



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I743461 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：108110615

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 27 日

(51)Int. Cl. : C07K16/24 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

(30)優先權：2011/03/28 美國

61/468,276

2011/11/14 法國

1160311

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：寶林 尼可拉斯 BAURIN, NICOLAS (FR)；貝爾 克里斯汀 BEIL, CHRISTIAN (DE)；科維 卡斯坦 CORVEY, CARSTEN (DE)；藍吉 克里斯汀 LANGE, CHRISTIAN (DE)；李 丹西 LI, DANXI (US)；米可 文森 MIKOL, VINCENT (FR)；史坦梅茲 安可 STEINMETZ, ANKE (FR)；拉歐 爾寇 RAO, ERCOLE (DE)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

CN 1173878A

WO 2011/014659A2

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：8 共 169 頁

(54)名稱

具有交叉結合區定向之雙重可變區類抗體結合蛋白

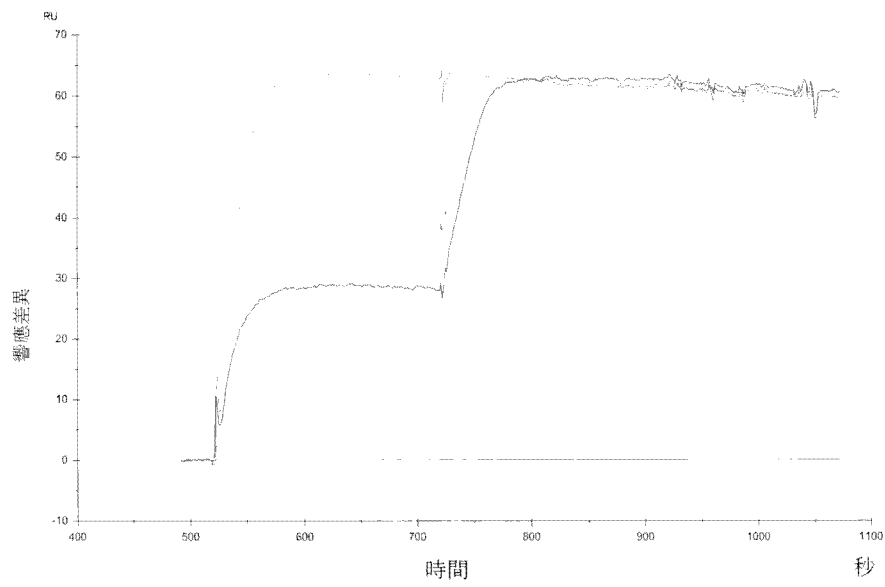
(57)摘要

本發明提供類抗體結合蛋白，其包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中每一對多胜肽形成一具有交叉位向之雙變異區域的類抗體結合蛋白。本發明亦提供製造上述類抗原結合蛋白的方法。

The invention provides antibody-like binding proteins comprising four polypeptide chains that form four antigen binding sites, wherein each pair of polypeptides forming an antibody-like binding protein possesses dual variable domains having a cross-over orientation. The invention also provides methods for making such antigen-like binding proteins.

指定代表圖：

圖 4



發明摘要

【發明名稱】

具有交叉結合區定向之雙重可變區類抗體結合蛋白

DUAL VARIABLE REGION ANTIBODY-LIKE BINDING
PROTEINS HAVING CROSS-OVER BINDING REGION
ORIENTATION

【中文】

本發明提供類抗體結合蛋白，其包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中每一對多胜肽形成一具有交叉位向之雙變異區域的類抗體結合蛋白。本發明亦提供製造上述類抗原結合蛋白的方法。

【英文】

The invention provides antibody-like binding proteins comprising four polypeptide chains that form four antigen binding sites, wherein each pair of polypeptides forming an antibody-like binding protein possesses dual variable domains having a cross-over orientation. The invention also provides methods for making such antigen-like binding proteins.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 4 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

具有交叉結合區定向之雙重可變區類抗體結合蛋白

DUAL VARIABLE REGION ANTIBODY-LIKE BINDING
PROTEINS HAVING CROSS-OVER BINDING REGION
ORIENTATION

【技術領域】

本發明有關類抗體結合蛋白，包含形成四抗原結合位置之四多胜肽鏈，其中形成類抗體結合蛋白的每一對多胜肽係擁有具交叉位向的雙變異區域。本發明亦有關產生此類抗體結合蛋白之方法。

【先前技術】

自然存在的 IgG 抗體係為雙價及單一特異性，具有用於二種不同抗原的結合特異性之雙特異性抗體可使用重組技術來製作，且提出寬廣的臨床應用。眾所周知，完整的 IgG 抗體分子係為 Y 型分子，包含四個多胜肽鏈：二個重鏈和二個輕鏈。每一輕鏈由二個區域組成，N 端區域已知為變異或 V_L 區域（或區），且 C 端區域已知為不變（或 C_L ）區域（不變 κ (C_κ) 或是不變 λ (C_λ) 區域）。每一重鏈由四個或五個區域組成，依據抗體的種類而定，N 端為已知的變異（或 V_H ）區域（或區），依序為第一不變（或 C_{H1} ）區域、絞鏈區，然後是第二及第三不變（或 C_{H2} 及 C_{H3} ）區域。在一組裝抗體中，此 V_L 和 V_H 區域結合在一起，以形成一抗原結合位置。而且，此 C_L 及 C_{H1} 區域結合在一起，以維持一重鏈結合一輕鏈。這二重-

輕鏈異二聚體係利用 C_{H2} 及 C_{H3} 區域的相互作用結合在一起，且相互作用介於二個重鏈的絞鏈區之間。

已知一抗體的蛋白酵素分解可以導致抗體片段 (Fab 及 Fab2) 的產生，整個抗體的片段可表現抗原結合能力。抗體片段亦可以重組產生；Fv 片段，僅由重鏈及輕鏈之變異區域結合在一起組成，可以獲得。這些 Fv 片段係為單價，用於抗原結合。較小的片段，例如獨立的變異區域 (區域抗體或 dABs；Ward 等人, 1989, *Nature* 341 (6242): 544-46)，以及獨立的互補決定區或 CDRs (Williams 等人, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (14): 5537-41) 亦已顯示保留母源抗體的

連結特徵，雖然大部分自然存在的抗體通常需要 V_H 及 V_L 二者，以保留完整結合能力。

單鏈變異片段 (scFv) 構成包括一單多胜肽鏈內的抗體的 V_H 及 V_L 區域，其中此些區域係以足夠長的彈性連結子 (flexible linker) (超過 12 個胺基酸殘基) 來分隔，以對抗分子內作用，允許二個區域自組裝成功能性抗原決定基結合位置 (Bird 等人, 1988, *Science* 242 (4877): 423-26)。在單一多胜肽中，這些小分子蛋白質 (MW ~25,000 Da) 對於他們的抗原通常保持特異性及親和性，並可提供給較大抗原特異性分子一個方便的建構區塊。

在診斷及治療上使用抗體片段的優點勝於整個抗體在於他們的較小尺寸，它們可能比整個抗體有較少的免疫原性而更可以穿透組織。一個跟此類片段使用有關聯的缺點是，它們只有一個抗原結合位置而導致抗体親抗原性的減少。另外，由於它們小尺寸，它們可以從血清中快速清除，因此顯示出較短的半衰期。

有興趣的是產生雙特異性抗體 (BsAbs)，其係結合位於單一分子內的二抗體的抗原結合位置，因此可同時地結合二個不同的抗體。除了診斷目的之應用之外，此類分子為新的治療應用鋪路，例如，藉由重定向有效能的作用子 (effector) 體系統至有病區 (癌細胞通常的生長機制而抑制由單株抗體觸發的正常免疫反應，像是抗體依賴性細胞毒殺作用 (ADCC) 或是補體依賴性細胞毒殺作用 (CDC))，或是藉由增加抗體的中和或刺激活性。此潛力係很早被認可，使得一些方法可得到此雙特異性抗體。剛開始為了治療目的嘗試去連結二個完整抗體的連結特異性對抗不同的目標抗原，係利用化學上融合複共軛分子 (Staerz 等人, 1985, *Nature* 314 (6012): 628-31)。

雙特異性抗體剛開始的做法係藉由融合二個融合瘤細胞，分別具有產生不同免疫球蛋白的能力 (Milstein 等人, 1983, *Nature* 305 (5934): 537-40)，但是由細胞培養產生之種類 (直至十個不同種類) 的複雜性使得純化困難且昂貴 (George 等人, 1997, *THE ANTIBODIES* 4: 99-141 (Capra 等人, ed., Harwood Academic Publishers))。使用這形式，小鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b 抗體可以在相同細胞內產生 (例如，二個融合瘤細胞的四源融合體 (quadroma fusion)，抑或是工程 CHO 細胞)。由於每一抗體的輕鏈係優先地連結他們同族種類的重鏈，所以有三個抗體的主要種類組裝：二個親本抗體和此二抗體的異二聚體，每一個抗體包含一個重/輕鏈對，並利用他們的 Fc 部份結合。此要求的異二聚體可以從這混合物中純化，因其結合至蛋白 A (Protein A) 的特性與來自親本抗體的那些有所不同：大鼠 IgG2b 無法結合至蛋白 A，反而小鼠 IgG2a 卻可

以。因此，此小鼠-大鼠異二聚體結合至蛋白比小鼠 IgG2a 同型二聚體在較高 pH 值中洗提，且此舉使得雙特異性異二聚體選擇性純化變為可能（Lindhofer 等人, 1995, *J. Immunol.* 155 (1) : 219-25），產生的雙特異性異二聚體完全是非人類的，因此具有很高的免疫性，其可能具有有害的副作用（例如“HAMA”或是“HARA”反應），及/或中和其治療。有需要維持機密策劃具有最高特性的雙特異性，使其可以較高產率自哺乳動物細胞培養中快速的產生。

儘管使用如上面所述之自細胞融合產生的異共軛體 (heteroconjugates) 或雙特異性抗體可以得到有希望的結果，但數種因素使得他們的較大治療應用變成無用的。這些因素包含：在活體內異共軛體的快速清除，需要實驗室加強技術來產生分子形式，有需要大量的自均共軛物中進行大量的複共軛純化，或是單一特異性抗體，亦即獲得一般較低的產率。

使用增加頻率的遺傳工程來設計、修改和產生抗體或是具有要求的結合特性和作用體功能組合之抗體衍生物。各種的重組方法已經相當成熟，有效率的生產 BsAbs，抗體片段（Carter 等人, 1995, *J. Hematother.* 4 (5) : 463-70; Pluckthun 等人, 1997, *Immunotechnology* 3(2) : 83-105; Todorovska 等人, 2001, *J. Immunol. Methods* 248(1-2) : 47-66）和全長的 IgG 格式（Carter, 2001, *J. Immunol. Methods* 248 (1-2) : 7-15）二者都是。

結合二種不同的 scFvs 產生出具有最小分子量的 BsAb 格式，稱為 sc-BsAbs 或 Ta-scFvs（Mack 等人, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (15) : 7021-25; Mallender 等人, 1994, *J. Biol. Chem.* 269

(1) : 199-206)。BsAbs 的建構係從基因方面融合二個 scFvs 至一個二聚體官能性，例如白胺酸鏈區 (Kostelny 等人, 1992, *J. Immunol.* 148 (5) : 1547-53; de Kruif 等人, 1996, *J. Biol. Chem.* 271 (13) : 7630-34)。

雙功能抗體係為小的雙價和雙特異性抗體片段，此片段包含一 V_H 連接至相同多胜肽鏈的 V_L ，由於使用的連結子太短（少於 12 胺基酸殘基）以允許在相同鏈上的二個區域之間配對。此些區域係強迫與另一鏈上的互補區域分子間地配對，並創造二個抗原結合位置。這些二聚體抗體片段，或“雙功能抗體”係為雙價和雙特異性 (Holliger 等人, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (14) : 6444-48)，雙功能抗體在尺寸上係與一 Fab 片段相似。 V_H 和 V_L 區域的多胜肽鏈藉由一個 3 和 12 胺基酸殘基之間的連結子所連結，以形成佔優勢地二聚物（雙功能抗體(diabodies)），鑑於藉由一個 0 和 2 胺基酸殘基的連結子，形成佔優勢的三聚物（三功能抗體(triabodies)）和四聚物（四功能抗體(tetrabodies)）。除了連結子長度之外，寡聚集作用的確切樣式似乎依賴像變異區域位向的組成 (Hudson 等人, 1999, *J. Immunol. Methods* 231 (1-2) : 177-89)。雙功能抗體分子的最終結構的可預測性相當的貧乏。

雖然 sc-BsAb 和基於雙功能抗體的構築體表現顯示有趣的臨床潛力，其係顯示出此類的非共價組合的分子在生理狀態下沒有足夠的穩定性。一個 scFv 片段的整體穩定性係依賴 V_L 和 V_H 區域內部的穩定性，就如同區域界面的穩定性。scFv 片段的 V_H - V_L 界面不足的穩定性常常被認為是不可逆的 scFv 失活最主要的原因，由於界面的短暫開啟，其係使得胜肽連結子暴露出利於聚集的疏水性區塊，且

因此而不穩定和貧乏的生產量 (Wörn 等人, 2001, *J. Mol. Biol.* 305 (5) : 989-1010)。

一種從 V_H 和 V_L 區域製造雙特異性雙價抗原-結合蛋白的選擇性方法係描述於美國專利號 5,989,830。此類的雙頭和雙 Fv 組態之取得係藉由表現一雙表現載體 (bicistronic vector)，其係編碼二個多胜肽鏈。在雙 Fv 組態中，二個不同抗體之變異區域係表現在二個分離鏈的串列位向 (一個重鏈和一個輕鏈)，其中一個多胜肽鏈具有串連二次 V_H 並以一胜肽連結子分離 (V_{H1} -連結子- V_{H2})，以及另一個多胜肽鏈由互補的 V_L 區域串接一胜肽連結子組成 (V_{L1} -連結子- V_{L2})。在交叉雙頭組態組態中，二個不同抗體的變異區域係表現在二個分離多胜肽鏈的串列位向 (一個重鏈和一個輕鏈)，其中一個多胜肽鏈具有串連二次 V_H 並以一胜肽連結子分離 (V_{H1} -連結子- V_{H2})，以及另一個多胜肽鏈係由互補的 V_L 區域以相反位向串接一胜肽連結子組成 (V_{L2} -連結子- V_{L1})。構築體的分子模型建議此連結子有足夠長的尺寸可跨越 30-40 Å (15-20 個胺基酸殘基)。

有關於增加一抗體的價位，使抗體增加其功能上的親和力，此乃因抗體親抗原性效力。具有增加價位的多價蛋白複合物 (Polyvalent protein complexes, PPC) 係描述於美國專利申請公開號 US 2005/0003403 A1。PPCs 包含一般以側向彼此安排之二個多胜肽鏈，每一多胜肽鏈典型地包括三或四個“v-區”，其係包括胺基酸序列，當其與在相對多胜肽鏈上對應的 v-區匹配時，具有形成一抗原結合位置的能力。提高至六個“v-區”可以使用於每一個多胜肽，每一多胜肽鏈的 v-區係彼此互相線性連接，並可以散置的鏈接區連接。當排列成此 PPC 的形式時，每一多胜肽鏈上的 v-區係形成個別

的抗原結合位置。此複合物可能包含一個或數個結合特異性。

一種策略係由 Carter 等人 (Ridgway 等人, 1996, *Protein Eng.* 9 (7) : 617-21; Carter, 2011, *J. Immunol. Methods* 248 (1-2) : 7-15) 提出, 係使用一套“球形突出物-至-洞 (knob-into-hole)”突變於 Fc 的 C_{H3} 區域來產生 Fc 異二聚體。這些突變導致殘基包裝互補在結構上保護疏水性核心內的 C_{H3} 區域界面之間產生改變, 使得異二聚體的形成係與同型二聚體比較, 以自哺乳動物細胞培養完成良好的異二聚體表現。雖然此策略導致較高的異二聚體產量, 但其同型二聚體也無法完成抑制 (Merchant 等人, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16 (7) : 677-81)。

Gunasekaran 等人探究固定疏水性核心完整性的可行性, 在 C_{H3} 區域界面改變電荷互補以驅使 Fc 異二聚體的形成時 (Gunasekaran 等人, 2010, *J. Biol. Chem.* 285 (25) : 19637-46)。利用靜電導向機制, 這些構築體顯示, 透過二對位於外圍的充電殘基突變, 使得 Fc 異二聚體形成係有效的提升, 並具有最小量的同型二聚體污染物。與球形突出物-至-洞設計相比, 由於靜電相斥機制的本質, 此同型二聚體可均勻地被抑制, 但無法完全避免。

Davis 等人描述一種抗體工程方法, 利用叉合人類的 IgG 和 IgA C_{H3} 區域的 β -股片段, 將 Fc 同型二聚體轉變為異二聚體, 毋需額外的雙硫鍵結交換 (Davis 等人, 2010, *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (4) : 195-202)。SEEDbody (Sb) 融合蛋白表現哺乳動物細胞產量, 高產量的 Sb 異二聚體容易地被純化, 以消除較少的副產品。

美國專利申請公開號 US 2010/331527 A1 描述一種基於 C_{H3} 區域之異二聚化的雙特異性抗體, 其在一重鏈上導入位於 C_{H3} 區域內

之突變 H95R 和 Y96F。這些胺基酸取代來自 IgG3 次型的 C_{H3} 區域，並將與一 IgG1 主鏈進行異二聚化。對於 C_{H3} 區域中基於異二聚化的所有形式，一共同的輕鏈易於與每個重鏈配對係為必要條件。三種形式抗體的總數因此生產：50%具有一純 IgG1 主鏈，三分之一具有一純 H95R 和 Y96F 突變主鏈，以及三分之一具有二不同重鏈（雙特異性）。此所需的異二聚體可以從這混合物中純化，因為其結合至蛋白 A 的特性與來自親本抗體的不同。IgG3 衍生的 C_{H3} 區域不能結合至蛋白 A，反而是 IgG1 可以。因此，此異二聚體結合至蛋白 A，但是相較於純 IgG1 同型二聚體而言要在較高 pH 值下洗提，且這使得雙特異性異二聚體的選擇性提純變得可能。

美國專利號 7,612,181 描述一種雙-變異-區域 IgG (DVD-IgG) 雙特異性抗體，其係基於描述於美國專利號 5,989,830 中的雙-Fv 形式。一相似的雙特異性形式亦描述於美國專利申請公開號 US 2010/0226923 A1。增加不變區域至各自的雙-Fv 鏈 (C_{H1}-Fc 至重鏈以及 κ 或 λ 不變區域至輕鏈)，使得功能性雙特異性抗體毋需任何的額外修改（即，顯著的增加不變區域加強穩定性）。一些抗體表現在 DVD-Ig/TBTI 形式顯示位置影響第二（或最內部的）抗原結合位置（Fv2）。依據抗原的序列與本質被確認為此 Fv2 位置，這個抗體區域對其抗原表現出一減少的親和力（即，對照親本抗體而言結合速率減少）。對此種觀察而言一種可能的解釋為介於 V_{L1} 和 V_{L2} 間的連結子突出至 Fv2 的 CDR 區，使得 Fv2 有點難接近較大抗原。

描述於美國專利號 5,989,830 的一雙特異性抗體片段的第二組態係為交叉雙頭 (CODH)，具有表現在二鏈的變異區域的下列位向：

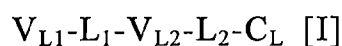
對輕鏈而言，V_{L1}-連結子-V_{L2}；以及

對重鏈而言， V_{H2} -連結子- V_{H1} 。

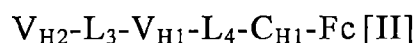
此 '830 專利揭露一種雙特異性交叉雙頭抗體片段（構築體 GOSA.E）較雙 F_v 保持較高的結合活性（參見'830 專利第 20 頁第 20-50 行），並進一步揭露此形式受使用於變異區域間之連結子較少的影響（參見'830 專利第 20-21 頁）。

【發明內容】

本發明提供一種類抗體結合蛋白，包含其係形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中二個多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



以及二個多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

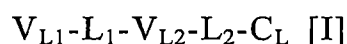
C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

Fc 係為免疫球蛋白絞鏈區和 C_{H2} 、 C_{H3} 免疫球蛋白重鏈不變區域；

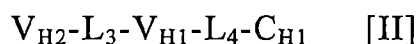
L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

本發明亦提供一種類抗體結合蛋白，包含形成二個抗原結合位置之二多胜肽鏈，其中一第一多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



以及一第二多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

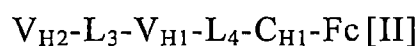
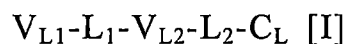
C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此第一和第二多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

本發明更提供一種製造類抗體結合蛋白的方法，該蛋白包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，包括識別結合第一目標抗原的第一抗體變異區域以及結合第二目標抗原的第二抗體變異區域，每一變異區域包含一 V_L 和一 V_H ；指定此第一抗體變異區域或第二抗體變異區域的 V_L 作為 V_{L1} ；根據下列式[I]和[II]，指定 V_{L2} 、 V_{H1} 和 V_{H2} ：



決定 L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 的最大和最小長度；產生式 I 和 II 的多胜肽結構；選擇式 I 和 II 的多胜肽結構，其結合第一目標抗原和第

二目標抗原，以合併形成類抗體結合蛋白；

其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

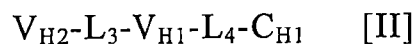
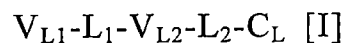
C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

Fc 係為免疫球蛋白絞鏈區和 C_{H2} 、 C_{H3} 免疫球蛋白重鏈不變區域；以及

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

本發明更提供一種製造類抗體結合蛋白的方法，該蛋白包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，包括識別結合第一目標抗原的第一抗體變異區域以及結合第二目標抗原的第二抗體變異區域，每一變異區域包含一 V_L 和一 V_H ；指定此第一抗體變異區域或第二抗體變異區域的 V_L 作為 V_{L1} ；根據下列式[I]和[II]，指定 V_{L2} 、 V_{H1} 和 V_{H2} ：



決定 L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 的最大和最小長度；產生式 I 和 II 的多胜肽結構；選擇式 I 和 II 的多胜肽結構，其結合第一目標抗原和第二目標抗原，以合併形成類抗體結合蛋白；

其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；以及

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

藉由下面某些實施例與請求項之更為詳細的說明，本發明之特定實施例將變得更為明白。

本發明提供類抗體結合蛋白，包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中每對多胜肽形成一類抗體結合蛋白具有交叉位向的雙變異區域。本發明亦提供製造上述類抗原結合蛋白的方法。

電腦模擬預測美國專利號 5,989,830 的交叉雙頭 (CODH) 設計會產生一複合物，在此有二個結合位置面對相對的方向，不用限制提議美國專利號 7,612,181 的雙-Fv 組態。尤其是，電腦模擬指出，對於 CODH 設計而言，介於變異區域間的胺基酸連結子的長度並不是關鍵的，但對於允許完全進入至雙-Fv 設計中的兩抗原結合位置是重要的。和 DVD-Ig/TBTI 形式相同，類抗體結合蛋白構築體的製備係在不變區域依附此 CODH 組態，以形成類抗體結合蛋白包括四個多胜肽鏈，其係形成四個抗原結合位置，其中每對多胜肽形成一類抗體結合蛋白係具有交叉位向的雙變異區域 (即，CODH-Ig)。相

