202432580

(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 202432580 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：112139671 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 10 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/705 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
C12N15/12 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*
C12P21/00 (2006.01) *A61K38/16 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/10/10 美國 62/570,655
2017/10/11 美國 62/570,660
2018/05/24 美國 62/676,221
2018/08/03 歐洲專利局 18187186.4

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
法國

(72)發明人：吳 嵐 WU, LAN (US)；許 齡 XU, LING (US)；宋 艾德華 SEUNG, EDWARD (US)；魏 羅尼 WEI, RONNIE (US)；納貝爾 蓋瑞 NABEL, GARY (US)；楊 之庸 YANG, ZHI-YONG (US)；岱伯道碧 塔雷克 DABDOUBI, TARIK (FR)；卡麥隆 畢崔斯 CAMERON, BEATRICE (FR)；勒莫因 桑德里納 LEMOINE, CENDRINE (FR)；普拉德斯 凱薩琳 PRADES, CATHERINE (FR)

(74)代理人：陳長文；林嘉興

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：92 項 圖式數：31 共 422 頁

(54)名稱

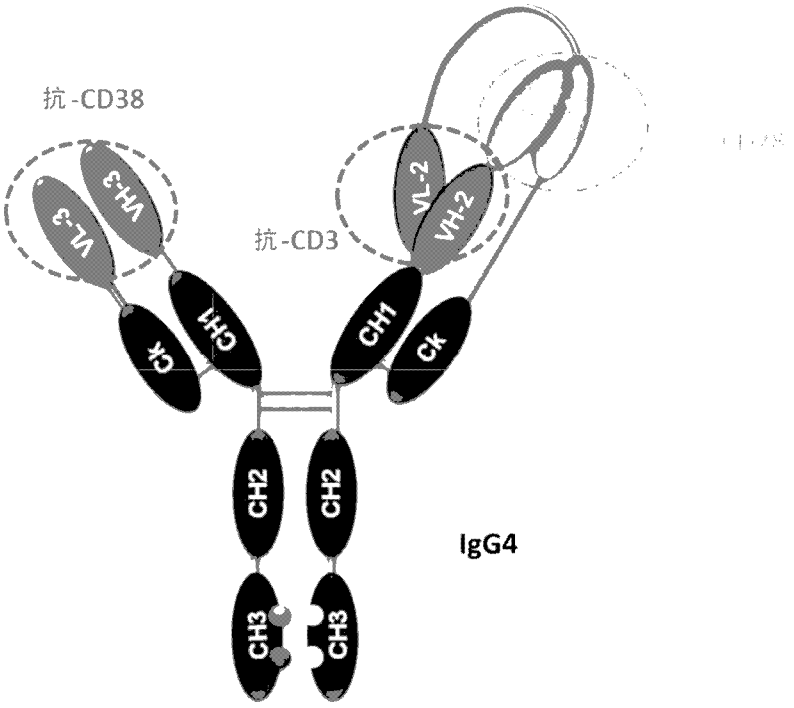
抗 CD38 抗體及其使用方法

(57)摘要

本公開提供了結合 CD38 多肽(例如人和食蟹猴 CD38 多肽)的結合蛋白。例如，結合蛋白可以是單特異性、雙特異性或三特異性結合蛋白，其具有至少一個結合 CD38 多肽的抗原結合結構域。本公開還提供了製備結合 CD38 多肽的結合蛋白的方法和這樣的結合蛋白的用途。

The disclosure provides binding proteins that bind CD38 polypeptides, e.g., human and cynomolgus monkey CD38 polypeptides. For example, the binding proteins can be monospecific, bispecific, or trispecific binding proteins with at least one antigen binding domain that binds a CD38 polypeptide. The disclosure also provides methods for making binding proteins that bind CD38 polypeptides and uses of such binding proteins.

指定代表圖：



【圖3A】

202432580
202[illegible]
專利案號：112139671
原申請案號：107135898

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗CD38抗體及其使用方法

【英文發明名稱】ANTI-CD38 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【中文】本公開提供了結合CD38多肽(例如人和食蟹猴CD38多肽)的結合蛋白。例如，結合蛋白可以是單特異性、雙特異性或三特異性結合蛋白，其具有至少一個結合CD38多肽的抗原結合結構域。本公開還提供了製備結合CD38多肽的結合蛋白的方法和這樣的結合蛋白的用途。

【英文】The disclosure provides binding proteins that bind CD38 polypeptides, e.g., human and cynomolgus monkey CD38 polypeptides. For example, the binding proteins can be monospecific, bispecific, or trispecific binding proteins with at least one antigen binding domain that binds a CD38 polypeptide. The disclosure also provides methods for making binding proteins that bind CD38 polypeptides and uses of such binding proteins.

【指定代表圖】圖3A

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗CD38抗體及其使用方法

【英文發明名稱】ANTI-CD38 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【技術領域】

本公開內容涉及結合CD38多肽(例如，人和食蟹猴CD38多肽)的結合蛋白，包括具有至少一個結合CD38多肽的抗原結合結構域的單特異性、雙特異性或三特異性結合蛋白，以及多核苷酸、主體細胞、產生方法和與其相關的使用方法。

【先前技術】

基於單克隆抗體的生物治療劑已成為新藥開發的重要途徑。單克隆抗體技術為特定細胞群體提供特異性靶向、精確信號遞送和/或有效負載，並通過其Fc功能提供持久的生物學效應。抗體工程的努力已經允許開發多特異性抗體，其結合多種單克隆抗體的特異性用於各種生物學應用，擴展了抗體藥物開發的範圍。

CD38是有吸引力的藥物靶標，因為它在多種淋巴腫瘤細胞的細胞表面上表現(參見Stevenson, G.T. (2006) *Mol. Med.* 12:345-346)。DARZALEX®(達雷木單抗，daratumumab)是一種被批准用於治療多發性骨髓瘤的抗CD38抗體。然而，需要靶向CD38的治療劑具有不同的作用模式和/或改善的性質，包括但不限於高親和力結合CD38、人和食蟹猴CD38多肽之間的交叉反應性、結合淋巴瘤細胞(例如，多發性骨髓瘤大B細胞淋巴瘤細胞株)，以及誘導細胞凋亡和/或抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)和T細胞介導的抗腫瘤活性的能力。

【發明內容】

本文提供了結合CD38多肽(例如，人和食蟹猴CD38多肽)的結合蛋白，其包括具有結合CD38多肽的至少一個抗原結合位點的單特異性、雙特異性或三特異性結合蛋白。有利地，此等結合蛋白具有將T細胞募集到癌細胞附近，隨後活化T細胞並通過顆粒酶/穿孔素機制促進活化的T細胞殺死相鄰癌細胞的能力，從抗CD38抗體諸如DARZALEX®(達雷木單抗)提供不同的抗腫瘤活性作用模式。此外，結合人和食蟹猴CD38多肽的能力允許在臨床前毒理學研究中容易地測試結合蛋白，例如，以評價它們的安全性特徵以供以後臨床使用。

在一些實施例中，本文提供了與人CD38多肽結合的單特異性結合蛋白。在一些實施例中，結合蛋白與人和食蟹猴CD38多肽交叉反應。在一些實施例中，結合蛋白結合人同功異型物A和同功異型物E CD38多肽。在一些實施例中，結合蛋白具有一個或多個以下特徵(以任何組合)：結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白質，如通過SPR測定的；結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白質，K_D為1.5nM或更低，如通過SPR測定的；結合在細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合在細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，其表觀K_D為20nM、15nM、10nM、5nM、1nM或更低，如通過流式細胞術測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白質，如通過SPR測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白質，K_D是3.5nM或更低，如通過

SPR測定的;結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如,包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列),如通過流式細胞術測定的;結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如,包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列),其表觀K_D是7.5nM或更低,如通過流式細胞術測定的;結合人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如,包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)作為純化的蛋白質,如通過ELISA測定的;結合在細胞表面上表現的人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如,包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列),如通過流式細胞術測定的;在細胞表面誘導表現CD38的細胞的凋亡或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC);和與沒有一個或多個突變的相同結合蛋白相比,具有一個或多個突變(例如,在Fc區中)導致與FcγRI和/或FcγRII的結合降低。對於示例性測定,參見實例1、3和4。在一些實施例中,KD在4℃或25℃測量。

在一些實施例中,本文提供了與人CD38多肽結合的三特異性結合蛋白。在一些實施例中,三特異性結合蛋白結合(例如,同時)CD38多肽(例如,在細胞表面上表現的)和在第二細胞表面上表現的一種或多種其他靶抗原,由此募集與表現CD38多肽的細胞接近的第二細胞。在一些實施例中,三特異性結合蛋白結合(例如,同時)CD38多肽(例如,在細胞表面上表現的)和在T細胞表面上表現的一種或兩種靶抗原,由此募集與表現CD38多肽的細胞接近的T細胞。在一些實施例中,三特異性結合蛋白活化T細胞和/或向T細胞提供CD28介導的共刺激信號。在一些實施例中,三特異性結合蛋白與人和食蟹猴CD38多肽交叉反應。在一些實施例中,三特異性結合蛋白結合人同功異型物A和同功異型物E CD38多肽。在一些實施例中,三特異性結合蛋白具有一個或多個以下特徵(以任何組合):結合人CD38多肽的胞外域(例如,包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白質,

如通過SPR測定的；結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白質，K_D是1.5nM或更低，如通過SPR測定的；結合細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合在細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，其表觀K_D是20nM、15nM、10nM、5nM、1nM或更低，如通過流式細胞術測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白質，如通過SPR測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白質，K_D是3.5nM或更低，如通過SPR測定的；結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)，其表觀K_D是7.5nM或更低，如通過流式細胞術測定的；結合人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)作為純化蛋白質，如通過ELISA測定的；結合在細胞表面上表現的人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；在細胞表面誘導表現CD38的細胞的凋亡或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)；和與沒有一個或多個突變的相同結合蛋白相比，具有一個或多個突變(例如，在Fc區中)導致與FcγRI和/或FcγRII的結合降低；誘導T細胞(例如CD4+和/或CD8+ T細胞)增生；誘導Bcl-xL的T細胞(例如CD4+和/或CD8+ T細胞)表現；誘導CD38+細胞的凋亡；結合在細胞表面上表現的CD38和在T細胞表面上表現的一種或多種T細胞靶抗原；結合在細胞表面上表現的CD38、在T細胞表面上表現的CD28和在T細胞表面上表現的CD3；刺激T細胞受體的活化；誘導T

細胞受體信號傳導的共刺激(例如，由CD28介導)；和與沒有一個或多個突變的相同結合蛋白相比具有一個或多個突變(例如，在Fc區中)導致PBMC的細胞因子釋放(例如，IFN-γ、IL-2和/或TNF-α)的誘導減少；在CD38+靶細胞存在下，由PBMC誘導細胞因子釋放(例如，IFN-γ和/或IL-6)。對於示例性測定，參見實例1、3和4。在一些實施例中，KD在4℃或25℃測量。

在一些實施例中，本文提供了包含結合CD38多肽的抗原結合位點的結合蛋白，其中所述抗原結合位點包含: (a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和/或(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述抗原結合位點包含: (a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和/或(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的

CDR-L3序列。在一些實施例中，所述抗原結合位點包含：(a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和/或(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述VH結構域從N末端至C末端包含序列FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4；其中FR1包含序列QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:86)、QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:87)或QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO:88)；其中FR2包含序列MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO:90)或MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO:91)；其中FR3包含序列NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:93)或NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:94)；和其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)。在一些實施例中，所述VH結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列，和/或所述VL結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:7的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:8的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，所述VH結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列，和/或所述VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:19

的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，所述VH結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列，和/或所述VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:22的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，所述VH結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列，和/或所述VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:24的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，所述抗原結合位點包含: (a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和(b)抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述VH結構域從N末端至C末端包含序列FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4；其中FR1包含序列QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:86)、QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:87)或QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO:88)；其中FR2包含序列MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO:90)或MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO:91)；其中FR3包含序列NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:93)或

NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:94)；和其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)。在一些實施例中，所述VH結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和/或所述VL結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:15的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:16的胺基酸序列的抗體輕鏈。

在一些實施例中，本文提供了一種結合蛋白，其包含結合CD38多肽的抗原結合位點，其中所述抗原結合位點包含: (a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述VH結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和/或所述VL結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:11的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:12的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，所述抗原結合位點與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應。在一些實施例中，所述抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽。在一些實施例中，所述抗原結合位點結合所述包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽，平衡解離常數(K_D)是2.1nM或更小。在一些實施例中，所述抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列的人同功異型物E CD38多肽。在一些實施例中，所述抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:30

的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽。在一些實施例中，所述抗原結合位點結合所述包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽，平衡解離常數(K_D)是1.3nM或更小。

在任何上述實施例的一些實施例中，所述結合蛋白是嵌合或人源化抗體。在一些實施例中，所述結合蛋白是人抗體。在一些實施例中，所述結合蛋白是單克隆抗體。在一些實施例中，所述結合蛋白包含含有Fc區的一個或多個全長抗體重鏈。在一些實施例中，所述Fc區是人Fc區，其包含降低或消除Fc受體結合和/或Fc區的效應子功能的一個或多個突變。在一些實施例中，所述Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，根據EU Index，所述人IgG1 Fc區在對應於人IgG1的234、235和329位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是L234A、L235A和P329A。在一些實施例中，根據EU Index，所述人IgG1 Fc區在對應於人IgG1的298、299和300位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S298N、T299A和Y300S。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區。在一些實施例中，根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的228和409位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S228P和R409K。在一些實施例中，根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的234和235位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是F234A和L235A。在一些實施例中，根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。在一些實施例中，根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的233-237位的位置處包含胺基酸取代，其中所述序列EFLGG被PVAG代替。在一些實施例中，所述結合蛋白包含抗體F(ab)、F(ab')2、Fab'-SH、Fv或scFv片段。在一些實施例中，所述結合蛋白與細胞毒性

劑或標記物綴合。在一些實施例中，所述結合蛋白是雙特異性結合蛋白，其包含結合CD38多肽的第一抗原結合位點，和第二抗原結合位點。在一些實施例中，所述結合蛋白是三特異性結合蛋白，其包含結合CD38多肽的第一抗原結合位點、第二抗原結合位點和第三抗原結合位點。在一些實施例中，所述第一抗原結合位點結合人CD38多肽的胞外域，和其中所述第二和第三抗原結合位點各自結合T細胞表面蛋白。在一些實施例中，所述第一抗原結合位點結合人CD38多肽的胞外域，和其中(a) 所述第二抗原結合位點結合人CD28多肽，和所述第三抗原結合位點結合人CD3多肽，或(b) 所述第二抗原結合位點結合人CD3多肽，和所述第三抗原結合位點結合人CD28多肽。

在一些實施例中，本文提供了一種結合蛋白，其包含3個抗原結合位點，其各自結合一個或多個靶蛋白，其中所述3個抗原結合位點的至少一個與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應。在一些實施例中，所述結合蛋白與包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:105的胺基酸序列的人CD38多肽交叉反應。在一些實施例中，所述結合蛋白與包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽交叉反應。在一些實施例中，所述結合蛋白包含與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應的抗原結合位點，和各自結合T細胞表面蛋白的2個抗原結合位點。在一些實施例中，所述結合蛋白包含與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應的抗原結合位點，結合人CD28多肽的抗原結合位點，和結合人CD3多肽的抗原結合位點。在一些實施例中，所述結合蛋白包含形成所述3個抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [II]

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H3}-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [III]

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對，和

其中：(a) 所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)

或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(b) 所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列，或

(c) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述結合蛋白包含形成所述3個

抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \quad [II]$$

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H3}\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \quad [III]$$

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{L3}\text{-}C_L \quad [IV]$$

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對，和

其中：(a) 所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(b) 所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或

(c) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID

NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有

QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ

ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列；所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列；所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列；所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列；或所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。在一些實施例中，其中所述結合蛋白包含形成所述3個抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \qquad [II]$$

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H3}\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \qquad [III]$$

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{L3}\text{-}C_L \qquad [IV]$$

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對，和

其中(a) 所述V_{H1}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(b) 所述V_{H2}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID

NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列，或

(c) 所述V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。在一些實施例中，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基

酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列；所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列；所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列；或所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列。在一些實施例中，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列，所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列；或所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列，所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4的至少一個的長度獨立地是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4的長度各自獨立地是至少一個胺基酸。在

一些實施例中，(a) L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地是0個胺基酸的長度或包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)；或(b) L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。在一些實施例中，L_1包含序列GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)，L_2包含序列TKGPS (SEQ ID NO:57)，L_3包含序列S，和L_4包含序列RT；L_1包含序列GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)，L_2包含序列GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)，L_3的長度是0個胺基酸，和L_4的長度是0個胺基酸；L_1包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_2包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_3的長度是0個胺基酸，和L_4的長度是0個胺基酸；或L_1包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，L_2的長度是0個胺基酸，L_3包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，和L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的234和235位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是F234A和L235A。在一些實施例中，所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。在一些實施例中，所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，

所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的228和409位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S228P和R409K。在一些實施例中，所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG1鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG1的234、235和329位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是L234A、L235A和P329A。在一些實施例中，所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG1鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG1的298、299和300位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S298N、T299A和Y300S。在一些實施例中，根據EU Index，所述第二多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V；和其中根據EU Index，所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S354C和T366W。在一些實施例中，根據EU Index，所述第二多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S354C和T366W；和其中根據EU Index，所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V。在一些實施例中，所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:60的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:62的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。在一些實施例中，所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:64的胺基

酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:65的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。在一些實施例中，所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:66的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:67的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。在一些實施例中，所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:60的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:68的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。在一些實施例中，所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:64的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:70的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。在一些實施例中，所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:66的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:71的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。

在一些實施例中，本文提供了一種結合蛋白，其包含各自結合一個或多個靶蛋白的3個抗原結合位點，其中所述結合蛋白包含形成3個抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一所肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \quad [II]$$

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H3}\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \qquad [III]$$

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對，和

其中(a) 所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG1鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG1的298、299和300位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S298N、T299A和Y300S；或(b) 所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。在一些實施例中，所述人IgG4

鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG4的233-237位的位置處包含胺基酸取代，其中所述序列EFLGG被PVAG代替。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的至少一對形成結合CD38多肽的抗原結合位點。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的1、2或3對形成結合選自下組的抗原靶標的抗原結合位點：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL15、CCL17、CCL19、CCL20、CCL21、CCL24、CCL25、CCL26、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80、CD86、CD122、CD137、CD137L、CD152、CD154、CD160、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD278、CD279、CDH1、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1、CSF-2、CSF-3、CX3CL1、CXCL12、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2、STEAP2、Syk激酶、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、

Vstm3、WUCAM和XCR1。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的第一對形成結合人CD3多肽的抗原結合位點，V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的第二對形成結合人CD28多肽的抗原結合位點，和V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的第三對形成結合選自下組的人抗原靶標的抗原結合位點：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶 、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL15、CCL17、CCL19、CCL20、CCL21、CCL24、CCL25、CCL26、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80、CD86、CD122、CD137、CD137L、CD152、CD154、CD160、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD278、CD279、CDH1、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1、CSF-2、CSF-3、CX3CL1、CXCL12、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7 、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2、STEAP2、Syk激 酶 、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM

和XCR1。

在一些實施例中，本文提供了一種多核苷酸類的套組，其包含：(a) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:72的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:74的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸；(b) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:76的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:77的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸；(c) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:78的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:79的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸；(d) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:72的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:80的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸；(e) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:76的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:82的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸；或(f) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:78的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:83的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸。

在一些實施例中，本文提供了一種多核苷酸，其包含上述實施例中任一項的結合蛋白。在一些實施例中，本文提供了一種載體，其包含上述實施例中任一項的多核苷酸。

在一些實施例中，本文提供了一種主體細胞，其包含上述實施例中任一項的多核苷酸類的套組、多核苷酸或載體。在一些實施例中，本文提供了一種產生結合蛋白的方法，所述方法包括培養上述實施例中任一項的主體細胞從而產

生所述結合蛋白。在一些實施例中，所述方案進一步包括從所述主體細胞回收所述結合蛋白。

在一些實施例中，本文提供了一種醫藥組合物，其包含上述實施例中任一項的結合蛋白和醫藥上可接受的載劑。

在一些實施例中，本文提供了一種預防和/或治療患者中的癌症的方法，其包括向所述患者投予治療有效量的至少一種上述實施例中任一項的結合蛋白或上述實施例中任一項的醫藥組合物。在一些實施例中，所述結合蛋白是三特異性結合蛋白，其包含結合CD3的第一抗原結合位點、結合CD28的第二抗原結合位點和結合人CD38多肽的胞外域的第三抗原結合位點。在一些實施例中，至少一種結合蛋白與化療劑共同投予。在一些實施例中，所述癌症是多發性骨髓瘤。在一些實施例中，所述癌症是急性髓樣白血病(AML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)或B細胞淋巴瘤。在一些實施例中，所述患者是人。在一些實施例中，選擇所述患者進行治療，因為癌症的細胞在其細胞表面表現人CD38同功異型物E多肽(例如, 如SEQ ID NO:105中所示)。

在一些實施例中，本文提供了至少一種上述實施例中任一項的結合蛋白或上述實施例中任一項的醫藥組合物，其用於預防和/或治療患者(例如，有此需要的患者，諸如患有癌症的患者)中的癌症。在一些實施例中，本文提供了至少一種上述實施例中任一項的結合蛋白或上述實施例中任一項的醫藥組合物，其用於製備用於預防和/或治療患者(例如，有此需要的患者，諸如患有癌症的患者)中的癌症的藥物。在任何上述實施例的一些實施例中，所述結合蛋白是三特異性結合蛋白，其包含結合CD3的第一抗原結合位點、結合CD28的第二抗原結合位點和結合人CD38多肽的胞外域的第三抗原結合位點。在一些實施例中，所述

至少一種結合蛋白與化療劑共同投予。在一些實施例中，所述癌症是多發性骨髓瘤。在一些實施例中，所述癌症是急性髓樣白血病(AML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)或B細胞淋巴瘤。在一些實施例中，所述患者是人。在一些實施例中，選擇所述患者進行治療，因為癌症的細胞在其細胞表面表現人CD38同功異型物E多肽(例如, 如SEQ ID NO:105中所示)。

應理解，本文所述的多種實施例的一個、一些或所有性質可以組合以形成本發明的其他實施例。本發明的此等和其他態樣對於熟習此項技術者而言會變得顯而易見。通過下面的詳細描述進一步描述本發明的此等和其他實方案。

【圖式簡單說明】

本專利或申請文件包含至少一幅彩色附圖。具有彩色附圖的本專利或專利申請公開的副本將在請求和支付必要費用後由專利局(Office)提供。

圖1A顯示使用流式細胞術使抗CD38抗體mAb1(上圖)和isatuximab (下圖)與SU-DHL-8人淋巴瘤細胞或MOLP-8人多發性骨髓瘤細胞結合。

圖1B顯示檢測抗CD38抗體mAb1或isatuximab(未觀察到結合)與在表面上表現食蟹猴CD38的細胞結合的流式細胞術結合測定的結果。

圖2A-2I顯示表徵抗CD38抗體與人和食蟹猴CD38多肽結合的測定結果。**圖2A**顯示通過ELISA使人源化抗CD38抗體mAb2與可溶性人CD38(上圖，“hCD38::Histag”)或食蟹猴CD38(上圖，“cynoCD38::Histag”)結合，以及通過流式細胞術使mAb2與表現人CD83(下圖，如所示的)或食蟹猴CD38(下圖，如所示的)的細胞表面結合。**圖2B**顯示通過表面等離子體共振(SPR)使mAb2與人CD38(上圖)或食蟹猴CD38(下圖)結合。**圖2C**顯示通過ELISA使人源化抗CD38抗體mAb3

與可溶性人CD38(上圖，“hCD38::Histag”)或食蟹猴CD38(上圖，“cynoCD38::Histag”)結合，以及通過流式細胞術使mAb3與表現人CD83(下圖，如所示的)或食蟹猴CD38(下圖，如所示的)的細胞表面結合。**圖2D**顯示通過SPR使mAb3與人CD38(上圖)或食蟹猴CD38(下圖)結合。**圖2E**顯示通過ELISA使人源化抗CD38抗體mAb5與可溶性人CD38(上圖，“hCD38::Histag”)或食蟹猴CD38(上圖，“cynoCD38::Histag”)結合，以及通過流式細胞術使mAb5與表現人CD83(下圖，如所示的)或食蟹猴CD38(下圖，如所示的)的細胞表面結合。**圖2F**顯示了通過SPR使mAb5與人CD38(上圖)或食蟹猴CD38(下圖)結合。**圖2G**顯示通過ELISA使人抗CD38抗體hhy1370與可溶性人CD38(上圖，“hCD38::Histag”)或食蟹猴CD38(上圖，“cynoCD38::Histag”)結合，以及通過流式細胞術使hhy1370與表現人CD83(下圖，如所示的)或食蟹猴CD38(下圖，如所示的)的細胞表面結合。**圖2H**顯示通過SPR使hhy1370與人CD38(上圖)或食蟹猴CD38(下圖)結合。**圖2I**匯總了來自ELISA、SPR和FACS實驗的結合數據，以及每個抗體VH (“H”)或VL (“L”)結構域與人V區序列從上到下的百分比同一性，對應於mAb2、mAb3、mAb4、mAb5和mAb6最後一行(1195 HHKK-3未在下文中通過其VL/VH胺基酸序列描述)。

圖2J顯示在37℃溫育72小時後mAb7和mAb1對SU-DHL-8細胞凋亡的濃度依賴性誘導。

圖2K顯示在NK92細胞的存在下，isatuximab和mAb1對SU-DHL-8細胞的抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)活性。

圖2L顯示在37℃ 4小時後，在NK92細胞的存在下，isatuximab (右)和mAb1(左)對SU-DHL-8細胞的濃度依賴性抗體依賴性細胞介導的細胞毒性

(ADCC)活性。

圖2M-2Q顯示使用所示針對SU-DHL-8腫瘤細胞的抗CD38抗體的凋亡誘導測定的結果。通過經由流式細胞術測量雙膜聯蛋白V和碘化丙啶攝取來量化細胞凋亡。**圖2M**顯示每種抗體誘導的凋亡細胞的百分比。**圖2N-2Q**顯示抗CD38抗體mAb2(**圖2N**)、mAb3(**圖2O**)、mAb4(**圖2P**)和mAb5(**圖2Q**)對SU-DHL-8淋巴瘤細胞凋亡的劑量依賴性誘導，以及每種抗體的IC50。

圖3A提供了包含形成結合以下3種靶蛋白的3個抗原結合位點的四條多肽鏈的三特異性結合蛋白的示意圖：CD28、CD3和CD38。第一對多肽具有交叉方向的雙可變結構域(VH1-VH2和VL2-VL1)，形成識別CD3和CD28的2個抗原結合位點，第二對多肽具有單可變結構域(VH3和VL3)，形成識別CD38的單個抗原結合位點。**圖3A**中顯示的三特異性結合蛋白使用具有“杵臼(knobs-into-holes)”突變的IgG4恒定區，其中杵在具有單個可變結構域的第二對多肽上。

圖3B提供了基於SPR的測定的示意圖，該測定用於檢查抗CD38/抗CD28 /抗CD3三特異性結合蛋白的每個抗原結合結構域結合其同源抗原的能力。

圖3C顯示用於檢查CD38與抗CD38/抗CD28/抗CD3三特異性結合蛋白結合的基於SPR的測定的結果。在預結合CD3(中上)之後，在預結合CD28(右上)之後，在預結合CD3然後CD28(左下)之後，或在預結合CD28然後CD3(右下)之後，單獨檢查人CD38與三特異性結合蛋白的結合(左上)。

圖4顯示人CD3、CD28和CD38多肽與抗CD38/抗CD28/抗CD3三特異性結合蛋白的順序結合，如通過SPR測定的。

圖5匯總了所示三特異性結合蛋白對其同源抗原(人CD3、CD28和CD38)的結合親和力，如通過SPR測量的。

圖6A比較了人IgG1形式(第二片層)或三特異性結合蛋白形式的isatuximab抗原結合結構域與isatuximab、抗CD28和抗CD3抗原結合結構域的表觀親和力(根據**圖3A**的形式;第一片層)用於結合人(上圖)或食蟹猴(下圖)CD38多肽，如通過流式細胞術測定的。

圖6B-6D比較了三特異性結合蛋白$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$、$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$或單特異性抗CD38抗體mAb2與表現人或食蟹猴CD38多肽的細胞結合的表觀親和力，如通過流式細胞術測定的。**圖6B**顯示三特異性結合蛋白$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$與表現人(上圖)或食蟹猴(下圖)CD38多肽的細胞的結合。**圖6C**顯示三特異性結合蛋白$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$與表現人(上圖)或食蟹猴(下圖)CD38多肽的細胞的結合。**圖6D**顯示單特異性抗CD38抗體mAb2與表現人(上圖)或食蟹猴(下圖)CD38多肽的細胞的結合。

圖6E比較了三特異性結合蛋白$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$或單特異性抗CD38抗體mAb6與表現人(上圖)或食蟹猴(下圖)CD38多肽的細胞結合的表觀親和力，如通過流式細胞術測定的。

圖6F匯總了所示抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白對人CD38的結合親和力，如通過SPR或流式細胞術(FACS)測量的。

圖6G顯示了缺乏抗CD38抗原結合結構域的三特異性結合蛋白$\Delta CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$對與表現人(上圖)或食蟹猴(下圖)CD38多肽的細胞結合的表觀親和力，如通過流式細胞術測定的。

