_scFv6-LK37	22393	ADI-19842	22532	L20H37	1.1E-09	80.4
F1K_scFv6-LK45	22393	ADI-19842	22532	L20H45	1.5E-09	78.7
REGN4304					1.8E-09	42.0

7.8. 實例7：活化HEK293細胞中FGFR1c訊號傳遞

7.8.1. 材料和方法

【0297】 藉由連續以SRE-螢光酶報導子基因、全長人類FGFR1c和全長人類KLB質體轉染HEK293細胞，產生HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB穩定細胞株。就西方墨點分析，係將HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB細胞植入6-孔盤中，並於含有10%胎牛血清(FBS)之完全培養基中培養至隔夜。將培養基換成添加0.1% FBS之Opti-MEM減少血清培養基(ThermoFisher, USA)。大約24 hr後，將稀釋的配體加入細胞中至最終1 nM或10 nM濃度。15分鐘的處理之後，以冷的PBS清洗細胞，及然後以RIPA解離緩衝液解離(150 mMTris/HCl，pH 7.4，50 mM NaCl, 1% NP-40和0.1% Tween 20)。藉由SDS-PAGE解析總細胞解離液，並轉置於PVDF膜上。就西方墨點分析，係使用下列初級抗體：總ERK(Cell Signaling, 9102)，磷酸-ERK (Cell Signaling, 9101)，PLC-γ(Cell Signaling, 5690)，磷酸-PLCγ(Cell Signaling, 2821)。就螢光酶分析，係將HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB細胞植入384-孔盤中，並於含有10%胎牛血清(FBS)之完全培養基中培養至隔夜。將培養基換成添加0.1% FBS之Opti-MEM減少血清培養基(ThermoFisher, USA)。大約24 hr後，以連續稀釋的配體將細胞處理6 hr，及然後使用ONE-Glo™螢光酶分析系統(Promega, USA)，根據製造商說明書，進行螢光酶分析。

7.8.2. 結果

【0298】 為了測定F1K_scFv6和F1K_scFv6LK7之促效活性，吾等處理穩定表現人類FGFR1c和人類KLB之HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB細胞，並測量由活化FGFR1c所引的ERK和PLC-γ磷酸化作用(圖10A)。F1K_scFv6LK7和F1K_scFv6LK7二者在1 nM和10 nM濃度時強力引發ERK和PLC-γ磷酸化作用。值得注意地，在F1K_scFv6或F1K_scFv6LK7處理過的細胞中，磷酸-ERK和磷酸-PLC-γ量明顯高於

該等經對應濃度之親代雙特異性抗體(REGN4366)、FGFR1/KLB促效劑雙特異性抗體(REGN4304)或重組的人類FGF21(REGN1438)處理過的量。

【0299】 為了評估以F1K_scFv6處理之FGFR1c活化的時間期，係將HEK293.SREluc.hFGFR1c.hKLB細胞以配體處理歷時不同的時間，並收取進行西方墨點分析(圖10B)。在以REGN1438、REGN4304或F1K_scFv6處理後15分鐘，觀察到以磷酸-ERK量所測量的ERK活化，其持續高達6小時。在處理的整個時間期中，相較於REGN1438或REGN4304，F1K_scFv6顯示較高的磷酸-ERK量。F1K_scFv6在15分鐘的時間點強力引發磷酸-PLCγ，然後隨時間逐漸下降。

7.9. 實例8：活化脂肪細胞中的ERK

7.9.1. 材料和方法

【0300】 從Zen-Bio公司獲得皮下人類前脂肪細胞並維養於6-孔盤由Zen-Bio公司所提供的前脂肪細胞培養基中。藉由將全滿的前脂肪細胞培養於脂肪細胞分化培養基中14天，使前脂肪細胞分化成脂肪細胞。就西方墨點分析，係將分化的脂肪細胞以添加0.1% FBS的Opti-MEM減少血清培養基(ThermoFisher, USA)預處理4小時，及然後以藥物處理15分鐘。以冷的PBS清洗細胞，及然後以RIPA緩衝液解離供西方墨點分析。

【0301】 從Zen-Bio公司獲得分化的人類皮下脂肪細胞並維養於96-孔盤Zen-Bio公司所提供的脂肪細胞陪維持培養基中。就磷酸-ERK分析，係將細胞以添加0.1% FBS的Opti-MEM減少血清培養基(ThermoFisher, USA)預處理4小時，及然後以連續稀釋的配體或抗體處理。使用AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)分析套組(Perkin Elmer, Waltham, MA)，遵循製造商的建議，測定ERK磷酸化的量。

7.9.2. 結果

【0302】 就測定F1K_scFv6和F1K_scFv6LK7在內生性表現FGFR1c和KLB之人類脂肪細胞中的促效劑活性，係將原代人類脂肪細胞以這些分子處理(圖11A)。在

脂肪細胞分化期間引發KLB表現。F1K_scFv6和F1K_scFv6LK7在人類脂肪細胞中引發了與REGN1438(亦即，FGF21)處理相當的磷酸-ERK。

【0303】 就測定F1K_scFv6和F1K_Fab6對FGFR1c訊號傳遞之計量-依賴的效用，係將人類脂肪細胞以連續稀釋的藥物處理，使用AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)套組測量磷酸-ERK量(圖11A)。F1K_scFv6和F1K_Fab6以高於親代雙特異性抗體(REGN4366)和REGN4304的效用強力引發p-ERK，其表示F1K_scFv6和F1K_Fab6為活化FGFR1c/KLB訊號傳遞的強力促效劑。

7.10. 實例9：藉由不對稱流場流分離結合多角度光散射(A4F-MALLS)之活體外KLB、FGFR1c和結合分子間所形成的複合物之大小分析

7.10.1. 概述

【0304】 原則上，如圖12A和圖12B所示，本揭示文之三特異性結合分子可與FGFR1c和KLB形成不同類型的的複合物。就測定所形成的複合物類型，係使用不對稱流場流分離結合多角度光散射(A4F-MALS)進行活體外2+1 N-scFv和2+1 N-Fab三特異性結合分子間所形成的複合物之大小分析。亦使用A4F-MALLS分析由對照雙特異性結合分子(REGN4304)和單特異性KLB結合分子(REGN4661)所形成的複合物。

7.10.2. 材料和方法

7.10.2.1. A4F-MALLS移動相緩衝液

【0305】 藉由將1.4 g磷酸二氫鈉單水合物、10.7 g磷酸氫二鈉七水合物和500 mL 5 M氯化鈉混合，製備移動相緩衝液(10 mM磷酸鈉，500 mM氯化鈉，pH 7.0 ± 0.1)；然後將溶液以HPLC等級的水加至體積5.0 L。緩衝液最終測量的pH為7.0。使用前將移動相緩衝液過濾(0.2 μm)。

7.10.2.2. A4F-MALLS

【0306】 A4F-MALLS系統係由配置有紫外光(UV)二極體陣列偵測器、Wyatt Technology Dawn HELEOS® II雷射光散射儀器(LS)及Optilab® T-rEX示差折射計(RI)偵測器之Eclipse™ 3+ A4F分離系統結合Agilent 1200 Series HPLC系統所組成。偵測器係以下列順序連續連接：UV-LS-RI。根據Wyatt Technology公司所提供的說明書校正LS和RI偵測器。

【0307】 將定義量的抗-KLB和抗-FGFR1c多特異性結合分子候選物各自與REGN6424 (重組的KLB)和REGN6152 (重組的FGFR1c)組合並以1X DPBS, pH 7.4稀釋，得到等莫耳比：0.2 μM多特異性結合分子：0.2 μM REGN REGN6424或0.2 μM多特異性結合分子：0.2 μM REGN REGN6424：0.2 μM REGN REGN6152。所有的樣本係於周圍溫度培養2小時並在4°C維持未過濾，之後注射至配置W350箔襯(350 μm襯片厚度，2.2 cm襯片寬度)之Eclipse™短通道及使用10 kDa MWCO再生纖維素膜。以移動相緩衝液(10 mM磷酸鈉，500 mM氯化鈉，pH 7.0 ± 0.1)將通道預平衡，之後注射至各樣本。分別注射牛血清白蛋白(BSA；2 mg/mL；10 μg樣本負荷)及納入作為系統適合性對照。

【0308】 分離法係由四個步驟所組成：注射、聚焦、溶離和通道「清洗」步驟。整個分離法係使用A4F-MALLS移動相緩衝液(10 mM磷酸鈉，500 mM氯化鈉，pH 7.0 ± 0.1)。將各樣本(7 μg)以0.2 mL/min的流速注射1 min及隨後以1.0 mL/min的聚焦流速聚焦3 min。將樣本以1.0 mL/min通道流速與連續交叉流3.0 mL/min溶離15 min，接著於5 min期間從3.0 mL/min至0 mL/min的線性梯度交叉流。最後將交叉流保持在0 mL/min另再持續5 min用以清洗通道。使用相同的參數設定分離BSA。

7.10.2.3. MALLS數據分析

【0309】 使用ASTRA V軟體分析數據(5.3.4.14版本，Wyatt Technology)。將數據與過量散射光和溶質濃度及重量平均莫耳質量Mw關係之方程式擬合(Kendrick et al., 2001, Anal Biochem. 299(2)：136-46；Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272(1)：1-40)：

方程式1： $$\frac{K^*c}{R(\theta,c)}=\frac{1}{MwP(\theta)}+2A_2c$$

其中c為溶質濃度，R(θ,c)為來自溶質之超瑞立比值(excess Raleigh ratio)，為散射角和濃度之函數，Mw為莫耳質量，P(θ)係描述散射光的的角度相依性(對於迴轉半徑< 50 nm的粒子為~1)，A2為擴增的滲透壓之第二維里係數(virial coefficient)(其可忽略因為測量係在稀溶液中進行)及

方程式2： $$K^*=\frac{4\pi^2n_0^2}{N_A\lambda_0^4}\left(\frac{dn}{dc}\right)^2$$

其中n0係代表溶劑折射率，NA為亞佛加厥數(Avogadro's number)，λ0為真空中入射光的波長，而dn/dc係代表溶質之特定的折射率增量。

【0310】 BSA單體之莫耳質量係用來評估數據收集期間光散射和示差折射率偵測器之校正常數(系統適合性檢查)。從UV和RI偵測器所測定的BSA平均莫耳質量之相對標準偏差為≤ 5.0%。

【0311】 光散射偵測器，偵測器之間的延遲體積和譜帶寬化關係之正常化係數係就所用的A4F-MALLS條件從收集的BSA層析圖來計算。這些數值係應用所有其他樣本之數據檔案用以校正這些項目。

【0312】 dn/dc值和215 nm的吸光係數係使用Astra軟體中所提供的蛋白接合物分析以實驗來測定。校正的吸光係數和dn/dc值係用來分析所有的蛋白-蛋白複合物樣本。

7.10.3. 結果

【0313】 A4F-MALLS係用來評估重組KLB (REGN6424)、重組FGFR1c (REGN6152)和數個單特異性(REGN4661)、雙特異性(REGN4304)及三特異性(2+1 N-scFv和2+1 N-Fab)結合分子間所形成的複合物之相對大小分布。結果係如圖13A (REGN4661)，圖13B (4304)，圖13C (2+1 N-scFv 模式)和圖13D (2+1 N-Fab模式)中所示。提供潛在抗體：抗原複合物之理論莫耳質量和預測的化學計量係如圖

13A-13D中所述。如預期的，當以等莫耳比組合，單特異性KLB結合分子(REGN4661)與KLB形成典型的1：1 (波峰1, ~280 kDa)和1：2 (波峰2, ~356 kDa)複合物(圖13A)。同樣地，當對照雙特異性結合分子(抗-KLBxFGFR1c；REGN4304)與等莫耳量的KLB混合時，觀察到理論莫耳質量~280 kDa之離散的同質波峰(波峰1)(圖13B)。以個別組份之理論的莫耳質量為基準，波峰1可能代表1：1雙特異性：KLB複合物。與此混合物中另外加入FGFR1c產生一理論莫耳質量範圍~305-444 kDa之寬波峰(波峰2)，其一般而言係與1：1：1雙特異性：KLB：FGFR1c三元複合物一致(圖13B)。在波峰2尾端莫耳質量向上的趨勢顯示經由KLB-FGFR1c相互作用弱結合的較大複合物，可能存在溶液中，但容易在分離後解離。

【0314】　與對照的單特異性和雙特異性結合分子相比較，各新穎的三特異性結合分子係以獨特、較高階的化學計量結合KLB和FGFR1c。當與等莫耳量的KLB混合時，F1K-scFv6 IgG1形成具有~579 kDa莫耳質量之大的離散、同質波峰(波峰1)，其可能代表一含有2個分子的F1K-scFv6 IgG1與2個分子的KLB結合的複合物(2：2複合物；圖13C)。在混合物中加入不同量的FGFR1c後，觀察到具有~607-644 kDa理論莫耳質量範圍之稍微較廣、後溶離出的波峰(波峰2)。波峰2可能係代表含有2個分子的F1K-scFv6 IgG1，2個分子的KLB和1-2個分子的FGFR1c之三元複合物的混合物(2：2：1和2：2：2複合物；圖13C)。相反的，F1K-Fab6 IgG似乎係單獨與KLB形成2：2和2：3複合物之廣的異質混合物(波峰2；681-811 kDa)，而後續加入FGFR1c造成二者溶離變動且莫耳質量係與2：2：1 F1K-Fab6 IgG ：KLB：FGFR1c三元複合物一致(波峰3，~720-730 kDa；圖13D)。在這些樣本中亦可觀察到與1：1：1 F1K-Fab6 IgG：KLB：FGFR1c複合物一致的次要波峰(波峰1；~362 kDa)。代表F1K-Fab6 IgG、KLB和FGFR1c之複合物的波峰寬度可能顯示所生成的複合物採取異質構型及/或在分離後快速解離。綜合起來，相較於對照的單特異性和雙特異性

結合分子，這些數據顯露二種三特異性結合分子可結合KLB和FGFR1c形成具有獨特化學計量之三元複合物。

7.11. 用於三特異性抗體之恆定結構域變體的材料和方法(實例10至14)

7.11.1. 恆定結構域變體的載體結構

【0315】 由 Integrated DNA Technologies 公司 (San Diego, California) 或 Geneart/Thermo Fisher Scientific公司(Regensburg, Germany)合成編碼抗-KLB GH1 Fab、抗-KLB GH2 Fab、抗-KLB GH2 scFv和抗-FGFR1c Fab結構域之DNA片段；各種胺基酸連接子；和各種IgG絞鏈和Fc結構域。

【0316】 藉由NEBuilder HiFi DNA組裝套組(New England BioLabs Inc.)或限制消化，接著New England BioLabs公司所提供的標準分子選殖方法製造用於個別多肽鏈的哺乳動物表現載體。依照製造商的方法，將DNA轉染為單一質體或為重鏈和輕鏈對。收取50 ml的細胞培養上清液並經由HiTrapTM 蛋白G HP或MabSelect SuRe pcc 管柱(Cytiva)進行純化處理。

【0317】 藉由過渡性轉染將特定結構表現在Expi293F™細胞中(Thermo Fisher Scientific)。以HiTrapTM 蛋白G HP或MabSelect SuRe pcc管柱(Cytiva)使用ProteinMaker系統(Protein BioSolutions, Gaithersburg, MD)純化Expi293F上清液中的蛋白。單步驟溶離後，將抗體中和，透析至含有5%甘油的最終磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)之緩衝液中，分成等份並儲存於-80°C。就某些結構，使用HiPrep 26/60 Sephacryl S-200管柱之粒徑排阻層析的額外步驟。

【0318】 其他的表現載體係穩定表現於中國倉鼠卵巢(CHO)表現系統。

7.11.2.以Biacore測量Fc受體結合之動力學

【0319】 簡言之，於25°C在一Biacore T200儀器上應用塗覆羧甲基右旋糖酐(CM-5)的晶片進行表面電漿共振(SPR)實驗。將小鼠單株抗-五-組胺酸抗體(GE Healthcare)，使用標準胺-偶聯化學固定在CM-5感測晶片的表面。將His-標定的人

類、猴子或小鼠FcγR蛋白之140RU-376RU捕捉至抗-五-組胺酸胺-偶聯CM-5晶片並於捕捉的蛋白上以50 μl/min注射抗體儲存液歷時2 min及連續稀釋(6uM-24.7nM)。監測mAb結合反應及，就低親和力受體，計算穩態結合平衡。使用 Scrubber 2.0曲線擬合軟體藉由處理數據和將其與1：1結合模型擬合，測定動力學結合率(ka)和解離率(kd)常數。從動力學速率常數計算結合解離平衡常數(KD)和解離半衰期(t1/2)為：KD (M)=kd/ka；及t1/2 (min)=(In2/(60*kd)。某些KD係使用穩態平衡解離常數所衍生；NB =無觀察到結合；IC=由於低的特定RU訊號造成不確定親和力測定

7.11.3. 酵素連結免疫吸附分析(ELISA)

【0320】 將微量滴定盤的孔槽塗覆上(18 h，4°C)溶於100μl之PBS的4 μg/ml 6x-His(SEQ ID NO：42)標籤單株抗體(4E3D10H2/E3)(Thermo scientific)及然後於室溫以阻斷緩衝液(2% BSA之PBS溶液)阻斷1h。以雙重複載入不同的Fc受體(2 μg/ml, 100 μl/孔)並於室溫培養1 h。其間，將抗體以1：5的比率從6.0 x 10^{-06} M的起始濃度稀釋於阻斷緩衝液中。然後將稀釋的抗體(100 ul)加入孔槽中並於室溫培養1 h。於室溫加入過氧化酶-接合的山羊抗-人類IgG，$F(ab')_2$偵測抗體100ul/孔(1：5000溶於阻斷緩衝液)歷時1 h並藉由加入100 μl過氧化酶基質(KPL-TMB)讓反應顯像歷時30 min。以100 μl TMB停止緩衝液讓反應停止並使用ELISA盤式判讀儀(Envision, PerkinElmer)測量450 nm的吸收度。在每個步驟後，以清洗緩衝液(PBS，pH 7.4，含有0.05% (v/v) Tween 20)清洗測定盤三次。

7.11.4. 替代ADCC分析

7.11.4.1. 標靶細胞

【0321】 將其中內生性FGFR1已藉由CRISPR-Cas9切除的HEK293/hFGFR1c/hKLB/hCD20：HEK293細胞進行工程改造用以持續性表現全長人類CD20 (hCD20，登錄編號NP_690605.1之胺基酸M1-P297)，FGFR1c (hFGFR1c，

登錄編號NP_075594之胺基酸M1-R731)和KLB (hKLB，登錄編號NP_783864.1之胺基酸M1-S1044)。分選高表現所有受體之細胞。

7.11.4.2. 報導子細胞

【0322】 將Jurkat/NFAT-Luc/FcγR3a 176Val：Jurkat T細胞進行工程改造用以穩定表現活化的T-細胞之核因子(NFAT)螢光酶報導子結構以及高親和力人類FcγR3a 176Val同種異型受體(登錄編號P08637 VAR_003960之胺基酸M1-K254)。

7.11.4.3. 分析設定

【0323】 在實驗的三天前，將Jurkat報導子細胞分成1.25 x 10^5個細胞/ml置於RPMI1640 + 10% FBS + P/S/G + 0.5 μg/ml嘌呤黴素(puromycin)+ 500 μg/ml G418生長培養基中。在實驗當天，將標靶和報導子細胞轉置於分析培養基中(RPMI + 10% FBS + P/S/G)並以1：比率(各細胞類型3 x 10^4/孔)加到96-孔白色微量滴定盤中。將多特異性抗-FGFR1c/KLB抗體和hIgG4 S108P同型對照抗體以7-個點，範圍從73.2 pM至300 nM最終濃度的1：4連續稀釋液滴定，其中最後第8個點不含有抗體，並以雙重複加到細胞中。將滴定盤於37˚C/5% CO2培養4.6 h，接著加入等體積的ONE-Glo™ (Promega)試劑溶離細胞並偵測螢光酶活性。發射光係捕捉至多-標記盤式判讀儀Envision (PerkinElmer)上以相對光單位(RLU)表示。從4參數邏輯斯蒂方程式於8-點劑量反應曲線上(包括背景訊號)使用GraphPad Prism軟體測定抗體的EC50值。使用下列方程式計算最大引發倍數：

引發倍數 = 各抗體之受試劑量內的最大平均RLU/平均RLU(背景訊號=無抗體)

7.11.5. 穩定表現和抗體效價

【0324】 將具有各種IgG亞型之編碼不同抗體的重組蛋白選殖至表現載體，轉染至CHO細胞並在以400 mg/L潮黴素(hygromycin)選擇12-14天後，分離出穩定轉染池。使用生長於化學成份確定無蛋白培養基之懸浮液中的CHO-細胞池製造試驗用的蛋白。

【0325】 藉由0.5mg/L去氧羥四環黴素(Doxycycline)的誘發細胞培養歷時5天製造蛋白並收取該調節培養基。以Octet儀器(ForteBio)使用蛋白A感測器對比各種濃度的已知標準，測定蛋白效價。

7.11.6. 螢光酶報導子分析

【0326】 將包括不同IgG絞鏈和Fc結構域的抗體使用穩定表現人類FGFR1c和KLB以及螢光酶報導子基因之HEK293.SREluc.hFGFR1c/hKLB細胞，在含有血清反應元件(SRE)之啟動子的控制下檢測其促效劑活性。使用帶有6xHis (SEQ ID NO：42)標籤之重組的人類FGF21做為正對照，其中得自FGF21之最大報導子活性係定義為100%活性。以各抗體或6xHis-FGF21將細胞處理6小時，及然後進行螢光酶分析。對比FGF21的最大活性，將個別抗體引發的活性百分比正常化。進行劑量反應分析用以測定EC50。使用抗FelD1同型(hIgG4-S108P)對照抗體作為負對照。

7.11.7. 人類原代脂肪細胞訊號傳遞分析

【0327】 從Zen-Bio公司(Durham, NC)得到皮下前脂肪細胞分化的人類原代脂肪細胞。將細胞培養於無血清培養基4小時，及然後以連續稀釋的抗體處理15分鐘。使用解離緩衝液解離細胞供AlphaScreen™ SureFire™ ERK分析套組用於測量經處理細胞解離液中的磷酸-ERK(PerkinElmer, Shelton, CT)。根據製造商的方法進行SureFire™ ERK分析。檢測His-標定的人類FGF21和同型對照人類IgG4抗體分別作為正對照和負對照。本實驗亦包括FGFR1c/KLB雙特異性抗體。