較於 CODH 分子而言，CODH-Ig 分子預期具有值得注意地改進穩定性（就如同 DVD-Ig/TBTI 具有改進穩定性勝過雙-Fv 分子）。

為了試驗上述之假設，一 CODH-Ig 分子的製備係使用描述於美國專利申請公開號 US 2010/0226923 A1 中的抗-IL4 和抗-IL13 抗體序列。有關胺基酸連結子長度分離在各自的多胜肽鏈之變異區域，此 CODH-Ig 分子係不同於 US 2010/0226923 的 CODH 分子。在短暫轉移之後，CODH-Ig 分子表現在細胞，然後以蛋白 A 色層分析純化。雖然它們的分子篩層析法（SEC）輪廓顯示 5-10%的聚集程度，沒有任何 CODH-Ig 分子有功能，且因此沒有任何 CODH-Ig 分子可以結合所有目標抗原。抗原結合能力的缺少可能原因是因為重和輕鏈的 Fv-區的擾亂二聚化，因為不適當的連結子長度危及正確互補位形成。結果，發展出一個協議來識別合適的胺基酸連結子，用來插入二個變異區域之間，且第二變異區域和不變區域兩者在類抗體結合蛋白的重和輕多胜肽鏈上。這個協議係基於 FvIL4 和 FvIL13 區的相似實驗性模型的蛋白-蛋白對接，各別包含 Fc1 區域模型，在 FvIL4 和 FvIL13 區之間以及在 Fv 和不變 Fc1 區之間的適當連結子的建構。

標準重組 DNA 方法係用來建構多核苷酸，其係編碼多胜肽，以形成本發明之類抗體結合蛋白，這些多核苷酸至重組表現載體，並導入此類的載體至宿主細胞，參見，例如，Sambrook 等人, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL （Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed.）。根據製造者說明書，酵素反應和純化技術可以進行，如同一般在此領域所完成者，或是在此描述者。除非有提供特定的定義，命名係利用與在此描述之分析化學、合成有機化學和醫藥化學等有關，以及其實驗室程序與技術係為眾所周知且

通常使用於此領域。同樣地，一般常見技術可以用於化學合成、化學分析、製劑、配方、生產和病患治療。

1. 一般定義

根據本揭露內容所使用的下列名詞，除非另有不同的指示，否則應當瞭解其係具有下述意義。除非上下文的要求，否則單數的名詞應當包含複數個，且複數的名詞應當包含單數。

在此使用之名詞“多核苷酸”意指單股或雙股具有至少 10 個核苷酸長度的核酸聚合物。在某些實施例中，含有多核苷酸的核苷酸可為核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸或任一種核苷酸形式的修飾型。此修飾包括鹼基修飾，例如溴尿苷（bromuridine）；核糖修飾，例如阿拉伯糖苷和 2',3'-二去氧核糖；以及核苷酸間連接修飾，例如硫代磷酸酯（phosphorothioate）、二硫代磷酸酯（phosphorodithioate）、硒代磷酸酯（phosphoroselenoate）、二硒代磷酸酯（phosphorodiselenoate）、縮苯胺硫代磷酸酯（phosphoroanilothioate）、苯胺酸磷酸酯（phosphoraniladate）和磷醯胺酯（phosphoramidate）。此名詞“多核苷酸”特別包含單股或雙股形式的 DNA。

—“經分離的多核苷酸”係為一基因組、cDNA 或合成來源的多核苷酸，或其一些組合，藉由其來源，經分離的多核苷酸：（1）未與在自然界中在其中發現此經分離之多核苷酸的多核苷酸的全部或一部分結合；（2）與在自然界中未與其連接之多核苷酸連接；或（3）無以較大序列的一部分出現在自然界中。

—“經分離的多胜肽”係為：（1）至少不含一些正常與其一起被發現的其他多胜肽；（2）基本上不含來自相同來源，例如來自相同

物種的其他多胜肽；(3) 由來自不同物種的細胞表現；(4) 已經從至少大約百分之 50 在自然界中與其結合之多核苷酸、脂質、碳水化合物或其他物質中分離；(5) 未與在自然界中與該“經分離的多胜肽”結合的多胜肽的一部分結合（藉由共價或非共價交互作用）；(6) 以可操作之方式與在自然界中未與其結合的多胜肽結合（藉由共價或非共價交互作用）；或 (7) 未出現在自然界中。此一經分離的多胜肽可以藉由合成來源的基因組 DNA、cDNA、mRNA 或其他 RNA，或其任何組合來編碼。較佳者，經分離的多胜肽實質上不含在其自然環境中發現，將會干擾其用途（治療、診斷、預防、研究或其他）的多胜肽或其他污染物。

在此使用之名詞“人類抗體”包含具有實質上與人類生殖系列免疫球蛋白序列一致之變異和不變區的抗體。在某些實施例中，在非人類哺乳動物中產生人類抗體，包含但不限於嚙齒動物，例如小鼠和大鼠，以及兔類動物，例如兔。在其他實施例中，在融合瘤細胞中產生人類抗體。還有在其他實施例中，以重組方式產生人類抗體。

天然存在之抗體通常包括四聚體。每一四聚體通常均由兩個相同的多胜肽鏈對組成，各對具有一個全長“輕”鏈（通常具有大約 25 kDa 的分子量）及一個全長“重”鏈（通常具有大約 50-70 kDa 的分子量）。在此使用之名詞“重鏈”和“輕鏈”意指任何免疫球蛋白多胜肽具有足夠的變異區域序列來給予特定之目標抗原。每一輕和重鏈之胺基末端部分通常包含一通常負責抗原辨識之具有約 100 至 110 或更多個胺基酸的變異區域。各鏈之羧基末端部分通常定義一負責效應功能（effector function）之不變區域。因此，在天然存在的抗體中，一全長重鏈免疫球蛋白多胜肽包含一個變異區域（V_H）和三個

不變區域 (C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})，其中，此 V_H 區域係位於多胜肽的胺基終點，且此 C_{H3} 區域係位於羧基終點；以及一全長輕鏈免疫球蛋白多胜肽包含一個變異區域 (V_L) 和一個不變區域 (C_L)，其中，此 V_L 區域係位於多胜肽的胺基終點，且 C_L 區域係位於羧基終點。

人類輕鏈通常分為 κ (kappa) 和 λ (lambda) 輕鏈，且人類重鏈通常分為 μ (mu)、 δ (delta)、 γ (gamma)、 α (alpha) 或 ϵ (epsilon)，且分別對應將抗體之同型定義為 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。IgG 有幾個子類，包含但不限於 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4。IgM 有幾個子類，包含但不限於 IgM1 及 IgM2。IgA 同樣地分成幾個子類，包含但不限於 IgA1 及 IgA2。在全長輕鏈及重鏈中，變異和不變區域通常經由具有約 12 個或更多胺基酸之“J”區連接，此重鏈亦包含具有約 10 個或更多胺基酸之“D”區。參見，例如，FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2nd ed., 1989)，無論基於何種目的，其整體皆以引用之方式併入本文中。各輕/重鏈對之變異區通常形成一抗原結合位置。自然存在抗體的變異區域通常存在相同的整體結構：經由三個高變異區，亦稱為互補決定區或 CDR，連接之相對保守的構架區 (FR)。來自各對之兩個鏈的 CDR 通常利用構架區對準，使其能夠與特異性抗原決定基結合。自胺基終點至羧基終點，輕鏈與重鏈變異區域通常包括區域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。

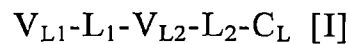
在此使用之名詞“天然 Fc”意指一分子包括一非抗原結合片段的序列產生於一抗體的消化作用或是由其他手段產生，不管是以單體的或多聚體的形式，並包含絞鏈區。天然 Fc 的原始免疫球蛋白來源較佳者係為人類來源，且可為任何的免疫球蛋白，雖然 IgG1 和 IgG2

係較佳。天然 Fc 分子係由單體多胜肽組成，其係可利用共價（即，雙硫鍵）和非共價結合來連接至二聚體或多聚體的形式。在天然 Fc 分子的單體子單元間的分子間雙硫鍵的數量範圍依分類（例如，IgG、IgA 和 IgE）或子類（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgA1 和 IgA2）從 1 至 4。天然 Fc 的一實例係為雙硫鍵結二聚物產生一 IgG 的木瓜蛋白酶消化作用。在此使用之名詞“天然 Fc”係為單體的、二聚體和多聚體的形式。

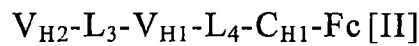
在此使用之名詞“Fc 變異體”意指自天然 Fc 修飾但較佳仍包含補救受體 FcRn（新生的 Fc 受體）之結合位置的分子或序列。示範的 Fc 變異體和與補救受體之相互作用係為此係為此領域所熟知者。因此，名詞“Fc 變異體”可包含自非人類天然 Fc 人源化之分子或序列。再者，天然 Fc 包括可移除之區，其係由於它們提供非本發明之類抗體結合蛋白所需之結構特徵或生物活性。因此，名詞“Fc 變異體”包括缺乏或修飾過一或多個影響或涉及以下各者之天然 Fc 位置或殘基的分子或序列：（1）雙硫鍵形成，（2）與所選擇之宿主細胞不相容，（3）在所選擇之宿主細胞中表現後 N 末端異質性，（4）糖基化，（5）與補體相互作用，（6）與除補救受體以外之 Fc 受體結合，或（7）抗體依賴細胞毒性（ADCC）。

在此使用之名詞“Fc 區域”包含如上文所定義之天然 Fc 及 Fc 變異體和序列。如同 Fc 變異體及天然 Fc 分子，名詞“Fc 區域”包括呈單體或多聚體形式的分子，無論自完整抗體消化或由其他手段產生。

在此使用之名詞“類抗體結合蛋白”意指非天然存在（或重組）分子係特別結合到至少一目標抗原，且其包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中二個多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



以及二個多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

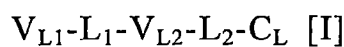
C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

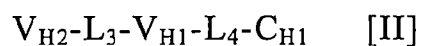
Fc 係為免疫球蛋白絞鏈區和 C_{H2} 、 C_{H3} 免疫球蛋白重鏈不變區域；

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽係形成一交叉輕鏈-重鏈對。在此使用之名詞“類抗體結合蛋白”意指非天然存在（或重組）分子係特別結合到至少一目標抗原，且其包含形成二個抗原結合位置之二個多胜肽鏈，其中第一多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



以及第二多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中第一和第二多胜肽係形成一交叉輕鏈-重鏈對。一“重組”分子係為一種利用重組手段來製備、表現、創造或分離。

本發明之一實施例提供類抗體結合蛋白在一個和四個目標抗原之間具有生物學和免疫學的特異性。本發明之另一實施例提供多核苷酸包括核苷酸序列編碼胺基酸序列成為多胜肽鏈，以形成此類抗體結合蛋白。本發明再一實施例提供宿主細胞係表現出此類抗體結合蛋白。

一“經分離的”類抗體結合蛋白是已經從其自然環境之成份中確認並分離及/或回收的抗體。它自然環境之污染成份是將干擾該抗體之診斷或治療用途的物質，且可包含酵素、荷爾蒙及其他蛋白質的或非-蛋白質的溶質。在較佳實施例中，此類抗體結合蛋白將被純化：(1) 至超過 95 重量%之抗體，係藉著 Lowry 方法判定，且最好超過 99 重量%，(2) 藉著使用紡織杯定續儀，至足以獲得 N-終端或內部胺基酸序列之至少 15 個殘基的程度，或 (3) 在還原或非還原條件下，使用考馬斯藍或較佳者為鍍銀染色，利用 SDS-PAGE 至均一性。經分離的類抗體結合蛋白包含在重組細胞內原地的類抗體結合蛋白，因為此類抗體結合蛋白之自然環境的至少一個成份將不存在。

在此使用之名詞“實質上純的”或“實質上經純化的”，意指優勢物種出現的化合物或物種（即以莫耳濃度為基礎，在組合物中其比

任何其他個別的物種更為豐富)。在某些實施例中，實質上經純化的溶離份是組合物，其中該物種包括所有出現之大分子物種的至少大約 50% (以莫耳濃度為基礎)。在其他實施例中，實質上純的組合物將包括在該組合物中所有出現之大分子物種的超過大約 80%、85%、90%、95%或 99%。還是在其他實施例中，將此物種純化至本質上均一性 (不能利用傳統的檢測方法在組合物中檢測到污染物種)，其中此組合物基本上由單一大分子物種所組成。

在此使用之名詞“抗原”或“目標抗原”意指一分子或分子的部份，其係具有與類抗體結合蛋白結合的能力，另外並具有使用於動物來產生抗體結合至抗原之抗原決定基的能力。一目標抗原可具有一個或多個抗原決定基，有關各目標抗原藉由一類抗體結合蛋白來識別，此類抗體結合蛋白係具有與識別此目標抗原之完整抗體競爭的能力。除了一“多特異性”或“多功能性”類抗體結合蛋白，可瞭解一“雙價”類抗體結合蛋白係包括具有同一抗原特異性的抗原結合位置。

一雙特異性或雙功能性抗體通常為一人工雜交抗體具有二個不同重鏈/輕鏈對和二個不同結合位置。雙特異性抗體可利用多種方法產生，包含但不限定於雜交瘤的融合或是 $F(ab')$ 片段的連接。

一個 $F(ab)$ 片段通常包含一個輕鏈和一個重鏈的 V_H 及 C_{H1} 區域，其中此 $F(ab)$ 片段的 V_H - C_{H1} 重鏈部份不能形成一雙硫鍵給另一重鏈多胜肽。如同在此所使用者，一 $F(ab)$ 片段亦可包含一輕鏈含有二個以一胺基酸連結子分離的變易區域以及一重鏈含有二個以胺基酸連結子和一 C_{H1} 區域分離的變易區域。

一個 $F(ab')$ 片段通常包含一個輕鏈和一重鏈的部份，其係含

有多個不變區（位於 C_{H1} 和 C_{H2} 區域間），使得一鏈間雙硫鍵可以在二個重鏈間形成，進而形成一 $F(ab')_2$ 分子。

此詞組“生物特性”、“生物特徵”和“活性”一詞對於本發明之類抗體結合蛋白在此可替換地使用，且包含但不限定於抗原決定基親和力和特異性、能夠對抗抗原目標（或目標多胜肽）活性、類抗體結合蛋白的活體穩定性和類抗體結合蛋白免疫特性。類抗體結合蛋白其他可識別的生物特性或特徵包含，例如，交叉反應（即，一般具抗體目標的非人類同系物或具其他抗原目標組織），和能夠維持在哺乳動物細胞內蛋白質的高表現量。使用技藝識別技術可以發現或量測到上述之特性或特徵，包含但不限定於 ELISA、競爭型 ELISA、表面電漿共振分析、體內和體外中和試驗，以及組織切片的免疫組織化學分析，此組織切片來自不同來源，包含人類、靈長類動物或是任何其他有需要的來源。

在此使用之名詞“免疫功能之免疫球蛋白片段”意指多胜肽片段至少含有免疫球蛋白重或輕鏈之 CDRs，來自取得的多胜肽片段。免疫功能之免疫球蛋白片段能夠結合一目標抗原。

在此使用之“中和”類抗體結合蛋白意指能夠阻斷或實質上減少與其結合之目標抗原的作用體功能的抗體分子。在此所使用之“實質上減少”表示降低至少大約 60%，較佳的是至少大約 70%，更佳的是至少大約 75%，再更佳的是至少大約 80%，再更佳的是至少大約 85%，最佳的是至少大約 90%之目標抗原的作用體功能。

“抗原決定基”一詞包含任何能夠與免疫球蛋白或 T-細胞受體特異性結合的決定因子，較佳者為多胜肽決定因子。在某些實施例中，抗原決定基決定因子包含分子之化學活性表面基團，例如胺基酸、

2021 年 5 月 27 日修正

糖側鏈、磷醯基或磺醯基，且在某些實施例中，可以具有特定性三維結構特徵及/或特定性電荷特徵。抗原決定基是抗原中與抗體或類抗體結合蛋白結合的區域。在某些實施例中，當類抗體結合蛋白在蛋白質及/或大分子的複雜混合物中優先認出其目標抗原時，便說類抗體結合蛋白特定地結合抗原。在較佳的實施例中，當平衡解離常數 $\leq 10^{-8}$ M 時，較佳者是當平衡解離常數 $\leq 10^{-9}$ M 時，且最佳的是當平衡解離常數 $\leq 10^{-10}$ M 時，便說類抗體結合蛋白特定地結合抗原。

一類抗體結合蛋白的解離常數 (K_D) 可以決定，例如，利用表面電漿共振。一般而言，表面電漿共振分析係使用 BIAcore 系統 (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ) 的表面電漿共振 (SPR) 在配位基 (在生物感測器基質上的目標抗原) 和分析物 (溶液中之類抗體結合蛋白) 之間測量即時結合相互作用。表面電漿分析亦可以固定分析物 (在生物感測器基質上的類抗體結合蛋白) 和出現配位基 (目標抗原)。在此使用之名詞“ K_D ”意指在特定類抗體結合蛋白和一目標抗原間之相互作用的解離常數。

在此使用之名詞“連結子”意指一個或多個胺基酸殘基插入免疫球蛋白區域之間，以提供足夠遷移性(mobility)給輕和重鏈區域來摺疊成交叉雙變異區免疫球蛋白。一連結子係插入至變異區域之間或變異和不變區域之間的轉變，以分別對應其序列級別。在區域間的轉變可被確認，此乃因免疫球蛋白區域的大約尺寸易於了解。一區域轉變的精確位置可藉由所在位置胜肽延伸來決定，其係無法形成次要結構元素，例如 β -薄板或 α -螺旋，係藉由實驗資料驗證或是採用模型技術或次要結構預測。在此描述之連結子係稱之為 L_1 ，其係位於 N-

末端 V_{L1} 和 V_{L2} 區域間的輕鏈上；稱之為 L_2 ，其亦位於 V_{L2} 和 C-末端 C_L 區域間之輕鏈上。重鏈連結子已知為 L_3 ，其係位於 N-末端 V_{H2} 和 V_{H1} 區域間；以及 L_4 ，其係位於 V_{H1} 和 C_{H1} -Fc 區域間。此連結子 L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係各自獨立，但他們可在某些個案內具有相同的序列及/或長度。

在此使用之名詞“載體”意指用來運送編碼資訊給一宿主細胞的任何分子（例如，核酸、質體或病毒）。“載體”一詞包含能夠運送已經與其連接之其他核酸的核酸分子。一種類型的載體為“質體”，意指環狀雙股的 DNA 分子，可將額外的 DNA 片段插入到其中。其他類型的載體為病毒載體，其中可將額外的 DNA 片段插入到病毒基因組內。某些載體能夠在導入其之宿主細胞內自動複製（例如，具有細菌複製起點的細菌載體，以及附加體的哺乳動物載體）。其他的載體（例如非-附加體的哺乳動物載體），在導入宿主細胞內時，可以整合至宿主細胞的基因組內，並藉此與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠指揮以可操作地連接之基因的表現。在此將這類載體稱為“重組表現載體”（或簡稱為“表現載體”）。一般而言，用於重組 DNA 技術中的表現載體，通常為質體之形式。在本文中，名詞“質體”和“載體”可交替使用，因為質體是最常使用的載體形式。然而，本發明企圖包含其他形式的表現載體，例如病毒載體（例如，複製缺陷的逆轉錄病毒、腺病毒和與腺關聯病毒），其係提供相同的功能。

在此使用之名詞“可操作地連接”意指側翼序列的排列，其中此側翼序列如此描述為配置或組裝，以便完成它們通常的功能。如此，側翼序列可操作地連接編碼序列能夠產生編碼序列的複製、轉錄及/

或轉譯。例如，當啟動子能夠指揮一編碼序列的轉錄時，編碼序列可操作地連接至啟動子。一側翼序列毋需鄰接此編碼序列，只要它功能正確。如此，例如，位於中間的未轉譯且尚未轉錄之序列可以出現在啟動子序列和編碼序列之間，且啟動子序列仍可被認為“可操作地連接”至編碼序列。

在此使用之詞組“重組宿主細胞”（或“宿主細胞”）意指已經在其中導入重組表現載體的細胞。重組宿主細胞或宿主細胞不僅企圖意指特定的個體細胞，還包括這類細胞的子代。因為某些修改可能發生在後續的世代中，其歸因於突變或環境的影響，所以這類子代事實上可能並非與親代細胞相同，但在本文使用時，這類細胞仍包含在“宿主細胞”一詞的範圍內。各種各樣的宿主細胞表現系統可以用來表現本發明之類抗體結合蛋白，包含細菌的、酵母、桿狀病毒和哺乳動物的表現系統（如同噬菌體顯示表現系統）。一適當細菌的表現載體的實例係為 pUC19。為了表現類抗體結合蛋白重組，以攜帶 DNA 片段的一個或多個重組表現載體編碼類抗體結合蛋白多肽鏈來轉形或轉染宿主細胞，如此使此多肽鏈係表現在宿主細胞，且較佳者，隱藏於培養宿主細胞培養基裡面，從此培養基中可以重新獲得類抗體結合蛋白。

在此使用之名詞“轉形”意指細胞遺傳特徵方面之變化，且當細胞經修飾而含有新的 DNA 時，細胞會被轉形。例如，當細胞自其天然狀態被遺傳修飾時，細胞被轉形。經轉形後，可藉由將轉形 DNA 物理上整合於細胞染色體中而使其與細胞染色體重組，或者可將轉形 DNA 暫時維持為附加體元素而不複製，或者轉形 DNA 可作為質體單獨複製。當 DNA 伴隨細胞分裂複製時，細胞將被視為已經穩

定轉形。在此使用之名詞“轉染”意指細胞吸收外來或外源 DNA，且當已將外源 DNA 引入細胞膜內部時，細胞被“轉染”。許多轉染技術為此項技術中所熟知者，所述技術可用於將一個或多個外源 DNA 分子引入合適的宿主細胞中。

在此使用之名詞並應用在目標上之“天然存在”意指此目標可在自然界中找到的事實，且非為人所操作。例如，出現在生物（包含病毒）中，可從天然來源中分離，但不可被人故意修改的多核苷酸或多胜肽是天然存在的。同樣地，在此使用之名詞“非天然存在”意指此目標在自然界中找不到或是被人進行結構上的修改或合成。

在此使用之二十個常見的胺基酸及它們的縮寫係沿用常見用法。二十個常見的胺基酸的立體異構物（例如，D-胺基酸）；非自然胺基酸，例如 α -、 α -雙取代胺基酸、N-烷基胺基酸、乳酸及其他非常見的胺基酸，亦可作為本發明類抗體結合蛋白之多胜肽鏈的適合成份。不常見的胺基酸的實例包含：4-羥脯胺酸、 γ -羧基谷胺酸、 ϵ -N,N,N-三甲基甘胺酸、 ϵ -N-乙醯賴胺酸、O-磷絲胺酸、N-乙醯絲胺酸、N-甲醯甲硫胺酸、3-甲基組胺酸、5-羥離胺酸、 σ -N-甲基精胺酸和其他類似的胺基酸和亞胺酸（例如，4-羥脯胺酸）。依據標準用法慣例，在此使用之多胜肽標記中，左手方向為胺基末端以及右手方向為羧基末端方向。

基於常見側鏈特性，天然存在殘基可以分類為：

- (1) 疏水性： Met、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Tyr、Pro；
- (2) 極性親水性： Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr；