圖7A和7B顯示確定多種抗CD38 x CD28 x CD3 IgG4三特異性結合蛋白或對照抗體對人和恒河猴CD3、CD28和CD38多肽的結合親和力的ELISA測定的結果。

圖8A-8D顯示使用所示抗CD38 x CD28 x CD3三特異性結合蛋白和對照抗體的來自三個不同人供體的PBMC的抗體介導的$CD38^+$細胞特異性殺傷的結果。顯示了使用多發性骨髓瘤細胞株RPMI8266(**圖8A**)、NCI-H929(**圖8B**)、KMS-26(**圖8C**)和KMS-11細胞株(**圖8D**)的代表性結果，並且在表N中提供了EC50值。在表O-Q中提供了通過使用NCI-H929、KMS-26和KMS-11細胞獲得的EC50值。

圖8E和8F顯示使用所示具有變異體Fc區的抗CD38 x CD28 x CD3三特異性結合蛋白和對照抗體的來自兩個不同供體的PBMC的抗體介導的$CD38^+$細胞特異性殺傷的結果。顯示了使用$CD38^+$ KMS-11 (**圖8D**)和U266(**圖8E**)細胞株的代表性結果，並且在表Q2和Q3中提供了EC50值。

圖9A、9B和10顯示用多種抗CD38 x CD28 x CD3三特異性結合蛋白或對照抗體處理24小時的人T細胞的活化($CD69^+$)。**圖9A**顯示人$CD3^+$ T細胞的活化($CD69^+$)。**圖9B**顯示人$CD3^+$ $CD4^+$ T細胞的活化($CD69^+$)。**圖10**顯示人$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞的活化($CD69^+$)。

圖11A-11B顯示如Stebbings, R. *et al.* (2007) *J. Immunol.* 179:3325-3331中所述的基於乾燥平板法用所示抗CD38 x CD28 x CD3三特異性結合蛋白或對照抗體處理的人PBMC的體外細胞因子釋放評估的結果。**圖11A**顯示使用5μg/mL的所示抗體的結果。**圖11B**顯示使用25ng/mL的所示抗體的結果。

圖12A-12E顯示了植入RPMI-8226多發性骨髓瘤細胞的CD34+臍帶血細胞人源化NSG小鼠模型中抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白的體內活性。**圖12A**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠的腫瘤體積變化。**圖12B**顯示用所示濃度的$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處

理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠在第18天的平均腫瘤體積。**圖12C**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠的平均終末腫瘤重量。**圖12D**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠在實驗長度上的平均腫瘤生長曲線。**圖12E**顯示在用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠的實驗長度上的多個時間點的體重的平均變化。

圖13A-13F顯示了植入RPMI-8226多發性骨髓瘤細胞的PBMC人源化NSG小鼠模型中抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白的體內活性。**圖13A**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠的腫瘤體積變化。**圖13B**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠在第4天的腫瘤體積。**圖13C**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠在第21天的腫瘤體積。**圖13D**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠在第21天的平均腫瘤體積。**圖13E**顯示用所示濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠的平均末端腫瘤重量。**圖13F**顯示在用所述濃度的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白處理的小鼠相對於用抗CD3/CD38雙特異性抗體處理的小鼠在實驗長度內的多個時間點的

平均腫瘤體積。

圖14A-14U顯示使用非人靈長類動物中的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$、抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$、抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$和抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白的劑量遞增研究的結果。**圖14A**顯示在投予不同劑量的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD3^+$ T細胞的T細胞活化($CD69^+$)。**圖14B**顯示在投予不同劑量的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD3^+$ T細胞的T細胞活化($CD69^+$)。**圖14C**顯示投予不同劑量的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD3^+$ T細胞的T細胞活化($CD69^+$)。**圖14D**顯示在投予不同劑量的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD3^+$ T細胞的T細胞活化($CD69^+$)。**圖14E**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD4^+$ T細胞百分比的變化。**圖14F**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD8^+$ T細胞百分比的變化。**圖14G**顯示使用所示劑量的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD4^+$ T細胞百分比的變化。**圖14H**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD8^+$ T細胞百分比的變化。**圖14I**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD4^+$ T細胞百分比的變化。**圖14J**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD8^+$ T細胞百分比的變化。**圖14K**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD4^+$ T細胞百分比的變化。**圖14L**顯示投予所示劑量的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後循環$CD8^+$ T細胞百分比的變化。**圖14M**顯示投予

12.5 μg/kg的所示三特異性結合蛋白後6、24和48小時總$CD4^+$ T細胞的變化。**圖14N**顯示投予12.5 μg/kg的所示三特異性結合蛋白後6、24和48小時的總NK細胞的變化。**圖14O**顯示投予12.5 μg/kg的所示三特異性結合蛋白後6、24和48小時的總$CD8^+$ T細胞的變化。**圖14P**顯示投予12.5 μg/kg的所示三特異性結合蛋白後6、24和48小時的總B細胞的變化。**圖14Q**顯示投予三種遞增劑量(0.5、2.5、12.5 μg/kg)的抗$CD38_{(VH1)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後6小時細胞因子水準的變化(結果來自標記為“117065”和“117066”的不同測試動物)。**圖14R**顯示投予三種遞增劑量(0.5、2.5、12.5 μg/kg)的抗$CD38_{(VH1)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後6小時細胞因子水準的變化(結果來自標記為“117067”和“117068”的不同試驗動物)。**圖14S**顯示投予三種遞增劑量(0.5、2.5、12.5 μg/kg)的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後6小時細胞因子水準的變化(結果來自標記為“117069”和“117070”的不同測試動物)。**圖14T**顯示投予三種遞增劑量(0.5、2.5、12.5 μg/kg)的抗$CD38_{(hhy1370)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後6小時細胞因子水準的變化(結果來自標記為“117071”和“117072”的不同測試動物)。**圖14U**顯示投予三種遞增劑量(0.5、2.5、12.5 μg/kg)的所示三特異性結合蛋白後24小時細胞因子水準的變化(所有試驗動物顯示的結果)。

圖14V和14W顯示抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$和抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白在較高劑量的非人靈長類血液中誘導體內T細胞的消耗(給藥後6小時)。

圖14X和14Y顯示抗$CD38_{(HHY1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$和抗$CD38_{(HHY1370}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白在較高劑量的非人靈長類血液中誘導體內T細胞的消耗(給藥後6小時)。

圖14Z和14AA顯示投予抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$或抗$CD38_{(VHI)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後非人靈長類中的血液T細胞隨時間變化的量。

圖14AB和14AC顯示投予抗$CD38_{(HHY1370)}$ x $CD28_{(sup)}$ x $CD3_{(mid)}$或抗$CD38_{(HHY1370)}$ x $CD28_{(cvn)}$ x $CD3_{(mid)}$三特異性結合蛋白後非人靈長類中的血液T細胞隨時間變化的量。

圖14AD和14AE顯示在非人靈長類中投予100μg/kg劑量後具有結合的三特異性結合蛋白的CD4+ T細胞的量。

圖14AF和14AG顯示在非人靈長類中投予100μg/kg劑量後具有結合的三特異性結合蛋白的CD8+ T細胞的量。

圖15A-15C顯示多種Fc變異體與人Fc受體FcγR I (**圖15A**)、FcγR IIa (**圖15B**)和FcγR IIIb/c (**圖15C**)的結合或缺乏。測試的變異體是人IgG1、人IgG4和具有FALA突變的人IgG4。

圖16顯示具有或不具有FALA突變的人IgG4與FcRn的結合。

圖17匯總了NSG小鼠中所示三特異性結合蛋白($CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA、$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG1 LALA P329A和$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA)的PK參數。

圖18A-18C顯示與具有野生型或FALA變異體Fc區的三特性異結合蛋白一起溫育的人PBMC的Fc/FcR交互作用介導的(非特異性) IFN-γ (**圖18A**)、IL-2 (**圖18B**)或TNF-α(**圖18C**)的釋放。

圖18D顯示$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$和$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白以及其IgG1和IgG4 Fc變異體對人PBMC的體外活化。

圖19A和19B顯示通過三特異性結合蛋白$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$在CD4+ (**圖19A**)或CD8+ (**圖19B**)T細胞中誘導Bcl-xL需要CD3和CD28抗原結合結構域。條形圖=來自3個PBMC供體的平均值和s.d.。*p=≤0.009。

圖19C和19D顯示具有IgG4 FALA變異體Fc的$CD38_{VH1}xCD28xCD3$上調大於基準雙特異性抗體的CD4+ (**圖19C**)或CD8+ (**圖19D**)T細胞中的Bcl-xL。條形圖=來自3個PBMC供體的平均值和s.d.。*p=≤0.045

圖19E顯示通過Jurkat T細胞報告細胞株中的IL-2表現測定的抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白的T細胞活化依賴於抗CD3抗原結合結構域。

圖19F顯示與具有突變的抗CD28、抗CD38或抗CD28、抗CD38和抗CD3以及基準的結合蛋白相比，$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白釋放細胞因子TNF、IFNg、IL-2、IL-6和IL-10。

圖19G顯示由具有IgG4 FALA變異體Fc的抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白、基準抗CD38x抗CD3雙特異性抗體或同功異型物對照(具有突變結合結構域的IgG4 FALA變異體Fc的三特異性結合蛋白)活化的T細胞的增生。

圖20顯示由具有IgG4 FALA變異體Fc的抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白、具有IgG4 FALA變異體Fc和CD38、CD28或CD3抗原結合結構域中的突變的抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白，或同功異型物對照(具有三個突變結合結構域的IgG4 FALA變異體Fc的三特異性結合蛋白)活化的T細胞的增生。

圖21顯示在PBMC人源化NSG小鼠的NCI-H929-Luc播散性腫瘤模型中以所示劑量投予的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA三特異性結合蛋白的體內抗腫瘤活性。

圖22顯示在PBMC人源化NSG小鼠的NCI-H929-Luc播散性腫瘤模型中以所示劑量投予的$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA三特異性結合蛋白的體內抗腫瘤活性。

圖23A和23B顯示了使用在體內研究中使用的人PBMC的具有$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$和$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白和基準抗CD38x抗CD3雙特異性抗體的NCI-929-Luc細胞的有效體外腫瘤殺傷活性。以10:1的效應物:PBMC比例溫育24小時後使用來自2個供體人源化NSG小鼠的人PBMC。

圖23C顯示與基準抗CD38x抗CD3雙特異性抗體相比，以所示劑量在PBMC人源化NSG小鼠的NCI-H929-Luc播散性腫瘤模型中投予的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$和$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白的優異體內抗腫瘤活性。通過以30μg/kg每週腹膜內(IP)注射投予結合蛋白。

圖24顯示使用GloResponse™ IL2-luc2P Jurkat細胞(Promega)在$CD38_{VH1}$/$CD28_{sup}xCD3_{mid}$及其單個結合位點KO和10nM濃度的三重KO突變體刺激後的熒光素酶報告基因測定的結果。

圖25顯示$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$誘導初級T細胞中Bcl-2家族成員Bcl-xL的上調是CD28依賴性的。

圖26顯示三特異性Ab中的抗CD28提供了在體外支持初級T細胞增生所必需的二級信號傳導。

圖27顯示了由親本抗體進行顏色編碼的三特異性抗體的組態(左)。深色調(紫色或綠色)表示重鏈肽；淺色調表示輕鏈肽。還顯示基於抗CD38 VH1 Fab和$CD28_{sup}$/$CD3_{mid}$ CODV Fab的晶體結構的$CD38_{VH1}$/$CD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性抗體

的結構模型(右)。

圖28A和28B顯示具有高(RPMI-8226;**圖28A**)和低(KMS-11;**圖28B**)CD38表面表現的多發性骨髓瘤(MM)細胞被與多種濃度的三特異性Ab一起溫育的人PBMC有效裂解(E:T=10:1)。通過結合位點KO突變證明了每個結合位點對殺傷活性的貢獻，如所示的。

圖29A-29C顯示三特異性Ab的抗$CD28_{sup}$KO突變體在體外對$CD38_{high}$、$CD38_{mid}$和$CD38_{low}$ MM細胞顯示出顯著降低的抗腫瘤活性。顯示了使用RPMI-8226(**圖29A**)、U266(**圖29B**)或KMS-11(**圖29C**)細胞的測定。

圖30顯示$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體治療組中腫瘤負荷的降低在使用用體外擴增的人初級T細胞重構的NSG小鼠的播散性人多發性骨髓瘤細胞株模型中是劑量依賴性的和統計學差異的。

圖31A和31B顯示出顯示由$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體介導的人PBMC裂解的RPMI-8226(人MM細胞，用CellTracker Deep Red染料標記)的顯微圖像。**圖31A**顯示出對照，而**圖31B**顯示由$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體介導的裂解。使用10:1 E:T比例溫育24小時。比例尺: 50μm。

【實施方式】

[對相關申請的交叉引用]

本申請要求2017年10月10日提交的美國臨時申請序列號62/570,655；2017年10月11日提交的美國臨時申請序列號62/570,660；2018年5月24日提交的美國臨時申請序列號62/676,221；和2018年8月3日提交的EP申請號EP18187186.4的優先權，所有都通過提述以其整體併入本文。

[提交ASCII文本文件的序列表]

以下提交的ASCII文本文件的內容通過提述以其整體併入本文：序列表的計算機可讀形式(CRF)(文件名:183952029940seqlist.TXT，記錄日期:2018年10月8日，大小:154 KB)。

本公開內容提供了包含至少一個結合CD38多肽的抗原結合位點的結合蛋白。

I. 一般定義

如根據本公開所使用的，除非另有說明，否則以下術語應理解為具有以下含義。除非上下文另有要求，否則單數術語應包括複數，複數術語應包括單數。如在本說明書和所附申請專利範圍中所使用的，單數形式“一”，“一個”和“該”包括複數提及，除非內容另有明確說明。因此，例如，提及“一種分子”任選地包括兩種或更多種這樣的分子的組合等。

應理解，本文所述的本公開的態樣和實施例包括“包含”態樣和實施例、“由(態樣和實施例)組成”和“基本上由(態樣和實施例)組成”。

如本文所使用的術語“多核苷酸”是指長度是至少10個核苷酸的單鏈或雙鏈核酸聚合物。在某些實施例中，包含多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸或任一類型核苷酸的修飾形式。這樣的修飾包括鹼基修飾，諸如溴尿苷；核糖修飾，諸如阿拉伯糖苷和2',3'-雙脫氧核糖；和核苷酸間鍵修飾，諸如硫代磷酸酯(phosphorothioate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、硒代磷

酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、phosphoroanilothioate、phosphoranilidate和胺基磷酸酯(phosphoroamidate)。術語“多核苷酸”具體包括單鏈和雙鏈形式的DNA。

“單離的多核苷酸”是基因組、cDNA或合成來源的多核苷酸或它們的某些組合，其：(1)不與全部或部分多核苷酸結合，其中在自然界中發現單離的多核苷酸，(2)與天然不結合的多核苷酸結合，或(3)不作為較大序列的一部分出現在自然界中。

“單離的多肽”是這樣的：(1)不含至少一些通常會發現的其他多肽，(2)基本上不含來自相同來源(例如來自相同的物種)的其他多肽，(3)由來自不同物種的細胞表現，(4)已與至少約50%的多核苷酸、脂質、碳水化合物或與其天然結合的其他物質單離，(5)不與“單離的多肽”天然結合的多肽部分結合(通過共價或非共價交互作用)，(6)與天然不結合的多肽可操作地結合(通過共價或非共價交互作用)，或(7)不存在於自然界。這樣的單離的多肽可以由合成來源的基因組DNA、cDNA、mRNA或其他RNA，或它們任何組合編碼。較佳地，單離的多肽基本上不含在其天然環境中發現的會干擾其使用(治療、診斷、預防、研究或其他)的多肽或其他污染物。

天然存在的抗體通常包含四聚體。每個這樣的四聚體通常由兩對相同的多肽鏈組成，每對具有一條全長“輕鏈”(通常具有約25kDa的分子量)和一條全長“重鏈”(通常具有約為50-70kDa的分子量)。本文所用的術語“重鏈”和“輕鏈”是指具有足夠的可變結構域序列以賦予靶抗原特異性的任何免疫球蛋白多肽。每條輕鏈和重鏈的胺基末端部分通常包括約100至110或更多個胺基酸的可變結構域，其通常負責抗原識別。每條鏈的羧基末端部分通常定義負責效應子功能的恒定結

構域。因此，在天然存在的抗體中，全長重鏈免疫球蛋白多肽包括可變結構域(V_H)和3個恒定結構域(C_{H1}、C_{H2}和C_{H3})，其中V_H結構域位於多肽的胺基末端和C_{H3}結構域位於羧基末端，全長輕鏈免疫球蛋白多肽包括可變結構域(V_L)和恒定結構域(C_L)，其中V_L結構域位於多肽的胺基末端和C_L結構域位於羧基末端。

人輕鏈通常被分類為κ和λ輕鏈，並且人重鏈通常被分類為μ、δ、γ、α或ε，並且將抗體的同功異型物分別定義為IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有幾個亞類，包括但不限於IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亞類，包括但不限於IgM1和IgM2。IgA類似地細分為亞類，包括但不限於IgA1和IgA2。在全長輕鏈和重鏈內，可變區和恒定結構域通常通過約12個或更多個胺基酸的“J”區連接，重鏈還包括約10個以上胺基酸的“D”區。參見，例如，FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2nd ed., 1989)，其出於所有目的通過提述以其整體併入。每個輕/重鏈對的可變區通常形成抗原結合位點。天然存在的抗體的可變結構域通常表現出由三個高變區連接的相對保守的架構區(FR)的相同的一般結構，也稱為互補決定區或CDR。來自每對的兩條鏈的CDR通常通過架構區對齊，這可以使得能夠結合特定的抗原決定區。從胺基末端到羧基末端，輕鏈和重鏈可變結構域通常包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

術語“CDR組”是指在能夠結合抗原的單個可變區中出現的一組三個CDR。根據不同的系統，此等CDR的確切邊界已經被不同地定義。由Kabat描述的系統(Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))不僅提供了一種適用於抗體的任何可變區域的明確的殘基編號系統，而且還提供了定義三個CDR的精確殘基邊界。此等CDR可以稱為Kabat CDR。Chothia和同事(Chothia and Lesk,

1987, *J. Mol. Biol*. 196: 901-17; Chothia *et al*., 1989, *Nature* 342: 877-83)發現儘管在胺基酸序列水準上具有很大的多樣性，Kabat CDR中的某些亞部分仍採用幾乎相同的肽骨架構形。此等亞部分被指定為L1、L2和L3，或H1、H2和H3，其中“L”和“H”分別表示輕鏈和重鏈區域。此等區域可稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊的邊界。定義與Kaba CDR重疊的CDR的其他邊界由Padlan, 1995, *FASEB J*. 9: 133-39; MacCallum, 1996, *J. Mol. Biol*. 262(5): 732-45; 和Lefranc, 2003, *Dev. Comp. Immunol*. 27: 55-77描述。其他CDR邊界定義可能不嚴格遵循本文系統之一，但仍然會與Kabat CDR重疊，儘管根據特定殘基或殘基組或甚至整個CDR的預測或實驗結果，它們可能會縮短或延長，這不顯著影響抗原結合。本文使用的方法可以利用根據任何此等系統定義的CDR，儘管某些實施例使用Kabat或Chothia定義的CDR。使用胺基酸序列鑒定預測的CDR是業內(諸如在Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains," *In Antibody Engineering*, Vol. 2. Kontermann R., Dübel S., eds. Springer-Verlag, Berlin, p. 33–51 (2010)中)公知的。還可以檢查重鏈和/或輕鏈可變結構域的胺基酸序列以通過其他習知方法(例如通過與其他重鏈和輕鏈可變區的已知胺基酸序列比較確定序列高變區)來鑒定CDR的序列。編號的序列可以通過眼睛或者通過採用比對程序(諸如CLUSTAL程序套件之一)對齊，如Thompson, 1994, *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-80中所述的。通常使用分子模型來正確描繪架構和CDR區，並且因此校正基於序列的分配。

在一些實施例中，免疫球蛋白輕鏈或重鏈中的CDR/FR定義基於IMGT定義來確定(Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org)。

如本文所使用的術語“Fc”是指以單體形式或多聚體形式包含由抗體消化產

生或通過其他方式產生的非抗原結合片段的序列的分子，並且可以包含鉸鏈區。天然Fc的原始免疫球蛋白來源較佳是人來源的，並且可以是任何免疫球蛋白。Fc分子由單體多肽組成，所述單體多肽可通過共價(即二硫鍵)和非共價結合而連接成二聚體或多聚體形式。天然Fc分子的單體亞基之間的分子間二硫鍵的數量範圍為1至4，取決於類別(例如，IgG、IgA和IgE)或亞類(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2和IgG4)。Fc的一個實例是由木瓜蛋白酶消化IgG產生的二硫鍵鍵合的二聚體。如本文所使用的術語“天然Fc”對於單體、二聚體和多聚體形式是通用的。

F(ab)片段通常包括一條輕鏈和一條重鏈的V_H和C_{H1}結構域，其中F(ab)片段的V_H-C_{H1}重鏈部分不能與另一條重鏈多肽形成二硫鍵。如本文所使用的，F(ab)片段還可包括一條輕鏈，其含有由胺基酸連接子單離的兩個可變結構域和一條含有由胺基酸連接子分開的兩個可變結構域和C_{H1}結構域的重鏈。

F(ab')片段通常包括一條輕鏈和一條重鏈的一部分，其含有更多的恒定區(在C_{H1}和C_{H2}結構域之間)，從而可以在兩條重鏈之間形成鏈間二硫鍵以形成$F(ab')_2$分子。

如本文所使用的術語“結合蛋白”是指特異性結合至少一種靶抗原的非天然存在的(或重組或工程改造的)分子，例如，本公開的CD38多肽。

“重組”分子是通過重組方法製備、表現、產生或單離的分子。

本公開的一個實施例提供了對1~3種靶抗原具有生物學和免疫學特異性的結合蛋白。本公開的另一個實施例提供了包含編碼形成這樣的結合蛋白的多肽鏈的核苷酸序列的核酸分子。本公開的另一個實施例提供了包含含有編碼形成這樣的結合蛋白的多肽鏈的核酸分子的表現載體。本公開的還一個實施例提供

了表現這樣的結合蛋白的主體細胞(即，包含編碼形成這樣的結合蛋白的多肽鏈的核酸分子或載體)。

如本文所使用的術語“可交換性”是指結合蛋白質形式內可變結構域的可互換性並且具有保留折疊和最終結合親和力。“完全可交換性”是指交換式I的多肽鏈或式II的多肽鏈中的V_{H1}和V_{H2}結構域的順序，並因此交換V_{L1}和V_{L2}結構域的順序(即，顛倒順序)同時保持如保留結合親和力所證明的結合蛋白的完整功能的能力。此外，應該注意，名稱V_H和V_L僅指最終形式中特定蛋白質鏈上的結構域位置。例如，V_{H1}和V_{H2}可以衍生自親本抗體中的V_{L1}和V_{L2}結構域，並置於結合蛋白中的V_{H1}和V_{H2}位置。同樣地，V_{L1}和V_{L2}可以衍生自親本抗體中的V_{H1}和V_{H2}結構域，並置於結合蛋白中的V_{H1}和V_{H2}位置。因此，V_H和V_L名稱是指當前位置而不是親本抗體中的原始位置。因此，V_H和V_L結構域是“可交換的”。

如本文所使用的術語“抗原”或“靶抗原”或“抗原靶標”是指能夠被結合蛋白結合的分子或分子的一部分，並且另外能夠用於動物產生能夠結合該抗原抗原決定區的抗體。靶抗原可具有一個或多個抗原決定區。對於結合蛋白識別的每種靶抗原，結合蛋白能夠與識別靶抗原的完整抗體競爭。

“CD38”是分化簇38多肽，並且是在許多免疫細胞表面上發現的糖蛋白。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合一種或多種CD38多肽的胞外域。示例性CD38胞外域多肽序列包括但不限於人CD38的胞外域(例如，如SEQ ID NO:1所示的)和食蟹猴CD38的胞外域(例如，如SEQ ID NO:30所示的)。

術語“T細胞接合物”是指針對主體免疫系統，更具體地是T細胞的細胞毒活性的結合蛋白以及針對腫瘤靶蛋白的結合蛋白。

術語“單特異性結合蛋白”是指特異性結合一種抗原靶標的結合蛋白。

術語“單價結合蛋白”是指具有一個抗原結合位點的結合蛋白。

術語“雙特異性結合蛋白”是指特異性結合兩個不同抗原靶標的結合蛋白。在一些實施例中，雙特異性結合蛋白結合兩種不同的抗原。在一些實施例中，雙特異性結合蛋白結合相同抗原上的兩個不同抗原決定區。

術語“二價結合蛋白”是指具有兩個結合位點的結合蛋白。

術語“三特異性結合蛋白”是指特異性結合三個不同抗原靶標的結合蛋白。在一些實施例中，三特異性結合蛋白結合三種不同的抗原。在一些實施例中，三特異性結合蛋白結合相同抗原上的一個、兩個或三個不同抗原決定區。

術語“三價結合蛋白”是指具有三個結合位點的結合蛋白。在特定實施例中，三價結合蛋白可以結合一種抗原靶標。在其他實施例中，三價結合蛋白可以結合兩個抗原靶標。在其他實施例中，三價結合蛋白可以結合三個抗原靶標。

“單離的”結合蛋白是已經從其天然環境的組分中鑒定和單離和/或回收的蛋白。其天然環境的污染組分是會干擾結合蛋白的診斷或治療用途的材料，並且可包括酶、激素和其他蛋白質或非蛋白質溶質。在一些實施例中，結合蛋白會被純化：(1) 通過Lowry方法測定至大於95重量%的抗體，並且最佳大於99重量%，(2)通過使用旋轉杯定序儀至足以獲得N末端或內部胺基酸序列的至少15個殘基，或(3) 使用考馬斯藍或較佳銀染色在還原或非還原條件下通過SDS-PAGE至均一性。單離的結合蛋白包括重組細胞內的原位結合蛋白，因為不存在結合蛋白的天然環境的至少一種組分。

如本文所使用的術語“基本上純的”或“基本上純化的”是指存在的主要物質的化合物或物質(即，以摩爾計，它比組合物中的任何其他個體物質更豐富)。在一些實施例中，基本上純化的級分是組合物，其中所述物質包含至少約50%(基

於摩爾)存在的所有大分子物質。在其他實施例中，基本上純的組合物會占組合物中存在的所有大分子物質的大於約80%、85%、90%、95%或99%。在其他實施例中，將物質純化至基本均一(通過習知檢測方法不能在組合物中檢測到污染物質)，其中組合物基本上由單一大分子物質組成。

術語“抗原決定區”包括能夠特異性結合免疫球蛋白或T細胞受體的任何決定簇，較佳多肽決定簇。在某些實施例中，抗原決定區決定簇包括分子的化學活性表面基團，諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基，並且在某些實施例中，可具有特定的三維結構特徵和/或特定的電荷特徵。抗原決定區是抗原或結合蛋白結合的抗原區域。在某些實施例中，當結合蛋白在蛋白質和/或大分子的複雜混合物中優先識別其靶抗原時，稱其特異性結合抗原。在一些實施例中，當平衡解離常數≤ 10^{-8} M時，更佳當平衡解離常數≤ 10^{-9} M時，並且最佳當解離常數≤ 10^{-10} M時，稱結合蛋白特異性結合抗原。

結合蛋白的解離常數(K_D)可以例如通過表面等離子體共振來確定。一般地，表面等離子體共振分析使用BIAcore系統(Pharmacia Biosensor; Piscataway，NJ)通過表面等離子體共振(SPR)測量配位體(生物傳感器基質上的靶抗原)和分析物(溶液中的結合蛋白)之間的實時結合交互作用。表面等離子體分析也可以通過固定分析物(結合蛋白質在生物傳感器基質上)和呈遞配位體(靶抗原)來進行。如本文所使用的術語“K_D”是指特定結合蛋白與靶抗原之間交互作用的解離常數。

提及結合蛋白時本文所用的術語“結合”是指結合蛋白或其抗原結合片段與含有抗原決定區的抗原結合的能力，其Kd至少約是1 x 10^{-6} M、1 x 10^{-7} M、1 x 10^{-8} M、1 x 10^{-9} M、1 x 10^{-10} M、1 x 10^{-11} M、1 x 10^{-12} M或更高，和/或以比其對非特異性抗原的親和力大至少兩倍的親和力結合抗原決定區。在一些實施例中，本

公開的結合蛋白結合兩種或更多種抗原，例如人和食蟹猴CD38多肽。

在一些實施例中，本公開的抗原結合結構域和/或結合蛋白與人和食蟹猴CD38多肽(諸如CD38胞外域，諸如SEQ ID NO:1(人CD38同功異型物A)，SEQ ID NO:105(人CD38同功異型物E)和SEQ ID NO:30(食蟹猴CD38))“交叉反應”。當EC50在兩種抗原的相似範圍內時，與抗原1(Ag1)結合的結合蛋白與抗原2(Ag2)“交叉反應”。在本申請中，當Ag2的親和力與Ag1的親和力的比例等於或小於10(例如5、2、1或0.5)時，與Ag1結合的結合蛋白與Ag2交叉反應，親和力用對於兩種抗原相同的方法檢測。

當兩種抗原的親和力非常不同時，與Ag1結合的結合蛋白與Ag2“不顯著交叉反應”。如果結合反應太低，Ag2的親和力可能無法測量。在本申請中，當在相同實驗設定和相同的抗體濃度中結合蛋白與Ag2的結合反應小於相同結合蛋白與Ag1的結合反應的5%時，與Ag1結合的結合蛋白與Ag2不顯著交叉反應。在實踐中，使用的結合蛋白濃度可以是EC50或達到用Ag1獲得的飽和平穩狀態所需的濃度。