7.12. 實例10：設計，選殖和表現IgG1 PVA恆定結構域

7.12.1. 概述

【0328】 IgG1 Fc和IgG4 Fc具有不同的Fcγ受體結合能力和電荷分布，其係對最適性Fc功能締合和與抗體構件，例如Fab、scFv和替代模式抗體融合蛋白的不同相容性提供選擇。IgG1和IgG4的絞鏈區亦具有不同的長度和彈性。IgG4(S108P或S228P，EU編號)已用於多個核准的抗體產品中，例如帕博利珠單抗

(pembrolizumab)、納武單抗(nivolumab)和依奇珠單抗(Ixekizumab)，其中需要降低Fc效應子功能。由於抗體構件(例如，Fab、scFv)對於特定免疫球蛋白亞型的偏好，係尋求以人類IgG1 Fc-為基準和與IgG (S108P)不同的天然序列變體–其顯現降低的Fcγ受體結合和降低的Fc受體效應子功能。

【0329】 圖17係呈現從胺基酸226至447 (EU編號)，各種IgG絞鏈/Fc變體與各種野生型及經修飾的人類IgG1和IgG4絞鏈區間之序列的比對和所用的CH2 CH3 Fc區之說明。hIgG1 PVA係經設計在不同的全長-IgG1背景之下絞鏈區中包括PVA突變(例如，IgG1上絞鏈，CH2和CH3區)。

【0330】 就檢測hIgG1 PVA的性質，係將其併入具有2+1 N-scFv或2+1 N-Fab模式之替代模式的抗體中(參見，例如，圖5之2+1 N-scFv模式的圖示說明；在2+1 N-Fab模式中，N-端scFV結構域係被Fab結構域取代，亦如圖5所示)。

7.12.2. 結果

【0331】 成功地表現和純化併入各種IgG絞鏈和Fc結構域的對照組和雙特異性抗體。

【0332】 當表現在CHO細胞時，在scFv和Fab之間帶有不同連接子長度之IgG1 PVA骨架中的F1K_scFv6結構比包括IgG4 S108P的結構具有較高的抗體效價(總抗體種類的測量)(圖18)。

7.13. 實例11：對Fcγ受體之恆定結構域變體的結合動力學

7.13.1. 概述

【0333】 帶有不同絞鏈-Fc區之各種抗體對於Fcγ受體的結合親和力和訊號係如0.章節所述藉由Biacore測量。

7.13.1.1. 結果

【0334】 結果係如下表14和15中所示。

表 14

帶有各種 Fc 變體之抗體與人類 FcγR 結合之結合訊號

	FcR 捕捉(RU)	615.9 ± 0.8	164.4 ± 0.4	364.4 ± 0.6	378.2 ± 1	208 ± 1.7	899 ± 2.7	548 ± 2.4
抗體	**Fc 變體**	**人類 FcγRI**	**人類 FcγRIIa (R131)**	**人類 FcγRIIa (H131)**	**人類 FcγRIIb**	**人類 FcγRIIIa (F176)**	**人類 FcγRIIIa (V176)**	**人類 FcγRIIIb**
mAb1	**hIgG1**	1606	457	614	833	322	2228	1028
mAb2	**hIgG4 S108P**	1475	181	393	737	28	429	-2
mAb3	**hIgG4s**	36	340	419	226	6	34	-8
AF2a	**hIgG1 PVA**	6	91	21	-1	4	144	-5
AF2c	**hIgG1 N180G**	518	-5	-9	-9	-5	-11	-7

表 15

高和低親和力 FcγR 結合之 KD(M) 值

抗體	**Fc 變體**	人類 FcγRI	人類 FcγRIIa (R131)	人類 FcγRIIa (H131)	人類 FcγRIIb	人類 FcγRIIIa (F176)	人類 FcγRIIIa (V176)	人類 FcγRIIIb
mAb1	**hIgG1**	1.76E-09	3.40E-07	3.40E-07	5.40E-07	1.02E-06	6.20E-07	1.02E-06
mAb2	**hIgG4 S108P**	5.35E-09	5.70E-06	1.50E-06	7.20E-07	WB	4.90E-06	NB
mAb3	**hIgG4s**	NB	1.32E-06	1.61E-06	1.23E-05	NB	WB	NB
AF2a	**hIgG1 PVA**	NB	WB	WB	NB	NB	7.20E-05	NB

AF2c	**hIgG1 N180G**	2.21E-06	NB	NB	NB	NB	NB	NB

【0335】 表15中，NB係指無結合；WB係指弱結合

【0336】 IgG1 PVA在FcγR1、FcγR2b、 FcγR3a (F176)、FcγR3b中無結合訊號。對FcγR2a (R131和H131二者)具有低的結合訊號，但相較於IgG1和IgG4 S108P，量明顯下降(分別為91和21 RU)。IgG1 PVA對FcγR3a (V176)具有弱至中的結合訊號(144 RU)，KD = 7.2 x 10^{-05} M，比IgG1和IgG4 S108P弱很多(表14和表15)。

7.14. 實例12：與Fcγ受體之ELISA結合

7.14.1. 概述

【0337】 藉由ELISA如7.11.3章節中所述，評估包括各種IgG絞鏈和Fc區之FGFR1c/KLB三特異性抗體的結合。

7.14.2. 結果

【0338】 顯示對照抗體和試驗抗體結合各種Fcγ受體之能力的結合曲線係描繪於圖19A-19G中。包含野生型IgG1絞鏈和Fc結構域之抗體展現與hFCRγ1最高的結合。hFCRγ1與IgG1 PVA的結合明顯下降，顯示與IgG4類似的結合(圖19A)。與IgG1 N180G結合同樣為下降的。相對於野生型type IgG1，IgG4 S108P與hFCRγ1結合僅展現些微下降。在與hFCRγ3A(V158)和hFCRγ3A(F158)的結合中觀察到類似的趨勢(圖19E, 圖19F)。在hFCRγ2A(H131)和hFCRγ2A (R131)觀察到非常小的結合差異(圖19B和圖19C)。但IgG1 PVA具有比IgG4 S108P更弱的結合且在hFCRγ2B中比IgG1稍弱(圖19D)。在hFCRγ3B中，IgG1 PVA具有少於IgG1的結合(圖19G)。

7.15. 實例13：抗體依賴的細胞毒性

7.15.1. 概述

【0339】 利用7.11.4章節中所述之替代抗體-依賴的細胞毒性(ADCC)分析，測定IgG1 PVA的細胞毒性活性並與其他IgG變體(例如，IgG1 N180G和IgG4 S108P)之細胞毒性活性相比較。

【0340】 於代理生物分析中使用報導子細胞和與抗體結合的標靶細胞測量以hFGFR1c和hKLB為標靶的三特異性抗體與FcγR3a(一種顯著表現在NK細胞上，引發抗體依賴的細胞媒介細胞毒性(ADCC)之Fc-受體)相互作用之能力。在此分析中，經工程改造的Jurkat T細胞係在轉錄因子NFAT (NFAT-Luc)與高親和力人類FcγR3a ^{176}Val同種異體瘦體的控制下表現報導子基因螢光酶(Jurkat/NFAT-Luc/hFcγR3a ^{176}Val)。標靶細胞為經工程改造用以表現人類CD2與全長的人類FGFR1c和人類KLB組合之HEK293細胞。以標靶細胞培養報導子細胞並經由與標靶細胞結合的人類IgG1抗體之Fc結構域來結合FcγR3a，導致報導子細胞中的轉錄因子NFAT活化並驅動螢光酶表現，然後經由發光讀數測量螢光酶表現。

7.15.2. 結果

【0341】 來自ADCC分析的代表性數據係描繪於圖20和21中。僅帶有野生型IgG1的抗體F1K_scFv6-LK30 IgG1和F1K_Fab6-LK30 IgG1顯示引發螢光酶訊號，分別為1.9倍(EC50 = 307 pM)和3.4倍(EC50 = 1.04 nM)。帶有IgG1 PVA之2+1 N-scFv或2+1 N-Fab模式的三特異性抗體IgG1 N180G或IgG4 S108P在替代ADCC分析中並無顯示活性。

7.16. 實例14：分子活性

7.16. 概述

【0342】 利用描述於0和0章節中的螢光酶報導子分析和人類原代脂肪細胞分析，檢測包括IgG1 PVA之FGFR1c/KLB三特異性抗體和對照抗體之活性。

7.16.1. 結果

【0343】 三特異性抗體在HEK.293SREluc.hFGFR1c/hKLB中的活性係顯示於圖22 (F1K_scFv6-LK30 ， IgG1 PVA 和 F1K_scFv6-LK30 ， IgG4 S108P) 和 圖 22 (F1K_Fab6-LK30，IgG1 PVA；F1K_Fab6-LK15，IgG1 PVA；F1K_Fab6-LK30，IgG4 S108P和F1K_Fab6-LK15，IgG4 S108P)。在人類脂肪細胞中的活性係顯示於圖24 (F1K_scFv6-LK30，IgG1 PVA；F1K_scFv6-LK30，IgG4 S108P；F1K_Fab6-LK15, IgG1 PVA；和F1K_Fab6-LK15，IgG4 S108P)。帶有併入IgG1 PVA之2+1 N-scFv模式之抗體對IgG4 S108P在HEK FGFR1c/KLB細胞(圖22)和人類脂肪細胞(圖23)中顯示優越的促效劑活性。在報導子細胞分析中帶有IgG1 PVA恆定結構域之2+1 N-Fab模式的抗體比帶有IgG4 S108P恆定結構域的抗體造成更佳的最大活性(圖24)。

8. 特定具體實例

【0344】 本揭示文係以下文之特定具體實例作為例示。

1. 一種包括將一多特異性結合分子(MBM)或包括該 MBM 之醫藥組成物投予一對象的方法，其中該 MBM 係包括：
   (a) 一特異性與人類纖維母細胞生長因子受體 1c 同功型(「FGFR1c」)結合之抗原結合模組 1(ABM1)
   (b) 一特異性與人類 klotho β (「KLB」)的 GH1 結構域結合之抗原結合模組 2 (ABM2)；及
   (c) 一特異性與人類 KLB 的 GH2 結構域結合之抗原結合模組 3 (ABM3)。
2. 如具體實例 1 之方法，其中該 MBM 係以有效：
   (a) 治療一代謝症狀；及/或
   (b) 改善代謝作用之量投予該對象。
3. 如具體實例 1 或具體實例 2 之方法，其中該方法係有效促效該對象中的 FGF21 受體複合物。

4. 如具體實例 1 至3 中任一例之方法，其中各抗原結合模組能在其他各抗原結合模組結合其個別標靶的相同時間，結合其個別的標靶。
5. 如具體實例 1 至4 中任一例之方法，其中ABM1 係與 FGFR1c 的 D3 環結合。
6. 如具體實例 1 至4 中任一例之方法，其中ABM1 係與 FGFR1c 的 D2 環結合。
7. 如具體實例 1 至6 中任一例之方法，其中該 MBM 為三特異性結合分子(「TBM」)。
8. 如具體實例 1 至7 中任一例之方法，其中ABM1 為抗體片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')2、單域抗體(SDAB)、VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
9. 如具體實例1 至8 中任一例之方法，其中ABM2 為抗體片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')2、單域抗體(SDAB)、VH 或 VL 結構域或駱駝 VHH 結構域。
10. 如具體實例 1 至9 中任一例之方法，其中ABM3 為抗體片段、scFv、dsFv、Fv、Fab、scFab、(Fab')2、單域抗體(SDAB)、VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
11. 如具體實例 1 至10 中任一例之方法，其中ABM1 為 scFv。
12. 如具體實例方法 1 至10 中任一例之方法，其中ABM1 為 Fab。
13. 如具體實例12 之方法，其中 ABM1 之一輕鏈為通用輕鏈。
14. 如具體實例 12 之方法，其中 ABM1 之一輕鏈恆定區和一第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
15. 如具體實例 1 至14 中任一例之方法，其中ABM2 為 scFv。
16. 如具體實例 1 至12 中任一例之方法，其中ABM2 為 Fab。
17. 如具體實例16 之方法，其中 ABM2 之一輕鏈為通用輕鏈。

18. 如具體實例16之方法，其中 ABM2 之一輕鏈恆定區和一第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
19. 如具體實例 1 至18 中任一例之方法，其中ABM3 為 scFv。
20. 如具體實例 1 至18 中任一例之方法，其中ABM3 為 Fab。
21. 如具體實例 20 之方法，其中ABM3 之一輕鏈為通用輕鏈。
22. 如具體實例20之方法，其中 ABM3 之一輕鏈恆定區和一第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
23. 如具體實例 1 至22 中任一例之方法，其中該 MBM 係包括一 Fc 異二聚體。
24. 如具體實例23 之方法，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc 結構域係包括旋鈕入孔洞(knob-in-hole)突變。
25. 如具體實例 23 或具體實例 24 之方法，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc 結構域係包括星狀突變。
26. 如具體實例 23 至25 中任一例之方法，其中該 MBM 係包括：
    (a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一 scFv，其操作上連接(ii)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；
    (b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；
    (c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；
    (d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。
27. 如具體實例 26 之方法，其中該第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。
28. 如具體實例 26 或具體實例27 之方法，其中ABM1 為第一 Fab。
29. 如具體實例 28 之方法，其中ABM2 為 scFv 而 ABM3 為第二 Fab。
30. 如具體實例 28 之方法，其中ABM2 為第二 Fab 而 ABM3 為 scFv。

31. 如具體實例26至30中任一例之方法，其中該 scFv 係經由一連接子與第一重鏈區相連接。

32. 如具體實例31之方法，其中該連接子：

(a) 長度為至少 5 個胺基酸，至少 6 個胺基酸或至少 7 個胺基酸；及視需要

(b) 長度為至高 30 個胺基酸，至高 40 個胺基酸，至高 50 個胺基酸或至高 60 個。

33. 如具體實例32之方法，其中該該連接子：

(a) 長度為 5 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 5 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 5 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 5 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 5 個胺基酸至 20 個胺基酸。

34. 如具體實例 32 之方法，其中該連接子：

(a) 長度為 6 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 6 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 6 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 6 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 6 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 6 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 6 個胺基酸至 20 個胺基酸。

35. 如具體實例32之方法，其中該連接子：

(a) 長度為 7 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(b) 長度為 7 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(c) 長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(d) 長度為 7 個胺基酸至 25 個胺基酸；

(e) 長度為 7 個胺基酸至 20 個胺基酸。

36. 如具體實例32 之方法，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸。

37. 如具體實例32 之方法，其中該連接子長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸。

38. 如具體實例 32 之方法，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸。

39. 如具體實例32 之方法，其中該連接子長度為 10 個胺基酸至 60 個胺基酸。

40. 如具體實例 39 之方法，其中該連接子長度為 20 個胺基酸至 50 個胺基酸。

41. 如具體實例 40 之方法，其中該連接子長度為 25 個胺基酸至 35 個胺基酸。

42. 如具體實例31 至41 中任一例之方法，其中該連接子為或包括 G_nS (SEQ ID NO：15)或 SG_n (SEQ ID NO：16)之多聚體，其中 n 為 1 至 7 之整數。

43. 如具體實例 42 之方法，其中該連接子為或包括一 G_4S (SEQ ID NO：17)之多聚體。

44. 如具體實例 31 至41 中任一例之方法，其中該連接子為或包括二個連續的甘胺酸(2Gly)，3 個連續的甘胺酸(3Gly)，4 個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，5 個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，6 個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，7 個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，8 個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或 9 個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23))。

45. 如具體實例 23 至 25 中任一例之方法，其中該 MBM 係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(ii)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域，視需要其中視需要第一重鏈區係經由一連接子與第二重鏈區相連接，視需要其中該連接子係如具體實例 32 至 44 中任一例所定義；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i) 一第三 Fab 之第三重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第三重鏈區配對形成第三 Fab 的第三輕鏈。

46. 如具體實例 45 之方法，其中該第一、第二和第三Fab 為僅有的抗原結合模組。

47. 如具體實例45 至46 中任一例之方法，其中該第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

48. 如具體實例45 至47 中任一例之方法，其中ABM1 為第二 Fab。

49. 如具體實例48 之方法，其中ABM2 為第一 Fab 而 ABM3 為第三 Fab。

50. 如具體實例48 之方法，其中ABM3 為第一 Fab 而 ABM2 為第三 Fab。

51. 如具體實例 1 至50 中任一例之方法，其中ABM1 係包括如表 1B 中所述的 CDR 序列。

52. 如具體實例 1 至51 中任一例之方法，其中ABM2 係包括如表 2B 中所述的 CDR 序列。

53. 如具體實例 1 至52 中任一例之方法，其中ABM3 係包括如表 3B 中所述的 CDR 序列。

54. 如具體實例 1 至53 中任一例之方法，其中該 MBM 為三價的 MBM。

55. 如具體實例 1 至53 中任一例之方法，其中該 MBM 為四價的 MBM。

56. 如具體實例 1 至55 中任一例之方法，其中該方法係有效降低該對象的體重。

57. 如具體實例 1 至56 之方法，其中該方法係有效降低該對象的循環高密度脂蛋白膽固醇。

58. 如具體實例 1 至57 之方法，其中該方法係有效增加該對象的循環低密度脂蛋白膽固醇。

59. 如具體實例 1 至58 之方法，其中該方法係有效降低該對象的血液三酸甘油酯。

60. 如具體實例 1 至59 之方法，其中該方法係有效降低該對象的血糖。

61. 如具體實例 1 至60 之方法，其中該對象係具有代謝病症。

62. 如具體實例61 之方法，其中該代謝病症為代謝症候群。

63. 如具體實例 61 之方法，其中該代謝病症為肥胖症。

64. 如具體實例61 之方法，其中該代謝病症為脂肪肝。

65. 如具體實例 61 之方法，其中該代謝病症為高胰島素血症。

66. 如具體實例 61 之方法，其中該代謝病症為第 2 型糖尿病。

67. 如具體實例61 之方法，其中該代謝病症為非酒精性脂肪性肝炎(「NASH」)。

68. 如具體實例61 之方法，其中該代謝病症為非酒精性脂肪肝疾病(「NAFLD」)。

69. 如具體實例 61 之方法，其中該代謝病症為高膽固醇血症。

70. 如具體實例 61 之方法，其中該代謝病症為高血糖。

71. 一種包括將一多特異性結合分子(MBM)或包括該 MBM 之醫藥組成物投予一對象的方法，其中該 MBM 係包括：

    (a) 一特異性與人類纖維母細胞生長因子受體 1c 同功型(「FGFR1c」)結合之第一抗原結合裝置；

    (b) 一特異性與人類 klotho β 的 GH1 結構域(「KLB」)結合之第二抗原結合裝置；及

    (c) 一特異性與人類 KLB 的 GH2 結構域結合之第三抗原結合裝置。

72. 如具體實例 71 之方法，其中該 MBM 係以有效：

    (a) 治療一代謝症狀；及/或

    (b) 改善代謝作用，之量投與該對象。

73. 如具體實例 71 或具體實例 72 之方法，其中該方法係有效促效該對象中的 FGF21 受體複合物。

74. 如具體實例 71 至73 中任一例之方法，其中各抗原結合裝置能在其他各抗原結合模組結合其個別標靶的相同時間，結合其個別的標靶。
75. 如具體實例 71 至74 中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置係與 FGFR1c 的 D3 環結合。
76. 如具體實例 71 至 74 中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置係與 FGFR1c 的 D2 環結合。
77. 如具體實例中任一例之方法71 至76，其中該 MBM 為三特異性結合分子(「TBM」)。
78. 如具體實例71至77中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
79. 如具體實例71至78中任一例之方法，其中該第二抗原結合裝置為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
80. 如具體實例71至79中任一例之方法，其中該第三抗原結合裝置為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
81. 如具體實例 71 至80 中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置為一 scFv。
82. 如具體實例71 至80 中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置為一 Fab。
83. 如具體實例 82 之方法，其中該第一抗原結合裝置之一輕鏈為通用輕鏈。
84. 如具體實例82 之方法，其中該第一抗原結合裝置之一輕鏈恆定區和第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
85. 如具體實例71 至84 中任一例之方法，其中該第二抗原結合裝置為一 scFv.
86. 如具體實例71 至82 中任一例之方法，其中該第二抗原結合裝置為一 Fab.