- (3) 脂肪族： Ala、Gly、Ile、Leu、Val、Pro；
- (4) 脂肪族疏水性： Ala、Ile、Leu、Val、Pro；
- (5) 中性親水性： Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (6) 酸性： Asp、Glu；
- (7) 鹼性： His、Lys、Arg；
- (8) 影響鏈位向的殘基： Gly、Pro；
- (9) 芳香族： His、Trp、Tyr、Phe；以及
- (10) 芳香族疏水性： Phe、Trp、Tyr。

保守胺基酸取代可能包含這些分類的其中一個的成份與相同分類的另一個成份交換。保守胺基酸取代可能包含了非天然存在的胺基酸殘基，其係典型地以化學勝肽合成方式結合的，而不是以生物系統的合成。這些包含類肽和其他胺基酸殘基的顛倒或轉形形式。非保守胺基酸取代可能包含這些分類的其中一個的成份與另一個分類的成份交換。

熟練的專業人士可以使用熟知的技術來決定本發明之類抗體結合蛋白之多勝肽鏈適當的變異體。例如，熟悉此技術者之人士可識別合適的多勝肽鏈區域，可能毋需透過不相信對活性是重要的目標區域進行破壞活性而改變；或者是，熟悉此技術者之人士可識別殘基和分子的部份，其係被保存在相似的多勝肽中。此外，甚至對生物活性或結構很重要的區域可容易受到保守胺基酸取代而不用破壞生物活性或是不用不利地影響此多勝肽結構。

在此使用之名詞“患者”係包含人類和動物個體。

一“異常”係為可藉助本發明之類抗體結合蛋白的使用來治療的任何狀況。“異常”和“狀況”在此可互相使用交換且包含慢性和急性

異常或疾病，包含這些病理上的狀況，係易感染一病患至異常問題中。

在此使用之名詞“治療”或“處理”意指治療處理和預防性或防止的測量兩者。需要治療的那些包含已罹患異常的那些，以及有罹患異常之傾向的那些，或其中欲預防異常的那些。

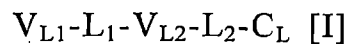
在此使用之名詞“醫藥組成物”或“治療組成物”意指化合物或組成物能夠引起要求的治療效果，當其正確的提供給一病患時。

在此使用之名詞“藥學上可接受的載體”或“生理上可接受的載體”意指一個或多個合適的配方材料可完成或加強類抗體結合蛋白的傳送。

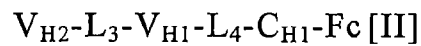
此名詞“有效量”和“治療上有效量”，當其使用在關於一醫藥組成物，包括一個或多個類抗體結合蛋白，係指一量或劑量足以產生要求的治療效果。更特別地，治療上有效量係為一類抗體結合蛋白的量足以抑制與受治療狀況有關聯的一個或多個臨床定義病理過程一段時間。此有效量可以根據所使用之特定類抗體結合蛋白而不同，且亦根據病患受治療和異常的嚴重性相關的各種因素和狀況而不同。例如，假如類抗體結合蛋白為體內給予，例如病患的年齡、體重和健康等因素，在劑量反應曲線和臨床和臨床前動物實驗所獲致的毒性資料都要考慮這些因素中。決定一給予醫藥組成物的有效量或治療上有效量對於熟悉此項技術者的能力是清楚的。

2. 類抗體結合蛋白

在本發明一實施例中，此類抗體結合蛋白包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中二個多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



以及二個多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

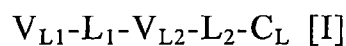
C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

Fc 係為免疫球蛋白絞鏈區和 C_{H2} 、 C_{H3} 免疫球蛋白重鏈不變區域；

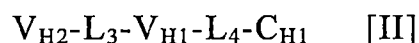
L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

在本發明另一實施例中，此類抗體結合蛋白，包含形成二個抗原結合位置之二多胜肽鏈，其中一第一多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



以及一第二多胜肽鏈具有下式所表示之結構：



其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此第一和第二多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

在本發明之某些類抗體結合蛋白中， L_3 的長度係至少為二倍的 L_1 長度。在本發明之另一類抗體結合蛋白中， L_4 的長度係至少為二倍的 L_2 長度。在本發明之某些類抗體結合蛋白中， L_1 係為 1 至 10 個胺基酸殘基長度以及 L_3 係為 1 至 14 個胺基酸殘基長度。在本發明之另一類抗體結合蛋白中， L_2 係為 1 至 15 個胺基酸殘基長度以及 L_4 係為 1 至 15 個胺基酸殘基長度。在本發明之較佳實施例中， L_1 係為 1 至 3 個胺基酸殘基長度以及 L_3 係為 2 至 6 個胺基酸殘基長度。在本發明之另一類抗體結合蛋白中， L_2 係為 1 至 3 個胺基酸殘基長度以及 L_4 係為 4 至 7 個胺基酸殘基長度。

合適的連結子實例包含：單一甘胺酸 (Gly) 殘基；雙甘胺酸胜肽 (Gly-Gly)；三胜肽 (Gly-Gly-Gly)；具有四個甘胺酸殘基的胜肽 (Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 25)；具有五個甘胺酸殘基的胜肽 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 26)；具有六個甘胺酸殘基的胜肽 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 27)；具有七個甘胺酸殘基的胜肽 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 28)；具有八個甘胺酸殘基的胜肽 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 29)。其他胺基酸殘基的結合可以使用例如胜肽 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 30) 和胜肽

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 31)。

在連結子內胺基酸殘基的識別和序列可能依據對完成連結子為必要的次要結構上元素而變化。例如，甘胺酸、絲胺酸和丙胺酸對連結子而言具有最大的彈性。假如一個更為堅固且擴大的連結子為必要的，甘胺酸、脯胺酸、酰胺酸和絲胺酸的一些結合為有用的。依據要求特性的必要，任何胺基酸殘基可能被視為一連結子，使其與其他胺基酸殘基，以構成較大勝肽連結子。

在本發明之某些類抗體結合蛋白中，V_{L1} 包含 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列；V_{L2} 包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列；V_{H1} 包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列；以及 V_{H2} 包含 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列。

在本發明之某些實施例中，此抗體結合蛋白能夠特定結合一個或多個抗原目標。在本發明之較佳實施例中，此類抗體結合蛋白能夠特定結合至少一抗原目標，其係選自 B7.1、B7.2、BAFF、BlyS、C3、C5、CCL11 (嗜酸粒細胞趨化蛋白)、CCL15 (MIP-1d)、CCL17 (TARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL2 (MCP-1)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (MIP-2)、SLC、CCL24 (MPIF-2/嗜酸粒細胞趨化蛋白-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸粒細胞趨化蛋白-3)、CCL3 (MIP-1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CD3、CD19、CD20、CD24、CD40、CD40L、CD80、CD86、CDH1 (E-鈣黏蛋白)、幾丁質酶、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (GCSF)、CTLA4、CX3CL1 (SCYD1)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、FCER1A、FCER2、IL-1、IL-12、IL13、IL15、IL17、IL18、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL22、IL23、IL25、IL27、IL7、IL8、IL9、ITGB4 (b4 整合蛋白)、LEP (瘦蛋白)、TLR2、TLR4、

TLR5、TNF、TNF- α 、TNFSF4 (OX40 配位基)、TNFSF5 (CD40 配位基)、類鐸受體、TREM1、TSLP、TWEAK、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、DNGR-1 (CLEC91) 和 HMGB1 所組成之群組。在本發明其他實施例中，此類抗體結合蛋白能夠抑制一個或多個抗原目標的功能。

在本發明之某些實施例中，類抗體結合蛋白係為雙特異性且能夠結合二個不同的抗原目標。在本發明之一較佳實施例中，此類抗體結合蛋白係為雙特異性且每一輕鏈-重鏈對能夠結合二個不同的抗原目標。在某一較佳實施例中，此類抗體結合蛋白能夠結合二個不同抗原目標，其係選自 IL4 和 IL13、BK 和 IL13、PDL-1 和 CTLA-4、IL-12 和 IL-18、IL-1 α 和 IL-1 β 、TNF α 和 IL-12p40、TNF α 和 IL-1 β 、TNF α 和 IL-23 以及 IL17 和 IL23 所組成之群組。在一更佳的實施例中，此類抗體結合蛋白能夠結合的抗原目標係為 IL4 和 IL13。

在本發明之某些實施例中，此類抗體結合蛋白係以 2.97×10^7 的結合速率(on-rate)和 3.30×10^{-4} 的解離速率(off-rate)特異性結合 IL4n，以及係以 1.39×10^6 的結合速率和 1.63×10^{-4} 的解離速率特異性結合 IL13。本發明之其他實施例中，此類抗體結合蛋白係以 3.16×10^7 的結合速率和 2.89×10^{-4} 的解離速率特異性結合 IL4，以及係以 1.20×10^6 的結合速率和 1.12×10^{-4} 的解離速率特異性結合 IL13。

在本發明之一實施例中，一類抗體結合蛋白包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其製備係藉由識別結合第一目標抗原的第一抗體變異區域以及結合第二目標抗原的第二抗體變異區域，每一變異區域包含一 V_L 和一 V_H ；指定此第一抗體變異區域或第二抗

體變異區域的 V_L 作為 V_{L1} ；根據下列式[I]和[II]，指定 V_{L2} 、 V_{H1} 、和 V_{H2} ：

$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-C_L \text{ [I]}$$

$$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1}-Fc \text{ [II]}$$

決定 L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 的最大和最小長度；產生式 I 和 II 的多胜肽結構；選擇式 I 和 II 的多胜肽結構，其結合第一目標抗原和第二目標抗原，以合併形成類抗體結合蛋白；

其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；以及

Fc 係為免疫球蛋白絞鏈區和 C_{H2} 、 C_{H3} 免疫球蛋白重鏈不變區域；以及

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

在本發明之另一實施例中，一類抗體結合蛋白包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，此製備係藉由識別結合第一目標抗原的第一抗體變異區域以及結合第二目標抗原的第二抗體變異區域，每一變異區域包含一 V_L 和一 V_H ；指定此第一抗體變異區域或第二抗體變異區域的 V_L 作為 V_{L1} ；根據下列式[I]和[II]，指定 V_{L2} 、 V_{H1} 、

和 V_{H2} ：

$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-C_L \quad [I]$$

$$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1} \quad [II]$$

決定 L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 的最大和最小長度；產生式 I 和 II 的多胜肽結構；選擇式 I 和 II 的多胜肽結構，其結合第一目標抗原和第二目標抗原，以合併形成類抗體結合蛋白。

其中：

V_{L1} 係為第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{L2} 係為第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；

V_{H1} 係為第一免疫球蛋白重鏈變異區域；

V_{H2} 係為第二免疫球蛋白重鏈變異區域；

C_L 係為一免疫球蛋白輕鏈不變區域；

C_{H1} 係為免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；以及

L_1 、 L_2 、 L_3 和 L_4 係為胺基酸連結子；

以及其中此式 I 的多胜肽和式 II 的多胜肽形成一交叉輕鏈-重鏈對。

在本發明之其他實施例中，一類抗體結合蛋白中的第一抗體變異區域和第二抗體變異區域係以相同方式製備。

3. 類抗體結合蛋白的使用

本發明之類抗體結合蛋白可以使用於任何已知試驗方法中，例如，競爭性結合試驗、直接和間接三明治試驗和免疫沈澱試驗，用於一個或多個目標抗原的偵測和量化。此類抗體結合蛋白將以親和力結合一個或多目標抗原，此親和力係適於所使用的試驗方法之用。

對診斷應用而言，在某些實施例中，類抗體結合蛋白可以被標記具有可偵測的部份。此可偵測的部份可為任何一個能夠直接或間接產生可偵測訊號。舉例來說，此可偵測的部份可為一放射性同位素，例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 或 ^{67}Ga ；一螢光或化學發光化合物，例如 螢光素異氰硫酸鹽、若丹明或螢光素；或一酵素，例如 鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或山葵過氧化酶。

本發明之類抗體結合蛋白亦可有利於體內成像。一被標記具有可偵測的部份類抗體結合蛋白可以提供給一動物，更好地進入血流中，並可分析在宿主中之被標記抗體的存在與位置。此類抗體結合蛋白可以被標記在動物內具有任何可偵測的部份，不管核磁共振、放射線或其他此領域中已知偵測手段。

本發明亦有關一套組，包括一類抗體結合蛋白和其他在生物樣品中可用來偵測目標抗原的級別的試劑。這些試劑可以包含可偵測的標記、阻斷血清、正和負控制樣品以及偵測試劑。

4. 類抗體結合蛋白治療組成物及其給藥

包含類抗體結合蛋白的治療或醫藥組成物係屬於本發明之範疇內。此類治療或醫藥組成物可以包含治療上有效量之一類抗體結合蛋白、或是類抗體結合蛋白-藥物複合體，係添加有根據給藥方式選擇適當的藥或生理上可接受的調配物。

可接受的調配物材料較佳者為對接受者在所利用的劑量及集中上為無毒者。

此醫藥組成物可包含調配物材料來修改、保持或保存組成物的，例如，pH 值、滲透性、黏性、清晰度、色彩、等滲透壓性、氣

味、不孕性、穩定性、解離或釋放速率、吸附性或穿透性。合適的配方材料包含但不限定於，胺基酸（例如甘胺酸、穀胺醯胺、天冬醯胺、精胺酸或賴胺酸）、抗菌劑、抗氧化劑（例如抗壞血酸、亞硫酸鈉或亞硫酸氫鈉）、緩衝劑（例如硼酸、碳酸氫鹽、三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其他有機酸）、填充劑（例如甘露醇或甘胺酸）、螯合劑（例如乙二胺四乙酸（EDTA））、錯化劑（例如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -環糊精或羥丙基- β -環糊精）、充填劑、單醣類、貳醣類或其他碳水化合物（例如葡萄糖、甘露糖或葡聚糖）、蛋白質（例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白）、著色劑、香料和稀釋劑、乳化劑、親水性聚合物（例如聚乙烯吡咯烷酮）、低分子量多肽、鹽形成相對離子（例如鈉）、防腐劑（例如氯化苄二甲胺、安息香酸、水楊酸、乙汞硫柳酸鈉、苯乙醇、對羥苯甲酸甲酯、對羥苄酸丙酯、氯己定、山梨酸或過氧化氫）、溶劑（例如甘油、丙二醇或聚乙二醇）、糖醇（例如甘露醇或山梨醇）、懸浮劑、表面活性劑或溼潤劑（例如共聚合物；PEG；山梨糖醇酐酯；聚山梨醇酯，例如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80；氫核；氨丁三醇；卵磷脂；膽固醇或四丁酚醛）、穩定增加劑（例如蔗糖或山梨醇）、張力增加劑（例如鹼性金屬鹵化物—較佳者為鈉或氯化鉀—或甘露醇山梨醇）、輸送載體、稀釋液、賦形劑及/或輔藥（參見，例如，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES（18th Ed., A.R. Gen-naro, ed., Mack Publishing Company 1990），以及其後續發明之版本，為任何目的於此結合參考）。

最理想的醫藥組成物將受依賴之熟練的專業人士所決定，例如，給藥的預期途徑、輸送形式和要求的劑量。此類組成物可以影

響身體狀態、穩定性、類抗體結合蛋白的體內釋放速率和體內清除速率。

醫藥組成物中之主要的運載體或載體可為天然的水性或非水性。例如，一個適合注射的運載體或載體可為水、生理食鹽水溶液或人造腦脊髓液，腸胃外給藥可能需要補充其他材料至組成物中。中性緩衝鹽水或混合有血清白蛋白的鹽水更可為示範的運載體。其他示範的醫藥組成物包括 pH 值大約為 7.0-8.5 之三羥甲基氨基甲烷緩衝液，或是 pH 值大約為 4.0-5.5 的乙酸鹽緩衝液，其係更可包含山梨醇或合適的替代物。在本發明之一實施例中，類抗體結合蛋白組成物可以利用混合所選擇之具有要求純度等級組成物和選擇配方劑以形成一凍乾塊狀物或是一水溶液來製備成可供貯存的形式。另外，此類抗體結合蛋白使用適當的賦形劑例如蔗糖可以配製成冷凍產物。

本發明之醫藥組成物可以選擇腸胃外輸送。或者是，此組成物可以選擇吸入法或經由消化道輸送，例如口服。此藥學上可接受的組成物的製備係為熟悉此項技術者所熟知。

此調配物成份會以濃度方式存在，使其為給藥位置可接受的濃度。例如，緩衝液係用來使組成物保持在生理的 pH 值或微低的 pH 值，通常係在從大約 5 至大約 8 的 pH 值範圍內。

若考慮腸胃外給藥，在本發明使用之治療組成物可以無熱源的、腸胃外可以接受的、包括要求的類抗體結合蛋白位於在藥學上可接受的運載體的水溶液之形式。一具體適用於腸胃外注射的運載體係為無菌蒸餾水，在此一類抗體結合蛋白係配製成一無菌、等滲透壓溶液，以適當的保存。然而，另一種製備可以包含具有試劑的

要求分子之配方，例如，注射微球、生物可蝕性微粒、高分子化合物（例如聚乳酸或聚乙醇酸）、珠粒或脂質體，其係提供產品受控制或持續的釋放，然後便可透過積存注射輸送。亦可使用玻尿酸，且此係具有促進循環持續期間的效果。引入所要求的分子的其他合適的手段包含植入式藥物輸送裝置。

在一實施例中，一醫藥組成物可以配製成吸入劑。例如，一類抗體結合蛋白可以配製成乾燥粉末作為吸入劑。類抗體結合蛋白吸入劑溶液亦可與推進劑配製成霧劑輸送。在另一實施例中，溶液可以為噴霧狀。

亦可考慮使用某些配方作為口服給藥。在本發明一實施例中，以這種方式給藥的類抗體結合蛋白可以製備成有或沒有那些載體，係通常使用在配合的固體劑量形式，例如錠劑和膠囊。例如，一膠囊可以設計成釋放配方的有效部份在消化道位置，使生物利用率增加至最大，且體循環前下降減到最小。添加的試劑可被包含來使類抗體結合蛋白的吸收更為容易。亦可利用稀釋液、香料、低熔點石蠟、蔬菜油、潤滑劑、懸浮劑、錠劑崩散劑和黏結劑。

另一醫藥組成物可包含一有效量的類抗體結合蛋白與無毒賦形劑混合成適合錠劑的製造。藉由錠劑溶解在無菌水中或另一適當的運載體，溶液可以被製備成單位劑量形式。適當的賦形劑包含，但不限於惰性稀釋劑，例如碳酸鈣、碳酸鈉或碳酸氫鹽、乳糖或磷酸鈣；或黏合劑，例如澱粉、明膠或阿拉伯膠；或潤滑劑，例如硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石。

本發明額外之醫藥組成物對於熟悉此項技術者所明白的，包括含有在持續的或受控制的輸送配方內的類抗體結合蛋白之配方。配

製各種持續的或受控制的輸送手段的技術，例如脂質體載體、生物可蝕性微粒或多孔珠粒和積存注射，此亦為熟悉此項技術者所熟知的。持續釋放配製的更多實例包含半透性聚合物基質以形成某種形狀的物品，例如，薄膜或微膠囊。持續的釋放基質可包含聚酯、水膠、聚丙交酯、L-麩胺酸和 γ 乙基-L-麩胺酸的共聚合物、聚（2-羥乙基-甲基丙烯酸酯）、乙烯乙酸乙烯酯或聚-D（-）-3-羥丁酸。持續的釋放組成物亦可包含脂質體，其係可由現有技術的數種已知方法來製備。

本發明之醫藥組成物使用於體內給藥通常必須是無菌的，此可透過無菌過濾薄膜的過濾來完成。此組成物在哪裡凍乾，就可以使用此方法的無菌在之前或之後引導冷凍乾燥法和還原。用於腸胃外給藥的組成物可以貯存在凍乾形式或一溶液中。另外，腸胃外組成物一般放置於具有無菌出入口的容器，例如，一靜脈注射溶液袋或具有一被皮下注射針刺穿之塞子的藥水瓶。

一旦此醫藥組成物已被配製，其可呈溶液、懸浮液、凝膠、乳液、固體或是乾燥或凍乾的粉末被貯存於無菌藥水瓶中。此類調配物亦可貯存在一即用形式或是在給藥前需要還原的形式（例如，凍乾）。

本發明亦包含用以產生單劑量給藥單元的套組。每一套組皆係包含一具有乾燥蛋白質的第一容器和一具有水溶液配方的第二容器。包含有單一和多腔室預充式注射器（例如，液體注射器和二室注射器）的套組亦包含在本發明之範疇內。

有療效地利用一類抗體結合蛋白醫藥組成物的有效數量將取決於，例如治療的背景與目的。熟悉此領域之技術者將正確鑑別治療

用的適當劑量級別，在某種程度上，將因此基於分子輸送而變化，此指示是為了使用的類抗體結合蛋白、給藥的途徑，和病患的尺寸（體重、體表或器官尺寸）和狀況（年齡和一般健康）。因此，臨床醫生可以滴定量劑量和修改給藥途徑，以得到最理想的治療效果。一典型之劑量範圍可以取決於上述之因素而從大約 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 提高至大約 100 mg/kg 或更多。在其他實施例中，此劑量範圍可以從 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 提高至大約 100 mg/kg ；或 1 $\mu\text{g/kg}$ 提高至大約 100 mg/kg ；或 5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 、15 $\mu\text{g/kg}$ 、20 $\mu\text{g/kg}$ 、25 $\mu\text{g/kg}$ 、30 $\mu\text{g/kg}$ 、35 $\mu\text{g/kg}$ 、40 $\mu\text{g/kg}$ 、45 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 、55 $\mu\text{g/kg}$ 、60 $\mu\text{g/kg}$ 、65 $\mu\text{g/kg}$ 、70 $\mu\text{g/kg}$ 、75 $\mu\text{g/kg}$ 提高至大約 100 mg/kg 。

給藥的次數將取決於使用調配物的類抗體結合蛋白的藥物動力學參數。典型地，一臨床醫生將提供此組成物直到可達到要求效果的劑量。此組成物可因此給予單一劑量，反覆給予雙或更多劑量（其係可以或不可包含所要求分子的相同數量），或是透過一注入裝置或導管的連續注入。適當劑量進一步的改進慣常地由熟悉此領域之技術者所決定，且其屬於他們所執行的工作範圍內。適當劑量反應資料的使用可以確定適合的劑量。

此醫藥組成物的給藥途徑係與已知方法一致，例如，口服；透過靜脈內、腹膜內、大腦內（薄壁組織內）、腦室內、肌肉內、眼內、動脈內、門脈內或病灶內的注射等途徑；透過持續釋放系統；或透過注入裝置。需要此組成物之位置係可以透過彈丸注射或連續注入，或是注入裝置來給予。

此組成物亦可局部給藥，其係透過薄膜、海綿或其他適當材料注入到已被吸收或封裝的所要求分子。注入裝置在哪裡使用，此裝

置即可注入至任何適當的組織或器官，且所要求分子的輸送可以透過擴散、定時釋放彈丸或連續給藥。

【圖式簡單說明】

圖 1. 圖式代表在雙 V 區組態內的抗原結合區域 Fv1 和 Fv2 以及它們各自的胜肽連結子 L_L 和 L_H 在 TBTI 形式的排列。

圖 2. 在 CODV 組態內的抗原結合區域 Fv1 (抗-IL4)和 Fv2 (抗-IL13) 以及它們各自的胜肽連結子排列的示意圖(2D)。

圖 3. 圖式代表在顯示一種可能的空間排列之 Fv 抗-IL4 和 Fab 抗-IL13，其由抗-IL4 的 Fv 和抗-IL13 的 Fv 的蛋白蛋白對接獲得。