如本文所使用的術語“連接子”是指插入免疫球蛋白結構域之間的一個或多個胺基酸殘基，以為輕鏈和重鏈的結構域提供足夠的遷移率以折疊成交叉雙可變區免疫球蛋白。在序列水準，分別在可變域之間或在可變域和恒定域之間的轉換處插入連接子。可以鑒定結構域之間的轉換，因為很好地理解了免疫球蛋白結構域的大致大小。結構域轉變的精確位置可以通過定位不形成二級結構元件(諸如β-片層或α-螺旋)的肽段來確定，如實驗數據所證明的，或者可以通過建模技術或二級結構預測來假設。本文描述的連接子稱為L_1，其位於V_{L2}的C末端和V_{L1}結構域的N末端之間的輕鏈上；和L_2，其位於V_{L1}的C末端和C_L結構域的N

末端之間的輕鏈上。重鏈連接子稱為L_3，其位於V_{H1}的C末端和V_{H2}結構域的N末端之間；和L_4，其位於V_{H2}的C末端和C_{H1}結構域的N末端之間。

如本文所使用的術語“載體”是指用於將編碼信息轉移至主體細胞的任何分子(例如，核酸、質體或病毒)。術語“載體”包括能夠轉運與其連接的另一種核酸的核酸分子。一種類型的載體是“質體”，其是指可以插入額外的DNA區段的環狀雙鏈DNA分子。另一種類型的載體是病毒載體，其中可以將額外的DNA區段插入病毒基因組中。某些載體能夠在引入它們的主體細胞中自主複製(例如，具有細菌複製起點的細菌載體和附加型哺乳動物載體)。其他載體(例如，非附加型哺乳動物載體)可以在引入主體細胞後整合到主體細胞的基因組中，並由此與主體基因組一起複製。另外，某些載體能夠指導它們可操作地連接的基因的表現。這樣的載體在本文中稱為“重組表現載體”(或簡稱為“表現載體”)。一般而言，在重組DNA技術中有用的表現載體通常是質體的形式。術語“質體”和“載體”在本文中可互換使用，因為質體是最常用的載體形式。然而，本公開內容意圖包括其他形式的表現載體，諸如病毒載體(例如，複製缺陷型逆轉錄病毒、腺病毒和腺相關病毒)，它們具有相等的功能。

如本文所使用的片語“重組主體細胞”(或“主體細胞”)是指其中已引入重組表現載體的細胞。重組主體細胞或主體細胞不僅意指特定的個體細胞，還指這樣的細胞的後代。因為某些修飾可能由於突變或環境影響而在後代中發生，所以這樣的後代實際上可能與親本細胞不同，但是這樣的細胞仍然包括在本文所用的術語“主體細胞”的範圍內。多種主體細胞表現系統可用於表現結合蛋白，包括細菌、酵母、杆狀病毒和哺乳動物表現系統(以及噬菌體展示表現系統)。合適的細菌表現載體的實例是pUC19。為了重組表現結合蛋白，用一種或多種攜帶編

碼結合蛋白多肽鏈的DNA片段的重組表現載體轉化或轉染主體細胞，從而多肽鏈在主體細胞中表現，並較佳分泌到培養主體細胞的培養基中，從中可以回收結合蛋白。

如本文所使用的術語“轉化”是指細胞遺傳特徵的變化，並且當細胞被修飾為含有新DNA時已經轉化。例如，細胞被轉化，其中從其天然狀態進行遺傳修飾。轉化後，轉化DNA可以通過物理整合到細胞的染色體中而與細胞的DNA重組，或者可以作為附加型元件瞬時維持而不被複製，或者可以作為質體獨立地複製。當DNA與細胞分裂複製時，認為細胞已被穩定轉化。如本文所使用的術語“轉染”是指細胞攝取外來或外源DNA，並且當外源DNA已被引入細胞膜內時，細胞已被“轉染”。許多轉染技術是業內公知的。這樣的技術可用於將一種或多種外源DNA分子引入合適的主體細胞中。

如本文所用並且應用於物體的術語“天然存在的”是指物體可以在自然界中找到並且未被人操作的事實。例如，存在於生物體(包括病毒)中的可以從天然來源中單離並且未經人有意修飾的多核苷酸或多肽是天然存在的。類似地，如本文所使用的，“非天然存在的”是指在自然界中未發現或已經由人進行結構修飾或合成的物體。

如本文所使用的，二十種習知胺基酸及其縮寫遵循習知用法。二十種習知胺基酸的立體異構物(例如D-胺基酸)；非天然胺基酸和類似物，諸如α-, α-二取代胺基酸、N-烷基胺基酸、乳酸，和其它非習知胺基酸也可以是結合蛋白多肽鏈的合適組分。非習知胺基酸的實例包括：4-羥基脯胺酸、γ-羧基麩胺酸、ε-N,N,N-三甲基離胺酸、ε-N-乙醯離胺酸、O-磷酸絲胺酸、N-乙醯絲胺酸、N-甲醯基甲硫胺酸、3-甲基組胺酸、5-羥基離胺酸、σ-N-甲基精胺酸和其他類似的胺基酸和

亞胺基酸(例如，4-羥基脯胺酸)。本文所使用的多肽符號中，根據標準用法和慣例，左手方向是胺基末端方向，右手方向是羧基末端方向。

可以基於共同的側鏈性質將天然存在的殘基分成以下種類:

(1)疏水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Tyr、Pro；

(2)極性親水性：Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys、Ser、Thr；

(3)脂肪族：Ala、Gly、Ile、Leu、Val、Pro；

(4)脂肪族疏水性：Ala、Ile、Leu、Val、Pro；

(5)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(6)酸性：Asp、Glu；

(7)鹼性：His、Lys、Arg；

(8)影響鏈取向的殘基：Gly、Pro；

(9)芳香族：His、Trp、Tyr、Phe；和

(10)芳香族疏水性：Phe、Trp、Tyr。

保守胺基酸取代可涉及將此等種類之一的成員與同一種類的另一成員交換。非保守替代可能涉及將此等種類中的一個的成員交換給另一個種類的成員。

熟習此項技術者將能夠使用公知的技術確定結合蛋白的多肽鏈的合適變異體。例如，熟習此項技術者可鑒定多肽鏈的合適區域，其可通過靶向不被認為對活性重要的區域而在不破壞活性的情況下改變。或者，熟習此項技術者可以鑒定在相似多肽中保守的分子的殘基和部分。另外，甚至可能對生物活性或結構重要的區域可以進行保守胺基酸取代而不破壞生物活性或不對多肽結構產生不利影響。

本文使用的術語“患者”包括人和動物個體(例如哺乳動物，諸如狗、豬、馬、

貓、牛等)。

如本文所使用的術語“治療”或“處理”是指治療性治療和預防性或預防措施。需要治療的患者包括患有病症的患者以及易患病症的患者或要預防病症的患者。在具體的實施例中，結合蛋白可用於治療患有癌症的人，或易患癌症的人，或改善人個體中的癌症。結合蛋白也可用于預防人類患者的癌症。在具體的實施例中，癌症是多發性骨髓瘤、急性淋巴母細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病、急性髓樣白血病、淋巴瘤、乳腺癌諸如Her2+乳腺癌、前列腺癌、生髮中心B細胞淋巴瘤或B細胞急性淋巴母細胞白血病。

如本文所使用的術語“醫藥組合物”或“治療組合物”是指當適當地投予患者時能夠誘導期望的治療效果的化合物或組合物。

如本文所使用的術語“醫藥上可接受的載劑”或“生理學上可接受的載劑”是指一種或多種適於實現或增強結合蛋白遞送的製劑材料。

當用於指包含一種或多種結合蛋白的醫藥組合物時，術語“有效量”和“治療有效量”是指足以產生期望的治療結果的量或劑量。更具體地，治療有效量是足以在一段時間內抑制與所治療病況相關的一種或多種臨床定義的病理過程的結合蛋白的量。有效量可以根據所使用的特異性結合蛋白而變化，並且還取決於與所治療的患者相關的多種因素和病況以及病症的嚴重程度。例如，如果要在體內投予結合蛋白，則在臨床前動物工作中獲得的因素，諸如患者的年齡、體重和健康以及劑量反應曲線和毒性數據會是所考慮的因素之一。確定給定醫藥組合物的有效量或治療有效量完全在熟習此項技術者的能力範圍內。

本公開的一個實施例提供了一種醫藥組合物，其包含醫藥上可接受的載劑和治療有效量的結合蛋白。

II・抗CD38結合蛋白

本公開的某些態樣涉及結合蛋白，其包含結合CD38多肽(例如，人和食蟹猴CD38多肽)的抗原結合位點。在一些實施例中，結合蛋白是單特異性的和/或單價的、雙特異性的和/或二價的、三特異性的和/或三價的或多特異性的和/或多價的。

本文描述了示例性單特異性、雙特異性或三特異性結合蛋白的多種特徵。例如，在一些實施例中，結合蛋白或其抗原結合片段與人CD38(例如，人CD38同功異型物A和/或同功異型物E多肽)和食蟹猴CD38交叉反應。在一些實施例中，結合蛋白誘導CD38+細胞的凋亡。在一些實施例中，結合蛋白將T細胞募集至CD38+細胞並任選地活化T細胞(例如，通過TCR刺激和/或共刺激)。

在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；或抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺

基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；或抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQG (SEQ ID NO:111)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，結合蛋白包含來自mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA、mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A、mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA、mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA、mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A或mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA的抗體VH和/或VL結構域序列的1、2、3、4、5或6個CDR，如表G、H或I所示。

在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：

抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；或抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在其他實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；或抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有

IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，VH結構域從N末端至C末端包含序列FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4；其中FR1包含序列QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:86)、QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:87)或QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO:88)；其中FR2包含序列MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO:90)或MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO:91)；其中FR3包含序列NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:93)或NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:94)；和其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)。在一些實施例中，VL結構域從N末端到C末端包含序列FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4；其中FR1包含序列DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRAS (SEQ ID NO:97)；其中FR2包含序列MHWYQQKPGQPPRLLIY (SEQ ID NO:99)；其中FR3包含序列SRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:101)；其中FR4包含序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:103)。

在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:5的胺基酸序列至少85%、

至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和/或VL結構域包含與SEQ ID NO:6的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:17的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和/或VL結構域包含與SEQ ID NO:18的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:21的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和/或VL結構域包含與SEQ ID NO:18的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:23的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和/或VL結構域包含與SEQ ID NO:18的胺基酸序列至少85%、至少86%、

至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:13的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和/或VL結構域包含與SEQ ID NO:14的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。

在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:5的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和VL結構域包含與SEQ ID NO:6的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:17的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和VL結構域包含與SEQ ID NO:18的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ

ID NO:21的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和VL結構域包含與SEQ ID NO:18的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:23的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和VL結構域包含與SEQ ID NO:18的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:13的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和VL結構域包含與SEQ ID NO:14的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。

在一些實施例中，VH結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列；和VL結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列；和VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，

VH結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列；和VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列；和VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列；和VL結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:7的胺基酸序列的抗體重鏈和/或含有SEQ ID NO:8的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:19的胺基酸序列的抗體重鏈和/或含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:22的胺基酸序列的抗體重鏈和/或含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:24的胺基酸序列的抗體重鏈和/或含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:15的胺基酸序列的抗體重鏈和/或含有SEQ ID NO:16的胺基酸序列的抗體輕鏈。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:7的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:8的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:19的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:22的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:24的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:15的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:16的胺基酸序列的抗體輕鏈。

在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；或抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，結合蛋白包含抗原結合位點，所述抗原結合位點包含：抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，VH結構域從N末端到C末端包含序列，FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4；其中FR1包含序列QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS (SEQ ID NO:89)；其中FR2包含序列MHWVRQAPGKGLEWVAV (SEQ ID NO:92)；其中FR3包含序列YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:95)；並且其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)。在一些實施例中，VL結構域從N末端到C末端包含序列，FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4；其中FR1包含序列

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:98)；其中FR2包含序列GWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:100)；其中FR3包含序列SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYC (SEQ ID NO:102)；並且其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:104)。

在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:9的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和/或VL結構域包含與SEQ ID NO:10的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。

在一些實施例中，VH結構域包含與SEQ ID NO:9的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列；和VL結構域包含與SEQ ID NO:10的胺基酸序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，VH結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列；和VL結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:11的胺基酸序列的抗體重鏈或含有SEQ ID NO:12的胺基酸序列的抗體輕鏈。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含含有SEQ ID NO:11的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ

ID NO:12的胺基酸序列的抗體輕鏈。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含表G中所示的抗體序列的1、2、3、4、5或6個CDR序列。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含表H中所示的抗體序列的1、2、3、4、5或6個CDR序列，VH結構域序列，和/或VL結構域序列。在一些實施例中，本發明的結合蛋白包含表I中所示的抗體序列的1、2、3、4、5或6個CDR序列，VH結構域序列，和/或VL結構域序列。在一些實施例中，本發明的結合蛋白包含表I中所示的1、2、3或4個多肽序列。

表G. 抗CD38結合蛋白的CDR序列。

Ab	CDR_H1	CDR_H2	CDR_H3	CDR_L1	CDR_L2	CDR_L3
mAb1	GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)	ARTGGLRRA YFTY (SEQ ID NO:33)	ESVDSYGNG F (SEQ ID NO:34)	LAS (SEQ ID NO:35)	QQNKEDP WT (SEQ ID NO:36)
mAb2	GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)	IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)	ARTGGLRRA YFTY (SEQ ID NO:33)	QSVSSYGQG F (SEQ ID NO:39)	GAS (SEQ ID NO:40)	QQNKEDP WT (SEQ ID NO:36)
mAb3	GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)	ARTGGLRRA YFTY (SEQ ID NO:33)	ESVDSYGNG F (SEQ ID NO:34)	LAS (SEQ ID NO:35)	QQNKEDP WT (SEQ ID NO:36)
mAb4	GYTFTSFN	IYPGNGGT	ARTGGLRRA	ESVDSYGNG	LAS	QQNKEDP

	(SEQ ID NO:31)	(SEQ ID NO:32)	YFTY (SEQ ID NO:33)	F (SEQ ID NO:34)	(SEQ ID NO:35)	WT (SEQ ID NO:36)
mAb5	GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)	ARTGGLRRA YFTY (SEQ ID NO:33)	ESVDSYGNG F (SEQ ID NO:34)	LAS (SEQ ID NO:35)	QQNKEDP WT (SEQ ID NO:36)
mAb6	GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)	IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)	ARMFRGAFD Y (SEQ ID NO:43)	QGIRND (SEQ ID NO:44)	AAS (SEQ ID NO:45)	LQDYIYYP T (SEQ ID NO:46)

表H. 抗CD38(mAb1-7)和其他結合蛋白的可變結構域序列。

Ab	**VH (蛋白質)**	**VL (蛋白質)**
mAb1	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSC KAS**GYTFTSFN**MHWVKETPGQ GLEWIGY**IYPGNGGT**NYNQKFK GKATLTADTSSSTAYMQISSLTSE DSAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**W GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS CRAS**ESVDSYGNGF**MHWYQ QKPGQPPKLLIY**LAS**NLESGV PARFSGSGSRTDFTLTIDPVEA DDAATYYC**QQNKEDPWT**FG GGTKLEIK (SEQ ID NO:6
mAb2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KAS**GYTFTSYA**MHWVKEAPGQ RLEWIGY**IYPGQGGT**NYNQKFQ	DIVLTQSPATLSLSPGERATISC RAS**QSVSSYGQGF**MHWYQQ KPGQPPRLLIY**GAS**SRAT

Ab	VH (蛋白質)	VL (蛋白質)
	GRATLTADTSASTAYMELSSLRSE DTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**W GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:13)	GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC**QQNKEDPWT**F GGGTKLEIK (SEQ ID NO:14)
mAb3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KAS**GYTFTSFN**MHWVKEAPGQ RLEWIGY**IYPGNGGT**NYNQKFQ GRATLTADTSASTAYMELSSLRSE DTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**W GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISC RAS**ESVDSYGNGF**MHWYQQ KPGQPPRLLIY**LAS**SRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC**QQNKEDPWT**F GGGTKLEIK (SEQ ID NO:18)
mAb4	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSC KAS**GYTFTSFN**MHWVKEAPGQ GLEWIGY**IYPGNGGT**NYNQKFQ GRATLTADTSASTAYMEISSLRSE DTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**W GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISC RAS**ESVDSYGNGF**MHWYQQ KPGQPPRLLIY**LAS**SRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC**QQNKEDPWT**F GGGTKLEIK (SEQ ID NO:18)
mAb5	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSC KAS**GYTFTSFN**MHWVKEAPGQ RLEWIGY**IYPGNGGT**NYNQKFQ GRATLTADTSASTAYMEISSLRSE DTAVYFC**ARTGGLRRAYFTY**W GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:23)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISC RAS**ESVDSYGNGF**MHWYQQ KPGQPPRLLIY**LAS**SRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC**QQNKEDPWT**F GGGTKLEIK (SEQ ID NO:18)
mAb6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT

Ab	VH (蛋白質)	VL (蛋白質)
	AAS**GFTFSSYG**MHWVRQAPGK GLEWVAV**IWYDGSNK**YYADSV KGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC**ARMFRGAFDY**WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)	CRAS**QGIRND**LGWYQQKPG KAPKLLIY**AAS**SLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISGLQPEDSAT YYC**LQDYIYYPT**FGQGTKVE IK (SEQ ID NO:10)
mAb7	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSC KASGYTFTDYWMQWVKQRPGQ GLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQ GKATLTADKSSKTVYMHLSSLAS EDSAVYYCARGDYYGSNSLDY WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:47)	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSI TCKASQDVSTVVAWYQQKPG QSPRRLIYSASYRYIGVPDRFT GSGAGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSPPYTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:48)
抗 $CD28_{sup}$	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KAS**GYTFTSYY**IHWVRQAPGQG LEWIGS**IYPGNVNT**NYAQKFQG RATLTVDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYC**TRSHYGLDWNFDV**WG KGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CQAS**QNIYVW**LNWYQQKPG KAPKLLIY**KAS**NLHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDIAT YYC**QQGQTYPYT**FGQGTKL EIK (SEQ ID NO:50)
抗 $CD28_{cvn}$	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCT VS**GFSLSDYG**VHWVRQPPGKGL EWLGV**IWAGGGT**NYNPSLKSR KTISKDTSKNQVSLKLSSVTAAD TAVYYC**ARDKGYSYYYSMDY**W	DIVLTQSPASLAVSPGQRATIT CRAS**ESVEYYVTSL**MQWYQ QKPGQPPKLLIF**AAS**NVESGV PARFSGSGSGTDFTLTINPVEA NDVANYYC**QQSRKVPYT**FG

Ab	VH (蛋白質)	VL (蛋白質)
	GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:51)	QGTKLEIK (SEQ ID NO:52)
抗 $CD3_{mid}$	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AAS**GFTFTKAW**MHWVRQAPG KQLEWVAQ**IKDKSNSYAT**YYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC**RGVYYALSPFD** **Y**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:53)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSS**QSLVHNNANTY**LSWYL QKPGQSPQSLIY**KVS**NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYC**GQGTQYPFT**FG SGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
抗 $CD3_{low}$	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AAS**GFTFTKAW**MHWVRQAPG KGLEWVAQ**IKDKSNSYAT**YYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCR**GVYYALSPFD** **Y**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:84)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSS**QSLVHNNGNTY**LSWYL QKPGQSPQLLIY**KVS**NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYC**GQGTQYPFT**FG GGTKVEIK (SEQ ID NO:85)

注意：CDR序列在以上胺基酸序列中加粗和加下劃線。

表I. 結合蛋白的全長序列。

mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(臼) FALA重鏈1 (例如，本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSI YPGNVNTNYAQKFQGRATLTVDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGL DWNFDVWGKGTTVTVSSSQVQLVES	**SEQ ID NO: 60**

鏈)	GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKA WMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSP FDYWGQGTLVTVSSRTASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG	
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQ SLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGS GTKVEIKGQPKAAPDIQMTQSPSSLS	**SEQ ID NO: 61**

	ASVGDRVTITCQASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQ GQTYPYTFGQGTKLEIKTKGPSRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
mAb2 IgG4(杵) FALA重鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYAMHWVKEAPGQRLEWIGY IYPGQGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFCARTGGL RRAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG	**SEQ ID NO: 62**

	QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG	
mAb2輕鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQS VSSYGQGFMHWYQQKPGQPPRLLIY GASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISP LEPEDFAVYYCQQNKEDPWTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 63**
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) LALA P329A 重鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSI YPGNVNTNYAQKFQGRATLTVDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGL DWNFDVWGKGTTVTVSSSQVQLVES GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKA WMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSP FDYWGQGTLVTVSSRTASTKGPSVFP	**SEQ ID NO: 64**

	LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 61**
mAb2 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYAMHWVKEAPGQRLEWIGY IYPGQGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFCARTGGL RRAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	**SEQ ID NO: 65**

	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	
mAb2輕鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 63**
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) NNSA重鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSI YPGNVNTNYAQKFQGRATLTVDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGL DWNFDVWGKGTTVTVSSSQVQLVES	**SEQ ID NO: 66**

	GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKA WMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSP FDYWGQGTLVTVSSRTASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNNASRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	
CD28supxCD3mid輕鏈1 (例如，本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)	參見以上。	**SEQ ID NO: 61**
mAb2 IgG1(杵) NNSA	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS	**SEQ ID**

重鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	GYTFTSYAMHWVKEAPGQRLEWIGY IYPGQGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFCARTGGL RRAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNNASRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	**NO: 67**
CD38VH1輕鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 63**
mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		

CD28supxCD3mid IgG4(臼) FALA重鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 60**
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 61**
mAb6 IgG4(杵) FALA重鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISGDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMF RGAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI	**SEQ ID NO: 68**

	SKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLG	
mAb6輕鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQP EDSATYYCLQDYIYYPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	**SEQ ID NO: 69**
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) LALA P329A 重鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 64**

CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 61**
mAb6 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISGDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMF RGAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 70**

mAb6輕鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 69**
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) NNSA重鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 66**
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 61**
mAb6 IgG1(杵) NNSA重鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISGDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMF RGAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG	**SEQ ID NO: 71**

	LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNNASRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	
mAb6輕鏈2 **(例如，本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO: 69**
mAb1單價抗體		
mAb1重鏈	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKAS GYTFTSFNMHWVKETPGQGLEWIGY IYPGNGGTNYNQKFKGKATLTADTSS STAYMQISSLTSEDSAVYFCARTGGLR RAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	**SEQ ID NO: 7**

	VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	
mAb1輕鏈	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASES VDSYGNGFMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDA ATYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC	**SEQ ID NO: 8**
mAb2單價抗體		

mAb2重鏈	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYAMHWVKEAPGQRLEWIGY IYPGQGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFCARTGGL RRAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPL PEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 15**
mAb2輕鏈	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQS VSSYGQGFMHWYQQKPGQPPRLLIY GASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFA VYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRT	**SEQ ID NO: 16**

	VAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
mAb3單價抗體		
mAb3重鏈	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS GYTFTSFNMHWVKEAPGQRLEWIGY IYPGNGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFCARTGGL RRAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPL PEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN	**SEQ ID NO: 19**

	HYTQKSLSLSPG	
mAb3輕鏈	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASES VDSYGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIY LASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFA VYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRT VAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 20**
mAb4單價抗體		
mAb4重鏈	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS GYTFTSFNMHWVKEAPGQGLEWIGY IYPGNGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMEISSLRSEDTAVYFCARTGGLR RAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV	**SEQ ID NO: 22**

	EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	
mAb4輕鏈	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASES VDSYGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIY LASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFA VYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRT VAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 20**
mAb5單價抗體		
mAb5重鏈	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS GYTFTSFNMHWVKEAPGQRLEWIGY IYPGNGGTNYNQKFQGRATLTADTSA STAYMEISSLRSEDTAVYFCARTGGLR RAYFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF	**SEQ ID NO: 24**

	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG	
mAb5輕鏈	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASES VDSYGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIY LASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFA VYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRT VAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 20**

mAb6 單價抗體		
mAb6重鏈	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISGDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMF RGAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	**SEQ ID NO: 11**
mAb6輕鏈	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYY	**SEQ ID NO: 12**

	CLQDYIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	
mAb7單價抗體		
mAb7重鏈	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKAS GYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIG TIYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKS SKTVYMHLSSLASEDSAVYYCARGD YYGSNSLDYWGQGTSVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL	**SEQ ID NO: 107**

	YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
mAb7輕鏈	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKAS QDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSAS YRYIGVPDRFTGSGAGTDFTFTISSVQ AEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKL EIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	**SEQ ID NO: 106**

表J. 結合蛋白的全長多核苷酸序列。

mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(臼) FALA重鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC GCCGAGGTCGTGAAACCTGGCGCC TCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCA GCGGCTACACCTTTACCAGCTACTA CATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGACAGGGACTGGAATGGATCGGC AGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGG GCAGAGCCACCCTGACCGTGGACA	**SEQ ID NO:72**

	CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGA ACTGAGCCGGCTGAGAAGCGACGA CACCGCCGTGTACTACTGCACCCGG TCCCACTACGGCCTGGATTGGAACT TCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGT GCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGG AGTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCACCAAGGCCTGGATG CACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGA AAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAG ATCAAGGACAAGAGCAACAGCTAC GCCACCTACTACGCCGACAGCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGG ACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTCG GGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCC TTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCC TCGTGACCGTGTCTAGTCGGACCGC CAGCACAAAGGGCCCATCGGTGTTC CCTCTGGCCCCTTGCAGCAGAAGCA CCAGCGAATCTACAGCCGCCCTGGG	

	CTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACT CTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCCGTGCTCCAGAG CAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGC GTCGTGACAGTGCCCAGCAGCAGC CTGGGCACCAAGACCTACACCTGTA ACGTGGACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAT CTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCC TTGCCCAGCCCCTGAAGCTGCCGGC GGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCC CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTG CGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAA GATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AACAGTTCAACAGCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG GGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC	

	CCCGCGAGCCTCAAGTGTGTACCCT GCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGT GCCGTGAAAGGCTTCTACCCCAGCG ACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA AGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAG CGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCC AAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGG TGGCAGGAAGGCAACGTGTTCAGC TGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCT GTCTCTGTCCCTGGGC	
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCC TGAGCCTGAGCGTGACACCTGGAC AGCCTGCCAGCATCAGCTGCAAGA GCAGCCAGAGCCTGGTGCACAACA ACGCCAACACCTACCTGAGCTGGTA TCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC CCAGTCCCTGATCTACAAGGTGTCC AACAGATTCAGCGGCGTGCCCGAC AGATTCTCCGGCAGCGGCTCTGGCA CCGACTTCACCCTGAAGATCAGCCG	**SEQ ID NO:73**

	GGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGT GTACTATTGTGGCCAGGGCACCCAG TACCCCTTCACCTTTGGCAGCGGCA CCAAGGTGGAAATCAAGGGCCAGC CCAAGGCCGCCCCCGACATCCAGAT GACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCT GCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCCAGAACA TCTACGTGTGGCTGAACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAA GCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAAC CTGCACACCGGCGTGCCCAGCAGAT TTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGA CTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTG CAGCCCGAGGACATTGCCACCTACT ACTGCCAGCAGGGCCAGACCTACC CCTACACCTTTGGCCAGGGCACCAA GCTGGAAATCAAGACCAAGGGCCC CAGCCGTACGGTGGCCGCTCCCAGC GTGTTCATCTTCCCACCTAGCGACG AGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCT CTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCCGCGAGGCCAAAGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCA	

	GAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACACTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAA GTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCC CCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGG GCGAGTGT	
mAb2 IgG4(杵) FALA重鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC GCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCC TCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCA GCGGCTACACCTTTACCAGCTACGC CATGCACTGGGTCAAAGAGGCCCCT GGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCT ACATCTACCCCGGCCAGGGCGGCAC CAACTACAACCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGCCGATACA AGCGCCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAC AGGCGGCCTGAGGCGGGCCTACTTT ACCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAA	**SEQ ID NO:74**

	GGGCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCC CCTTGCAGCAGAAGCACCAGCGAA TCTACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCG TGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGT GACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCT CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTC CAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCC TGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGAC AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCAC CAAGACCTACACCTGTAACGTGGAC CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGCGGGTGGAATCTAAGTACG GCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGC CCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCTCC GTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCCGGAC CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGG TGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA	

	AGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCA GCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAA GGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCC TCAAGTGTATACCCTGCCCCCTTGC CAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGTGGTGTCTCGTGAAAG GCTTCTACCCCAGCGACATTGCCGT GGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCC CGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCA TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAG GCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCC CTGGGC	
mAb2輕鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTG CCACCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGA GAGAGCCACCATCAGCTGTAGAGCC AGCCAGAGCGTGTCCAGCTACGGC CAGGGCTTCATGCACTGGTATCAGC AGAAGCCCGGCCAGCCCCCCAGAC TGCTGATCTATGGCGCCAGCAGCAG	**SEQ ID NO:75**

	AGCCACAGGCATCCCCGCCAGATTT TCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACT TCACCCTGACAATCAGCCCCCTGGA ACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTAC TGCCAGCAGAACAAAGAGGACCCC TGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCT AGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC ACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGA ACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAA GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGA AAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC ACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGATT ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGT CTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAA CCGGGGCGAGTGC	
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) LALA P329A	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC GCCGAGGTCGTGAAACCTGGCGCC	**SEQ ID NO:76**

重鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	TCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCA GCGGCTACACCTTTACCAGCTACTA CATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGACAGGGACTGGAATGGATCGGC AGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGG GCAGAGCCACCCTGACCGTGGACA CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGA ACTGAGCCGGCTGAGAAGCGACGA CACCGCCGTGTACTACTGCACCCGG TCCCACTACGGCCTGGATTGGAACT TCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGT GCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGG AGTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCACCAAGGCCTGGATG CACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGA AAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAG ATCAAGGACAAGAGCAACAGCTAC GCCACCTACTACGCCGACAGCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGG ACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG	

	AGGACACCGCCGTGTACTACTGTCG GGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCC TTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCC TCGTGACCGTGTCTAGTCGGACCGC CAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTT CCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGG GCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAAT TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTC CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCT CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAAC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGA AGCCGCCGGAGGCCCTTCCGTGTTC CTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAG TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG	

	AAGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CAAGAGAGGAACAGTACAACAGCA CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT GTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAG GTGTGCACACTGCCCCCAAGCAGG GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCT TCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT CCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGAC AAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG C	
CD28supxCD3mid輕鏈1 (例如，編碼本公開的三	參見以上。	**SEQ ID NO:73**

特異性結合蛋白的第一多肽鏈)		
mAb2 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)**	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC GCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCC TCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCA GCGGCTACACCTTTACCAGCTACGC CATGCACTGGGTCAAAGAGGCCCCT GGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCT ACATCTACCCCGGCCAGGGCGGCAC CAACTACAACCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGCCGATACA AGCGCCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAC AGGCGGCCTGAGGCGGGCCTACTTT ACCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCC CCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCG GAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGT GAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCC	**SEQ ID NO:77**

	AGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTG TACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACA GTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTG CGACAAGACCCACACCTGTCCCCCT TGTCCTGCCCCCGAAGCCGCCGGAG GCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCC AAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC AGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC GTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGA ACAGTACAACAGCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG GCCCTGGCCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGCGAACCCCAGGTGTACACACT GCCCCCATGCAGGGACGAGCTGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGT	

	CTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCG ATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA CGGCCAGCCCGAGAACAACTACAA GACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCA AGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGC	
mAb2輕鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:75**
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) NNSA重鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC GCCGAGGTCGTGAAACCTGGCGCC TCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCA GCGGCTACACCTTTACCAGCTACTA CATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGACAGGGACTGGAATGGATCGGC AGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA	**SEQ ID NO:78**

	CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGG	
	GCAGAGCCACCCTGACCGTGGACA	
	CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGA	
	ACTGAGCCGGCTGAGAAGCGACGA	
	CACCGCCGTGTACTACTGCACCCGG	
	TCCCACTACGGCCTGGATTGGAACT	
	TCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA	
	CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGT	
	GCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGG	
	AGTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCT	
	GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG	
	CTTCACCTTCACCAAGGCCTGGATG	
	CACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGA	
	AAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAG	
	ATCAAGGACAAGAGCAACAGCTAC	
	GCCACCTACTACGCCGACAGCGTGA	
	AGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGG	
	ACGACAGCAAGAACACCCTGTACC	
	TGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG	
	AGGACACCGCCGTGTACTACTGTCG	
	GGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCC	
	TTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCC	
	TCGTGACCGTGTCTAGTCGGACCGC	
	CAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTT	

	CCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGG GCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAAT TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTC CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCT CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAAC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCCGA ACTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTC CTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAG TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AAGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CAAGAGAGGAACAGTACAACAATG CCTCCCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT	

	GTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCC ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAG GTGTGCACACTGCCCCCAAGCAGG GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCT TCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT CCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGAC AAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG C	
CD28supxCD3mid輕鏈1 (例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)	參見以上。	**SEQ ID NO:73**
mAb2 IgG1(杵) NNSA 重鏈2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC GCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCC TCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCA	**SEQ ID NO:79**

(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)	GCGGCTACACCTTTACCAGCTACGC CATGCACTGGGTCAAAGAGGCCCCT GGCCAGAGACTGGAATGGATCGGCT ACATCTACCCCGGCCAGGGCGGCAC CAACTACAACCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGCCGATACA AGCGCCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAC AGGCGGCCTGAGGCGGGCCTACTTT ACCTATTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT	

	GACAAAACTCACACATGCCCACCGT GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA TGTTGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAATGCCTCCCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCA AGAATCAAGTCAGCCTGTGGTGCCT GGTAAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACTCAAA ACTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG	

	GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGT	
mAb2輕鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:75**
mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(臼) FALA重鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:72**
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:73**
mAb6 IgG4(杵) FALA重鏈2	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGC GGAGGCGTGGTGCAGCCTGGCAGG TCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCA	**SEQ ID NO:80**

(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)	GCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGG AATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCC GTGATTTGGTACGACGGCAGCAACA AGTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCGGCGACAA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGA ATGTTCAGAGGCGCCTTCGACTACT GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCC ATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGC AGCAGAAGCACCAGCGAATCTACA GCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGG ACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACA AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCG TGCTCCAGAGCAGCGGCCTGTACTC TCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACC TACACCTGTAACGTGGACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGC GGGTGGAATCTAAGTACGGCCCTCC	

	CTGCCCTCCTTGCCCAGCCCCTGAA GCTGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCC TGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGT CCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAACAGTTCAACAGCACC TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGT CCAACAAGGGCCTGCCCAGCTCCAT CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAAGT GTATACCCTGCCCCCTTGCCAGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGTGGTGTCTCGTGAAAGGCTTCT ACCCCAGCGACATTGCCGTGGAATG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCCTGTG CTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAA GAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGT	

	GTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
mAb6輕鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCCA GCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC CAGCCAGGGCATCCGGAACGACCT GGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGC AAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACG CCGCTAGCTCTCTGCAGTCCGGCGT GCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGC TCCGGCACCGACTTCACCCTGACAA TCTCTGGCCTGCAGCCCGAGGACAG CGCCACCTACTACTGTCTGCAAGAC TACATCTACTACCCCACCTTCGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTC ATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGC TGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCGT GTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCC CGCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAG	**SEQ ID NO:81**

	CAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCCTGACACTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC AAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACC CACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGT GT	
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) LALA P329A 重鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:76**
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:73**
mAb6 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2 **(例如，編碼本公開的三**	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGC GGAGGCGTGGTGCAGCCTGGCAGG TCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCA	**SEQ ID NO:82**

特異性結合蛋白的第三多肽鏈)	GCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGG AATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCC GTGATTTGGTACGACGGCAGCAACA AGTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCGGCGACAA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGA ATGTTCAGAGGCGCCTTCGACTACT GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGC AGCAAGAGCACATCTGGCGGAACA GCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGG ACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTG TGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACAG CCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCC AGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAA	

	GACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCT GCCCCCGAAGCCGCCGGAGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG GACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCT GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG ACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCAAGAGAGGAACAGT ACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTG GCCGCCCCCATCGAGAAAACCATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCG AACCCCAGGTGTACACACTGCCCCC ATGCAGGGACGAGCTGACCAAGAA CCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTG AAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCG CCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCC AGCCCGAGAACAACTACAAGACCA CCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGG CTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGA CAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC	

	AGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGC	
mAb6輕鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:81**
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(臼) NNSA重鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第二多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:78**
CD28supxCD3mid輕鏈1 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第一多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:73**
mAb6 IgG1(杵) NNSA重鏈2	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGC GGAGGCGTGGTGCAGCCTGGCAGG TCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCA	**SEQ ID NO:83**

(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第三多肽鏈)	GCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGG AATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGCAAAGGACTGGAATGGGTGGCC GTGATTTGGTACGACGGCAGCAACA AGTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCGGCGACAA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGA ATGTTCAGAGGCGCCTTCGACTACT GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA	

	AACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTTG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAATGCCTCCCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT GCCGGGATGAGCTGACCAAGAATC AAGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTAAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCCTCTACTCAAAACTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA	

	GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGT	
mAb6輕鏈2 **(例如，編碼本公開的三特異性結合蛋白的第四多肽鏈)**	參見以上。	**SEQ ID NO:81**

CD38多肽

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含結合人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域的抗原結合位點。用於確定抗原結合位點是否結合抗原的示例性測定在本文中描述並且是業內已知的。在一些實施例中，通過ELISA測定來確定結合，例如，如下文所述。在一些實施例中，通過SPR測定確定結合，例如，如下文所述。在一些實施例中，使用在其細胞表面上表現CD38多肽的細胞通過流式細胞術測定來確定結合，例如，如下文所述。參見，例如，實例1、3和4。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合包含SEQ ID NO:1和/或30的胺基酸序列的純化多肽或其片段(例如，通過ELISA或SPR測量的)。在一些實施例中，當在細胞表面上表現時(例如，通過流式細胞術測量的)，本公開的結合蛋白結合多肽或包含SEQ ID NO:1和/或30的胺基酸序列。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合CD38同功異型物A多肽(例如，包

含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合CD38同功異型物E多肽(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列，並且不包含SEQ ID NO:1的完整胺基酸序列，由SEQ ID NO:105的胺基酸序列組成，或基本上由SEQ ID NO:105的胺基酸序列組成)。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合CD38同功異型物A多肽(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)和CD38同功異型物E多肽(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列，並且不包含SEQ ID NO:1的完整胺基酸序列，由SEQ ID NO:105的胺基酸序列組成，或基本上由SEQ ID NO:105的胺基酸序列組成)。不希望受理論束縛的情況下，認為與CD38同功異型物E多肽結合可能是有利的，例如，將本公開的結合蛋白靶向表現CD38同功異型物E多肽的細胞。

人CD38同功異型物A胞外域多肽序列

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS KHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLED TLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAE AACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGRED SRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO:1)

人CD38同功異型物E多肽序列

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS KHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLED

TLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRHFW ECGSP (SEQ ID NO:105)

在一些實施例中，人CD38多肽的胞外域包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列。在一些實施例中，食蟹猴CD38多肽的胞外域包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列。

食蟹猴CD38多肽序列

RWRQQWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS KYPCNITEEDYQPLVKLGTQTVPCNKTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLED MLLGYLADDLTWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAE TACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGRED SRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI (SEQ ID NO:30)

結合CD38多肽的多特異性(例如，雙特異性、三特異性或多特異性)結合蛋白

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是雙特異性結合蛋白，其包含結合一種或多種CD38多肽的抗原結合位點和結合不同靶抗原的第二抗原結合位點。在一些實施例中，本公開的結合蛋白是雙特異性結合蛋白，其包含結合一種或多種CD38多肽的抗原結合位點和結合一種或多種CD38多肽的第二抗原結合位點。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是三特異性結合蛋白，其包含結合一種或多種CD38多肽的抗原結合位點、第二抗原結合位點和第三抗原結合位點。例如，在一些實施例中，抗原結合位點之一結合一種或多種CD38多肽(例如，人

和/或食蟹猴CD38多肽的胞外域)，並且一個或兩個抗原結合位點結合T細胞表面蛋白。在一些實施例中，抗原結合位點之一結合一種或多種CD38多肽(例如，人和/或食蟹猴CD38多肽的胞外域)，一個抗原結合位點結合人CD3多肽，和一個抗原結合位點結合人CD28多肽。人CD3和CD28多肽是業內已知的。本文提供了結合人CD3和CD28多肽的示例性和非限制性抗體可變結構域的胺基酸序列。

在一些實施例中，本文提供了包含三個抗原結合位點的結合蛋白，每個抗原結合位點結合一種或多種靶蛋白。在一些實施例中，三個抗原結合位點中的至少一個結合人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域。在一些實施例中，人CD38多肽包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列，和/或食蟹猴CD38多肽包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列。在一些實施例中，結合蛋白包含結合人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域的抗原結合位點和兩個各自結合T細胞表面蛋白(例如，人CD28多肽和/或人CD3多肽)的抗原結合位點。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合一種或多種腫瘤靶蛋白(例如，一種或多種CD38多肽)和一種或多種T細胞靶蛋白。在一些實施例中，結合蛋白能夠結合一種腫瘤靶蛋白(例如，一種或多種CD38多肽)和單個T細胞靶蛋白上的兩種不同的抗原決定區。在一些實施例中，結合蛋白能夠結合一種腫瘤靶蛋白(例如，一種或多種CD38多肽)和兩種不同的T細胞靶蛋白(例如CD28和CD3)。在一些實施例中，結合蛋白能夠結合一種T細胞靶蛋白和單個腫瘤靶蛋白(例如，一種或多種CD38多肽)上的兩種不同抗原決定區。在一些實施例中，結合蛋白能夠結合一種T細胞靶蛋白和兩種不同的腫瘤靶蛋白(例如，一種或多種CD38多肽和另一種腫瘤靶蛋白)。在一些實施例中，結合蛋白的第一和第二多肽鏈形成靶向兩種T細胞靶蛋白的兩個抗原結合位點，並且結合蛋白的第三和第四多肽鏈形成

結合一種或多種CD38多肽的抗原結合位點。在一些實施例中，結合蛋白的第一和第二多肽鏈形成靶向兩種腫瘤靶蛋白(例如，一種或多種CD38多肽和另一種腫瘤靶蛋白)的兩個抗原結合位點，並且結合蛋白的第三和第四多肽鏈形成結合T細胞靶蛋白的抗原結合位點。在一些實施例中，一種或多種T細胞靶蛋白是CD3和CD28中的一種或多種。

在一些實施例中，結合蛋白特異性結合T細胞上的一種或多種CD38多肽和一種或多種靶蛋白，包括T細胞受體複合物。此等T細胞接合物結合蛋白能夠將T細胞瞬時募集到靶細胞中，同時活化T細胞的溶細胞活性。T細胞上的靶蛋白的實例包括但不限於CD3和CD28等。上文提供了這樣的抗原靶標或靶蛋白的其他實例。在一些實施例中，可以通過將兩種或更多種單特異性抗體(親本抗體)的抗原結合結構域組合成一種抗體來產生三特異性結合蛋白。

雙特異性結合蛋白形式

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是雙特異性和/或二價結合蛋白，其包含四條多肽鏈，其形成結合一種或多種(例如，兩種)不同抗原靶標或靶蛋白的四個抗原結合位點(例如，具有在國際公開號WO2012/135345中描述的結構)。在一些實施例中，結合蛋白是二價和/或雙特異性的。在一些實施例中，結合蛋白是四價和/或四特異性的。在一些實施例中，結合蛋白是四價和/或雙特異性的。在一些實施例中，至少一個抗原結合位點結合CD38多肽(例如，人和/或食蟹猴CD38多肽的胞外域)。

在一些實施例中，結合蛋白包含兩條多肽鏈，其具有由下式表示的結構：

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

和兩條多肽鏈具有下式表示的結構：

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

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

Fc包含免疫球蛋白鉸鏈區和C_{H2}、C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定區；

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

並且其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H2}和V_{L2}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。在一些實施例中，V_{H2}和V_{L2}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H1}和V_{L1}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。

在一些實施例中，結合蛋白包含形成兩個抗原結合位點的兩條多肽鏈，其中第一多肽鏈包含

$$V_{L1}\text{-}L_1\text{-}V_{L2}\text{-}L_2\text{-}CL\text{-}Fc$$

和第二多肽鏈包含

$$V_{H2}\text{-}L_3\text{-}V_{HI}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}Fc$$

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

CL是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

Fc包含免疫球蛋白鉸鏈區和C_{H2}、C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定區；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中第一和第二多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H2}和V_{L2}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。在一些實施例中，V_{H2}和V_{L2}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H1}和V_{L1}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。

在一些實施例中，結合蛋白包含形成兩個抗原結合位點的三條多肽鏈，其中第一多肽鏈包含

$$V_{L1}\text{-}L_1\text{-}V_{L2}\text{-}L_2\text{-}CL$$

第二多肽鏈包含

$$V_{H2}\text{-}L_3\text{-}V_{HI}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}Fc$$

第三多肽鏈包含抗體Fc區

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

CL是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

Fc包含免疫球蛋白鉸鏈區和C_{H2}、C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定區；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中第一和第二多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H2}和V_{L2}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。在一些實施例中，V_{H2}和V_{L2}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H1}和V_{L1}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。

在一些實施例中，結合蛋白包含第一多肽鏈，其包含由下式表示的結構：

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

和包含由下式表示的結構的第二多肽鏈:

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

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，V_{H1}和V_{L1}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H2}和V_{L2}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。在一些實施例中，V_{H2}和V_{L2}形成結合CD38多肽的抗原結合結構域，並且V_{H1}和V_{L1}形成結合另一抗原靶標的抗原結合結構域。

在上述任何雙特異性結合蛋白中，除CD38之外的靶抗原可以是以下任何示例性抗原靶標：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4(也稱為VTCN1)、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2(也稱為MCP-1)、CCL3(也稱為MIP-1a)、CCL4(也稱為MIP-1b)、CCL5(也稱為RANTES)、CCL7(也稱為MCP-3)、CCL8(也稱為mcp-2)、CCL11(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素)、CCL15(也稱為MIP-1d)、CCL17(也稱為TARC)、CCL19(也稱為MIP-3b)、CCL20(也稱為MIP-3a)、CCL21(也稱為MIP-2)、CCL24(也稱為MPIF-2/嗜酸性粒細胞趨化介素-2)、CCL25(也稱為TECK)、CCL26(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素-3)、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23(也稱為FCER2，一種IgE受體)、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80(也稱為B7-1)、CD86(也稱為B7-2)、CD122、CD137(也稱為41BB)、CD137L、CD152(也稱為CTLA4)、CD154(還稱為CD40L)、CD160、CD272、CD273(也稱為PDL2)、CD274(也稱為PDL1)、CD275(也稱為B7H2)、CD276(也稱為B7H3)、CD278(也稱為ICOS)、CD279 (也稱為PD-1)、CDH1(也稱為E-鈣粘蛋白)、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1(也稱為M-CSF)、CSF-2(也稱為GM-CSF)、CSF-3(也稱為GCSF)、CX3CL1(也稱為SCYD1)、

CXCL12(也稱為SDF1)、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb(也稱為IL25的受體)、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4(也稱為b4整合素)、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2(也稱為IL33受體)、STEAP2、Syk激酶、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP(也稱為IL7Ra的共同受體)、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM和XCR1(也稱為GPR5/CCXCR1)。在一些實施例中，一種或多種上述抗原靶標是人抗原靶標。

在上文描述的任何雙特異性結合蛋白中，可以使用本文描述的任何連接子或連接子組合。例如，在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4中的至少一個的長度獨立地是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4的長度各自獨立地是至少1個胺基酸。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地是0個胺基酸的長度或包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、

GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。在一些實施例中，L_1包含序列GQPKAAP(SEQ ID NO:58)，L_2包含序列TKGPS(SEQ ID NO:57)，L_3包含序列S，L_4包含序列RT。在一些實施例中，L_1包含序列GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:55)，L_2包含序列GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:55)，L_3的長度是0個胺基酸，L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_2包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_3的長度是0個胺基酸，L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，L_2的長度是0個胺基酸，L_3包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，L_4的長度是0個胺基酸。

<u>與CD38多肽結合的三特異性結合蛋白</u>

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是三特異性和/或三價結合蛋白，其包含四條多肽鏈，其形成結合一種或多種(例如，三種)不同抗原靶標或靶蛋白的三個抗原結合位點。在一些實施例中，至少一個抗原結合位點結合CD38多肽(例如，人和/或食蟹猴CD38多肽的胞外域)。在一些實施例中，第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H1}\text{-}L_3\text{-}V_{H2}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \quad [II]$$

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H3}\text{-}C_{H1}\text{-鉸鏈-}C_{H2}\text{-}C_{H3} \qquad [III]$$

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是三特異性和/或三價結合蛋白，其包含四條多肽鏈，其形成結合一種或多種(例如，三種)不同抗原靶標或靶蛋白的三個抗原結合位點。在一些實施例中，至少一個抗原結合位點結合CD38多肽(例如，人和/或食蟹猴CD38多肽的胞外域)。在一些實施例中，第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H3}\text{-}C_{H1} \quad [III]$$

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{L3}\text{-}C_L \quad [IV]$$

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

和其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，第二和第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的Fc區，Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域。

在一些實施例中，第一多肽鏈和第二多肽鏈具有交叉取向，其形成兩個不同的抗原結合位點。在一些實施例中，VH1和VL1形成結合對並形成第一抗原結合位點。在一些實施例中，VH2和VL2形成結合對並形成第二抗原結合位點。在一些實施例中，第一抗原結合位點結合CD3多肽(例如，人CD3)，第二抗原結合

位點結合CD28多肽(例如，人CD28)。在一些實施例中，第二抗原結合位點結合CD3多肽(例如，人CD3)，並且第一抗原結合位點結合CD28多肽(例如，人CD28)。在一些實施例中，第三多肽和第四多肽形成第三抗原結合位點。在一些實施例中，VH3和VL3形成結合對並形成第三抗原結合位點。在一些實施例中，第三抗原結合位點結合CD38多肽(例如，人和任選的食蟹猴CD38)。具有考慮用於本文的交叉取向的示例性結合蛋白質形式也在美國專利申請號15/487,243和國際申請號PCT/US2017/027488中描述。

在本文所述的任何雙特異性、三特異性或多特異性結合蛋白的一些實施例中，抗原結合位點結合CD38多肽(例如，人和任選的食蟹猴CD38)。在一些實施例中，本文所述的任何雙特異性、三特異性或多特異性結合蛋白的其他(例如，不結合CD38)抗原結合位點結合CD28或CD3。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF

(SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L1}結構域的包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L2}結構域的包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID

NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L3}結構域的包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L1}結構域的包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L2}結構域的包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L3}結構域的包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有

AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L1}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺

基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L2}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，

含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L1}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L2}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有

GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列，或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列，或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列，或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的

胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列，或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。

在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列，和/或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列，和V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列，和V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列，和V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。

在一些實施例中，V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列，和/或V_{L3}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

在一些實施例中，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和/或V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。

在本公開的任何三特異性結合蛋白的一些實施例中，一個抗原結合結構域結合CD3多肽(例如，人CD3)，和一個抗原結合結構域結合CD28多肽(例如，人CD28)。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含來自SEQ ID NO:49或51的三個CDR，

如表H中所示，並且V_{L1}結構域包含來自SEQ ID NO:50或52的三個CDR，如表H中所示。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含來自SEQ ID NO:49或51的三個CDR，如表H中所示，並且V_{L2}結構域包含來自SEQ ID NO:50或52的三個CDR，如表H中所示。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含來自SEQ ID NO:53或84的三個CDR，如表H中所示，並且V_{L1}結構域包含來自SEQ ID NO:54或85的三個CDR，如表H中所示。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含來自SEQ ID NO:53或84的三個CDR，如表H中所示，並且V_{L2}結構域包含來自SEQ ID NO:54或85的三個CDR，如表H中所示。

在一些實施例中，V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列。

在一些實施例中，V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺

基酸序列，和V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。在一些實施例中，V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列，V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。

在某些實施例中，第一多肽鏈包含與SEQ ID NO:61的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第二多肽鏈包含與SEQ ID NO:60的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第三多肽鏈包含與SEQ ID NO:62的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，和第四多肽鏈包含與SEQ ID NO:63的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含與SEQ ID NO:61的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第二多肽鏈包含與SEQ ID NO:64的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第三多肽鏈包含與SEQ ID NO:65的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，和第四多肽鏈包含與SEQ ID NO:63的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含與SEQ ID NO:61的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第二多肽鏈包含與SEQ ID NO:66的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第三多肽鏈包含與SEQ ID NO:67的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，和第四多肽鏈包含與SEQ ID NO:63的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含與SEQ ID NO:61的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第二多肽鏈包含與SEQ ID NO:60的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第三多肽鏈包含與SEQ ID NO:68的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，和第四多肽鏈包含與SEQ ID NO:69的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含與SEQ ID NO:61的胺基酸序列至少95%

相同的多肽序列，第二多肽鏈包含與SEQ ID NO:64的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第三多肽鏈包含與SEQ ID NO:70的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，和第四多肽鏈包含與SEQ ID NO:69的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含與SEQ ID NO:61的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第二多肽鏈包含與SEQ ID NO:66的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，第三多肽鏈包含與SEQ ID NO:71的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列，和第四多肽鏈包含與SEQ ID NO:69的胺基酸序列至少95%相同的多肽序列。

在某些實施例中，第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，第二多肽鏈包含SEQ ID NO:60的胺基酸序列，第三多肽鏈包含SEQ ID NO:62的胺基酸序列，和第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，第二多肽鏈包含SEQ ID NO:64的胺基酸序列，第三多肽鏈包含SEQ ID NO:65的胺基酸序列，和第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，第二多肽鏈包含SEQ ID NO:66的胺基酸序列，第三多肽鏈包含SEQ ID NO:67的胺基酸序列，和第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，第二多肽鏈包含SEQ ID NO:60的胺基酸序列，第三多肽鏈包含SEQ ID NO:68的胺基酸序列，和第四條多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，第二多肽鏈包含SEQ ID NO:64的胺基酸序列，第三多肽鏈包含SEQ ID NO:70的胺基酸序列，和第四條多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。在某些實施例中，第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，第二多

肽鏈包含SEQ ID NO:66的胺基酸序列，第三多肽鏈包含SEQ ID NO:71的胺基酸序列，和第四條多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。

在上文描述的任何三特異性結合蛋白中，除CD38之外的靶抗原可以是以下任何示例性抗原靶標：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4(也稱為VTCN1)、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2(也稱為MCP-1)、CCL3(也稱為MIP-1a)、CCL4(也稱為MIP-1b)、CCL5(也稱為RANTES)、CCL7(也稱為MCP-3)、CCL8(也稱為mcp-2)、CCL11(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素)、CCL15(也稱為MIP-1d)、CCL17(也稱為TARC)、CCL19(也稱為MIP-3b)、CCL20(也稱為MIP-3a)、CCL21(也稱為MIP-2)、CCL24(也稱為MPIF-2/嗜酸性粒細胞趨化介素-2)、CCL25(也稱為TECK)、CCL26(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素-3)、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23(也稱為FCER2，一種IgE受體)、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80(也稱為B7-1)、CD86(也稱為B7-2)、CD122、CD137(也稱為41BB)、CD137L、CD152(也稱為CTLA4)、CD154(還稱為CD40L)、CD160、CD272、CD273(也稱為PDL2)、CD274(也稱為PDL1)、CD275(也稱為B7H2)、CD276(也稱為B7H3)、CD278(也稱為ICOS)、CD279 (也稱為PD-1)、CDH1(也稱為E-鈣粘蛋白)、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1(也稱為M-CSF)、CSF-2(也稱為GM-CSF)、CSF-3(也稱為GCSF)、CX3CL1(也稱為SCYD1)、CXCL12(也稱為SDF1)、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、

IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb(也稱為IL25的受體)、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4(也稱為b4整合素)、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2(也稱為IL33受體)、STEAP2、Syk激酶、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP(也稱為IL7Ra的共同受體)、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM和XCR1(也稱為GPR5/CCXCR1)。在一些實施例中，一種或多種上述抗原靶標是人抗原靶標。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是抗體。在一些實施例中，抗體是單克隆抗體。在一些實施例中，抗體是嵌合抗體、人源化抗體或人抗體。

可以使用獲得或衍生自任何人或非人抗體(包括例如，人、鼠或人源化抗體)的結構域或序列來製備本公開的結合蛋白。

連接子

在一些實施例中，連接子L_1、L_2、L_3和L_4的範圍是無胺基酸(長度= 0)至約100個胺基酸長，或小於100、50、40、30、20或15個胺基酸或更少。連接子也可以是10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸長。一種結合蛋白中的L_1、L_2、L_3和L_4可以全部具有相同的胺基酸序列，或者可以全部具有不同的胺基酸序列。

合適的連接子的實例包括單個甘胺酸(Gly)殘基；二甘胺酸肽(Gly-Gly)；三肽(Gly-Gly-Gly)；具有四個甘胺酸殘基的肽；具有五個甘胺酸殘基的肽；具有六

個甘胺酸殘基的肽；具有七個甘胺酸殘基的肽；和具有八個甘胺酸殘基的肽。可以使用胺基酸殘基的其他組合，諸如肽GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55)、肽GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56)、肽TKGPS (SEQ ID NO: 57)、肽GQPKAAP (SEQ ID NO:58)和肽GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。上面列出的實例不意圖以任何方式限制本公開的範圍，並且顯示包含選自下組的隨機選擇的胺基酸的連接子適用於結合蛋白：擷胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、天門冬醯胺酸、麩胺醯胺酸、甘胺酸和脯胺酸。關於連接子序列的其他描述，參見例如，WO2012135345和國際申請號PCT/US2017/027488。

連接子中胺基酸殘基的同一性和序列可以根據在連接子中實現所需的二級結構元件的類型而變化。例如，甘胺酸、絲胺酸和丙胺酸最適合具有最大靈活性的連接子。如果需要更剛性和延伸的連接子，甘胺酸、脯胺酸、蘇胺酸和絲胺酸的某些組合是有用的。根據期望的性質，任何胺基酸殘基可以被認為是與其他胺基酸殘基組合的連接子以構建所需更大的肽連接子。

在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4中的至少一個的長度獨立地是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4的長度各自獨立地是至少1個胺基酸。在一些實例中，L_1的長度是L_3的長度的至少兩倍。在一些實施例中，L_2的長度是L_4的長度的至少兩倍。在一些實例中，L_1的長度是L_3的長度的至少兩倍，並且L_2的長度是L_4的長度的至少兩倍。在一些實施例中，L_1的長度是3至12個胺基酸殘基，L_2的長度是3至14個胺基酸殘基，L_3的長度是1至8個胺基酸殘基，L_4的長度是1至3個胺基酸殘基。在一些實施例中，L_1的長度是5至10個胺基酸殘基，L_2的長度是5至8個胺基酸殘基，L_3的長度是1至5個胺基酸殘基，L_4的長度是1至2個胺基酸殘