87. 如具體實例 86 之方法，其中該第二抗原結合裝置之一輕鏈為通用輕鏈。

88. 如具體實例86 之方法，其中該第二抗原結合裝置之一輕鏈區和第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。

89. 如具體實例71 至88 中任一例之方法，其中該第三抗原結合裝置為一 scFv。

90. 如具體實例 71 至88 中任一例之方法，其中該第三抗原結合裝置為一 Fab。

91. 如具體實例90 之方法，其中該第三抗原結合裝置之一輕鏈為通用輕鏈。

92. 如具體實例90 之方法，其中該第三抗原結合裝置之一輕鏈區和第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。

93. 如具體實例71 至92 中任一例之方法，其中該 MBM 係包括一 Fc 異二聚體。

94. 如具體實例 93 或具體實例 94 之方法，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc 結構域係包括旋鈕入孔洞(knob-in-hole)突變。

95. 如具體實例93 之方法，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc 結構域係包括星狀突變。

96. 如具體實例93 至 95 中任一例之方法，其中該 MBM 係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一 scFv 操作上連接(ii)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括 (i) 一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。

97. 如具體實例96 之方法，其中該第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

98. 如具體實例 96 或具體實例97 之方法，其中該第一抗原結合裝置為第一 Fab。

99. 如具體實例之方法98，其中該第二抗原結合裝置為 scFv 而該第三抗原結合裝置為第二 Fab。

100. 如具體實例 98 之方法，其中該第二抗原結合裝置為第二 Fab 而該第三抗原結合裝置為 scFv。

101. 如具體實例96 至 100 中任一例之方法，其中該 scFv 係經由一連接子與第一重鏈區相連接。

102. 如具體實例101 之方法，其中該連接子：

(a) 長度為至少 5 個胺基酸，至少 6 個胺基酸或至少 7 個胺基酸；及視需要

(b) 長度為至高 30 個胺基酸，至高 40 個胺基酸，至高 50 個胺基酸或至高 60 個胺基酸。

103. 如具體實例102 之方法，其中該連接子：

(a) 長度為 5 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 5 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 5 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 5 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 5 個胺基酸至 20 個胺基酸。

104. 如具體實例102 之方法，其中該連接子：

(a) 長度為 6 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 6 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 6 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 6 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 6 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 6 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 6 個胺基酸至 20 個胺基酸。

105. 如具體實例102之方法，其中該連接子：

(a) 長度為7個胺基酸至40個胺基酸；

(b) 長度為7個胺基酸至35個胺基酸；

(c) 長度為7個胺基酸至30個胺基酸；

(d) 長度為7個胺基酸至25個胺基酸；

(e) 長度為7個胺基酸至20個胺基酸。

106. 如具體實例102之方法，其中該連接子長度為5個胺基酸至45個胺基酸。

107. 如具體實例102之方法，其中該連接子長度為7個胺基酸至30個胺基酸。

108. 如具體實例102之方法，其中該連接子長度為5個胺基酸至25個胺基酸。

109. 如具體實例之方法102，其中該連接子長度為10個胺基酸至60個胺基酸。

110. 如具體實例之方法109，其中該連接子長度為20個胺基酸至50個胺基酸。

111. 如具體實例之方法110，其中該連接子長度為25個胺基酸至35個胺基酸。

112. 如具體實例101至111中任一例之方法，其中該連接子為或包括 G_nS (SEQ ID NO：15)或 SG_n (SEQ ID NO：16)之多聚體，其中n為1至7之整數。

113. 如具體實例109之方法，其中該連接子為或包括一 G_4S (SEQ ID NO：17)之多聚體。

114. 如具體實例101至111中任一例之方法，其中該連接子為或包括二個連續的甘胺酸(2Gly)，3個連續的甘胺酸(3Gly)，4個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，5個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，6個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，7個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，8個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或9個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23))。

115. 如具體實例93至95中任一例之方法，其中該MBM係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由N-端至C-端方向，係包括(i)一第一Fab之第一重鏈區操作上連接(ii)一第二Fab之第二重鏈區操作，其上連接(iii)一Fc結構

域，視需要其中視需要第一重鏈區係經由一連接子與第二重鏈區相連接，視需要其中該連接子係如具體實例 32 至 44 中任一例所定義；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N 端至 C 端方向，係包括 (i) 一第二 Fab 之第二重鏈區，其視作上連接(ii) 一 Fc 結構域；

(c) 一第二多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。

116. 如具體實例115之方法，其中該第一、第二和第三 Fab 為僅有的抗原結合模組。

117. 如具體實例115 至 116 中任一例之方法，其中該第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

118. 如具體實例115至117中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置為第二 Fab。

119. 如具體實例118之方法，其中該第二抗原結合裝置為第一 Fab 而該第三抗原結合裝置為第二 Fab。

120. 如具體實例118之方法，其中該第二抗原結合裝置為第一 Fab 而該第三抗原結合裝置為第二 Fab。

121. 如具體實例71 至120 中任一例之方法，其中該第一抗原結合裝置係包括如表 1B 中所述的 CDR 序列。

122. 如具體實例71 至121 中任一例之方法，其中該第二抗原結合裝置係包括如表 2B 中所述的 CDR 序列。

123. 如具體實例71 至122 中任一例之方法，其中該第三抗原結合裝置係包括如表 3B 中所述的 CDR 序列。

124. 如具體實例 71 至123 中任一例之方法，其中該 MBM 為二價的 MBM。

125. 如具體實例 71 至123 中任一例之方法，其中該 MBM 為四價的 MBM。

126. 如具體實例 1 至125 中任一例之方法，其中該 MBM 係包括成對的異二聚體恆定結構域。

127. 如具體實例126 之方法，其中各恆定結構域係包括一或多個在 S228、E233、L234、L235、D265、N297、P329 或 P331 (全部係根據 EU 編號)的取代。

128. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 S228P 取代。

129. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 E233A 或 E233P 取代。

130. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 L234A 取代。

131. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 L235A。

132. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 D265A 取代。

133. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 N297A 或 N297D 取代。

134. 如具體實例127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 P329G 或 P329A 取代。

135. 如具體實例 127 之方法，其中該恆定結構域係包括一 P331S。

136. 如具體實例126 至135 中任一例之方法，其係包括任何 6.2.7.1 章節中所述的取代組合。

137. 如具體實例126 至136 中任一例之方法，其中各恆定結構域係包括一具有降低的效應子功能之絞鏈序列。

138. 如具體實例137 之方法，其中該絞鏈序列係包括或由任一 SEQ ID NO：66、SEQ ID NO：67、SEQ ID NO：70 和 SEQ ID NO：71 之胺基酸序列所組成。

139. 如具體實例 137 之方法，其中該絞鏈序列係包括任何 6.2.6.2 章節中所述的絞鏈修飾。

140. 如具體實例 126 至 139 中任一例之方法，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 90%序列相同性的胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係在胺基酸位置 233-236 (EU 編號)包括 P-V-A-缺位序列序列；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

141. 如具體實例140 之方法，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 93%序列相同性的胺基酸序列。

142. 如具體實例 140 之方法，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 95%序列相同性的胺基酸序列。

143. 如具體實例140 之方法，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 97%序列相同性的胺基酸序列。

144. 如具體實例 126 至 139 中任一例之方法，其中該恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：58 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或 100%序列相同性的胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：58 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：62 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：62 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)P-V-A-缺位)和孔洞突變 T366S、L368A 及 Y407V。

145. 如具體實例144 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：58 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：62 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

146. 如具體實例 126 至 139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：58 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：58 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：63 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：63 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

147. 如具體實例 146 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：58 具有至少 95%(或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：63 具有至少 95%(或 100%)序列相同性。

148. 如具體實例126 至 139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：59 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：59 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：62 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列

相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：62 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和孔洞突變 T366S、L368A 及 Y407V。

149. 如具體實例148 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：59 具有至少 95%(或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：62 具有至少 95%(或 100%)序列相同性。

150. 如具體實例126 至 139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：59 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：59 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：63 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：63 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

151. 如具體實例 150 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：59 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：62 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

152. 如具體實例126 至 139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：60具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：60具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C 和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：64具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：64具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C 以及孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V。

153. 如具體實例 152 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：60 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：64 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

154. 如具體實例 126 至139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：60具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：60具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：65具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：65 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

155. 如具體實例154 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：60 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：65 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

156. 如具體實例126 至139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：61具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：61 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，旋鈕突變 T366W 和星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：64具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：64 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種

選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)以及孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V。

157. 如具體實例156 之方法，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：61 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：64 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

158. 如具體實例126 至139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：61 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：61 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：65 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：65 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

159. 如具體實例之方法158，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：61 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：65 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

160. 如具體實例126 至139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域各自係包括與SEQ ID NO：49 (hIgG1 N180G，亦稱為hIgG1 N297G)具有至少90%，至少93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 N180G/N297G 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

161. 如具體實例160 之方法，其中各恆定結構域與 SEQ ID NO：49 係具有至少 95%序列相同性。

162. 如具體實例126 至139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括與SEQ ID NO：53 (hIgG4 S108P，亦稱為 hIgG4 S228P)具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

163. 如具體實例162 之方法，其中各恆定結構域與 SEQ ID NO：49 係具有至少 95%序列相同性。

164. 如具體實例 126 至139 中任一例之方法，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：54 (變體 IgG4，帶有 S108P 取代，亦稱為 hIgG4 S228P，和 IgG1 CH2 及 CH3 結構域)具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

165. 如具體實例 164 之方法，其中各恆定結構域與 SEQ ID NO：49 係具有至少 95% 序列相同性。

166. 如具體實例 71 至165 中任一例之方法，其中該方法係有效降低該對象的體重。

167. 如具體實例71 至166 之方法，其中該方法係有效降低該對象的循環高密度脂蛋白膽固醇。

168. 如具體實例71 至167 之方法，其中該方法係有效增加該對象的循環低密度脂蛋白膽固醇。

169. 如具體實例 71 至168 之方法，其中該方法係有效降低該對象的血液三酸甘油酯。

170. 如具體實例71 至169 之方法，其中該方法係有效降低該對象的血糖。

171. 如具體實例 71 至170 之方法，其中該對象係具有代謝病症。

172. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為代謝症候群。

173. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為肥胖症。

174. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為脂肪肝。

175. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為高胰島素血症。

176. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為第 2 型糖尿病。

177. 如具體實例171 之方法，其中該代謝病症為非酒精性脂肪性肝炎(「NASH」)。

178. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為非酒精性脂肪肝疾病(「NAFLD」)。

179. 如具體實例171 之方法，其中該代謝病症為高膽固醇血症。

180. 如具體實例 171 之方法，其中該代謝病症為高血糖。

181. 一種多特異性結合分子(MBM)，係包括：

(a) 一特異性與人類纖維母細胞生長因子受體 1c 同功型(「FGFR1c」)結合之抗原結合模組 1(ABM1)；

(b) 一特異性與人類 klotho β (「KLB」)的 GH1 結構域結合之抗原結合模組 2 (ABM2)；及

(c) 一特異性與人類 KLB 的 GH2 結構域結合之抗原結合模組 3 (ABM3)。

182. 如具體實例181 之 MBM，其中各抗原結合模組能在其他各抗原結合模組結合其個別標靶的相同時間，結合其個別的標靶。

183. 如具體實例181 或具體實例182 之 MBM，其中 ABM1 係與 FGFR1c 的 D3 環結合。

184. 如具體實例 181 或具體實例182 之 MBM ，其中 ABM1 係與 FGFR1c 的 D2 環結合。

185. 如具體實例181 至184 中任一例之 MBM，其為三特異性結合分子(「TBM」)。

186. 如任何具體實例 181 至185 之 MBM，其中 ABM1 為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。

187. 如任何具體實例 181 至186 之 MBM，其中ABM2 為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
188. 如任何具體實例 181 至187 之 MBM，其中ABM3 為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。
189. 如具體實例181 至188 中任一例之 MBM，其中ABM1 為一 scFv。
190. 如具體實例181 至188 中任一例之 MBM，其中ABM1 為一 Fab。
191. 如具體實例190 之 MBM，其中 ABM1 之一輕鏈為通用輕鏈。
192. 如具體實例 190 之 MBM，其中 ABM1 之一輕鏈恆定區和一第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
193. 如具體實例181 至192 中任一例之 MBM，其中ABM2 為一 scFv。
194. 如具體實例181 至190 中任一例之 MBM，其中ABM2 為一 Fab。
195. 如具體實例194 之 MBM，其中 ABM2 之一輕鏈為通用輕鏈。
196. 如具體實例194 之 MBM，其中 ABM2 之一輕鏈恆定區和一第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
197. 如具體實例181 至196 中任一例之 MBM，其中ABM3 為一 scFv。
198. 如具體實例181 至196 中任一例之 MBM，其中ABM3 為一 Fab。
199. 如具體實例198 之 MBM，其中ABM3 之一輕鏈為通用輕鏈。
200. 如具體實例198 之 MBM，其中 ABM3 之一輕鏈恆定區和一第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。
201. 如具體實例181 至200 中任一例之 MBM，其係包括一 Fc 異二聚體。
202. 如具體實例201 之 MBM，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc 結構域係包括旋鈕入孔洞(knob-in-hole)突變。

203. 如具體實例201 之 MBM，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc 結構域係包括星狀突變。

204. 如具體實例201 至203 中任一例之 MBM，其係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一 scFv，其操作上連接(ii)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括 (i)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。

205. 如具體實例204 之 MBM，其中該第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

206. 如具體實例204 或具體實例205 之 MBM，其中ABM1 為第一 Fab。

207. 如具體實例206 之 MBM，其中ABM2 為 scFv 而 ABM3 為第二 Fab。

208. 如具體實例206 之 MBM，其中ABM2 為第二 Fab 而 ABM3 為 scFv。

209. 如具體實例204 至 208 中任一例之 MBM，其中該 scFv 係經由一連接子與第一重鏈區相連接。

210. 如具體實例209 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為至少 5 個胺基酸，至少 6 個胺基酸或至少 7 個胺基酸；及視需要

(b) 長度為至高 30 個胺基酸，至高 40 個胺基酸，至高 50 個胺基酸或至高 60 個胺基酸。

211. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為 5 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 5 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 5 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 5 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 5 個胺基酸至 20 個胺基酸。

212. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為 6 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 6 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 6 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 6 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 6 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 6 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 6 個胺基酸至 20 個胺基酸。

213. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為 7 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(b) 長度為 7 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(c) 長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(d) 長度為 7 個胺基酸至 25 個胺基酸；

(e) 長度為 7 個胺基酸至 20 個胺基酸。

214. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸。

215. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸。

216. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸。

217. 如具體實例210 之 MBM，其中該連接子長度為 10 個胺基酸至 60 個胺基酸。

218. 如具體實例217 之 MBM，其中該連接子長度為 20 個胺基酸至 50 個胺基酸。

219. 如具體實例218 之 MBM，其中該連接子長度為 25 個胺基酸至 35 個胺基酸。

220. 如具體實例209至219中任一例之MBM，其中該連接子為或包括G_nS (SEQ ID NO：15)或SG_n (SEQ ID NO：16)之多聚體，其中n為1至7之整數。

221. 如具體實例220之MBM，其中該該連接子為或包括G_4S (SEQ ID NO：17)之多聚體。

222. 如具體實例204 至219 中任一例之 MBM，其中該該連接子為或包括二個連續的甘胺酸(2Gly)，3 個連續的甘胺酸(3Gly)，4 個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，5 個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，6 個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，7個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，8個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或9個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23))。

223. 如具體實例 201 至203 中任一例之 MBM，其係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(ii)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域，視需要其中視需要第一重鏈區係經由一連接子與第二重鏈區相連接，視需要其中該連接子係如具體實例 32 至 44 中任一例所定義；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第三 Fab 之第三重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第三重鏈區配對形成第三 Fab 的第三輕鏈。

224. 如具體實例223之MBM，其中第一、第二和第三Fab為僅有的抗原結合模組。

225. 如具體實例223至224中任一例之MBM，其中第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

226. 如具體實例223至225中任一例之MBM，其中ABM1為第二Fab。

227. 如具體實例226之MBM，其中ABM2為第一Fab而ABM3為第三Fab。

228. 如具體實例226之MBM，其中ABM3為第一Fab而ABM2為第三Fab。

229. 如具體實例181至228中任一例之MBM，其中ABM1係包括如表1B中所述的CDR序列。

230. 如具體實例181至229中任一例之MBM，其中ABM2係包括如表2B中所述的CDR序列。

231. 如具體實例181至230中任一例之MBM，其中ABM3係包括如表3B中所述的CDR序列。

232. 如具體實例181至231中任一例之MBM，其為三價的MBM。

233. 如具體實例181至231中任一例之MBM，其為四價的MBM。

234. 一種多特異性結合分子(MBM)，係包括：

(a) 一特異性與人類纖維母細胞生長因子受體1c同功型(「FGFR1c」)結合之第一抗原結合裝置)；

(b) 一特異性與人類klotho β(「KLB」)的GH1結構域結合之第二抗原結合裝置；及

(c) 一特異性與人類KLB的GH2結構域結合之第三抗原結合裝置。

235. 如具體實例234之MBM，其中各抗原結合裝置能在其他各抗原結合模組結合其個別標靶的相同時間，結合其個別的標靶。

236. 如具體實例234 或具體實例235 之 MBM，其中該第一抗原結合裝置係與FGFR1c的D3環結合。

237. 如具體實例234 或具體實例235 之 MBM，其中該第一抗原結合裝置係與FGFR1c的D2環結合。

238. 如具體實例234至237中任一例之MBM，其為三特異性結合分子(「TBM」)。

239. 如任何具體實例234至238之MBM，其中該第一抗原結合裝置為一抗體片段、一scFv、一dsFv、一Fv、一Fab、一scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、

一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。

240. 如任何具體實例234 至239 之 MBM，其中該第二抗原結合裝置為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。

241. 如任何具體實例234 至240 之 MBM，其中該第三抗原結合裝置為一抗體片段、一 scFv、一 dsFv、一 Fv、一 Fab、一 scFab、一(Fab')2、一單域抗體(SDAB)、一 VH 或 VL 結構域或一駱駝 VHH 結構域。

242. 如具體實例234 至241 中任一例之 MBM，其中該第一抗原結合裝置為一 scFv。

243. 如具體實例234 至 241 中任一例之 MBM，其中該第一抗原結合裝置為一 Fab。

244. 如具體實例243 之 MBM，其中該第一抗原結合裝置之一輕鏈為通用輕鏈。

245. 如具體實例243 之 MBM，其中該第一抗原結合裝置之一輕鏈恆定區和第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。

246. 如具體實例234 至245 中任一例之 MBM，其中該第二抗原結合裝置為一 scFv。

247. 如具體實例234 至243 中任一例之 MBM，其中該第二抗原結合裝置為一 Fab。

248. 如具體實例247 之 MBM，其中該第二抗原結合裝置之一輕鏈為通用輕鏈。

249. 如具體實例247 之 MBM，其中該第二抗原結合裝置之一輕鏈恆定區和第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。

250. 如具體實例234 至249 中任一例之 MBM，其中該第三抗原結合裝置為一 scFv。

251. 如具體實例234 至249 中任一例之 MBM，其中該第三抗原結合裝置為一 Fab。

252. 如具體實例251 之 MBM，其中該第三抗原結合裝置之一輕鏈為通用輕鏈。

253. 如具體實例251 之 MBM，其中該第三抗原結合裝置之一輕鏈恆定區和第一重鏈恆定區(CH1)為 Crossmab 排列。

254. 如具體實例234 至 253 中任一例之 MBM，其係包括一 Fc 異二聚體。

255. 如具體實例254 之 MBM，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc結構域係包括旋鈕入孔洞(knob-in-hole)突變。

256. 如具體實例254 之 MBM，其中相較於野生型 Fc 結構域，該 Fc 異二聚體的Fc結構域係包括星狀突變。

257. 如具體實例254 至256 中任一例之 MBM，其係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一 scFv，其操作上連接(ii)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。

258. 如具體實例257 之 MBM，其中第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

259. 如具體實例257 或具體實例258 之 MBM，其中該第一抗原結合裝置為第一 Fab。

260. 如具體實例259 之 MBM，其中該第二抗原結合裝置為 scFv 而該第三抗原結合裝置為為第二 Fab。

261. 如具體實例259 之 MBM，其中該第二抗原結合裝置為第二 Fab 而該第三抗原結合裝置為 scFv。

262. 如具體實例257 至 261 中任一例之 MBM，其中該 scFv 係經由一連接子與第一重鏈區相連接。

263. 如具體實例262 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為至少 5 個胺基酸，至少 6 個胺基酸或至少 7 個胺基酸；及視需要

(b) 長度為至高 30 個胺基酸，至高 40 個胺基酸，至高 50 個胺基酸或至高 60 個胺基酸。

264. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為 5 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 5 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 5 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 5 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 5 個胺基酸至 20 個胺基酸.

265. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為 6 個胺基酸至 50 個胺基酸；

(b) 長度為 6 個胺基酸至 45 個胺基酸；

(c) 長度為 6 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(d) 長度為 6 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(e) 長度為 6 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(f) 長度為 6 個胺基酸至 25 個胺基酸；或

(g) 長度為 6 個胺基酸至 20 個胺基酸.

266. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子：

(a) 長度為 7 個胺基酸至 40 個胺基酸；

(b) 長度為 7 個胺基酸至 35 個胺基酸；

(c) 長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸；

(d) 長度為 7 個胺基酸至 25 個胺基酸；

(e) 長度為 7 個胺基酸至 20 個胺基酸.

267. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸。

268. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸。

269. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 25 個胺基酸。

270. 如具體實例263 之 MBM，其中該連接子長度為 10 個胺基酸至 60 個胺基酸。

271. 如具體實例之 MBM 270，其中該連接子長度為 20 個胺基酸至 50 個胺基酸。

272. 如具體實例之 MBM 271，其中該連接子長度為 25 個胺基酸至 35 個胺基酸。

273. 如具體實例257 至272 中任一例之 MBM，其中該連接子為或包括 G_nS (SEQ ID NO：15)或 SG_n (SEQ ID NO：16)之多聚體，其中 n 為 1 至 7 之整數。

274. 如具體實例273之MBM，其中該連接子為或包括一G_4S (SEQ ID NO：17)之多聚體。

275. 如具體實例257 至272 中任一例之 MBM，其中該連接子為或包括二個連續的甘胺酸(2Gly)，3 個連續的甘胺酸(3Gly)，4 個連續的甘胺酸(4Gly (SEQ ID NO：18))，5 個連續的甘胺酸(5Gly (SEQ ID NO：19))，6 個連續的甘胺酸(6Gly (SEQ ID NO：20))，7 個連續的甘胺酸(7Gly (SEQ ID NO：21))，8 個連續的甘胺酸(8Gly (SEQ ID NO：22))或 9 個連續的甘胺酸(9Gly (SEQ ID NO：23))。

276. 如具體實例254 至256 中任一例之 MBM，其係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(ii)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域，視需要其中視需要第一重鏈區係經由一連接子與第二重鏈區相連接，視需要其中該連接子係如具體實例 32 至 44 中任一例所定義；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括 (i) 一第三 Fab 之第三重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第三重鏈區配對形成第三 Fab 的第三輕鏈。

277. 如具體實例276 之 MBM，其中該第一、第二和第三Fab 為僅有的抗原結合模組。

278. 如具體實例276 至277 中任一例之 MBM，其中該第一輕鏈和第二輕鏈為相同的。

279. 如具體實例276 至278 中任一例之 MBM，其中該第一抗原結合裝置為第二 Fab。

280. 如具體實例279 之 MBM，其中該第二抗原結合裝置為第一 Fab 而該第三抗原結合裝置為第三 Fab。

281. 如具體實例279 之 MBM，其中t 該第三抗原結合裝置為第一 Fab 而該第二抗原結合裝置為第三 Fab。

282. 如具體實例234 至 281 中任一例之 MBM，其中該第一抗原結合裝置係包括如表 1B 中所述的 CDR 序列。

283. 如具體實例234 至 282 中任一例之 MBM，其中該第二抗原結合裝置係包括如表 2B 中所述的 CDR 序列。

284. 如具體實例234 至 283 中任一例之 MBM，其中該第三抗原結合裝置係包括如表 3B 中所述的 CDR 序列。

285. 如具體實例234 至 284 中任一例之 MBM，其為三價的 MBM。

286. 如具體實例234 至 284 中任一例之 MBM，其為四價的 MBM。

287. 如具體實例181 至286 中任一例之 MBM，其係包括成對的異二聚體恆定結構域。

288. 如具體實例287 之 MBM，其中各恆定結構域係包括一或多個在 S228、E233、L234、L235、D265、N297、P329 或 P331 (全部係根據 EU 編號)的取代。

289. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 S228P 取代。

290. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 E233A 或 E233P 取代。

291. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 L234A 取代。

292. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 L235A.

293. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 D265A 取代。

294. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 N297A 或 N297D 取代。

295. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 P329G 或 P329A 取代。

296. 如具體實例288 之 MBM，其中該恆定結構域係包括一 P331S。

297. 如具體實例287 至296 中任一例之 MBM，其係包括 6.2.7.1 章節中所述的任何取代組合。

298. 如具體實例287 至 297 中任一例之 MBM，其中各恆定結構域係包括一具有降低的效應子功能之絞鏈序列。

299. 如具體實298 例之 MBM，其中該絞鏈序列係包括或由任一 SEQ ID NO：66、SEQ ID NO：67、SEQ ID NO：70 和 SEQ ID NO：71 之胺基酸序列所組成。

300. 如具體實例298 之 MBM，其中該絞鏈序列係包括 6.2.6.2 章節中所述的任何絞鏈修飾。

301. 如具體實例287 至 300 中任一例之 MBM，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 90%序列相同性的胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係在胺基酸位置 233-236 (EU 編號)包括 P-V-A-缺位序列序列；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

302. 如具體實例301 之 MBM，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 93%序列相同性的胺基酸序列。

303. 如具體實例301 之 MBM，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 95%序列相同性的胺基酸序列。

304. 如具體實例301 之 MBM，其中各恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：46 具有至少 97%序列相同性的胺基酸序列。

305. 如具體實例287 至300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：58 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或 100%序列相同性的胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：58 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：62 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：62 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)P-V-A-缺位)和孔洞突變 T366S、L368A 及 Y407V。

306. 如具體實例305 之 MBM，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：58 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：62 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

307. 如具體實例287 至 300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：58 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或 100%序列相同性的胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：58 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：63具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：63具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

308. 如具體實例307 之 MBM，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：58 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：63 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

309. 如具體實例287 至 300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：59具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：59具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236 (EU 編號)之 P-V-A-缺位)和旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：62具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：62具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置233-236 (EU編號)之P-V-A-缺位)和孔洞突變T366S、L368A及Y407V。

310. 如具體實例309 之 MBM，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：59 具有至少 95% (或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：62 具有至少 95% (或 100%)序列相同性。

311. 如具體實例287至300中任一例之MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO:59具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與SEQ ID NO：59具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的PVA修飾(胺基酸位置233-236(EU編號)之P-V-A缺位)和旋鈕突變T366W以及杵狀突變H435R和Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO:63具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與SEQ ID NO：63具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的PVA修飾(胺基酸位置233-236(EU編號)之P-V-A缺位)，孔洞突變T366S、L368A和Y407V，以及杵狀突變H435R和Y436F。

312. 如具體實例311之MBM，其中該第一恆定結構域與SEQ ID NO：59具有至少95%(或100%)序列相同性而該第二恆定結構域與SEQ ID NO：62具有至少95%(或100%)序列相同性。

313. 如具體實例287至300中任一例之MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO:60具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與SEQ ID NO：60具有低於100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的PVA修飾(胺基酸位置233-236(EU編號)之P-V-A缺位)，二硫化物結構突變S354C和旋鈕突變T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：64具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：64具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C 以及孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V。

314. 如具體實例313 之 MBM，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：60 具有至少95%(或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：64 具有至少95%(或 100%)序列相同性。

315. 如具體實例287至300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：60具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：60具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C 和旋鈕突變 T366W；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：65具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：65具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

316. 如具體實例315之MBM，其中該第一恆定結構域與SEQ ID NO：60具有至少95%(或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：65 具有至少95%(或100%)序列相同性。

317. 如具體實例287至300中任一例之MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：61具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：61具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，旋鈕突變 T366W 以及星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：64具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：64具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)以及孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V。

318. 如具體實例317之MBM，其中該第一恆定結構域與SEQ ID NO：61具有至少95%(或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：64 具有至少95%(或100%)序列相同性。

319. 如具體實例287至300中任一例之MBM，其中該等恆定結構域係包括：

(a) 一第一恆定結構域，其係包括與SEQ ID NO：61具有至少90%，至少93%，至少95%，至少96%，至少97%，至少98%，至少99%或至少100%序列

相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：61 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，旋鈕突變 T366W 和星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(b) 一第二恆定結構域，其係包括與 SEQ ID NO：65 具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%或至少 100%序列相同性之胺基酸序列，其限制條件為若該胺基酸序列與 SEQ ID NO：65 具有低於 100%的相同性，則該序列係保留絞鏈中的 PVA 修飾(胺基酸位置 233-236(EU 編號)之 P-V-A-缺位)，二硫化物結構突變 S354C(或另一種選擇以二硫化物結構突變 E356C 取代結構突變 S354C)，孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V，以及星狀突變 H435R 和 Y436F。

320. 如具體實例之 MBM 319，其中該第一恆定結構域與 SEQ ID NO：61 具有至少 95%(或 100%)序列相同性而該第二恆定結構域與 SEQ ID NO：65 具有至少 95%(或 100%)序列相同性。

321. 如具體實例287至300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域各自係包括與 SEQ ID NO：49 (hIgG1 N180G，亦稱為 hIgG1 N297G)具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 N180G/N297G 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

322. 如具體實例321 之 MBM，其中各恆定結構域與 SEQ ID NO：49 係具有至少 95% 序列相同性。

323. 如具體實例287 至300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：53 (hIgG4 S108P，亦稱為 hIgG4 S228P)具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

324. 如具體實例323 之 MBM，其中各恆定結構域與 SEQ ID NO：49 係具有至少 95% 序列相同性。

325. 如具體實例287 至300 中任一例之 MBM，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：54(變體 IgG4，帶有 S108P，亦稱為 hIgG4 S228P，取代和 IgG1 CH2 及 CH3 結構域)具有至少 90%，至少 93%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，或至少 98%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 而另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域係包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

326. 如具體實例325 之 MBM，其中各恆定結構域與 SEQ ID NO：49 係具有至少 95% 序列相同性。

327. 一種包括如具體實例 181 至326 中任一例之 MBM 的醫藥組成物。

328. 一種包括投予一對象如具體實例181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物的方法。

329. 如具體實例328 之方法，其中該 MBM 或該醫藥組成物係以有效：

(a) 治療代謝症狀；及/或

(b) 改善代謝之量投與該對象。

330. 如具體實例 328 或具體實例329 之方法，其中該方法係有效於該對象中促效 FGF21 受體複合物。

331. 如具體實例328 至330 中任一例之方法，其中該對象具有代謝病症。

332. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為代謝症候群。

333. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為肥胖症。

334. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為脂肪肝。

335. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為高胰島素血症。

336. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為第 2 型糖尿病。

337. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為非酒精性脂肪性肝炎(「NASH」)。

338. 如具體實例 331 之方法，其中該代謝病症為高膽固醇血症。

339. 如具體實例331 之方法，其中該代謝病症為高血糖。

340. 一種降低體重的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一體重過重的對象。

341. 如具體實例340 之方法，其中該對象為肥胖的。

342. 一種治療非酒精性脂肪性肝炎(「NASH」)的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一患有 NASH 的對象。

343. 一種治療非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一患有 NAFLD 的對象。

344. 一種降低循環的 HDL 膽固醇的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一患有升高 HDL 的對象。

345. 一種增加循環的 LDL 膽固醇的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一患有低 LDL 的對象。

346. 一種降低血液三酸甘油酯的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一患有升高的三酸甘油酯量的對象。

347. 一種降低血糖的方法，其係包括將一有效量的如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 或如具體實例327 之醫藥組成物投予一患有升高的血糖量的對象。

348. 一種或多數種編碼如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 的核酸。

349. 一種經工程改造用以表現如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 的細胞。

350. 一種以一或多個表現載體轉染之細胞，而該載體係包括一或多個在一或多個啟動子控制下編碼如具體實例 181 至 326 中任一例之 MBM 的核酸。

351. 一種製造 MBM 的方法，係包括：

(a) 於現該 MBM 之條件下培養如具體實例349 或350 之細胞；及

(b) 從細胞培養回收該 MBM。

352. 如具體實例351 之方法，其進一步係包括增豐該 MBM。

353. 如具體實例351 或具體實例352 之方法，其進一步係包括純化該 MBM。

引述的參考文獻

【0345】　本申請案中所引述的所有公開案、專利、專利申請案和其他文件就所有目的係以全文引用的方式併入本文中，其引用程度就如同將各個個別公開案、專利或專利申請案或其他文件個別地特定就所有目的以全文引用的方式併入。在併入文中的一或多個參考文獻之教導和本揭示文之間有不一致的情況下，係以本說明書之教導為主。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

序列表

<110> 美商再生元醫藥公司(REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 多特異性FGF21受體促效劑及其等用途

<130> RGN-004TW

<140>
<141>

<150> 63/183,976
<151> 2021-05-04

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 823
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1               5                  10                  15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
            20                  25                  30

Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
        35                  40                  45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
    50                  55                  60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
65                  70                  75                  80

Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
                85                  90                  95

Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
            100                 105                 110

Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
        115                 120                 125

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
    130                 135                 140

Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145                 150                 155                 160
```

Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
165 170 175

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala
195 200 205

Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn
210 215 220

Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr
225 230 235 240

Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala
245 250 255

Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe
260 265 270

Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys
275 280 285

His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr
290 295 300

Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Tyr Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met
305 310 315 320

Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr
325 330 335

Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp
340 345 350

Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Ile Val Ile
355 360 365

Thr Ser Pro Leu Tyr Leu Glu Ile Ile Ile Tyr Cys Thr Gly Ala Phe
370 375 380

Leu Ile Ser Cys Met Val Gly Ser Val Ile Val Tyr Lys Met Lys Ser
385 390 395 400

Gly Thr Lys Lys Ser Asp Phe His Ser Gln Met Ala Val Glu Ile Lys
405 410 415

Leu Ala Lys Ser Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Asp
420 425 430

Ser Ser Ala Ser Met Asn Ser Gly Val Leu Leu Val Arg Pro Ser Arg
435 440 445

Leu Ser Ser Ser Gly Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu
450 455 460

Leu Pro Glu Asp Pro Arg Trp Glu Leu Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu
465 470 475 480

Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu
485 490 495

Ala Ile Gly Leu Asp Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala
500 505 510

Val Lys Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu
515 520 525

Ile Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys Glu Ile Lys Asn
530 535 540

Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val
545 550 555 560

Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala
565 570 575

Arg Arg Pro Pro Gly Leu Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro
580 585 590

Glu Glu Gln Leu Ser Ser Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val
595 600 605

Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp
610 615 620

Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile
625 630 635 640

Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys
645 650 655

```
Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala
            660                 665                 670

Leu Phe Asp Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
        675                 680                 685

Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly
    690                 695                 700

Val Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met
705                 710                 715                 720

Asp Lys Pro Ser Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp
                725                 730                 735

Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val
            740                 745                 750

Glu Asp Leu Asp Arg Ile Val Ala Leu Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu
        755                 760                 765

Asp Leu Ser Met Pro Leu Asp Gln Tyr Ser Pro Ser Phe Pro Asp Thr
    770                 775                 780

Arg Ser Ser Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His Glu
785                 790                 795                 800

Pro Leu Pro Glu Glu Pro Cys Leu Pro Arg His Pro Ala Gln Leu Ala
                805                 810                 815

Asn Gly Gly Leu Lys Arg Arg
            820
```

<210> 2
<211> 1004
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

```
Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr
1               5                   10                  15

Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn
            20                  25                  30

Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp
        35                  40                  45
```

```
Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp Glu Ile Phe Ile His
    50                  55                  60

Thr Glu Ile Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser Asp Ser
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile Gly Val
                85                  90                  95

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

Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu
        115                 120                 125

Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr
    130                 135                 140

His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp Lys
145                 150                 155                 160

Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe
                165                 170                 175

Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Glu Ile Asn
            180                 185                 190

Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro
        195                 200                 205

Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu
    210                 215                 220

Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp Glu Ile Asn Tyr Asn Thr Glu Ile
225                 230                 235                 240

Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His
                245                 250                 255

Trp Ile Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys
            260                 265                 270

Gln Gln Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His
        275                 280                 285
```

Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val
290 295 300

Leu Pro Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ile Glu Met Arg Gly Thr
305 310 315 320

Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu
325 330 335

Asn Thr Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu
340 345 350

Ala Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile
355 360 365

Ala Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr
370 375 380

Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala
385 390 395 400

Ile Arg Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu
405 410 415

Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu
420 425 430

Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser
435 440 445

Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu
450 455 460

Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser
465 470 475 480

Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser
485 490 495

Pro Gln Phe Ser Asp Pro Glu Ile Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly
500 505 510

Asn Arg Leu Leu Glu Ile Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg
515 520 525

Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met
530 535 540

Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala
545 550 555 560

Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu
565 570 575

Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser
580 585 590

Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala Glu Ile Leu Gly Leu
595 600 605

Pro Glu Pro Leu Leu His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala
610 615 620

Glu Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp
625 630 635 640

Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp
645 650 655

Ile Tyr Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Glu Ile Asn
660 665 670

Leu Leu Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe
675 680 685

Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp
690 695 700

Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu
705 710 715 720

Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys
725 730 735

Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Glu
740 745 750

Ile Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala
755 760 765

Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn Glu
770 775 780

```
Ile Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg
785                 790                 795                 800

Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu
                805                 810                 815

Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
            820                 825                 830

Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr
        835                 840                 845

Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys
    850                 855                 860

Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile
865                 870                 875                 880

Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu
                885                 890                 895

Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys
            900                 905                 910

Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro
        915                 920                 925

Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu
    930                 935                 940

Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu
945                 950                 955                 960

Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile
                965                 970                 975

Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln
            980                 985                 990

His Ile Pro Leu Lys Lys Gly Lys  Arg Val Val Ser
        995                 1000
```

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 3
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 4
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Val Lys
100 105

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gln Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 6
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Arg His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile
35 40 45

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Gly Tyr Gly
85 90 95

Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105

<210> 8
<211> 107
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Trp Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Ile
35 40 45

Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Phe Asp
85 90 95

Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105

<210> 10
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile
35 40 45

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Thr Asp Trp
85 90 95

Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100

<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Ala Ala Ala Gly Leu His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 13
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Arg Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 14
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Val Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Thr Phe Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(7)
<223> 此區可包含 1-7 個殘基

<400> 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<220>
<221> SITE
<222> (2)..(8)
<223> 此區可包含 1-7 個殘基

<400> 16
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 17
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 18
Gly Gly Gly Gly
1

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 19
Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 20
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 24
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(10)
<223> 此區可包含 1-10 個殘基

<400> 25
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<220>
<221> SITE
<222> (2)..(11)
<223> 此區可包含 1-10 個殘基

<400> 26
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 27
Cys Pro Pro Cys
1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 28
Cys Pro Ser Cys
1

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 29
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala
20

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 30

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 31
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 32
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 33
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 34
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10

<210> 35
<211> 232

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 35

```
Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1               5                  10                  15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
            100                 105                 110

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
    130                 135                 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
        195                 200                 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220
```

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
225 230

<210> 36
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 36
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
35 40 45

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
50 55 60

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
65 70 75 80

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
85 90 95

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
100 105 110

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
115 120 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
130 135 140

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
165 170 175

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
180 185 190

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
195 200 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 37
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 37
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 38
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 38
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 39
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 39
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 40
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 40
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的 5xHis 標籤

<400> 41
His His His His His
1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的 6xHis 標籤

<400> 42
His His His His His His
1 5

<210> 43
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(45)
<223> 此序列可包含3-9個 "Gly Gly Gly Gly Ser" 重複單元

<400> 43
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

35 40 45

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 44
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 45
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 45
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 46
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 46
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 47
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 47
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 48
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 48
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
35 40 45

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
50 55 60

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
65 70 75 80

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
85 90 95

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
100 105 110

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
115 120 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
130 135 140

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
165 170 175

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
180 185 190

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
195 200 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 49
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 49
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 50
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 50
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 51
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 51
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 52
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 52
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 53
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 53
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 54
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 54
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Gly Lys
225

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 55
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 56
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 57
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 57
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 58
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 58
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 59
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 59
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 60
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 60
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 61
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 61
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

```
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        115                 120                 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
    130                 135                 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145                 150                 155                 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                165                 170                 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        195                 200                 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 62
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 62

```
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            20                  25                  30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        35                  40                  45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    50                  55                  60
```

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 63
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 63
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 64
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 64
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 65
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 65

```
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                  10                  15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            20                  25                  30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        35                  40                  45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    50                  55                  60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65                  70                  75                  80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                85                  90                  95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        115                 120                 125

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
    130                 135                 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145                 150                 155                 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                165                 170                 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
            180                 185                 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        195                 200                 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
```

225 230

<210> 66
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 66
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro
20

<210> 67
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 67
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro
20

<210> 68
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 68
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
20

<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 69
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 70
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 70
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro
20

<210> 71
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 71
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 72
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 72
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro
20

<210> 73
<211> 22

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 73
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20

<210> 74
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 74
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly
35

<210> 75
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 75
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 76
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 76

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5				10						15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 77
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 77
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

```
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    130                 135                 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145                 150                 155                 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225                 230                 235                 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        275                 280                 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    290                 295                 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 78
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的多肽

<400> 78

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5				10						15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
		20					25						30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
	35					40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
50					55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro
		100					105						110		
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
	115					120					125				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
130					135					140					
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
145					150					155					160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
			165					170						175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
		180					185						190		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
	195					200					205				
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
210					215					220					
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240