圖 4. CODV 蛋白的四價的和雙特異性結合能力係於一 BIACORE 分析中評估，其係利用連續或是同時注射二抗原至一 DVD-Ig 蛋白覆蓋晶片上。連續注射觀察到的最大訊號可以藉由二抗原的共注射來獲得，證明所有結合位置的飽和。

圖 5. 在 CODV 組態內的抗原結合區域以及他們各自的胜肽連結子 L_L (L₁ 和 L₂)和 L_H (L₃ 和 L₄)排列的示意圖(2D)。在圖 A 中，此輕鏈係保持在一“線性或樣板”直線上，而重鏈係位於“交叉”組態。在圖 B 中，此重鏈係保持在一“線性或樣板”直線上，而輕鏈係位於“交叉”組態。

圖 6. 圖式代表根據不管是輕鏈或重鏈使用作為“樣板”的 CODV-Ig 設計。

圖 7. 併入抗-IL4 和抗-IL13 序列之 TBTI/DVD-Ig 或 CODV-Ig 分子的比較。

圖 8. 在一使用 NALM-6 細胞的細胞毒性分析中，CODV-Fab 和 B-Fab 形式的比較。

【實施方式】

5. 實例

以下的實例是本發明的具體化說明和其各種應用。他們只提出關於目的說明，但不應以任何方式解釋為限制本發明之範疇。

實例 1. 雙特異性交叉雙變異區類抗體結合蛋白的設計與工程

在一 Fv 形式之交叉雙變異區係描述於美國專利號 5,989,830，且其係被稱為交叉雙頭 (CODH) 組態。分子模型預測此交叉雙頭 (CODH) 設計產生具有二結合位置面對相對的方向的複合物，沒有限制的建議此雙-Fv 組態。檢查此 CODH Fv 形式，以決定是否可藉由增加 C_L 區域至輕鏈和 Fc 區至重鏈來轉變為完整的類抗體分子。一類似的轉換係成功的產生對應的雙變異區域 (DVD-Ig) 和 TBTI，如描述於美國專利號 7,612,181 和國際公開號 WO 2009/052081。在 CODH 形式下的變異區的排列係表示如下面之結構，其係指出胜肽鏈的胺基至羧基位向：

(a) 輕鏈：NH₂-V_{L1}-連結子-V_{L2}-COOH

(b) 重鏈：NH₂-V_{H2}-連結子-V_{H1}-COOH

此變異區的胺基至羧基末端以上述 (a) 和 (b) 排列，可以從表示在雙-Fv 組態的下面 (c) 和 (d) 的排列中辨別：

(c) 輕鏈：NH₂-V_{L1}-連結子-V_{L2}-COOH

(d) 重鏈：NH₂-V_{H1}-連結子-V_{H2}-COOH

注意到最主要的差異係為有區別的配置此對應的輕鏈和重鏈變異區 (V_{H1}/V_{L1} 和 V_{H2}/V_{L2}) 有關二個別的雙變異區組態。此對應的

V_{L1} 和 V_{H1} 區域兩個都在雙變異區組態內輕和重鏈的 N-末端。相對地，在此交叉組態，一對抗體變異區的一半係在蛋白質鏈空間內被分離為交叉組態。在此交叉組態，此 V_{L1} 區域能夠位於蛋白質輕鏈的 N-末端，但配對的 V_{H1} 區域位於交叉組態重鏈的 C-終端。在雙變異區組態內發現的 V_{L1} 和 V_{H1} 間的空間關係為在天然抗體內發現的排列。

此雙 Fv 組態的一個潛在的不利條件係為連結子 L_L 分離二變異區突出至此 Fv2 區域的抗原結合位置（參見圖 1）。此突出可能會干擾抗原結合和導致擾亂抗原 2 至 Fv2 的可達性。此擾亂可達性或干擾可能會妨礙抗原結合。另外，此干擾可能更明顯的使抗原 2 所在位置尺寸變大。當然，在美國專利號 7,612,181 中記錄有一 DVD-Ig 分子的結合親和力和中和能力，取決於存在於 N-終端或 C-終端的抗原特異性。參見美國專利號 7,612,181，實例 2。

因此，為了創造更多穩定的類抗體結合蛋白，相較於親本抗體其較不會遭受抗原親和力的損失，具有 C_L 區域在輕鏈上和一 Fc 區在重鏈上的交叉雙變異區分子將被設計和建構。形成這些類抗體蛋白的多胜肽係具有下面所示之結構，其係指出多胜肽鏈的胺基至羧基末端位向：

(e) 輕鏈： NH_2-V_{L1} -連結子- $V_{L2}-C_L-COOH$

(f) 重鏈： NH_2-V_{H2} -連結子- $V_{H1}-C_{H1}-Fc-COOH$

為了評估此雙特異性類抗體蛋白設計是否可結合二個不同抗原，二個事先產生且來自 IL4（親代人源化抗-IL4）和 IL13（親代人源化抗-IL13）的抗體特異性的人源化變異區係用來建構此雙特異性類抗體分子，如表 1 所示。小鼠抗體序列和人源化過程係描述於

國際公開號 WO 2009/052081 (TBTI)。簡單地說，小鼠抗-IL13 選殖體 B-B13 和小鼠抗-IL4 選殖體 8D4-8 的變異重和輕鏈的胺基酸序列係由胺基酸序列所決定。此小鼠序列係為人源化，然後譯回核苷酸序列，如實例 5 描述的國際公開號 WO 2009/052081，其係結合本文為完整的參考。此親代人源化抗-IL4 V_H和 V_L以及親代人源化抗-IL13 V_H和 V_L 序列結合並排列如表 1 所示。在表 1 的第一欄簡寫編號設計為這些類抗體結合蛋白簡化討論。此類抗體結合蛋白係異於插入二變異區間的連結子的尺寸，如表 1 所示。如表 1 所示之 DNA 分子編碼多胜肽係產生自譯回的親代抗-IL4 和抗-IL13 抗體。自 IGHG1 (GenBank Accession No. 569F4) 和 IGKC (GenBank Accession No. Q502W4) 可以獲得 C_{H1}、C_L和 Fc 區域。

表 1. 交叉雙頭免疫球蛋白

蛋白質簡寫編號	蛋白質描述	SEQ ID NO:
親代抗-IL4 輕鏈	抗-IL4 V _L	1
親代抗-IL4 重鏈	抗-IL4 V _H	2
親代抗-IL13 輕鏈	抗-IL13 V _L	3
親代抗-IL13 重鏈	抗-IL13 V _H	4
重鏈編號		
IL13 (G4S) IL4CH1-Fc	抗-IL13 V _H -(G ₄ S)-抗-IL4 V _H -C _{H1} -Fc	5
IL13 (G4S2) IL4CH1-Fc	抗-IL13 V _H -(G ₄ S) ₂ -抗-IL4 V _H -C _{H1} -Fc	6
IL4 (G4S) IL13CH1-Fc	抗-IL4 V _H -(G ₄ S)-抗-IL13 V _H -C _{H1} -Fc	7
IL4 (G4S2) IL13CH1-Fc	抗-IL4 V _H -(G ₄ S) ₂ -抗-IL13 V _H -C _{H1} -Fc	8
輕鏈編號		
IL13 (G4S) IL4CL	抗-IL13 V _L -(G ₄ S)-抗-IL4 V _L -CL	9
IL13 (G4S2) IL4CL	抗-IL13 V _L -(G ₄ S) ₂ -抗-IL4 V _L -CL	10
IL4 (G4S) IL13CL	抗-IL4 V _L -(G ₄ S)-抗-IL13 V _L -CL	11
IL4 (G4S2) IL13CL	抗-IL4 V _L -(G ₄ S) ₂ -抗-IL13 V _L -CL	12

蛋白結合體如表 2 所示，其表現是由暫時轉染和利用蛋白 A 色層分析純化。在每一實例中，尺寸排除色層分析顯現少於 12%的聚集，大部分少於 7%的聚集；但是沒有發現可顯示任何能力與 IL4 或 IL13 結合的交叉雙頭疫球蛋白。

然而，沒有功能性類抗體結合可以被檢測，且此缺乏活性的理由可能無法確定。

先前已預測有這排列可顯示較高的穩定性在雙變異區區域抗體，係描述於美國專利號 7,612,181 和國際公開號 WO 2009/052081。

表 2. CODH-Ig 結合 IL4 和 IL13

蛋白結合體	聚集	IL4 結合	IL13 結合
抗-IL13 V _H - (G ₄ S) -抗-IL4 V _H -C _{H1} -Fc 抗-IL4 V _L - (G ₄ S) -抗-IL13 V _L -C _L	5.4%	ND*	ND
抗-IL13 V _H - (G ₄ S) -抗-IL4 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL4 V _L - (G ₄ S) ₂ -抗-IL13 V _L -CL	6.3%	ND	ND
抗-IL13 V _H - (G ₄ S) ₂ -抗-IL4 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL4 V _L - (G ₄ S) -抗-IL13 V _L -CL	11.5%	ND	ND
抗-IL13 V _H - (G ₄ S) ₂ -抗-IL4 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL4 V _L - (G ₄ S) ₂ -抗-IL13 V _L -CL	10.1%	ND	ND
抗-IL4 V _H - (G ₄ S) -抗-IL13 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL13 V _L - (G ₄ S) -抗-IL4 V _L -CL	2.7%	ND	ND
抗-IL4 V _H - (G ₄ S) -抗-IL13 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL13 V _L - (G ₄ S) ₂ -抗-IL4 V _L -CL	3.6%	ND	ND
抗-IL4 V _H - (G ₄ S) ₂ -抗-IL13 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL13 V _L - (G ₄ S) -抗-IL4 V _L -CL	2.9%	ND	ND
抗-IL4 V _H - (G ₄ S) ₂ -抗-IL13 V _H - C _{H1} -Fc 抗-IL13 V _L - (G ₄ S) ₂ -抗-IL4 V _L -CL	10.8%	ND	ND

* ND 表示無檢測到

實例 2. CODV-Ig 蛋白分子模型的設計

為了獲得足夠功能的類抗體蛋白，利用此交叉雙頭組態係可修

正 Fc 和 C_{L1} 區域的合併，一分子模型協議係為了包含和評估在重和輕鏈上位於不變和變異區域間以及在雙變異區域間的連結子。問題是，是否獨特連結子增加於重和輕鏈兩的每一不變/變異區域界面間和二變異/變異區域界面間可允許適合的蛋白摺疊，以在交叉雙變異區組態內發生或產生功能性類抗體分子（參見圖 2）。換言之，共有四個獨立且獨特的連結子可以估計（參見圖 2）。這分子模型協議係基於 Fv_{IL4} 和 Fv_{IL13} 區的同源性模型和實驗模型的蛋白-蛋白對接，分別結合在 Fv_{IL4} 和 Fv_{IL13} 區之間以及 Fv 和不變或 Fc 區之間的適當連結子。

此些獨立的連結子各分配有唯一的名字，如下所述：L1 係指在輕鏈上 N-末端 V_L 和 C-末端 V_L 之間的連結子；L2 係指在輕鏈上 C-末端 V_L 和 C_L 之間的連結子；L3 係指在重鏈上 N-末端 V_H 和 C-末端 V_H 之間的連結子；L4 係指在重鏈上 C-末端 V_H 和 C_{H1}（和 Fc）之間的連結子。值得注意的是，名稱 V_H 和 V_L 僅是指在最終形式，在特定蛋白鏈上的區域的位置。例如，V_{H1} 和 V_{H2} 可能來自親本抗體的 V_{L1} 和 V_{L2} 區域，且在 CODV-Ig 內置入 V_{H1} 和 V_{H2} 位置。同樣地，V_{L1} 和 V_{L2} 可能來自親本抗體的 V_{H1} 和 V_{H2} 區域，且在 CODV-Ig 內置入 V_{H1} 和 V_{H2} 位置。因此，V_H 和 V_L 名稱係指在親本抗體中的現在位置而不是原始位置。

更詳細地，Fv_{IL4} 的同源性模型係建構在 PDB 進入 1YLD（輕鏈）和 1IQW（重鏈）。此 Fv_{IL4} 二聚物係重構於 IL13/抗-IL13 Fab_{IL13} 複合物的內部晶體結構，且最佳化。為了獲得由 IL4 連結到 Fv_{IL4} 所需要估計的數量，IL4（1RCB.pdb）的晶體結構對接此 Fv_{IL4} 的同源性模型。接著，此複合物產生的二十二個假定模型值得進一步考慮。

與此同時，Fv_{IL4} 的同源性模型對接 Fv_{IL13}，其係萃取自 IL13/Fab_{IL13} 複合物的內部晶體結構。發現一種對雙變異區免疫球蛋白而言較好的解決方案，可允許相對短連結子建構，以顯現沒有空間干擾的抗原結合和不變區域的配置（參見圖 3）。在這排列 Fv_{IL4}（V_{L1}）係設置於輕鏈的 N-終端，跟隨輕鏈 C-終端上的 Fv_{IL13}（V_{L2}）和 Fc（C_{L1}）。在此重鏈，Fv_{IL13}（V_{H2}）係設置於 N-終端，跟隨 Fv_{IL4}（V_{H1}）和不變區（C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}）。

如表 3 所示，輕鏈模型建議，連結子 L1 位於 V_{L1} 和 V_{L2} 區域之間及連結子 L2 位於 V_{L2} 和 C_{L1} 區域之間應該分別介於一至三個及零至二個甘胺酸殘基長。重鏈模型建議，連結子 L3 位於 V_{H2} 和 V_{H1} 區域之間及連結子 L4 位於 V_{H1} 和 C_{H1} 區域之間應該分別介於二至六個及四至七個甘胺酸殘基長（參見表 3 和圖 2）。在此實例中，使用甘胺酸作為連結子的原型胺基酸，但是其他胺基酸殘基亦可視為連結子。建議模型的結構穩定性以藉由連結子結構的最佳化、最小化和分子動力計算得到驗證。四個輕鏈和六個重鏈間的系統性結合構築體產生 24 可能的交叉雙變異區雙特異性抗-IL4 和抗-IL13 類抗體結合蛋白（參見表 4）。

表 3. 建議的連結子長度

連結子間	最大連結子插入	最小連結子插入	連結子名稱
V _{L1} -V _{L2}	Gly ₃	Gly	L1
V _{L2} -C _L	Gly ₂	無	L2
V _{H2} -V _{H1}	Gly ₆	Gly ₂	L3
V _{H1} -C _{H1}	Gly ₇	Gly ₄	L4

表 4. CODV-Ig 表現

編號*	重鏈 (N 至 C 末端)	SEQ ID NO:
HC1	IL13 V _H - (Gly6) -IL4 V _H - (Gly7) -C _{H1} -Fc	13
HC2	IL13 V _H - (Gly6) -IL4 V _H - (Gly4) - C _{H1} -Fc	14
HC3	IL13 V _H - (Gly2) -IL4 V _H - (Gly7) - C _{H1} -Fc	15
HC4	IL13 V _H - (Gly2) -IL4 V _H - (Gly4) - C _{H1} -Fc	16
HC5	IL13 V _H - (Gly4) -IL4 V _H - (Gly7) - C _{H1} -Fc	17
HC6	IL13 V _H - (Gly4) -IL4 V _H - (Gly4) - C _{H1} -Fc	18
編號*	輕鏈 (N 至 C 末端)	
LC1	IL4 V _L - (Gly3) -IL13 V _L -C _{L1}	19
LC2	IL4 V _L - (Gly) -IL13 V _L - C _{L1}	20
LC3	IL4 V _L - (Gly3) -IL13 V _L - (Gly2) - C _{L1}	21
LC4	IL4 V _L - (Gly) -IL13 V _L - (Gly2) - C _{L1}	22
C _{L1}	C _{L1} 人類輕鏈不變區域	23
C _{H1} -Fc	C _{H1} 人類重鏈不變區域和 Fc 區	24
Gly4	胜肽連結子具有 4 甘胺酸 (GGGG)	25
Gly5	胜肽連結子具有 5 甘胺酸 (GGGGG)	26
Gly6	胜肽連結子具有 6 甘胺酸 (GGGGGG)	27
Gly7	胜肽連結子具有 7 甘胺酸 (GGGGGGG)	28
Gly8	胜肽連結子具有 8 甘胺酸 (GGGG GGGG)	29

*簡短手編號設計為代表關聯的結構。以 HC 開始的編號代表相鄰的重鏈，且以 LC 開始的編號代表相鄰的輕鏈。

在表 4 中，不包含此字首“抗”，但其意欲表示 IL13 係指抗-IL13 且 IL4 係指抗-IL4。

實例 3. CODV-Ig 表現質體的產生

核酸分子編碼於表 4 中描述的六個重鏈和四個輕鏈的變異重和輕鏈，係藉由在 Geneart (Regensburg, Germany) 的基因合成來產生。此變異輕鏈區域會藉由限制內核酸酶 ApaLI 和 BsiWI 的消化作用來融合至不變輕鏈 (IGKC, GenBank Accession No. Q502W4)，接著接合至附體型表現載體 pFF 的 ApaLI/BsiWI 位置，此 pTT 載體的

相似物係描述在 Durocher 等人 (2002, *Nucl. Acids Res.* 30(2): E9), 創造用來表現輕鏈的哺乳動物表現質體。

變異重鏈區域係融合至人類不變重鏈的“Ted”變異體 (IGHG1, GenBank Accession No. 569F4), 或是選擇性地融合至一來自人類不變 IGHG1 的 6x His 標記的 C_{H1} 區域, 以創造一雙特異性 Fab。然後, 此 V_H 區域係以限制內核酸酶 ApaLI 和 ApaI 消化, 然後分別融合至 IGHG1 或是 His 標記 C_{H1} 區域, 藉由接合至附體型表現載體 pFF 的 ApaLI/ApaI 位置, 以創造用來表現重鏈的哺乳動物表現質體 (分別是 IgG1 或 Fab)。

實例 4. CODV-Ig 的表現

表現質體編碼對應構築體的重和輕鏈會在 *E. coli* DH5a 細胞內增殖。使用 Qiagen 的 EndoFree Plasmid Mega 套組可自 *E. coli* 中製備出用於轉染的質體。

如製造商所描述, 在 Freestyle Medium (Invitrogen 公司) 成長的 HEK 293-FS 細胞使用 293fectin (Invitrogen 公司) 轉染試劑來轉染指示 LC 和 HC 質體編碼顯示於表 4 的重鏈和輕鏈。7 天後, 利用離心作用來分離細胞, 且上層液通過 0.22 μm 的過濾器來分離微粒。

CODV-IgG1 構築體係利用親和力色層分析於蛋白 A 管柱 (HiTrap Protein A HP Columns, GE Life Sciences) 上進行純化。以 100 mM 乙酸鹽緩衝液和 100 mM NaCl、pH 值為 3.5 的管柱洗提之後, 此 CODV-IgG1 構築體係使用 HiPrep 26/10 除鹽管柱 (Desalting Columns) 來去除鹽分, 在濃度 1 mg/mL 的 PBS 並使用 0.22 μm 薄

膜過濾。

雙特異性 CODV Fab 構築體係利用 IMAC 在 HiTrap IMAC HP Columns (GE Life Sciences) 上進行純化。以線性梯度的管柱 (洗提緩衝液: 20 mM 磷酸鈉, 0.5 M NaCl, 50 - 500 mM 咪唑, pH 值為 7.4) 洗提之後, 含片段的蛋白聯合, 並使用 HiPrep 26/10 除鹽管柱去除鹽分, 在濃度 1 mg/mL 的 PBS 中製備並使用 0.22 μ m 薄膜過濾。

在 280 nm 處測量吸光度以測定蛋白濃度。在還原和無還原狀況下, 每一批次皆利用 SDS-PAGE 進行分析, 以測定每一子單元和單體的純度和分子量。

一個 Nunc F96-MaxiSorp-Immuno 培養盤係被覆有山羊抗-人類 IgG (Fc 特異性) [NatuTec A80-104A]。此抗體係以碳酸鹽被覆緩衝液 (50 mM 碳酸鈉, pH 值為 9.6) 稀釋至 10 μ g/ml, 且每一孔分配有 50 μ L。此培養盤係以膠帶密封, 且在 4° C 下貯存一整夜。此培養盤係以清洗緩衝液 (PBS, pH 值為 7.4 以及 0.1% Tween20) 清洗三次。150 μ L 的封閉液 (1% BSA / PBS) 係分配至每一孔中並覆蓋整個培養盤。在室溫下 1 小時之後, 培養盤係以清洗緩衝液清洗三次。增加 100 μ L 的樣品或標準 (在 1500 ng/ml 至 120 ng/ml 的範圍中) 且於室溫下靜置 1 小時。此培養盤係以清洗緩衝液清洗三次。加入使用孵育液 (0.1% BSA, PBS, pH 值為 7.4 以及 0.05% Tween20) 以 1:10,000 稀釋 100 μ L 的山羊抗-人類 IgG-FC - HRP 共軛 [NatuTec A80-104P-60]。在室溫下孵育 1 小時之後, 此培養盤係以清洗緩衝液清洗三次。100 μ L 的 ABTS 基質 (10 mg ABTS 錠劑 (Pierce 34026) 於 0.1 M Na₂HPO₄, 0.05 M 檸檬酸溶液, pH 值為 5.0)。在

使用前加入 10 μL 的 30% H_2O_2 / 10 ml 基質緩衝液，係分配至每一個孔，且允許形成色彩。在色彩形成後（大約 10 至 15 分鐘），加入 50 μL 的 1% SDS 溶液來停止反應。此培養盤在 A_{405} 讀取。

實例 5. CODV-Ig 變異體的特性分析

為了測定 CODV-Ig 類抗體蛋白重鏈和輕鏈是否有成對和正確的摺疊，此聚集級別係利用分析分子篩層析法（SEC）測量。分析 SEC 係在使用 ÄKTA explorer 10（GE Healthcare）裝配對上完成，且其裝配有 TSKgel G3000SWXL 管柱（7.8 mm x 30 cm）和 TSKgel SWXL 保護管柱（Tosoh Bioscience）。此分析使用 250 mM NaCl、100 mM Na-磷酸鹽，pH 值為 6.7，且在 280 nm 處以 1 ml/min 進行偵測。30 μL 的蛋白樣品（在 0.5-1 mg/ml）係提供給此管柱。對於分子大小的估計，使用凝膠過濾標準調配（MWGF-1000, SIGMA Aldrich）來校正此管柱。資料估算係使用 UNICORN 軟體 v5.11 來完成。

表 5 顯示使用表 4 描述之抗-IL4 和抗-IL13 變異區結合製作的第一組 24 個不同 CODV-Ig 分子的結果。在表 4 分配的編號代表在表 4 內相鄰的結構。對於輕鏈和重鏈對產生蛋白的位置，可以使用 SEC 測量其聚集級別，結果顯示於表 5，其中 LC4（ $L1 = 1$ ； $L2 = 2$ ）幾乎與所有六重鏈成功成對。LC4 相當於結構 IL4 V_L -（Gly）-IL13 V_L -（Gly2）- C_{L1} 具有連結子 L1 等於 1，其中單一胺基酸殘基分離雙變異區輕鏈的二個 V_L 區域。另外，LC4 具有 L2 等於 2，其係包含 Gly-Gly 雙胜肽連結子位於中心 V_L 和 C-末端 C_{H1} 之間。