基。在一些實施例中，L_1的長度是7個胺基酸殘基，L_2的長度是5個胺基酸殘基，L_3的長度是1個胺基酸殘基，L_4的長度是2個胺基酸殘基。在一些實施例中，L_1的長度是10個胺基酸殘基，L_2的長度是10個胺基酸殘基，L_3的長度是0個胺基酸殘基，L_4的長度是0個胺基酸殘基。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自具有0至15個胺基酸的獨立選擇的長度(例如，0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個胺基酸)，其中至少兩個連接子具有1至15個胺基酸 (例如，0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個胺基酸)的長度。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自的長度是0個胺基酸。

在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和/或L_4包含衍生自抗體可變結構域和抗體恒定結構域之間的連接處的天然存在的序列的序列(例如，如WO2012/135345中所述的)。例如，在一些實施例中，連接子包含在內源性V_H和C_{H1}結構域之間或在內源性V_L和C_L結構域(例如，κ或λ)之間的轉換處發現的序列。在一些實施例中，連接子包含在內源性人V_H和C_{H1}結構域之間或在內源性人V_L和C_L結構域(例如，人κ或λ)之間的轉換處發現的序列。

在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地是0個胺基酸的長度或包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。

在一些實施例中，L_1包含序列GQPKAAP(SEQ ID NO:58)，L_2包含序列

TKGPS(SEQ ID NO:57)，L_3包含序列S，和L_4包含序列RT。在一些實施例中，L_1包含序列GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:55)，L_2包含序列GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:55)，L_3的長度是0個胺基酸，和L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1包含序列GGSGSSGSGG(SEQ ID NO:59)，L_2包含序列GGSGSSGSGG(SEQ ID NO:59)，L_3的長度是0個胺基酸，和L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1包含序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:56)，L_2的長度是0個胺基酸，L_3包含序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:56)，和L_4的長度是0個胺基酸。

Fc區和恒定結構域

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含全長抗體重鏈或含有Fc區的多肽鏈。在一些實施例中，Fc區是人Fc區，例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區。在一些實施例中，Fc區包括抗體鉸鏈、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}和任選的C_{H4}結構域。在一些實施例中，Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區。在一些實施例中，Fc區包括下文描述的一種或多種突變。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包括一種或兩種Fc變異體。如本文所使用的術語“Fc變異體”是指從天然Fc修飾但仍包含補救受體(salvage receptor)FcRn(新生兒Fc受體)的結合位點的分子或序列。示例性Fc變異體及其與補救受體的交互作用是業內已知的。因此，術語“Fc變異體”可包含人源化的非人天然Fc的分子或序列。此外，天然Fc包含可以被除去的區域，因為它們提供了本發明的抗體樣結合蛋白不需要的結構特徵或生物活性。因此，術語“Fc變異體”包含缺少一個或多個天然Fc位點或殘基的分子或序列，或其中一個或多個Fc位點或殘基被修飾，影響或參與：(1)二硫鍵形成，(2)與選定的主體細胞不相容，

(3)在選定的主體細胞中表現時的N-末端異質性，(4)糖基化，(5)與補體的交互作用，(6)與除了補救受體之外的Fc受體的結合，或(7)抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)。

在一些實施例中，Fc區包含一種或多種減少或消除Fc區的Fc受體結合和/或效應子功能的突變(例如，Fc受體介導的抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、補體依賴性細胞毒性(CDC)和/或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC))。

在一些實施例中，Fc區是人IgG1 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG1的234、235和/或329位的位置處包含一個或多個胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是L234A、L235A和/或P329A。在一些實施例中，Fc區是人IgG1 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG1的298、299和/或300位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S298N、T299A和/或Y300S。

在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其包含一個或多個減少或消除FcγI和/或FcγII結合的突變。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其包含一個或多個減少或消除FcγI和/或FcγII結合但不影響FcRn結合的突變。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的228和/或409位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S228P和/或R409K。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的234和/或235位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是F234A和/或L235A。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的228、234、235和/或409位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S228P、F234A、L235A和/或R409K。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代。

在一些實施例中，胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的228、233-236和/或409位的取代處的包含胺基酸突變。在一些實施例中，胺基酸突變是S228P；E233P、F234V、L235A和在236處的缺失；和/或R409K。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含一個或多個突變以例如通過調節對純化試劑的親和力改善純化。例如，眾所周知，如果異二聚體形式的兩個Fc區之一含有減少或消除與蛋白A結合的突變，則異二聚體結合蛋白可以從其同型二聚體形式中選擇性地純化，因為與任一種同型二聚體形式相比，異二聚體形式會具有基於蛋白A的純化的中間親和力，並且可以例如通過使用不同的pH從蛋白A中選擇性溶離(參見例如，Smith, E.J. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:17943)。在一些實施例中，突變包含根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的435和436位的位置處的取代，其中胺基酸取代是H435R和Y436F。在一些實施例中，結合蛋白包含第二多肽鏈，其進一步包含與C_{H1}連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定區，並且第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定區；並且其中僅第一和第二Fc區中的一個在根據EU Index的對應於人IgG1或IgG4的位置435和436的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是H435R和Y436F。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含杵臼突變和一個或多個突變以改善純化。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。

為了提高一些結合蛋白(例如，雙特異性或三特異性結合蛋白)的產量，可以通過“杵臼”技術改變CH3結構域，該技術在例如國際公開號WO 96/027011、

Ridgway *et al*., 1996, *Protein Eng*. 9: 617-21和Merchant *et al*., 1998, *Nat. Biotechnol*. 16: 677-81幾個實例中詳細描述。具體地，改變兩個C_{H3}結構域的交互作用表面以增加含有這兩個C_{H3}結構域的兩條重鏈的異二聚化。兩個C_{H3}結構域(兩個重鏈)中的每一個可以是“杵”，而另一個是“臼”。二硫橋的引入進一步穩定了異二聚體(Merchant *et al*., 1998; Atwell *et al*., 1997, *J. Mol. Biol*. 270: 26-35)並提高了產率。在特定的實施例中，杵位於具有單個可變結構域的第二對多肽上。在其他實施例中，杵位於具有交叉取向的第一對多肽上。在其他實施例中，C_{H3}結構域不包括臼中的杵。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白(例如，三特異性結合蛋白)包含第二多肽鏈上的“杵”突變和第三多肽鏈上的“臼”突變。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含第三多肽鏈上的“杵”突變和第二多肽鏈上的“臼”突變。在一些實施例中，“杵”突變包含根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的354和/或366位的位置處的取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S354C、T366W、T366Y、S354C和T366W，或S354C和T366Y。在一些實施例中，“杵”突變包含根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處的取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S354C和T366W。在一些實施例中，“臼”突變包含根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的407位和任選地349、366和/或368位的位置處的取代。在一些實施例中，胺基酸取代是Y407V或Y407T，和任選的Y349C、T366S和/或L368A。在一些實施例中，“臼”突變包含根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處的取代。在一些實施例中，胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc

區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於的人IgG1或IgG4的366位和任選354位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是T366W或T366Y，和任選的S354C；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG1或IgG4的407位和任選地349、366和/或368位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是Y407V或Y407T，和任選的Y349C、T366S和/或L368A。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG1或IgG4的407位和任選349、366和/或368位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是Y407V或Y407T，和任選的Y349C、T366S和/或L368A；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG1或IgG4的366位和任選的354位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是T366W或T366Y，和任選的S354C。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG1或IgG4的366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是T366W；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG1或IgG4的366、368和/或407位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是T366S、L368A和/或Y407V。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG1或IgG4的366、368和/或407位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是T366S、L368A和/或Y407V；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG1或IgG4的366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是T366W。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S354C和T366W；其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V。在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V；其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S354C和T366W。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG1 Fc區。在一

些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，其中第一Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG4的228、354、366和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、S354C、T366W和R409K；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，其中第二Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG4的228、349、366、368、407和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、Y349C、T366S、L368A、Y407V和R409K。在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，其中第一Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG4的228、349、366、368、407和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、Y349C、T366S、L368A、Y407V和R409K；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，其中第二Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG4的228、354、366和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、S354C、T366W和R409K。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，其中第一Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG4的234、235、354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是F234A、L235A、S354C和T366W；

和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，其中第二Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG4的234、235、349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是F234A、L235A、Y349C、T366S、L368A和Y407V。在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，其中第一Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG4的234、235、349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是F234A、L235A、Y349C、T366S、L368A和Y407V；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，其中第二Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG4的234、235、354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是F234A、L235A、S354C和T366W。

在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，其中第一Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG4的228、234、235、354、366和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、F234A、L235A、S354C、T366W和R409K；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，其中第二Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第二Fc區在對應於人IgG4的228、234、235、349、366、368、407和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、F234A、L235A、Y349C、T366S、L368A、Y407V和R409K。在一些

實施例中，第二多肽鏈進一步包含與CH1連接的第一Fc區，其中第一Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第一Fc區在對應於人IgG4的228、234、235、349、366、368、407和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、F234A、L235A、Y349C、T366S、L368A、Y407V和R409K；和其中第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，其中第二Fc區是包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域的人IgG4 Fc區，其中根據EU Index，第二Fc區，在對應於人IgG4的228、234、235、354、366和409位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P、F234A、L235A、S354C、T366W和R409K。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含一個或多個突變以改善血清半衰期(參見例如，Hinton, P.R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56)。在一些實施例中，根據EU Index，突變在對應於人IgG1或IgG4的428和434位的位置處包含取代，其中胺基酸取代是M428L和N434S。在一些實施例中，結合蛋白包含第二多肽鏈，其進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，其中根據EU Index，第一和/或第二Fc區在對應於人IgG1的428和434位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是M428L和N434S。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含杵和臼突變和一個或多個突變以改善血清半衰期。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含一個或多個突變以改善例如IgG4

的鉸鏈區和/或二聚體界面的穩定性(參見例如，Spiess, C. *et al.* (2013) *J. Biol. Chem.* 288:26583-26593)。在一些實施例中，根據EU Index，突變在對應於人IgG4的228和409位的位置處的包含取代，其中胺基酸取代是S228P和R409K。在一些實施例中，結合蛋白包含第二多肽鏈，其進一步包含與C_{H1}連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域，和第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域；其中第一和第二Fc區是人IgG4 Fc區；和其中根據EU Index，第一和第二Fc區在的對應於人IgG4的228和409位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S228P和R409K。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含杵和臼突變和一個或多個突變以改善穩定性。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含一個或多個突變以例如通過調節對純化試劑的親和力來改善純化。例如，已知，如果異二聚體形式的兩個Fc區之一含有減少或消除與蛋白A結合的突變，則異二聚體結合蛋白可以從其同型二聚體形式中選擇性地純化，因為與任一同型二聚體形式相比，異二聚體形式會具有基於蛋白A的純化的中間親和力，並且可以例如通過使用不同的pH從蛋白A中選擇性溶離(參見例如，Smith, E.J. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:17943)。在一些實施例中，根據EU Index，突變在對應於人IgG1或IgG4的435和436位的位置處包含取代，其中胺基酸取代是H435R和Y436F。在一些實施例中，結合蛋白包含第二多肽鏈，其進一步包含與C_{H1}連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域，和第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定

結構域；並且其中根據EU Index，僅第一和第二Fc區中的一個在對應於人IgG1或IgG4的435和436位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是H435R和Y436F。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含杵和臼突變和一個或多個突變以改善純化。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含一個或多個突變以改善血清半衰期(參見例如，Hinton, P.R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56)。在一些實施例中，根據EU Index，突變在對應於人IgG1或IgG4的428和434位的位置處包含取代，其中胺基酸取代是M428L和N434S。在一些實施例中，結合蛋白包含第二多肽鏈，其進一步包含與CH1連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，和第三多肽鏈進一步包含與CH1連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及CH2和CH3免疫球蛋白重鏈恒定結構域，其中根據EU Index，第一和/或第二Fc區在對應於人IgG1的428和434位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是M428L和N434S。在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含杵和臼突變和一個或多個突變以改善血清半衰期。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含一種或多種突變以降低效應子功能，例如Fc受體介導的抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、補體依賴性細胞毒性(CDC)和/或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)。在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域；其中第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第二

Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域；其中第一和第二Fc區是人IgG1 Fc區；並且其中根據EU Index，第一和第二Fc區在對應於人IgG1的234和235位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是L234A和L235A。在一些實施例中，第二和第三多肽鏈的Fc區是人IgG1 Fc區，並且其中根據EU Index，Fc區在對應於人IgG1的234和235位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸酸取代是L234A和L235A。在一些實施例中，第二多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域；其中第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域；其中第一和第二Fc區是人IgG1 Fc區；並且其中根據EU Index，第一和第二Fc區在對應於人IgG1的234、235和329位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是L234A、L235A和P329A。在一些實施例中，第二和第三多肽鏈的Fc區是人IgG1 Fc區，並且其中根據EU Index，Fc區在對應於人IgG1的234、235和329位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是L234A、L235A和P329A。在一些實施例中，第二和第三多肽鏈的Fc區是人IgG4 Fc區，並且根據EU Index，Fc區在對應於人IgG4的234和235位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是F234A和L235A。在一些實施例中，結合蛋白包含第二多肽鏈，其進一步包含與C_{H1}連接的第一Fc區，第一Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域，和第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的第二Fc區，第二Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域；和其中根據EU Index，第一和第二Fc區在對應於人IgG4的234和235位的位置處各自包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是F234A和L235A。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含杵和臼突變和一種或多種突變以降低效應子功能。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG1 Fc區。在一些實施例中，第一和/或第二Fc區是人IgG4 Fc區。對於329位Fc突變的進一步描述，參見，例如，Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604和WO1999051642。

在一些實施例中，上文描述的突變類型可以以任何順序或組合進行組合。例如，本公開的結合蛋白可包含兩個或更多個“杵”和“臼”突變，一個或多個突變以改善血清半衰期，一個或多個突變以改善IgG4穩定性，一個或多個突變以改善純化，和/或一個或多個突變以減少上文所述的效應子功能。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白包含抗體片段，包括但不限於抗體F(ab)、F(ab')2、Fab'-SH、Fv或scFv片段。

測定

本公開內容提供了結合人和/或食蟹猴CD38多肽，誘導T細胞(例如，CD4+和/或CD8+ T細胞)增生，和/或誘導CD38+細胞凋亡的抗原結合蛋白。本文提供了用於測量此等參數和鑒定這樣的結合蛋白的示例性測定法。例如，在一些實施例中，通過SPR(例如，如下所述的)測量結合蛋白或其抗原結合片段與純化的CD38多肽之間的結合親和力，以及通過流式細胞術(例如，如下所述的)測量結合蛋白或其抗原結合片段與在細胞表面上表現的CD38多肽之間的結合親和力。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白的抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽，其平衡解離常數(K_D)是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、1nM或更小或0.8nM

或更小，如通過使用在其細胞表面上表現包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽的細胞的流式細胞術測定所測量的，例如，如下文所述的。在一些實施例中，抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽，其平衡解離常數(K_D)是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、1nM或更小或0.75nM或更小，如通過使用在其細胞表面上表現包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽的細胞的流式細胞術測定所測量的，例如，如下文所述的。在一些實施例中，抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽，其平衡解離常數(K_D)是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、1nM或更小或0.83nM或更小，如通過使用包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽的SPR測定所測量的，例如，如下文所述的。在一些實施例中，抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽，其平衡解離常數(K_D)是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、3.5nM或更小、1.5nM或更小或1nM或更小，如通過使用包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽的SPR測定所測量的，例如，如下文所述的。如本文所證明的，在一些實施例中，本公開的結合蛋白可具有本文所述的一種或多種示例性結合特性。在一些實施例中，KD在4℃或25℃測量。

在一些實施例中，本公開的單特異性結合蛋白具有一個或多個以下特徵：結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白，如通過SPR或ELISA測定的；結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白，其K_D是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1.5nM或更小，如通過SPR或ELISA

測定的；結合細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，其表觀K_D是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過流式細胞術測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白質，如通過SPR或ELISA測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白質，其K_D是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過SPR或ELISA測定的；結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)，其表觀K_D是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過流式細胞術測定的；結合人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)作為純化蛋白，如通過SPR或ELISA測定；結合在細胞表面上表現的人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；在其細胞表面誘導表現CD38的細胞的凋亡或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)；和與沒有一個或多個突變的相同結合蛋白相比，具有一個或多個突變(例如，在Fc區中)導致與FcγRI和/或FcγRII的結合降低。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合在細胞表面上表現的CD38多肽(例如，人或食蟹猴)，其EC50是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過流式

細胞術測定的。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合CD38多肽(例如，人或食蟹猴)作為純化蛋白質，其EC50是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過ELISA測定的。在一些實施例中，KD在4℃或25℃測量。

在一些實施例中，本公開的三特異性結合蛋白具有一個或多個以下特徵：誘導T細胞(例如，CD4+和/或CD8+ T細胞)增生；誘導Bcl-xL的T細胞(例如，CD4+和/或CD8+ T細胞)表現；誘導CD38+細胞的凋亡(例如，如通過膜聯蛋白V染色和/或碘化丙啶攝取測量的)；結合在細胞表面上表現的CD38和在T細胞表面上表現的一種或多種T細胞靶抗原；結合在細胞表面上表現的CD38、在T細胞表面上表現的CD28和在T細胞表面上表現的CD3；刺激T細胞受體的活化(例如，如通過CD69表現測量的)；誘導T細胞受體信號傳導的共刺激(例如，如通過CD28介導的)；與沒有一個或多個突變的相同結合蛋白相比，具有一個或多個突變(例如，在Fc區中)導致PBMC對細胞因子釋放(例如，IFN-γ、IL-2和/或TNF-α)的誘導減少；在CD38+靶細胞存在下，通過PBMC誘導細胞因子釋放(例如，IFN-γ和/或IL-6)(例如，如通過免疫測定測量的)；結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白，如通過SPR或ELISA測定的；結合人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)作為純化蛋白，其K_D是1.5nM或更小，如通過SPR或ELISA測定的；結合細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合在細胞表面上表現的人CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)，其表觀K_D是12nM或更小，如通過流式細胞術測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白，如通過SPR

或ELISA測定的；結合食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)作為純化蛋白，其K_D是3.5nM或更小，如通過SPR或ELISA測定的；結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；結合在細胞表面上表現的食蟹猴CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列)，其表觀K_D是7.5nM或更低，如通過流式細胞術測定的；結合人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)作為純化蛋白，如通過SPR或ELISA測定的；結合在細胞表面上表現的人同功異型物E CD38多肽的胞外域(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)，如通過流式細胞術測定的；誘導在其細胞表面上表現CD38的細胞的凋亡或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)；與沒有一個或多個突變的相同結合蛋白相比，具有一個或多個突變(例如，在Fc區中)導致與FcγRI和/或FcγRII的結合降低。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合在細胞表面上表現的CD38多肽(例如，人或食蟹猴)，EC50是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過流式細胞術測定的。在一些實施例中，本公開的結合蛋白結合CD38多肽(例如，人或食蟹猴)作為純化蛋白，其EC50是20nM或更小、15nM或更小、12nM或更小、10nM或更小、5nM或更小、2nM或更小、或1nM或更小，如通過ELISA測定的。

核酸

使用標準重組DNA方法構建編碼形成結合蛋白的多肽的多核苷酸，將此等多核苷酸併入重組表現載體中，並將這樣的載體導入主體細胞中。參見例如，Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed.)。酶促反應和純化技術可根據製造商的說明書進行，如業內通常實現的，或如本文所述。除非提供具體的定義，否則與本文所述的分析化學、合成有機化學和藥物和藥物化學結合使用的命名法和實驗室程序和技術是業內公知和常用的那些。類似地，習知技術可用于化學合成、化學分析、藥物製備、配製、遞送和患者治療。

本公開的其他態樣涉及單離的核酸分子，其包含編碼本文所述的任何結合蛋白的核苷酸序列。在一些實施例中，單離的核酸分子包含與SEQ ID NO:60-83至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%的序列。至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同和/或表J中所示的序列。

本公開的某些態樣涉及多核苷酸的套組。在一些實施例中，一種或多種多核苷酸是載體(例如，表現載體)。所述套組，尤其可用于產生本文所述的一種或多種結合蛋白，例如本公開的三特異性結合蛋白。在一些實施例中，套組包含在表J中所示的(例如，mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA、mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A、mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA、mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA、mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A或mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA的)一個、兩個、三個或四個核苷酸。在一些實施例中，多核苷酸套組包含：包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:72的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:74的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸。在一些實施例中，多核苷酸套組包含：包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:76的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:77的序列的第三多

核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸。在一些實施例中，多核苷酸套組包含：包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:78的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:79的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸。在一些實施例中，多核苷酸套組包含：包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:72的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:80的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸。在一些實施例中，多核苷酸套組包含：包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:76的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:82的序列的第三多核苷酸，和SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸。在一些實施例中，多核苷酸套組包含：包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:78的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:83的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸。

在一些實施例中，單離的核酸與異源啟動子可操作地連接以指導結合蛋白編碼核酸序列的轉錄。啟動子可以指指導核酸轉錄的核酸控制序列。當第一核酸序列與第二核酸序列處於功能關係時，第一核酸序列與第二核酸序列可操作地連接。例如，如果啟動子影響編碼序列的轉錄或表現，則啟動子與結合蛋白的編碼序列可操作地連接。啟動子的實例可包括但不限於從病毒(諸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒，乙型肝炎病毒、猿猴病毒40(SV40)等)的基因組獲得的啟動子，來自異源真核啟動子(諸如肌動蛋白啟動子、免疫球蛋白啟動子、來自熱休克啟動子等)、CAG啟動子(Niwa et al., Gene 108(2):193-9, 1991)、磷酸甘油酸激酶(PGK)-啟動子、四環素誘導型啟動子(Masui et al., Nucleic Acids Res. 33:e43, 2005)、lac

系統、trp系統、tac系統、trc系統、噬菌體λ的主要操縱子和啟動子區域、3-磷酸甘油酸激酶的啟動子、酵母酸性磷酸酶的啟動子，和酵母α-交配因子的啟動子。編碼本公開的結合蛋白的多核苷酸可以在組成型啟動子、誘導型啟動子或本文所述的任何其他合適的啟動子或熟習此項技術者容易識別的其他合適的啟動子的控制下。

在一些實施例中，將單離的核酸併入載體中。在一些實施例中，載體是表現載體。表現載體可包括與待表現的多核苷酸可操作地連接的一種或多種調節序列。術語“調節序列”包括啟動子、強化子和其他表現控制元件(例如，多腺苷酸化信號)。合適的強化子的實例可包括但不限於，來自哺乳動物基因的強化子序列(諸如球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、α-胎蛋白、胰島素等)，以及來自真核細胞病毒的強化子序列(諸如在複製起點的後側(bp 100-270)的SV40強化子、巨細胞病毒早期啟動子強化子、複製起點後側的多瘤強化子、腺病毒強化子等)。合適載體的實例可包括，例如，質體、粘粒、附加體、轉座子和病毒載體(例如，腺病毒、痘苗病毒、辛德比斯病毒(Sindbis-viral)、麻疹、皰疹病毒、慢病毒、逆轉錄病毒、腺相關病毒載體等)。表現載體可用於轉染主體細胞，諸如，例如，細菌細胞、酵母細胞、昆蟲細胞和哺乳動物細胞。能夠在主體中表現和複製的生物學功能性病毒和質體DNA載體是業內已知的，並且可用於轉染任何感興趣的細胞。

本公開的其他態樣涉及載體系統，其包含編碼本文所述任何結合蛋白的第一、第二、第三和第四多肽鏈的一種或多種載體。在一些實施例中，載體系統包含編碼結合蛋白的第一多肽鏈的第一載體，編碼結合蛋白的第二多肽鏈的第二載體，編碼結合蛋白的第三多肽鏈的第三載體，和編碼結合蛋白的第四多肽

鏈的第四載體。在一些實施例中，載體系統包含編碼結合蛋白的第一和第二多肽鏈的第一載體，和編碼結合蛋白的第三和第四多肽鏈的第二載體。在一些實施例中，載體系統包含編碼結合蛋白的第一和第三多肽鏈的第一載體，和編碼結合蛋白的第二和第四多肽鏈的第二載體。在一些實施例中，載體系統包含編碼結合蛋白的第一和第四多肽鏈的第一載體，和編碼結合蛋白的第二和第三多肽鏈的第二載體。在一些實施例中，載體系統包含編碼結合蛋白的第一、第二、第三和第四多肽鏈的第一載體。載體系統的一個或多個載體可以是本文所述的任何載體。在一些實施例中，一種或多種載體是表現載體。

單離的主體細胞

本公開的其他態樣涉及單離的主體細胞，其包含一種或多種本文所述的單離的多核苷酸、多核苷酸套組、載體和/或載體系統。在一些實施例中，主體細胞是細菌細胞(例如，大腸桿菌(*E. coli*)細胞)。在一些實施例中，主體細胞是酵母細胞(例如，釀酒酵母(*S. cerevisiae*)細胞)。在一些實施例中，主體細胞是昆蟲細胞。昆蟲主體細胞的實例可包括，例如，果蠅(Dropophila)細胞(例如，S2細胞)、粉紋夜蛾(Trichoplusia ni)細胞(例如，High Five™細胞)和草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)細胞(例如，Sf21或Sf9細胞)。在一些實施例中，主體細胞是哺乳動物細胞。哺乳動物主體細胞的實例可包括，例如，人胚胎腎細胞(例如，亞克隆用於懸浮培養中生長的293或293細胞)、Expi293TM細胞、CHO細胞、幼倉鼠腎細胞(例如BHK，ATCC CCL 10)，小鼠支持細胞(例如，TM4細胞)、猴腎細胞(例如，CV1 ATCC CCL 70)、非洲綠猴腎細胞(例如，VERO-76、ATCC CRL-1587)、人宮頸癌細胞(例如，HELA、ATCC CCL 2)、犬腎細胞(例如，MDCK、ATCC CCL

34)、水牛大鼠肝細胞(例如，BRL 3A、ATCC CRL 1442)、人肺細胞(例如，W138、ATCC CCL 75)、人肝細胞(例如，Hep G2、HB 8065)、小鼠乳腺腫瘤細胞(例如，MMT 060562、ATCC CCL51)、TRI細胞、MRC 5細胞、FS4細胞、人肝細胞瘤株(例如，Hep G2)和骨髓瘤細胞(例如，NS0和Sp2/0細胞)。

本公開的其他態樣涉及產生本文所述的任何結合蛋白的方法。在一些實施例中，該方法包括a) 在主體細胞表現結合蛋白的條件下，培養包含單離的核酸、載體和/或載體系統(例如，本文所述的任何單離的核酸、載體和/或載體系統)的主體細胞(例如，本文所述的任何主體細胞)；b) 從主體細胞中單離結合蛋白。在表現蛋白質的條件下培養主體細胞的方法是熟習此項技術者公知的。從培養的主體細胞中單離蛋白質的方法是熟習此項技術者公知的，包括例如親和層析(例如，包括蛋白A親和層析然後進行尺寸排阻層析的兩步親和層析)。

在一些實施例中，通過蛋白A親和層析、κ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明書使用KappaSelect樹脂; GE Healthcare)和任選的λ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明使用LambdaFabSelect樹脂; GE Healthcare)純化本公開的結合蛋白。在一些實施例中，通過蛋白A親和層析、λ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明書使用LambdaFabSelect樹脂; GE Healthcare)和任選的κ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明使用KappaSelect樹脂; GE Healthcare)純化本公開的結合蛋白。在一些實施例中，結合蛋白包含兩個Fc區，每個包含C_{H3}結構域，並且根據EU Index，僅一個C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的435和436位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是H435R和Y436F。在一些實施例中，依序通過蛋白A親和層析，然後κ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明書使用KappaSelect樹脂; GE Healthcare)，然後任選地λ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明使用

LambdaFabSelect樹脂; GE Healthcare)純化本公開的結合蛋白。在一些實施例中，依序通過蛋白A親和層析，然後λ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明書使用LambdaFabSelect樹脂; GE Healthcare)，然後任選地κ輕鏈親和層析(例如，根據製造商的說明使用KappaSelect樹脂; GE Healthcare)純化本公開的結合蛋白。例如，在一些實施例中，使結合蛋白與蛋白A接觸，在適於將結合蛋白從包含0或2個含有胺基酸取代為H435R和Y436F的C_{H3}結構域的結合蛋白單離的條件下從蛋白A溶離，與κ輕鏈親和介質接觸(例如，如在KappaSelect中所用的樹脂; GE Healthcare)，並在適於將結合蛋白從僅包含λ C_L結構域的結合蛋白單離的條件下從κ輕鏈親和介質溶離(例如，根據製造商的說明)。適用於蛋白A溶離的條件是業內已知的，包括但不限於pH4.5-2.8的分步溶離梯度。在一些實施例中，使用可用於蛋白質純化蛋白質A或蛋白質A變異體。在一些實施例中，蛋白質A附接於基底或樹脂，例如作為層析介質的一部分。在一些實施例中，在從κ輕鏈親和介質溶離後，使結合蛋白與λ輕鏈親和介質(例如，如在LambdaFabSelect樹脂中所用的; GE Healthcare)接觸，並在適合於將結合蛋白從僅包含κ C_L結構域的結合蛋白單離的條件下從λ輕鏈親和介質中溶離 (例如，根據製造商的說明書)。在一些實施例中，使用HIC層析法檢測本公開的結合蛋白。在一些實施例中，結合蛋白包含：第一多肽鏈，其包含λ C_L結構域；第二多肽鏈的C_{H3}結構域，其根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是S354C和T366W；第三多肽鏈的C_{H3}結構域，其根據EU Index，在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368、407、435和436位的位置處包含胺基酸取代，其中胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A、Y407V、H435R和Y436F；和第四多肽鏈，其包含κ C_L結構域。在一些實施例中，結合蛋白由主體細胞產生。在一些