```
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
```

<210> 79
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成的胜肽

<400> 79
Glu Leu Leu Gly
1

【發明申請專利範圍】

【請求項1】　一種包括將一多特異性結合分子(MBM)或包括該 MBM 之醫藥組成物投予一對象的方法，其中該 MBM 係包括：

(a) 一特異性與人類纖維母細胞生長因子受體 1c 同功型(「FGFR1c」)結合之抗原結合模組 1 (ABM1)；

(b) 一特異性與人類 klotho β (「KLB」)的 GH1 結構域結合之抗原結合模組 2 (ABM2)；及

(c) 一特異性與人類 KLB 的 GH2 結構域結合之抗原結合模組 3 (ABM3)。

【請求項2】　如請求項 1 之方法，其為三特異性結合分子(「TBM」)。

【請求項3】　如請求項 1 或請求項 2 之方法，其中ABM1 為 scFv 或 Fab。

【請求項4】　如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其中ABM2 為 scFv 或 Fab。

【請求項5】　如請求項 1 至 4 中任一項之方法，其中ABM3 為 scFv 或 Fab。

【請求項6】　如請求項 1 至 5 中任一項之方法，其中該 MBM 係包括 Fc 異二聚體。

【請求項7】　如請求項 6 之方法，其中該 MBM 係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一 scFv，其操作上連接(ii)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。

【請求項8】　如請求項 7 之方法，其中ABM1 為第一 Fab。

【請求項9】　如請求項 8 之方法，其中ABM2 為 scFv 且 ABM3 為第二 Fab。

【請求項10】　如請求項 8 之方法，其中ABM2 為第二 Fab 且 ABM3 為 scFv。

【請求項11】　如請求項 7 至 10 中任一項之方法，其中該 scFv 係經由連接子與第一重鏈區相連接。

【請求項12】 如請求項 11 之方法，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸。

【請求項13】 如請求項 11 方法，其中該連接子長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸。

【請求項14】 如請求項 6 之方法，其中該 MBM 係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(ii)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括 (i) 一第三 Fab 之第三重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第三重鏈區配對形成第三 Fab 的第三輕鏈。

【請求項15】 如請求項 14 之方法，其中該第一、第二和第三Fab 為僅有的抗原結合模組。

【請求項16】 如請求項 14 或請求項 15 之方法，其中ABM1 為第二 Fab。

【請求項17】 如請求項 16 之方法，其中ABM2 為第一 Fab 且 ABM3 為第三 Fab。

【請求項18】 如請求項 16 之方法，其中ABM3 為第一 Fab 且 ABM2 為第三 Fab。

【請求項19】 如請求項 1 至 18 中任一項之方法，其中該對象具有代謝病症。

【請求項20】 如請求項 1 至 19 中任一項之方法，其中該 MBM 為三價的 MBM。

【請求項21】 如請求項 1 至 20 中任一項之方法，其中該 MBM 係包括成對的異二聚體恆定結構域。

【請求項22】 如請求項 126 之方法，其中各恆定結構域係包括一具有降低的效應子功能之絞鏈序列。

【請求項23】 如請求項 137 之方法，其中該絞鏈序列係包括或由 SEQ ID NO：66、SEQ ID NO：67、SEQ ID NO：70 和 SEQ ID NO：71 中任一者之胺基酸序列所組成。

【請求項24】 如請求項 137 或請求項 138 之方法，其中各恆定結構域係包括一與 SEQ ID NO：46 具有至少 90%序列相同性的胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係在胺基酸位置 233-236 (EU 編號)包括 P-V-A-缺位序列；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項25】 如請求項 22 或請求項 23 之方法，其中該等恆定結構域各自係包括與 SEQ ID NO：49 (hIgG1 N180G，亦稱為 hIgG1 N297G)具有至少 90%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 N180G/N297G 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項26】 如請求項 137 或請求項 138 之方法，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：53 (hIgG4 S108P，亦稱為 hIgG4 S228P)具有至少 90%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項27】 如請求項 137 或請求項 138 之方法，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：54 (變體 IgG4，帶有 S108P 取代，亦稱為 hIgG4 S228P，和 IgG1 CH2 及 CH3 結構域)具有至少 90%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，其中一個或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項28】 一種多特異性結合分子(MBM)，係包括：

(a) 一特異性與人類纖維母細胞生長因子受體 1c 同功型(「FGFR1c」)結合之抗原結合模組 1 (ABM1)；

(b) 一特異性與人類 klotho β (「KLB」)的 GH1 結構域結合之抗原結合模組 2 (ABM2)；及

(c) 一特異性與人類 KLB 的 GH2 結構域結合之抗原結合模組 3 (ABM3)。

【請求項29】 如請求項 28 之 MBM，其為三特異性結合分子 (「TBM」)。

【請求項30】 如請求項 28 或請求項 29 之 MBM，其中ABM1 為 Fab 或 scFV。

【請求項31】 如請求項 28 至 30 中任一項之 MBM，其中ABM2 為 Fab 或 scFV。

【請求項32】 如請求項 28 至 31 中任一項之 MBM，其中ABM3 為 Fab 或 scFV。

【請求項33】 如請求項 28 至 32 中任一項之 MBM，其係包括 Fc 異二聚體。

【請求項34】 如請求項 33 之 MBM，其係包括：

(d) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一 scFv，其操作上連接(ii)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(e) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(f) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(g) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈。

【請求項35】 如請求項 34 之 MBM，其中ABM1 為第一 Fab。

【請求項36】 如請求項35之MBM，其中ABM2為scFv且ABM3為第二Fab。

【請求項37】 如請求項 35 之 MBM，其中ABM2 為第二 Fab 且 ABM3 為 scFv。

【請求項38】 如請求項 34 至 37 中任一項之 MBM，其中該 scFv 係經由連接子與第一重鏈區相連接。

【請求項39】 如請求項 38 之 MBM，其中該連接子長度為 5 個胺基酸至 45 個胺基酸。

【請求項40】 如請求項 38 之 MBM，其中該連接子長度為 7 個胺基酸至 30 個胺基酸。

【請求項41】 如請求項 33 之 MBM，其係包括：

(a) 一第一多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括(i)一第一 Fab 之第一重鏈區，其操作上連接(ii)一第二 Fab 之第二重鏈區，其操作上連接(iii)一 Fc 結構域；