表 5. 重和輕鏈對間的聚集級別

	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5	HC6
LC1	>50%	>50%	ND*	ND	ND	ND
LC2	ND	ND	ND	>50%	ND	ND
LC3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LC4	7.2%	6.8%	6.8%	7.1%	6.3%	5.9%

*ND 表示沒有蛋白產生

在 CODV-Ig 分子產生的地方，在中間物 IL13 和 IL4 集中處進行單一集中 BIACORE 試驗，以證實結合至目標抗原。選擇 CODV-Ig 類抗體分子相當於表 4 描述之 LC4:HC4 和 LC4:HC6 結合體，作為使用表面電漿共振的完整動力分析的估算。

如表 5 所描述者，大部分的 CODV-Ig 分子無法生產，或僅僅聚集而已（高達 90%）。在色層分析步驟後，造成可接受的聚集級別（5-10%）的此重鏈/輕鏈結合體係為與輕鏈 IL4 V_L-(Gly)-IL13 V_L-(Gly2)-C_{L1} 結合體。輕鏈在這些 CODV-Ig 變異體係為最挑剔的鏈，並作為平台來接受不同重鏈形成不同連結子組成物。

1. 動力分析

選擇二對的重鏈和輕鏈作為完整的動力分析。重組人類 IL13 和 IL4 係購買自 Chemicon (USA) 公司。純化抗體的動力特性分析係在 BIACORE 3000 (GE Healthcare) 上使用表面電漿共振技術來完成。使用一物種特異性抗體（例如，人類-Fc 特異性 MAB 1302，Chemicon）用來捕捉的捕捉試驗，並使用研究抗體的位向。透過伯胺族群（11000 RU）並使用標準程序使捕捉抗體固定在研究級 CM5 晶片 (GE 生命科學) 上。此分析抗體係在具有調整 RU 值的 10 μ L/min

流動率下捕捉，且此 RU 值可導致 30RU 的最大分析結合。對照重組人類 IL4 和 IL13 在 0 至 25 nM 間之濃度範圍的 HBS EP (10 mM HEPES，pH 值為 7.4，150 mM NaCl，3 mM EDTA 和 0.005 % 表面活性劑 P20)，於 30 μ l/min 流動率下測量結合動力學。晶片表面係以 pH 值為 2.5 的 10 mM 甘胺酸進行再生。使用流動細胞而毋需捕捉抗體作為參考，以 BIAevaluation 程式 v4.1 版分析並計算動力參數。

下表 6 顯示在 CODV-Ig 形式(表 4，編號 LC4:HC4 和 LC4:HC6)具有各自區域的親本 BB13 (抗-IL13) 和 8D4 (抗-IL4) 抗體 (表示為 IgGs) 的動力比較。如表 6 所示，當比較親本抗-IL13 和抗-IL4 抗體時，此 CODV-Ig 構築體並沒有表現出減少對相應的抗原結合特性。在 DVD-Ig/TBTI 形式觀察到的結合速率之損失並未發生在使用相同 Fv 序列的 CODV-Ig 組態。此相對面的結合位置應該允許結合大抗原或橋接具有雙特異性類抗體組態的不同細胞，也將適用於親本抗體更廣泛的選擇。此 CODV-Ig 更進一步的優點是無連結子殘基突出至抗原結合位置以及減少抗原的可親性。

表 6. LC4:HC4 和 LC4:HC6 的動力分析

編號		結合速率[1/Ms]	解離速率[1/s]	KD [M]
	親本抗-IL4 mAb	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
	親本抗-IL13 mAB	1.59E+06	1.30E-04	8.18E-11
LC4:HC4	CODV-Ig with IL4	3.16E+07	2.89E-04	9.14E-12
LC4:HC4	CODV-IG with IL13	1.20E+06	1.12E-04	9.34E-11
LC4:HC6	CODV-Ig with IL4	2.97E+07	3.30E-04	1.11E-11
LC4:HC6	CODV-IG with IL13	1.39E+06	1.63E-04	1.18E-10

2. IL4 和 IL13 的共注射用來證明藉由 CODV-Ig 的附加抗原結合

為了研究二抗原的附加結合，應用一種驅動精靈（wizard-driven）共注射方法，直接先以一抗原注射，在一延遲時間之後，再接著注射另一抗原（先 IL4 然後 IL13，反之亦然）。產生的結合級別係係用來比較在相同濃度以 1:1 混合的二抗原所完成者。為了顯示二 IL4 和 IL13 抗原藉由 CODV-Ig 分子的附加結合，一 BIACORE 實驗係與 CODV-Ig 結合體[HC4:LC4]以二抗原的共注射進行三次分離分析循環（參見圖 4）。此共注射係以 3.125 nM 的 IL4 / 25 nM IL13（反之亦然）進行，並以 1:1 混合的 3.125 nM 的 IL4 和 25 nM 的 IL13 進行。HBS-EP 緩衝液的共注射係作為參考。不管共注射序列，在抗原混合注射後或是抗原共注射後，在 800 秒的時間點，係達到 63 RU 的同一級別。當 CODV-Ig 蛋白已藉由第一抗原（IL4）飽和，注射第二抗原（IL13），並觀察到第二結合訊號。當抗原注射序列反轉，此觀察係會再次重現。這證明二抗原藉由 CODV-Ig 的附加的和非抑制的結合。所以，此 CODV-Ig 構築體可能會同時結合二抗原（即，展現雙特異性）飽和所有結合位置（即，展現四價）。

實例 6. CODV-Ig 之連結子長度的允差

各種長度的連結子容忍度的計算係利用建構具有不同連結子長度的結合體的 CODV-Ig 分子，L1、L2 位於輕鏈上以及 L3 和 L4 位於重鏈上。CODV-Ig 構築體之產生係與重鏈連結子 L3 和 L4 變化，L3 係介於 1 到 8 殘基間以及 L4 係為 0 或 1 殘基。在 CH1-Fc 後，重鏈包含抗-IL4 作為 N-末端結合區域以及抗-IL13 作為 C-末端結合區域。此輕鏈連結子 L1 和 L2 變化，L1 係從 3 至 12 殘基間變化以及

L2 係從 3 至 14 殘基間變化。在 C_{L1} 後，此輕鏈包含抗-IL13 作為 N-末端結合區域以及抗-IL4 作為 C-末端結合區域。

1. CODV-Ig 變異體的特性分析

聚集級別的測定係藉由分析分子篩層析法 (SEC)。分析 SEC 係使用 ÄKTA explorer 10 (GE Healthcare) 來完成，且其裝配有 TSKgel G3000SWXL 管柱 (7.8 mm x 30 cm) 和 TSKgel SWXL 保護管柱 (Tosoh Bioscience)。此分析使用 250 mM NaCl、100 mM Na-磷酸鹽，pH 值為 6.7，且在 280 nm 處以 1 ml/min 進行偵測。30 µL 的蛋白質樣品 (在 0.5-1 mg/ml) 係提供給此管柱。對於分子大小的估計，使用凝膠過濾標準調配 (MWGF-1000, SIGMA Aldrich) 來校正此管柱。資料估算係使用 UNICORN 軟體 v5.11 來完成。

重組人類 IL13 和 IL4 係購買自 Chemicon (USA)。重組人類 TNF- α 係購買自 Sigma Aldrich (H8916-10µg)，重組人類 IL-1 β (201-LB/CF)、重組人類 IL-23 (1290-IL/CF)、重組人類 EGFR (344 ER) 以及重組人類 ErbB2-Fc (1129-ER-50) 皆購買自 R&D Systems。

以 Biacore 進行動力結合分析如下所述。純化抗體的詳細動力特性分析係在 BIACORE 3000 (GE Healthcare) 上使用表面電漿共振技術來完成。使用一物種特異性抗體 (例如，人類-Fc 特異性 MAB 1302, Chemicon) 用來捕捉的捕捉試驗，並使用研究抗體的位向。為了 EGFR 和 ErbB2 結合動力的測定，在實例 5，表 6 中對應之 CODV Fabs 係使用抗-人類 Fab 捕捉套組 (GE Healthcare) 來捕捉。透過伯胺群組 (11000 RU) 並使用標準程序使捕捉抗體固定在研究級 CM5 晶片 (GE 生命科學) 上。此分析抗體係在具有調整 RU 值的 10 µL/min

流動率下捕捉，且此 RU 值可導致 30RU 的最大分析結合。對照重組人類 IL4 和 IL13 在 0 至 25 nM 間之濃度範圍的 HBS EP (10 mM HEPES, pH 值為 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 表面活性劑 P20)，於 30 μ L/min 流動率下測量結合動力學。晶片表面係以 pH 值為 2.5 的 10 mM 甘胺酸進行再生。使用流動細胞而毋需捕捉抗體作為參考，以 BIAevaluation 程式 v4.1 版分析並計算動力參數。使用流動細胞而毋需捕捉抗體作為參考，以 BIAevaluation 程式 v4.1 版分析並計算動力參數。

表 7 總結了具有不同尺寸的連結子結合體之 CODV-Ig 於產量、聚集（以尺寸排除色層分析測量）和結合親和力的結果。這些結果顯露出 L2 為零者，CODV-Ig 分子通常不能產生，或是蛋白產生，而具有較高聚集的級別（參見表 7 中之批次 ID Nos. 101、102、106-111 和 132-137）。所以，相較於來自實例 2 之分子模型預測，L2 等於零者係在可接受範圍內；這些結果指出，此 V_{L2} - C_L 轉變（或 L2）需要至少一個殘基的連結子（參見表 7）。

表 7. 對 CODV-Ig 連結子尺寸的最佳化

批次 ID	對 準 在 LC1*	L1	L2	L3	L4	產量 ¹ [mg/L]	聚 集 [%]	KD (抗原 1) IL4 [pM]	KD (抗原 2) IL13 [pM]
101	IL4 x IL13	0	0	0	0	n.p.	—	—	—
102	IL4 x IL13	0	0	2	4	1.0	66.4	35	125
103	IL4 x IL13	0	1	2	4	2.0	10.8	4	124
104	IL4 x IL13	0	2	2	4	1.0	10.0	3	137
105	IL4 x IL13	0	2	4	4	2.0	8.5	6	94
106	IL4 x IL13	1	0	2	4	4.2	61.0	—	—
107	IL4 x IL13	1	0	2	7	n.p.	—	—	—
108	IL4 x IL13	1	0	4	4	n.p.	—	—	—
109	IL4 x IL13	1	0	4	7	n.p.	—	—	—
110	IL4 x IL13	1	0	6	4	3.0	75.0	—	—

111	IL4 x IL13	1	0	6	7	5.6	91.0	—	—
112	IL4 x IL13	1	1	2	4	5.3	8.8	5	55
113	IL4 x IL13	1	2	0	0	2.0	1.9	6	59
114	IL4 x IL13	1	2	0	2	1.0	7.2	4	75
115	IL4 x IL13	1	2	0	4	2.0	8.0	11	62
116	IL4 x IL13	1	2	1	4	3.0	5.7	5	74
117	IL4 x IL13	1	2	12	12	4.0	9.2	7	75
118	IL4 x IL13	1	2	12	9	7.0	11.8	7	74
119	IL4 x IL13	1	2	15	15	10.0	7.9	6	64
120	IL4 x IL13	1	2	2	2	2.0	5.9	6	70
121	IL4 x IL13	1	2	2	4	7.0	7.1	11	118
122	IL4 x IL13	1	2	2	7	6.6	6.8	1	50
123	IL4 x IL13	1	2	4	4	5.8	5.9	9	93
124	IL4 x IL13	1	2	4	7	5.6	6.3	6	51
125	IL4 x IL13	1	2	6	4	7.6	6.8	8	64
126	IL4 x IL13	1	2	6	7	8.2	7.2	9	56
127	IL4 x IL13	1	2	9	12	4.0	8.7	2	83
128	IL4 x IL13	1	2	9	9	10.2	14.0	12	94
129	IL4 x IL13	1	3	2	4	4.0	4.7	5	70
130	IL4 x IL13	1	4	2	4	7.1	6.0	4	57
131	IL4 x IL13	2	2	2	4	1.0	7.3	5	50
132	IL4 x IL13	3	0	2	4	n.p.	—	—	—
133	IL4 x IL13	3	0	2	7	n.p.	—	—	—
134	IL4 x IL13	3	0	4	4	n.p.	—	—	—
135	IL4 x IL13	3	0	4	7	n.p.	—	—	—
136	IL4 x IL13	3	0	6	4	9.8	93.0	—	—
137	IL4 x IL13	3	0	6	7	5.8	90.0	—	—
138	IL4 x IL13	3	2	2	4	n.p.	—	—	—
139	IL4 x IL13	3	2	2	7	n.p.	—	—	—
140	IL4 x IL13	3	2	4	4	n.p.	—	—	—
141	IL4 x IL13	3	2	4	7	n.p.	—	—	—
142	IL4 x IL13	3	2	6	4	n.p.	—	—	—
143	IL4 x IL13	3	2	6	7	n.p.	—	—	—

* 對準在重鏈上必須是 IL13V_H-L3-IL4V_H-L4_C_{H1}-Fc

¹ n.p. 表示此構築體不可生產。

另外，可以發現上述之 CODV-Ig 連結子長度如增加 1 胺基酸殘基會比增加 2 胺基酸殘基更加敏感。例如，批次 ID Nos. 103 和 104 異於 L2 內的 1 胺基酸殘基，批次 ID No. 103 顯示 6 摺疊更多聚集，以及批次 ID No. 104 顯示較少的聚集和二倍的產量。相反地，批次

ID Nos. 104 和 105，其係異於在 L2 內的二殘基，並顯示出有關產量、聚集和結合的類似輪廓。

實例 7. 重鏈作為 CODV-Ig 的樣板鏈

在實例 1 到 5 中，輕鏈上最理想的短連結子尺寸建議此輕鏈保持線性排列作為樣板，以及在重鏈上需要較大連結子以便重鏈可正確的摺疊至交叉組態來符合樣板輕鏈（參見圖 5，圖 A）。的不管短連結子是否特別設置於重鏈來維持線性排列在重鏈上成為重鏈“樣板”鏈，以及不管圖案是否會一再重複，需要較大的連結子來允許非-樣板鏈正確地摺疊，然後接著接著評估能容納現在的樣板重鏈（參見圖 5，圖 B）。

圖 6 說明這些 CODV-Ig 設計理論係基於具有輕鏈或重鏈作為“樣板”。為了評估這觀念的一般性質，CODV-Ig 構築體之產生係與重鏈連結子 L3 和 L4 變化，L3 係介於 1 到 8 殘基間，以及 L4 係為 0 或 1 殘基。在 C_{H1} -Fc 後，重鏈包含抗-IL4 作為 N-末端結合區域以及抗-IL13 作為 C-末端結合區域。此輕鏈連結子 L1 和 L2 變化，L1 係從 3 至 12 殘基間變化以及 L2 係從 3 至 14 殘基間變化。在 C_{L1} 後，此輕鏈包含抗-IL13 作為 N-末端結合區域以及抗-IL4 作為 C-末端結合區域。

表 8 總結了具有不同尺寸的連接子結合體之 CODV-Ig 於產量、聚集（以尺寸排除色層分析）和結合親和力的結果，其中重鏈係抱持線性排列作為樣板鏈，且輕鏈被允許摺疊成一交叉組態。這些結果顯露出 L4 為零者，CODV-Ig 分子通常不能產生，或是蛋白產生，而具有較高聚集的級別（類似於 L2 的分子等於零）（參見表 8 中之

批次 ID Nos. 207-209、211-212、219-224、231-236、243-252 和 263-266)。有一個例外是批次 ID No. 210，其中 L1 為 7、L2 為 5、L3 為 2 以及 L4 為零。此排列產生足夠數量的蛋白，並具有一可接受的聚集和結合的級別，以提出某個結合體的連結子尺寸可以發現用來補償在某個環境下 L4 位置的零長度連結子。

表 8. 具有重鏈作為樣板的連結子尺寸最佳化

批次 ID	對 準 在 HC*	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚 集 [%]	KD (抗原 1) IL4 [pM]	KD (抗原 2) IL13 [pM]
201	IL4 x IL13	5	3	1	2	6.3	12	4	72
202	IL4 x IL13	5	5	1	2	10.5	7.0	9	54
203	IL4 x IL13	7	3	1	2	19.3	9.4	80	46
204	IL4 x IL13	7	5	1	2	15.3	5.2	3	25
205	IL4 x IL13	10	3	1	2	4.7	4.0	8	58
206	IL4 x IL13	10	5	1	2	9.1	3.9	4	58
207	IL4 x IL13	5	3	2	0	6.7	25.3	3	33
208	IL4 x IL13	5	5	2	0	10.2	18.4	10	77
209	IL4 x IL13	7	3	2	0	16.2	22.2	5	47
210	IL4 x IL13	7	5	2	0	14.7	9.7	4	47
211	IL4 x IL13	10	3	2	0	2.1	12.8	7	53
212	IL4 x IL13	10	5	2	0	7.0	36.3	10	29
213	IL4 x IL13	5	3	2	2	4.0	13.2	5	27
214	IL4 x IL13	5	5	2	2	8.0	7.9	10	53
215	IL4 x IL13	7	3	2	2	14.9	11.5	4	50
216	IL4 x IL13	7	5	2	2	7.5	3.6	11	40
217	IL4 x IL13	10	3	2	2	2.4	4.4	8	79
218	IL4 x IL13	10	5	2	2	4.6	6.6	4	36
219	IL4 x IL13	3	6	3	0	2.1	51.8	8	71
220	IL4 x IL13	3	10	3	0	3.9	59.4	1	42
221	IL4 x IL13	3	14	3	0	1.9	57.6	35	81
222	IL4 x IL13	6	6	3	0	4.0	11.8	7	53
223	IL4 x IL13	6	10	3	0	10.3	16.6	6	23
224	IL4 x IL13	6	14	3	0	5.1	13.5	9	52
225	IL4 x IL13	3	6	3	2	2.8	71.6	6	68
226	IL4 x IL13	3	10	3	2	7.3	65.8	6	64
227	IL4 x IL13	3	14	3	2	1.6	53.6	7	39
228	IL4 x IL13	6	6	3	2	4.0	19.1	7	44
229	IL4 x IL13	6	10	3	2	2.2	15.4	3	14
230	IL4 x IL13	6	14	3	2	4.0	16.2	6	76

231	IL4 x IL13	5	3	5	0	n.p.	—	—	—
232	IL4 x IL13	5	5	5	0	0.6	24.9	8	70
233	IL4 x IL13	7	3	5	0	0.4	15.1	3	113
234	IL4 x IL13	7	5	5	0	1.3	30.7	3	122
235	IL4 x IL13	10	3	5	0	0.1	11.3	2	82
236	IL4 x IL13	10	5	5	0	0.4	18.6	11	112
237	IL4 x IL13	5	3	5	2	2.1	45.3	8.1	101.0
238	IL4 x IL13	5	5	5	2	0.6	45.4	9.3	67.2
239	IL4 x IL13	7	3	5	2	n.p.	—	—	—
240	IL4 x IL13	7	5	5	2	1.6	31.7	4	65
241	IL4 x IL13	10	3	5	2	0.2	14.7	7	119
242	IL4 x IL13	10	5	5	2	1.1	17.6	10	37
243	IL4 x IL13	3	6	6	0	1.6	54.3	5	50
244	IL4 x IL13	3	10	6	0	1.5	63.9	10	10
245	IL4 x IL13	3	14	6	0	1.0	61.5	10	69
246	IL4 x IL13	6	6	6	0	1.1	16.2	6	57
247	IL4 x IL13	6	10	6	0	4.7	27.9	2	41
248	IL4 x IL13	6	14	6	0	0.9	18.1	10	79
249	IL4 x IL13	10	6	6	0	0.3	8.7	3	87
250	IL4 x IL13	10	8	6	0	0.7	21.3	8	53
251	IL4 x IL13	12	6	6	0	1.3	9.7	8	70
252	IL4 x IL13	12	8	6	0	1.3	11.7	7	85
253	IL4 x IL13	3	6	6	2	5.1	66.8	6	66
254	IL4 x IL13	3	10	6	2	2.4	62.4	6	80
255	IL4 x IL13	3	14	6	2	2.0	72.1	2	60
256	IL4 x IL13	6	6	6	2	2.0	32.4	4	81
257	IL4 x IL13	6	10	6	2	1.9	29.8	7	30
258	IL4 x IL13	6	14	6	2	2.5	24.6	5	70
259	IL4 x IL13	10	6	6	2	1.4	16.4	8	71
260	IL4 x IL13	10	8	6	2	0.8	16.6	10	71
261	IL4 x IL13	12	6	6	2	1.2	12.3	5	265
262	IL4 x IL13	12	8	6	2	1.1	13.2	4	111
263	IL4 x IL13	10	6	8	0	2.4	10.8	2	74
264	IL4 x IL13	10	8	8	0	0.8	8.0	7	22
265	IL4 x IL13	12	6	8	0	1.0	9.5	8	66
266	IL4 x IL13	12	8	8	0	2.0	9.3	3	69
267	IL4 x IL13	10	6	8	2	1.4	15.0	9	170
268	IL4 x IL13	10	8	8	2	1.0	12.9	4	52
269	IL4 x IL13	12	6	8	2	1.2	8.8	5	66
270	IL4 x IL13	12	8	8	2	2.4	11.7	3	72

* 對準在輕鏈上必須是 IL13V_L-L1-IL4V_L-L2-C_{L1}

從表 7 和表 8 之結果清楚顯示，連結子需要位於變異區域和不變區域間，以允許最理想的摺疊。只有在少數的排列為可容忍等於

零的連結子（參見批次 ID Nos. 103-105，其中 L1（LC）為零，以及批次 No. 210，其中 L4 為零）。然而，在每個實例中，在其他鏈上變異區和不變區間的對應轉變連結子不能為零。

上述結果指出，結合體 L1=7、L2=5、L3=1 和 L4=2 係為良好的起始點來最佳化一新的 CODV-Ig，其中重鏈係為樣板。表 9 中的範圍顯示，可從二個親本抗體中成功設計出一新的 CODV-Ig 的合理範圍。

表 9. LC 或 HC 作為樣板的連結子尺寸範圍

連結子	LC 作為樣板		HC 作為樣板	
	最大範圍	最小範圍	最大範圍	最小範圍
L1	1-3	1-2	3-12	5-10
L2	1-4	1-2	3-14	5-8
L3	2-15	4-12	1-8	1-5
L4	2-15	2-12	1-3	1-2

實例 8. CODV-Ig 形式的一般適用性

為了評估適合的 CODV-Ig 形式來設計新的類抗體結合蛋白，來自許多現存人類和人源化抗體的變異區具有特異性提供類胰島素生長因素 1 受體（IGF1R（1））、第二抗體至類胰島素生長因素 1 受體（IGF1R（2））、人類表皮生長因素受體 2（HER2）、表皮生長因素受體（EGFR）、腫瘤壞疽因素- α （TNF α ）、介白素 12 和 23（IL-12/23）和介白素 1 β （IL-1 β ）結合至 CODV-Ig 形式（參見表 10）。

表 10. 使用於雙特異性 CODV-Ig 的重和輕鏈之描述編號

編號*	重鏈（N 至 C 端）	SEQ ID NO:
HC10	IGF1R（1）V _H -（Gly）-HER2 V _H -（Gly2）-C _{H1} -Fc	32
HC11	HER2 V _H -（Gly）-IGF1R（1）V _H -（Gly2）-C _{H1} -Fc	33
HC12	IGF1R（2）V _H -（Gly）-EGFR V _H -（Gly2）-C _{H1} -Fc	34
HC13	EGFR V _H -（Gly）-IGF1R（2）V _H -（Gly2）-C _{H1} -Fc	35