實施例中，從細胞培養基或主體細胞提取物中純化結合蛋白。在一些實施例中，結合蛋白由主體細胞分泌或從主體細胞產生和提取(例如，在與蛋白A接觸之前)。在一些實施例中，當與蛋白A接觸時，結合蛋白在細胞培養基或主體細胞提取物中。在一些實施例中，結合蛋白從其他結合蛋白、多肽和/或其他細胞組分中純化。

III．三特異性結合蛋白

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是三特異性和/或三價結合蛋白，其包含形成結合一種或多種(例如，三種)不同抗原靶標或靶蛋白的三個抗原結合位點的四條多肽鏈。在一些實施例中，第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [II]

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H3}-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [III]

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，第一多肽鏈和第二多肽鏈具有交叉取向，其形成兩個不同的抗原結合位點。如上所述，第二和第三多肽鏈包括Fc區(例如，包含鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域)。在一些實施例中，一個或兩個Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的228、233-236和/或409位的取代處包含胺基酸突變。在一些實施例中，胺基酸突變是S228P；E233P、F234V、L235A和在236處的缺失；和/或R409K。在一些實施例中，一個或兩個Fc區是人IgG1 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG1的234、235和/或329位的位置處包含一個或多個胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是L234A、L235A和/或P329A。在一些實施例中，Fc區是人IgG1 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG1的298、299和/或300位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S298N、T299A和/或Y300S。

在一些實施例中，本公開的結合蛋白是三特異性和/或三價結合蛋白，其包含形成結合一種或多種(例如三種)不同抗原靶標或靶蛋白的三個抗原結合位點的四條多肽鏈。在一些實施例中，至少一個抗原結合位點結合CD38多肽(例如，人和/或食蟹猴CD38多肽的胞外域)。在一些實施例中，第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{H3}\text{-}C_{H1} \qquad [III]$$

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

$$V_{L3}\text{-}C_L \qquad [IV]$$

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

和其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對。在一些實施例中，第二和第三多肽鏈進一步包含與C_{H1}連接的Fc區，Fc區包含免疫球蛋白鉸鏈區以及C_{H2}和C_{H3}免疫球蛋白重鏈恒定結構域。在一些實施例中，一個或兩個Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。在一些實施例中，Fc區是人IgG4 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG4的228、233-236和/或409位的取代處包含胺基酸突變。在一些實施例中，胺基酸突變是S228P；E233P、F234V、L235A和在236處的缺失；和/或R409K。在一些實施例中，一個或兩個Fc區是人IgG1 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG1的234、235和/或329位的位置處包含一個或多個胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是L234A、L235A和/或P329A。在一些實施例中，Fc區是人IgG1 Fc區，其根據EU Index，在對應於人IgG1的298、299和/或300位的位置處包含胺基酸取代。在一些實施例中，胺基酸取代是S298N、T299A和/或Y300S。

在一些實施例中，VH1和VL1形成結合對並形成第一抗原結合位點。在一些實施例中，VH2和VL2形成結合對並形成第二抗原結合位點。在一些實施例中，VH3和VL3形成結合對並形成第三抗原結合位點。結合蛋白還可用於細胞活化、腫瘤靶向、細胞因子活性的中和、病毒感染的中和、多種信號傳導事件的組合，以治療癌症、關節炎和/或炎性病症。例如，在一些實施例中，結合蛋白特異性結合選自以下的一種、兩種或三種抗原靶標：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4(也稱為VTCN1)、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2(也稱為MCP-1)、CCL3(也稱為MIP-1a)、CCL4(也稱為MIP-1b)、CCL5(也稱為RANTES)、CCL7(也

稱為MCP-3)、CCL8(也稱為mcp-2)、CCL11(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素)、CCL15(也稱為MIP-1d)、CCL17(也稱為TARC)、CCL19(也稱為MIP-3b)、CCL20(也稱為MIP-3a)、CCL21(也稱為MIP-2)、CCL24(也稱為MPIF-2/嗜酸性粒細胞趨化介素-2)、CCL25(也稱為TECK)、CCL26(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素-3)、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23(也稱為FCER2，一種IgE受體)、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80(也稱為B7-1)、CD86(也稱為B7-2)、CD122、CD137(也稱為41BB)、CD137L、CD152(也稱為CTLA4)、CD154(還稱為CD40L)、CD160、CD272、CD273(也 稱 為PDL2)、CD274(也 稱 為PDL1)、CD275(也稱為B7H2)、CD276(也稱為B7H3)、CD278(也稱為ICOS)、CD279 (也稱為PD-1)、CDH1(也稱為E-鈣粘蛋白)、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1(也 稱 為M-CSF)、CSF-2(也 稱 為GM-CSF)、CSF-3(也 稱 為GCSF)、CX3CL1(也稱為SCYD1)、CXCL12(也稱為SDF1)、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb(也稱為IL25的受體)、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4(也稱為b4整合素)、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2(也稱為IL33受體)、STEAP2、Syk激酶、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、

TREM1、TSLP(也稱為IL7Ra的共同受體)、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM和XCR1(也稱為GPR5/CCXCR1)。在一些實施例中，一種或多種上述抗原靶標是人抗原靶標。

在一些實施例中，三個抗原結合位點之一結合CD3多肽(例如，人CD3多肽)，三個抗原結合位點之一結合CD28多肽(例如，人CD28多肽)，並且三個抗原結合位點之一結合第三多肽。在一些實施例中，特異性結合除CD3或CD28之外的抗原靶標的抗原結合位點結合選自以下的抗原靶標：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4(也稱為VTCN1)、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2(也稱為MCP-1)、CCL3(也稱為MIP-1a)、CCL4(也稱為MIP-1b)、CCL5(也稱為RANTES)、CCL7(也稱為MCP-3)、CCL8(也稱為mcp-2)、CCL11(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素)、CCL15(也稱為MIP-1d)、CCL17(也稱為TARC)、CCL19(也稱為MIP-3b)、CCL20(也稱為MIP-3a)、CCL21(也稱為MIP-2)、CCL24(也稱為MPIF-2/嗜酸性粒細胞趨化介素-2)、CCL25(也稱為TECK)、CCL26(也稱為嗜酸性粒細胞趨化介素-3)、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23(也稱為FCER2，一種IgE受體)、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80(也稱為B7-1)、CD86(也稱為B7-2)、CD122、CD137(也稱為41BB)、CD137L、CD152(也稱為CTLA4)、CD154(還稱為CD40L)、CD160、CD272、CD273(也稱為PDL2)、CD274(也稱為PDL1)、CD275(也稱為B7H2)、CD276(也稱為B7H3)、CD278(也稱為ICOS)、CD279(也稱為PD-1)、CDH1(也稱為E-鈣粘蛋白)、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1(也稱為M-CSF)、CSF-2(也稱為GM-CSF)、CSF-3(也稱為GCSF)、CX3CL1(也稱為SCYD1)、CXCL12(也稱為SDF1)、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、

外核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb(也稱為IL25的受體)、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4(也稱為b4整合素)、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2(也稱為IL33受體)、STEAP2、Syk激酶、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP(也稱為IL7Ra的共同受體)、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM和XCR1(也稱為GPR5/CCXCR1)。在一些實施例中，一種或多種上述抗原靶標是人抗原靶標。

在上文描述的任何三特異性結合蛋白中，可以使用本文所述的任何連接子或連接子組合。例如，在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4中的至少一個的長度獨立地是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3或L_4的長度各自獨立地是至少1個胺基酸。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地是0個胺基酸的長度或包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。在一些實施例中，L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、

GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。在一些實施例中，L_1包含序列GQPKAAP(SEQ ID NO:58)，L_2包含序列TKGPS(SEQ ID NO:57)，L_3包含序列S，L_4包含序列RT。在一些實施例中，L_1包含序列GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:55)，L_2包含序列GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:55)，L_3的長度是0個胺基酸，L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_2包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_3的長度是0個胺基酸，L_4的長度是0個胺基酸。在一些實施例中，L_1包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，L_2的長度是0個胺基酸，L_3包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，L_4的長度是0個胺基酸。

IV．結合蛋白的用途

結合蛋白可以用於任何已知的測定方法，諸如競爭性結合測定，直接和間接夾心式測定，以及用於檢測和定量一種或多種靶抗原的免疫沈澱測定。結合蛋白會以一種適合於所用測定方法的親和力結合一種或多種靶抗原。

對於診斷應用，在某些實施例中，可以用可檢測部分標記結合蛋白。可檢測部分可以是任何能夠直接或間接產生可檢測信號的部分。例如，可檢測部分可以是放射性同位素，諸如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S、^{125}I、^{99}Tc、^{111}In或^{67}Ga；熒光或化學發光化合物，諸如異硫氰酸熒光素、羅丹明或熒光素；或酶，諸如鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或辣根過氧化物酶。

結合蛋白也可用于體內成像。用可檢測部分標記的結合蛋白可以投予動物，較佳投予血流中，並測定主體中標記抗體的存在和位置。結合蛋白可以用在動物中通過無論是通過核磁共振、放射學還是業內已知的其他檢測手段可檢測的

任何部分標記。

對於臨床或研究應用，在某些實施例中，結合蛋白可以與細胞毒性劑綴合。已經使用與細胞毒性劑綴合的多種抗體(即抗體-藥物綴合物)將細胞毒性有效負載靶向特定腫瘤細胞。細胞毒性劑和將試劑與抗體綴合的連接子是業內已知的；參見，例如，Parslow, A.C. *et al.* (2016) *Biomedicines* 4:14 and Kalim, M. *et al.* (2017) *Drug Des. Devel. Ther.* 11:2265-2276。

本公開還涉及一種套組，其包含結合蛋白和用於檢測生物樣品中的靶抗原水準的其他試劑。這樣的試劑可包括可檢測標記、阻斷血清、陽性和陰性對照樣品和檢測試劑。在一些實施例中，套組包含組合物，其包含本文所述的任何結合蛋白、多核苷酸、載體、載體系統和/或主體細胞。在一些實施例中，所述套組包括容器和容器上或與容器相關的標簽或包裝說明書(package insert)。合適的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由多種材料形成，諸如玻璃或塑膠。所述容器容納組合物本身，所述組合物是其本身或與另一種有效治療、預防和/或診斷病況的組合物組合，並且可具有無菌進入口(例如所述容器可以是靜脈內溶液袋或具有通過皮下注射針頭可刺穿的塞子的小瓶)。在一些實施例中，標簽或包裝說明書指示該組合物用於預防、診斷和/或治療選擇的病況。或者，或另外，製品或套組可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥上可接受的緩衝液，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液。它可進一步包括從商業和用戶角度所需的其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

在一些實施例中，將本公開的結合蛋白投予有此需要的患者以治療或預防癌症。在一些實施例中，本公開涉及預防和/或治療增生性疾病或病症(例如，癌

症)的方法。在一些實施例中，該方法包括向患者投予治療有效量的至少一種本文所述的結合蛋白或與其相關的醫藥組合物。在一些實施例中，本公開涉及本文所述的至少一種結合蛋白或與其相關的醫藥組合物用於預防和/或治療有此需要的患者中的增生性疾病或病症(例如，癌症)的用途。在一些實施例中，本公開涉及本文所述的至少一種結合蛋白或與其相關的醫藥組合物，其用於製備用於預防和/或治療有此需要的患者中的增生性疾病或病症(例如，癌症)的藥物的用途。在一些實施例中，患者是人。在一些實施例中，結合蛋白包含結合T細胞表面蛋白的一個抗原結合位點和結合人CD38多肽的胞外域的另一個抗原結合位點，例如，如上文第II部分所述的。在一些實施例中，結合蛋白包含結合人CD38多肽的胞外域的抗原結合位點、結合人CD28多肽的抗原結合位點和結合人CD3多肽的抗原結合位點。

在一些實施例中，癌細胞在其細胞表面上表現人CD38同功異型物A多肽(例如，包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列)。在一些實施例中，癌細胞在其細胞表面上表現人CD38同功異型物E多肽(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)。在一些實施例中，基於癌細胞在其細胞表面上表現人CD38同功異型物E多肽(例如，包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列)，選擇患者進行治療。

在一些實施例中，癌症是多發性骨髓瘤、急性淋巴細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病、急性髓樣白血病、淋巴瘤、乳腺癌如Her2+乳腺癌、前列腺癌、生髮中心B細胞淋巴瘤或B細胞急性淋巴母細胞白血病。在某些實施例中，癌症是多發性骨髓瘤。在某些實施例中，癌症是急性髓樣白血病(AML)、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)或B細胞淋巴瘤。

在某些實施例中，癌症是多發性骨髓瘤。已經測試了抗CD38抗體用於治療

多發性骨髓瘤，諸如達雷木單抗和isatuximab。然而，雖然多發性骨髓瘤被認為是可治療的，但幾乎所有患者都不可避免地復發，導致治療難治性疾病的發展。在一些實施例中，癌症是復發性或難治性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，患者已經用先前的多發性骨髓瘤治療進行了治療。在一些實施例中，將本公開的結合蛋白作為多發性骨髓瘤的第一、第二或第三線治療投予患者。在不希望受理論束縛的情況下，認為本公開的抗CD38x抗CD28x抗CD3結合蛋白可用於例如通過經由抗CD38(或抗CD28/抗CD38)將T細胞募集至腫瘤細胞，經由抗CD3/抗CD28活化參與的T細胞，和/或通過基於穿孔素/顆粒酶的機制殺死腫瘤細胞治療多發性骨髓瘤。已經報道CD28為多發性骨髓瘤的新型癌症標記。參見Nair, J.R. *et al.* (2011) *J. Immunol.* 187:1243-1253。

在一些實施例中，至少一種結合蛋白與一種或多種抗癌療法(例如，業內已知的任何抗癌療法，諸如化療劑或化療法)組合投予(或待投予)。在一些實施例中，至少一種結合蛋白在一種或多種抗癌療法之前投予(或待投予)。在一些實施例中，所述至少一種結合蛋白與所述一種或多種抗癌療法同時投予(或待投予)。在一些實施例中，至少一種結合蛋白在一種或多種抗逆轉錄病毒療法後投予(或待投予)。

V. 結合蛋白治療組合物及其投予

包含結合蛋白的治療或醫藥組合物在本公開的範圍內。這樣的治療或醫藥組合物可包含治療有效量的結合蛋白或結合蛋白-藥物綴合物，其與選擇用於投予模式的醫藥上或生理學上可接受的配製劑相混合。

在所用的劑量和濃度下，可接受的配製劑材料較佳對接受者無毒。

醫藥組合物可含有用於改變、維持或保持例如組合物的pH、同滲容摩、粘度、透明度、顏色、等滲性、氣味、無菌性、穩定性、溶解或釋放速率、吸附或滲透的製劑材料。合適的製劑材料包括但不限於，胺基酸(諸如甘胺酸、麩胺醯胺酸、天門冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸)，抗微生物劑，抗氧化劑(諸如抗壞血酸、亞硫酸鈉或亞硫酸氫鈉)，緩衝劑(諸如硼酸鹽、碳酸氫鹽、Tris-HCl、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其他有機酸)，填充劑(諸如甘露醇或甘胺酸)，螯合劑(諸如乙二胺四乙酸(EDTA))，絡合劑(諸如咖啡因、聚乙烯吡咯啶酮、β-環糊精、或羥丙基-β-環糊精)，填充劑，單糖，二糖和其他碳水化合物(諸如葡萄糖、甘露糖或糊精)，蛋白質(諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白)，著色劑，調味劑和稀釋劑，乳化劑，親水聚合物(諸如聚乙烯吡咯啶酮)，低分子量多肽，成鹽相對離子(諸如鈉)，防腐劑(諸如苯紮氯銨、苯甲酸、柳酸、硫柳汞、苯乙醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或過氧化氫)，溶劑(諸如甘油、丙二醇或聚乙二醇)，糖醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)，懸浮劑，界面活性劑或潤濕劑(諸如普流羅尼(pluronics)；PEG；脫水山梨醇酯；聚山梨醇酯諸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80；triton；胺丁三醇；卵磷脂；膽固醇或泰洛沙泊(tyloxapal))，穩定性增強劑(諸如蔗糖或山梨糖醇)，張力增強劑(諸如鹼金屬鹵化物 - 較佳氯化鈉或氯化鉀 - 或甘露糖醇山梨糖醇)，遞送媒劑，稀釋劑，賦形劑和/或藥物佐劑(參見例如，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990)，及其後續版本，出於任何目的通過提述併入本文)。

最佳醫藥組合物會由技術人員根據例如預期的投予途徑、遞送形式和期望劑量來確定。這樣的組合物可影響結合蛋白的物理狀態、穩定性、體內釋放速

率和體內清除速率。

醫藥組合物中的主要媒劑或載劑可以是水性或非水性的。例如，用於注射的合適的媒劑或載劑可以是水、生理鹽水溶液或人造腦脊液，可能補充有用於腸胃外給藥的組合物中常見的其他材料。中性緩衝鹽水或與血清白蛋白混合的鹽水是進一步的示例性媒劑。其他示例性醫藥組合物包含約pH 7.0-8.5的Tris緩衝液或約pH 4.0-5.5的乙酸鹽緩衝液，其可進一步包括山梨糖醇或合適的替代物。在本公開的一個實施例中，通過將具有期望純度的所選組合物與凍幹餅或水溶液形式的任選配製劑混合，可以製備結合蛋白組合物用於儲存。此外，可以使用合適的賦形劑，諸如蔗糖，將結合蛋白配製為凍幹物。

可以選擇本公開的醫藥組合物用於腸胃外遞送或皮下遞送。或者，可以選擇組合物用於吸入或通過消化道遞送，諸如口服。這樣的醫藥上可接受的組合物的製備在業內技術範圍內。

製劑組分以投予部位可接受的濃度存在。例如，緩衝劑用於將組合物保持在生理pH或略低的pH，通常在約5至約8的pH範圍內。

當考慮腸胃外投予時，使用的治療組合物可以是無熱原的、腸胃外可接受的、水溶液的形式，其在醫藥上可接受的媒劑中包含期望的結合蛋白。用於腸胃外注射的特別合適的媒劑是無菌蒸餾水，其中將結合蛋白配製為適當保存的無菌等滲溶液。另一種製劑可涉及用藥劑配製期望分子，諸如可注射微球、生物可侵蝕顆粒、聚合化合物(諸如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠子或脂質體，其提供了產品的受控或持續釋放，所述產品然後可以通過貯庫注射(depot injection)來遞送。也可以使用透明質酸，這可以具有促進循環持續時間的效果。用於引入期望分子的其他合適方法包括可植入藥物遞送裝置。

在一個實施例中，可配製醫藥組合物用於吸入。例如，可以將結合蛋白配製為用於吸入的乾粉。結合蛋白吸入溶液也可以用推進劑配製用於氣溶膠遞送。在又一個實施例中，可以霧化溶液。

還考慮到某些製劑可以口服投予。在本公開的一個實施例中，以這種方式投予的結合蛋白可以與或不與彼等通常用於配製固體劑型諸如錠劑和膠囊的載劑一起配製。例如，當生物利用度最大化並且系統前降解最小化時，可設計膠囊以在胃腸道中的點釋放製劑的活性部分。可以包括另外的試劑以促進結合蛋白的吸收。還可以使用稀釋劑、調味劑、低熔點蠟、植物油、潤滑劑、懸浮劑、錠劑崩解劑和粘合劑。

另一種醫藥組合物可以在與適合製備錠劑的無毒賦形劑的混合物中包含有效量的結合蛋白。通過將錠劑溶解在無菌水或另一種合適的媒劑中，可以以單位劑量形式製備溶液。合適的賦形劑包括但不限於惰性稀釋劑，諸如碳酸鈣、碳酸鈉或碳酸氫鈉、乳糖或磷酸鈣；或粘合劑，諸如澱粉、明膠或阿拉伯膠；或潤滑劑，諸如硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石。

本公開的其他醫藥組合物對於熟習此項技術者而言會是顯而易見的，包括涉及持續或控制遞送製劑中結合蛋白的製劑。用於配製多種其他持續或控制遞送方法的技術，諸如脂質體載劑、生物可侵蝕微粒或多孔珠粒和貯庫注射，也是熟習此項技術者已知的。持續釋放製劑的另外的實例包括成形制品形式的半透性聚合物基質，例如，薄膜或微膠囊。緩釋基質可包括聚酯、水凝膠、聚交酯、L-麩胺酸和L-麩胺酸-γ-乙酯的共聚物、聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)、乙烯-乙酸乙烯酯或聚-D(-)-3-羥基丁酸。持續釋放組合物還可包括脂質體，其可通過業內已知的幾種方法中的任何一種製備。

用於體內投予的醫藥組合物通常必須是無菌的。這可以通過無菌過濾膜過濾來完成。在凍幹組合物的情況下，可以在凍幹和重構之前或之後進行使用該方法的滅菌。用於腸胃外投予的組合物可以凍幹形式或溶液形式儲存。另外，腸胃外組合物通常放入具有無菌進入口的容器中，例如，具有可由皮下注射針刺穿的塞子的靜脈內溶液袋或小瓶。

一旦配製了醫藥組合物，就可以將其作為溶液、懸浮液、凝膠、乳液、固體或作為脫水或凍幹粉末儲存在無菌小瓶中。這樣的製劑可以以即用形式或以在投予前需要重構的形式(例如凍幹)儲存。

本公開還涵蓋用於產生單劑量投予單位的套組。套組可各自包含具有乾燥蛋白質的第一容器和具有含水製劑的第二容器。還包括在本公開範圍內的是包含單室和多室預填充注射器(例如，液體注射器和凍幹注射器)的套組。

治療上使用的結合蛋白醫藥組合物的有效量將取決於例如治療背景和目的。熟習此項技術者會理解，治療的適當劑量水準會因此部分地取決於遞送的分子，使用結合蛋白的適應症，投予的途徑，以及患者的大小(體重、體表或器官大小)和狀況(年齡和一般健康狀況)。因此，臨床醫生可以滴定劑量並改變投予途徑以獲得最佳治療效果。

給藥頻率會取決於所用製劑中結合蛋白的藥代動力學參數。一般而言，臨床醫生會投予組合物直至達到實現期望效果的劑量。因此，組合物可以作為單劑量，作為兩個或更多個劑量(其可以包含或不包含相同量的期望分子)隨時間投予，或者作為經由植入裝置或導管的連續輸注投予。適當劑量的進一步改進是熟習此項技術者習知進行的，並且在他們習知執行的任務範圍內。通過使用適當的劑量反應數據可以確定適當的劑量。

醫藥組合物的投予途徑與已知方法一致，例如口服；通過靜脈內、腹膜內、腦內(實質內)，腦室內，肌內，眼內，動脈內，門脈內或病灶內的途徑的注射；通過持續釋放系統；或通過植入裝置。需要時，組合物可以通過推注(bolus injection)或通過輸注或通過植入裝置連續投予。

組合物還可以經由植入膜、海綿或其它適當的材料局部投予，期望的分子已被吸收或包封在其上。在使用植入裝置的情況下，可以將裝置植入任何合適的組織或器官中，並且可以經由擴散、定時釋放推注或連續投予來遞送期望分子。

實例

以下實例說明了本公開的具體實施例及其多種用途。它們僅出於解釋目的而提出，並且不應被解釋為以任何方式限制本發明的範圍。

以下術語可以在本文的實例和附圖中互換使用，以指代特異性抗CD38抗原結合結構域或抗體:

抗CD38_C2-CD38-1:mAb1

抗CD38_C2-CD38-1_VH1-VL1或$CD38_{VH1}$: mAb2

抗CD38_C2-CD38-1_VH3-VL3:mAb3

抗CD38_C2-CD38-1_VH5-VL3:mAb4

抗CD38_C2-CD38-1_VH6-VL3:mAb5

抗CD38_1370或$CD38_{HHY1370}$: mAb6

抗CD38_SB19或isatuximab:mAb7。

實例1: 單克隆抗CD38抗體的生成和表徵

以下實例描述了單克隆抗CD38抗體的生成和表徵。有利地，本文提供的抗體與人和猴CD38蛋白交叉反應，由此提供可用於安全性和臨床研究的分子。此等抗體還能夠通過凋亡和抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)殺死CD38+細胞。

該實例描述了用於從單個鼠B細胞生成CD38特異性和交叉反應性單克隆抗體的有效工作流程。

材料和方法

單克隆抗體的生成

使用人CD38胞外域R45-I300(SEQ ID NO:1)生成針對人CD38的抗體。參見Q. Liu, I. Krilksunov, R. Graeff, C. Munshi, H.C. Lee, and Q. Hao 2005 Structure 13:: 1331-1339。將免疫原與佐劑一起直接投予正常BalbC小鼠或轉基因Trianni Mice™ (Trianni, San Francisco, CA)，其包含編碼人免疫球蛋白重鏈和κ輕鏈可變區的DNA，以刺激免疫應答。

使用衍生自具有不同標簽和點突變的同功異型物A的多種重組CD38蛋白(SEQ ID NO:2、3、4和28)，以及包含來自R45-P203的CD38胞外域的CD38同功異型物E(SEQ ID NO:105)的帶標簽版本。通過在哺乳動物細胞中瞬時表現產生蛋白質。將編碼DNA序列克隆到CMV強化子/啟動子和SV40聚腺苷酸(polyA)信號下的哺乳動物表現質體中。根據製造商的說明書，使用FreeStyle™ MAX 293表現系統，用表現質體瞬時轉染HEK293細胞(Invitrogen; #K9000-10)。

小鼠的免疫和單個B細胞選擇

還從抗原陽性B細胞中直接單離抗CD38抗體，而不與骨髓瘤細胞融合。使用該方法，獲得了幾種抗CD38抗體，諸如mAb1(參見，SEQ ID No:5和6，分別用於VH和VL序列，和SEQ ID No:7和8，分別用於重鏈和輕鏈序列)。簡言之，6-8周齡雌性BALB/c小鼠(S082342; Charles River Labs，Bar Harbor，ME)各自使用A. Wennerberg *et al.* (1993 Am. J. Pathol. 143:1050-1054)描述的經典方法在41天的過程中接受三輪免疫。將抗原腹膜內投予小鼠的腹側部位。最後一次注射後3天，處死小鼠並無菌單離脾臟並用新鮮的RPMI培養基洗滌。從脾臟釋放淋巴細胞，和在使用包括一組熒光抗體和雙重人和猴CD38蛋白的四色分選策略分選前，用RPMI培養基洗滌單細胞懸浮液兩次，然後使用流式細胞術細胞分選來單離，以單離人/猴交叉反應性IgG-CD38特異性B細胞。將單個細胞直接分選到PCR管中以通過RT-PCR擴增VH和VL基因的同源對(T. Tiller, C. Busse and H. Wardemann 2009 J. Immunol. Methods 350:183-193)。對得到的DNA進行定序。

根據製造商的說明書，使用FreeStyle™ MAX 293表現系統將得到的DNA克隆到分別編碼人IgG1或人Ck結構域的哺乳動物表現載體中，用於在HEK293細胞中瞬時表現。通過蛋白A親和層析(MabSelect, GE Heathcare)純化批次。在無菌過濾前將溶離液用PBS透析並儲存在4℃。

通過在人免疫球蛋白轉基因小鼠中的免疫生成抗體和使用雜交瘤技術選擇

如Kilpatrick *et al.* 1997 Hybridoma 16: 381389中所述的，使用P3X63-Ag8.653骨髓瘤細胞和人CD38的胞外域進行免疫、融合和篩選。使用Kilpatrick等人描述的RIMMS方法，包含編碼人免疫球蛋白重鏈和κ輕鏈可變區的DNA的6-8周齡雌

性轉基因Trianni Mice™各自在14天過程中每隔3-4天接受四輪免疫。沿著小鼠的背部和沿著腹部的六個並列部位將在RIBI佐劑(Sigma＃T2684)中乳化的CD38蛋白皮下投予靠近引流淋巴結的6個部位。最後一次注射後4天，處死小鼠。無菌單離雙側腸窩、淺表腹股溝、腋窩和鰓淋巴結，並用新鮮的RPMI培養基洗滌。從淋巴結釋放淋巴細胞，在使用聚乙二醇與P3X63-AG8.653骨髓瘤細胞融合之前，用RPMI培養基洗滌單細胞懸浮液兩次。融合後，將細胞混合物在37℃的培養箱中溫育16-24小時。將得到的細胞配製物轉移到選擇性半固體培養基中，無菌鋪板到100 mm陪替平(Petri)皿中並在37℃溫育。選擇開始10天后，檢查平板的雜交瘤生長，挑取可見的菌落並置於含有200 μL生長培養基的96孔板中。將96孔板保持在37℃的培養箱中2至4天。使用該技術和上述免疫原，獲得了幾種抗CD38嵌合抗體，諸如mAb 6(參見SEQ ID No:9和10，分別用於VH和VL序列，和SEQ ID No:11和12，分別用於重鏈和輕鏈序列)。通過RT-PCR檢索VH和VL序列，並通過如上所述的瞬時表現產生mAb 6。

