



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202440645 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：113109700 (22)申請日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 15 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) C07K16/30 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01) A61K47/68 (2017.01)
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2023/03/15 中國大陸 2023102614810

(71)申請人：大陸商三生國健藥業(上海)股份有限公司 (中國大陸) SUNSHINE GUOJIAN
PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：趙杰 (CN)；蔣良豐 (CN)；鄭眾 (CN)；朱 禎平 (US)；張昊 (CN)；婁 競 (AG)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：11 共 143 頁

(54)名稱

抗 MUC17*CD3*CD28 三特异性抗體

(57)摘要

本發明提供了一種抗 MUC17*CD3*CD28 三特异性抗體。具體地，本發明的三特异性抗體標靶腫瘤特异性抗原 MUC17，同時標靶 T 細胞表現的 CD3 和共刺激分子 CD28，能夠為 T 細胞提供共刺激信號，從而激發更強更有效的毒殺活性，有望有效克服固態腫瘤對 T 細胞銜接子的耐藥性。



【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體

【中文】

本發明提供了一種抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體。具體地，本發明的三特異性抗體標靶腫瘤特異性抗原 MUC17，同時標靶 T 細胞表現的 CD3 和共刺激分子 CD28，能夠為 T 細胞提供共刺激信號，從而激發更強更有效的毒殺活性，有望有效克服固態腫瘤對 T 細胞銜接子的耐藥性。

【指定代表圖】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體

【技術領域】

【0001】 本發明涉及抗體領域，具體地涉及一種抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體。

【先前技術】

【0002】 據世界衛生組織 IARC 發佈的《2020 世界癌症報告》中數據顯示，2020 年全球新發癌症病例 1929 萬例，僅中國新發癌症就有 457 萬人，占全球 23.7%，中國癌症新發人數遠超世界其他國家。2020 年，我國癌症病種中，癌症病種最高的前 10 位分別是：肺癌、乳腺癌、胃癌、結直腸癌、肝癌、食道癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、子宮體癌、前列腺癌。肺癌為患病率最高的癌症，結直腸癌和胃癌緊隨其後，分別占比 12.3% 和 10.5%。因此，尋找和探索胃腸道腫瘤相關治療標的用於開發更加有效的臨床治療藥物，具有重大臨床意義。

【0003】 MUC17 是一種分子量較大的 O-糖基化黏蛋白 (Mucins)，與其它幾種黏蛋白 (MUC1、3、12、13 和 16) 同屬於 SEA 家族的跨膜黏蛋白。臨床癌症研究數據表明，MUC17 在多種消化道腫瘤 (包括胃癌和結直腸癌) 中高度表現，這使 MUC17 成為潛在的消化道腫瘤相關標的。

【0004】 雙特異性 T 細胞銜接子 (Bispecific T-cell Engagers, BiTEs) 是一種雙特異型抗體，它由兩類抗體的片段融合而成，分別可以結合 T 細胞表面的 CD3 分子以及腫瘤細胞表面

抗原分子，從而誘導 T 細胞對腫瘤細胞的毒殺，此過程不受 MHC 限制。目前這一療法在血液系統惡性腫瘤中效果較好，其中一種 CD3×CD19 的 BiTE，Blinatumomab，已經被 FDA 批准用於 B 細胞惡性腫瘤的治療。由於固態腫瘤存在的物理屏障以及免疫抑制微環境，BiTEs 在多種固態腫瘤的臨床治療中沒有達到預期效果。

【0005】 因此，本領域亟待提供一種能克服 BiTEs 缺陷的新型 T 細胞銜接子，例如能夠標靶腫瘤特異性抗原 MUC17 的三特異性 T 細胞銜接子(Trispecific T-cell engagers, TriTEs)。

【發明內容】

【0006】 本發明的目的在於提供一種抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體。

【0007】 本發明的目的在於提供一種三特異性 T 細胞銜接子 (TriTEs)，標靶的腫瘤特異性抗原為 MUC17，同時標靶 T 細胞表現的 CD3 和共刺激分子 CD28。

【0008】 在本發明的第一方面，提供了一種多特異性 T 細胞銜接子(T-cell Engagers)，所述多特異性 T 細胞銜接子包含：

第一標靶結構域 D1，所述 D1 與選自下組的標的蛋白結合：
CD3、CD28、CD40、CD137；

任選的第二標靶結構域 D2，所述 D2 與選自下組的標的蛋白結合：CD3、CD28、CD40、CD137；和

第三標靶結構域 D3，所述 D3 包含一個或多個 MUC17 抗原結合結構域。

【0009】 在另一優選例中，所述 D1、D2 或 D3 各自獨立地選自：單域抗體(sdAb)、Fab、Fab'、F(ab')₂、TriFab、Fv 片段、

片段可變(Fv)異二聚體、單鏈 Fv(scFv)片段、雙抗體(diabody)、雙特異性 T 細胞接合器(BiTE)或單結構域片段，優選為單鏈 Fv(scFv)、Fv 片段或 Fab 片段。

【0010】 在另一優選例中，所述 MUC17 抗原結合結構域包含第三重鏈可變區和第三輕鏈可變區，其中，所述第三重鏈可變區包含如下三個重鏈可變區 CDR：

- H-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 3 所示的胺基酸序列；
 - H-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 4 所示的胺基酸序列；和
 - H-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 5 所示的胺基酸序列；以及
- 所述第三輕鏈可變區包含如下三個輕鏈可變區 CDR：
- L-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 6 所示的胺基酸序列；
 - L-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列；和
 - L-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的胺基酸序列。

【0011】 在另一優選例中，所述 MUC17 抗原結合結構域包含如 SEQ ID NO:1 或 9 所示的第三重鏈可變區，和如 SEQ ID NO:2 或 10 所示的第三輕鏈可變區。

【0012】 在另一優選例中，所述 MUC17 抗原結合結構域包含與如 SEQ ID NO: 1 或 9 所示的胺基酸序列具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同性的第三重鏈可變區(其中 CDR 序列不變或基本不變)；和與如 SEQ ID NO: 2 或 10 所示的胺基酸序列具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同性的第三輕鏈可變區(其中 CDR 序列不變或基本不變)。

【0013】 在另一優選例中，所述第二標靶結構域選自下組：CD3 抗原結合結構域、CD28 抗原結合結構域、CD40 抗原結合結構域、CD137 抗原結合結構域、CD40L 序列、或 CD137L 序列。

【0014】 在另一優選例中，所述第三標靶結構域選自下組：CD3 抗原結合結構域、CD28 抗原結合結構域、CD40 抗原結合結構域、CD137 抗原結合結構域、CD40L 序列、或 CD137L 序列。

【0015】 在另一優選例中，所述多特異性 T 細胞銜接子還包含 Fc 片段。

【0016】 在另一優選例中，所述 Fc 片段來源於 IgG1 或 IgG4。

【0017】 在另一優選例中，所述 Fc 片段為來源於 IgG1 的 Fc 片段。

【0018】 在另一優選例中，所述來源於 IgG1 的 Fc 片段具有選自下組的突變：

N297A；

L234F/L235E/P331S；

Y349C/K370E/K409D/K439E；

S354C/D356K/E357K/D399K；

S354C/T366W；

S354C/T366W/H435R/Y436F；

Y349C/T366S/L368A/Y407V；

L234F/L235E/P331S/Y349C/K370E/K409D/K439E；

L234F/L235E/P331S/S354C/D356K/E357K/D399K；

L234F/L235E/P331S/S354C/T366W；

L234F/L235E/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407V；

N297A/Y349C/K370E/K409D/K439E ;
N297A/S354C/D356K/E357K/D399K ;
N297A/S354C/T366W ;
N297A/Y349C/T366S/L368A/Y407V ; 和/或
S267E ; S267E/G236D ; S267E/S239D ; S267E/L328F 。

【0019】 在另一優選例中，所述來源於 IgG1 的 Fc 片段具有選自下組的突變：

L234A/L235A/G237A ;
S354C/T366W ;
S354C/T366W/H435R/Y436F ;
Y349C/T366S/L368A/Y407V 。

【0020】 在另一優選例中，所述多特異性 T 細胞銜接子為雙/三特異性 T 細胞銜接子

【0021】 在另一優選例中，所述多特異性 T 細胞銜接子為雙特異性 T 細胞銜接子。

【0022】 在另一優選例中，所述三特異性 T 細胞銜接子包含：
第一標靶結構域，所述第一標靶結構域為 CD28 抗原結合結構域；
第二標靶結構域，所述第二標靶結構域為 CD3 抗原結合結構域；和
第三標靶結構域，所述第三標靶結構域包含一個或多個 MUC17 抗原結合結構域。

【0023】 在另一優選例中，所述第一標靶結構域、第二標靶結構域和第三標靶結構域各包含一個或多個抗體可變區。

【0024】 在另一優選例中，所述多特異性 T 細胞銜接子為三特異性 T 細胞銜接子。

【0025】 在另一優選例中，所述多特異性 T 細胞銜接子為同源或異源二聚體。

【0026】 在另一優選例中，所述三特異性 T 細胞銜接子為三特異性抗體。

【0027】 在另一優選例中，所述三特異性抗體的結構對稱或不對稱。

【0028】 在另一優選例中，所述三特異性抗體為二價、三價、四價或多價分子。

【0029】 在另一優選例中，所述三特異性抗體為結構不對稱的三價三特異性抗體。

【0030】 在另一優選例中，所述 CD3 抗原結合結構域包含第二重鏈可變區和第二輕鏈可變區，其中，所述第二重鏈可變區包含如下三個重鏈可變區 CDR：

H-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 17 所示的胺基酸序列；

H-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 18 所示的胺基酸序列；和

H-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 19 所示的胺基酸序列；以

及

所述第二輕鏈可變區包含如下三個輕鏈可變區 CDR：

L-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 20 所示的胺基酸序列；

L-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 21 所示的胺基酸序列；和

L-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 22 所示的胺基酸序列；或

所述第二重鏈可變區包含如下三個重鏈可變區 CDR：

H-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 17 所示的胺基酸序列；
H-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 18 所示的胺基酸序列；和
H-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 51 所示的胺基酸序列；以
及

所述第二輕鏈可變區包含如下三個輕鏈可變區 CDR：

L-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 20 所示的胺基酸序列；
L-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 21 所示的胺基酸序列；和
L-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 52 所示的胺基酸序列。

【0031】 在另一優選例中，所述 CD3 抗原結合結構域包含與如 SEQ ID NO:15 或 23 所示的胺基酸序列具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同性的第二重鏈可變區，和與如 SEQ ID NO: 16 或 24 所示的胺基酸序列具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同性的第二輕鏈可變區。

【0032】 在另一優選例中，所述 CD3 抗原結合結構域包含與如 SEQ ID NO:15 所示的第二重鏈可變區，和與如 SEQ ID NO: 16 所示的第二輕鏈可變區；或如 SEQ ID NO: 23 所示的第二重鏈可變區，和與如 SEQ ID NO: 24 所示的第二輕鏈可變區。

【0033】 在另一優選例中，所述 CD28 抗原結合結構域包含第一重鏈可變區和第一輕鏈可變區，其中所述第一重鏈可變區包含如下三個重鏈可變區 CDR：

H-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 30 所示的胺基酸序列；
H-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 31 或 53 所示的胺基酸序列；和

H-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 32 所示的胺基酸序列；以及

所述第一輕鏈可變區包含如下三個輕鏈可變區 CDR：

L-CDR1，其具有如 SEQ ID NO: 33 所示的胺基酸序列；

L-CDR2，其具有如 SEQ ID NO: 34 所示的胺基酸序列；和

L-CDR3，其具有如 SEQ ID NO: 35 所示的胺基酸序列。

【0034】 在另一優選例中，所述 CD28 抗原結合結構域包含與如 SEQ ID NO:28 或 50 所示的胺基酸序列具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同性的第一重鏈可變區，和與如 SEQ ID NO: 29 所示的胺基酸序列具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列相同性的第一輕鏈可變區。

【0035】 在另一優選例中，所述 CD28 抗原結合結構域包含與如 SEQ ID NO: 28 或 50 所示的第一重鏈可變區，和與如 SEQ ID NO: 29 所示的第一輕鏈可變區。

【0036】 在另一優選例中，所述三特異性抗體為同源二聚體或異源二聚體。

【0037】 在另一優選例中，所述第一標靶結構域和第二標靶結構域成異二聚體結構。

【0038】 在另一優選例中，所述第一標靶結構域包含抗 CD28 Fv 結構域、Fab 結構域或抗 CD28 scFv 結構域。

【0039】 在另一優選例中，所述第二標靶結構域包含抗 CD3 Fv 結構域、Fab 結構域或抗 CD3 scFv 結構域。

【0040】 在另一優選例中，所述第三標靶結構域包含抗 MUC17 Fab 結構域。

【0041】 在另一優選例中，所述三特異性抗體從 N 端到 C 端包含如下所示的結構：

- (a)第一鏈：VL₁-L1-VH₂-L2-VL₂-L3-VH₁-L4-Fc1；
- (b)第二鏈：VH₃-CH1-Fc2；和
- (c)第三鏈：VL₃-CL；

或所述三特異性抗體從 N 端到 C 端包含如下所示的結構：

- (a)第一鏈：VL₁-L1-VH₁-L2-VL₂-L3-VH₂-L4-Fc1；
- (b)第二鏈：VH₃-CH1-Fc2；和
- (c)第三鏈：VL₃-CL；

其中，

VH1 為第一重鏈可變區，VL1 為第一輕鏈可變區；

VH2 為第二重鏈可變區，VL2 為第二輕鏈可變區；

VH3 為第三重鏈可變區，VL3 為第三輕鏈可變區；

CL 為輕鏈恆定區，CH1 為 CH1 結構域；

L1、L2、L3、L4 各自獨立地為無、鏈或連接子；

Fc1 或 Fc2 各自獨立地為 Fc 元件；

“-”代表肽鍵。

【0042】 在另一優選例中，所述連接子為剛性連接子或柔性連接子。

【0043】 在另一優選例中，所述 L1、L2、L3、L4 各自獨立地為無或(GS)_n、(G3S)_n、(G4S)_n(n 選自 1-6)。

【0044】 在另一優選例中，所述三特異性抗體與檢查點抑制劑共同施用。

【0045】 在另一優選例中，所述三特異性抗體與抗 PD1 和/或抗 PDL1 拮抗劑共同施用。

【0046】 在另一優選例中，所述輕鏈恆定區為人 Kappa 輕鏈恆定區。

【0047】 在另一優選例中，所述 VH₁、VL₁ 分別為 CD28 抗原結合結構域包含的第一重鏈可變區、第一輕鏈可變區。

【0048】 在另一優選例中，所述 VH₂、VL₂ 分別為 CD3 抗原結合結構域包含的第二重鏈可變區、第二輕鏈可變區。

【0049】 在另一優選例中，所述 VH₃、VL₃ 分別為 MUC17 抗原結合結構域包含的第三重鏈可變區、第三輕鏈可變區。

【0050】 在另一優選例中，所述 VH1 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和所述 VL1 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

所述 VH1 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 53 和 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和所述 VL1 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0051】 在另一優選例中，所述 VH2 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和所述 VL2 包含：胺基酸序列分

別如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

所述 VH2 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 51 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和所述 VL2 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 52 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0052】 在另一優選例中，所述 VH3 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和所述 VL3 包含：胺基酸序列分別如 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0053】 在另一優選例中，所述三特異性抗體中，

所述第一鏈的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 38 或 42 所示。

【0054】 在另一優選例中，所述三特異性抗體中，

所述第二鏈的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 40 所示；和/或

所述第三鏈的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 14 所示。

【0055】 在另一優選例中，所述三特異性抗體還包括所述三特異性抗體的活性片段和/或衍生物，所述抗體的衍生物具有與本發明的三特異性抗體至少 86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列相同性。

【0056】 在本發明的第二方面，提供了一種多核苷酸，所述多核苷酸編碼本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子。

【0057】 在本發明的第三方面，提供了一種載體，所述載體含有本發明的第二方面所述的多核苷酸。

【0058】 在另一優選例中，所述載體包括質體、噬菌體、酵母質體、植物細胞病毒、哺乳動物細胞病毒如腺病毒、反轉錄病毒、或其他載體。

【0059】 在本發明的第四方面，提供一種宿主細胞，所述宿主細胞含有本發明的第三方面所述的載體或基因組中整合有本發明的第二方面所述的多核苷酸。

【0060】 在另一優選例中，所述宿主細胞為真核細胞，優選地為哺乳動物細胞。

【0061】 在本發明的第五方面，提供了一種製備如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子的方法，包括步驟：

(i) 在合適的條件下，培養本發明的第四方面所述的宿主細胞，獲得含有如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子的混合物；

(ii) 對步驟(i)中得到的混合物進行純化和/或分離，從而獲得如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子。

【0062】 在本發明的第六方面，提供了一種藥物組成物，所述藥物組成物含有：

(I) 如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子；和

(II) 藥學上可接受的載劑。

【0063】 在另一優選例中，所述藥物組成物還包括其他的藥學活性試劑。

【0064】 在另一優選例中，所述其他的藥學活性試劑包括一種或多種檢查點調節劑或化療劑。

【0065】 在另一優選例中，所述檢查點調節劑包括但不限於抗 PD1 和/或抗 PDL1 拮抗劑。

【0066】 在另一優選例中，所述藥物組成物為注射劑型。

【0067】 在本發明的第七方面，提供了一種免疫偶聯物，所述免疫偶聯物包括：

(a) 如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子；和

(b) 選自下組的偶聯部分：可檢測標記物、藥物、毒素、細胞激素、放射性核種、酵素、或其組合。

【0068】 在另一優選例中，所述偶聯物部分選自：螢光或發光標記物、放射性標記物、MRI (核磁共振成像)或 CT (電腦 X 射線斷層掃描技術)造影劑、或能夠產生可檢測產物的酵素、放射性核種、生物毒素、細胞激素(如 IL-2 等)、抗體、抗體 Fc 片段、抗體 scFv 片段、金奈米顆粒/奈米棒、病毒顆粒、脂質體、奈米磁粒。

【0069】 在本發明的第八方面，提供了如本發明的第一方面所述多特異性 T 細胞銜接子、如本發明的第六方面所述的藥物組成物或如本發明的第七方面所述的免疫偶聯物的用途，用於製備(a)檢測試劑或套組；和/或(b)製備預防和/或治療癌症/腫瘤的藥物。

【0070】 在另一優選例中，所述癌症/腫瘤為 MUC17 相關的癌症/腫瘤。

【0071】 在另一優選例中，所述癌症/腫瘤包括固態腫瘤和血液腫瘤。

【0072】 在另一優選例中，所述癌症/腫瘤為固態腫瘤。

【0073】 在另一優選例中，所述癌症/腫瘤選自下組：胃癌、胃腸癌、結直腸癌、食道癌、胃食道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、子宮體癌、前列腺癌或其組合。

【0074】 在本發明的第九方面，提供了一種套組，所述套組包括如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子、如本發明的第二方面所述的多核苷酸、如本發明的第三方面所述的載體、如本發明的第四方面所述的宿主細胞、如本發明的第六方面所述的藥物組成物或如本發明的第七方面所述的免疫偶聯物。

【0075】 在本發明的第十方面，提供了如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子、如本發明的第二方面所述的多核苷酸、如本發明的第三方面所述的載體、如本發明的第四方面所述的宿主細胞、如本發明的第六方面所述的藥物組成物或如本發明的第七方面所述的免疫偶聯物在製備預防、治療和/或檢測癌症/腫瘤的藥物中的用途。

【0076】 在本發明的第十一方面，提供了一種預防、治療和/或檢測癌症/腫瘤的方法，向有需要的受試者施用安全有效量的如本發明的第一方面所述的多特異性 T 細胞銜接子、其藥物組成物或其免疫偶聯物。

【0077】 應理解，在本發明範圍內中，本發明的上述各技術特徵和在下文(如實施例)中具體描述的各技術特徵之間都可以互相組合，從而構成新的或優選的技術方案。限於篇幅，在此不再一一累述。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示了本發明的三特異性抗體的結構示意圖。其中圖 1A 為 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 抗體的結構示意圖，圖 1B 為 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 抗體的結構示意圖。

圖 2 顯示了 ELISA 測定抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體對 MUC17 (圖 2A)、CD3 (圖 2B)和 CD28 (圖 2C)的抗原結合能力。

圖 3 顯示了流式細胞儀測定抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體結合人結腸腺癌細胞 LS174T 表面 MUC17 (圖 3A)，以及結合人 T 細胞表面 CD3/CD28 的能力(圖 3B)。

圖 4 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體對標的細胞 LS174T-Luciferase 的毒殺活性，圖 4A 和 4B 分別是兩次獨立重複實驗的結果，兩次實驗中使用的效應細胞來自不同的人類個體。

圖 5 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體相對於雙特異性抗體的優效性評價。其中，圖 5A 中的突變體 SP34-Hu-IgG1 (A101D)不再結合 CD3-Epsilon。圖 5B 中的突變體 Anti-CD28-Hu-IgG1 (H35A+H96A)不再結合 CD28。