HC14	TNF α V _H - (Gly) -IL12/23 V _H - (Gly2) - C _{H1} -Fc	36
HC15	IL12/23 V _H - (Gly) -TNF α V _H - (Gly2) - C _{H1} -Fc	37
HC16	TNF α V _H - (Gly) -IL1 β V _H - (Gly2) - C _{H1} -Fc	38
HC17	IL1 β V _H - (Gly) -TNF α V _H - (Gly2) - C _{H1} -Fc	39
編號*	輕鏈 (N 至 C 端)	
LC10	HER2 V _L - (Gly7) -IGF1R (1) V _L - (Gly5) -C _{L1}	40
LC11	IGF1R (1) V _L - (Gly7) - HER2 V _L - (Gly5) - C _{L1}	41
LC12	EGFR V _L - (Gly7) -IGF1R (2) V _L - (Gly5) -C _{L1}	42
LC13	IGF1R (2) V _L - (Gly7) - EGFR V _L - (Gly5) - C _{L1}	43
LC14	IL12/23 V _L - (Gly7) - TNF α V _L - (Gly5) -C _{L1}	44
LC15	TNF α V _L - (Gly7) - IL12/23 V _L - (Gly5) - C _{L1}	45
LC16	IL1 β V _L - (Gly7) - TNF α V _L - (Gly5) -C _{L1}	46
LC17	TNF α V _L - (Gly7) - IL1 β V _L - (Gly5) -C _{L1}	47
C _{L1}	C _{L1} 人類輕鏈不變區域	23
C _{H1} -Fc	C _{H1} 人類重鏈不變區域和 Fc 區	24
Gly4	胜肽連結子具 4 個甘胺酸 (GGGG)	25
Gly5	胜肽連結子具 5 個甘胺酸 (GGGGG)	26
Gly6	胜肽連結子具 6 個甘胺酸 (GGGGGG)	27
Gly7	胜肽連結子具 7 個甘胺酸 (GGGGGGG)	28
Gly8	胜肽連結子具 8 個甘胺酸 (GGGG GGGG)	29

*簡短手編號設計為代表關聯的結構。以 HC 開始的編號代表相鄰的重鏈，且以 LC 開始的編號代表相鄰的輕鏈。

已知人類和人源化抗體的抗體變異區係用來測試在設計之雙特異性類抗體結合蛋白的 CODV-Ig 形式之一般適用性。另外，關於特定抗體變異區域配置的位置效應的可能性，要檢查 N-末端或 C-末端位在重鏈或輕鏈上。基於具有 L1= 7、L2= 5、L3= 1 和 L4=2 的連結子組成物的 CODV-Ig 分子設計，抗體的不同序列係導入至 CODV-Ig 形式。如表 11 所示，所有構築體顯示出良好到優秀的蛋白產量和可接收的聚集級別(參見，尤其是，表 11 中的批次 ID Nos. 301 和 302)。每一抗體變異區域測量到的親和力係落入已公開或預期的親和力。在評估親和力的任何實例，沒有位置效應被偵測到。

表 11. 雙特異性類抗體結合蛋白一般所使用之 CODV-Ig 形式

批次 ID DC/LC 編號 ¹	對準在 HC	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚 集 [%]	KD (抗 原 1) [pM]	KD (抗 原 2) [pM]	IC50 [pM] TNFa 細胞 試驗
301 HC10/LC10	IGF1R (1) x HER2	7	5	1	2	70	5.9	n.m.	(HER2)	—
302 HC11/LC11	HER2 x IGF1R (1)	7	5	1	2	60	1.8	(HER2)	n.m.	—
303 HC12/LC12	IGF1R (2) x EGFR	7	5	1	2	17	2.7	n.m.	(EGFR)	—
304 HC13/LC13	EGFR x IGF1R (2)	7	5	1	2	9.5	4.3	(EGFR)	n.m.	—
305 HC14/LC14	TNFa x IL12/23	7	5	1	2	7.1	7.5	321 (TNFa)	65 (IL23)	95
306 HC15/LC15	IL12/23 x TNFa	7	5	1	2	11.9	7.1	118 (IL23)	543 (TNFa)	138
307 HC16/LC16	TNFa x IL1b	7	5	1	2	6.6	13.6	340 (TNFa)	155 (IL1b)	136
308 HC17/LC17	ILb x TNFa	7	5	1	2	2.4	5.7	97.5 (IL1b)	358 (TNFa)	138

*n.m.= 未以 Biacore 測量。

¹ - 重鏈和輕鏈相當於可以在表 10 發現的編號。

總之，如下表所示，沒有位置效應被視為與任何的抗體變異區域使用，或是與這些抗體變異區域在任一抗體鏈上的使用。

實例 9. 保留在 CODV-Ig 形式的親本抗體親和力

抗-IL4 和抗-IL13 的同一抗體序列係結合至 TBTI/DVD-Ig 或 CODV-Ig 形式，以與這些組態直接比較其連結子所在位置和產生分子的親和力。如圖 7 所示，每一抗體的親本親和力係保持在 CODV 形式。如圖 7 的上圖所示，當變異區設置於 TBTI/DVD-Ig 形式，定位在內部 Fv2 位置的 IL4 抗體的親和力，表明抗體結合至抗原的結合速率的減少。相反地，相較於親本抗體，CODV-Ig 形式無親和力的損失（參見圖 7，下圖）。

實例 10. CODV-Ig 至 Fab 形式的適應性

接著評估形式提供片段，例如 Fab 片段的能力。可以觀察到直接的優點是，在 CODV 位向的類 Fab 分子顯示無聚集的傾向並保留親本抗體的親和力（參見表 12）。自批次 ID Nos. 401-421 開始建構的結合蛋白係直接比較於類抗體蛋白，其中，抗體變異區與重鏈排列在 CODV-Ig 分子，如同樣板（401、402、406 和 407）、CODV 類 Fab 片段（402、408、413、418 和 421）、四區域類抗體分子在 TBTI/DVD-Ig 形式（404、409、414 和 419）以及無連結子之 CODV-Ig（405、410、415 和 420）。如表 12 所示，比較結果指出，當變異區結合至一 TBTI 或 DVD-Ig 形式時，相較於親本抗體，可能有更多的親和力損失。相

反地。CODV-Ig 和 CODV-Ig 類 Fab 形式二者較能維持親本的親和力。這些結果更可確認，CODV-Ig 分子需要連結子在變異區之間以及在變異區和不變區域之間（參見表 12）。

表 12. 類 Fab 片段所使用的 CODV-Ig 形式

批次 ID	樣品-ID	形式	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚集 [%]	KD (抗原 1) [pM]	KD (抗原 2) [pM]	IC50 [pM] TNFa 細胞試驗
401	TNFa x IL12/23	CODV-Ig	7	5	1	2	7.1	7.5	321 (TNFa)	90 (IL23)	95
402	IL12/23 x TNFa	CODV-Ig	7	5	1	2	11.9	7.1	118 (IL23)	543 (TNFa)	138
403	TNFa x IL12/23	CODV-Fab	7	5	1	2	18.7	1.7	232 (TNFa)	41 (IL23)	785
404	TNFa x IL12/23	TBTI	(G4S) 2	0	(G4S) 2	0	26.0	8.7	219 (TNFa)	399 (IL23)	-
405	TNFa x IL12/23	CODV-Ig	0	0	0	0	3.5	71	-	-	-
406	ILb x TNFa	CODV-Ig	7	5	1	2	2.4	5.7	98 (IL1b)	358 (TNFa)	139
407	TNFa x IL1b	CODV-Ig	7	5	1	2	6.6	13.6	340 (TNFa)	155 (IL1b)	122
408	ILb x TNFa	CODV-Fab	7	5	1	2	8.6	0	179 (IL1b)	-	-
409	ILb x TNFa	TBTI	(G4S) 2	0	(G4S) 2	0	1.3	40.5	133 (IL1b)	456 (TNFa)	-
410	TNFa x ILb	CODV-Ig	0	0	0	0	n.p.	-	-	-	-
411	EGFR x IGF1R (2)	CODV-Ig	7	5	1	2	9.5	4.3	124nM (EGFR)	n.m.	-
412	IGF1R (2) x EGFR	CODV-Ig	7	5	1	2	17	2.7	n.m.	-	-
413	EGFR x IGF1R (2)	CODV-Fab	7	5	1	2	13.3	0	42nM (EGFR)	n.m.	-
414	EGFR x IGF1R (2)	TBTI	(G4S) 2	0	(G4S) 2	0	2.1	2.9	7nM (EGFR)	n.m.	-
415	EGFR x IGF1R (2)	CODV-Ig	0	0	0	0	4.4	100	-	-	-
416	HER2 x IGF1R (1)	CODV-Ig	7	5	1	2	60.0	1.8	163 (HER2)	n.m.	-
417	IGF1R (1) x HER2	CODV-Ig	7	5	1	2	70	5.9	n.m.	41 (HER2)	-
418	HER2 x IGF1R (1)	CODV-Fab	7	5	1	2	34.4	0	190 (HER2)	n.m.	-
419	HER2 x IGF1R (1)	TBTI	(G4S) 2	0	(G4S) 2	0	6.3	6.8	56 (HER2)	n.m.	-
420	IGF1R (1) x HER2	CODV-Ig	0	0	0	0	0.35	54.5	-	-	-
421	IL4 x IL13	CODV-Fab	7	5	1	2	8.7	14	12 (IL4)	48 (IL13)	-

實例 11. 在 CODV-Ig 和 CODV-Fab 內變異區域的取代

為了特徵化 T-細胞接合方法中之 CODV 形式，具有 TCR 結合位置 (CD3 ϵ) 和 CD19 結合位置的雙特異性 CODV 類 Fab 結合蛋白 (CODV-Fab) 產生，並比較於一來自 TBTI/DVD-Ig 形式的雙特異性 Fab (B-Fab)。為了研究結合位置 (TCR x CD19 對 CD19 x TCR) 位向的重要性，每一結合蛋白的二個位向皆要評估。

結合蛋白的特徵化係在細胞毒素試驗中進行，係使用 NALM-6 (CD19 表現) 細胞作為目標細胞以及主要人類 T-細胞作為作用體細胞。CD3 正細胞係自最近製備的人類 PBMC's 分離。作用體和目標細胞以 10:1 的比率混合，並與雙特異性結合蛋白的指示濃度培養 20 小時 (參見圖 8)。凋亡目標細胞係以使用 7-氨基放線菌素染色之基於 FACS 試驗來決定。

在組態 CD3-CD19 (1060) 中的 B-Fab 形式係顯示主動引誘 T-細胞傳達細胞毒性至 NALM-6 細胞具有 3.7 ng/ml 的 EC50。一相似的高活性觀察自 CD19-CD3 CODV-Fab (1109) 具有 3.2 ng/ml 的 EC50 (參見圖 8)。

B-Fab 分子 (TBTI / DVD-Ig 形式的 Fab) 至 CD19-CD3 位向的組態交換產生活性的重大損失 (參見圖 8)。對於 CODV-Ig Fab 的位向和 B-Fab 的另一位向，交換 B-Fab 分子顯示在濃度最高時無活性。對於 CODV-Ig Fabs 和 B-Fab 的一位向，發現到最大反應 (於 1 和 100 ng/ml 的範圍內)。對於 B-Fab 的 CD19-CD3 位向，甚至是在最大濃度 (30 μ g/ml)，無法達到最理想的細胞毒素反應。在鮮明的對比下，在

CODV-Fab 至 CD3-CD19 (1108) 內區域的位向變化，在此試驗中，產生具有顯著活性的分子（參見圖 8）。雖然在 CODV-Fab CODV-Fab 的區域交換亦可減少 T-細胞傳達細胞毒性(藉由因素 ~100 增加 EC50) 的誘導，此效應是遠遠低於在 B-Fab 形式中所看見者，且分子可能誘導細胞毒性上升至最大級別。這些資料為代表性，且自三個獨立實驗中取得。

實例 12. 胺基酸序列本身對 CODV-Ig 連結子的影響

選擇對應於批次 ID 204 (參見實例 7 和表 8) 的最佳化構築體，以研究連結子組成物對連結子 L1 至 L4 的影響。連結子長度上設定在 7、5、1 和 2 個殘基長度分別對應 L1、L2、L3 和 L4 (參見表 13)。測試序列係來自自然抗體 V_H 和 C_{H1} 區域之間或是 κ 或 λ 輕鏈上的抗體 F_V 和 C_L 區域之間的自然存在連結子轉變。候選序列係為來自 V_H 和 C_{H1} 區域轉變的 ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)，分別來自 κ 或 λ 輕鏈上的 F_V 和 C_L 區域轉變的 RTVAAPS (SEQ ID NO: 49) 和 GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)。再者，一構築體可以與任意連結子組成物產生，以顯示任何序列有可能使用於連結子 L1 至 L4。這連結子組成物之獲得可藉由任意分配胺基酸纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、酰胺酸、賴胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、天冬醯胺、穀胺醯胺、甘胺酸和脯胺酸之四連結子的 15 個位置。芳香族胺基酸苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸，和胺基酸甲硫胺酸和半胱胺酸則故意排除在外，以避免可能的聚集增加。

批次 ID No. 204 的三維模型構築體的產生是為了確保適當的或是提純這些連結子組成物的選擇。如此，為連結子 L3 選擇絲胺酸，正和負電荷殘基被觀察到在三維模型附近。選擇連結子 L4 內之殘基可相容於此模型建議這些位置的溶劑接觸。同樣地，預期或預測 L1 和 L2 的連結子組成物為沒問題的。選擇建議的連結子組成物之三維模型已建構完成。

如表 12 所示，連結子組成物可能對產量具有巨大影響。來自 L1 上的 λ 鏈的序列（比較批次 ID Nos. 505-507 和批次 ID Nos. 501-503）係為更多生產性的蛋白產生器（增加至 8 折疊）。當然，基於任意產生的連結子亦可產生十足的產量，如表 13 所示，批次 ID No. 508。因此，連結子組成物在 CODV-Ig 最佳化過程中應該是要考慮的一個參數。

表 13. 連結子組成份在 CODV-Ig 的影響

批 次 ID	對準在 HC	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚集 [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	IC50 細胞 試驗 IL4 [nM]	IC50 細胞 試驗 IL13 [nM]
501	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TKGPS (SEQ ID NO: 52)	S	RT	10.8	1.2	1	55	0.034	4.5
502	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	QP	15.8	2.9	3	61	0.049	2.4
503	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	SS	11.6	3.5	3	52	0.047	2.1
504	IL4 x IL13	RTVAAPS (SEQ ID NO: 49)	QPKAA (SEQ ID NO: 54)	S	TK	15	1.9	8	71	0.042	1.4
505	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	TKGPS (SEQ ID NO: 52)	S	RT	71.7	1.9	6	68	0.033	0.9
506	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	TK	49.3	1.7	7	55	0.045	1.8
507	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	QPKAA (SEQ ID NO: 54)	S	RT	62.4	2	1	69	0.040	2.0
508	IL4 x IL13	HIDSPNK (SEQ ID NO: 51)	QRIEG (SEQ ID NO: 55)	V	SL	37.7	2.1	1	44	0.054	1.3

實例 13. 引進半胱胺酸至 CODV-Ig 連結子

公開文獻建議，抗體和來自抗體蛋白的穩定性可利用引進非自然雙硫架來增加(參見 Wozniak-Knopp 等人, 2012, “Stabilisation of the Fc Fragment of Human IgG1 by Engineered Intradomain Disulfide Bonds,” *PLoS ONE* 7(1): e30083)。為了調查相等的 Fc 片段是否來自人類 IgG1 抗體，且設計成一 CODV-Ig 分子可藉由引進中間鏈和內部鏈雙硫架橋來穩定，建構批次 ID No. 204（來自實例 7）的相等的 Fc 位置係突變至半胱胺酸殘基，且此突變蛋白係被過度生產、純化和特徵化（參見表 14）。

如表 14 所示，每一突變的 CODV-Ig 分子包含附加的半胱胺酸殘基，其係具有熔解溫度，此與 CODV-Ig 建構批次 ID No. 204 的熔解溫度相同。

另外，二個半胱胺酸同時導入至每一變異區域上的輕鏈 κ 位置 100 和重鏈 κ 位置 44，描述在 Brinkmann 等人, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7538-42。這些位置已顯示結構上的保存在抗體折疊內，且因而可容許半胱胺酸取代而不會干擾個別區域的完整。

如表 15 所示，CODV 和 CODV-Ig 構築體，其中半胱胺酸殘基係導入至至每一變異區域上的輕鏈 κ 位置 100 和重鏈 κ 位置 44，係比半胱胺酸殘基無導入至這些位置的 CODV 和 CODV-Ig 構築體具有更高的熔解溫度（參見，例如，批次 ID Nos. 704 和 706 以及批次 ID Nos. 713 和 714）。

1. CODV 和 TBTI 變異體的熱穩定性測量

CODV 和 TBTI 變異體的熔點 (T_m) 係使用微差掃描螢光分析 (DSF) 來測定。樣品係在 D-PBS 緩衝液 (Invitrogen) 中稀釋至 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的最終濃度，並加入 $2 \mu\text{l}$ 的 40 倍 SYPRO-橙色染料 (Invitrogen) 的濃縮溶液在白色半裙邊 96 孔培養盤內的 D-PBS 中。所有測量的進行都是完全一樣地使用一 MyiQ2 即時 PCR 儀器

表 14. 雙硫架橋穩定性在 CODV-Ig 的影響

批 次 ID	對準在 HC	導入 突變 IGHG1	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚 集 [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	IC50 細胞 試驗 IL4 [nM]	IC50 細胞 試驗 IL13 [nM]	Tm [°C]
601	IL4 x IL13	P344C & A432C	7	5	1	2	21.6	0.9	n.d.	n.d.	0.032	1.7	64
602	IL4 x IL13	S376C & P397C	7	5	1	2	13.9	0.8	10	100	0.034	1.5	64
603	IL4 x IL13	P446G447 至 G446E447C448	7	5	1	2	15.7	1.3	4	64	0.036	1.4	64

表 15. 雙硫架橋穩定性在 CODV-Ig 的影響

批次 ID	對準在 HC	形式	導入突變 LC	導入突變 HC	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚集 [%]	KD (抗原 1) [pM]	KD (抗原 2) [pM]	Tm [°C]
701	IL13 x IL4	TBTI	-	-	10	0	10	0	-	-	-	-	64
702	IL4 x IL13	TBTI	G100C & G100C	G44C & G44C	10	0	10	0	-	32	-	-	71
703	IL13 x IL4	TBTI	G100C & G100C	G44C & G44C	10	0	10	0	-	24.8	-	-	67
704	IL13 x IL4	CODV	-	-	7	5	1	2	15.3	5.2	3	25	78
705	IL13 x IL4	CODV	G100C & G100C	G44C & G44C	7	5	1	2	-	-	-	-	n.d.
706	IL4 x IL13	CODV	G100C & G100C	G44C & G44C	7	5	1	2	3.2	17.7	8	61	68
707	HER2	mAb	-	-	-	-	-	-	-	0.0	-	-	-
708	EGFR	mAb	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-
709	HER2	mAb	Q100C	G44C	-	-	-	-	-	1.4	-	-	-
710	EGFR	mAb	G100C	G44C	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-
711	EGFR x HER2	TBTI	G100C & Q100C	G44C & G44C	10	0	10	0	-	2.0	-	-	-
712	EGFR x HER2	CODV	G100C & Q100C	G44C & G44C	7	5	1	2	-	7.9	-	-	-
713	IGF1R (1) x HER2	CODV-Ig	-	-	7	5	1	2	60	1.8	163 (HER2)	-	64
714	IGF1R (1) x HER2	CODV-Ig	G100C & Q100C	G44C & G44C	7	5	1	2	3.4	7.9	362 (HER2)	-	68

(Biorad)。使用 iQ5 軟體 v2.1 自熔解曲線的負第一衍生物中取出 T_m 值。

接著調查直接引進半胱胺酸殘基至連結子或變異區內的影響。在這實例中，使用批次 ID No. 204 (來自實例 7 和表 8) 作為模型 CODV-Ig 結合蛋白，且半胱胺酸係取代在 L1、L3 或是基於三維模型的變異區上的甘胺酸。如下面表 16 所示，這些結果指出，半胱胺酸對的引進將會如何影響產量和聚集。所有設想的突變將被模型化，以確定雙硫鍵適當的形成，且對於在模型中連結子和其環境維持正確的幾何形狀。然而，批次 ID No. 808 顯示良好的產量和少量的聚集，因此建議可以形成有適當的半胱胺酸架橋。

本發明所描述之各種實施例，熟習此項技藝之人士當可輕易變化或修飾。因此，凡依本發明所揭示之內容所作之均等變化，仍應涵蓋在本發明請求之範圍內。另外，在此使用之部份標題僅係作為組織上的目的說明，並非用來解釋為所述主題的限制。

在本說明書中所有引用的參考係明確地納入本文參考中。

表 16A. 雙硫架橋穩定性在 CODV-Ig 的影響

批次 ID	對準在 HC	導入突變 LC	導入突變 HC	L1	L2	L3	L4	產量 [mg/L]	聚集 [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	Tm
801	IL4 x IL13			7	5	1	2	15.3	5.2	3	25	64
802	IL4 x IL13	G114C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 56)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	3.0	11.3	6	34	64
803	IL4 x IL13	G115C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 57)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	4.0	9.4	6	20	63
804	IL4 x IL13	G116C	Q43C	GGGCGG (SEQ ID NO: 58)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	11.1	9.6	2	33	64
805	IL4 x IL13	G117C	Q43C	GGGCGG (SEQ ID NO: 59)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	5.8	10.6	7	45	64
806	IL4 x IL13	S60C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	n.p.	--	--	--	--
807	IL4 x IL13	S60C	S123C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	7.5	27.9	2	202	66
808	IL4 x IL13	S60C	G124C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	C	GG	1.1	5.8	5	70	64
809	IL4 x IL13	G61C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	8.7	6.9	6	81	65

表 16B. 雙硫架橋穩定性在 CODV-Ig 的影響

批次 ID	對準在 HC	導入突變 LC	導入突變 HC	L1	L2	L3	L4	IC50 細胞試驗 IL4 [nM]	IC50 細胞試驗 IL13 [nM]
801	IL4 x IL13			7	5	1	2	0.045	1.8
802	IL4 x IL13	G114C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 56)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0.027	1.2
803	IL4 x IL13	G115C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 57)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0.036	1.5
804	IL4 x IL13	G116C	Q43C	GGCGGG (SEQ ID NO: 58)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0.040	1.8
805	IL4 x IL13	G117C	Q43C	GGGGCG (SEQ ID NO: 59)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0.047	1.9
806	IL4 x IL13	S60C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	–	–
807	IL4 x IL13	S60C	S123C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0.048	10.1
808	IL4 x IL13	S60C	G124C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	C	GG	0.023	3.8
809	IL4 x IL13	G61C	S122C	GGGGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0.035	2.8

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> Rao, Ercole
Mikol, Vincent
Corvey, Carsten
Beil, Christian
Lange, Christian
Steinmetz, Anke
Baurin, Nicolas
Li, Danxi

<120> 具有交叉結合區位向之雙變異區類抗體結合蛋白

<130> US2011/026

<140> TBD

<141> 2011-03-11

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自抗-IL4 的人源化抗體輕鏈 (VL)