(b) 一第二多肽鏈，其由 N-端至 C-端方向，係包括 (i) 一第三 Fab 之第三重鏈區，其操作上連接(ii)一 Fc 結構域；

(c) 一第三多肽鏈，其係包括與第一重鏈區配對形成第一 Fab 的第一輕鏈；

(d) 一第四多肽鏈，其係包括與第二重鏈區配對形成第二 Fab 的第二輕鏈；及

(e) 一第五多肽鏈，其係包括與第三重鏈區配對形成第三 Fab 的第三輕鏈。

【請求項42】 如請求項 41 之 MBM，其中該第一、第二和第三Fab 為僅有的抗原結合模組。

【請求項43】 如請求項 41 或請求項 42 之 MBM，其中ABM1 為第二 Fab。

【請求項44】 如請求項 43 之 MBM，其中ABM2 為第一 Fab 且 ABM3 為第三 Fab。

【請求項45】 如請求項 43 之 MBM，其中ABM3 為第一 Fab 且 ABM2 為第三 Fab。

【請求項46】 如請求項 28 至 45 中任一項之 MBM，其為三價的 MBM。

【請求項47】 如請求項 28 至 46 中任一項之 MBM，其係包括成對的異二聚體恆定結構域。

【請求項48】 如請求項287 之 MBM，其中各恆定結構域係包括一具有降低的效應子功能之絞鏈序列。

【請求項49】 如請求項298 之 MBM，其中該絞鏈序列係包括或由 SEQ ID NO：66、SEQ ID NO：67、SEQ ID NO：70 和 SEQ ID NO：71 中任一者之胺基酸序列所組成。

【請求項50】 如請求項287至49 中任一項之 MBM，其中各恆定結構域係包括一與 SEQ ID NO：46 具有至少 90%序列相同性的胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係在胺基酸位置 233-236 (EU 編號)包括 P-V-A-缺位序列；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項51】 如請求項 287至49 中任一項之 MBM，其中該等恆定結構域各自係包括與 SEQ ID NO：49 (hIgG1 N180G，亦稱為 hIgG1 N297G)具有至少 90%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 N180G/N297G 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項52】 如請求項 287至49 中任一項之 MBM，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：53 (hIgG4 S108P，亦稱為 hIgG4 S228P)具有至少 90%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項53】 如請求項 287至49 中任一項之 MBM，其中該等恆定結構域係包括與 SEQ ID NO：54 (變體 IgG4，帶有 S108P，亦稱為 hIgG4 S228P，取代和 IgG1 CH2 及 CH3 結構域)具有至少 90%序列相同性之胺基酸序列，其中：

(a) 二個恆定結構域係包括 S108P/S228P 胺基酸取代；

(b) 一恆定結構域係包括旋鈕(knob)突變 T366W 且另一個恆定結構域係包括孔洞(hole)突變 T366S、L368A 和 Y407V；

(c) 視需要，一或二個恆定結構域係包括星狀突變 H435R 和 Y436F；及

(d) 二個恆定結構域皆包括或皆不包括二硫化物結構突變 S354C 或 E356C。

【請求項54】 一種包括如請求項 28 至 325 中任一項之 MBM 的醫藥組成物。

【請求項55】 一種包括將如請求項 28 至 53 中任一項之 MBM 或如請求項 54 之醫藥組成物投予一對象的方法。

【請求項56】 如請求項 55 之方法，其中該 MBM 或該醫藥組成物係以有效：

(a) 治療代謝症狀；及/或

(b) 改善代謝之量投予該對象。

【請求項57】 如請求項 55 或請求項 56 之方法，其中該對象具有代謝病症。

【請求項58】 一種或多數種編碼如請求項 28 至 325 中任一項之 MBM 的核酸。

【請求項59】 一種經工程改造用以表現如請求項 28 至 325 中任一項之 MBM 的細胞。

【請求項60】 一種以一或多個表現載體轉染之細胞，該載體係包括一或多個在一或多個啟動子控制下編碼如請求項 28 至 325 中任一項之 MBM 的核酸序列。

【請求項61】 一種製造 MBM 的方法，係包括：

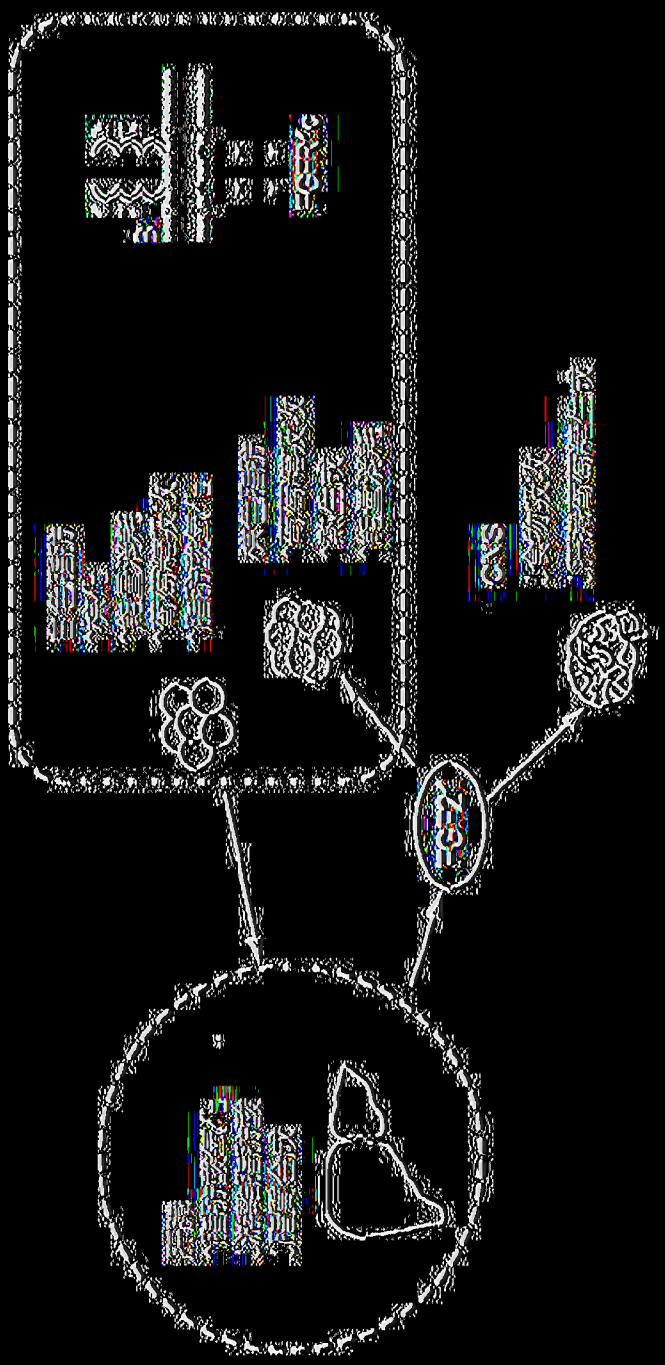
(a) 於表現該 MBM 之條件下培養如請求項 59 或請求項 60 之細胞；及

(b) 從細胞培養回收該 MBM。

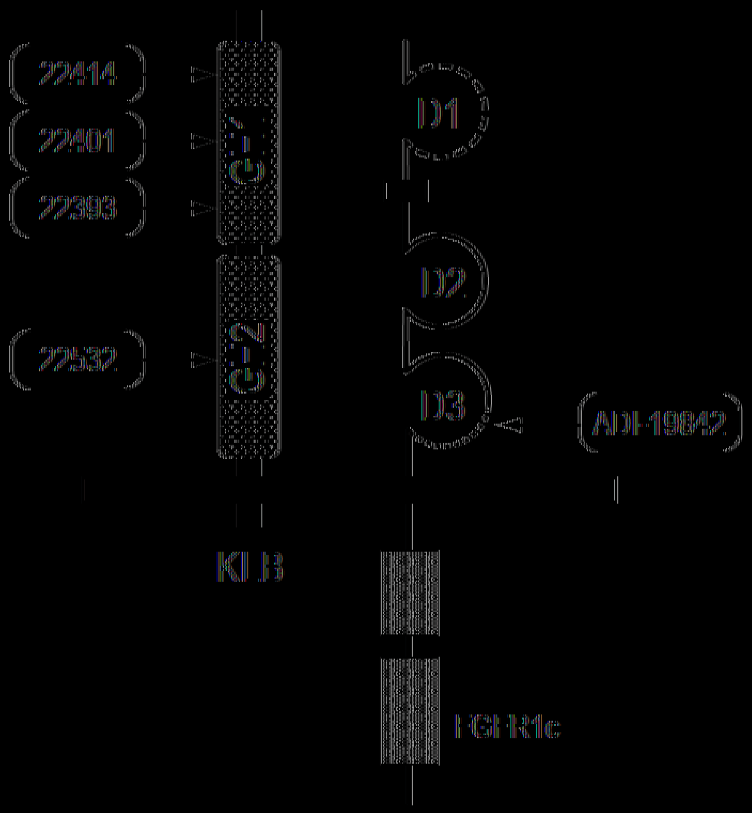
【請求項62】　如請求項 61 之方法，其進一步係包括增豐該 MBM。

【請求項63】　如請求項61或請求項62之方法，其進一步係包括純化該MBM。

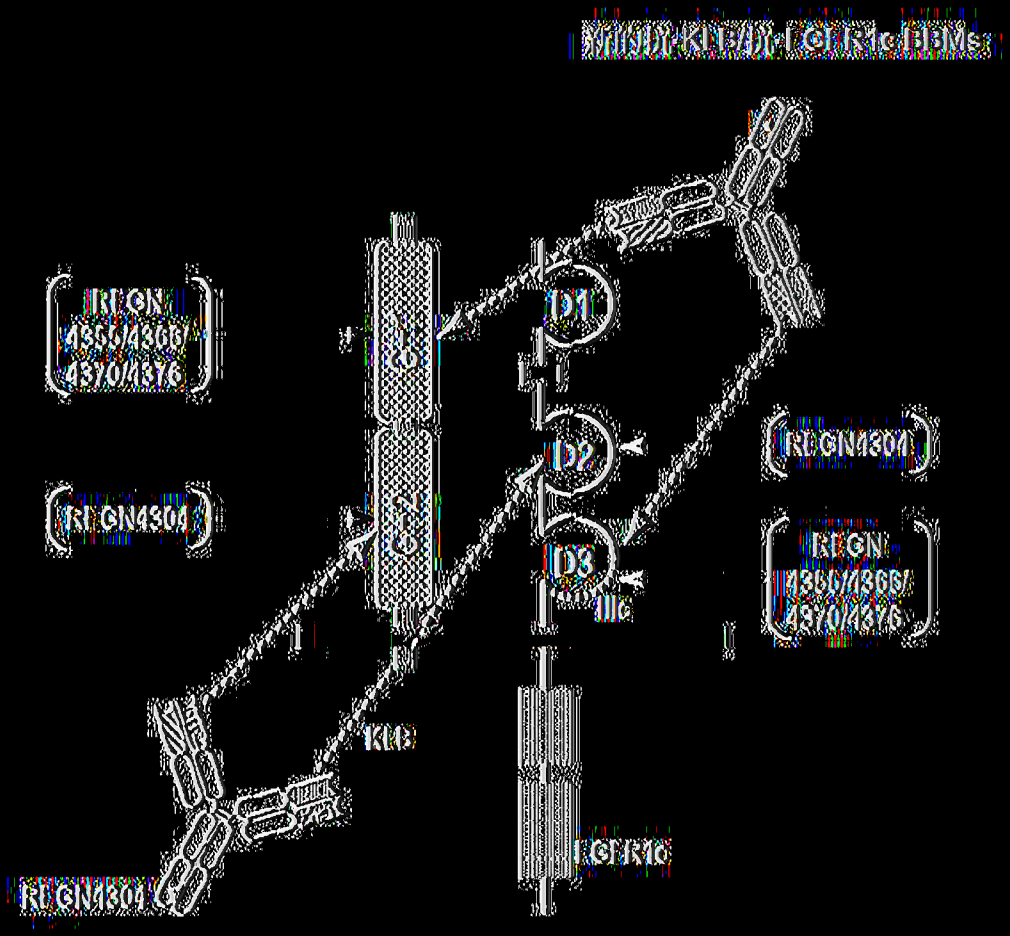
[(發明圖式)]



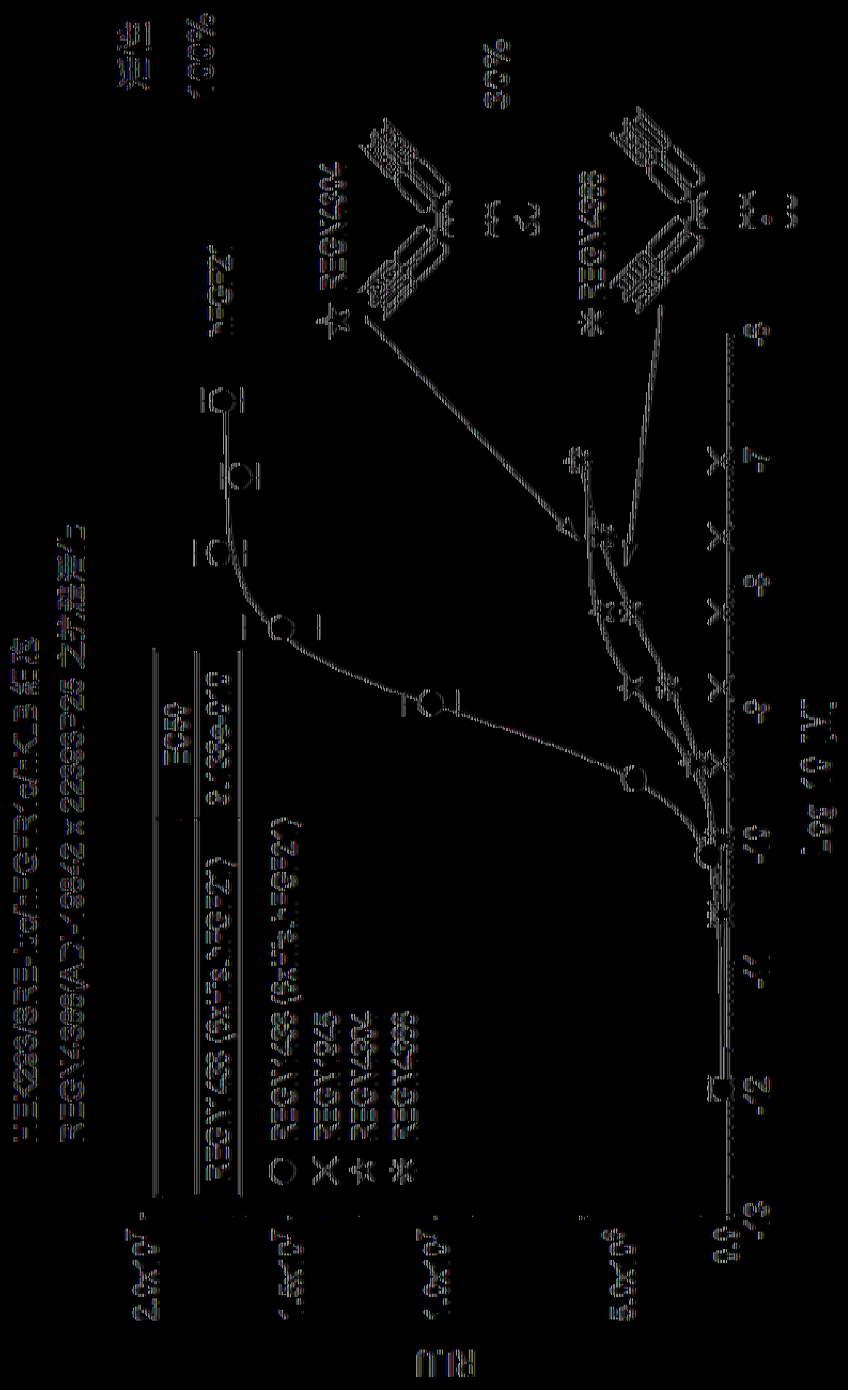
[(圖1)]



[圖2,]


第N步驟
KL3
LGFR1c
IBMs
IR_GN4304
D1
D2
D3
IIIc
IR_GN4304
IR_GN4304
KL3
LGFR1c
IR_GN4304

圖(圖3)


RU
SR1
SR2
SR3
SR4
SR5
SR6
SR7
SR8
SR9
SR10
SR11
SR12
SR13
SR14
SR15
SR16
SR17
SR18
SR19
SR20
SR21
SR22
SR23
SR24
SR25
SR26
SR27
SR28
SR29
SR30
SR31
SR32
SR33
SR34
SR35
SR36
SR37
SR38
SR39
SR40
SR41
SR42
SR43
SR44
SR45
SR46
SR47
SR48
SR49
SR50
SR51
SR52
SR53
SR54
SR55
SR56
SR57
SR58
SR59
SR60
SR61
SR62
SR63
SR64
SR65
SR66
SR67
SR68
SR69
SR70
SR71
SR72
SR73
SR74
SR75
SR76
SR77
SR78
SR79
SR80
SR81
SR82
SR83
SR84
SR85
SR86
SR87
SR88
SR89
SR90
SR91
SR92
SR93
SR94
SR95
SR96
SR97
SR98
SR99
SR100
SR101
SR102
SR103
SR104
SR105
SR106
SR107
SR108
SR109
SR110
SR111
SR112
SR113
SR114
SR115
SR116
SR117
SR118
SR119
SR120
SR121
SR122
SR123
SR124
SR125
SR126
SR127
SR128
SR129
SR130
SR131
SR132
SR133
SR134
SR135
SR136
SR137
SR138
SR139
SR140
SR141
SR142
SR143
SR144
SR145
SR146
SR147
SR148
SR149
SR150
SR151
SR152
SR153
SR154
SR155
SR156
SR157
SR158
SR159
SR160
SR161
SR162
SR163
SR164
SR165
SR166
SR167
SR168
SR169
SR170
SR171
SR172
SR173
SR174
SR175
SR176
SR177
SR178
SR179
SR180
SR181
SR182
SR183
SR184
SR185
SR186
SR187
SR188
SR189
SR190
SR191
SR192
SR193
SR194
SR195
SR196
SR197
SR198
SR199
SR200
SR201
SR202
SR203
SR204
SR205
SR206
SR207
SR208
SR209
SR210
SR211
SR212
SR213
SR214
SR215
SR216
SR217
SR218
SR219
SR220
SR221
SR222
SR223
SR224
SR225
SR226
SR227
SR228
SR229
SR230
SR231
SR232
SR233
SR234
SR235
SR236
SR237
SR238
SR239
SR240
SR241
SR242
SR243
SR244
SR245
SR246
SR247
SR248
SR249
SR250
SR251
SR252
SR253
SR254
SR255
SR256

圖(4)

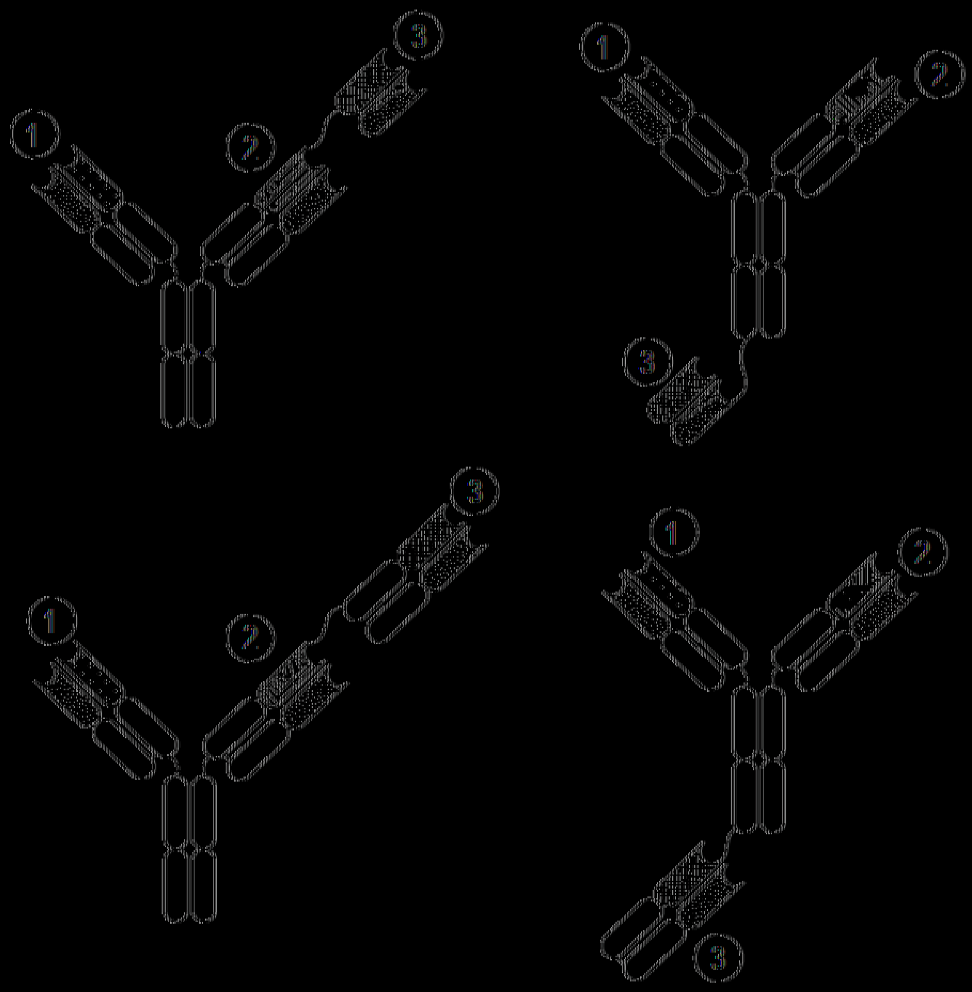


圖5