圖 6 顯示了本發明的三特異性抗體及其突變體對標的細胞的毒殺活性(圖 6A)和刺激 T 細胞分泌 IFN-gamma 的活性(圖 6B)。

圖 7 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體相對於 CODV-IgG 的優效性，其中圖 7A 顯示了對標的細胞的毒殺活性比較，圖 7B 顯示了刺激 CD3 陽性 T 細胞分泌 IFN-gamma 的能力比較。

圖 8 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的體外安全性評估，其中顯示了 SP34-Hu-IgG1 單抗能夠強烈刺激 PBMC 分

泌 IL-2 (圖 8A)、IFN-gamma (圖 8B)，並能夠刺激 PBMC 增殖 (圖 8C)。

圖 9 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的 SEC 純度分析。其中，圖 9A 和圖 9B 分別顯示了 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 HPLC-SEC 圖譜。

圖 10 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的 CE-SDS 分析。其中，圖 10A 和圖 10B 分別為 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 的 NR-CE-SDS 和 R-CE-SDS 圖譜，圖 10C 和圖 10D 分別為 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 NR-CE-SDS 和 R-CE-SDS 圖譜。

圖 11 顯示了抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的動物抑瘤藥效(包括小鼠體重和腫瘤體積大小)。

【實施方式】

【0078】 本發明人經過廣泛而深入地研究，首次意外地開發了一種抗 MUC17 的多特異性 T 細胞銜接子。本發明的多特異性 T 細胞銜接子優選地包含經人源化改造的 MUC17、CD3 和 CD28 標靶結構域。本發明的多特異性 T 細胞銜接子除了能結合 CD3 外還能標靶 CD28，能夠為 T 細胞提供共刺激信號，從而激發更強更有效的毒殺活性，能夠有效克服固態腫瘤對 T 細胞銜接子的耐藥性。在此基礎上完成了本發明。

術語

【0079】 除非另有定義，否則本文中所用的全部技術術語和科學術語均具有如本發明所屬領域普通技術人員通常理解的相同含義。

【0080】 術語“約”可以是指在本領域普通技術人員確定的特定值或組成的可接受誤差範圍內的值或組成，其將部分地取決於如何測量或測定值或組成。

【0081】 如本文所用，術語“含有”或“包括(包含)”可以是開放式、半封閉式和封閉式的。換言之，所述術語也包括“基本上由...構成”、或“由...構成”。

MUC17

【0082】 MUC17 是一種分子量較大的 O-醣基化黏蛋白(Mucins)，與其它幾種黏蛋白(MUC1、3、12、13 和 16)同屬於 SEA (Sea urchin sperm protein, Enterokinase, and Agrin)家族的跨膜黏蛋白。跨膜黏蛋白在維持粘膜屏障功能方面起著重要作用，它們可以防止病原體侵入粘膜表面，還與發炎性腸病的發展有關。透過對 HPA (Human Protein Atlas，基因組學資料庫)數據的分析，申請人發現 MUC17 的 RNA 主要表現於結直腸和胃相關器官(小腸、十二指腸、直腸、結腸和胃)。臨床癌症研究數據表明，MUC17 在多種消化道腫瘤(包括胃癌和結直腸癌)中高度表現，這使 MUC17 成為潛在的消化道腫瘤相關標的。

T 細胞銜接子(T-cell Engagers)

【0083】 雙特異性 T 細胞銜接子(Bispecific T-cell Engagers，BiTEs)是一種雙特異型抗體，它由兩類抗體的片段融合而成，分別可以結合 T 細胞表面的 CD3 分子以及腫瘤細胞表面

抗原分子，從而誘導 T 細胞對腫瘤細胞的毒殺，此過程不受 MHC 限制。

【0084】 2022 年 2 月，賽諾菲的研發團隊在《Nature》發表了一篇關於標靶 HER2×CD3×CD28 的三特异性 T 細胞銜接子 (Trispecific T-cell engagers, TriTEs)(採用 CODV-IgG 結構) 的研究進展(參考文獻：Seung E, Xing Z, Wu L, et al. A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells[J]. Nature, 2022, 603(7900): 328-334.)。該研究表明，該 TriTEs 能比 BiTEs 更加有效地刺激 IL-2 分泌並活化 NF-κB 訊息途徑，並具有更強烈的毒殺活性。在用原代人 CD3 陽性 T 細胞重建的免疫缺陷 NSG 小鼠體內，該 TriTEs 使 CD8 陽性 T 細胞中顆粒酶的表現增加了 6.8 倍，劑量低至 10 μg/kg 時，HER2×CD3×CD28 依然能夠誘導腫瘤消退。該論文中標靶 HER2×CD3×CD28 的 TriTEs 已經處於臨床 1 期開發階段，具有治療 HER2 陽性固態腫瘤的潛力。

抗體

【0085】 通常，“抗體”也稱為“免疫球蛋白“其可以是天然或常規的抗體，其中兩條重鏈透過二硫鍵彼此連接且每條重鏈與輕鏈透過二硫鍵連接。存在兩種類型的輕鏈，λ(l)和 κ(k)。存在五種主要的重鏈種類(或同型)，其決定抗體分子的功能活性：IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。每種鏈包含不同的序列結構域。輕鏈包括兩個結構域或區，可變結構域(VL)和恆定結構域(CL)。重鏈包括四個結構域，重鏈可變區(VH)和三個恆定區(CH1、CH2 和 CH3，統稱為 CH)。輕鏈(VL)和重鏈(VH)的可變區都決定對抗原的結合辨識

和特異性。輕鏈的恆定結構域(CL)和重鏈的恆定區(CH)賦予重要的生物性質如抗體鏈結合、分泌、經胎盤的移動性、補體結合和與Fc受體(FcR)的結合。Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N-末端部分且由一條輕鏈和一條重鏈的可變部分組成。抗體的特異性取決於抗體結合位和抗原決定區間的結構互補。抗體結合位由主要來自高度可變區或互補決定區(CDR)的殘基組成。偶爾，來自非高度可變或框架區(FR)的殘基影響整體結構域結構且進而影響結合位。互補決定區或CDR指共同限定結合親和力和天然免疫球蛋白結合位天然Fv區的特異性的胺基酸序列。免疫球蛋白的輕鏈和重鏈各具有三個CDR，分另稱為CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L和CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。常規抗體抗原結合位因此包括六個CDR，包含來自每個重鏈和輕鏈v區的CDR集合。

【0086】 在一個給定的抗體的輕鏈可變區或重鏈可變區胺基酸序列中，各CDR的精確胺基酸序列邊界可以使用許多公知的抗體CDR指派系統的任一種或其組合確定，所述指派系統包括例如：Chothia，Kabat，AbM，Contact，國際Immuno GeneTics database (IMGT)，EU編號系統等。

【0087】 應理解，本發明中的CDR的精確胺基酸序列邊界可以任選地利用上述提及的不同指派系統定義。優選地，除非另有說明，否則在本發明中，當提及抗體可變區中的殘基位置(包括重鏈可變區殘基和輕鏈可變區殘基)時，是指根據Kabat編號系統的編號位置。

【0088】 如本文所用，術語“可變”表示抗體中可變區的某些部分在序列上有所不同，它形成了各種特定抗體對其特定抗原的結合

和特異性。然而，可變性並不均勻地分佈在整個抗體可變區中。它集中於輕鏈和重鏈可變區中稱為互補決定區(CDR)或超變區中的三個片段中。可變區中較保守的部分稱為框架區(FR)。天然重鏈和輕鏈的可變區中各自包含四個 FR 區，它們大致上呈 β -折疊構型，由形成連接環的三個 CDR 相連，在某些情況下可形成部分 β -折疊結構。每條鏈中的 CDR 透過 FR 區緊密地靠在一起並與另一鏈的 CDR 一起形成了抗體的抗原結合部位(參見 Kabat 等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷 I, 647-669 頁(1991))。恆定區不直接參與抗體與抗原的結合，但是它們表現出不同的效應功能，例如參與抗體的依賴於抗體的細胞毒性。

【0089】 如本文所用，術語“框架區”(FR)指插入 CDR 間的胺基酸序列，即指在單一物種中不同的免疫球蛋白間相對保守的免疫球蛋白的輕鏈和重鏈可變區的那些部分。免疫球蛋白的輕鏈和重鏈各具有四個 FR，分別稱為 FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L 和 FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。相應地，輕鏈可變結構域可因此稱作 (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)且重鏈可變結構域可因此表示為(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)。優選地，本發明的 FR 是人抗體 FR 或其衍生物，所述人抗體 FR 的衍生物與天然存在的人抗體 FR 基本相同，即序列相同性達到 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%。

【0090】 獲知 CDR 的胺基酸序列，本領域的技術人員可輕易確定框架區 FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L 和/或 FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

【0091】 如本文所用，術語“人框架區”是與天然存在的人抗體的框架區基本相同的(約 85%或更多，具體地 90%、95%、97%、99%或 100%)框架區。

【0092】 如本文所用，術語“片段”、“衍生物”和“類似物”是指基本上保持本發明抗體相同的生物學功能或活性的多肽。本發明的多肽片段、衍生物或類似物可以是(i)有一個或多個保守或非保守性胺基酸殘基(優選保守性胺基酸殘基)被取代的多肽，而這樣的取代的胺基酸殘基可以是也可以不是由遺傳密碼編碼的，或(ii)在一個或多個胺基酸殘基中具有取代基團的多肽，或(iii)成熟多肽與另一個化合物(比如延長多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的胺基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前導序列或分泌序列或用來純化此多肽的序列或蛋白原序列，或與 6His 標籤形成的融合蛋白)。根據本文的教導，這些片段、衍生物和類似物屬於本領域熟練技術人員公知的範圍。

【0093】 如本文所用，術語“抗體片段”、“抗原結合片段”、“標靶結構域”或“抗原結合結構域”用於指抗體的一部分，例如 $F(ab')_2$ ， $F(ab)_2$ ， Fab' ， Fab ， Fv ，單鏈 $Fvs(scFv)$ ，單鏈抗體，二硫鍵連接的 $Fvs(sdFv)$ ，包含 VL 或 VH 結構域的片段， Fab 表現序列庫產生的片段以及抗個體遺傳型(anti-Id)抗體。不論結構如何，抗體片段都與完整抗體所辨識的相同抗原結合。本發明的標靶結構域的實例包括例如但不限於 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 片段、單鏈 $Fv(scFv)$ 片段和單結構域片段。

【0094】 “ Fv ”片段是含有完整標的辨識和結合位的抗體的最小片段。該區域由以緊密的非共價結合的一個重鏈和一個輕鏈可變結

構域的二聚體(VH-VL 二聚體)組成。在該構型中，每個可變結構域的三個 CDR 相互作用，以限定在 VH-VL 二聚體的表面上的標的結合位。通常，六個 CDR 對抗體賦予標的結合特異性。然而，在一些情況下，甚至單個可變結構域(或僅包含對於標的特異性的三個 CDR 的 Fv 的一半)可以具有辨識且結合標的的能力，儘管其親和力低於整個結合位。

【0095】 “單鏈 Fv”或“scFv”抗體結合片段包含抗體的 VH 和 VL 結構域，其中這些結構域存在於單條多肽鏈中。一般地，Fv 多肽進一步包含在 VH 和 VL 結構域之間的多肽連接子，其致使 scFv 能夠形成有利於標的結合的結構。

【0096】 “單結構域片段”由對冠狀病毒 RBD 顯示出足夠親和力的單個 VH 或 VL 結構域組成。在一個具體實施方案中，單結構域片段是駱駝化的。

【0097】 如本文所用，術語“輕鏈恆定區(CL)”包括衍生自抗體輕鏈的胺基酸序列 CL。優選地，輕鏈恆定區包括恆定 κ 結構域或恆定 λ 結構域中的至少一個。

【0098】 如本文所用，術語“重鏈恆定區(CH)”包括源自免疫球蛋白重鏈的胺基酸序列。包含重鏈恆定區的多肽包含以下至少之一：CH1 結構域，樞紐區(例如，上部，中間和/或下部樞紐區)結構域，CH2 結構域，CH3 結構域或其變體或片段。應當理解，可以修飾重鏈恆定區，使得它們的胺基酸序列與天然存在的免疫球蛋白分子不同。

【0099】 如本文所用，術語“抗原”或“標的抗原”指能夠由抗體或抗體樣結合蛋白所結合的分子或分子的部分。該術語進一步指能

夠用於動物以產生能夠與該抗原的表位結合的抗體的分子或分子的部分。標的抗原可具有一個或多個表位。對於每種由抗體或由抗體樣結合蛋白辨識的標的抗原，抗體樣結合蛋白能夠與辨識標的抗原的完整抗體競爭。

【0100】 如本文所用，術語“連接子”是指插入免疫球蛋白結構域中為輕鏈和重鏈的結構域提供足夠的可動性以折疊成交換雙重可變區免疫球蛋白的一個或多個胺基酸殘基。合適的連接子實例包括單甘胺酸(Gly)、或絲胺酸(Ser)殘基，連接子中胺基酸殘基的標識和序列可隨著連接子中需要實現的次級結構要素的類型而變化。優選的連接子可以為(GS) n 、(G3S) n 、(G4S) n (n 選自 1-6)。

【0101】 如本文所用，抗體、抗體片段或抗體結構域的“變體”是指如下，抗體、抗體片段或抗體結構域：(1)與原始抗體、抗體片段或抗體結構域具有至少 80%，85%，90%，95%，96%，97%，98%或 99%的序列相同性，和(2)特異性結合至與原始抗體，抗體片段或抗體結構域特異性結合的相同標的。應當理解，在以“至少 $x\%$ 相同”或“至少 $x\%$ 相同性”的形式表示序列相同性的情況下，這樣的實施方案包括等於或高於下限的任何和所有數值百分比。此外，應當理解，在本申請中存在胺基酸序列的情況下，應將其解釋為另外揭示或包含與該胺基酸序列具有至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%或至少 99%的相同性。

本發明的 T 細胞銜接子

【0102】 如本文所用，術語“多特異性 T 細胞銜接子”是指包含至少兩個具有不同結合特異性的標靶結構域分子，其中至少一個

標靶結構域特異性結合 T 細胞表面抗原。在一些實施方式中，多特異性抑制劑是包含支架和標靶不同抗原或表位的兩個或更多個免疫球蛋白抗原結合結構域的多肽。在某些實施方式中，多特異性 T 細胞銜接子是雙特異性抗體或三特異性抗體。

【0103】 如本文所用，術語“雙特異性抗體”和“雙特異性 T 細胞銜接子”在本文中可互換使用，涉及可以特異性結合兩種不同抗原(或表位)的抗體。

【0104】 如本文所用，術語“本發明的三特異性抗體”、“本發明的三特異性 T 細胞銜接子”、“3Sbody”在本文中可互換使用，涉及包含具有三個不同結合特異性的三個標靶結構域分子。每個標靶結構域都能夠與標的分子特異性結合，並在與標的分子結合時抑制標的分子的生物學功能。在一些實施方式中，三特異性拮抗劑是具有兩個或更多個肽的聚合物分子。在一些實施方案中，標靶結構域包含抗體的抗原結合結構域或 CDR。在一些實施方式中，標靶結構域包含與標的蛋白特異性結合的配體或其片段。

【0105】 應理解，本發明的三特異性 T 細胞銜接子本質上是三特異性抗體，是能同時特異性結合三種抗原的抗體分子。根據對稱性，三特異性抗體可以分為結構對稱的和不對稱的分子。根據結合位的多少，雙特異性抗體可以分為二價、三價、四價和多價分子。本發明的兩種三特異性抗體為結構不對稱的三價三特異性抗體，針對每個特定標的，該三特異性抗體都是單價的。

【0106】 如本文所用，術語“Fc 片段”或“Fc”是指抗體的不具有抗原結合活性但是最初被觀察到容易結晶的部分，並因此將其命名為 Fc 片段(針對片段可結晶性)。這種片段對應於成對的 CH₂ 和

CH3 結構域，並且是抗體分子的與效應分子和細胞相互作用的部分。本文所述的 Fc 片段可以衍生自 IgG1、IgG2 和 IgG4 抗體。對於特定用途，可以優選特定的 IgG 亞型。此外，可以透過將一個或多個突變引入 Fc 來增加或減少抗體的效應子功能。較佳地，Fc 段可以含有 L234A/L235A/G237A 突變以削弱 Fc 與 Fc γ 受體之間的相互作用。

【0107】 進一步地，可以引入突變以形成杵臼結構(Knob-Into-Hole, KIH)。其主要功能是促使雙特異性抗體的兩條不同重鏈異二聚化。其結構特點為：組成雙特異性抗體的兩條不同重鏈，其中一條重鏈的 CH3 區發生突變形成一個突起的“杵”的結構，另一條重鏈的 CH3 區發生突變形成一個凹陷的“臼”的結構，杵臼結構設計有利於兩種異源抗體重鏈的正確裝配。具體地，將第一條重鏈 CH3 結構域的 366 位的 T 突變成側鏈體積更大的 W，形成一個突起的“杵”的結構；同時將第二條重鏈 CH3 結構域的 366 位的 T 突變成 S、368 位的 L 突變成 A、407 位的 Y 突變成 V，這三種突變均使得側鏈體積更小，從而形成一個凹陷的“臼”的結構。進一步地，將第一條重鏈 354 位的 S 突變成 C，將第二條重鏈 349 位的 Y 突變成 C，如此可使第一重鏈和第二重鏈在形成杵臼結構後再增加一個共價的二硫鍵，這能夠進一步地穩定形成的杵臼結構。

【0108】 具體地，對於杵-臼形式，除了可以在第一個 Fc 中引入 T366W 突變產生“杵”，在第二個 Fc 引入 T366S、L368A 和 Y407V 突變產生“臼”外。對於電荷對形式，透過在相反的 Fc 結構域中引入連接電荷殘基來穩定離子相互作用，從而有利於異二聚化。例如，第一 Fc 結構域中的 D356K、E357K 和 D399K，以及

第二 Fc 結構域中的 K370E、K409D 和 K439E 突變，或其組合（根據 Kabat EU 編號系統對殘基進行編號）。此外，半胱胺酸可被引入以穩定異二聚體的配對，例如第一 Fc 中的 S234C 和第二 Fc 中的 Y349C，或者第一 Fc 中的 Y349C 和第二 Fc 中的 S344C。將“臼”鏈 435 位的 H 突變成 R、436 位的 Y 突變成 F，這樣可以消除“臼”鏈對 Protein A 的結合作用，以便在純化步驟將“臼”鏈的同源二聚體去除。

【0109】 本發明的多特異性分子可以包括選自下組的各種結構：不對稱 IgG 樣抗體（例如，三功能單株抗體/四價體瘤 (triomab/quadroma)）；鈕孔式抗體 (knobs-into-holes antibodies)；交叉單株抗體 (Cross MAb)；靜電匹配抗體；LUZ-Y；鏈交換工程化結構域 (SEED) 體；Fab 交換抗體；對稱 IgG 類抗體；二合一抗體；交聯的單株抗體，mAb2；Cov X-body；雙可變區結構域 (DVD)-Ig 融合蛋白；IgG 樣雙特異性抗體；Ts2Ab；BsAb；scFv/Fc 融合；雙 (scFv)2-Fabs；F(ab)2 融合蛋白；雙作用或 Bis-Fab；Dock-and-Lock (DNL)；Fab-Fv；scFv 抗體和雙抗體（例如雙特異性 T 細胞銜接子 (BiTEs)）；串聯雙抗體 (Tandab)；DARTs；單鏈雙抗體；TCR 樣抗體；人類血清白蛋白 scFv 融合蛋白，COMBODIES 和 IgG/non-IgG 融合蛋白。

編碼核酸和表現載體

【0110】 本發明還提供了編碼上述抗體或其片段的多核苷酸分子。本發明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因組 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是單鏈的或是雙鏈的。DNA 可以是編碼鏈或非編碼鏈。編碼成熟多肽的

編碼區序列可以與本發明抗體的編碼區序列相同或者是簡併的變異體。如本文所用，“簡併的變異體”在本發明中是指編碼具有與本發明的多肽相同的胺基酸序列，但其編碼區序列有差別的核酸序列。

【0111】 編碼本發明的成熟多肽的多核苷酸包括：只編碼成熟多肽的編碼序列；成熟多肽的編碼序列和各種附加編碼序列；成熟多肽的編碼序列(和任選的附加編碼序列)以及非編碼序列。

【0112】 術語“編碼多肽的多核苷酸”可以是包括編碼此多肽的多核苷酸，也可以是還包括附加編碼和/或非編碼序列的多核苷酸。

【0113】 本發明還涉及與上述的序列雜交且兩個序列之間具有至少 50%，較佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本發明特別涉及在嚴格條件下與本發明所述多核苷酸可雜交的多核苷酸。在本發明中，“嚴格條件”是指：(1)在較低離子強度和較高溫度下的雜交和洗提，如 0.2×SSC，0.1% SDS，60°C；或(2)雜交時加有變性劑，如 50%(v/v)甲醯胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll，42°C等；或(3)僅在兩條序列之間的相同性至少在 90%以上,更好是 95%以上時才發生雜交。並且，可雜交的多核苷酸編碼的多肽與 SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.9 所示的成熟多肽有相同的生物學功能和活性。