<400> 1

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 來自抗-IL4 抗體的人源化重鏈 V 區 (VH)

<400> 2

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

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自抗-IL13 抗體的人源化輕鏈 V 區 (VL)

<400> 3

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 4
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自抗-IL-13 抗體的人源化重鏈 V 區 (VH)

<400> 4

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

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

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 575
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 交叉雙頭建構 IL13 (G4S) IL4CHFc 的重鏈

<400> 5

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
 115 120 125
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
 130 135 140
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile
 145 150 155 160
 Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro
 165 170 175
 Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr
 180 185 190
 Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser
 195 200 205
 Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu
 210 215 220
 Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 245 250 255

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 260 265 270
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 275 280 285
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 290 295 300
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 305 310 315 320
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 325 330 335
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 340 345 350
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 355 360 365
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 370 375 380
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 385 390 395 400
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 405 410 415
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 420 425 430
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 435 440 445
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 450 455 460
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 465 470 475 480
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 485 490 495
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 500 505 510

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
515 520 525

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
530 535 540

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
545 550 555 560

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

<210> 6
<211> 580
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 交叉雙頭建構 IL13 (G4S2) IL4CHFc 的重鏈

<400> 6

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

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

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
145 150 155 160

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 180 185 190
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 225 230 235 240
 Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 260 265 270
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 275 280 285
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 290 295 300
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 305 310 315 320
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 325 330 335
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 340 345 350
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 355 360 365
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 370 375 380
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 385 390 395 400
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 405 410 415

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
420 425 430

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
435 440 445

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
450 455 460

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
465 470 475 480

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
485 490 495

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
500 505 510

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
515 520 525

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
530 535 540

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
545 550 555 560

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
565 570 575

Leu Ser Pro Gly
580

<210> 7
<211> 698
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 交叉雙頭建構 IL4 (G4S) IL13CHFc 的重鏈

<400> 7

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

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 130 135 140
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
 145 150 155 160
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 165 170 175
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 180 185 190
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 195 200 205
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu
 245 250 255
 Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly
 275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr
290 295 300

Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu
305 310 315 320

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp
325 330 335

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp
340 345 350

Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
355 360 365

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
370 375 380

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
385 390 395 400

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
405 410 415

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
420 425 430

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
435 440 445

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
450 455 460

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
465 470 475 480

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
485 490 495

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
500 505 510

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
545 550 555 560

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
565 570 575

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
690 695

<210> 8
<211> 703
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 交叉雙頭建構 IL4 (G4S2) IL13CHFc 的重鏈

<400> 8

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

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val
			100					105					110		
Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu
	130					135					140				
Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe
145					150					155					160
Ser	Leu	Thr	Asp	Ser	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
				165					170					175	
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Met	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Arg	Ile	Asp	Tyr
			180					185					190		
Ala	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys
		195					200					205			
Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Glu	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala
	210					215					220				
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Ala	Met	Asp	Phe
225					230					235					240
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln
				245					250					255	
Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser
			260					265					270		
Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	His	Trp	Ile
		275					280					285			
Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Met	Ile	Asp	Pro
	290					295					300				
Ser	Asp	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Asn	Gln	Arg	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr
305					310					315					320

Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser
 325 330 335
 Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu
 340 345 350
 Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 355 360 365
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 370 375 380
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 385 390 395 400
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 405 410 415
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 435 440 445
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 450 455 460
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 465 470 475 480
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 485 490 495
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 500 505 510
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 515 520 525
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 530 535 540
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 545 550 555 560
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 565 570 575

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
580 585 590

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
595 600 605

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
610 615 620

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
625 630 635 640

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
645 650 655

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
660 665 670

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
675 680 685

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
690 695 700

<210> 9

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 交叉雙頭建構 IL13 (G4S) IL4CL 的輕鏈

<400> 9

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
115 120 125

Val Ser Val Gly Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn
130 135 140

Ile Asp Val Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro
145 150 155 160

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser
165 170 175

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser
180 185 190

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His
195 200 205

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215 220

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
225 230 235 240

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
245 250 255

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
260 265 270

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
275 280 285

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
290 295 300

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
305 310 315 320

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 10
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 交叉雙頭建構 IL13(G4S2) IL4CL 的輕鏈

<400> 10

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
 85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 115 120 125

Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys
 130 135 140

His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys
 145 150 155 160

Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His
 165 170 175

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe
 180 185 190

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
 195 200 205

Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 210 215 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225 230 235 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
245 250 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
260 265 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
275 280 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
290 295 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330 335

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 交叉雙頭建構 IL4 (G4S) IL13CL 的輕鏈

<400> 11

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 115 120 125
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 130 135 140
 Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 165 170 175
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 180 185 190
 Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
 195 200 205
 Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215 220
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 225 230 235 240
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 260 265 270
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 275 280 285
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 290 295 300
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 305 310 315 320
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 12
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 交叉雙頭建構 IL4 (G4S2) IL13CL 的輕鏈

<400> 12

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
115 120 125

Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
130 135 140

Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
145 150 155 160

Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
165 170 175

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
180 185 190

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
195 200 205

Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
210 215 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225 230 235 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
245 250 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
260 265 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
275 280 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
290 295 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330 335

<210> 13
<211> 583
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HCl 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列
<400> 13

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

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

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu

115					120					125					
Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile
130					135					140					
Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	His	Trp
145					150					155					160
Ile	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Met	Ile	Asp
				165					170					175	
Pro	Ser	Asp	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Asn	Gln	Arg	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala
			180					185					190		
Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Arg
		195					200					205			
Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Leu	Lys
	210					215					220				
Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly
225					230					235					240
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser
				245					250					255	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
			260					265					270		
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
		275					280					285			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
	290					295					300				
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
305					310					315					320
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
				325					330					335	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
			340					345					350		
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
		355					360					365			
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro

370	375	380
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
385	390	395 400
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
	405	410 415
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
	420	425 430
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
	435	440 445
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
	450	455 460
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
	465	470 475 480
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
	485	490 495
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	500	505 510
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	515	520 525
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
	530	535 540
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
	545	550 555 560
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	565	570 575
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	580	

<210> 14
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有編碼 HC2 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 14

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu
 115 120 125
 Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
 130 135 140
 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp
 145 150 155 160
 Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp
 165 170 175
 Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala
 180 185 190
 Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg
 195 200 205
 Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys
 210 215 220
 Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
260 265 270

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
275 280 285

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
290 295 300

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
305 310 315 320

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
325 330 335

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
340 345 350

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
355 360 365

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
370 375 380

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
385 390 395 400

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
405 410 415

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
420 425 430

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
435 440 445

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
450 455 460

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
465 470 475 480

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
485 490 495

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
500 505 510

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
515 520 525

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
530 535 540

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
545 550 555 560

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
565 570 575

Leu Ser Pro Gly
580

<210> 15
<211> 579
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC3 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 15

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

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

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala

130		135		140
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg				
145		150	155	160
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly				
	165	170	175	
Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val				
	180	185	190	
Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser				
	195	200	205	
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn				
	210	215	220	
Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr				
	225	230	235	240
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro				
	245	250	255	
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr				
	260	265	270	
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr				
	275	280	285	
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro				
	290	295	300	
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr				
	305	310	315	320
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn				
	325	330	335	
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser				
	340	345	350	
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu				
	355	360	365	
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu				
	370	375	380	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser				

385 390 395 400
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 405 410 415
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 420 425 430
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 435 440 445
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 450 455 460
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 465 470 475 480
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 485 490 495
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 500 505 510
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 515 520 525
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 530 535 540
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 545 550 555 560
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 565 570 575
 Ser Pro Gly

<210> 16
 <211> 576
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有編碼 HC4 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 16

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

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

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly
165 170 175

Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val
180 185 190

Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser
195 200 205

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn
210 215 220

Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
355 360 365

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
370 375 380

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

<210> 17
<211> 581
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC5 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 17

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

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

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln
115 120 125

Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys
130 135 140

Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys
145 150 155 160

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser

420	425	430
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
435	440	445
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
450	455	460
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
465	470	475
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
	485	490
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
	500	505
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
	515	520
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	530	535
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	545	550
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	565	570
Ser Leu Ser Pro Gly		
	580	
<210> 18		
<211> 578		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 具有編碼 HC6 的交叉雙 V-Ig 之重鏈		
<400> 18		
Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser		
	20	25
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu		
	35	40
		45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln
 115 120 125
 Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys
 130 135 140
 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys
 145 150 155 160
 Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser
 165 170 175
 Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro
 195 200 205
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr
 210 215 220
 Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 260 265 270
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 275 280 285
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 290 295 300

Val 305	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly 310	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 315	Ser	Val	Val	Thr	Val 320
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu 325	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 330	Ile	Cys	Asn	Val	Asn 335	His
Lys	Pro	Ser	Asn 340	Thr	Lys	Val	Asp	Lys 345	Lys	Val	Glu	Pro	Lys 350	Ser	Cys
Asp	Lys	Thr 355	His	Thr	Cys	Pro	Pro 360	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 365	Leu	Leu	Gly
Gly	Pro 370	Ser	Val	Phe	Leu	Phe 375	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 380	Asp	Thr	Leu	Met
Ile 385	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu 390	Val	Thr	Cys	Val	Val 395	Val	Asp	Val	Ser	His 400
Glu	Asp	Pro	Glu	Val 405	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 410	Val	Asp	Gly	Val	Glu 415	Val
His	Asn	Ala	Lys 420	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 425	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser 430	Thr	Tyr
Arg	Val	Val 435	Ser	Val	Leu	Thr	Val 440	Leu	His	Gln	Asp	Trp 445	Leu	Asn	Gly
Lys	Glu 450	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 455	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu 460	Pro	Ala	Pro	Ile
Glu 465	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys 470	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro 475	Arg	Glu	Pro	Gln	Val 480
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro 485	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu 490	Thr	Lys	Asn	Gln	Val 495	Ser
Leu	Thr	Cys	Leu 500	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 505	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala 510	Val	Glu
Trp	Glu	Ser 515	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu 520	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr 525	Thr	Pro	Pro
Val 530	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser 535	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser 540	Lys	Leu	Thr	Val
Asp 545	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln 550	Gln	Gly	Asn	Val	Phe 555	Ser	Cys	Ser	Val	Met 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
565 570 575

Pro Gly

<210> 19
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC1 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 19

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Asp Ile
100 105 110

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
115 120 125

Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln
130 135 140

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val

```

<210>      20
<211>      326
<212>      PRT
<213>      人工序列

<220>
<223>      具有編碼 LC2 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400>      20

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
              20              25              30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
              35              40              45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
              50              55              60

```

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Asp Ile Val Leu
100 105 110

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
115 120 125

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr
130 135 140

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
145 150 155 160

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
165 170 175

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala
180 185 190

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
210 215 220

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
225 230 235 240

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
245 250 255

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
260 265 270

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
275 280 285

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
290 295 300

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
305 310 315 320

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 21
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC3 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 21

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Asp Ile
100 105 110

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
115 120 125

Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln
130 135 140

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val
180 185 190

Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp

195	200	205
Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg		
210	215	220
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
225	230	235
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
	245	250
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
	260	265
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	275	280
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	290	295
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
305	310	315
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	325	330
<210> 22		
<211> 328		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 具有編碼 LC4 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列		
<400> 22		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp		
	20	25
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
		80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Asp Ile Val Leu
 100 105 110
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 115 120 125
 Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr
 130 135 140
 Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 165 170 175
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala
 180 185 190
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val
 210 215 220
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 225 230 235 240
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 245 250 255
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 260 265 270
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 275 280 285
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 290 295 300
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 305 310 315 320
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 23

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 24
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24

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											
				325															

<210> 25

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有四甘胺酸殘基的胜肽連結子

<400> 25

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 5 甘胺酸胺基酸殘基的胜肽連結子

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 6 甘胺酸胺基酸殘基的胜肽連結子

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有七甘胺酸胺基酸殘基的胜肽連結子

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有八甘胺酸胺基酸殘基的胜肽連結子

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽連結子

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽連結子

<400> 31

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

<210> 32
<211> 582
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC10 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 32

Glu 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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	Ala	Pro	Leu	Arg	Phe	Leu	Glu	Trp	Ser	Thr	Gln	Asp	His	Tyr				
			100					105					110						
Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val				
		115					120					125							
Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln				
	130					135					140								
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile				
145					150				155						160				
Lys	Asp	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu				
				165					170					175					
Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala				
			180					185					190						
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn				
		195					200					205							
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val				
	210					215					220								
Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr				
225					230				235						240				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Thr				
				245					250					255					
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser				
			260					265					270						
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu				
		275					280					285							
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His				
						295					300								
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser				
305					310						315				320				
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys				
				325					330					335					
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu				

<210> 33

<211> 582
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC11 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 33

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 Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser
115 120 125

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe
165 170 175

Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
180 185 190

Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe
210 215 220

Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val
 225 230 235 240
 Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr
 245 250 255
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 260 265 270
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 275 280 285
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 290 295 300
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 305 310 315 320
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 325 330 335
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 340 345 350
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 355 360 365
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 370 375 380
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 385 390 395 400
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 405 410 415
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 420 425 430
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 435 440 445
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 450 455 460
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 465 470 475 480

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
485 490 495

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
580

<210> 34
<211> 571
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC12 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100					105					110					
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro
		115					120					125			
Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
	130					135					140				
Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln
145					150					155					160
Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly
				165					170					175	
Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val
			180					185					190		
Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Thr	Ala
		195					200					205			
Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Ser	Ile	Phe	Gly	Val
	210					215					220				
Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
225					230					235					240
Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
				245					250					255	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
			260					265					270		
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
		275					280					285			
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
		290				295					300				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
305					310					315				320	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
				325					330					335	
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
			340					345					350		
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe

355	360	365
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
370	375	380
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
385	390	395
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
405	410	415
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
420	425	430
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
435	440	445
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
450	455	460
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
465	470	475
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
485	490	495
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
500	505	510
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
515	520	525
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
530	535	540
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
545	550	555
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
565	570	

<210> 35
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有編碼 HC13 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Val Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Val Ser Ile Phe Gly Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg
 165 170 175
 Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 180 185 190
 Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 195 200 205
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr
 210 215 220
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
465 470 475 480

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

<210> 36
<211> 572
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC14 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln
115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
130 135 140

Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr Trp Leu Gly Trp Val Arg

145		150		155		160
Gln Met Pro Gly	Lys 165	Gly Leu Asp Trp	Ile 170	Gly Ile Met Ser	Pro 175	Val
Asp Ser Asp	Ile 180	Arg Tyr Ser Pro	Ser 185	Phe Gln Gly Gln	Val 190	Thr Met
Ser Val Asp	Lys 195	Ser Ile Thr Thr	Ala 200	Tyr Leu Gln Trp	Asn 205	Ser Leu
Lys Ala Ser Asp	Thr 210	Ala Met Tyr Tyr	Cys 215	Ala Arg Arg Arg	Pro 220	Gly
Gln Gly Tyr Phe	Asp 225	Phe Trp Gly Gln	Gly 230	Thr Leu Val Thr	Val 235	Ser 240
Ser Gly Gly Ala	Ser 245	Thr Lys Gly Pro	Ser 250	Val Phe Pro Leu	Ala 255	Pro
Ser Ser Lys Ser	Thr 260	Ser Gly Gly Thr	Ala 265	Ala Leu Gly Cys	Leu 270	Val
Lys Asp Tyr Phe	Pro 275	Glu Pro Val Thr	Val 280	Ser Trp Asn Ser	Gly 285	Ala
Leu Thr Ser Gly	Val 290	His Thr Phe Pro	Ala 295	Val Leu Gln Ser	Ser 300	Gly
Leu Tyr Ser Leu	Ser 305	Ser Val Val Thr	Val 310	Pro Ser Ser Ser	Leu 315	Gly 320
Thr Gln Thr Tyr	Ile 325	Cys Asn Val Asn	His 330	Lys Pro Ser Asn	Thr 335	Lys
Val Asp Lys Lys	Val 340	Glu Pro Lys Ser	Cys 345	Asp Lys Thr His	Thr 350	Cys
Pro Pro Cys Pro	Ala 355	Pro Glu Leu Leu	Gly 360	Gly Pro Ser Val	Phe 365	Leu
Phe Pro Pro Lys	Pro 370	Lys Asp Thr Leu	Met 375	Ile Ser Arg Thr	Pro 380	Glu
Val Thr Cys Val	Val 385	Val Asp Val Ser	His 390	Glu Asp Pro Glu	Val 395	Lys 400
Phe Asn Trp Tyr	Val 405	Asp Gly Val Glu	Val 410	His Asn Ala Lys	Thr 415	Lys

405410415

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

420425430

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

435440445

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

450455460

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

465470475480

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

485490495

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

500505510

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

515520525

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

530535540

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

545550555560

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

565570

<210> 37

<211> 572

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有編碼 HC15 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

151015

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr

202530

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile

354045

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly
165 170 175

His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr
210 215 220

Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
245 250 255

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
260 265 270

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
275 280 285

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
290 295 300

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 305 310 315 320
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 325 330 335
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 340 345 350
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 355 360 365
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 370 375 380
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 385 390 395 400
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 405 410 415
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 420 425 430
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 435 440 445
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 450 455 460
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 465 470 475 480
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 485 490 495
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 500 505 510
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 515 520 525
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 530 535 540
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 545 550 555 560

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

<210> 38
<211> 571
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 HC16 的交叉雙 V-Ig 之重鏈序列

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Glu
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg
145 150 155 160

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp
165 170 175

Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu

195					200					205					
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Leu	Arg	Thr
210					215					220					
Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
225					230					235					240
Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
				245					250					255	
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
			260					265					270		
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
		275					280					285			
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
	290					295					300				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
305					310					315					320
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
				325					330					335	
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
			340					345					350		
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
		355					360					365			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
		370				375					380				
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
385					390					395					400
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
				405					410					415	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
			420					425					430		
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
		435					440					445			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala

450 455 460
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 465 470 475 480
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 485 490 495
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 500 505 510
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 515 520 525
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 530 535 540
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 545 550 555 560
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570

 <210> 39
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 具有編碼 HC17 的交叉雙 V-Ig 之重鍵序列
 <400> 39

 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 Val Tyr
 20 25 30

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

 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln 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 Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His
165 170 175

Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
180 185 190

Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala
210 215 220

Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 355 360 365
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 370 375 380
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 385 390 395 400
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 405 410 415
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 420 425 430
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 435 440 445
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 450 455 460
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 465 470 475 480
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 485 490 495
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 500 505 510
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 515 520 525
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 530 535 540
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 545 550 555 560
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570

<210> 40
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有編碼 LC10 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 40

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	Asn	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	Arg	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	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu
		115					120					125			
Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr
	130					135					140				
Tyr	Ala	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Ile	Leu	Val
145					150					155					160
Ile	Tyr	Gly	Glu	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
				165					170					175	
Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln
			180					185					190		
Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Ser	Arg	Asp	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Gln	His	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
225					230					235					240
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
				245					250					255	

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 41
<211> 334
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC11 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 41

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

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

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
115 120 125

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 130 135 140

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 145 150 155 160

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 165 170 175

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 180 185 190

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
 195 200 205

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 42
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有編碼 LC12 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 42

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala 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	Tyr	20	25	30
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	35	40	45
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	65	70	75
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	85	90	95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Ala	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	100	105	110
Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	115	120	125
Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	130	135	140
Ser	Ser	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	145	150	155
Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	165	170	175
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	180	185	190
Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Ser	Arg	Leu	195	200	205
Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	210	215	220
Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	225	230	235
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	245	250	255
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	260	265	270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 43
<211> 333
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC13 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg Leu Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser
115 120 125

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
130 135 140

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 145 150 155 160
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 165 170 175
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 180 185 190
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Thr
 195 200 205
 Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 245 250 255
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 275 280 285
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 290 295 300
 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 305 310 315 320
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 44
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有編碼 LC14 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 44

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 Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 115 120 125
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg
 130 135 140
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 145 150 155 160
 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 165 170 175
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala
 195 200 205
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 245 250 255
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 45
<211> 333
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC15 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 45

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
115 120 125

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
130 135 140

Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
180 185 190

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr
195 200 205

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
225 230 235 240

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 46
<211> 333
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC16 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 46

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 115 120 125
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg
 130 135 140
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 145 150 155 160
 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 165 170 175
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala
 195 200 205
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 245 250 255
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 275 280 285
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 47
<211> 333
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有編碼 LC17 的交叉雙 V-Ig 之輕鏈序列

<400> 47

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

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

Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
130 135 140

Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu
145 150 155 160

Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
 180 185 190
 Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu
 195 200 205
 Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 245 250 255
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 275 280 285
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 290 295 300
 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 305 310 315 320
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胜肽連結子

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
1 5

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胜肽連結子

<400> 49

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽連結子

<400> 50

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽連結子

<400> 51

His Ile Asp Ser Pro Asn Lys
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽連結子

<400> 52

Thr Lys Gly Pro Ser
1 5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽連結子

<400> 53

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽連結子

<400> 54

Gln Pro Lys Ala Ala
1 5

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胜肽連結子

<400> 55

Gln Arg Ile Glu Gly
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽連結子

<400> 56

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽連結子

<400> 57

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽連結子

<400> 58

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽連結子

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5

專利申請案第 108110615 號
ROC Patent Appln. No. 108110615
修正部分無劃線之申請專利範圍中文本一附件(二)
Amended Claims in Chinese—Encl.(II)
(民國 110 年 5 月 27 送呈)
(Submitted on May 27 2021)

2021 年 5 月 27 日修正

申請專利範圍

1. 一種類抗體結合蛋白，其包含形成二個抗原結合位置之二個多胜肽鏈，其中第一多胜肽鏈包含 V_{L1} - L_1 - V_{L2} - L_2 - C_L 結構，以及第二多胜肽鏈包含 V_{H2} - L_3 - V_{H1} - L_4 - C_{H1} 結構，其中：
 - V_{L1} 係第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；
 - V_{L2} 係第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；
 - V_{H1} 係第一免疫球蛋白重鏈變異區域；
 - V_{H2} 係第二免疫球蛋白重鏈變異區域；
 - C_L 係免疫球蛋白輕鏈不變區域；
 - C_{H1} 係免疫球蛋白 C_{H1} 重鏈不變區域；及
 - L_1 、 L_2 、 L_3 、與 L_4 係胺基酸連結子，其中 L_1 、 L_2 、 L_3 、與 L_4 各包含一個或多個胺基酸殘基並提供第一多胜肽鏈和第二多胜肽鏈之變異區域足夠的遷移性 (mobility)，以摺疊成交叉雙變異區免疫球蛋白。
2. 一種類抗體結合蛋白，其包含形成四個抗原結合位置之四個多胜肽鏈，其中第一多胜肽鏈包含 V_{L1} - L_1 - V_{L2} - L_2 - C_L 結構，以及第二多胜肽鏈包含 V_{H2} - L_3 - V_{H1} - L_4 - C_{H1} -Fc 結構，其中：
 - V_{L1} 係第一免疫球蛋白輕鏈變異區域；
 - V_{L2} 係第二免疫球蛋白輕鏈變異區域；
 - V_{H1} 係第一免疫球蛋白重鏈變異區域；
 - V_{H2} 係第二免疫球蛋白重鏈變異區域；
 - C_L 係免疫球蛋白輕鏈不變區域；