對可溶性CD38胞外結構域的結合親和力

使用BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ)評價抗huCD38 mab的結合特性。簡言之，將CM5 BIAcore生物傳感器晶片對接到儀器中並在室溫用250μL的1:1 NHS/EDC活化。將小鼠抗人Fc IgG1(GE Healthcare＃BR-1008-39)(在0.05M乙酸鹽緩衝液中的13.5μg/mL，pH5)固定在流動池1中的活化晶片上。固定化以5μL/min的流速進行。然後通過注入55μL的乙醇胺-HCl，pH8.5封閉晶片，然後用50mM NaOH、1M NaCl洗滌5次。為了測量抗CD38 mab與人CD38蛋白或cyno CD38蛋白的結合，在BIAcore運行緩衝液(HBS-EP)中以2μg/mL使用抗體。從3至

1000 nM注射抗原(人CD38-histag(ID2)或cyno CD38-histag(ID3))。在完成注射階段後，在BIAcore運行緩衝液中以相同的流速監測解離360秒。使用30μL的50mM NaOH-1M NaCl在注射之間再生表面。使用BIAsimulation軟體分析各個傳感圖。

對表現人CD38的前B細胞的結合親和力

通過流式細胞術測定抗CD38抗體與重組鼠前B::300.19細胞表面上表現的CD38的結合。重組細胞株由J. Deckket et al. 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583描述。將鼠前B::300.19 CD38表現細胞以40,000個細胞/孔包被在96孔High Bind板(MSD L15XB-3)上，並在4℃加入100μL/孔的抗CD38抗體45分鐘並用PBS 1%BSA洗滌三次。在4℃加入100μL/孔的與Alexa488綴合的山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch; # 109-545-098)45分鐘，並用PBS 1% BSA洗滌三次。離心並通過添加200μl/孔PBS 1% BSA重懸細胞並使用Guava® easyCyte™ 8HT流式細胞計數系統讀取來評價抗體結合。使用BIOST BIOST@T-BINDING和BIOST@T-SPEED軟體分別估計表觀KD和EC50值。

結果

使用流式細胞術將新單離的mAb1與人SU-DHL-8或MOLP-8細胞的結合與isatuximab的進行比較(**圖1A**)。兩種抗體均顯示出對兩種細胞株的高親和力結合。然而，只有mAb1能夠與表面上表現食蟹猴CD38的細胞結合(**圖1B**)。

使用表面等離子體共振(SPR)檢查與人和食蟹猴CD38多肽的可溶性胞外域的結合的新單離的抗體mAb1和mAb6。SPR結果匯總在表A中。

表A. 通過SPR測定確定的抗體與hCD38和cCD38的可溶性胞外域的結合親和力。

	hCD38-his (SEQ ID NO:2)		cCD38-his (SEQ ID NO:4)	
	Kd (s-1)	KD (M)	Kd (s-1)	KD (M)
mAb1	2.66E-04	3.36E-10	9.85E-05	3.90E-10
mAb6	2.03E-04	1.44E-09	1.90E-04	1.38E-09

流式細胞術也用於檢測mAb1和mAb6抗CD38抗體與其細胞表面上表現人或食蟹猴CD38多肽的鼠前B細胞的結合。結果顯示在表B中。測試的兩種抗體均顯示出與表現前B::300.19 huCD38-或cCD38的細胞的高親和力結合。

表B. 通過流式細胞術確定的抗體與鼠前B::300.10細胞表現的hCD38或cCD38的結合親和力。

	表觀KD FACS (M)	
	表現hCD38的細胞	表現cCD38的細胞
mAb1	2.80E-10	2.20E-10
mAb6	2.07E-09	1.14E-09

此等結果證明了以高親和力結合人和食蟹猴CD38多肽的抗體的生成。與其他抗CD38抗體不同，此等抗體與可溶性細胞外形式的人和食蟹猴CD38多肽交叉反應或在哺乳動物細胞表面上表現。

實例2: 人源化抗CD38變異體的計算機設計

該實例描述了實例1中生成的抗體的人源化。

在計算機中分析mAb1可變結構域的序列。用於免疫球蛋白(IMGT)定義的國際ImMunoGeneTics信息系統用於鑒定互補決定區(CDR)。

首先，並行地進行搜索以鑒定每個可變鏈的最接近的小鼠種系和人種系蛋白序列組合。這是使用基本局部比對搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool，BLAST) (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)對小鼠和人種系蛋白序列數據庫進行搜索來進行的。對於每個抗體鏈，找到最接近的V和J小鼠和人蛋白序列。通過V區識別百分比測量這種高蛋白序列同一性的鑒定。mAb1輕鏈和重鏈的搜索結果分別列於表C和D中。

表C. mAb1可變輕鏈最接近的人和小鼠(V＆J)種系蛋白序列。

物種	**V等位基因**	**V區同一性(%)**	**J等位基因**
[智人] ***最佳功能種系***	IGKV4-1*01 (imgt) *功能*	66.34 %	IGKJ1*01 (imgt) *功能*
[小家鼠] ***最佳功能種系***	IGKV3-10*01 (imgt) *功能*	**96.97 %**	IGKJ1*01 (imgt) *功能*

表D. mAb1可變重鏈最接近的人和小鼠(V＆J)種系蛋白序列。

物種	**V等位基因**	**V區同一性(%)**	**J等位基因**
[智人]	IGHV1-3*01 (imgt)	69.39 %	IGHJ4*01 (imgt)

最佳功能種系	*功能*		*功能*
[小家鼠] ***最佳功能種系***	IGHV1-12*01 (imgt) *功能*	**87.76 %**	IGHJ3*01 (imgt) *功能*

接下來，篩選mAb1可變結構域序列的序列責任(liability)，諸如脫醯胺、酸性裂解、氧化或異天門冬胺酸形成位點。通過藉由同源性的3D建模分析mAb1結構，以定義胺基酸殘基如何以分子內或分子間方式交互作用。該步驟導致鑒定一組胺基酸殘基，其對於mAb1功能性在結構上是重要的，如CDR構形和抗原結合。選擇此等胺基酸殘基以存在於人源化mAb1可變序列中。

將來自親本鼠mAb1的CDR移植到相關架構上。基於上述分析，選擇與**IGKJ1*01**偶聯的人**IGKV3-20*02**和與**IGHJ4*01**偶聯的人**IGHV1-3*01**，分別作為mAb1可變輕鏈和可變重鏈人源化的基礎。mAb1輕鏈與選擇的人IGKV3-20*02種系在V區上顯示出64.52%的同一性。mAb1重鏈與選擇的人IGHV1-3*01種系在V區上顯示出69.39%的同一性。在人源化過程中，將親本鼠mAb1 CDR移植到選擇的種系架構之間以重構標準抗體可變序列。如上所述，注意到先前鑒定的mAb1胺基酸殘基組在結構上對其功能很重要。如果需要，彼等胺基酸殘基在新產生的序列中被它們確切的相應mAb1殘基取代。這對應於回復突變步驟以併入足夠的親本序列胺基酸殘基。一些CDR突變被併入用於親本CDR中的人源化和避免序列責任。新創建的輕和重可變序列用於生成人源化mAb1可變區的3D同源性模型。使用來自BIOVIA Discovery Studio套件的模型抗體架構(Model Antibody Framework)建立3D模型。

基於CDR移植方法，生成可變輕鏈的兩個變異體(VL1和VL3)和可變重鏈的

四個變異體(VH1、VH3、VH5和VH6)。在mAb1可變輕鏈和重鏈序列之間變化的胺基酸殘基的特定組合及其人源化形式分別列於表E和表F中。

表E. mAb1可變輕鏈和人源化變異體之間的序列差異。

Ig區(IMGT)	親本mAb1 VL	人源化VL1	人源化VL3
FR1	S10	T	T
	A12	S	S
	V13	L	L
	L15	P	P
	Q17	E	E
CDR1	E27	Q	E
	D30	S	D
	N34	Q	N
FR2	K49	R	R
CDR2	L54	G	L
FR3	N57	S	S
	L58	R	R
	E59	A	A
	S60	T	T
	V62	I	I
	R72	G	G
	D80	S	S

	V82	L	L
	A84	P	P
	D85	E	E
	A87	F	F
	T89	V	V

表F. mAb1可變重鏈和人源化變異體之間的序列差異。

Ig區(IMGT)	親本mAb1 VH	人源化VH1	人源化VH3	人源化VH5	人源化VH6
FR1	Q5	V	V	V	V
	L11	V	V	V	V
	R13	K	K	K	K
	S14	P	P	S	P
	M20	V	V	V	M
CDR1	F32	Y	F	F	F
	N33	A	N	N	N
FR2	T40	A	A	A	A
	G44	R	R	G	R
CDR2	N55	Q	N	N	N
FR3	K65	Q	Q	Q	Q
	K67	R	R	R	R
	S76	A	A	A	A
	Q82	E	E	E	E
	I83	L	L	I	I

	T87	**R**	**R**	**R**	**R**
	S91	**T**	**T**	**T**	**T**

與具有SEQ ID NO:6的mAb1序列的親本VL相比，具有SEQ ID NO:14的人源化VL1變異體顯示總共22個突變(FR中18個和CDR中4個)。該變異體衍生自與IGKJ1*01偶聯的人種系IGKV3-20*02的架構，其由於對mAb結構、CDR構形以及因此對結合其靶標的負面影響的風險而進行了8次回復突變。使親本CDR的四個位置突變以增加人源化比例或避免序列責任。

與具有SEQ ID NO:6的mAb1序列的親本VL相比，具有SEQ ID NO:18的人源化VL3變異體顯示總共18個突變(FR中18個)。該變異體衍生自與IGKJ1*01偶聯的人種系IGKV3-20*02的架構，其由於對mAb結構、CDR構形以及因此對結合其靶標的負面影響的風險而進行了8次回復突變。

與具有SEQ ID NO:5的mAb1序列的親本VH相比，具有SEQ ID NO:13的人源化VH1變異體顯示總共17個突變(FR中14個和CDR中3個)。該變異體衍生自與IGHJ4*01偶聯的人種系IGHV1-3*01的架構，其由於對mAb結構、CDR構形以及因此對結合其靶標的負面影響的風險而進行了11次回復突變。突變親本CDR的三個位置以增加人源化比例或避免序列責任。

與具有SEQ ID NO:5的親本VH mAb1序列相比，具有SEQ ID NO:17的人源化VH3變異體顯示總共14個突變(FR中14個)。該變異體衍生自與IGHJ4*01偶聯的人種系IGHV1-3*01的架構，其由於對mAb結構、CDR構形以及因此對結合其靶標的負面影響的風險而進行了11次回復突變。

與具有SEQ ID NO:5的mAb1序列的親本VH相比，具有SEQ ID NO:21的人源

化VH5變異體顯示總共11個突變(FR中11個)。該變異體衍生自與IGHJ4*01偶聯的人種系IGHV1-3*01的架構，其由於對mAb結構、CDR構形以及因此對結合其靶標的負面影響的風險而進行了14次回復突變。

與具有SEQ ID NO:5的mAb1序列的親本VH相比，具有SEQ ID NO:23的人源化VH6變異體顯示總共12個突變(FR中12個)。該變異體衍生自與IGHJ4*01偶聯的人種系IGHV1-3*01的架構，其由於對mAb結構、CDR構形以及因此對結合其靶標的負面影響的風險而進行了13次回復突變。

對得到的輕和重人源化可變序列進行爆破以獲得與免疫抗原決定區數據庫(IEDB)數據庫((PLos Biol (2005) 3(3)e91) www.iedb.org)的序列相似性，以確保沒有序列含有其中列出的任何已知的B或T細胞抗原決定區。

表G中列出了mAb1和人源化輕和重可變結構域的完整胺基酸可變序列。已將此等人源化輕和重可變結構域組合以生成mAb1的親本可變結構域的幾種人源化形式。mAb2可變結構域對應於人源化VH1與人源化VL1組合的結合。mAb3可變結構域對應於人源化VH3與人源化VL3組合的結合。mAb4可變結構域對應於人源化VH5與人源化VL3組合的結合。mAb5可變結構域對應於人源化VH6與人源化VL3組合的結合。表G中所示的三特異性結合蛋白在實例4中有更詳細的描述。

將如上所述的人源化VH和VL變異體的相應編碼DNA序列克隆到分別編碼人IgG1或人Ck結構域的哺乳動物表現載體中，用於如實例1中所述的瞬時表現和純化。衍生自mAb1的全長人源化抗CD38變異體的胺基酸序列列為mAb2(重鏈:HC1，SEQ ID NO:15；輕鏈:LC1，SEQ ID NO:16)、mAb3(重鏈:HC3，SEQ ID NO:19；輕鏈:LC3，SEQ ID NO:20)、mAb4(重鏈:HC5，SEQ ID NO:22；輕鏈:LC3，

SEQ ID NO:20)和mAb5(重鏈:HC6，SEQ ID NO:24；輕鏈:LC3，SEQ ID NO:20)。

實例3: 抗CD38抗體的交叉反應性和凋亡誘導

接下來表徵實例2中產生的人源化抗CD38變異體與人和食蟹猴CD38多肽的結合以及誘導細胞凋亡。

材料和方法

凋亡誘導試驗

將細胞以2 x 10^5個細胞/mL在完全培養基(RPMI-1640, 10%FBS，2mM L-麩胺醯胺酸)中與1.5 μg/mL(10 nM)指定的抗體在37℃和5% CO2溫育20小時。按照製造商的說明書(Life Technologies)用膜聯蛋白V-FITC染色細胞。在具有BD FACSDiva軟體的BD FACSAria™流式細胞儀上通過流式細胞術分析樣品用於採集控制和數據分析(均為BD Biosciences)。

結果

檢查了如上所述產生的選定的抗人CD38抗體的結合特性(**圖2A-2H**)。使用ELISA和SPR檢查抗體與可溶性人CD38和食蟹猴CD38的結合。ELISA數據用於確定抗體與人和食蟹猴CD38結合的EC50，用於人源化抗CD38抗體mAb2(**圖2A**)、mAb3(**圖2C**)、mAb4、mAb5(**圖2E**)和人抗CD38抗體mAb6(**圖2I**)。

還使用上述SPR測定評價人源化抗CD38變異體或人抗CD38mAb與CD38的結合。SPR數據用於確定抗體與人和食蟹猴CD38結合的K_D和k_{off}，用於人源化抗CD38抗 體mAb2(**圖2B**)、mAb3(**圖2D**)、mAb4、mAb5(**圖2F**)和 人 抗CD38抗 體

mAb6(**圖2H**)。結合數據匯總在表K中，顯示所有抗CD38 mAb與具有相似結合特徵的CD38結合。

表K. 通過表面等離子體共振測定確定的抗CD38mAb與人CD38和食蟹猴CD38的可溶性胞外域的結合親和力。

	hCD38-his (SEQ ID NO:2)		cCD38-his (SEQ ID NO:4)	
	Kd (s-1)	KD (M)	Kd (s-1)	KD (M)
mAb1	2.66E-04	3.36E-10	9.85E-05	3.90E-10
mAb2	3.90E-04	3.32E-10	7.84E-04	3.44E-09
mAb3	2.83E-04	4.83E-10	1.29E-04	7.10E-10
mAb4	5.29E-04	8.22E-10	2.01E-04	1.14E-09
mAb5	3.33E-04	3.12E-10	1.25E-04	5.63E-10
mAb6	2.03E-04	1.44E-09	1.90E-04	1.38E-09

使用上述基於FACS的結合測定評估人源化抗CD38變異體與表現CD38的細胞結合的能力。FACS數據用於確定抗體與人和食蟹猴CD38結合的EC50，用於人源化抗CD38抗體mAb2(**圖2A**)、mAb3(**圖2C**)、mAb4、mAb5(**圖2E**)和人抗CD38抗體mAb6(**圖2G**)。表L中列出的結合數據顯示所有人源化抗CD38變異體對細胞表面CD38表現出相似的結合親和力。

表L. 抗CD38 mAb與表現CD38的鼠前B::300.19細胞的結合親和力。

	表觀KD FACS (M)

	表現hCD38的細胞	表現cCD38的細胞
mAb1	2.80E-10	2.20E-10
mAb2	3.30E-10	7.50E-10
mAb3	7.80E-10	1.31E-09
mAb4	5.50E-10	1.15E-09
mAb5	6.80E-10	1.07E-09
mAb6	2.07E-09	1.14E-09

來自三種測定的結合數據匯總於**圖2I**中，以及VH和VL結構域與人V區的序列同一性。

接下來檢查親本mAb1抗體和mAb7誘導細胞凋亡的能力。兩種抗體均增加膜聯蛋白V染色和碘化丙啶(PI)攝取。用mAb7處理後，40%的細胞成為膜聯蛋白V和PI的雙陽性，而用mAb1處理的細胞中60%是雙陽性。兩種抗體在SU-DHL-8細胞中表現出類似的濃度依賴性凋亡作用(**圖2J**)。類似地，兩種抗體在NK92細胞存在下促進針對SU-DHL-8細胞的ADCC活性(**圖2K**)，在37℃4小時後導致高達60%的細胞毒性和4-6pM的IC50(**圖2L**)。

在計算機中鑒定CD38同功異型物E，並在來自多發性骨髓瘤患者和癌細胞株(MOLP-8、CU1702和CU2332)的NK細胞、PBMC和BMMC的轉錄水準上進行驗證。使用有關人RefSeq轉錄物數據庫發佈20131216的BLASTN 2.2.26 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.)程序通過核酸序列數據庫篩選證明CD38同功異型物E。BLASTN程序在沒有掩蔽

序列低複雜性區域和至少考慮以下的情況下應用:與一片最少100個核酸殘基長的人CD38同功異型物A核酸序列的98.5%同一性。從該篩選中突出顯示的序列與CD38基因座重新對齊，以便被驗證為人CD38基因的轉錄形式(相同的內含子-外顯子基因組結構)。CD38同功異型物E核酸序列是被驗證為人CD38基因的轉錄形式的序列之一。

還檢測了抗CD38抗體結合人CD38同功異型物A和E的能力。為了評價與CD38同功異型物A和同功異型物E的結合，通過使用同功異型物A和同功異型物E蛋白(如實例1中所述製備的)作為捕獲抗原進行酶聯免疫吸附測定(ELISA)。用PBS中的0.5μg/孔的同功異型物包被96孔板，並向板中添加100μL/孔的抗體。將板在37℃溫育1小時，並用含有0.05%Tween-20(PBS-T)的PBS洗滌5次。然後，向每個孔中添加100μL與辣根過氧化物酶綴合的1:25,000稀釋的抗人IgG (Jackson Ref:109-035-098)。在黑暗中在37℃溫育1小時後，用PBS-T洗滌平板5次。通過添加TMB-H2O2緩衝液使抗體結合可見，並在450nm的波長讀數。使用BIOST@T-SPEED軟體估計EC50值。

測定多種抗體對CD38同功異型物A(SEQ ID NO:1)和同功異型物E(SEQ ID NO:105)的結合親和力，如表L2所示。表M提供了多種抗CD38抗體的結合特性的比較。

表L2. 基於通過ELISA測定的EC50，抗CD38抗體對CD38同功異型物A和E的結合親和力。

抗體	CD38同功異型物A EC50 (nM)	CD38同功異型物E EC50 (nM)
mAb1	0.11 (CV 9 %)	0.08 (CV 7%)

mAb2	0.14 (CV 13%)	0.10 (CV 12%)
mAb6	0.47 (CV 3.7%)	0.32 (CV 5%)
mAb7	0.10 (CV 7.1%)	未結合

表M. 多種抗CD38抗體的結合特徵。

抗CD38	H11(Santa Cruz)	達雷木單抗	mAb7	mAb1	mAb6
結合huCD38同功異型物A	+	+	+	+	+
結合huCD38同功異型物E	+	-	-	+	+
結合cyno CD38	+	-	-	+	+

總之，mAb7和mAb1在MOLP-8人多發性骨髓瘤細胞中誘導相似的凋亡，對SU-DHL-8細胞具有相似的濃度依賴性凋亡作用，並且對SU-DHL-8細胞具有相似的濃度依賴性ADCC活性。然而，只有mAb1以亞納摩爾親和力結合人和食蟹猴CD38並且結合CD38同功異型物A和E。

還通過如上所述的熒光激活細胞分選儀(FACS)評估人源化抗CD38變異體誘導細胞凋亡的能力。先前已經鑒定了幾種具有多種功能特性的抗CD38抗體，而其中一些可經由直接影響細胞增生或凋亡介導體外殺傷CD38+細胞株。凋亡誘導測定的結果如**圖2M**所示。除mAb6外，實例1和2中生成的所有抗體均能誘導凋亡。抗CD38抗體mAb2、mAb3、mAb4和mAb5導致SU-DHL-8淋巴瘤細胞中凋亡的劑量依賴性誘導；每種抗體的IC50在**圖2N-2Q**中提供。

實例4: 三特異性抗CD38結合蛋白的生成

接下來，以**圖3A**中所示的三特異性形式分析實例1-3中描述的所選抗CD38抗體的抗原結合結構域的結合特性。

當使用SPR將其他抗原結合結構域與其同源配位體結合時，以三特異性形式(抗CD38x抗CD28x抗CD3)測試抗CD38抗原結合結構域的結合CD38的能力。順序配位體結合測定示於**圖3B**。為了將三種抗原順序結合到每種三特異性抗體，注射每種抗原的飽和濃度(> 10KD)8分鐘，然後解離5分鐘。通過以30μl/min注射10 mM甘胺酸-HCl pH 2.5 60秒進行表面再生。數據用1:1動力學結合模型擬合，並使用Biacore S200評價軟體v 1.0進行分析。使用結合速率常數(k_{on})和解離速率常數(k_{off})計算平衡解離常數(K_D)。

如**圖3C**所示，這種基於SPR的測定顯示，無論CD3和/或CD28抗原結合結構域是否也結合其同源抗原，三特異性結合蛋白能夠結合CD38。示例性順序結合測定的結果示於**圖4**。通過SPR測量的動力學參數在表M2中提供。

表M2. 三特異性抗CD38x抗CD28x抗CD3結合蛋白與1、2或3種同源抗原的結合。

CD38 結合前的結合蛋白狀態	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**
無預結合	9.02E+05	1.42E-03	1.57E-09
預結合 CD3	8.35E+05	1.24E-03	1.48E-09
預結合 CD28	7.39E+05	1.32E-03	1.79E-09

預結合 CD3 然後 CD28	8.18E+05	1.23E-03	1.50E-09
預結合 CD28 然後 CD3	8.37E+05	1.23E-03	1.47E-09

此等結果證明所有三種靶標可以同時結合三特異性結合蛋白。將三特異性結合蛋白與CD28、CD3或兩者(以任一順序)預結合不改變對CD38的結合動力學或結合親和力。

接下來，通過SPR評估$CD38_{SB19}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$三特異性結合蛋白的每個抗原結合結構域在飽和時具有和不具有其他兩個抗原結合結構域的結合同源抗原的能力。表M3和M4顯示了此等測定的結果。

表M3. 沒有其他靶標存在的靶標結合

靶標	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**
CD38	8.04E+05	1.41E-03	1.75E-09
CD28	1.16E+05	3.14E-04	2.71E-09
CD3	2.90E+04	6.73E-04	2.32E-08

表M4. 與其他靶標在飽和時的靶標結合

靶標	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**
CD38	5.93E+05	1.44E-03	2.42E-09
CD28	1.05E+05	3.96E-04	3.77E-09
CD3	1.27E+05	2.36E-03	1.86E-08

如表M3和M4所示，通過與抗原預結合而飽和的兩個靶標不影響第三靶標對

CD38或CD28的動力學或結合親和力。在CD3結合的情況下，預結合的CD38和/或CD28導致更快的動力學(對k_{on}和k_{off}值的約4倍影響)。

以三特異性形式測試抗CD38抗原結合結構域，其具有兩個抗CD28抗原結合結構域(超促效劑，“sup”，和習知促效劑，“cvn”)和兩個抗CD3抗原結合結構域(“mid”和“low”)。此等抗原結合結構域的可變結構域序列如下提供：抗$CD28_{sup}$: SEQ ID NO:49 (VH)和SEQ ID NO:50 (VL); 抗$CD28_{cvn}$: SEQ ID NO:51 (VH)和SEQ ID NO:52 (VL); 抗$CD3_{mid}$: SEQ ID NO:53 (VH)和SEQ ID NO:54 (VL); 抗$CD3_{low}$: SEQ ID NO:84 (VH)和SEQ ID NO:85 (VL)。檢測三特異性結合蛋白結合的SPR測定結果如**圖5**所示。三種抗CD38結合結構域在三特異性結合蛋白形式中具有與單特異性形式大致相同的結合親和力。兩種CD3結合結構域在單、雙和三特異性形式中具有大致相同的結合親和力。與單特異性相比，CD28結合結構域在雙或三特異性形式中應略降低(但仍然是納摩爾)結合親和力。當其他兩個抗原結合結構域飽和時，與其他兩個抗原結合結構域未與抗原結合時相比，抗$CD38_{SB19}$和抗$CD28_{sup}$結合結構域具有相似的結合親和力。然而，當其他兩個抗原結合結構域飽和時，抗$CD3_{mid}$結合結構域顯示出更快的動力學。此等結果證明抗CD38、抗CD28和抗CD3結合結構域與三特異性結合蛋白形式相容。

還將本文生成的抗CD38抗原結合結構域與mAb7的現有抗CD38抗原結合結構域進行比較(分別參見，VH序列的SEQ ID NO:47和VL序列的SEQ ID NO:48)。通過流式細胞術確定三特異性分子與重組鼠前B::300.19細胞表面上表現的CD38的結合，並且平行測定相應的抗CD38單價抗體。重組細胞株由J. Deckket et al. 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583描述。將鼠前B::300.19 CD38表現細胞以40,000個細胞/孔包被在96孔High Bind板(MSD L15XB-3)上，並在4℃添加100μL/

孔的三特異性分子45分鐘並用PBS 1% BSA洗滌三次。在4℃添加100μL/孔的與Alexa488綴合的山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch; # 109-545-098)45分鐘，並用PBS 1% BSA洗滌三次。離心並通過添加200μl/孔PBS 1% BSA重懸細胞並使用Guava® easyCyte™ 8HT流式細胞儀系統讀取來評價抗體結合。使用BIOST@T-BINDING和BIOST@T-SPEED軟體分別估計表觀KD和EC50值。

如上所述使用流式細胞術檢查mAb7或三特異性結合蛋白與mAb7抗CD38抗原結合結構域與在細胞表面上表現人或食蟹猴CD38多肽的鼠前B細胞的結合。如**圖6A**所示，CD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$三特異性結合蛋白與mAb7抗CD38抗原結合結構域結合表現人CD38的細胞(左上)，其表觀親和力比mAb7單特異性抗體低8倍(右上)。mAb7單特異性抗體(右下)或具有mAb7抗CD38抗原結合結構域的三特異性結合蛋白(左下)均未與表現食蟹猴CD38的細胞結合。

還以三特異性形式測試人源化抗CD38抗體mAb2的結合結構域，以結合表現人或食蟹猴CD38多肽的細胞。如**圖6B-6D**所示，與mAb7不同，具有mAb2抗CD38抗原結合結構域的CD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$和CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$三特異性結合蛋白以及mAb2單特異性抗體能夠結合人和食蟹猴CD38多肽。具有mAb2抗CD38抗原結合結構域的CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$三特異性結合蛋白與表現人CD38的細胞結合，其表觀親和力比親本mAb2抗體低9倍(比較**圖6C**上圖，與**圖6D**上圖)。具有mAb2抗CD38抗原結合結構域的CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$三特異性結合蛋白與表現食蟹猴CD38的細胞結合，其表觀親和力比親本mAb2抗體低7.5倍(比較**圖6C**下圖，與**圖6D**下圖)。具有mAb2抗CD38抗原結合結構域的CD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$三特異性結合蛋白與表現人CD38的細胞結合，其表觀親和力比具有mAb2抗CD38抗原結合結構域的CD38xCD28$_{cvn}$xCD3$_{mid}$三特異性結

合蛋白低2.5倍(比較**圖6C**上圖，與**圖6B**上圖)。

還將人源化抗CD38抗體mAb6的結合結構域與mAb6單特異性抗體進行比較，以結合表現人或食蟹猴CD38多肽的細胞。雖然mAb6單特異性抗體與nM範圍內表現人(右上)或食蟹猴(右下)CD38多肽的細胞結合(**圖6E**)，但$CD38xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白與mAb6抗CD38抗原結合結構域結合表現人(左上)或食蟹猴(左下)CD38多肽的細胞而沒有飽和。

總之，發現$CD38_{SB19}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白與人CD38結合的親和力在相同的範圍內，無論是通過SPR檢測與重組人CD38的結合還是通過流式細胞術檢測在細胞表面上表現的人CD38(**圖6F**)。類似地，$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid/low}$ (mAb2抗CD38結合結構域)和$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid/low}$三特異性結合蛋白(mAb2抗CD38結合結構域)與人CD38結合的親和力在兩種測定中也在相同的範圍內。對於$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ (mAb6抗CD38結合結構域)，通過SPR測定結合人CD38的K_D為1 nM，而通過流式細胞術無法估計準確的EC50值。表M5中提供了具有多種抗CD38結合結構域的三特異性結合蛋白的表觀KD值(通過FACS分析獲得)的匯總。

表M5. 通過流式細胞術測定獲得的表觀KD值的匯總

	表觀KD FACS (M)	
	hCD38表現細胞	cCD38表現細胞
具有抗CD38	4.4 nM	7.5 nM

*mAb2*的三特異性		
具有抗CD38 mAb6的三特異性	不飽和	不飽和
具有抗CD38 mAb7的三特異性	4 nM	未結合
	表觀KD FACS (M)	
	hCD38表現細胞	*cCD38表現細胞*
mAb2	*0.5 nM*	*1 nM*
mAb6	*11.2 nM*	*6.6 nM*
mAb7	*0.5 nM*	*未結合*