【0114】 本發明的抗體的核苷酸全長序列或其片段通常可以用 PCR 擴增法、重組法或人工合成的方法獲得。一種可行的方法是用人工合成的方法來合成有關序列，尤其是片段長度較短時。通常，透過先合成多個小片段，然後再進行連接可獲得序列很長的片段。

此外，還可將重鏈的編碼序列和表現標籤(如 6His)融合在一起，形成融合蛋白。

【0115】 一旦獲得了有關的序列，就可以用重組法來大批量地獲得有關序列。這通常是將其選殖入載體，再轉入細胞，然後透過常規方法從增殖後的宿主細胞中分離得到有關序列。本發明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分離的形式存在的生物分子。

【0116】 目前，已經可以完全透過化學合成來得到編碼本發明蛋白(或其片段，或其衍生物)的 DNA 序列。然後可將該 DNA 序列引入本領域中已知的各種現有的 DNA 分子(或如載體)和細胞中。此外，還可透過化學合成將突變引入本發明蛋白序列中。

【0117】 本發明還涉及包含上述的適當 DNA 序列以及適當啟動子或者控制序列的載體。這些載體可以用於轉形適當的宿主細胞，以使其能夠表現蛋白質。

【0118】 宿主細胞可以是原核細胞，如細菌細胞；或是低等真核細胞，如酵母細胞；或是高等真核細胞，如哺乳動物細胞。代表性例子有：大腸桿菌，鏈黴菌屬；鼠傷寒沙門氏菌的細菌細胞；真菌細胞如酵母；果蠅 S2 或 Sf9 的昆蟲細胞；CHO、COS7、293 細胞的動物細胞等。

【0119】 用重組 DNA 轉形宿主細胞可用本領域技術人員熟知的常規技術進行。當宿主為原核生物如大腸桿菌時，能吸收 DNA 的勝任細胞可在指數生長期後收穫，用 CaCl_2 法處理，所用的步驟在本領域眾所周知。另一種方法是使用 MgCl_2 。如果需要，轉形也可用電穿孔的方法進行。當宿主是真核生物，可選用如下的 DNA

轉染方法：磷酸鈣共沉澱法，常規機械方法如顯微注射、電穿孔、脂質體包裝等。

【0120】 獲得的轉形株可以用常規方法培養，表現本發明的基因所編碼的多肽。根據所用的宿主細胞，培養中所用的培養基可選自各種常規培養基。在適於宿主細胞生長的條件下進行培養。當宿主細胞生長到適當的細胞密度後，用合適的方法(如溫度轉換或化學誘導)誘導選擇的啟動子，將細胞再培養一段時間。

【0121】 在上面的方法中的重組多肽可在細胞內、或在細胞膜上表現、或分泌到細胞外。如果需要，可利用其物理的、化學的和其它特性透過各種分離方法分離和純化重組的蛋白。這些方法是本領域技術人員所熟知的。這些方法的例子包括但並不限於：常規的復性處理、用蛋白沉澱劑處理(鹽析方法)、離心、滲透破菌、超處理、超高速離心、分子篩層析(凝膠過濾)、吸附層析、離子交換層析、高效液相層析(HPLC)和其它各種液相層析技術及這些方法的結合。

【0122】 本發明的抗體可以單獨使用，也可與可檢測標記物(為診斷目的)、治療劑、PK (蛋白激酶)修飾部分或任何以上這些物質的組合結合或偶聯。

【0123】 用於診斷目的的可檢測標記物包括但不限於：螢光或發光標記物、放射性標記物、MRI (核磁共振成像)或 CT (電腦 X 射線斷層掃描技術)造影劑、或能夠產生可檢測產物的酵素。

【0124】 可偶聯的治療劑包括但不限於：胰島素、IL-2、干擾素、降鈣素、GHRH 肽、腸肽類似物、白蛋白、抗體片段、細胞激素、和激素。

組成物

【0125】 本發明還提供了一種組成物。在優選例中，所述的組成物是藥物組成物，它含有上述的抗體或其活性片段或其融合蛋白，以及藥學上可接受的載劑。通常，可將這些物質配製於無毒的、惰性的和藥學上可接受的水性載劑介質中，其中 pH 通常約為 5-8，較佳地 pH 約為 6-8，儘管 pH 值可隨被配製物質的性質以及待治療的病症而有所變化。配製好的藥物組成物可以透過常規途徑進行給藥，其中包括(但並不限於)：口服、呼吸道、瘤內、腹膜內、靜脈內、或局部給藥。

【0126】 本發明的藥物組成物可用於治療癌症/腫瘤，尤其是固態腫瘤，特別是 MUC17 高度表現的固態腫瘤。

【0127】 本發明的藥物組成物含有安全有效量(如 0.001-99 wt%,較佳地 0.01-90 wt%，更佳地 0.1-80 wt%)的本發明上述的單株抗體(或其偶聯物)以及藥學上可接受的載劑或賦形劑。這類載劑包括(但並不限於)：鹽水、緩衝液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其組合。藥物製劑應與給藥方式相匹配。本發明的藥物組成物可以被製成針劑形式，例如用生理鹽水或含有葡萄糖和其他佐劑的水溶液透過常規方法進行製備。藥物組成物如針劑、溶液宜在無菌條件下製造。活性成分的給藥量是治療有效量，例如每天約 1 微克/千克體重-約 10 毫克/千克體重。此外，本發明的藥物組成物還可與其他治療劑一起使用。

【0128】 使用藥物組成物時，是將安全有效量的免疫偶聯物施用於哺乳動物，其中該安全有效量通常至少約 10 微克/千克體重，而且在大多數情況下不超過約 8 毫克/千克體重，較佳地該劑量是

約 10 微克/千克體重-約 1 毫克/千克體重。當然，具體劑量還應考慮給藥途徑、病人健康狀況等因素，這些都是熟練醫師技能範圍之內的。

應用

【0129】 本發明涉及預防、治療和/或檢測癌症/腫瘤或自身免疫性疾病的方法。該方法包括向有需要的受試者施用有效量的本發明的多特異性 T 細胞銜接子或三特異性抗體。另一方面，預防、治療和/或檢測癌症/腫瘤的方法包括向有需要的受試者施用有效量的一種或多種表現本發明的三特異性抗體的表現載體。在另一優選例中，所述癌症/腫瘤為 MUC17 相關的癌症/腫瘤，特徵在於表現 MUC17 的細胞的數量/比例/活性增加的疾病/病症，與在沒有疾病/病症的情況下表現 MUC17 的細胞的數量/比例/活性相比。所述癌症/腫瘤包括固態腫瘤和血液腫瘤。優選地選自下組：胃癌、胃腸癌、結直腸癌、食道癌、胃食道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、子宮體癌、前列腺癌或其組合。

本發明的主要優點包括

(1) 本發明的三特異性抗體能夠同時標靶腫瘤特異性抗原 MUC17、T 細胞表現的 CD3 和共刺激分子 CD28，對標的細胞能激發更強更有效的毒殺活性；並有良好的體外安全性。

(2) 本發明的三特異性抗體具有高純度和良好的理化性質，避免抗體分子在生產和存儲抗體的過程中容易出現的聚集體、降解片段和不完整組裝等問題，有利於工業化生產。

【0130】 下面結合具體實施例，進一步陳述本發明。應理解，這些實施例僅用於說明本發明而不用於限制本發明的範圍。下列實施

例中未註明詳細條件的實驗方法，通常按照常規條件如 Sambrook 等人，分子選殖：實驗室手冊(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的條件，或按照製造廠商所建議的條件。除非另外說明，否則百分比和份數按重量計算。

實施例 1. 抗 MUC17 單株抗體的來源和序列

【0131】 根據 CN202111500224.5 中所述，抗 MUC17 鼠源單株抗體 44H4 的重鏈可變區胺基酸序列如下所示(SEQ ID NO:1):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSFTASGFNIKDTYIHWV
KQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKYGPRFQGKATITADTASNA
AYLQLSSLTSEDVAVYYCARNYGTSYPNAMDYWGQGTSV
TVSS

【0132】 抗 MUC17 鼠源單株抗體 44H4 的輕鏈可變區胺基酸序列如下(SEQ ID NO:2):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVETYGNSFMH
WYQQKPGQPPKLLIYRASSLESGIPARFSGSGSRDFTLTIT
PVEADDVATYFCQQSNEDPYTFGGGGTKLEIK

【0133】 對鼠源單抗 44H4 的重鏈可變區和輕鏈可變區胺基酸序列進行分析，依據 Kabat 編碼規則分別確定其重鏈和輕鏈可變區的互補決定區(complementarity determining region, CDR)和框架區。44H4 重鏈可變區 CDR 胺基酸序列分別為

H-CDR1: DTYIH (SEQ ID NO:3)、H-CDR2: RIDPANGYTKYGPRFQG (SEQ ID NO:4)和 H-CDR3: NYGTSYPNAMDY (SEQ ID NO:5)，

輕鏈可變區 CDR 的胺基酸序列分別為 L-CDR1：RASESVETYGNSFMH (SEQ ID NO：6)、L-CDR2：RASSLES (SEQ ID NO：7)和 L-CDR3：QQSNEDPYT (SEQ ID NO：8)。

【0134】 鼠源 44H4 的人源化過程描述如下。將鼠源單抗 44H4 的重鏈可變區與人抗體重鏈可變區胚系序列進行同源性比較，選擇 IGHV1-46*01 為人源化的模板，將鼠源 44H4 的 3 個重鏈 CDR 移植入 IGHV1-46*01，分別替換 IGHV1-46*01 對應位置的 CDR，並在 H-CDR3 之後加入第四個框架區，獲得 CDR 移植重鏈可變區胺基酸序列。同樣地，將鼠源 44H4 的輕鏈可變區與人抗體輕鏈可變區胚系序列進行同源性比較，選擇 IGKV7-3*01 為人源化的模板，將鼠源 44H4 的 3 個輕鏈 CDR 移植入 IGKV7-3*01 的框架區，分別替換 IGKV7-3*01 對應位置的 CDR，並在 L-CDR3 之後加入第四個框架區，獲得 CDR 移植輕鏈可變區胺基酸序列。在 CDR 移植可變區的基礎上，對框架區的一些位點進行回復突變(回復突變就是將人源框架區的某些胺基酸殘基突變成鼠源框架區同一位置的胺基酸殘基，回復突變的位點一般對維持抗體的結構和/或親和力是至關重要的)。在進行回復突變時，將胺基酸序列進行 Kabat 編碼，位點的位置由 Kabat 碼指示。

【0135】 優選的，對於 CDR 移植後的重鏈可變區，將第 27 位的 Y 回復突變為鼠源的 F，將第 28 位的 T 突變為 N，將第 29 位的 F 突變為 I，將第 30 位的 T 突變為 K，將第 69 位的 M 突變為 I，第 71 位的 R 突變為 A。對於 CDR 移植後的輕鏈可變區，將第 81 位的 N 突變為 D，以消除輕鏈的 N 糖基化位點。上述帶有突變

的重鏈和輕鏈可變區分別定義為 44H4 人源化重鏈可變區(SEQ ID NO：9)和輕鏈可變區(SEQ ID NO：10)。

【0136】 由上海生工生物工程有限公司合成編碼上述人源化重鏈和輕鏈可變區的 DNA。用基因工程的方法將合成的人源化重鏈可變區與人 IgG1 重鏈恆定區(SEQ ID NO：11)相連，獲得全長的人源化重鏈，命名為 44H4-Hu-HC (SEQ ID NO：12)；將人源化輕鏈可變區與人 Kappa 輕鏈恆定區(SEQ ID NO：13)相連，獲得全長的人源化輕鏈，命名為 44H4-Hu-LC (SEQ ID NO：14)。

【0137】 將 44H4-Hu-HC 和 44H4-Hu-LC 的編碼基因分別選殖到 pcDNA3.4 表現載體中，利用 PEI 將重鏈和輕鏈的表現載體共同轉染到 HEK293F 細胞中以表現抗體。5 天後收取 FreeStyle™ 293-F 細胞培養上清液，利用 Protein A 親和層析法純化抗體，所得抗體命名為 44H4-Hu-IgG1。

實施例 2. 抗 CD3 單株抗體的來源和序列

【0138】 鼠源抗人 CD3 單株抗體(簡稱 SP34)的重鏈和輕鏈可變區胺基酸序列分別來自於 US8236308B2 中的 SEQ ID NO：2 和 4，分別對應本發明中的序列 SEQ ID NO：15 和 16。

【0139】 SP34 重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO：15)：

EVKLL ESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWW
RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS
QSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLVTVSA

【0140】 SP34 輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO：16)

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV
QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG
AQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

【0141】 對 SP34 的重鏈和輕鏈可變區胺基酸序列進行分析，依據 Kabat 規則分別確定 SP34 重鏈和輕鏈的互補決定區(CDR)和框架區。

【0142】 SP34 重鏈 3 個 CDR 的胺基酸序列分別為 H-CDR1：TYAMN (SEQ ID NO：17)、H-CDR2：RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO：18)和 H-CDR3：HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO：19)，

輕鏈 3 個 CDR 的胺基酸序列分別為 L-CDR1：RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO：20)、L-CDR2：GTNKRAP (SEQ ID NO：21)和 L-CDR3：ALWYSNLWV (SEQ ID NO：22)。

【0143】 鼠源 SP34 的人源化過程描述如下。將鼠源單抗 SP34 的重鏈可變區與人抗體重鏈可變區胚系序列進行同源性比較，選擇 IGHV3-23*04 為人源化的模板，將鼠源 SP34 的 3 個重鏈 CDR 移植入 IGHV3-23*04，分別替換 IGHV3-23*04 對應位置的 CDR，並在 H-CDR3 之後加入第四個框架區，獲得 CDR 移植重鏈可變區胺基酸序列。同樣地，將 SP34 的輕鏈可變區與人抗體重鏈可變區胚系序列進行同源性比較，選擇 IGLV7-46*01 為輕鏈 CDR 移植模板，將鼠源 SP34 的 3 個輕鏈 CDR 移植入 IGLV7-46*01，分別替換 IGLV7-46*01 對應位置的 CDR，並在 L-CDR3 之後加入第四個框架區，獲得 CDR 移植輕鏈可變區胺基酸序列。在 CDR

移植可變區的基礎上，對框架區的一些位點進行回復突變。在進行回復突變時，將胺基酸序列進行 Kabat 編碼，位點的位置由 Kabat 碼指示。

【0144】 優選的，對於 CDR 移植重鏈可變區，將第 73 位的 N 回復突變為 D，將第 94 位的 K 突變為 R。對於 CDR 移植輕鏈可變區，將第 36 位的 F 突變為 V，第 46 位的 T 突變為 G，第 49 位的 Y 突變為 G，第 57 位的 W 突變為 G，第 58 位的 T 突變為 V。此外，將 CDR 移植重鏈可變區第 2 位的 A 突變為 T，第 96 位的 G (位於 H-CDR3) 突變為 D。此外，對於 CDR 移植輕鏈可變區，將第 24 位的 R 突變為 G，第 33 位的 A 突變為 P，第 94 位的 N (位於 L-CDR3) 突變為 D。上述改造可以進一步提高 SP34 人源化抗體的親和力和穩定性等性能。上述帶有突變的重鏈和輕鏈可變區分別定義為 SP34 人源化重鏈可變區 (SEQ ID NO : 23) 和輕鏈可變區 (SEQ ID NO : 24)。

【0145】 由上海生工生物工程有限公司合成編碼上述人源化重鏈和輕鏈可變區的 DNA。用基因工程的方法將合成的人源化重鏈可變區與人 IgG1 重鏈恆定區 (SEQ ID NO : 11) 相連，獲得全長的人源化重鏈，命名為 SP34-Hu-HC (SEQ ID NO : 25)；將人源化輕鏈可變區與人 Lambda 輕鏈恆定區 (SEQ ID NO : 26) 相連，獲得全長的人源化輕鏈，命名為 SP34-Hu-LC (SEQ ID NO : 27)。

【0146】 將 SP34-Hu-HC 和 SP34-Hu-LC 的編碼基因分別選殖到 pcDNA3.4 表現載體中，利用 PEI 將所得重鏈和輕鏈的表現載體共同轉染到 FreeStyle™ 293-F 細胞中以表現抗體，5 天後收

取 FreeStyle™ 293-F 細胞培養上清液，利用 Protein A 親和層析法從上清液中純化抗體，所得抗體命名為 SP34-Hu-IgG1。

實施例 3. 抗 CD28 單株抗體的來源和序列

【0147】 抗人 CD28 單株抗體(簡稱 Anti-CD28)的重鏈和輕鏈可變區胺基酸序列分別來自於 US20060286104A1 中的 SEQ ID NO：46 和 48，分別對應本發明中的序列 SEQ ID NO：28 和 29。

【0148】 Anti-CD28 重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO：28)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWV
RQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST
AYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVT
VSS

【0149】 Anti-CD28 輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO：29)：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ
QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGTKVEIK

【0150】 對 Anti-CD28 的重鏈和輕鏈可變區胺基酸序列進行分析，依據 Kabat 規則分別確定 Anti-CD28 重鏈和輕鏈的互補決定區(CDR)和框架區。Anti-CD28 重鏈 3 個 CDR 的胺基酸序列分別為 H-CDR1：SYYIH (SEQ ID NO：30)、H-CDR2：CIYPGNVNTNYNEKFKD (SEQ ID NO：31)和 H-CDR3：SHYGLDWNFDV (SEQ ID NO：32)，

輕 鏈 3 個 CDR 的 胺 基 酸 序 列 分 別 為 L-CDR1：HASQNIYVWLN (SEQ ID NO：33)、L-CDR2：KASNLHT (SEQ ID NO：34)和 L-CDR3：QQGQTYPYT (SEQ ID NO：35)。

【0151】 為進一步提高 Anti-CD28 單株抗體的人源化程度，改造其重鏈可變區胺基酸序列，過程描述如下。將 Anti-CD28 重鏈可變區胺基酸序列與人抗體重鏈可變區胚系序列進行同源性比較，選擇 IGHV1-46*01 為參照模板。在此將 Anti-CD28 重鏈可變區框架區的某些胺基酸殘基突變成 IGHV1-46*01 框架區同一位置的胺基酸殘基。在進行突變時，將胺基酸序列進行 Kabat 編碼，位點的位置由 Kabat 碼指示。

【0152】 優選的，對於 Anti-CD28 重鏈可變區胺基酸序列，將其第 48 位的 I 突變為 M，將第 67 位的 A 突變為 V，將第 91 位的 F 突變為 Y。此外，將 Anti-CD28 重鏈可變區 H-CDR2 的第一個胺基酸殘基 C 突變成 S，以避免生產過程中抗體分子之間形成共價的二硫鍵。

【0153】 改造後的 Anti-CD28 重鏈可變區胺基酸序列如下：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYYIHWV
RQAPGQGLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDT
TAYMELSRRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQG
TTVTVSS (SEQ ID NO. 50)

【0154】 由上海生工生物工程有限公司合成編碼上述改造後的 Anti-CD28 重鏈可變區和未改造的 Anti-CD28 輕鏈可變區的 DNA。用基因工程的方法將合成的人源化重鏈可變區與人 IgG1 重

鏈恆定區(SEQ ID NO：11)相連，獲得全長的人源化重鏈，命名為 Anti-CD28-Hu-HC (SEQ ID NO：36)；將 Anti-CD28 輕鏈可變區與人 Kappa 輕鏈恆定區(SEQ ID NO：13)相連，獲得全長的人源化輕鏈，命名為 Anti-CD28-Hu-LC (SEQ ID NO：37)。

【0155】 將 Anti-CD28-Hu-HC 和 Anti-CD28-Hu-LC 的編碼基因分別選殖到 pcDNA3.4 表現載體中，利用 PEI 將所得重鏈和輕鏈表現載體共同轉染到 FreeStyle™ 293-F 細胞中以表現抗體，5 天後收取 FreeStyle™ 293-F 細胞培養上清液，利用 Protein A 親和層析法從上清液中純化抗體，所得抗體命名為 Anti-CD28-Hu-IgG1。

實施例 4. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的建構和製備

【0156】 第一種結構含有三條序列不同的多肽鏈，分別由三條基因編碼，它們的設計和建構方式描述如下。

【0157】 第一條多肽鏈或基因的建構方法描述如下：

【0158】 用基因工程的方法，Anti-CD28-Hu-IgG1 的輕鏈可變區(含 Q100C 突變)透過短人工連接子(在此使用的連接子是 G₄S)連接 SP34-Hu-IgG1 的重鏈可變區，末端再透過長人工連接子(在此使用的連接子是四個串聯的 G₄S)連接 SP34-Hu-IgG1 的輕鏈可變區，末端再透過短人工連接子(在此使用的連接子是 G₄S)連接 Anti-CD28-Hu-IgG1 的重鏈可變區(含 G44C 突變)，末端再透過長人工連接子(在此使用的連接子是三個串聯的 G₄S)連接人 IgG1 的樞紐區和 Fc 段(Fc 段表示人 IgG1 重鏈恆定區的 CH2 和 CH3 結構域)。