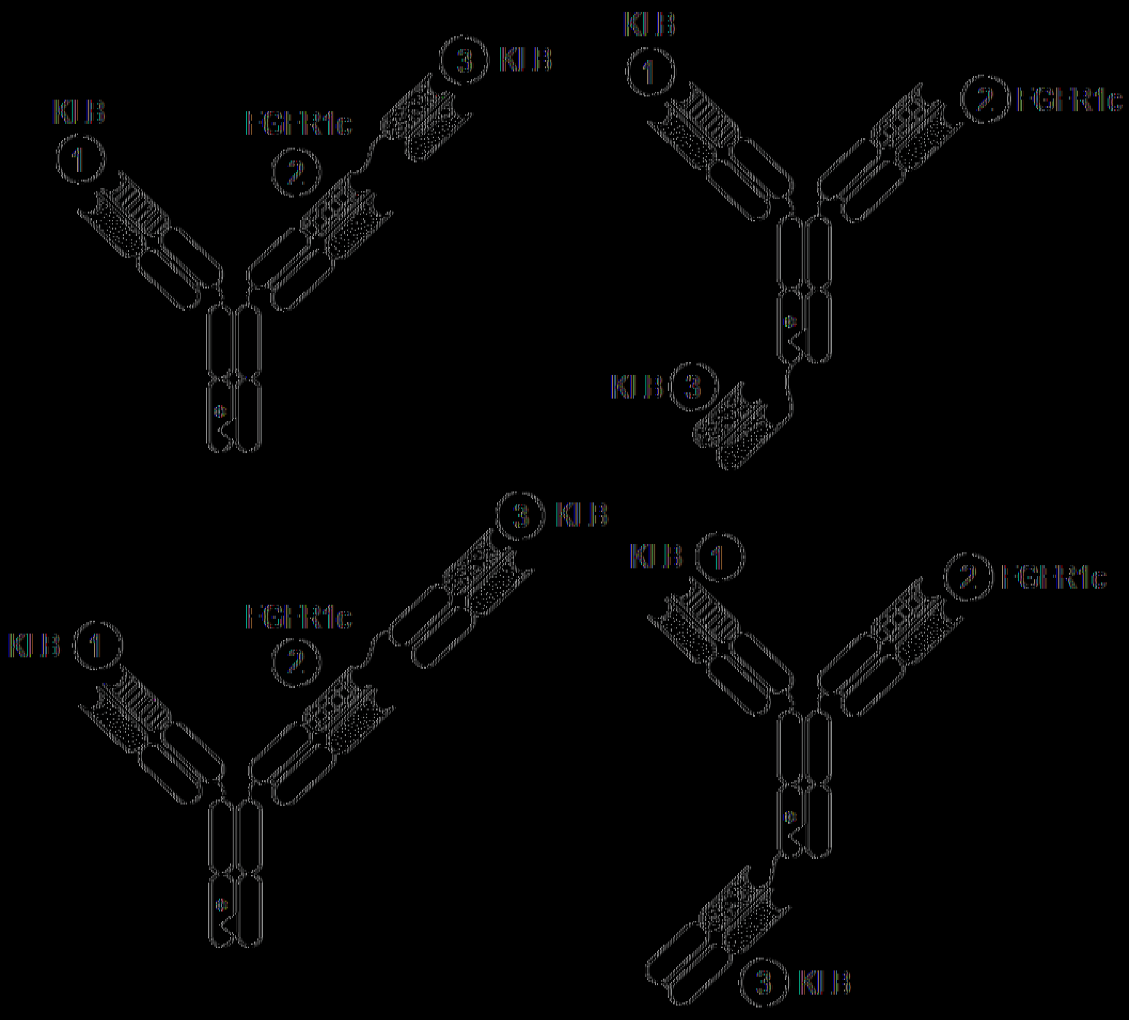
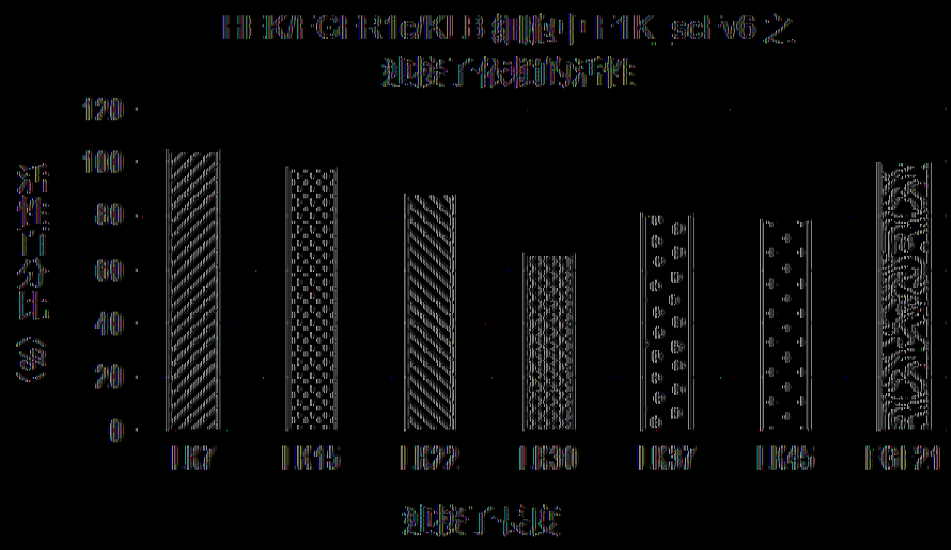

KIR
1
2
IGFR1c
3
KIR
KIR
1
2
IGFR1c
KIR
3
KIR
1
2
IGFR1c
3
KIR
KIR
1
2
IGFR1c
3
KIR

圖6A


HTTP/3 と HTTP/2 の同時セッション数と
速度テスト成功率の関係
成功率（%）
120
100
80
60
40
20
0
167
145
162
130
167
146
171
速度テスト設定

|（図6B）|

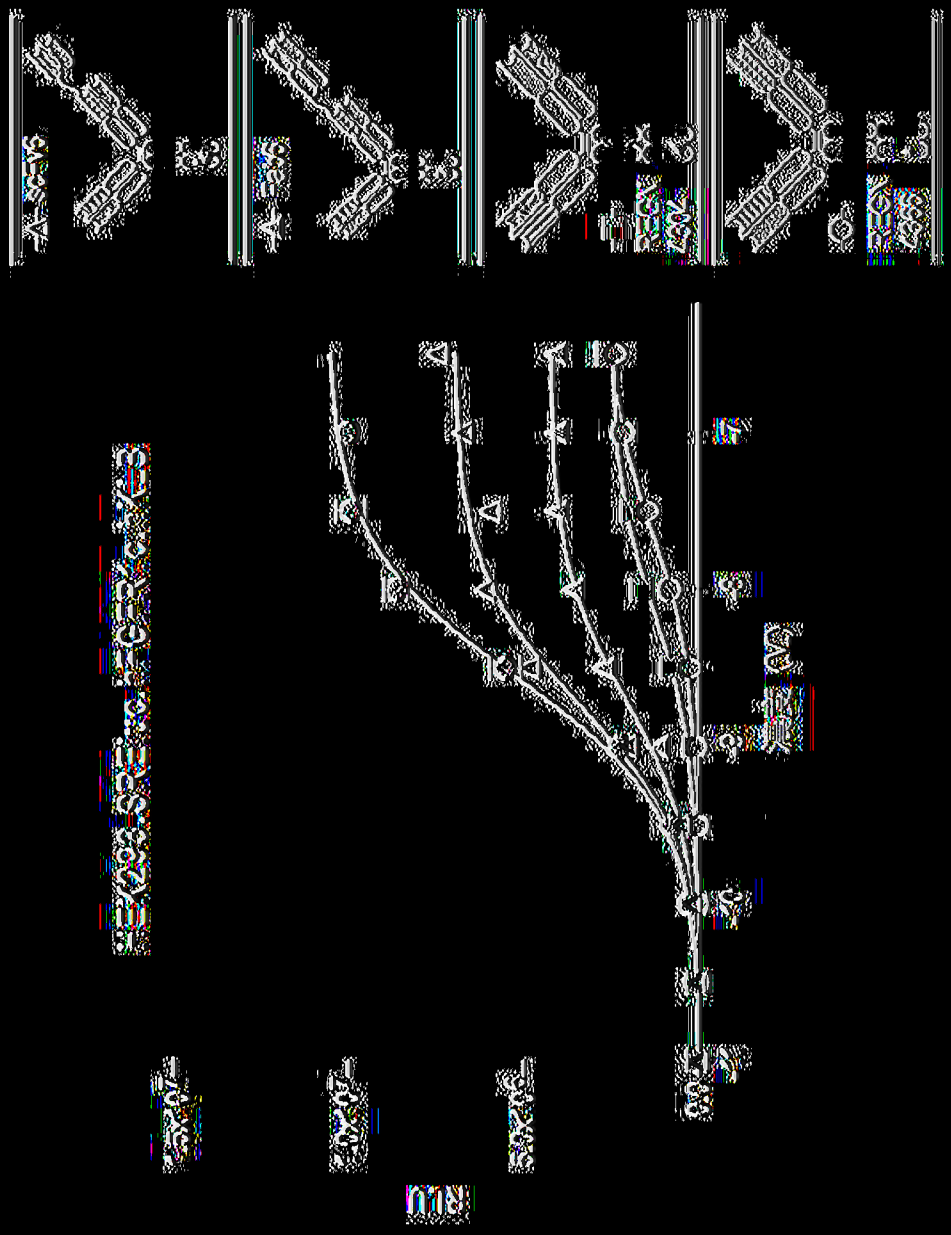
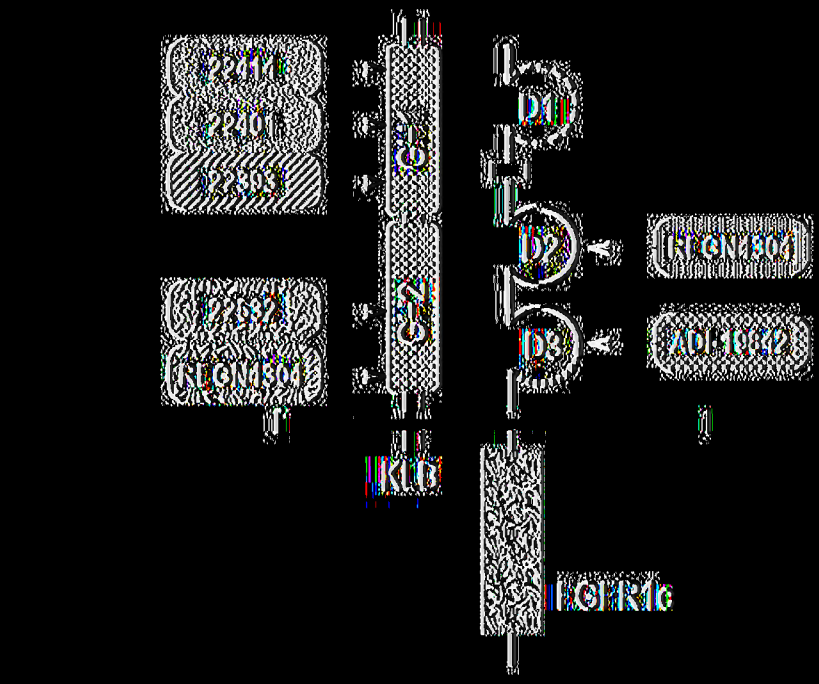


圖7A


22414
22401
22393
D1
D2
RTGN4304
22432
RTGN4304
D3
ADL10342
K16
GCFR16

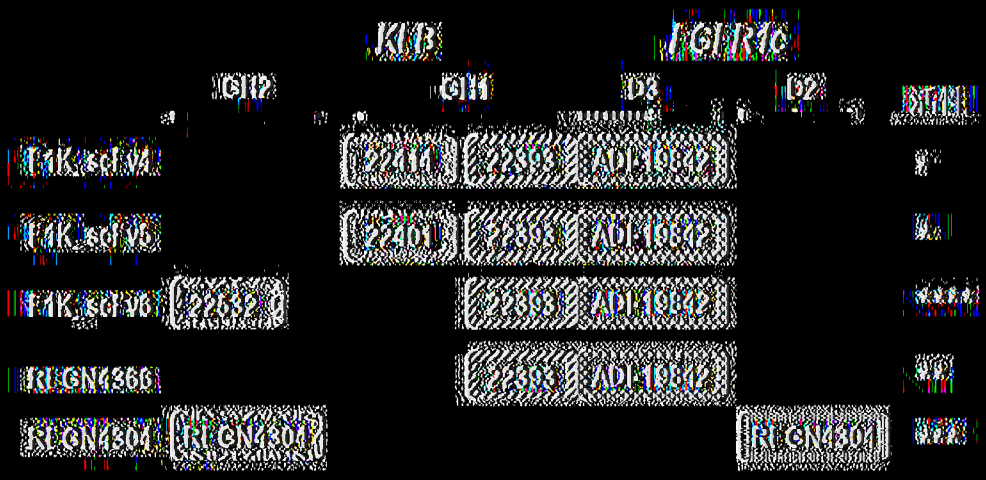
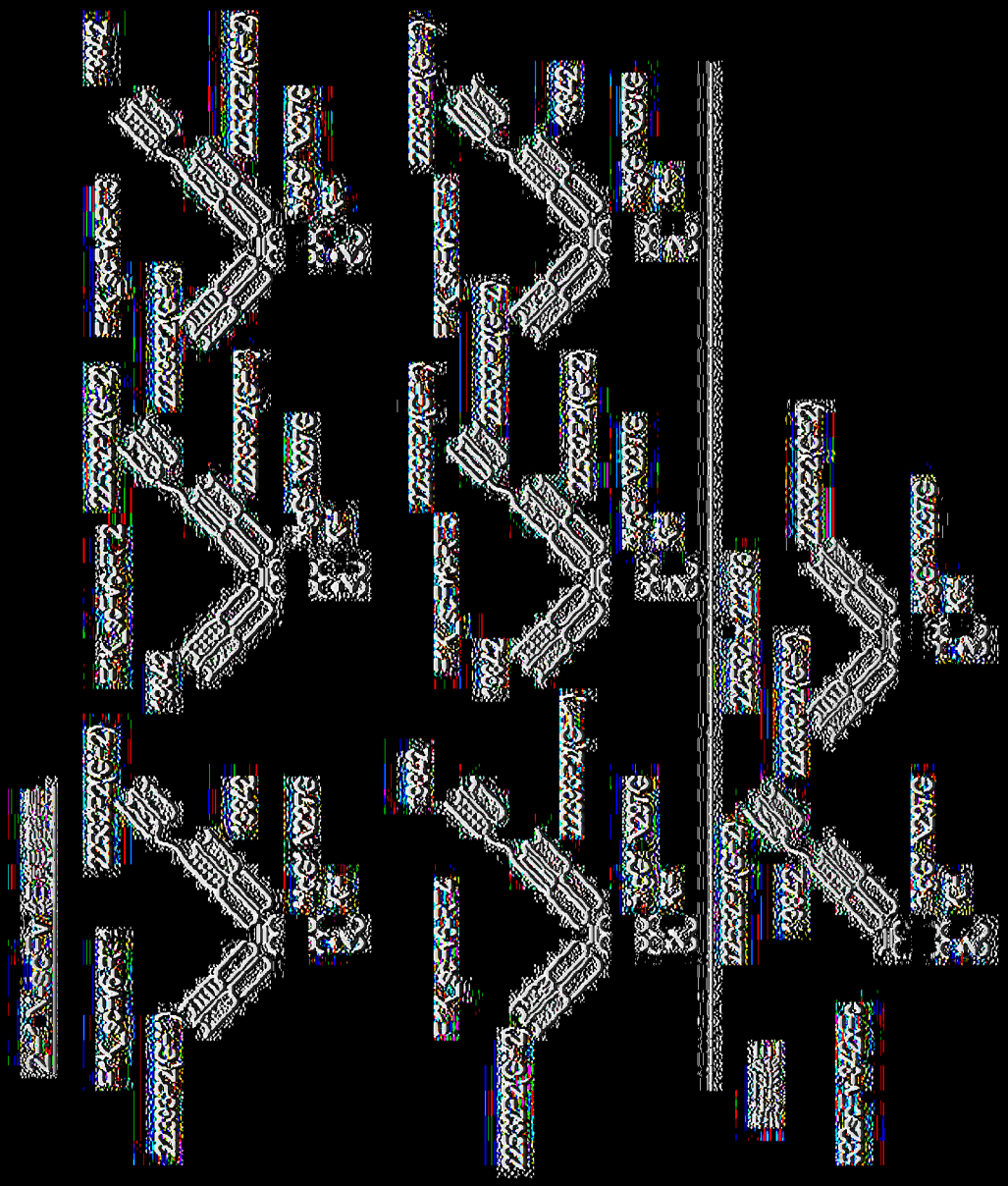

K16
GCFR16
GH2
GH1
D3
D2
GH3
F4K_scfv4
F4K_scfv5
F4K_scfv6
RTGN4366
RTGN4304
RTGN4304
22414
22393
ADL10342
22401
22393
ADL10342
22432
22393
ADL10342
22393
ADL10342
RTGN4304

圖7B

|(|岡8∧)|

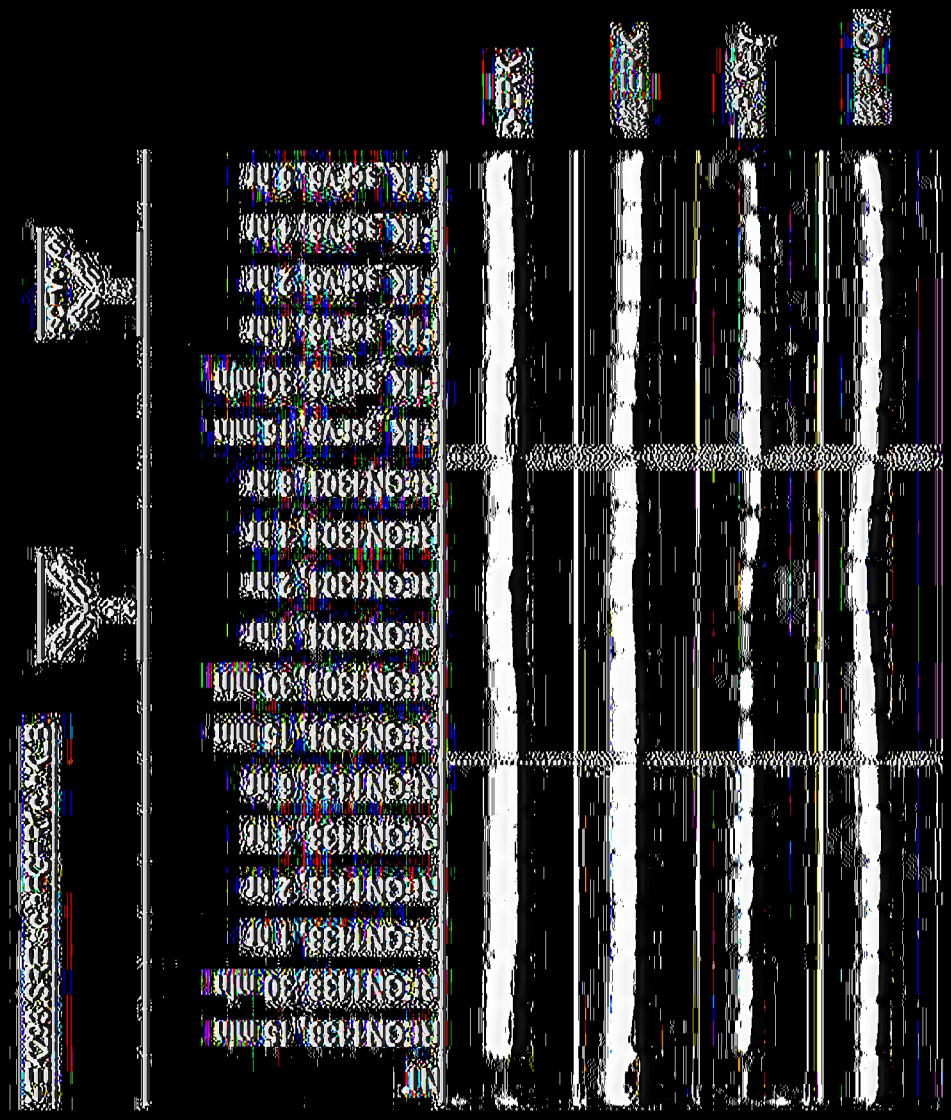


|(|同|8B)|

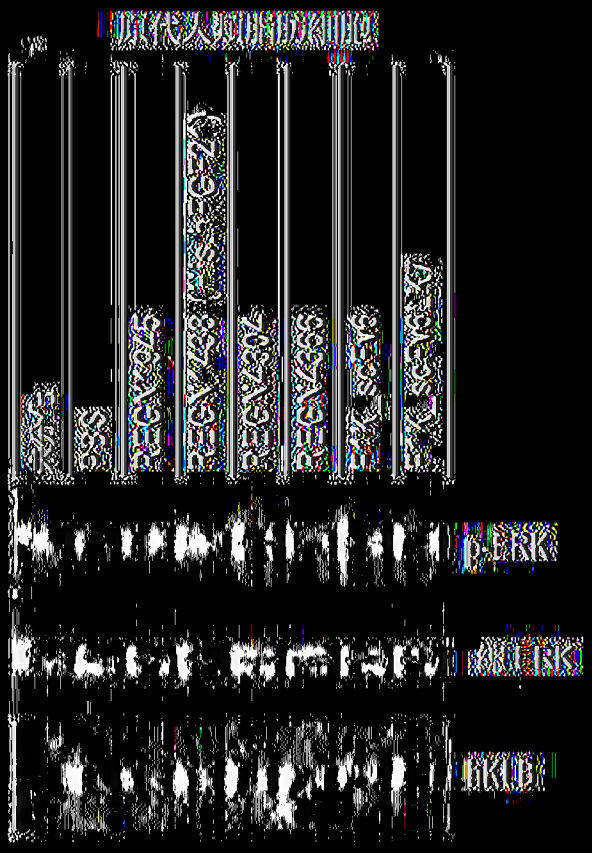
圖9

R-GND138-10.0M
R-GND138-1.0M
R-GND130A-10.0M
R-GND130A-1.0M
R-GND130-10.0M
R-GND130-1.0M
1K-5dBVp-10.0M
1K-5dBVp-1.0M
1K-5dBVpdeg-10.0MM
1K-5dBVpdeg-1.0MM
R-GND191S-10.0M
R-GND191S-1.0M
SBS

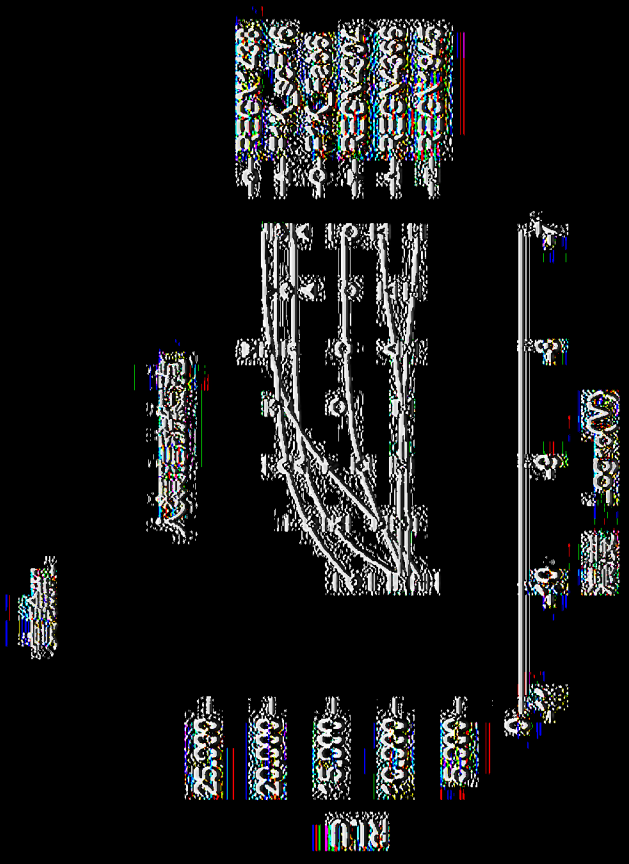
圖10A



[圖10B]

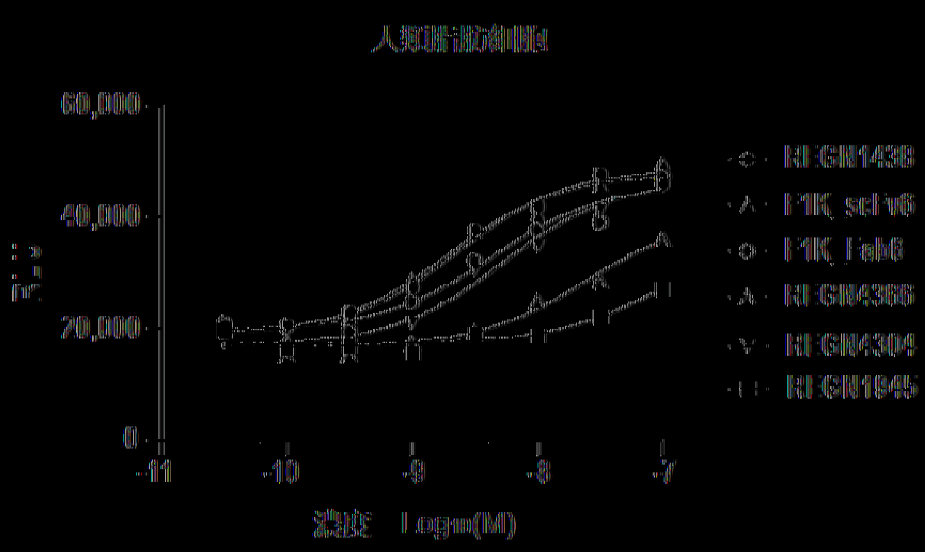


|(圖11A)|



[(圖11B)]

圖2


人源BTK抑制曲線
60,000
40,000
20,000
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log10(M)
RIGH438
PIK_sch46
PIK_Fab6
RIGH366
RIGH304
RIGH145

|(碘11C)|

App
Web
Server
Database
Cache
Queue
Worker
Storage
CDN
Monitoring
Logging
Alerting
Backup
Auth
Payment
Email
SMS
Analytics
Search
Recommendation
Notification
Gateway
Load Balancer
Firewall
DNS
Certificate
Container
Orchestration
Pipeline
Repository
Artifact
Secret
Config
Feature Flag
Experiment
Dashboard
Report
Audit
Compliance
Policy
Identity
Session
Token
Key
Vault
Network
Subnet
Route
Peering
Endpoint
Proxy
Mesh
Service
Function
Event
Stream
Topic
Partition
Replica
Shard
Index
Query
Schema
Migration
Seed
Fixture
Test
Coverage
Benchmark
Profile
Trace
Span
Metric
Alert
Incident
Runbook
On-call
Escalation
Postmortem
Capacity
Quota
Rate Limit
Throttle
Retry
Timeout
Circuit Breaker
Bulkhead
Fallback
Idempotency
Consistency
Availability
Partition Tolerance
Latency
Throughput
Bandwidth
Packet
Frame
Segment
Datagram
Port
Socket
Handshake
Encryption
Decryption
Hash
Salt
Nonce
Signature
Certificate Authority
Revocation
Expiration
Renewal
Rotation
Compliance
Audit
Forensics
Incident Response
Disaster Recovery
Business Continuity
Risk Assessment
Threat Model
Vulnerability
Patch
Update
Deployment
Rollback
Canary
Blue-Green
Shadow
Dark Launch
Feature Toggle
Configuration
Environment
Staging
Production
Development
Sandbox
Emulator
Simulator
Hardware
Software
Firmware
Driver
Kernel
Operating System
Virtual Machine
Hypervisor
Container Runtime
Image
Registry
Volume
Mount
Permission
Ownership
Group
User
Role
Policy
Boundary
Trust
Federation
Single Sign-On
Multi-Factor
Biometric
Password
Passphrase
Recovery
Enrollment
Provisioning
Deprovisioning
Directory
LDAP
SAML
OAuth
OpenID
JWT
Claim
Scope
Consent
Delegation
Impersonation
Audit Log
Event Log
Access Log
Error Log
Debug Log
Trace Log
Structured Log
Unstructured Log
Log Rotation
Log Retention
Log Aggregation
Log Analysis
Log Search
Log Visualization
Log Alert
Log Dashboard
Log Report
Log Export
Log Import
Log Archive
Log Backup
Log Restore
Log Migration
Log Schema
Log Format
Log Level
Log Filter
Log Parser
Log Collector
Log Shipper
Log Buffer
Log Queue
Log Stream
Log Topic
Log Partition
Log Replica
Log Shard
Log Index
Log Query
Log Cache
Log Proxy
Log Gateway
Log Load Balancer
Log Firewall
Log DNS
Log Certificate
Log Container
Log Orchestration
Log Pipeline
Log Repository
Log Artifact
Log Secret
Log Config
Log Feature Flag
Log Experiment
Log Dashboard
Log Report
Log Audit
Log Compliance
Log Policy
Log Identity
Log Session
Log Token
Log Key
Log Vault
Log Network
Log Subnet
Log Route
Log Peering
Log Endpoint
Log Proxy
Log Mesh
Log Service
Log Function
Log Event
Log Stream
Log Topic
Log Partition
Log Replica
Log Shard
Log Index
Log Query
Log Schema
Log Migration
Log Seed
Log Fixture
Log Test