2021 年 5 月 27 日修正

C_{H1}係免疫球蛋白C_{H1}重鏈不變區域；

Fc 係免疫球蛋白絞鏈區且C_{H2}、C_{H3}係免疫球蛋白重鏈不變區域；及

L₁、L₂、L₃、與L₄係胺基酸連結子，

其中L₁、L₂、L₃、與L₄各包含一個或多個胺基酸殘基並提供第一多胜肽鏈和第二多胜肽鏈之變異區域足夠的遷移性，以摺疊成交叉雙變異區免疫球蛋白。

3. 如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白，其中該結合蛋白可特異性結合一個或多個抗原目標。
4. 如請求項 3 之類抗體結合蛋白，其中該一個或多個抗原目標係選自由下列組成之群組：B7.1、B7.2、BAFF、BlyS、C3、C5、CCL11（嗜酸粒細胞趨化蛋白(eotaxin)）、CCL15（MIP-1d）、CCL17（TARC）、CCL19（MIP-3b）、CCL2（MCP-1）、CCL20（MIP-3a）、CCL21（MIP-2）、SLC、CCL24（MPIF-2/嗜酸粒細胞趨化蛋白-2）、CCL25（TECK）、CCL26（嗜酸粒細胞趨化蛋白-3）、CCL3（MIP-1a）、CCL4（MIP-1b）、CCL5（RANTES）、CCL7（MCP-3）、CCL8（mcp-2）、CD3、CD19、CD20、CD24、CD40、CD40L、CD80、CD86、CDH1（E-鈣黏蛋白(cadherin)）、幾丁質酶、CSF1（M-CSF）、CSF2（GM-CSF）、CSF3（GCSF）、CTLA4、CX3CL1（SCYD1）、CXCL12（SDF1）、CXCL13、EGFR、FCER1A、FCER2、HER2、IGF1R、IL-1、IL-12、IL13、IL15、IL17、IL18、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1β、IL2、IL4、IL6、

2021 年 5 月 27 日修正

IL7、IL8、IL9、IL12/23、IL22、IL23、IL25、IL27、IL35、ITGB4(b 4 整合蛋白)、LEP(瘦蛋白)、第 II 類 MHC、TLR2、TLR4、TLR5、TNF、TNF α 、TNFSF4(OX40 配位基)、TNFSF5(CD40 配位基)、類鐸受體、TREM1、TSLP、TWEAK、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、DNGR-1 (CLEC91) 和 HMGB1。

5. 如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白，其中該結合蛋白係雙特異性且可結合二種不同抗原目標。
6. 如請求項 5 之類抗體結合蛋白，其中該二種不同抗原目標係選自由下列組成之群組：IL4 和 IL13、IGF1R 和 HER2、IGF1R 和 EGFR、EGFR 和 HER2、BK 和 IL13、PDL-1 和 CTLA-4、CTLA4 和第 II 類 MHC、IL-12 和 IL-18、IL-1 α 和 IL-1 β 、TNF α 和 IL12/23、TNF α 和 IL-12p40、TNF α 和 IL-1 β 、TNF α 和 IL-23、或 IL17 和 IL23。
7. 如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白，其中該結合蛋白可抑制一或多種不同抗原目標的功能。
8. 如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白，其中至少一個選自由 L₁、L₂、L₃ 及 L₄ 組成之群組的連結子含有至少一個半胱胺酸殘基。
9. 如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白，其中：
 - (a) 若 L₂ 長度為 L₄ 長度的至少兩倍，則 L₁ 長度為 L₃ 長度的至少兩倍；或
 - (b) 若 L₄ 長度為 L₂ 長度的至少兩倍，則 L₃ 長度為 L₁ 長度的至少兩倍。

2021 年 5 月 27 日修正

10. 一種醫藥組成物，其包含醫藥上可接受之載劑及治療有效量之如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白。
11. 一種分離之核酸分子，其包含編碼如請求項 1 或 2 之類抗體結合蛋白的核苷酸序列。
12. 一種表現載體，其包含如請求項 11 之核酸分子。
13. 一種分離之宿主細胞，其包含如請求項 11 之核酸分子。
14. 一種分離之宿主細胞，其包含如請求項 12 之表現載體。
15. 如請求項 13 之分離之宿主細胞，其中該宿主細胞為哺乳動物細胞或昆蟲細胞。
16. 如請求項 14 之分離之宿主細胞，其中該宿主細胞為哺乳動物細胞或昆蟲細胞。

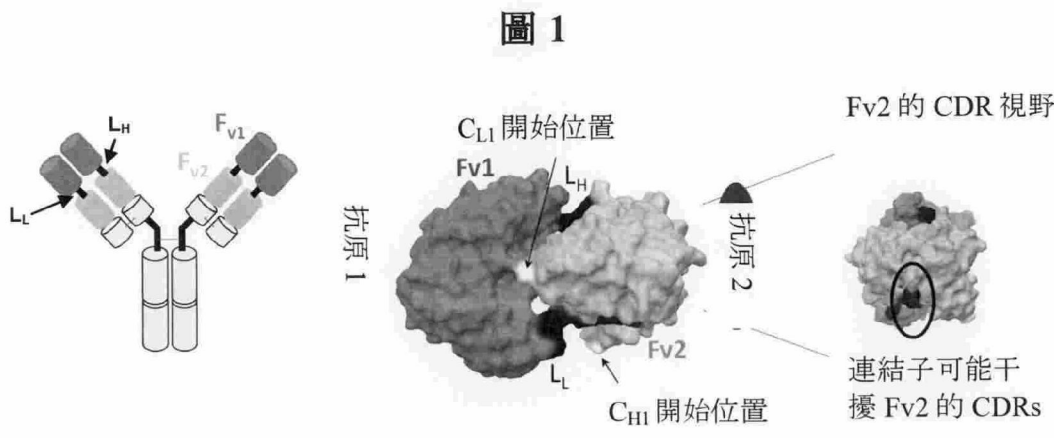


圖 2

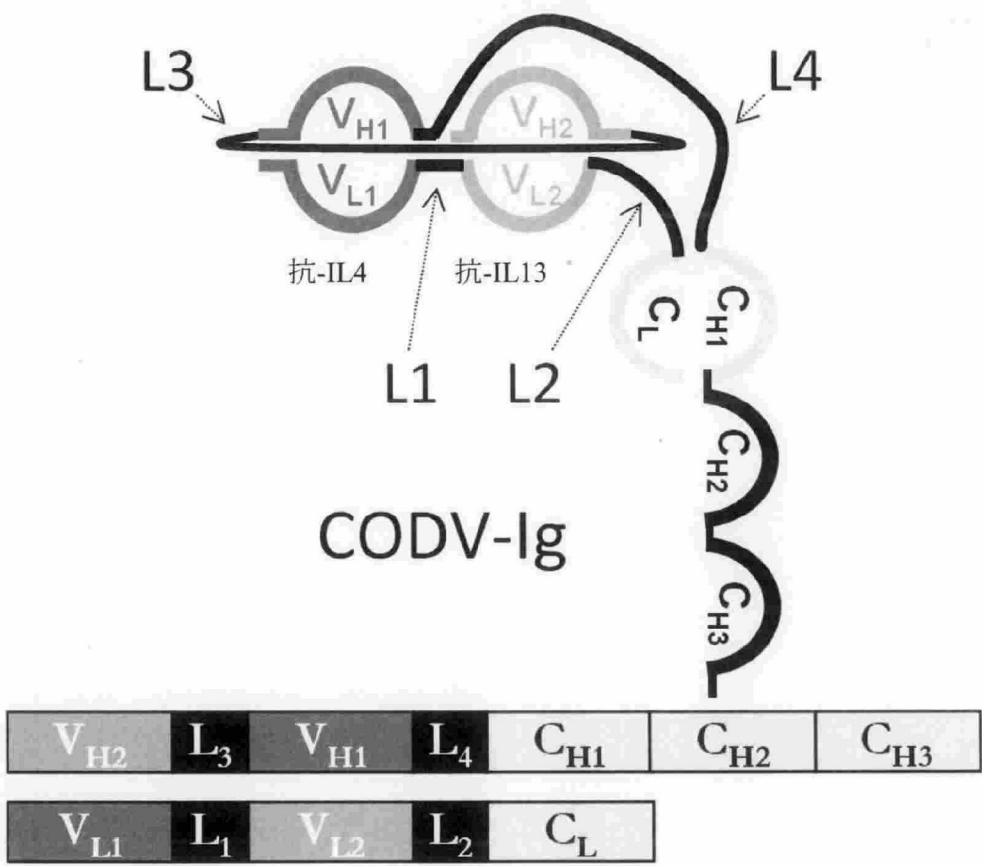


圖 3

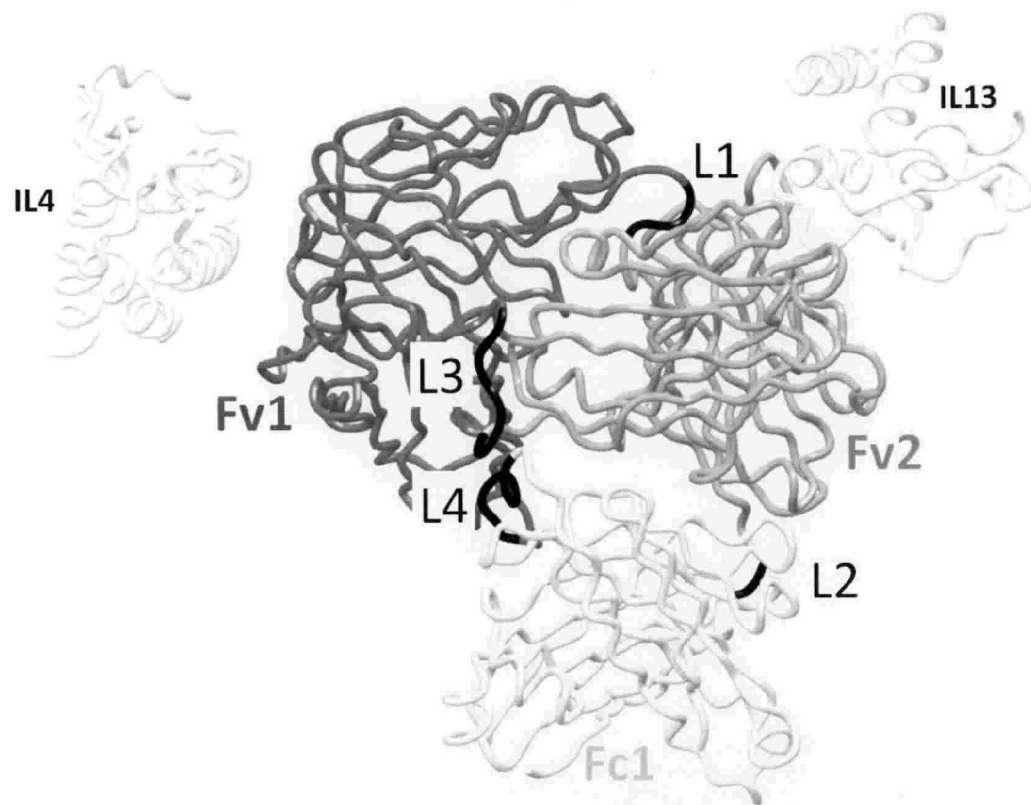


圖 4

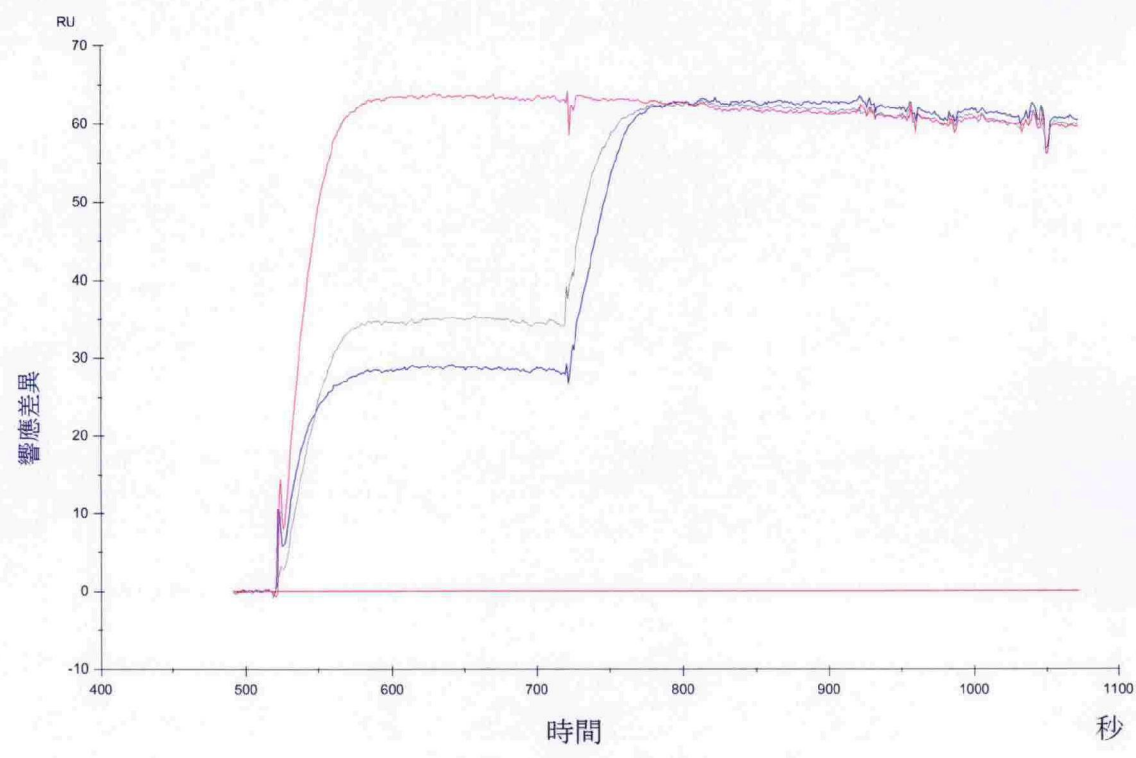


圖 5

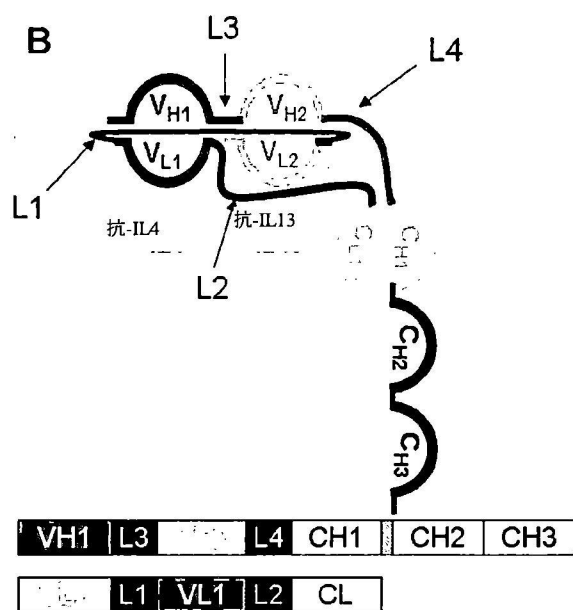
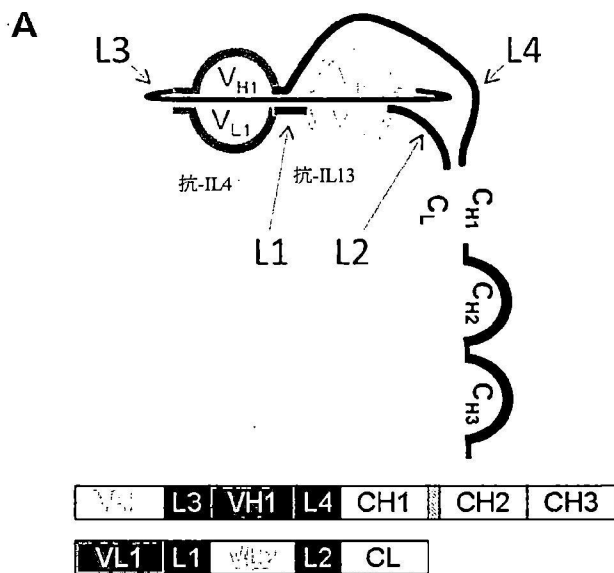


圖 6

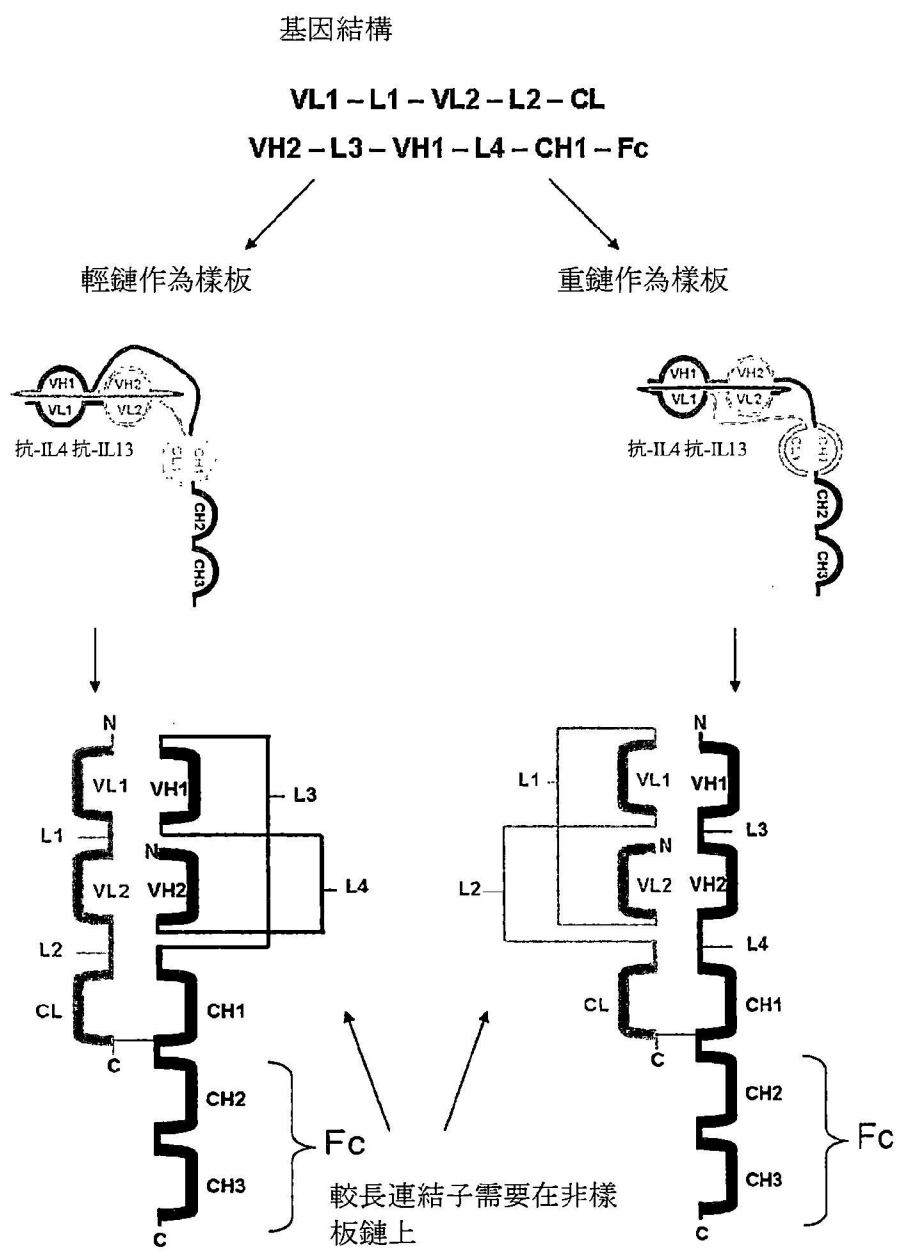
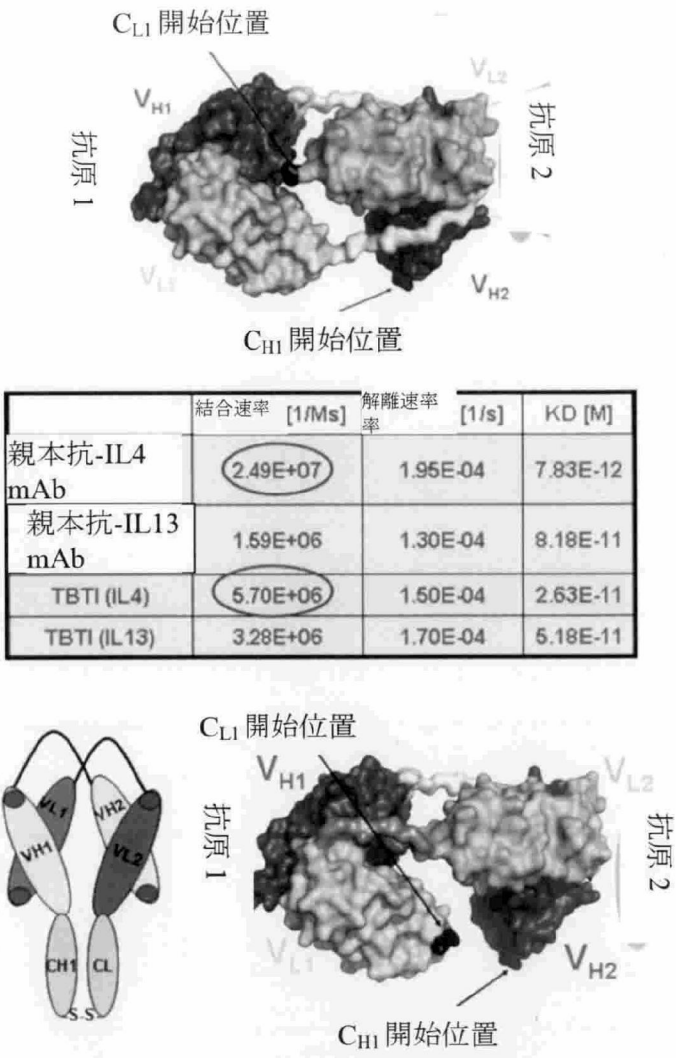
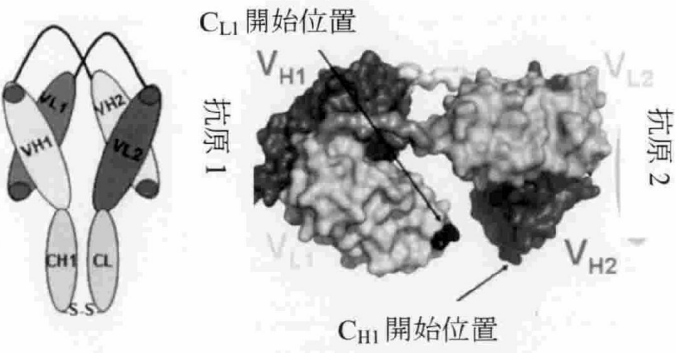


圖 7



	結合速率 [1/Ms]	解離速率 [1/s]	KD [M]
親本抗-IL4 mAb	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
親本抗-IL13 mAb	1.59E+06	1.30E-04	8.18E-11
TBTI (IL4)	5.70E+06	1.50E-04	2.63E-11
TBTI (IL13)	3.28E+06	1.70E-04	5.18E-11



	結合速率 [1/Ms]	解離速率 [1/s]	KD [M]
親本抗-IL4 mAb	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
親本抗-IL13 mAb	1.59E+06	1.30E-04	8.18E-11
CODH (IL4)	3.16E+07	2.89E-04	9.14E-12
CODH (IL13)	1.20E+06	1.12E-04	9.34E-11

圖 8