【0159】 此處，Fc 段含有 L234A/L235A/G237A 突變以削弱 Fc 與 Fc γ 受體之間的相互作用(參考文獻：Liu R, Oldham R J, Teal E, et al. Fc-engineering for modulated effector functions—improving antibodies for cancer treatment[J]. Antibodies, 2020, 9(4): 64.)，還含有 S354C/T366W 突變以與後述的另一條重鏈多肽形成 Knob-Into-Hole (KIH)結構的異源二聚體(參考文獻：Ha J H, Kim J E, Kim Y S. Immunoglobulin Fc heterodimer platform technology: from design to applications in therapeutic antibodies and proteins[J]. Frontiers in Immunology, 2016, 7: 394.)。

【0160】 第一條多肽鏈或基因命名為 CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC (胺基酸序列 SEQ ID NO：38，核苷酸序列 SEQ ID NO：39)。

【0161】 第二條多肽鏈或基因的建構方法描述如下：

【0162】 44H4-Hu-IgG1 的重鏈可變區與含有多個突變的人 IgG1 重鏈恆定區(包括 CH1、CH2 和 CH3 結構域)相連。此處，Fc 段含有 L234A/L235A/G237A 突變以削弱 Fc 與 Fc γ 受體之間的相互作用，還含有 Y349C/T366S/L368A/Y407V 突變以與前述的另一條重鏈多肽形成 Knob-Into-Hole (KIH)結構的異源二聚體。第二條多肽鏈或基因命名為 44H4-IgG1-Hole-HC (胺基酸序列 SEQ ID NO：40，核苷酸序列 SEQ ID NO：41)。

【0163】 第三條多肽鏈或基因即 44H4-Hu-IgG1 的輕鏈，不做任何改動和修飾。

【0164】 將 CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC、44H4-IgG1-Hole-HC 和 44H4-Hu-LC 的編碼基因分別選殖到 pcDNA3.4 表現載體中，利用 PEI 將所得表現載體共同轉染到 FreeStyle™ 293-F 細胞中以表現抗體，5 天後收取 FreeStyle™ 293-F 細胞培養上清液，利用 Protein A 親和層析法從上清液中純化抗體，所得抗體命名為 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH。

【0165】 該三特異性抗體的結構示意圖如圖 1A 所示，圖中 VL1 和 VH1 分別為抗 CD28 抗體的輕鏈和重鏈可變區，VH2 和 VL2 分別為抗 CD3 抗體的重鏈和輕鏈可變區，VH3 和 VL3 分別為抗 MUC17 抗體的重鏈和輕鏈可變區。直線箭頭和曲線箭頭表示人工設計的銜接子和其方向，雙向直線箭頭表示人工設計的二硫鍵的位置。圖 1A 中的 VL1、VH2、VL2 和 VH1 透過長度不同的銜接子依次相連，最終折疊並組合成 Diabody 的結構(Diabody 的結構可參考文獻 Wu C. Diabodies: molecular engineering and therapeutic applications[J]. Drug News Perspect, 2009, 22(8): 453.)。

【0166】 第二種結構含有三條序列不同的多肽鏈，分別由三條基因編碼，它們的設計和建構方式描述如下。

【0167】 第一條多肽鏈或基因的建構方法描述如下：

【0168】 用基因工程的方法，Anti-CD28-Hu-IgG1 的輕鏈可變區(含 Q100C 突變)透過長人工連接子(在此使用的連接子是四個串聯的 G₄S)連接 Anti-CD28-Hu-IgG1 的重鏈可變區(含 G44C 突變)，末端再透過短人工連接子(在此使用的連接子是兩個串聯的 G₃S)連接 SP34-Hu-IgG1 的輕鏈可變區，末端再透過長人工連接

子(在此使用的連接子是四個串聯的 G₄S)連接 SP34-Hu-IgG1 的重鏈可變區，末端再透過短人工連接子(在此使用的連接子是兩個串聯的 GGGS)連接人 IgG1 的樞紐區和 Fc 段(Fc 段表示人 IgG1 重鏈恆定區的 CH2 和 CH3 結構域)。此處，Fc 段含有 L234A/L235A/G237A 突變以削弱 Fc 與 Fc γ 受體之間的相互作用，還含有 S354C/T366W 突變以與後述的另一條重鏈多肽形成 Knob-Into-Hole (KIH)結構的異源二聚體。第一條多肽鏈或基因命名為 CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC (胺基酸序列 SEQ ID NO：42，核苷酸序列 SEQ ID NO：43)。

【0169】 第二條多肽鏈或基因為 44H4-IgG1-Hole-HC。

【0170】 第三條多肽鏈或基因為 44H4-Hu-LC。

【0171】 將 CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC、44H4-IgG1-Hole-HC 和 44H4-Hu-LC 的編碼基因分別選殖到 pcDNA3.4 表現載體中，利用 PEI 將所得表現載體共同轉染到 FreeStyle™ 293-F 細胞中以表現抗體，5 天後收取 FreeStyle™ 293-F 細胞培養上清液，利用 Protein A 親和層析法從上清液中純化抗體，所得抗體命名為 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH。

【0172】 該三特異性抗體的結構示意圖如圖 1B 所示，圖中 VL1 和 VH1 分別為抗 CD28 抗體的輕鏈和重鏈可變區，VL2 和 VH2 分別為抗 CD3 抗體的輕鏈和重鏈可變區，VH3 和 VL3 分別為抗 MUC17 抗體的重鏈和輕鏈可變區。曲線箭頭表示人工設計的銜接子和其方向，雙向直線箭頭表示人工設計的二硫鍵的位置。

【0173】 圖 1B 中的 VL1、VH1、VL2 和 VH2 透過長度不同的銜接子依次相連，最終折疊並組合成 2 個串聯的 ScFv 的結構(ScFv

的結構可參考文獻 Ahmad Z A, Yeap S K, Ali A M, et al. scFv antibody: principles and clinical application[J]. Clinical and developmental immunology, 2012, 2012:980250.)。

【0174】 本實施例中，在人 IgG1 重鏈恆定區 Fc 段進行突變，分別建構成帶有“杵”結構的重鏈恆定區和帶有“臼”結構的重鏈恆定區。將“臼”鏈 435 位的 H 突變成 R、436 位的 Y 突變成 F，這樣可以消除“臼”鏈對 Protein A 的結合作用，可以在純化步驟將“臼”鏈的同源二聚體去除(參見文獻：Smith E, Olson K, Haber L, et al. A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys[J]. Scientific Reports, 2016, 5(1): 17943-17943.)。將上述“杵”重鏈恆定區和改進後的“臼”重鏈恆定區 Fc 段分別命名為 IgG1-Knob-HC (SEQ ID NO：44)和 IgG1-Hole-HC (SEQ ID NO：45)。

實施例 5. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體結合抗原的能力

【0175】 表現並純化相關重組蛋白的方法說明如下：人類 MUC17 胺基酸序列來自 Uniprot (Entry: Q685J3)，選取其中的第 4131 到 4390 位胺基酸序列，並在其 N 端引入信號肽，在其 C 端引入一個銜接子(G₄S)和 6 個組胺酸殘基，透過基因合成獲得前述重組胺基酸序列的編碼基因，將該重組蛋白的編碼基因選殖到 pcDNA3.4 (購自 Thermo Fisher Scientific)表現載體中，利用 PEI 將表現載體轉入 FreeStyle™ 293-F 細胞(購自 Thermo Fisher Scientific)中以表現重組蛋白，適當時間後收集細胞培養

上清液並過濾，然後用鎳親和層析法從上清液中純化相應重組蛋白，所得重組蛋白命名為 MUC17-His (SEQ ID : 46)。人類 CD28 胺基酸序列來自 Uniprot (Entry: P10747)，選取其中的第 19 到 152 位胺基酸序列，並在其 N 端引入信號肽，在其 C 端引入一個銜接子(G4S)和 6 個組胺酸殘基，透過基因合成獲得前述重組胺基酸序列的編碼基因，透過上述相似的方法表現並純化該重組蛋白，所得重組蛋白命名為 CD28-His (SEQ ID : 47)。

【0176】 此實施例中使用 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)測定抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體對 MUC17、CD3 和 CD28 的結合力，該方法說明如下：

【0177】 用重組蛋白 MUC17-His、CD3-Epsilon (購自 ACROBiosystems，貨號：CDE-H5223)和 CD28-His 分別塗佈微孔盤(96 孔)，各種重組蛋白的塗佈量為 10 ng/孔，用含有 1%牛血清白蛋白的 PBST (PBST 表示含 0.05% Tween-20 的磷酸鹽緩衝液)封阻微孔盤。將待測抗體進行梯度稀釋，然後轉移到上述塗佈重組蛋白的微孔盤中，室溫培育半小時後洗滌培養盤；加入適當稀釋的 HRP (Horseradish Peroxidase)標記的羊抗人抗體(Fc specific，購自 Sigma，貨號：SAB3701283)，室溫培育半小時後洗滌培養盤；每孔加入 100 μ L 以 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)為受質的顯色液，室溫培育 1~5 min；加 50 μ L 終止液(2M H_2SO_4)終止反應；Microplate Reader (型號 SpectraMax 190)讀取 OD450，用 GraphPad Prism7 進行作圖和數據分析，並計算 EC_{50} (concentration for 50% of maximal effect)。

表 1. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體結合抗原的能力

Antibody	EC ₅₀ (nM)		
	MUC17-His	CD3-Epsilon	CD28-His
44H4-Hu-IgG1	0.06507	NA	NA
SP34-Hu-IgG1	NA	0.05533	NA
Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA	0.1166
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	0.06246	0.9199	0.8207
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	0.1732	3.363	1.711

【0178】 表 1 為圖 2A/B/C 中各曲線計算結果的匯總。如圖 2A/B/C 和表 1 所示，44H4-Hu-IgG1、SP34-Hu-IgG1 和 Anti-CD28-Hu-IgG1 均能夠有效地分別結合 MUC17-His、CD3-Epsilon 和 CD28-His，EC₅₀ 分別是 0.06507 nM、0.05533 nM 和 0.1166 nM。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 能有效地結合 MUC17-His、CD3-Epsilon 和 CD28-His，EC₅₀ 分別為 0.06246 nM、0.9199 nM 和 0.8207 nM。CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 也能有效地結合 MUC17-His、CD3-Epsilon 和 CD28-His，EC₅₀ 分別為 0.1732 nM、3.363 nM 和 1.711 nM。

【0179】 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 均能有效地結合 MUC17-His、CD3-Epsilon 和 CD28-His，這說明它們是三特異性抗體。

實施例 6. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體結合細胞表面
抗原的能力

【0180】 用流式細胞儀分別測定抗 MUC17*CD3*CD28 三特异性抗體結合人結腸腺癌細胞 LS 174T (購自 ATCC, 貨號: CL-188) 表面 MUC17, 以及結合人 T 細胞表面 CD3/CD28 的能力。

【0181】 具體方法描述如下: 將 LS 174T 細胞或者新鮮人周邊血液單核細胞(簡稱 PBMC, 購自上海澳能生物技術有限公司, 貨號: FPB002-C-200)接種到 96 孔圓底微孔盤中(每孔 30 萬個細胞), 300 g 離心 5 min, 用多道移液器吸掉上清液, 每孔加入 200 μ L 含有 1% 牛血清白蛋白(BSA)的磷酸鹽緩衝液(PBS)(記作 PBS+1% BSA)重新懸浮細胞團塊, 300 g 離心 5 min, 吸掉上清液。加入梯度稀釋的抗體, 重新懸浮細胞團塊, 室溫培育半小時左右。300 g 離心 5 min, 吸掉上清液, 每孔細胞用 200 μ L PBS 洗滌 2 遍。每孔加入適量用 PBS+1%BSA 以 1:1000 稀釋的 R-Phycoerythrin 標記的 Goat Anti-Human IgG (購自 Jackson ImmunoResearch, 貨號: 109-115-098), 重新懸浮細胞團塊, 室溫培育半小時左右。對於 PBMC, 此處還要加入 APC Mouse Anti-Human CD4 (購自 BD Biosciences, 貨號: 555349)以標記 CD4 陽性 T 細胞。300 g 離心 5 min, 吸掉上清液, 每孔細胞用 200 μ L PBS 洗滌 2 遍。每孔加入 Fix Buffer I (購自 BD Biosciences, 貨號: 557870)以固定細胞, 室溫培育 5 min。300 g 離心 5 min, 吸掉上清液, 每孔細胞用 200 μ L PBS 洗滌 2 遍, 最終用 200 μ L PBS 重新懸浮細胞。在流式細胞儀 CytoFLEX Cytometer System (購自 Beckman Coulter)檢測 PE 通道的螢光強度。對於 PBMC, 此處檢測的是 CD4 陽性 T 細胞的 PE 螢光強度。用流式細胞儀的

軟體處理數據並導出各個樣本 PE 通道的平均螢光強度(MFI)。用 GraphPad Prism 7 進行數據分析和作圖，計算 EC₅₀。

【0182】 此處，引入 Amgen 開發的抗 MUC17*CD3 雙特異性抗體 AMG199 作為對照抗體。AMG199 的胺基酸序列來自 WO2022060901A1 中的 SEQ ID NO: 171。按照上述實施例中的表現和純化方法製備 AMG199。

表 2. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體結合細胞表面抗原的能力

Antibody	LS 174T		CD4 T	
	EC ₅₀ (nM)	Top	EC ₅₀ (nM)	Top
44H4-Hu-IgG1	0.652	3745	NA	NA
SP34-Hu-IgG1	NA	NA	0.6691	39823
Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA	2.38	21894
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	2.265	8072	4.175	31073
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	1.844	7494	2.802	26579
AMG199	0.4247	4068	2.714	12929

【0183】 表 2 為圖 3A/B 中各曲線計算結果的匯總。Top 表示擬合曲線的高平臺，代表抗體結合的理論最大信號強度。

【0184】 如圖 3A 和表 2 所示，44H4-Hu-IgG1、CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 和 AMG199 均能夠有效地結合 LS 174T 細胞，EC₅₀ 分別是 0.652 nM、2.265 nM、1.844 nM 和 0.4247 nM，它們的 Top 分別為 3745、8072、7494 和 4068。

【0185】 上述結果表明，44H4-Hu-IgG1 和 AMG199 對 LS 174T 細胞的結合力是相當的，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和

CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 對 LS 174T 細胞的結合能力是相當的。在高濃度時，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 Top 明顯高於 44H4-Hu-IgG1 和 AMG199，這表明本發明三特異性抗體對細胞表面抗原的結合能力優於後兩者。

【0186】 如圖 3B 和表 2 所示，SP34-Hu-IgG1、Anti-CD28-Hu-IgG1、CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 和 AMG199 均能夠有效地結合 CD4 陽性 T 細胞，EC₅₀ 分別是 0.6691 nM、2.38 nM、4.175 nM、2.802 nM 和 2.714 nM，它們的 Top 分別為 39823、21894、31073、26579 和 12929。

【0187】 上述結果表明，單抗 SP34-Hu-IgG1 對 CD4 T 細胞的結合能力最強，Anti-CD28-Hu-IgG1、CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 對 CD4 T 細胞的結合能力相當，AMG199 的結合能力最弱。

實施例 7. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體對標的細胞的毒殺活性

【0188】 標的細胞的製備方法描述如下：Luciferase 基因序列來源於 GenBank (MK484108.1)，經生工生物工程(上海)股份有限公司合成其編碼基因，將 Luciferase 基因選殖至 pLVX-puro 慢病毒載體中(購自 Clontech，貨號：632164)，獲得的表現載體命名為 pLVX-Luciferase-puro。將慢病毒包裝質體和 pLVX-Luciferase-puro 共同轉染至 HEK293 細胞中，以製備攜帶 Luciferase 基因的重組慢病毒。收集含有重組慢病毒的細胞培養

上清液用以感染 LS 174T 細胞，三天後用 Puromycin 加壓篩選以獲得轉入目的基因的細胞選殖株。最終獲得的穩定表現 Luciferase 的細胞株命名為 LS174T-Luciferase。

【0189】 CD3 陽性 T 細胞(購自上海澳能生物技術有限公司，貨號：FPB009-1-C-100)在此作為效應細胞。在抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的媒介下，效應細胞可以有效活化並毒殺上述建立的腫瘤標的細胞 LS174T-Luciferase。效應細胞的毒殺效果或者標的細胞被毒殺的程度，可以透過測定 Luciferase 的強度反應出來，從而計算出三特異性抗體的功能活性。

【0190】 按照 1:10 的比例將 LS174T-Luciferase 和 CD3 陽性 T 混合，離心並棄掉上清液後用 Advanced RPMI 1640 完全培養基(含有 10% FBS，1% Penicillin Streptomycin，1% GlutaMAX 和 1% 2-Mercaptoethanol)重新懸浮細胞團塊，然後按照每孔 1 萬個 LS174T-Luciferase 細胞的密度將細胞混合物接種到平底 96 孔細胞培養盤中。然後加入梯度稀釋的各種抗體。此外，在若干個孔中加入 0.01% 的 Triton X-100 以完全毒殺標的細胞，在另外若干個孔中補充不含抗體的完全培養基。72 小時之後，用 Bio-Glo™ Luciferase Assay System (購自 Promega，貨號：G7940)測定 Luciferase 強度。加入 Triton X-100 的若干孔的 Luciferase 強度的平均值作為最低背景值，不含抗體的若干孔的 Luciferase 強度的平均值作為細胞增殖程度的最大參考值。抗體毒殺活性(Cytotoxicity)的計算公式為：

Cytotoxicity=(最大參考值-Luciferase)/(最大參考值-最低背景值)*100%

表 3A. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體對標的細胞的毒殺活性

Antibody	EC ₅₀ (pM)	Top (%)
44H4-Hu-IgG1	NA	NA
SP34-Hu-IgG1	432.4	37.76
Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	8.418	97.11
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	25.71	85.14
AMG199	13.63	83.04

表 3B. 抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體對標的細胞的毒殺活性

Antibody	EC ₅₀ (pM)	Top (%)
44H4-Hu-IgG1	NA	NA
SP34-Hu-IgG1	253.3	49.58
Anti-CD28-Hu-IgG1	NA	NA
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	9.284	93.55
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	20.59	85.72
AMG199	10.48	83.91

【0191】 圖 4A 和 4B 分別是兩次獨立重複實驗的結果，兩次實驗中使用的效應細胞來自不同的人類個體，表 3A/B 分別為圖 4A/B 中各曲線計算結果的匯總。Top 表示擬合曲線的高平臺，代表細胞毒性的理論最大強度。

【0192】 圖 4A 和表 3A 結果顯示，單抗 44H4-Hu-IgG1 和 Anti-CD28-Hu-IgG1 沒有毒殺標的細胞 LS174T-Luciferase 的活性，SP34-Hu-IgG1 顯示出較弱的毒殺活性(EC₅₀ 為 432.4 pM，

Top 為 37.76%)。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 和 AMG199 均能夠有效地毒殺 LS174T-Luciferase 細胞，EC₅₀ 分別是 8.418 pM、25.71 pM 和 13.63 pM，它們的 Top 分別為 97.11%、85.14%和 83.04%，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 對標的細胞的毒殺程度最高 (97.11%)。

【0193】 綜合評估後確定，三種抗體對標的細胞的毒殺活性從強到弱的排序為：CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH > AMG199 > CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH。

【0194】 圖 4B 和表 3B 結果顯示，單抗 44H4-Hu-IgG1 和 Anti-CD28-Hu-IgG1 沒有毒殺標的細胞 LS174T-Luciferase 的活性，SP34-Hu-IgG1 顯示出較弱的毒殺活性(EC₅₀ 為 253.3 pM，Top 為 49.58%)。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH、CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 和 AMG199 均能夠有效地毒殺 LS174T-Luciferase 細胞，EC₅₀ 分別是 9.284 pM、20.59 pM 和 10.48 pM，它們的 Top 分別為 93.55%、85.72%和 83.91%，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 對標的細胞的毒殺程度最高 (93.55%)。

【0195】 綜合評估後確定，三種抗體對標的細胞的毒殺活性從強到弱的排序為：CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH > AMG199 > CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH。

實施例 8. 評估抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體相對於雙特異性抗體的優效性

【0196】 分別在單抗 SP34-Hu-IgG1 和 Anti-CD28-Hu-IgG1 的 CDR 中關鍵位置處，引入定點突變，製備各個單抗的系列突變體，用上述實施例 5 中的 ELISA 評估突變體的結合活性，獲得不能再結合各自對應的標的的單抗突變體。圖 5A 結果顯示，在 SP34-Hu-IgG1 重鏈 CDR3 中引入 A101D 突變，製備成的突變體 SP34-Hu-IgG1 (A101D) 不再結合 CD3-Epsilon。圖 5B 結果顯示，在 Anti-CD28-Hu-IgG1 重鏈 CDR1 中引入 H35A 突變，在 CDR3 中引入 H96A 突變，製備成的突變體 Anti-CD28-Hu-IgG1 (H35A+H96A) 不再結合 CD28。