Log Coverage
Log Benchmark
Log Profile
Log Trace
Log Span
Log Metric
Log Alert
Log Incident
Log Runbook
Log On-call
Log Escalation
Log Postmortem
Log Capacity
Log Quota
Log Rate Limit
Log Throttle
Log Retry
Log Timeout
Log Circuit Breaker
Log Bulkhead
Log Fallback
Log Idempotency
Log Consistency
Log Availability
Log Partition Tolerance
Log Latency
Log Throughput
Log Bandwidth
Log Packet
Log Frame
Log Segment
Log Datagram
Log Port
Log Socket
Log Handshake
Log Encryption
Log Decryption
Log Hash
Log Salt
Log Nonce
Log Signature
Log Certificate Authority
Log Revocation
Log Expiration
Log Renewal
Log Rotation
Log Compliance
Log Audit
Log Forensics
Log Incident Response
Log Disaster Recovery
Log Business Continuity
Log Risk Assessment
Log Threat Model
Log Vulnerability
Log Patch
Log Update
Log Deployment
Log Rollback
Log Canary
Log Blue-Green
Log Shadow
Log Dark Launch
Log Feature Toggle
Log Configuration
Log Environment
Log Staging
Log Production
Log Development
Log Sandbox
Log Emulator
Log Simulator
Log Hardware
Log Software
Log Firmware
Log Driver
Log Kernel
Log Operating System
Log Virtual Machine
Log Hypervisor
Log Container Runtime
Log Image
Log Registry
Log Volume
Log Mount
Log Permission
Log Ownership
Log Group
Log User
Log Role
Log Policy
Log Boundary
Log Trust
Log Federation
Log Single Sign-On
Log Multi-Factor
Log Biometric
Log Password
Log Passphrase
Log Recovery
Log Enrollment
Log Provisioning
Log Deprovisioning
Log Directory
Log LDAP
Log SAML
Log OAuth
Log OpenID
Log JWT
Log Claim
Log Scope
Log Consent
Log Delegation
Log Impersonation

215 nm 的吸光度 (AU)
(nV)
(mV)
(mV)
(m

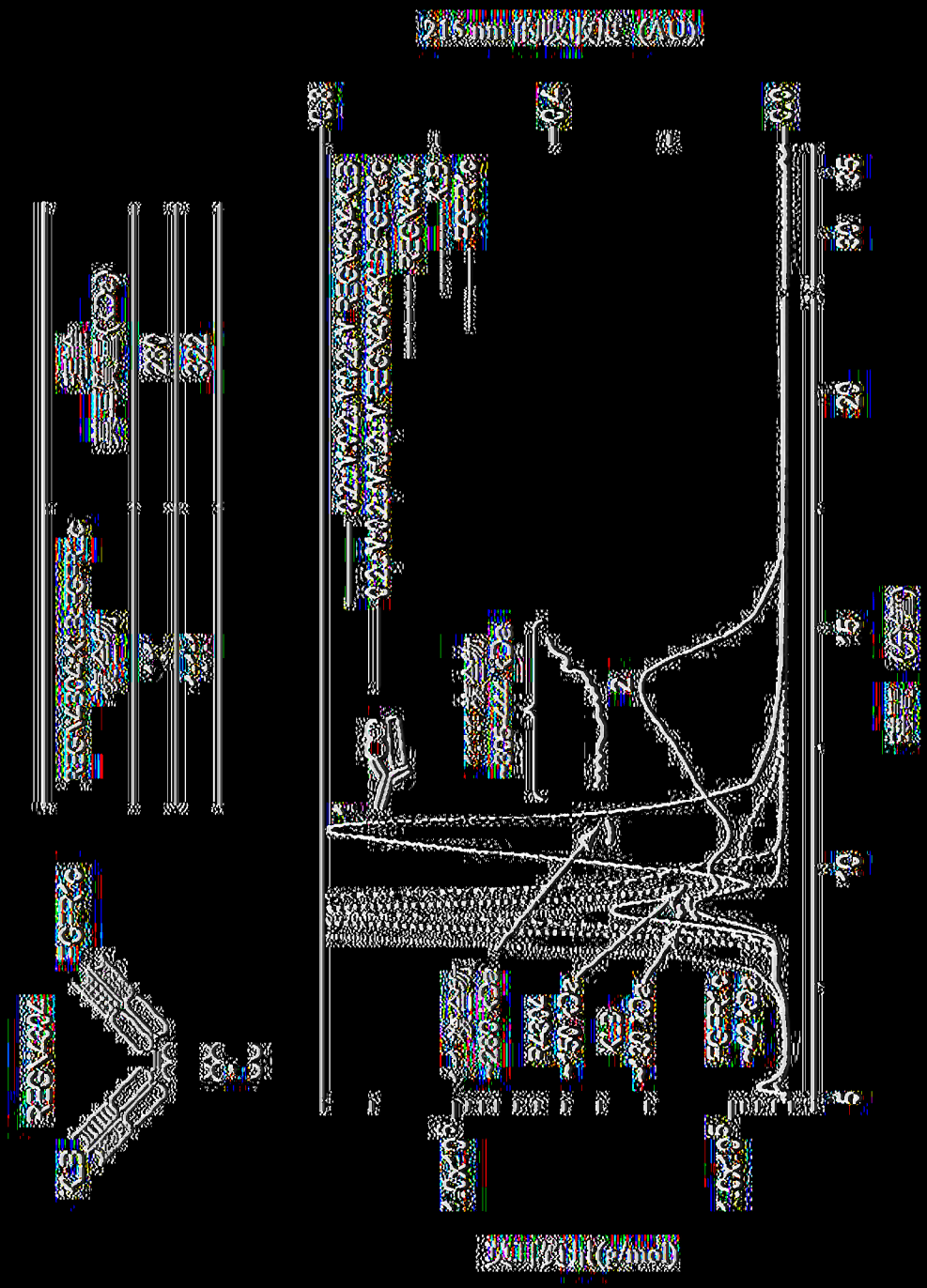
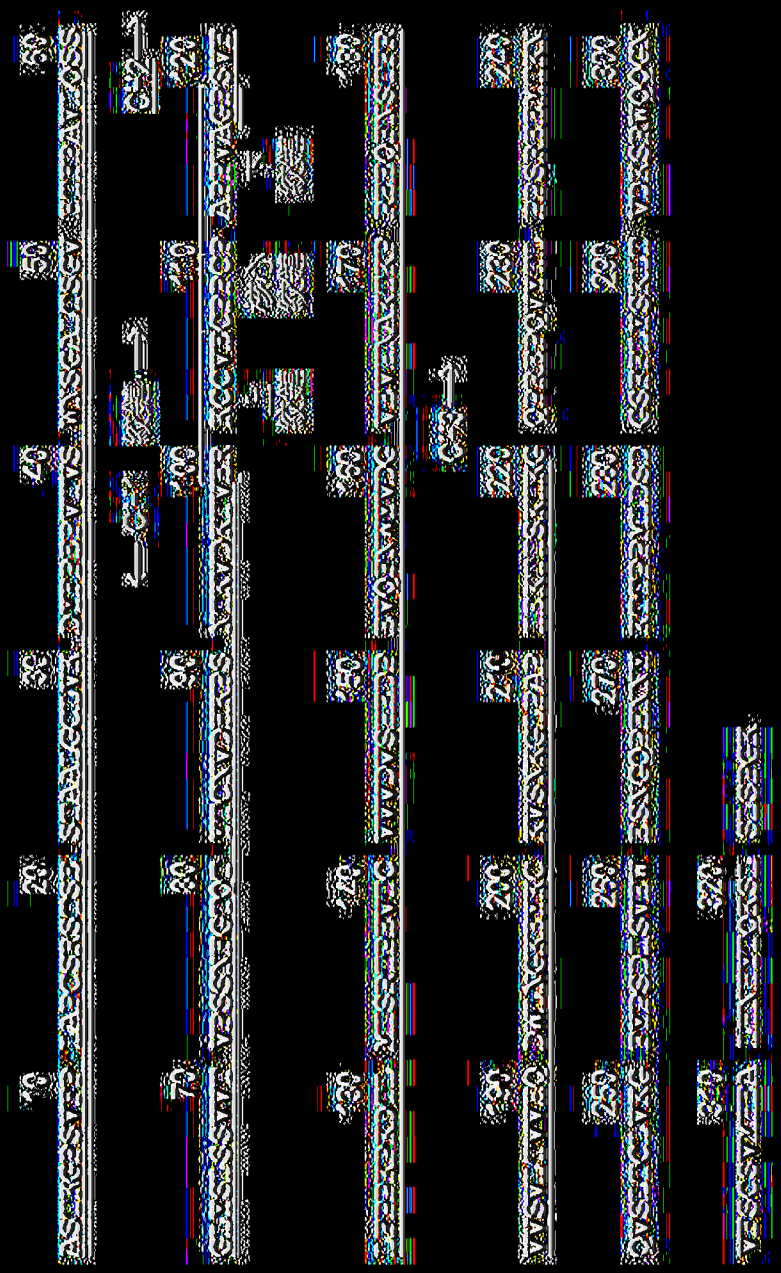


圖13B

215 nm 的吸收度 (AU)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195

圖13D

|(圖14)|



[(圖15)]

69	59	49	39	29	19	9	99	89	79
68	58	48	38	28	18	8	98	88	78
67	57	47	37	27	17	7	97	87	77
66	56	46	36	26	16	6	96	86	76
65	55	45	35	25	15	5	95	85	75
64	54	44	34	24	14	4	94	84	74
63	53	43	33	23	13	3	93	83	73
62	52	42	32	22	12	2	92	82	72
61	51	41	31	21	11	1	91	81	71
60	50	40	30	20	10	0	90	80	70

|(圖16)|

|(圖17)|

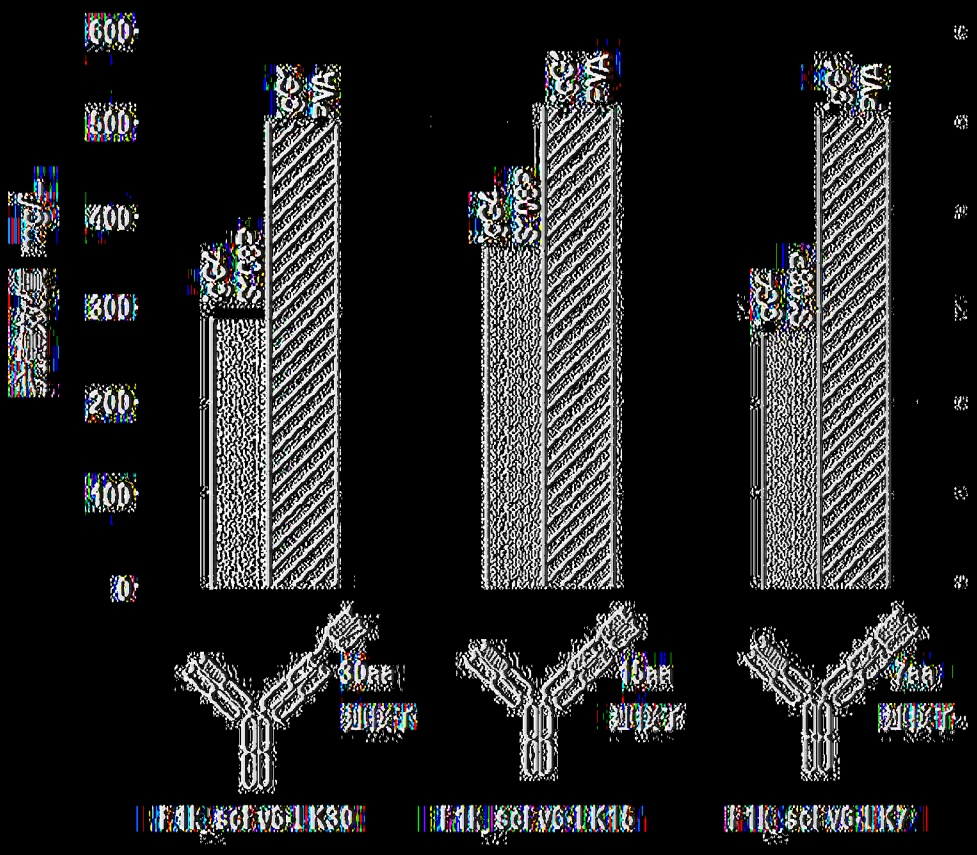
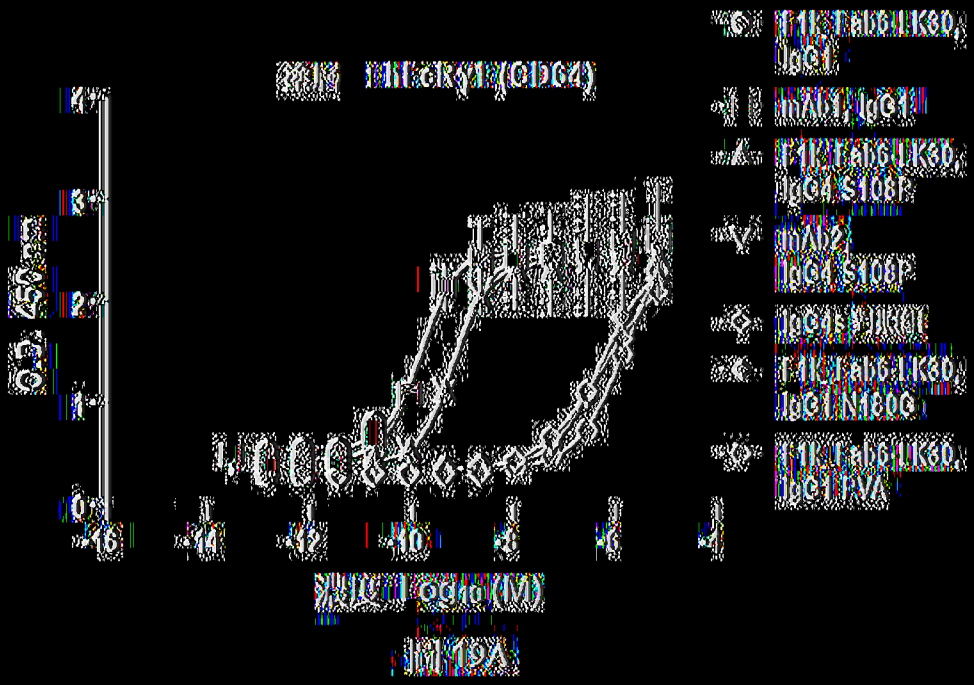
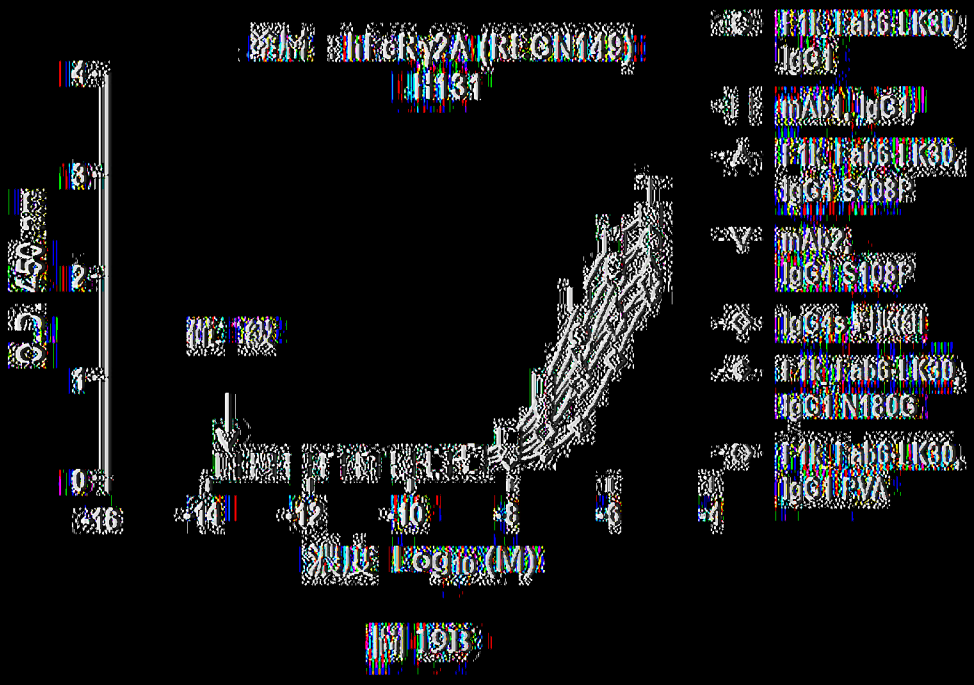


圖18





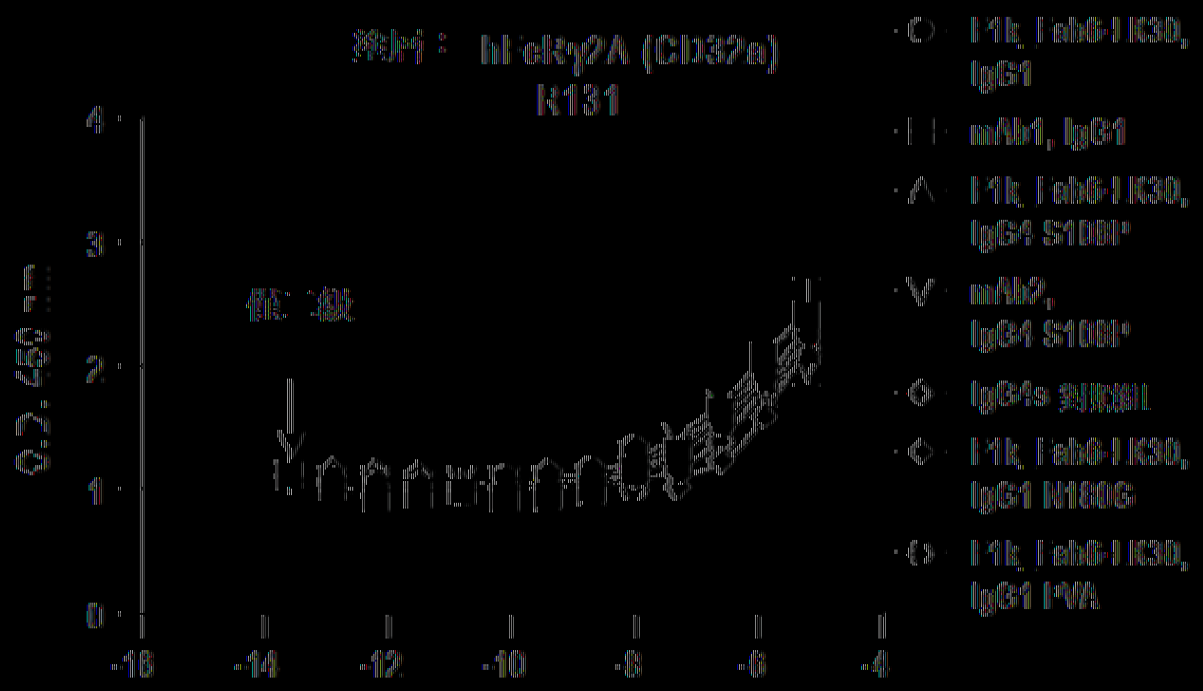

抗原：hCD32A (CD32a)
R131
OD 450 nm
4
3
2
1
0
低：1級
-16
-14
-12
-10
-8
-6
-4
濃度 Log10 (M)
1k, Fab6-1K30, IgG1
mAb1, IgG1
1k, Fab6-1K30, IgG4 S108P
mAb2, IgG1 S108P
IgG4s 對照組
1k, Fab6-1K30, IgG1 N180G
1k, Fab6-1K30, IgG1 N/A

圖 19C

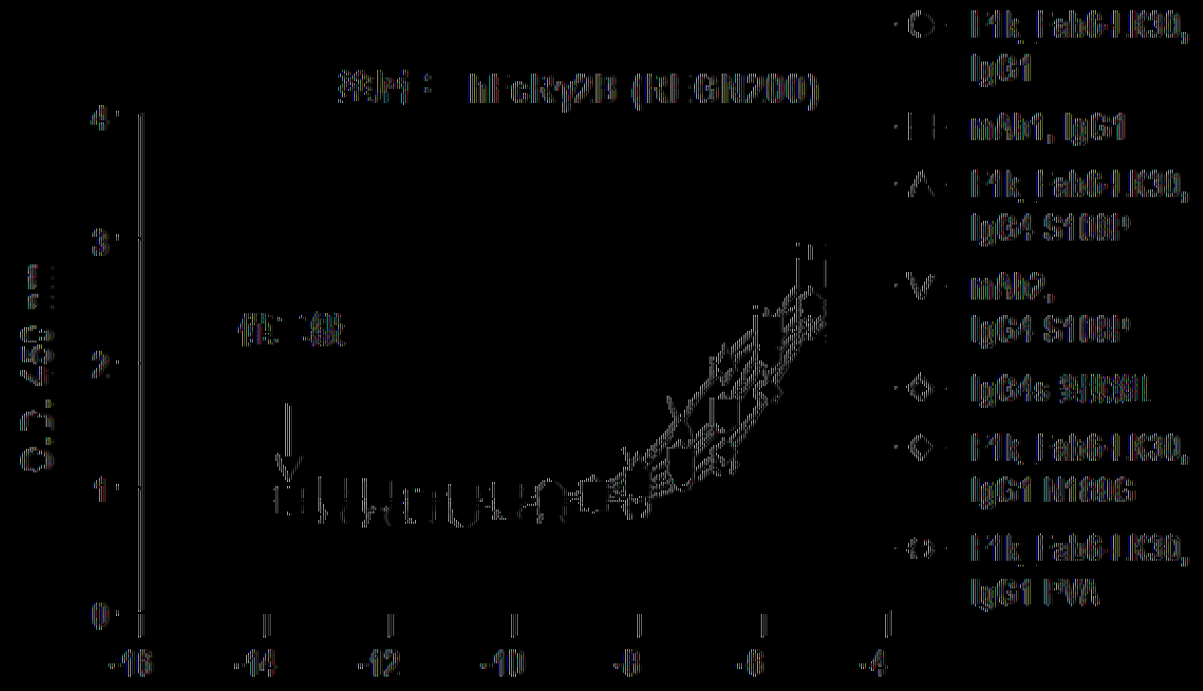

抗原：hCD32B (R131N200)
OD 450 nm
4
3
2
1
0
低：1級
-16
-14
-12
-10
-8
-6
-4
濃度 Log10 (M)
1k, Fab6-1K30, IgG1
mAb1, IgG1
1k, Fab6-1K30, IgG4 S108P
mAb2, IgG1 S108P
IgG4s 對照組
1k, Fab6-1K30, IgG1 N180G
1k, Fab6-1K30, IgG1 N/A

圖 19D

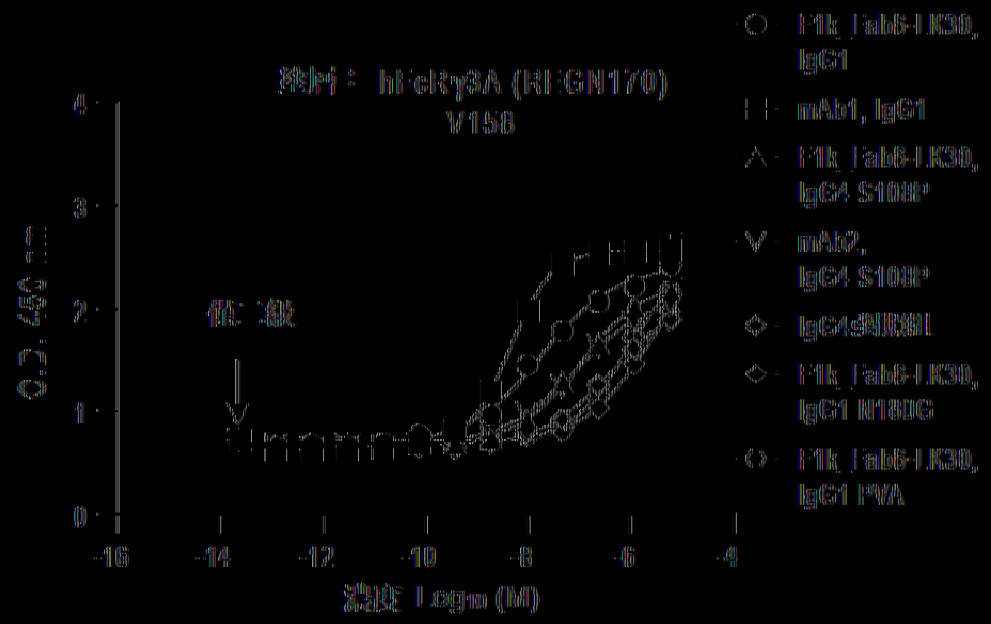

抗原：hFcRγ3A (R|HGN170)
V158
相對螢光單位 (RFU)
結合 log₁₀ (M)
低：無
Fc, mAb1, IgG1
mAb1, IgG1
Fc, Fab6-H30, IgG4 S108P
mAb2, IgG4 S108P
IgG4 gyDNI
Fc, Fab6-H30, IgG1 N180C
Fc, Fab6-H30, IgG1 PVA

圖 19E

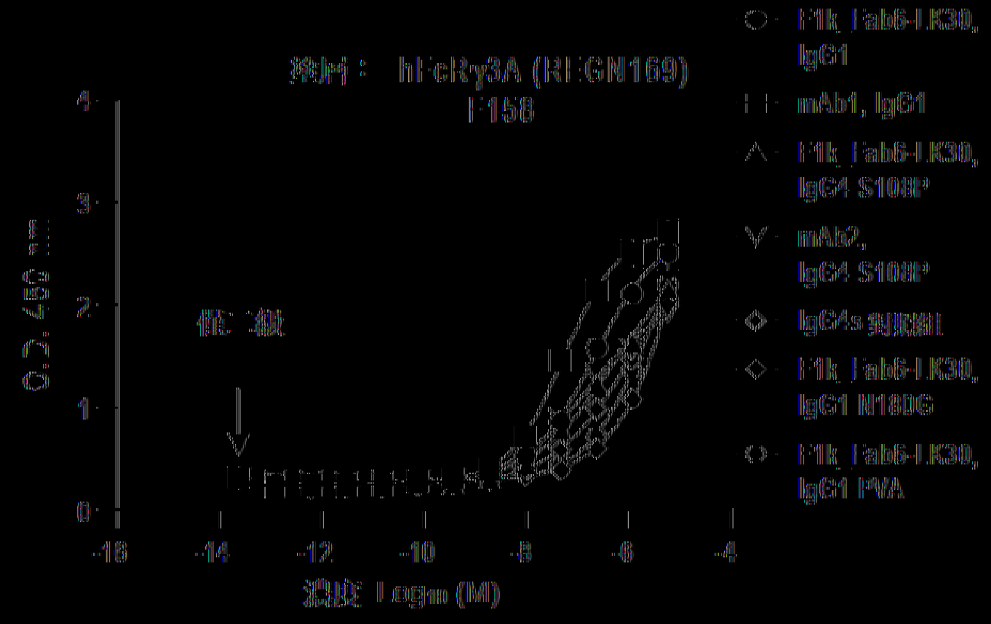

抗原：hFcRγ3A (R|HGN169)
F158
相對螢光單位 (RFU)
結合 log₁₀ (M)
低：無
Fc, mAb1, IgG1
mAb1, IgG1
Fc, Fab6-H30, IgG4 S108P
mAb2, IgG4 S108P
IgG4 gyDNI
Fc, Fab6-H30, IgG1 N180C
Fc, Fab6-H30, IgG1 PVA

圖 19F

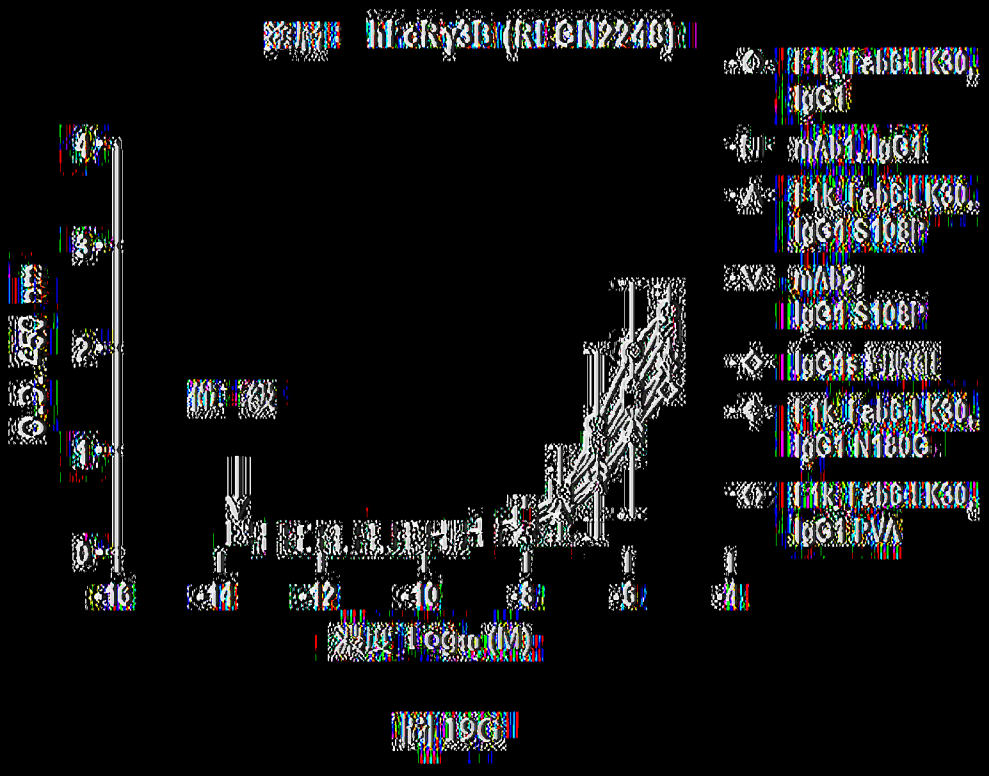


圖 1
16
14
12
10
8
6
4
0
1
2
3
4

以 scFv 為基礎的各種改造物之各代 ADCC 分析

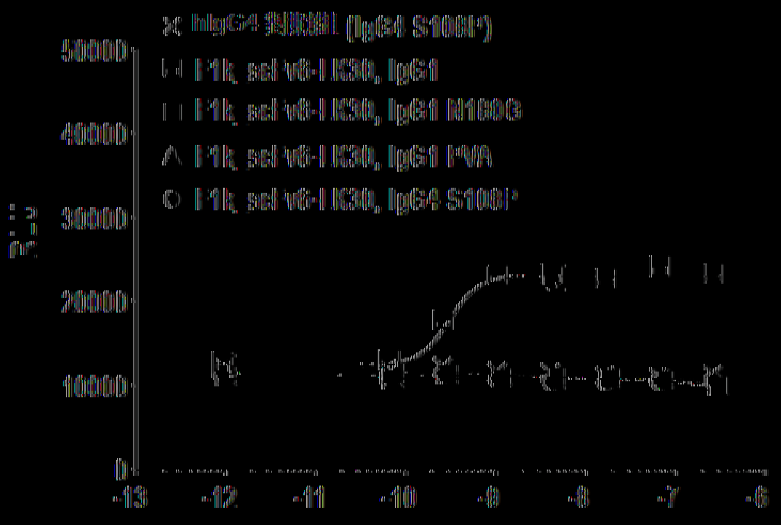


圖 20

以 scFv 為基礎的各種改造物之各代 ADCC 分析

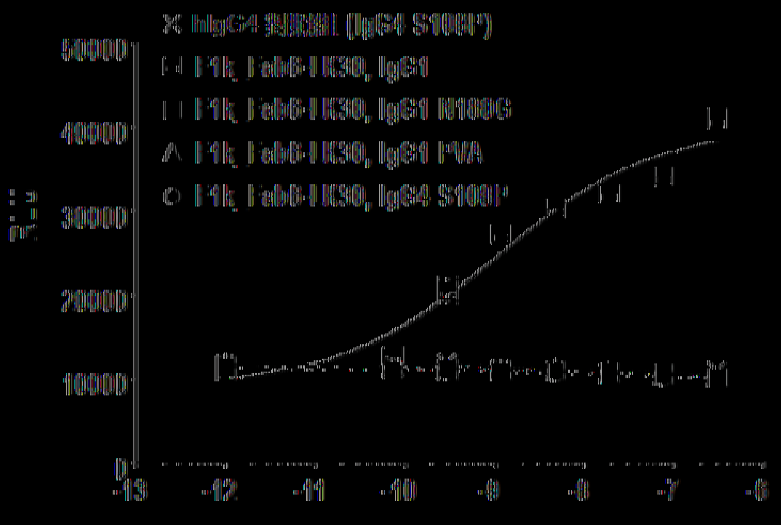


圖 21

HEK293.SRE luc.hIGFR1c.hKDR報告子分析
以scFv及IgG融合蛋白質進行評估

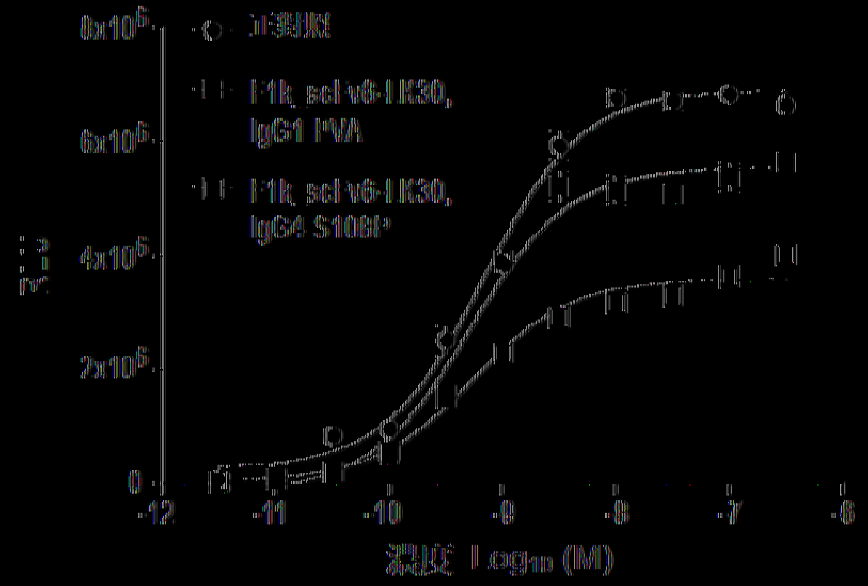


圖 22

HEK293.SRE luc.hIGFR1c.hKDR報告子分析
以Fab及IgG融合蛋白質進行評估

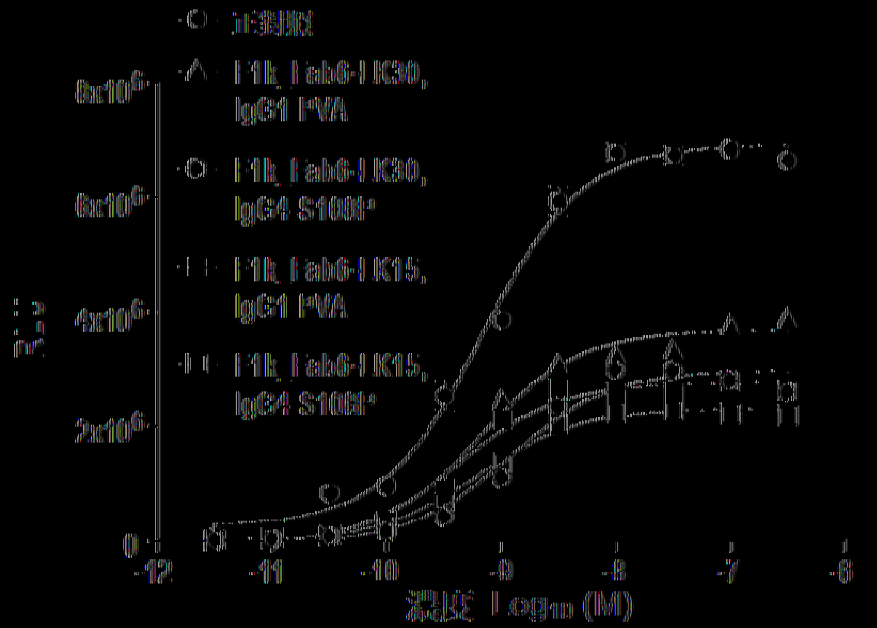
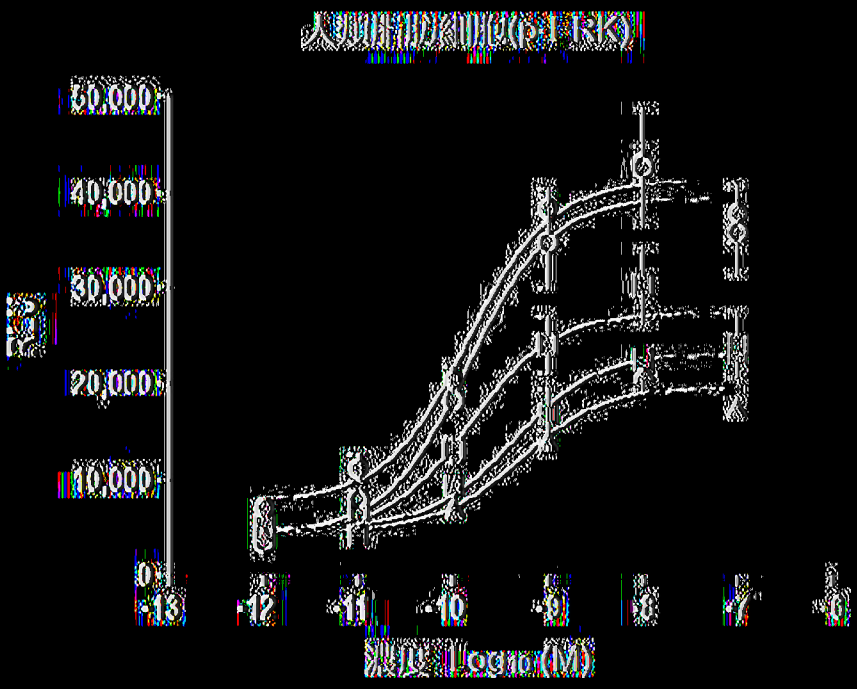


圖 23



		EC50 (M)	EC50 比例(%)
◆	Hu.M.G1.21	1.4E-10	100.0
○	F.1K.scFv.VG1.K30.IgG1.PVA	1.4E-10	95.2
▲	F.1K.Fab.VG1.K15.IgG1.PVA	4.3E-10	50.7
▽	F.1K.scFv.VG1.K30.IgG4.S108P	1.6E-10	82.2
△	F.1K.Fab.VG1.K15.IgG4.S108P	5.1E-10	41.1

[圖24]