【0197】 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 包含有 SP34-Hu-IgG1 的 VH 和 VL，在 VH 中引入 A101D 突變，重新製備突變後的抗體，並將其分別命名為 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH (-CD3) 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH (-CD3)，突變後的這兩個抗體不再具有結合 CD3-Epsilon 的能力，理論上為可以結合 MUC17 和 CD28 的雙特異性抗體。

【0198】 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 包含有 Anti-CD28-Hu-IgG1 的 VH 和 VL，在 VH 中引入 H35A 和 H96A 突變，重新製備突變後的抗體，並將分別命名為 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH (-CD28) 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH (-CD28)，突變後的這兩個抗體不再具有結合 CD28 的能力，理論上為可以結合 MUC17 和 CD3 的雙特異性抗體。

【0199】 用實施例 7 中的方法，測定上述三特異性抗體及其突變體對標的細胞的毒殺活性。表 4 為圖 6A 中各曲線計算結果的匯總。

【0200】 圖 6A 和表 4 中結果顯示，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 依然能夠有效地毒殺標的細胞，EC₅₀ 分別為 6.6 pM 和 12.99 pM，Top 分別為 97.51%和 96.41%。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH (-CD3)和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH (-CD3)對標的細胞沒有展現出毒殺活性。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH (-CD28)和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH (-CD28)對標的細胞毒殺活性的 EC₅₀ 分別為 117.8 pM 和 87.59 pM，Top 分別為 98.15%和 92.51%，與母代三特異性抗體相比，突變體的活性明顯變弱。

表 4. 三特異性抗體及其突變體對 LS174T-Luciferase 細胞的毒殺活性

Antibody	EC ₅₀ (pM)	Top (%)
44H4-Hu-IgG1	NA	NA
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH	6.6	97.51
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH	12.99	96.41
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD3)	NA	NA
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD3)	NA	NA
CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH(-CD28)	117.8	98.15
CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH(-CD28)	87.59	92.51

【0201】 上述細胞毒殺實驗中，效應細胞為 CD3 陽性 T 細胞，標的細胞為 LS174T-Luciferase。在三特異性抗體或其突變體的媒介下，T 細胞能夠辨識標的細胞表面表現的特異性抗原並被活化，

活化的 T 細胞會分泌一些細胞激素，這些細胞激素能夠進一步活化 T 細胞並增強其毒殺活性。為進一步驗證三特異性抗體相較於雙特異性抗體的優效性，本實施例還測定了上述細胞毒殺反應系統上清液中 INF-gamma 的濃度。上清液中 INF-gamma 濃度的測定方法描述如下：

【0202】 採用抗人 IFN-gamma 抗體(BD Biosciences，貨號：551221)塗佈 ELISA 微孔盤，塗佈量為 0.3 μg /孔，用含有 1%牛血清白蛋白的 PBST (PBST 表示含 0.05% Tween-20 的磷酸鹽緩衝液)封阻微孔盤。用含 1% BSA 的 PBST 配製 IFN-gamma 標準品(BD Biosciences，貨號：554617)。用含 1%BSA 的 PBST 將上述細胞毒殺反應系統的上清液稀釋 4 倍。將梯度稀釋的 IFN-gamma 標準品和 4 倍稀釋的上清液轉移入上述塗佈抗人 IFN-gamma 抗體的微孔盤中，每孔 100 μL ，室溫培育 1 小時；用 PBST 洗滌培養盤 3 次後，每孔加生物素化的抗人 IFN-gamma 抗體(BD Biosciences，貨號：554550。臨用前用含有 1% BSA 的 PBST 稀釋 1000 倍) 100 μL ，室溫培育 0.5 小時；PBST 洗滌培養盤 3 次後，每孔加 Streptavidin HRP (BD Biosciences，貨號：554066。臨用前用含有 1% BSA 的 PBST 稀釋 1000 倍) 100 μL ，室溫培育 0.5 小時；PBST 洗滌培養盤 3 次後，每孔加入 100 μL 以 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)為受質的顯色液，室溫培育 1~5 min；加 50 μL 終止液(2M H_2SO_4)終止反應；Microplate Reader (型號 SpectraMax 190)讀取 OD450，並依據標準曲線計算各孔的 IFN-gamma 濃度；用 GraphPad Prism7 進行作圖和數據分析，並計算 EC_{50} 。

【0203】 圖 6B 結果顯示，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 能有效地刺激 CD3 陽性 T 細胞分泌 IFN-gamma，EC₅₀ 分別為 16.65 pM 和 165.8 pM，抗體在高濃度時可以使 IFN-gamma 分泌量達到 10 ng/mL。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH (-CD3)和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH (-CD3)沒有展現出促進 IFN-gamma 分泌的活性。與母代三特異性抗體相比，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH (-CD28)和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH (-CD28)刺激 T 細胞分泌 IFN-gamma 的活性非常微弱。

【0204】 本實施例的結果表明，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 對標的細胞的毒殺活性和刺激 T 細胞分泌 IFN-gamma 的活性是相關和一致的。

【0205】 CD28 是 T 細胞表面表現的經典共刺激分子，本發明的三特異性抗體在結合 CD3 的同時還可以進一步結合 CD28，從而為 T 細胞的活化提供雙重信號，因此展現出比常規的雙特異性抗體更加有效地活化 T 細胞的毒殺活性。

實施例 9. 評估抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體相對於 CODV-IgG 的優效性

【0206】 CODV-Ig 為賽諾菲的多特異性抗體平臺(參考文獻：Steinmetz A, Vallée F, Beil C, et al. CODV-Ig, a universal bispecific tetravalent and multifunctional immunoglobulin format for medical applications[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2016, 8(5): 867-878.)。借助此平臺，賽諾菲設計了一款標靶 HER2*CD3*CD28 的三特異性抗體(參考文獻：Seung E,

Xing Z, Wu L, et al. A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells[J]. Nature, 2022, 603(7900): 328-334.)。

【0207】 為證明本發明的抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體相對於 CODV-IgG 的優效性，本實施例製備了具有 CODV-IgG 結構和相關抗 CD3/CD28 抗體可變區序列的抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體，製備過程描述如下：

【0208】 CODV-IgG 相關抗 CD3/CD28 抗體重鏈可變區的胺基酸序列來自 US20200140552A1 中的 SEQ ID：64，將該序列與前述多肽 CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC 的重鏈恆定區序列拼接，透過基因工程的方法獲得編碼該重組序列的編碼基因，將這條多肽及其編碼基因命名為 CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-HC (SEQ ID：48)。CODV-IgG 相關抗 CD3/CD28 抗體輕鏈的胺基酸序列來自 US20200140552A1 中的 SEQ ID：61，此處將這條多肽及其編碼基因命名為 CD3-CD28-CODV-LC (SEQ ID：49)。

【0209】 將 CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-HC 和 CD3-CD28-CODV-LC 的編碼基因分別選殖到 pcDNA3.4 表現載體中，並與前述實施例中的 44H4-IgG1-Hole-HC 和 44H4-Hu-LC 表現載體按比例組合後，利用 PEI 將四個表現載體共同轉染到 FreeStyle™ 293-F 細胞中以表現抗體，5 天後收取 FreeStyle™ 293-F 細胞培養上清液，利用 Protein A 親和層析法從上清液中純化抗體，所得抗體命名為 44H4-CD3-CD28-CODV。

【0210】 本實施例對本發明和 CODV-IgG 結構的三特異性抗體進行了活性上的研究和比較，用前述實施例中的方法測定了這些三特異性抗體的毒殺活性，並測定了細胞反應系統中 IFN- γ 的分泌。

【0211】 圖 7A 中結果顯示，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 依然能夠有效地毒殺標的細胞，EC₅₀ 分別為 6.6 pM 和 12.99 pM。44H4-CD3-CD28-CODV 對標的細胞毒殺活性的 EC₅₀ 為 173.2 pM。與本發明的兩種三特異性抗體相比，44H4-CD3-CD28-CODV 的活性明顯變弱。

【0212】 圖 7B 結果顯示，CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 和 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 能有效地刺激 CD3 陽性 T 細胞分泌 IFN- γ ，EC₅₀ 分別為 16.65 pM 和 165.8 pM，抗體在高濃度時可以使 IFN- γ 分泌量達到 10 ng/mL。與本發明的兩種三特異性抗體相比，44H4-CD3-CD28-CODV 刺激 T 細胞分泌 IFN- γ 的活性非常微弱。

實施例 10. 評估抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的體外安全性

【0213】 將 PBMC（購自上海澳能生物技術有限公司，貨號：FPB002-C-200)用 PBS 洗滌兩次，然後用 Advanced RPMI 1640 完全培養基(含有 10% FBS，1% Penicillin Streptomycin，1% GlutaMAX，1% 2-Mercaptoethanol)重新懸浮細胞團塊，計數並調整細胞密度後，接種至 96 孔圓底細胞培養盤中，每孔 30 萬個細胞，每孔 150 μ L。在另一 96 孔微孔盤中用培養基梯度稀釋抗體，取 50 μ L 梯度稀釋好的抗體加入上述細胞培養盤中。將加有抗體

的 96 孔細胞培養盤置於 CO₂ 細胞培養箱中 37°C 培育 2 天。取適量細胞培養上清液，測定其中 IL-2 和 IFN-gamma 的分泌量。

【0214】 IL-2 分泌量的測定方法與上述實施例中 IFN-gamma 的測量方法非常相似，也採用雙抗夾心法，相關試劑購自 BD Biosciences，分別為抗人 IL-2 抗體(貨號：9133977)、IL-2 標準品(貨號：9220085)和生物素化的抗人 IL-2 抗體(貨號：9120557)。棄掉細胞培養盤中多餘上清液之後，用 Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay 套組(購自 Promega，貨號：G7572)測定細胞的增殖情況。

【0215】 實驗結果顯示，SP34-Hu-IgG1 單抗能夠強烈刺激 PBMC 分泌 IL-2 (圖 8A，EC₅₀ 為 7.596 pM)、IFN-gamma (圖 8B，EC₅₀ 為 24.49 pM)，並能夠刺激 PBMC 增殖(圖 8C，EC₅₀ 為 0.4244 pM)。上述體外實驗結果表明，本發明的兩種三特異性抗體在合理濃度範圍內，沒有非特異性地活化 PBMC 細胞。

實施例 11. 評估抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的理化性質

【0216】 抗體是高分子量蛋白質，具有高度複雜的二級和三級結構。由於轉譯後修飾、聚集和降解等變化，抗體在生物化學和生物物理特性方面是異質的。當透過分離技術分析雙特異性抗體時，通常會觀察到變體、聚集體和降解片段，它們的存在可能會損害安全性和有效性。在生產和存儲抗體的過程中容易出現聚集體、降解片段和不完整組裝的分子。

【0217】 本發明使用高效液相層析-粒徑篩析層析(High-performance liquid chromatography-size exclusion

chromatography, HPLC-SEC) 檢測樣品中上述雜質的含量。聚集體的分子量要大於單體，因此相應峰的保留時間較短；降解片段或不完整組裝分子的分子量要小於單體，因此相應峰的保留時間較長。HPLC-SEC 所用層析儀為 Dionex Ultimate 3000；流動相配製方法如下：取適量 20 mM 磷酸二氫鈉儲備溶液，用 20 mM 磷酸氫二鈉調節 PH 至 6.8 ± 0.1 ；進樣量：20 μg ；層析管柱為 TSK G3000SWXL，規格為 $7.8 \times 300\text{mm}$ 5 μm ；流速 0.5 mL/min，洗提時間 30 min；管柱溫度 25°C，樣品室溫度 10°C；檢測波長 214 nm。

【0218】 圖 9A 是 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 的 HPLC-SEC 圖譜，其中保留時間為 16.263 分鐘的主峰占比為 98.8%。圖 9B 是 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 HPLC-SEC 圖譜，其中保留時間為 15.997 分鐘的主峰占比為 98.2%。這兩個三特異性抗體的主峰占比相近，說明它們的 SEC 純度相當。

【0219】 本發明使用 CE-SDS (Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate) 分析樣品中降解片段或不完整組裝的分子的含量。CE 分為非還原和還原兩種類型，用於前者的樣品在變性時不需要用還原劑 DTT 將分子內的二硫鍵破壞，而用於後者的樣品在變性時需要用還原劑 DTT 將分子內的二硫鍵破壞。非還原和還原 CE-SDS 分別記作 NR-CE-SDS 和 R-CE-SDS。所用毛細管電泳儀為 ProteomeLab™ PA800 plus (Beckman Coulter)，配備 UV 214 nm 檢測器，毛細管型號為 Bare Fused-Silica Capillary，規格 $30.7\text{ cm} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ ，有效長度 20.5 cm；其

它相關試劑購自 Beckman Coulter。儀器關鍵參數設置如下：毛细管管和樣品室溫度為 $20\pm2^{\circ}\text{C}$ ，分離電壓為 15 kV。

【0220】 圖 10A 和圖 10B 分別是 CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 的 NR-CE-SDS 和 R-CE-SDS 圖譜，圖 10C 和圖 10D 分別表示 CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 NR-CE-SDS 和 R-CE-SDS 圖譜。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 的 NR-CE-SDS 主峰占比 97.5%，CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 NR-CE-SDS 主峰占比 98.1%。CD28-44/SP34-Dia+44H4-KIH 的 R-CE-SDS 主峰 3、8 和 11 (分別對應該三特異性抗體的分子量由小到大的三條多肽鏈)占比分別為 15.5%、32.5%和 50.7%，三者峰面積占比之和為 98.7%。CD28-44/SP34-ScFv+44H4-KIH 的 R-CE-SDS 主峰 2、6 和 10 (分別對應該三特異性抗體的分子量由小到大的三條多肽鏈)占比分別為 15.6%、32.2%和 50.8%，三者峰面積占比之和為 98.6%。

【0221】 上述結果表明，本發明的兩種三特異性抗體的 SEC 純度均高於 98%，CE 測得的純度接近或者高於 98%，這表明它們的純度較高，理化性質良好。

實施例 12 評估抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體的動物抑瘤藥效

【0222】 利用人周邊血液單核細胞 hPBMC 在 NOG (維通利華) 小鼠體內重建人源免疫系統，並在此小鼠上建立經改造的人結腸癌 LS174T-MUC17 皮下移植瘤模型，用以評估 MUC17*CD3*CD28 三特異抗體的體內抗腫瘤效果。標的細胞的製備方法描述如下：將 MUC17 基因選殖至 pLVX-puro 慢病毒載體中(購自 Clontech，

貨號： 632164)，獲得的表現載體命名為 Muc17-plvx。將慢病毒包裝質體和 Muc17-plvx 共同轉染至 HEK293 細胞中，收集含有重組慢病毒的細胞培養上清液用以感染 LS 174T 細胞，三天後用 Puromycin 加壓篩選以獲得轉入目的基因的細胞選殖株。最終獲得的穩定表現 MUC17 的細胞株命名為 LS174T-MUC17。具體實施步驟如下：腫瘤細胞接種前 10 天，體外復甦購買的 PBMC (Peripheral blood mononuclear cell，周邊血液單核細胞，澳能生物，貨號 FPB004F-C)，用 PBS 重新懸浮 PBMC 細胞，將 PBMC 懸浮液濃度調整為 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。經小鼠尾靜脈注射，每隻小鼠接種 200 μL PBMC 細胞懸浮液，即每隻小鼠接種 5×10^6 個 PBMC 細胞。10 天後，收集體外培養的經改造的人結腸癌 LS174T-MUC17 細胞，將細胞懸浮液濃度調整為 $4 \times 10^7/\text{mL}$ ，與基質膠以 1:1 等體積混合。在無菌條件下，接種 100 μL 細胞懸浮液於 NOG 小鼠右側肋部皮下。待接種的腫瘤細胞在皮下形成固態腫瘤，體積約 50-100 mm^3 ，根據腫瘤體積將小鼠隨機分組。空白對照組，僅注射生理鹽水，作為對照；陽性對照抗體 AMG199 組，給藥劑量 0.5 mg/kg ；MUC17*CD3*CD28 組，劑量 0.5 mg/kg 。隨後，按照上述設計好的方案給藥，每週給藥 2 次，共給藥 5 次，每週測定腫瘤體積 2 次。最終，測定的各組腫瘤隨時間的生長曲線如圖 11 所示。

【0223】 結果表明：抗 MUC17*CD3*CD28 三特異性抗體相對 AMG199 具有相對較高的抑瘤藥效。

序列表

【0224】 抗 MUC17 鼠源單株抗體 44H4 的重鏈可變區胺基酸序列如下(SEQ ID NO：1)：

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSFTASGFNIKDTYIHWV
KQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKYGPRFQGKATITADTASNA
AYLQLSSLTSEDTA VYYCARNYGTSYPNAMDYWGQGTSV
TVSS

【0225】 抗 MUC17 鼠源單株抗體 44H4 的輕鏈可變區胺基酸序列如下(SEQ ID NO：2)：

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVETYGNSFMH
WYQQKPGQPPKLLIYRASSLESIGIPARFSGSGSRDFTLTIT
PVEADDVATYFCQQSNEDPYTFGGGGTKLEIK

【0226】 鼠源單抗 44H4 的 H-CDR1 (SEQ ID NO. 3)
DTYIH

【0227】 鼠源單抗 44H4 的 H-CDR2 (SEQ ID NO. 4)
RIDPANGYTKYGPRFQG

【0228】 鼠源單抗 44H4 的 H-CDR3 (SEQ ID NO. 5)
NYGTSYPNAMDY

【0229】 鼠源單抗 44H4 的 L-CDR1 (SEQ ID NO. 6)
RASESVETYGNSFMH

【0230】 鼠源單抗 44H4 的 L-CDR2 (SEQ ID NO. 7)
RASSLES

【0231】 鼠源單抗 44H4 的 L-CDR3 (SEQ ID NO. 8)
QQSNEDPYT

【0232】 44H4 人源化重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO:9):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWV
RQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGPRFQGRVTITADTSTS
TVYMELSSLRSED TAVYYCARNYGTSYPNAMDYWGQGTL
VTVSS

【0233】 44H4 人源化輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO : 10) :

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVETYGNSFMH
WYQQKPGQPPKLLIYRASSLES GVPARFSGSGSGTDFTLTI
NPVEADDTANYYCQQSNEDPYTFGQGTKVEIK

【0234】 人 IgG1 重鏈恆定區胺基酸序列(SEQ ID NO : 11) :

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

【0235】 44H4-Hu-HC 胺基酸序列(SEQ ID NO : 12) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWV
RQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGPRFQGRVTITADTSTS
TVYMELSSLRSED TAVYYCARNYGTSYPNAMDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP

VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【0236】 人 Kappa 輕鏈恆定區胺基酸序列(SEQ ID NO : 13) :

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0237】 44H4-Hu-LC 胺基酸序列(SEQ ID NO : 14) :

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVETYGNSFMH
WYQQKPGQPPKLLIYRASSLESQVPAARFSGSGSGTDFTLT
NPVEADDTANYCQQSNEDPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0238】 SP34 重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO : 15) :

EVKLLESGLLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWW
RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS
QSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLVTVSA

【0239】 SP34 輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO : 16) :

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV
QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITG
AQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

【0240】 SP34 抗體 H-CDR1 (SEQ ID NO. 17)

TYAMN

【0241】 SP34 抗體 H-CDR2 (SEQ ID NO. 18)

RIRSKYNNYATYYADSVKD

【0242】 SP34 抗體 H-CDR3 (SEQ ID NO. 19)

HGNFGNSYVSWFAY

【0243】 SP34 抗體 L-CDR1 (SEQ ID NO. 20)

RSSTGAVTTSNYAN

【0244】 SP34 抗體 L-CDR2 (SEQ ID NO. 21)

GTNKRAP

【0245】 SP34 抗體 L-CDR3 (SEQ ID NO. 22)

ALWYSNLWV

【0246】 SP34 人源化重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO : 23) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWV
RQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS

【0247】 SP34 人源化輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO : 24) :

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNW
VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAATL
SGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGGTKLTVL

【0248】 SP34-Hu-HC 胺基酸序列(SEQ ID NO : 25) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWW
RQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSFGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

【0249】 Lambda 輕鏈恆定區胺基酸序列(SEQ ID NO : 26) :

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV
TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【0250】 SP34-Hu-LC 胺基酸序列(SEQ ID NO : 27) :

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNW
VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAATL
SGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGGTKLTVLGQPKAAP

SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP
VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ
VTHEGSTVEKTVAPTECS

【0251】 Anti-CD28 重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO :
28) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWV
RQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST
AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVT
VSS

【0252】 Anti-CD28 輕鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO :
29) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ
QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQGQTPYTFGGGGTKVEIK

【0253】 Anti-CD28 抗體 H-CDR1 (SEQ ID NO. 30)
SYYIH

【0254】 Anti-CD28 抗體 H-CDR2 (SEQ ID NO. 31)
CIYPGNVNTNYNEKFKD

【0255】 Anti-CD28 抗體 H-CDR3 (SEQ ID NO. 32)
SHYGLDWNFDV

【0256】 Anti-CD28 抗體 L-CDR1 (SEQ ID NO. 33)
HASQNIYVWLN

【0257】 Anti-CD28 抗體 L-CDR2 (SEQ ID NO. 34)
KASNLHT

【0258】 Anti-CD28 抗體 L-CDR3 (SEQ ID NO. 35)

QQGQTYPYT

【0259】 Anti-CD28-Hu-HC 胺基酸序列(SEQ ID NO：36)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWV
RQAPGQGLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTSSIS
TAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【0260】 Anti-CD28-Hu-LC 胺基酸序列(SEQ ID NO：37)：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ
QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

【0261】 CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC 的胺基酸序列
(SEQ ID NO：38)：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIYVWLNWYQ
QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGCGTKVEIKGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL
EWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCARHDNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPSLTVSPGGT
LTCGSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPG
VPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSDLW
VFGGGTKLTVLGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK
ASGYTFTSYIHWVRQAPGQCLEWMGSIYPGNVNTNYNE
KFKDRVTLTVDTSTAYMELSRRLRSDDTAVYYCTRSHYG
LDWNFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHTC
PPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0262】 CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-HC 的核苷酸序列
(SEQ ID NO : 39) :

GACATCCAGATGACCCAGAGTCCCAGCAGCCTGTCT
GCTTCTGTGGGAGATAGAGTGACAATTACATGTCATGCTT
CTCAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAGCAGA

AACCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCTT
CTAACCTGCACACAGGCGTGCCTTCTAGATTTTCTGGATC
TGGCTCCGGAACAGATTTTACTCTGACCATCTCTAGCCTG
CAGCCAGAAGATTTTGCCACCTATTATTGTCAGCAGGGAC
AGACCTACCCTTACACATTTGGCTGCGGGCACAAAGGTGG
AGATCAAGGGTGGAGGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTG
GAGTCTGGCGGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGGCTCTCTG
AGACTGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTTTCTACCT
ATGCTATGAATTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGGCC
TGGAGTGGGTGTCTAGAATCAGATCTAAGTATAATAATTA
CGCTACCTATTATGCTGATTCTGTGAAGGACAGATTCACA
ATCTCTAGAGATGATTCTAAGAATACCCTGTATCTGCAGA
TGA ACTCTCTGAGAGCTGAGGATACCGCTGTGTATTACTG
TGCTAGACATGACAATTTTGGCAACTCTTATGTGTCTTGG
TTTGCTTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGAGC
TCTGGTGGAGGGCGGTTCAGGCGGGCGGAGGCAGCGGAGG
TGGCGGGAGTGGAGGGGGGTGGCTCTCAGACCGTGGTGA
CACAGGAGCCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGGCACC
GTGACCCTGACCTGCGGGCTCCTCCACAGGCGCCGTGACC
ACCTCCA ACTACCCCAACTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGC
CAGGCCCCAAGGGGGCCTGATCGGCGGGACCAATAAGAGG
GCCCCCGGCGTGCCCGCTAGATTCTCTGGCTCTCTTCTGG
GAGGAAAGGCTGCTCTGACACTGTCTGGAGCTCAGCCCG
AGGATGAGGCTGAATACTATTGTGCTCTGTGGTATTCTGA

TCTGTGGGTGTTTGGCGGTGGA ACTAACTTACAGTTCT
GGGCGGGGGCGGTAGCCAGGTGCAGCTGGTCCAGAGCG
GAGCCGAGGTGAAGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTG
AGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACTTTTACCTCTTACTACA
TTC ACTGGGTGAGACAGGCTCCCGGCCAGTGCCTGGAGT
GGATGGGATCCATCTATCCTGGAAATGTGAACACCAACTA
TAATGAGAAGTTTAAAGATAGAGTGACCCTGACCGTGGA
TACATCTATCTCTACCGCTTATATGGAGCTGTCTAGACTGA
GATCCGATGACACAGCTGTGTATTATTGTACCAGATCTCA
TTACGGACTGGATTGGAATTTTGATGTGTGGGGGCCAGGG
CACCAAGTGACCGTGTCTTCTGGTGGGGGGTGGTTCAGG
GGGTGGTGGAAGTGGCGGTGGAGGGAGTGACAAGACCC
ACACATGTCCCCCCTGTCCCGCTCCTGAAGCTGCAGGAG
CCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACAC
CCTGATGATTTCCAGGACACCCGAGGTGACCTGTGTGGT
GGTGGACGTCAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAA
CTGGTACGTCGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGAC
CAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAATTCCACCTACAGGGT
GGTGTCCGTGCTGACCGTCCTCCATCAGGACTGGCTGAA
CGGCAAAGAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCT
CCCTGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAAGCCAAGGG
CCAGCCCAGGGAACTCAAGTCTATACCCTGCCTCCCTG
CAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAGCCTCTGGTG
CCTCGTCAAGGGCTTCTATCCTTCCGATATTGCCGTCGAG

TGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAACAACACTACAAGAC
AACACCCCCCGTGCTCGATTCCGATGGCAGCTTCTTCCTG
TACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAACAA
GGCAACGTCTTCAGTTGCAGCGTCATGCATGAGGCCCTC
CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCCT
GGAAAG

【0263】 44H4-IgG1-Hole-HC 的胺基酸序列(SEQ ID NO :
40) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWV
RQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGPRFQGRVTITADTSTS
TVYMELSSLRSEDVAVYYCARNYGTSYPNAMDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNR
TQKSLSLSPGK

【0264】 44H4-IgG1-Hole-HC 的核苷酸序列(SEQ ID NO :
41) :

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAG
AAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGGTGTCTTGTAAGGCTTCT

GGCTTTAATATCAAGGATACATATATCCATTGGGGTGAGAC
AGGCCCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGAATCG
ATCCAGCTAATGGCTACACCAAGTATGGCCCTAGATTTCA
GGGAAGAGTGACCATCACAGCTGATACATCTACCTCCAC
CGTGTATATGGAGCTGTCCTCTCTGAGATCTGAGGATACA
GCTGTGTATTATTGTGCTAGAAATTATGGCACATCTTACCC
TAATGCTATGGATTACTGGGGACAGGGAACACTGGTGAC
AGTGAGCTCTGCTTCCACCAAAGGACCCAGCGTGTTTCC
TCTGGCCCCCTTCCAGCAAGAGCACCCAGCGGAGGCACAGC
TGCCCTGGGATGCCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAGCC
CGTGACAGTCAGCTGGAACTCCGGCGCTCTGACCTCCGG
CGTCCACACCTTTTCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT
GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCCTAGCTCCAG
CCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA
GCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTA
AGAGCTGTGACAAGACCCACACATGCCCTCCTTGTCTG
CTCCTGAAGCCGCCGGCGCACCTTCCGTGTTTCTGTTCC
CCCCTAAGCCCAAGGATACCCTCATGATTTCCAGGACCCC
CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGA
GGTCCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGT
ACAATAGCACCTACCGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGC
TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
AGGTCAGCAACAAGGCCCTCCCTGCCCCCCATCGAGAAGA

CCATTTCCAAGGCTAAGGGACAGCCTCGGGGAACCCCAAG
TGTGCACCCTGCCTCCTAGCAGGGATGAGCTGACCAAGA
ACCAGGTGAGCCTGAGCTGTGCTGTGAAGGGCTTCTACC
CTTCCGACATCGCTGTCGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC
CCGAGAATAACTACAAGACAACCCCCCCCCCGTGCTCGACA
GCGATGGCAGCTTCTTTCTGGTGTCCAAGCTCACCGTGG
ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCCTGCT
CCGTCATGCACGAGGCCCTGCACAACCGCTTCACACAGA
AGTCCCTGTCCCTGTCCCCTGGAAAG

【0265】 CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC 的胺基酸序
列(SEQ ID NO : 42) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICHASQNIYVWLNWYQ
QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
SYYIHWVRQAPGQCLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRV
LTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSYGLDWNFDV
WGQGTTVTVSSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT
CGSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVP
ARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVF
GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG
LVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVS
RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVTVSSGGG

SGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0266】 CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-HC 的核苷酸序
列(SEQ ID NO : 43) :

GACATCCAGATGACCCAGAGTCCCAGCAGCCTGTCT
GCTTCTGTGGGAGATAGAGTGACAATTACATGTCATGCTT
CTCAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAGCAGA
AACCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCTT
CTAACCTGCACACAGGCGTGCCCTTCTAGATTTTCTGGATC
TGGCTCCGGAACAGATTTTACTCTGACCATCTCTAGCCTG
CAGCCAGAAGATTTTGCCACCTATTATTGTCAGCAGGGAC
AGACCTACCCTTACACATTTGGCTGCGGCACAAAGGTGG
AGATCAAGGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGCGGAGGCAGC
GGAGGTGGCGGGAGTGGAGGGGGGTGGCTCTCAGGTGCA
GCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCG
CCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACTT
TTACCTCTTACTACATTCACTGGGTGAGACAGGCTCCCGG
CCAGTGCCTGGAGTGGATGGGATCTATCTATCCTGGAAAT
GTGAACACCAACTATAATGAGAAGTTTAAAGATAGAGTG
ACCCTGACCGTGGATACATCTATCTCTACCGCTTATATGG

AGCTGTCTAGACTGAGATCCGATGACACAGCTGTGTATTA
TTGTACCAGATCTCATTACGGACTGGATTGGAATTTTGAT
GTGTGGGGGCCAGGGGCACCACAGTGACCGTGTCTTCTGGG
GGCGGTAGCGGGGGGCGGGTCTCAGACCGTGGTGACACA
GGAGCCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGGCACCGTGAC
CCTGACCTGCGGGCTCCTCCACCGGCGCCGTGACCACCTC
CAACTACCCCAACTGGGTGCAGCAGAAGCCCCGGCCAGGC
CCCAAGGGGGCCTGATCGGCGGGCACCAATAAGAGGGGCCCC
CGGCGTGCCCGCTAGATTCTCTGGCTCTCTTCTGGGAGG
AAAGGCTGCTCTGACACTGTCTGGAGCTCAGCCCGAGGA
TGAGGCTGAATACTATTGTGCTCTGTGGTATTCTGATCTG
TGGGTGTTTGGCGGTGGAACATAAATTACAGTTCTGGGT
GGGGGTGGTTCAGGGGGGTGGTGGAAGTGGCGGTGGAGG
GAGTGGTGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGT
CTGGCGGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGGCTCTCTGAGAC
TGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTTTCTACCTATGCT
ATGAATTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAG
TGGGTGTCTAGAATCAGATCTAAGTATAATAATTACGCTA
CCTATTATGCTGATTCTGTGAAGGACAGATTCACAATCTC
TAGAGATGATTCTAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAAC
TCTCTGAGAGCTGAGGATACCGCTGTGTATTACTGTGCTA
GACATGACAATTTTGGCAACTCTTATGTGTCTTGGTTTGC
TTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGAGCTCTGG
CGGGGGATCAGGAGGTGGCAGTGACAAGACCCACACAT

GTCCCCCCTGTCCCGCTCCTGAAGCTGCAGGAGCCCCCTT
CCGTGTTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGAT
GATTTCCAGGACACCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGGA
CGTCAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTA
CGTCGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCAAGCC
CAGGGAGGAGCAGTACAATTCCACCTACAGGGTGGTGTC
CGTGCTGACCGTCCTCCATCAGGACTGGCTGAACGGCAA
AGAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTCCCTGC
TCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAAGCCAAGGGCCAGCC
CAGGGAACCTCAAGTCTATACCCTGCCTCCCTGCAGGGA
TGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAGCCTCTGGTGCCTCGT
CAAGGGCTTCTATCCTTCCGATATTGCCGTCGAGTGGGAG
TCCAACGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACACC
CCCCGTGCTCGATTCCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC
AAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAACAAGGCAA
CGTCTTCAGTTGCAGCGTCATGCATGAGGCCCTCCACAA
CCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCCTGGAAA
G

【0267】 IgG1-Knob-HC 胺基酸序列(SEQ ID NO : 44) :

DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA

VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0268】 IgG1-Hole-HC 胺基酸序列(SEQ ID NO : 45) :

DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVQLHWDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

【0269】 MUC17-His 的胺基酸序列(SEQ ID : 46) :

RTTTCFGDGCQNTASRCKNGGTWDGLKCQCPNLYYGE
LCEEVVSSIDIGPPETISAQMELTVTVTSVKFTEELKNHSSQ
EFQEFKQTFTEQMNIVYSGIPEYVGVNITKLRLGSVVVEHD
VLLRTKYTPEYKTVLDNATEVVKEKITKVTTQQIMINDICS
DMMCFNTTGTQVQNITVTQYDPEEDCRKMAKEYGDYFVV
EYRDQKPYCISPCEPGFSVSKNCNLGKCQMSLSGPQCLCV
TTETHWYSGETCNQGTQKSLGGGGSHHHHHH

【0270】 CD28-His 的胺基酸序列(SEQ ID : 47) :

NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLH
KGLDSAVEVCVVYGNYSQQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESV
TFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK
GKHLCPSPFLPGPSKPGGGGSHHHHHH

【0271】 CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-HC 的胺基酸序列
(SEQ ID : 48) :

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWV
RQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYAQKFQGRATLTVDTSIST
AYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVT
VSSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMH
WVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNSYATYYADSVKGRFTISRD
DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQG
TLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

【0272】 CD3-CD28-CODV-LC 的胺基酸序列(SEQ ID : 49) :

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYL
SWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAP
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYVWLNWYQQKP
GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
IATYYCQQGQTYPTYTFGQGKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN

SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

【0273】 改造後的 Anti-CD28 重鏈可變區胺基酸序列(SEQ ID NO：50)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWV
RQAPGQGLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTSS
TAYMELSRRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV
TVSS

【0274】 人源化 SP34 抗體的 H-CDR3 (SEQ ID NO. 51)
HDNFGNSYVSWFAY

【0275】 人源化 SP34 抗體 L-CDR3 (SEQ ID NO. 52)
ALWYSDLWV

【0276】 人源化 Anti-CD28 抗體 H-CDR2 (SEQ ID NO.
53) SIYPGNVNTNYNEKFKD

【0277】 在本發明提及的所有文獻都在本申請中引用作為參考，就如同每一篇文獻被單獨引用作為參考那樣。此外應理解，在閱讀了本發明的上述講授內容之後，本領域技術人員可以對本發明作各種改動或修改，這些等價形式同樣落於本申請所附申請專利範圍所限定的範圍。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="NP1692-M-Sequence.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-04-12">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>113109700</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2024-03-15</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>P2024-0267</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>CN</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>202310261481.0</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-03-15</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">大陸商三生國健藥業(上海)股份有限公司
</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO.,
LTD.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">抗MUC17*CD3*CD28三特異性抗體</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>53</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q107">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VH of murine monoclonal
antibody 44H4 against MUC17</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q108">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQQSGAELVKPGASVKLSFTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKYGP
RFQGGKATITADTASNAAYLQLSSLTSEDTAIVYYCARNYGTSPNAMYWGQGTSTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q109">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VL of murine monoclonal
antibody 44H4 against MUC17</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q110">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVETYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESGI
PARFSGSGSRRTDFTLTITPVEADDVATYFCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql11">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>H-CDR1 of murine monoclonal antibody
44H4</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql12">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DTYIH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql13">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>H-CDR2 of murine monoclonal antibody
44H4</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql14">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RIDPANGYTKYGPRFQG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql15">
```

```

    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>H-CDR3 of murine monoclonal antibody
44H4</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q116">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>NYGTSYPNAMDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q117">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>L-CDR1 of murine monoclonal antibody
44H4</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q118">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RASESVETYGNSFMH</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql19">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>L-CDR2 of murine monoclonal antibody
44H4</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql20">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RASSLES</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="ql21">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>L-CDR3 of murine monoclonal antibody
44H4</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="ql22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQSNEDPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql23">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VH of 44H4 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql24">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGP
RFQGRVTITADTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCARNYGTSTYPNAMYWGQGTTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql25">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VL of 44H4 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql26">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVETYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESGV
PARFSGSGSGTDFTLTINPVEADDTANYYCQQSNEDPYTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql27">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of human IgG1 heavy chain
constant region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql28">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="ql29">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of 44H4-Hu-
HC</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="ql30">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGP
RFQGRVTITADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYGTSYPNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql31">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of human Kappa light chain
constant region</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql32">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>218</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..218</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
```

```
<INSDQualifier id="q133">
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of 44H4-Hu-
LC</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q134">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVETYGNFSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASSLESQV
PARFSGSGSGTDFTLTINPVEADDTANYYCQQSNEDPYTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</IN
SDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>125</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..125</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q135">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VH of SP34
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q136">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVKLLESGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPKGLEWVARIRSKYNNYATYY
ADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSA</INSDSeq_sequenc
e>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>109</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..109</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q137">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VL of SP34
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q138">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPA
RFGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>

```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql39">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>H-CDR1 of SP34 antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql40">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>TYAMN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="ql41">
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>H-CDR2 of SP34 antibody</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="ql42">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RIRSKYNNYATYYADSVKD</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql43">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>H-CDR3 of SP34 antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HGNFGNSYVSWFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q145">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>L-CDR1 of SP34 antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q146">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RSSTGAVTTSNYAN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql47">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>L-CDR2 of SP34 antibody</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql48">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GTNKRAP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql49">
```

```

    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>L-CDR3 of SP34 antibody</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q150">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ALWYSNLWV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>125</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..125</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q151">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VH of SP34 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q152">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYY
ADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequenc
e>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 24" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>109</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..109</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q153">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VL of SP34 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q154">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPA
RFGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGTKLTVL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 25" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>455</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..455</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql55">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of SP34-Hu-
HC</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql56">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYY
ADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql57">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of lambda light chain constant
region</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql58">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>215</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..215</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql59">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of SP34-Hu-
LC</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q160">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPA
RFGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF
YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q161">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VH of anti-
CD28</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q162">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNE
KFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql63">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VL of anti-
CD28</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql64">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF
SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPTYFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql65">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>H-CDR1 of Anti-CD28 antibody</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql66">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SYYIH</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql67">
```

```
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>H-CDR2 of Anti-CD28 antibody</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="ql68">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CIYPGNVNTNYNEKFKD</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql69">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>H-CDR3 of Anti-CD28 antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql70">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SHYGLDWNFDV</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 33">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql71">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>L-CDR1 of Anti-CD28 antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql72">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>HASQNIYVWLN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 34">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql73">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>L-CDR2 of Anti-CD28 antibody</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql74">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KASNLHT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql75">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>L-CDR3 of Anti-CD28 antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql76">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQGQTYPYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 36" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>450</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..450</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql77">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of anti-CD28-Hu-
HC</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql78">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGSIYPGNVNTNYNE
KFKDRVTLTVDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_se
```

```
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 37">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql79">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of anti-CD28-Hu-
LC</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql80">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 38">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>733</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..733</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql81">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-
HC</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql82">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGCGTKVEIKGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
TYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDNFGNSYVS
WFAYWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWWQQKPGQA
PRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLVQSGAEV
KKPGASVKVSCASGYTFTSYIHWVRQAPGQCLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTISIAYMELSRLRSDDT
AVYYCTRSHYGLDNFVDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>2199</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..2199</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql83">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nucleotide sequence of CD28-44-SP34-Dia-IgG1-Knob-
HC</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="ql84">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GACATCCAGATGACCCAGAGTCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTGTGGGAGATAGAGTGACAAT
TACATGTCATGCTTCTCAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGA
TCTACAAGGCTTCTAACCTGCACACAGGCGTGCCTTCTAGATTTTCTGGATCTGGCTCCGGAACAGATTTTACTCTGACC
ATCTCTAGCCTGCAGCCAGAAGATTTTGCCACCTATTATTGTCAGCAGGGACAGACCTACCCTTACACATTTGGCTGCGG
CACAAAGGTGGAGATCAAGGGTGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGCG
GCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTTTCTACCTATGCTATGAATTGGGTGAGACAGGCTCCTGGC
AAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTAGAATCAGATCTAAGTATAATAATTACGCTACCTATTATGCTGATTCTGTGAAGGACAG
ATTCACAATCTCTAGAGATGATTCTAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGATACCGCTGTGT
ATTACTGTGCTAGACATGACAATTTTGGCAACTCTTATGTGTCTTGGTTTGCTTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACA
GTGAGCTCTGGTGGAGGCGGTTACAGGCGGCGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGGAGTGGAGGGGGTGGCTCTCAGACCGTGGT
GACACAGGAGCCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCCTGACCTGCGGCTCCTCCACAGGCGCCGTGACCA
CCTCCAACCTACCCCAACTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCAAGGGGCCTGATCGGCGGCACCAATAAGAGGGCC
CCCGGCGTGCCCCGCTAGATTCTCTGGCTCTCTTCTGGGAGGAAAGGCTGCTCTGACACTGTCTGGAGCTCAGCCCGAGGA
TGAGGCTGAATACTATTGTGCTCTGTGGTATTCTGATCTGTGGGTGTTTGGCGGTGGAATAAACTTACAGTTCTGGGCG
GGGGCGGTAGCCAGGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG
GCCAGCGGCTACACTTTTACCTCTTACTACATTCAGTGGGTGAGACAGGCTCCCGGCCAGTGCCTGGAGTGGATGGGATC
CATCTATCCTGGAATGTGAACACCAACTATAATGAGAAGTTTAAAGATAGAGTGACCCTGACCGTGGATACATCTATCT
CTACCGCTTATATGGAGCTGTCTAGACTGAGATCCGATGACACAGCTGTGTATTATTGTACCAGATCTCATTACGGACTG
GATTGGAATTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACCGTGTCTTCTGGTGGGGGTGGTTACAGGGGGTGGTGAAG
```

```
TGGCGGTGGAGGGAGTGACAAGACCCACACATGTCCCCCTGTCCCGCTCCTGAAGCTGCAGGAGCCCCCTCCGTGTTCC
TGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATTTCCAGGACACCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTCAGCCAC
GAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTACGTCGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCA
GTACAATTCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTCCTCCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCA
AGGTGAGCAACAAGGCCCTCCCTGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAAGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAACCTCAAGTC
TATACCCTGCCTCCCTGCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAGCCTCTGGTGCCTCGTCAAGGGCTTCTATCCTTC
CGATATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAACAACCTACAAGACAACACCCCCCGTCTCGATTCCGATG
GCAGCTTCTTCCGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAACAAGGCAACGTCTTCAGTTGCAGCGTCATG
CATGAGGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCCTGGAAAG</INSDSeg_sequence>
  </INSDSeg>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 40" >
  <INSDSeg>
    <INSDSeg_length>451</INSDSeg_length>
    <INSDSeg_moltype>AA</INSDSeg_moltype>
    <INSDSeg_division>PAT</INSDSeg_division>
    <INSDSeg_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q185">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of 44H4-IgG1-Hole-
HC</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q186">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeg_feature-table>
    <INSDSeg_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGYTKYGP
RFQGRVTITADTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCARNYGTSPNAMYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
```

```
SCDKHTCPCPAPEAAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1353</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1353</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql87">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Nucleotide sequence of 44H4-IgG1-Hole-
HC</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql88">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGGTGTC
TTGTAAGGCTTCTGGCTTTAATATCAAGGATACATATATCCATTGGGTGAGACAGGCCCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGA
TGGGCAGAATCGATCCAGCTAATGGCTACACCAAGTATGGCCCTAGATTTTCAGGGAAGAGTGACCATCACAGCTGATACA
TCTACCTCCACCGTGTATATGGAGCTGTCTCTCTGAGATCTGAGGATACAGCTGTGTATTATTGTGCTAGAAATTATGG
CACATCTTACCCTAATGCTATGGATTACTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGAGCTCTGCTTCCACCAAAGGACCCA
GCGTGTTTCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGAGCACCAGCGGAGGCACAGCTGCCCTGGGATGCCTGGTGAAGGACTATTTC
CCTGAGCCCGTGACAGTCAGCTGGAACCTCCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTCCACACCTTCTGCGGTGCTGCAGAGCAG
CGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC
```

ACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGAGCTGTGACAAGACCCACACATGCCCTCCTTGTCTT
GCTCCTGAAGCCGCCGGCGCACCTTCCGTGTTCTGTTCCTTCCCTAAGCCCAAGGATACCCTCATGATTTCCAGGACCCC
CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGAGCCACGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGG
TCCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAATAGCACCTACCGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCAC
CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGTTCAGCAACAAGGCCCTCCCTGCCCCATCGAGAAGACCATTTT
CAAGGCTAAGGGACAGCCTCGGGAACCCCAAGTGTGCACCCTGCCTCCTAGCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGA
GCCTGAGCTGTGCTGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCTGTGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAATAAC
TACAAGACAACCCCCCGTGTCTGACAGCGATGGCAGCTTCTTTCTGGTGTCCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTG
GCAGCAGGGCAACGTCTTCTCTCTGCTCCGTCATGCACGAGGCCCTGCACAACCGCTTCACACAGAAGTCCCTGTCCCTGT
CCCCTGGAAAG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 42" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>744</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..744</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q189">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Amino acid sequence of CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-
HC</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q190">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPG

```
ASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVRQAPGQCLEWMGSIYPGNVNTNYNEKFKDRVTLTVDTISI STAYMELSRLRSDDTAVYY
CTRSHYGLDWNFDVWGQTTVTVSSGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYPNWVQQKPGQAPR
GLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASTFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHDFGNSYVSWFAYWGQTLTVTVSSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>2232</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..2232</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q191">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Nucleotide sequence of CD28-44-SP34-2ScFv-IgG1-Knob-
HC</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q192">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GACATCCAGATGACCCAGAGTCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTGTGGGAGATAGAGTGACAAT
TACATGTCATGCTTCTCAGAATATCTACGTGTGGCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGCTGA
TCTACAAGGCTTCTAACCTGCACACAGGCGTGCCTTCTAGATTTTCTGGATCTGGCTCCGGAACAGATTTTACTCTGACC
ATCTCTAGCCTGCAGCCAGAAGATTTTGCCACCTATTATTGTCTAGCAGGGACAGACCTACCCTTACACATTTGGCTGCGG
```

CACAAAGGTGGAGATCAAGGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGGCGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGGAGTGGAGGGGGTGGCTCTC
AGGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTAC
ACTTTTACCTCTTACTACATTCCTGGGTGAGACAGGCTCCCGGCCAGTGCCTGGAGTGGATGGGATCTATCTATCCTGG
AAATGTGAACACCAACTATAATGAGAAGTTTAAAGATAGAGTGACCCTGACCGTGGATACATCTATCTCTACCGCTTATA
TGGAGCTGTCTAGACTGAGATCCGATGACACAGCTGTGTATTATTGTACCAGATCTCATTACGGACTGGATTGGAATTTT
GATGTGTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACCGTGTCTTCTGGGGGCGGTAGCGGGGGCGGGTCTCAGACCGTGGTGACACA
GGAGCCCAGCCTGACCGTGAGCCCCGGCGGCACCGTGACCCTGACCTGCGGCTCCTCCACCGGCGCCGTGACCACCTCCA
ACTACCCCAACTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCAAGGGGCGCTGATCGGCGGCACCAATAAGAGGGCCCCCGGC
GTGCCCCGCTAGATTCTCTGGCTCTCTTCTGGGAGGAAAGGCTGCTCTGACACTGTCTGGAGCTCAGCCCGAGGATGAGGC
TGAATACTATTGTGCTCTGTGGTATTCTGATCTGTGGGTGTTTGGCGGTGGAATAAACTTACAGTTCTGGGTGGGGGTG
GTTTACAGGGGGTGGTGAAGTGGCGGTGGAGGGAGTGGTGGAGGCGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGC
CTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTTTCTACCTATGCTATGAATTGGGT
GAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTAGAATCAGATCTAAGTATAATAATTACGCTACCTATTATGCTG
ATTCTGTGAAGGACAGATTCACAATCTCTAGAGATGATTCTAAGAATACCCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCT
GAGGATACCGCTGTGTATTACTGTGCTAGACATGACAATTTTGGCAACTCTTATGTGTCTTGGTTTGCTTATTGGGGACA
GGGAACACTGGTGACAGTGAGCTCTGGCGGGGGATCAGGAGGTGGCAGTGACAAGACCCACACATGTCCCCCCTGTCCCG
CTCCTGAAGCTGCAGGAGCCCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATTTCCAGGACACCC
GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTCAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTACGTCGATGGCGTGGAGGT
GCACAACGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAATTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTCCCTCCATC
AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTCCCTGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGC
AAAGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAACCTCAAGTCTATACCCTGCCTCCCTGCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAG
CCTCTGGTGCCTCGTCAAGGGCTTCTATCCTTCCGATATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCCGAGAACA
ACAAGACAACACCCCCCGTGCTCGATTCCGATGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGG
CAACAAGGCAACGTCTTCAAGTGCAGCGTCATGCATGAGGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAG
CCCTGGAAAG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
 <INSDSeq>
 <INSDSeq_length>227</INSDSeq_length>
 <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
 <INSDSeq_feature-table>
 <INSDFeature>
 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
 <INSDFeature_location>1..227</INSDFeature_location>
 <INSDFeature_qual>
 <INSDQualifier>
 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q193">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of IgG1-Knob-
HC</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q194">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>227</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..227</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q195">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of IgG1-Hole-
HC</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="q196">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNRFTQKSLS
LSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>271</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..271</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q197">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of MUC17-
His</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q198">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>RTTTCFGDGCQNTASRCKNGGTWDGLKCQCPNLYYGELCEEVSSIDIGPPETISAQMELTV
TVTSVKFTEELKNHSSQEFQFEFKQTFTEQMNIVYSGIPEYVGVNITKLRLGSVVVEHDVLLRTKYTPPEYKTVLDNATEVV
KEK1TKVTTQQIMINDICSDMMCFNTTGTQVQNITVTQYDPEEDCRKMAKEYGDYFVVEYRDQKPYCISPCEPGFSVSKN
CNLGKQCMSLSGPQCLCVTTETHWYSGETCNQGTQKSLGGGSGHHHHHH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 47">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q199">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of CD28-
His</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q200">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYS
KTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPLPFGPSKPGGGGSHHH
HHH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 48">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>574</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..574</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q201">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of CD28-CD3-CODV-IgG1-Knob-
HC</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q202">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYAQ
KFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKTTVTVSSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
CAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGV
YYALSPFDYWGQGLTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>338</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..338</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q203">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of CD3-CD28-CODV-
LC</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q204">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
QASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDIATYYCQQGQTYPTFGQGTK
LEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q205">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Amino acid sequence of VH of modified Anti-
CD28</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q206">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGSIYPGNVNTNYNE
KFKDRVTLTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCTRSYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q207">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>H-CDR3 of the SP34 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q208">
```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HDNFGNSYVSWFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 52" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q209">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>L-CDR3 of the SP34 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q210">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ALWYSDLWV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 53" >
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q211">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>H-CDR2 of Anti-CD28 humanized
antibody</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q212">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SIYPGNVNTNYNEKFKD</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種多特異性T細胞銜接子(T-cell Engagers)，其特徵在於，所述多特異性T細胞銜接子包含：

第一標靶結構域D1，所述D1與選自下組的標的蛋白結合：CD3、CD28、CD40、CD137；

任選的第二標靶結構域D2，所述D2與選自下組的標的蛋白結合：CD3、CD28、CD40、CD137；和

第三標靶結構域D3，所述D3包含一個或多個MUC17抗原結合結構域。

【請求項2】 如請求項1所述的多特異性T細胞銜接子，其特徵在於，所述D1、D2或D3各自獨立地選自：單域抗體(sdAb)、Fab、Fab'、F(ab')₂、TriFab、Fv片段、片段可變(Fv)異二聚體、單鏈Fv(scFv)片段、雙抗體(diabody)、雙特異性T細胞接合器(BiTE)或單結構域片段，優選為單鏈Fv(scFv)、Fv片段或Fab片段。

【請求項3】 如請求項1所述的多特異性T細胞銜接子，其特徵在於，所述MUC17抗原結合結構域包含第三重鏈可變區和第三輕鏈可變區，其中，所述第三重鏈可變區包含如下三個重鏈可變區CDR：

H-CDR1，其具有如SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列；

H-CDR2，其具有如SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列；和

H-CDR3，其具有如SEQ ID NO: 5所示的胺基酸序列；以及

所述第三輕鏈可變區包含如下三個輕鏈可變區CDR：

L-CDR1，其具有如SEQ ID NO: 6所示的胺基酸序列；

L-CDR2，其具有如SEQ ID NO: 7所示的胺基酸序列；和

L-CDR3，其具有如SEQ ID NO: 8所示的胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項1所述的多特異性T細胞銜接子，其特徵在於，所述多特異性T細胞銜接子還包含Fc片段，較佳地來源於IgG1或IgG4的Fc片段。

【請求項5】 如請求項1所述的多特異性T細胞銜接子，其特徵在於，所述來源於IgG1的Fc片段具有選自下組的突變：

N297A；

L234F/L235E/P331S；

Y349C/K370E/K409D/K439E；

S354C/D356K/E357K/D399K；

S354C/T366W；

S354C/T366W/H435R/Y436F；

Y349C/T366S/L368A/Y407V；

L234F/L235E/P331S/Y349C/K370E/K409D/K439E；

L234F/L235E/P331S/S354C/D356K/E357K/D399
K ;
L234F/L235E/P331S/S354C/T366W ;
L234F/L235E/P331S/Y349C/T366S/L368A/Y407
V ;
N297A/Y349C/K370E/K409D/K439E ;
N297A/S354C/D356K/E357K/D399K ;
N297A/S354C/T366W ;
N297A/Y349C/T366S/L368A/Y407V ; 和/或
S267E ; S267E/G236D ; S267E/S239D ;
S267E/L328F 。

【請求項6】 如請求項1所述的多特異性T細胞銜接子，其特徵在於，
所述多特異性T細胞銜接子為三特異性抗體，其從N端
到C端包含如下所示的結構：

- (a) 第一鏈：VL₁-L1-VH₂-L2-VL₂-L3-VH₁-L4-
Fc1；
- (b) 第二鏈：VH₃-CH1-Fc2；和
- (c) 第三鏈：VL₃-CL；

或所述三特異性抗體從N端到C端包含如下所示的結構：

- (a) 第一鏈：VL₁-L1-VH₁-L2-VL₂-L3-VH₂-L4-
Fc1；
- (b) 第二鏈：VH₃-CH1-Fc2；和
- (c) 第三鏈：VL₃-CL；

其中，

VH₁為第一重鏈可變區，VL₁為第一輕鏈可變區；

VH₂為第二重鏈可變區，VL₂為第二輕鏈可變區；

VH₃為第三重鏈可變區，VL₃為第三輕鏈可變區；

CL為輕鏈恆定區，CH1為CH1結構域；

L1、L2、L3、L4各自獨立地為無、鏈或連接子；

Fc1或Fc2各自獨立地為Fc元件；

“-”代表肽鍵。

【請求項7】 一種多核苷酸，其特徵在於，所述多核苷酸編碼請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子。

【請求項8】 一種載體，其特徵在於，所述載體含有請求項7所述的多核苷酸。

【請求項9】 一種宿主細胞，其特徵在於，所述宿主細胞含有請求項8所述的載體或基因組中整合有請求項7所述的多核苷酸。

【請求項10】 一種製備如請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子的方法，其特徵在於，包括步驟：

(i) 在合適的條件下，培養請求項9所述的宿主細胞，獲得含有如請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子的混合物；

(ii) 對步驟(i)中得到的混合物進行純化和/或分離，從而獲得如請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子。

【請求項11】 一種藥物組成物，其特徵在於，所述藥物組成物含有：

(I) 如請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子；
和

(II) 藥學上可接受的載劑。

【請求項12】 一種免疫偶聯物，其特徵在於，所述免疫偶聯物包括：

(a) 如請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子；
和

(b) 選自下組的偶聯部分：可檢測標記物、藥物、毒素、
細胞激素、放射性核種、酵素、或其組合。

【請求項13】 如請求項1-6任一所述多特異性T細胞銜接子、如請求項11所述的藥物組成物或如請求項12所述的免疫偶聯物的用途，其特徵在於，用於製備(a)檢測試劑或套組；
和/或(b)製備預防和/或治療癌症/腫瘤的藥物。

【請求項14】 如請求項13所述的用途，其特徵在於，所述癌症/腫瘤為MUC17相關的癌症/腫瘤。

【請求項15】 如請求項13所述的用途，其特徵在於，所述癌症/腫瘤包括固態腫瘤和血液腫瘤。

【請求項16】 如請求項13所述的用途，其特徵在於，所述癌症/腫瘤選自下組：胃癌、胃腸癌、結直腸癌、食道癌、胃食道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、子宮體癌、前列腺癌或其組合。

【請求項17】 一種套組，其特徵在於，所述套組包括如請求項1-6任一所述的多特異性T細胞銜接子、如請求項7所述的多核苷酸、如請求項8所述的載體、如請求項9所述的宿主

細胞、如請求項11所述的藥物組成物或如請求項12所述的免疫偶聯物。

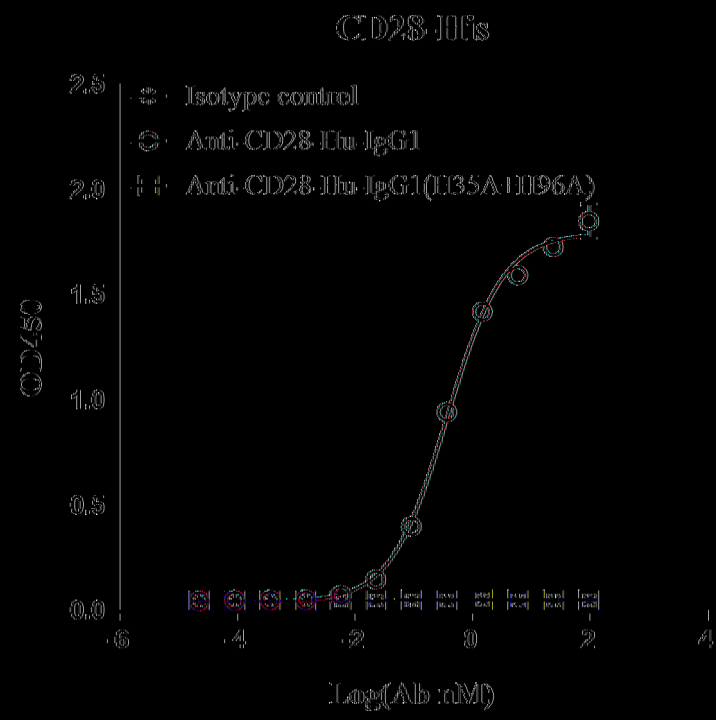


圖 5B

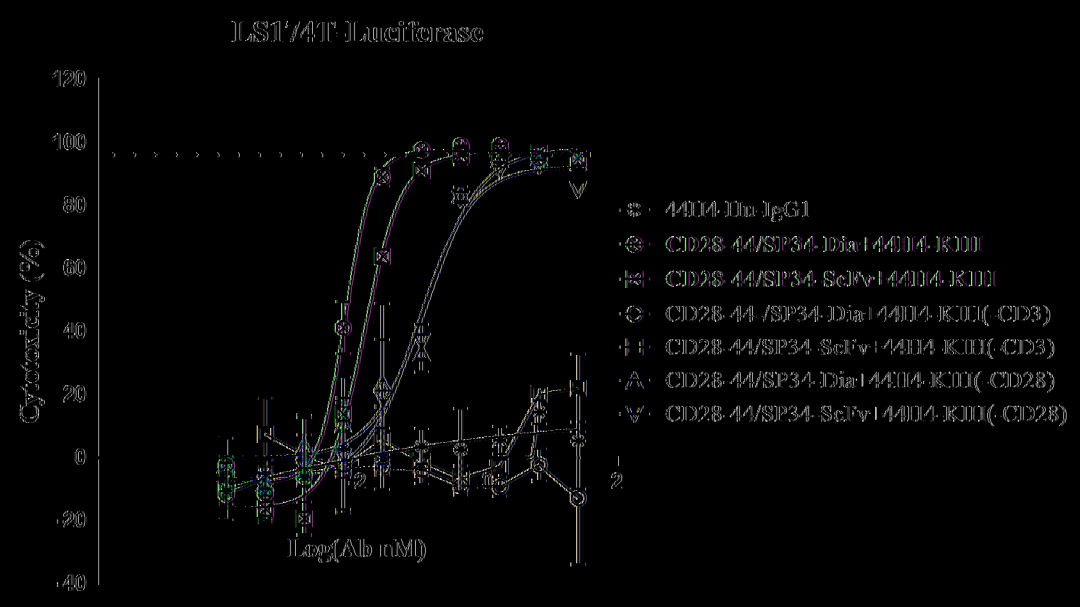


圖 6A

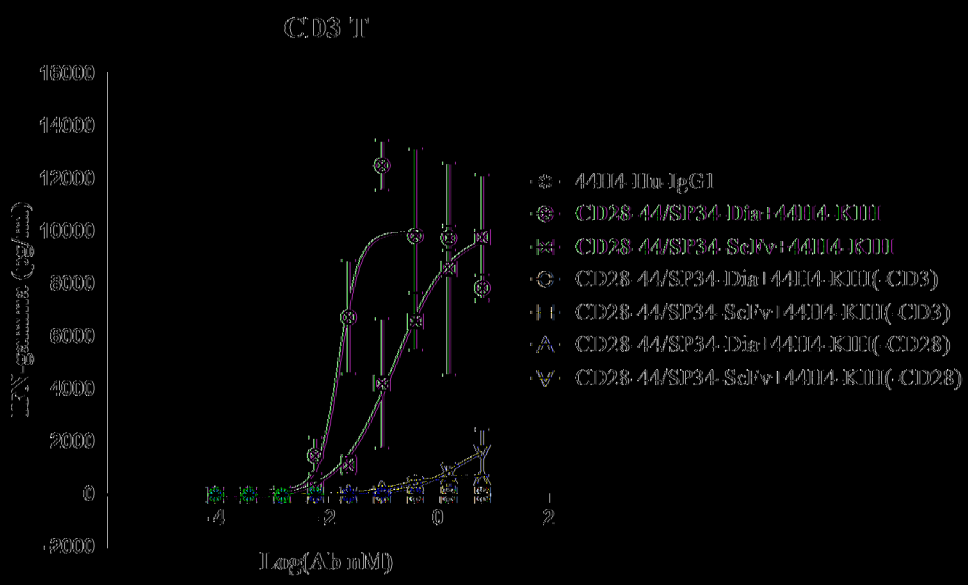


圖 6B

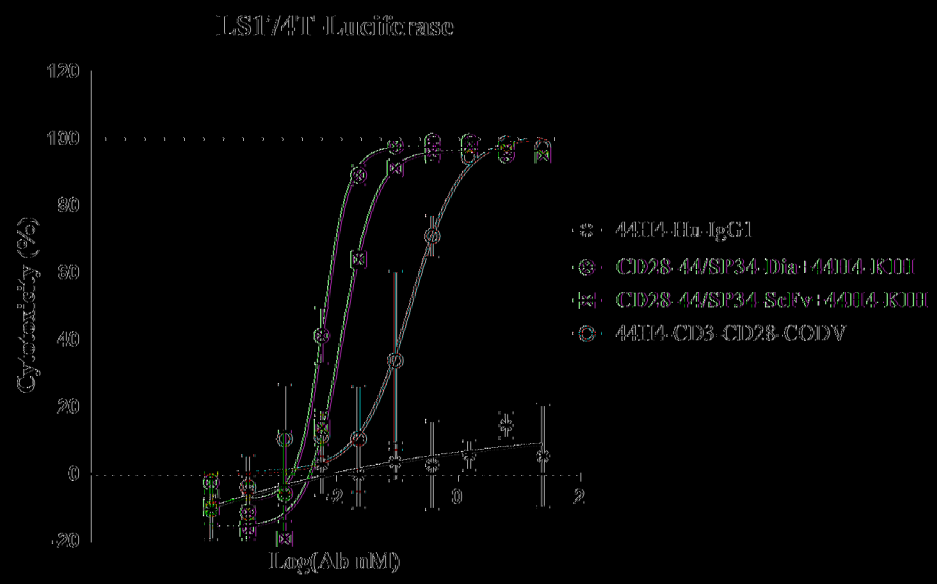


圖 7A

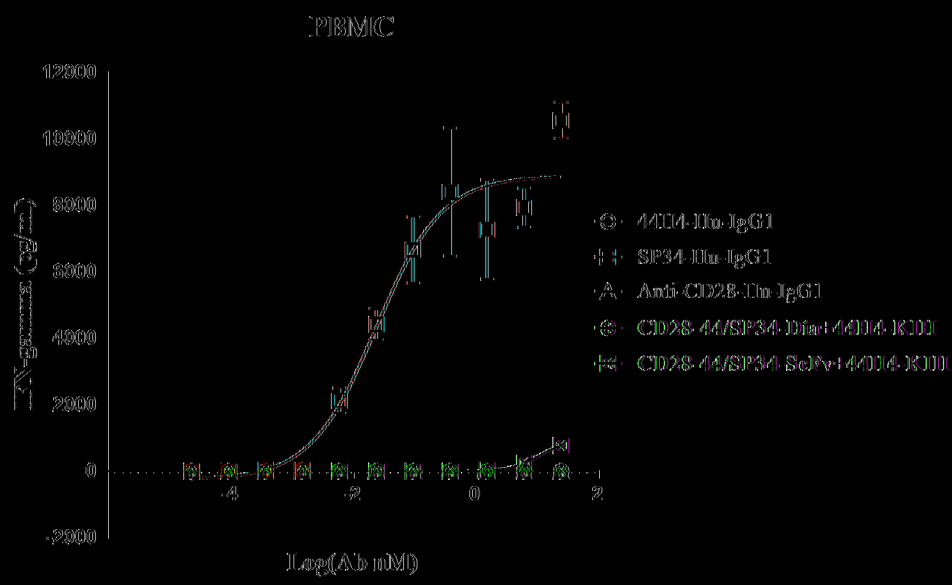


圖 8B

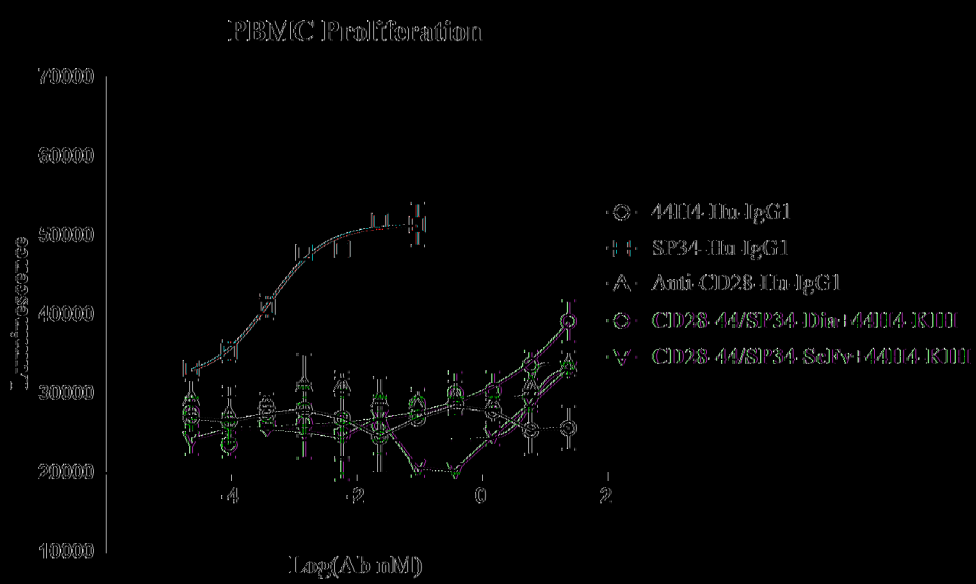


圖 8C

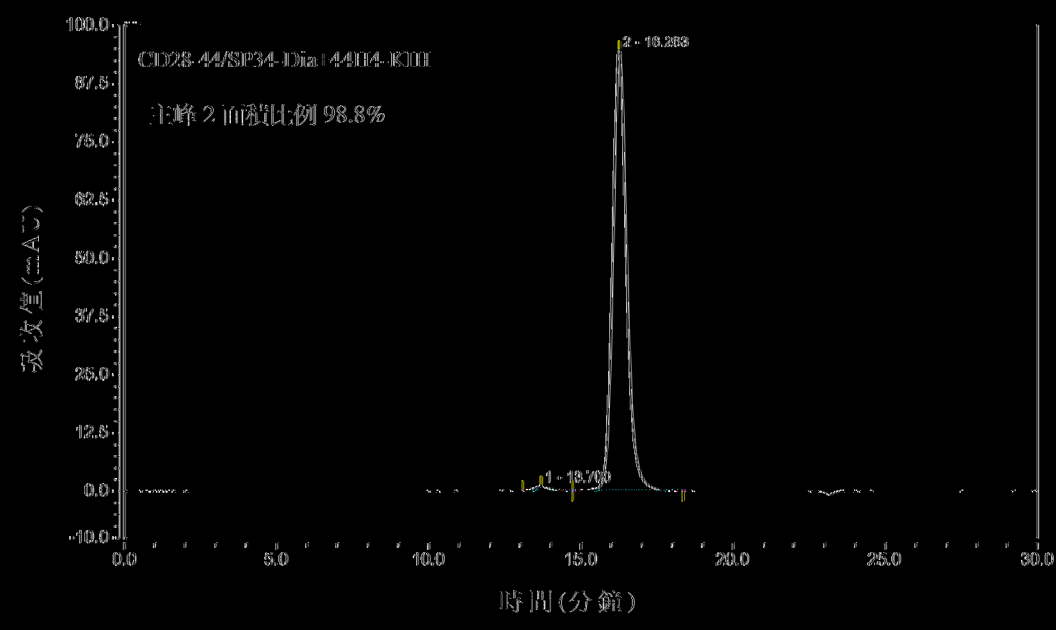


圖 9A

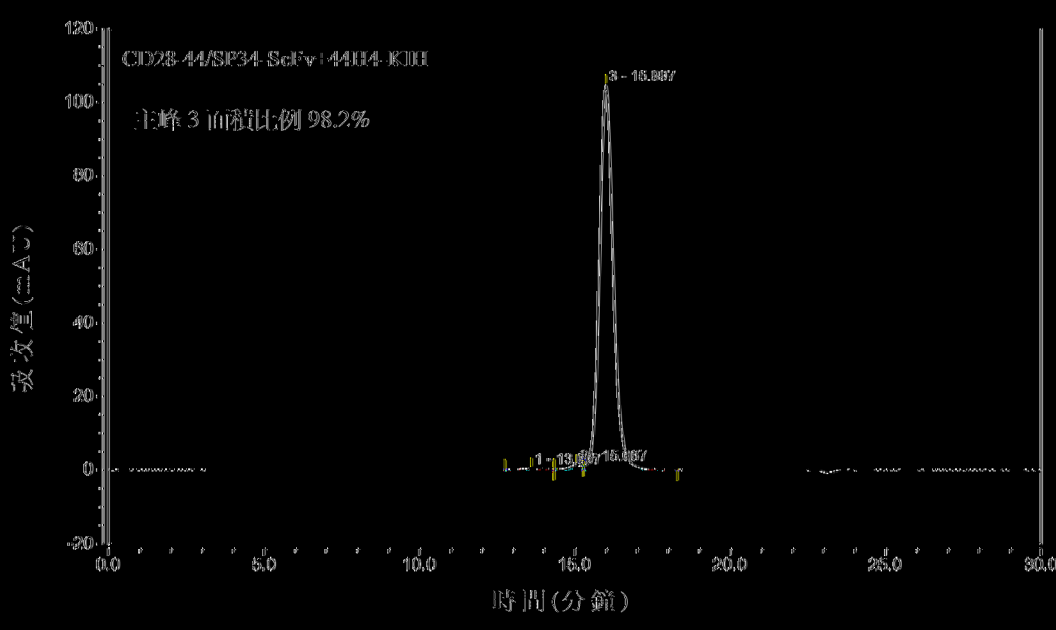


圖 9B

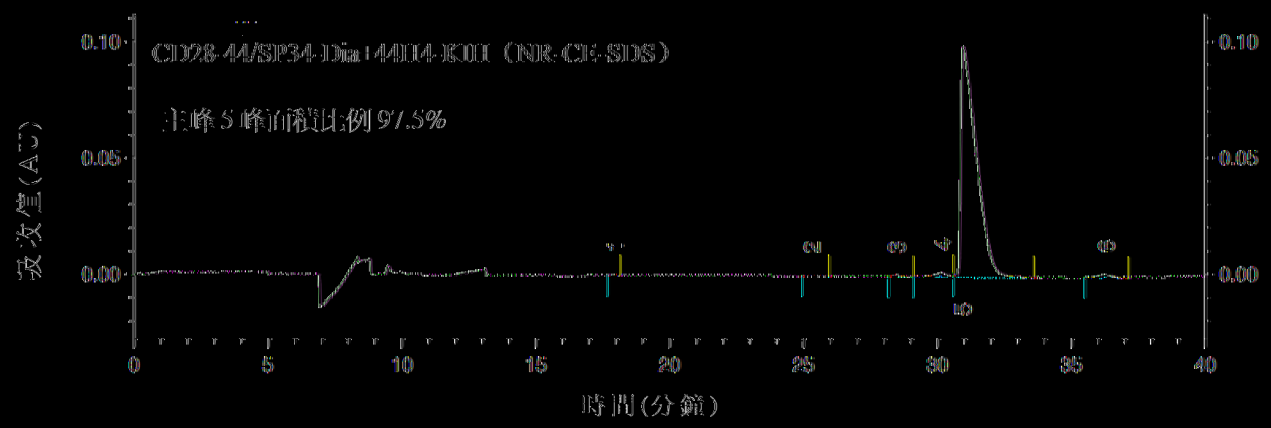


圖 10A

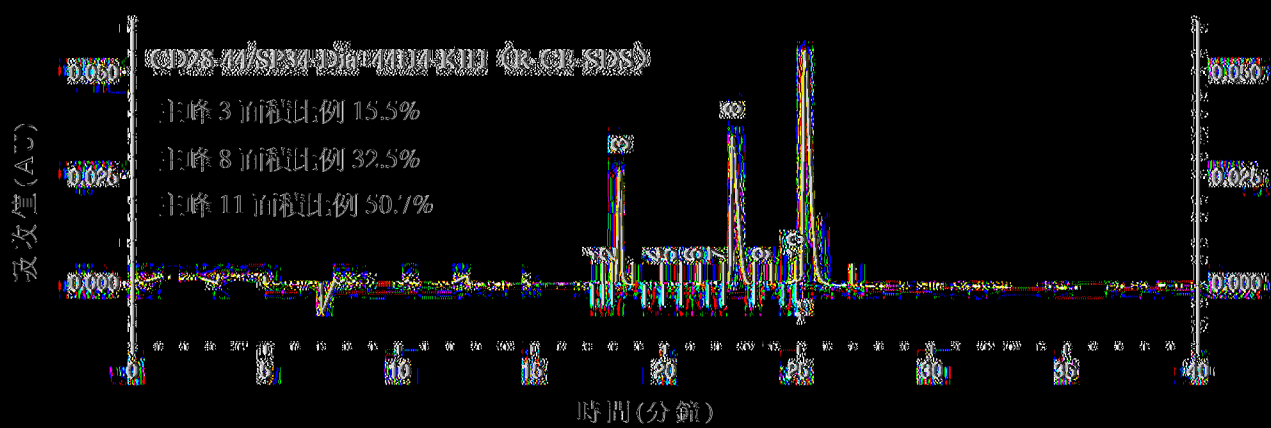


圖 10B

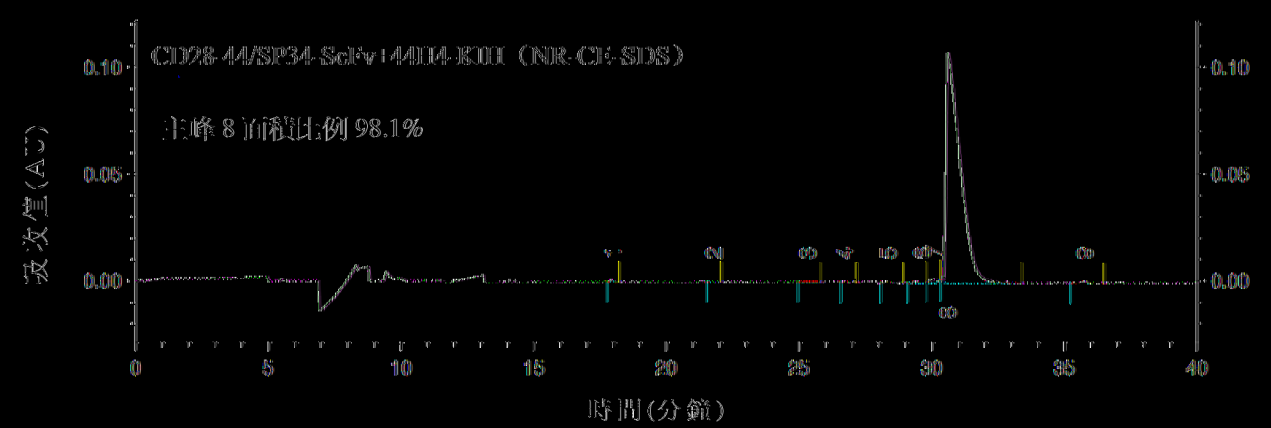
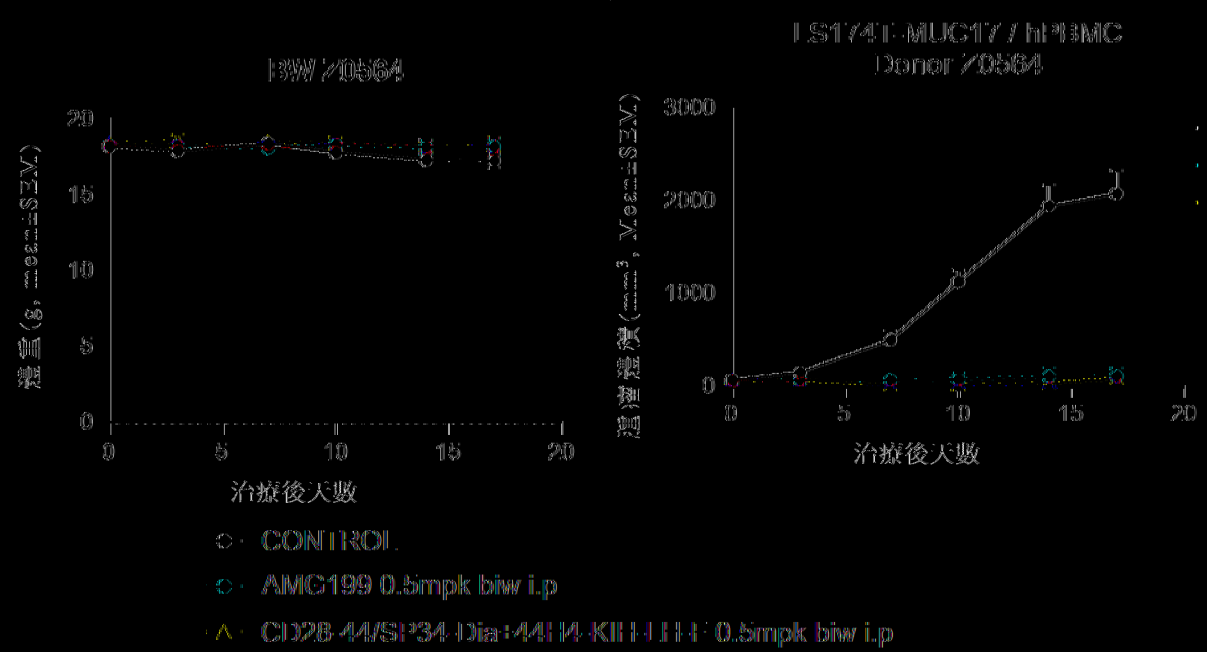
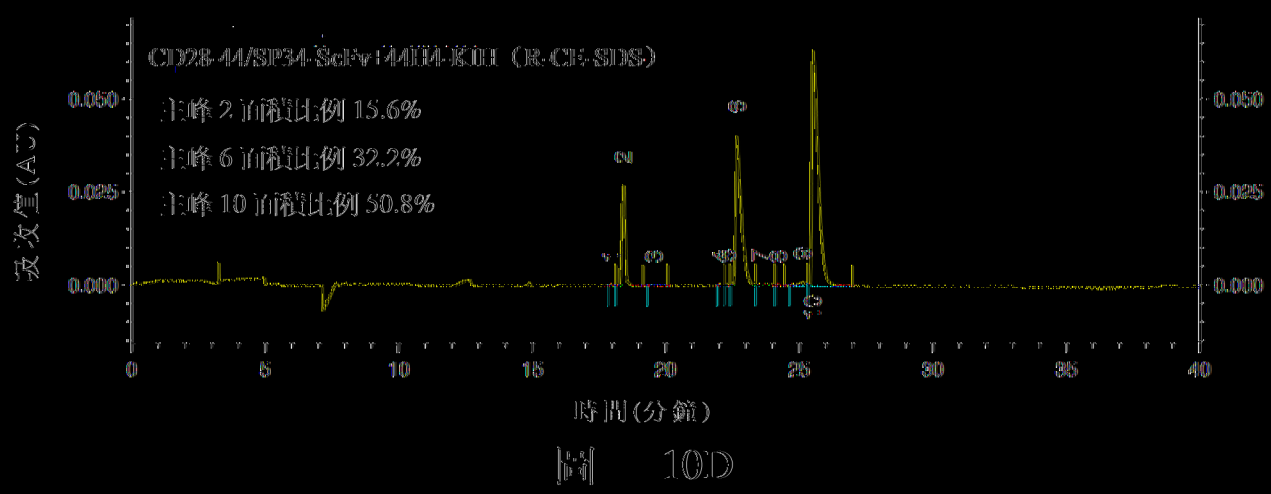


圖 10C



11