如所預期的，缺乏抗CD38結合結構域的ΔCD38xCD28$_{sup}$xCD3$_{mid}$三特異性結合蛋白不與表現人或食蟹猴CD38多肽的細胞結合(**圖6G**)。這表明在該測定中觀察到的結合對CD38抗原結合結構域是特異性的。

實例5: 含抗CD38 mAb2和抗CD38 mAb6的三特異性結合蛋白的體外和體內表徵

以下實例描述了表徵含有衍生自mAb2和mAb6抗體的可變結構域的新型T

細胞接合物的穩定性、結合特性和活性的實驗。生成另外的抗CD38x CD28 x CD3抗體，其包含三特異性結合蛋白的抗CD38、CD3和CD28臂的變異體。新的抗CD38/CD3/CD28抗體的不同之處在於：1) 抗CD38結合結構域(mAb2或mAb6)；2) 抗CD3結合結構域($CD3_{high}$或$CD3_{low}$；參見，SEQ ID NO:84和85，分別用於抗$CD3_{low}$ VH和VL序列)；3) 抗CD28結合結構域($CD28_{sup}$或$CD28_{cvn}$)。在可能的組合中，設計、生產並隨後測試各種功能的抗CD38 x CD28 x CD3的集合。

材料和方法

三特異性結合蛋白的產生和純化

根據製造商的方案，使用ExpiFectamine™ 293轉染套組(Thermo Fisher Scientific)將4種表現質體瞬時轉染到Expi293細胞中，產生三特異性結合蛋白。簡言之，將25% (w/w)的每種質體稀釋到Opti-MEM中，與預稀釋的ExpiFectamine試劑在室溫(RT)混合20-30分鐘，並加入Expi293細胞($2.5x10^6$個細胞/ml)中。為了產生具有良好產率和純度的三特異性結合蛋白通常使用最佳轉染以確定質體的最佳比例。

轉染後4-5天，收集來自轉染細胞的上清液並通過0.45 μm過濾單元(Nalgene)過濾。使用3步法純化上清液中的三特異性結合蛋白。首先，使用蛋白A親和純化，並使用“IgG溶離緩衝液”(Thermo Fisher Scientific)溶離結合的Ab。其次，將產物用PBS(pH7.4)透析隔夜，用2次改變PBS緩衝液。在下一步驟之前，通過0.45μm過濾單元(Nalgene)過濾清除任何沈澱物。第三，使用尺寸排阻層析(SEC)純化(Hiload 16/600 Superdex 200pg，或Hiload 26/600 Superdex 200pg，GE Healthcare)除去製劑中的聚集體和不同物質。在還原和非還原SDS-PAGE上分析

級分，以在組合它們之前鑒定含有單體三特異性結合蛋白的級分。可以將純化的抗體等分並長期儲存在-80℃。

ELISA測定

使用ELISA或SPR方法分析純化的抗體的結合特性。對於ELISA，使用三特異性結合蛋白中每個結合位點的相應抗原以在4℃使用2μg/ml PBS中的每種抗原(pH7.4)包被96孔免疫板(Nunc 439454，Thermo Fisher Scientific)隔夜。使用PBS中的5%脫脂乳+2% BSA在室溫封閉包被的板1小時，然後用PBS+0.25% Tween 20洗滌三次(Aqua Max 400，Molecular Devices)。製備抗體的連續稀釋液(三特異性和對照抗體)並添加到ELISA板上(100μl/孔，一式兩份)，在室溫溫育1小時，然後用PBS+0.25% Tween 20洗滌5次。

洗滌後，將HRP綴合的第二抗人Fab(1:5000，目錄號109-035-097，Jackson ImmunoResearch Inc)添加至各孔中，並在室溫溫育30分鐘。用PBS+0.25% Tween 20洗滌5次後，向每個孔中添加100μl TMB微孔過氧化物酶受質(KPL，Gaithersburg，MD，USA)。通過添加50 μl 1M H_2SO_4終止反應，並使用SpectraMax M5(Molecular Devices)測量OD_{450}，並使用SoftMax Pro6.3軟體(Molecular Devices)分析。將最終數據轉移至GraphPad Prism軟體(GraphPad Software，CA，USA)，並如所示繪圖。使用相同的軟體計算EC50。

ELISA測定用於測定抗CD38xCD28xCD3三特異性抗體或同功異型物對照抗體(人IgG4)與人CD3(Cambridge Biologics LLC Cat#03-01-0051)、CD28(Cambridge Biologics LLC Cat#03-01-0303)和CD38 (Cambridge Biologics LLC Cat#03-01-0369)的結合。使用辣根過氧化物酶(HRP)綴合的抗Fab二抗

(Jackson ImmunoResearch Inc #109-035-097)檢測結合的抗體。

體外細胞殺傷測定

使用不同的三特異性結合蛋白，將純化的人PBMC用於針對多種癌細胞的體外殺傷測定。簡言之，將殺傷試驗設置在96孔V底板中。對於每個平板，來自每個供體的40 ml PBMC以2x10^6個細胞/ml鋪板，並且製備以2.5x10^5個細胞/ml (4μL染料染色至1x10^7個細胞)的30 ml的PKH26 (Sigma #MINI26)標記的靶細胞。首先將多種濃度的20μL/孔測試蛋白質或PMA添加到每個孔中，然後向每個孔中添加80μL/孔標記的靶細胞(2X10^4個細胞/孔)。然後向每個孔中添加100μL的PBMC，達到E:T = 10:1孔(2x10^5個細胞/孔)，並在37℃，5% CO2培養箱中溫育24小時。旋轉減慢細胞，並收集上清液用於測量細胞因子釋放，或丟棄。用Vivid LIVE/DEAD™可固定紫色死細胞染色緩衝液(Fixable Violet Dead Cell Staining buffer) (Life Technology #L34955)染色細胞(通過將60μL Vivid試劑添加到60ml PBS中製備染色緩衝液)。通過在室溫在黑暗中溫育15分鐘將細胞重懸浮於100μL染色緩衝液中。用1xPBS洗滌細胞後，將細胞重懸于含有0.5%第二甲醛的200μL PBS中，通過Fortessa流式細胞儀(Beckton Dickinson，San Jose，CA)收集PKH26+Vivid+癌細胞，然後使用Flowjo軟體進行分析。殺傷百分比計算為特異性殺傷-自發殺傷/總細胞，並如所示繪製。

細胞因子釋放測定

為了測量體外活化測定中的炎性細胞因子濃度，體外殺傷測定，CD34+臍帶細胞人源化NSG小鼠的體內活化測定，以及毒性研究，收集細胞培養上清液，

並根據製造商的方案使用Milliplex Human High Sensitivity T cell 13-plex套組(EMD Millipore)稀釋血清樣品。隨後通過EMD Millipore MAGPIX®系統和MILLIPLEX® Analyst 5.1軟體對此等進行分析。

體內小鼠模型和功效研究

人CD34+造血幹細胞移植的NSG小鼠(hu-CD34)用作體內小鼠模型。此等小鼠產生多譜系人免疫細胞，並且是用於免疫腫瘤學功效研究的有效平臺(參見，例如，Shultz, L.D. *et al.* (2014) *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014:694-708)。通過注射CD34+造血幹細胞產生Hu-CD34$^+$ NSG小鼠，顯示包括T細胞、B細胞和一些其他群體的人免疫細胞群體的有效多譜系植入(McDermott, S.P. *et al.* (2010) *Blood* 116:193-200)。多譜系造血發生在12周內。植入穩定超過一年而沒有移植物抗主體病。

對於使用hu-CD34 NSG小鼠的功效研究，小鼠購自The Jackson Laboratory (Maine, USA)，並且在使用前驗證人細胞群體。一般而言，在基質膠(BD Biosciences) (50% v/v)中混合的5x10^{6}個腫瘤細胞用於接種每只小鼠的腫瘤。一旦腫瘤大小達到100-150 mm^{3}的範圍，選擇小鼠並隨機分到各組進行研究。每週3次以給定劑量靜脈內給予抗體。每週監測體重1-3次。通過卡尺腫瘤測量1-3次/周測量腫瘤大小。當腫瘤大小達到1,500 mm^{3}時，或最後一次給藥後24小時，終止所有小鼠。將末端血液樣品(0.3mL)收集到血清單離管中，通過輕輕倒置五次混合，並置於管架中。末端腫瘤還在置入固定劑中用於免疫組織化學分析前收集並稱重。

人PBMC人源化(hu-PBMC)NSG小鼠用作另一種體內小鼠模型。此等小鼠是

通過從健康供體注射純化的人PBMC產生的，其使用成人外周血單核細胞具有最快的植入率並且能夠進行需要強效效應和記憶T細胞和NK細胞功能的短期研究，並且適合於由移植物抗主體病引起的短期功效研究(3-4周)。

對於使用hu-PBMC NSG小鼠的功效研究，8-10周齡NSG小鼠(目錄號: 005557, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)購自The Jackson Laboratory (Maine，USA)。用在基質膠(BD Biosciences) (50% v/v)中混合的5x10^6個腫瘤細胞皮下接種每只小鼠。一旦腫瘤大小達到50-100 mm^3的範圍，就將來自健康供體的10x10^6個人PBMC腹膜內(IP)重建至每只小鼠。第二天驗證人細胞重建。一旦腫瘤大小達到100-150 mm^3的範圍，選擇小鼠並隨機分到各組進行研究。每週3次以給定劑量靜脈內給予抗體。每週監測體重1-3次。通過卡尺腫瘤測量1-3次/周測量腫瘤大小。當腫瘤大小達到1,500 mm^3時或最後一次給藥後24小時，終止所有小鼠。將末端血液樣品(0.3mL)收集到血清單離管中，通過輕輕倒置五次混合，並置於管架中。收集末端腫瘤並稱重，然後置於固定劑中用於免疫組織化學分析。

對於播散的hu-PMBC NSG小鼠模型，1-5x10^6個細胞在第0天靜脈內注射至各小鼠。在第3天，進行基線亮度成像用於隨機化。在第4天，將來自健康供體的10x10^6個人PBMC腹膜內(IP)重建至每只小鼠。使用指定劑量在第5、12、19天每週處理小鼠。在第10、17、24天進行每週亮度身體成像，以監測每只動物的腫瘤體積。在研究結束時，收集血液、脾臟、骨骼和骨髓用於組織病理學研究。

結果

通過ELISA測定測試抗體結合所有三種靶抗原的能力。$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{low}$ IgG4、

$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{low}$ IgG4顯示出與人和猴CD3和CD38相似的結合親和力，但對具有$CD28_{sup}$的CD28(人和猴具有相同的胞外域)的可變結合親和力顯示出更好的親和力(**圖7A**)。$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$和$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA變異體以及IgG1 LALA P329A和NNAS變異體均顯示出與人CD3、CD28和CD38類似的結合(**圖7B**)。

接下來，測試三特異性抗CD38xCD3xCD28結合蛋白變異體誘導T細胞活化和抗體介導的腫瘤細胞殺傷的能力(**圖8A-8D**)。**圖8A**顯示使用來自3個不同供體的PBMC在E:T=10下對人多發性骨髓瘤細胞株RPMI-8226的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4的體外殺傷活性。計算殺傷活性的EC50並匯總在表N中。含有$CD28_{sup}$的抗CD38xCD3xCD28三特異性結合蛋白均顯示出更好的殺傷活性。還使用NCI-H929 (**圖8B**)、KMS-26 (**圖8C**)和KMS-11細胞株(**圖8D**)檢查了此等分子的體外殺傷活性。

具有IgG1 LALA P329A和NNAS變異體或IgG4 FALA變異體的抗CD38x抗CD3x抗CD28三特異性結合蛋白也顯示體外殺傷多發性骨髓瘤KMS-11(**圖8E**)和U266(**圖8F**)細胞。計算每種抗體針對每種細胞株的EC50，並匯總於表Q2(KMS-11)和Q3(U266)中。

圖9A、9B和10顯示$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4和$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{low}$ IgG4的體外T細胞活化譜。兩種抗體均顯示出對CD4和CD8 T細胞的類似激活活性。計算每種抗體針對每種細胞株的EC50，並匯總於表N(RPMI-8226)、表O(NCI-H929)、表P(KMS-26)和表Q(KMS-11)中。

表N:來自不同供體的PBMC的抗體介導的CD38+ RPMI8266細胞的特異性殺傷

抗體	EC50 (ng/ml)		
	供體#65	供體#67	供體#68
$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	5.30	1.95	3.3
$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	2.24	3.42	3.4
$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	8.31	29.52	46.8
$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	4.62	8.98	16.5

表O:來自不同供體的PBMC的抗體介導的CD38+ NCI-H929細胞的特異性殺傷

	EC50 (ng/ml)		
	供體#65	供體#67	供體#68
$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	0.51	0.48	0.9
$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	0.94	1.84	2.5
$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	3.70	9.47	10.4
$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	2.31	6.39	7.2

表P:來自不同供體的PBMC的抗體介導的CD38+ KMS-26細胞的特異性殺傷

	EC50 (ng/ml)		
	供體#65	供體#67	供體#68
$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	1.03	0.91	1.3
$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	3.95	5.06	5.3
$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	10.73	28.17	22.4
$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	15.84	32.10	25.7

表Q:來自不同供體的PBMC的抗體介導的CD38+ KMS-11細胞的特異性殺傷

	EC50 (ng/ml)		
	供體#65	供體#67	供體#68
$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	3.05	3.40	14.7
$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4	4.17	7.74	25.1
$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	18.14	98.83	566.8
$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4	16.30	27.63	139.2

表Q2:來自不同供體的PBMC的抗體介導的CD38+ KMS-11細胞特異性殺傷(IgG1/4變異體Fc)

EC50 (pM) (KMS11)	**$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA**	**$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG1 LALA P329A**	**$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG1 NNAS**	**$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mi}$ IgG4 FALA**	**$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mi}$ IgG1 LALA P329A**	**$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mi}$ IgG1 NNAS**
KP50901	3.879	4.375	4.411	7.731	9.311	17.71
KP50904	4.379	6.739	8.644	19.01	18.88	24.39

表Q3:來自不同供體的PBMC的抗體介導的CD38+ U266細胞特異性殺傷(IgG1/4變異體Fc)

EC50 (pM) (U266)	**$CD38_{VH1}$ x$CD28_{sup}$ x$CD3_{mid}$ IgG4 FALA**	**$CD38_{VH1}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$ IgG1 LALA P329A**	**$CD38_{VH1}$ x$CD28_{sup}$ x$CD3_{mid}$ IgG1 NNAS**	**$CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$ x$CD3_{mi}$ IgG4 FALA**	**$CD38_{hhy1370}$ x$CD28_{sup}$x$CD3_{mi}$ IgG1 LALA P329A**	**$CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$ x$CD3_{mi}$ IgG1 NNAS**
KP50901	1.879	1.031	1.150	2.691	1.597	2.816
KP50904	0.8657	3.570	2.018	2.112	0.8375	3.527

還通過用指定的抗體包被平板使用Stebbings, R. *et al.* (2007) (*J. Immunol.* 179:3325-3331)中所述的方法，然後使用2種濃度的測試抗體(5μg/ml和25ng/ml)通過與人PBMC一起溫育24小時，檢查了由三特異性結合蛋白變異體誘導的細胞因子產生(**圖11A和11B**)。收集24小時培養物上清液並用於測量上述上清液中的IL2、IL6、IL10、IL12和TNF-α、IFN-γ濃度。$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4、$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4均以5μg/ml刺激產生顯著水準的IL2、TNF-α和IFN-γ，但未能以25 ng/ml誘導任何細胞因子的可測量水準，劑量顯示2種人源化NSG小鼠模型的體內功效。

如上所述，針對三特異性結合蛋白變異體(**圖12A-13F**)測試體內小鼠模型的抗腫瘤活性。**圖12A-12E**顯示了使用植入人MM細胞株RPMI-8226的人CD34+造血幹細胞移植的NSG小鼠(hu-CD34)模型的體內功效研究的結果。$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4和基準(bench marker)對照CD38xCD3雙特異性抗體用於以指定劑量3QW(總共6個劑量)治療具有腫瘤的小鼠。測量每只小鼠的體

重和腫瘤生長並繪圖(**圖12A和12E**)。還繪製了每組的平均腫瘤生長曲線(**圖12D**)，第18天腫瘤體積(**圖12B**)和D19終末腫瘤重量(**圖12C**)。與PBS對照相比，用$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4處理的所有組不僅顯示統計功效，而且與對照CD38xCD3雙特異性抗體相比，在1μg/kg劑量也顯示出統計學上更好的功效。

圖13A-13F顯示了使用植入人MM細胞株RPMI-8226的人PBMC人源化NSG小鼠模型的體內功效研究的結果。$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4和基準對照CD38xCD3雙特異性抗體用於以指定劑量3QW(總共8個劑量)治療具有腫瘤的小鼠。測量每只小鼠的腫瘤生長並作圖(**圖13A**)。還繪製了每組的平均腫瘤生長曲線(**圖13F**)，第4天腫瘤體積(開始治療的那天; **圖13B**)，第21天腫瘤體積(最後一次治療的那天; **圖13C**)，第21天平均腫瘤體積(**圖13D**)和第22天終末腫瘤重量(**圖13E**)。與PBS對照相比，用$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4處理的所有組不僅顯示出統計功效，而且與對照CD38xCD3雙特異性抗體相比，顯示出在多劑量下統計學上更好的效力，這表明三特異性抗CD38/CD3/CD28抗體具有優異的體內抗腫瘤活性。

基準對照CD38xCD3雙特異性抗體包含以下序列：

SEQ ID NO 108：基準重鏈1(結合CD38)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAPGKGLEWVSEI
NPQSSTINYATSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGNWFP
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
DVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQ
GDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 109：基準重鏈2 (結合CD3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRI
RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG
NFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVP
ARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKS
SDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 110：基準輕鏈(結合CD38)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNVDTWVAWYQQKPGQSPKALIYSAS
YRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDSYPLTFGGGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

實例6：用抗CD38 mAb2和含mAb6的三特異性結合蛋白的劑量遞增研究

材料和方法

所有NHP研究均由Covance (Princeton, New Jersey, USA)根據Covance ICUCA方案進行。在所有研究中使用未經藥物和蛋白質或未經蛋白質處理的雄性食蟹猴(Cynomolgus Monkeys)。基於研究設計，選擇猴並對每種三特異性結合蛋白進行分組。經由隱靜脈靜脈輸注給予抗體1小時。對於低劑量(<10μg/kg)，連續幾天給予增加的劑量，但是為了觀察目的，對於更高劑量(>10μg/kg)具有1-2天的間隔。如所指出的，在每次劑量後所有動物的輸注開始後0小時(僅第1天)、0.5小時(中間輸注)、1小時和6小時收集血液樣品。根據研究主任、病理學家和/或臨床獸醫的判斷，收集了額外的計劃外血液樣本。在第60天將所有動物放回集群中。使用標準方法製備來自血液樣品的PBMC和血清，並保存用於將來的分析。

來自經處理的非人靈長類動物的血液用針對T細胞標記和人IgG，Fcγ片段的熒光綴合抗體染色，並在流式細胞儀上分析。

結果

使用含有mAb2的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4，含有mAb6的$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4，含有mAb2的$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4和含有mAb6的$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4三特異性結合蛋白的劑量遞增毒性研究在非人靈長類動物中進行。4種結合蛋白中的所有三個結合結構域與食蟹猴CD38/CD3/CD28多肽交叉反應。該研究旨在評估分子的潛在毒性特徵。收集血樣用於血清和PBMC單離。在每次給藥後研究循環T細胞群(**圖14E-14H**)，以及T細胞亞群活化(CD69+)(**圖14A-14D**)。隨著劑量遞增，循環中CD4和CD8 T細

胞的百分比降低。從2.5μg/kg劑量開始，顯著的CD4和CD8 T細胞活化是顯著的，表明對含mAb2和mAb6的分子具有有效的活化能力。用12.5μg/kg的所有蛋白質可見顯著的循環T細胞缺失(**圖14I-14L**)，再次與效力相關。循環T細胞的消耗是相當短暫的，在24-48小時後恢復預處理水準(**圖14M-14P**)。還測量了幾種細胞因子的血清水準。在12.5μg/kg觀察到顯著的IL-6和IL-10釋放，所有分子相當短暫，在24小時返回基線(**圖14U**)。

$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 (**圖14V**)和$CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4 (**圖14W**)均以較高劑量誘導血液中T細胞的消耗。類似地，$CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 (**圖14X**)和$CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}$ IgG4 (**圖14Y**)也在較高劑量下誘導血液中T細胞的消耗。然而，在用四種三特異性結合蛋白中的任何一種處理後24小時，T細胞開始重新出現在血液中(**圖14Z-14AC**)。**圖14AD和14AE**顯示投予100μg/kg劑量後與CD4+ T細胞結合的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4的量。**圖14AF和14AG**顯示投予100μg/kg劑量後與CD8+ T細胞結合的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4的量。此等數據清楚地證明，三特異性Ab $CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4可以在延長的時間(48-72小時)內在體內與T細胞結合。

實例7：通過Fc變異體優化藥代動力學/藥力學

材料和方法

將C末端6-His標記的重組人Fcγ RI (R&D系統＃1257-FC-050)、C末端帶10-His標簽的重組人Fcγ RIIA (R&D系統#1330-CD-050/CF)和C末端帶HPC4標簽的重組人FcγRIII(V158或F158)捕獲至Biacore晶片。注射200、100和50nM的抗體

2分鐘，然後使用Biacore 200以30μL/min的流速在HBS-P+、2mM CaCl2 pH 7.4緩衝液中解離2分鐘。顯示在200nM的結合曲線。

使用C末端帶HPC4標簽的重組人新生兒Fc受體(FcRn)的ELISA測定用於測量具有不同Fc修飾的三特異性結合蛋白的結合特性。簡言之，將重組人新生兒Fc受體(FcRn)用於包被ELISA板(Nunc 80040LE)(PBS中2μg/ml)隔夜。將具有不同Fc修飾的連續稀釋的三特異性結合蛋白添加到每個孔中，並在室溫溫育1小時，然後洗滌並用HRP標記的抗人IgG二抗溫育。

結果

接著測定上述三特異性結合蛋白的變異體與多種Fc受體的結合，以優化藥代動力學(PK)/藥力學(PD)。

如上所述，表徵人Fc變異體與FcγR I (**圖15A**)、FcγR IIa (**圖15B**)和FcγR IIIb/c (**圖15C**)的結合。測試的變異體是人IgG1、人IgG4和具有FALA突變的人IgG4(根據EU Index的F234A和L235A)，具有對照三特異性結合蛋白。

如圖**15A-15C**所示，野生型IgG1和IgG4能夠結合FcγR I和FcγR IIa，而不能結合FcγR IIIb/c，如先前報道的。IgG4 FALA突變消除了FcγR I和FcγR IIa結合。在不希望受理論束縛的情況下，認為消除FcγR I和FcγR IIa結合可通過去除通過Fc/FcγR交互作用的非預期聚類來改善PK/PD。

接下來，檢查IgG4 FALA變異體的結合FcRn。變異體以及野生型IgG4與FcRn結合(**圖16**)。此等結果證明IgG4 FALA突變不影響IgG4 Fc和FcRn之間的交互作用，暗示對結合蛋白半衰期的影響最小。

如在NSG小鼠中測定的，$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4、

$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA、$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG1 LALA P329A和$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA的PK參數匯總於**圖17**中。通過消除與巨噬細胞中豐富的NSG特異性FcγRI的結合，IgG4 Fc修飾在NSG小鼠中顯示出顯著改善的半衰期和AUC。

實例8:抗CD38三特異性結合蛋白的體外活化和體內抗腫瘤功效

材料和方法

細胞因子從人PBMC中釋放

將人PMBC與100pM的結合蛋白一起溫育24小時。收集上清液，並使用Drop Array板(一式三份)通過Luminex測量細胞因子。對於使用腫瘤靶細胞的實驗，將人PMBC與100pM的抗體一起溫育，並且與或不與RPMI-8226靶細胞以10:1 E:T比例溫育24小時。在PMBC與三特異性蛋白溫育後收集上清液，並用MILLIPLEX® MAP套組測定細胞因子，並在MAGPIX®系統上分析。

Bcl-xL測定

將來自PBMC(磁性)的陰性分選的T細胞與100nM平板結合的Ab一起溫育1天。然後洗滌T細胞並用對T細胞標記和Bcl-xL特異性的熒光綴合的抗體染色，並在流式細胞儀上分析。

T細胞增生

將來自PBMC的陰性分選的T細胞(磁珠細胞單離)與平板結合的Ab (100nM)一起溫育1至6天。在溫育開始後的特定天數使用計數珠子通過流式細胞術計數

總細胞。從第0天細胞計數(500個細胞/uL)計算倍數變化。來自3名PBMC供體的結果。

IL-2表現

將GloResponse™ IL2-luc2P Jurkat細胞與三特異性蛋白一起溫育6小時，然後使用Bio-Glo™熒光素酶測定系統檢測熒光素酶報告基因表現。

PBMC體外活化

測定用抗CD38xCD28xCD3三特異性抗體或對照IgG4結合蛋白處理的人PBMC細胞的活化($CD69^+$)。

在播散性腫瘤模型中的體內功效

對於播散性hu-PMBC NSG小鼠模型，在第0天將1-5×10^6個細胞靜脈內注射到每個小鼠中。在第3天，進行基線亮度成像用於隨機化。在第4天，將來自健康供體的10x10^6個人PBMC腹膜內(IP)重組至每只小鼠。使用指定劑量在第5、12、19天每週處理小鼠。在第10、17、24天進行每週亮度身體成像，以監測每只動物的腫瘤體積。在研究結束時，收集血液、脾臟、骨骼和骨髓用於組織病理學研究。

結果

與具有野生型Fc區(**圖18A**)的類似結合蛋白相比，含有mAb2的抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白與IgG4 FALA變異體Fc區在人PBMC中引起顯著

降低的非特異性IFN-γ釋放水準。隨著IL-2(**圖18B**)和TNF-α(**圖18C**)的釋放觀察到類似的結果。重要的是，此等Fc變異體三特異性結合蛋白的細胞因子釋放顯著低於基準雙特異性抗CD38x抗CD3雙特異性抗體。此等結果暗示，由於非特異性細胞因子釋放的減少，三特異性結合蛋白與Fc變異體的安全性得到改善。

含有mAb2的$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$和含有mAb6的$CD38_{HH71370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$的IgG1和IgG4 Fc變異體也導致人PBMC的體外活化(**圖18D**)。

通過連接CD28進行免疫共刺激是T細胞存活和增生所必需的;單獨的TCR信號傳導不會導致T細胞增生(Sharmee and Allison (2015) *Science* 348:56-61)。三特異性結合蛋白$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$導致CD4+和CD8+ T細胞中Bcl-xL的誘導，而去除CD28或CD3抗原結合結構域消除了這種效應(**圖19A和19B**)。如所預期的，此等結果證明CD3和CD28結合臂是在T細胞中抗CD38三特異性結合蛋白誘導Bcl-xL所需的，由此向T細胞遞送促存活信號。三特異性結合蛋白的抗CD28臂對於T細胞中促存活Bcl-xL的上調是至關重要的。當與基準抗CD38x抗CD3雙特異性抗體比較時，$CD38_{VH1}xCD28xCD3$三特異性結合蛋白導致CD4+和CD8+ T細胞中Bcl-xL的更大上調(**圖19C和19D**)。

為了確定$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性結合蛋白對T細胞活化的主要驅動因子，使用Jurkat T細胞報告基因Jurkat系中含有人IL2啟動子驅動熒光素酶報告基因的IL-2表現來測量活化。抗CD3結合結構域的敲除突變導致T細胞活化的消除，證明了T細胞活化是CD3連接的特異性作用(**圖19E**)。此等結果表明，抗CD3是三特異性結合蛋白活化T細胞的主要驅動因子，抗CD28也對T細胞活化信號有顯著貢獻。還使用人PBMC檢查細胞因子釋放的主要驅動因子(**圖19F**)。通

過檢測TNF、IFNg、IL-2、IL-6和IL-10的釋放，發現CD3是細胞因子釋放的主要決定因素。發現CD28的貢獻最小。還發現具有抗$CD38_{VH1}$的三特異性結合蛋白比基準比較物誘導更少的細胞因子釋放。

還檢查了T細胞增生。使用具有IgG4 FALA變異體Fc的抗CD38x抗CD28x抗CD3三特異性結合蛋白活化T細胞導致比基準或同功異型物對照更大的增生(**圖19G**)。在抗CD28或抗CD3抗原結合結構域突變時，這種活化減少(**圖20**)。

接下來將人源化NSG小鼠模型用於體內實體瘤生長實驗。在第6-8周用RPMI8226人骨髓瘤細胞植入小鼠。在第9周，通過ip注射引入人PBMC，重構hPBMC，並在第10-13周投予抗腫瘤治療。將56只PBMC人源化NSG雌性小鼠在50%基質膠中植入500萬個RPMI8226細胞，並選擇小鼠並在植入後第5或6天隨機進入研究中。該模型用作具有人成熟T細胞的小鼠的體內腫瘤模型。

還使用NCI-H929-Luc人骨髓瘤細胞和通過生物發光測定腫瘤生長，在播散性腫瘤生長的NSG小鼠模型中測定三特異性結合蛋白。具有IgG4 FALA Fc變異體的$CD38_{VH1}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$三特異性結合蛋白在30μg/kg的該播散性腫瘤模型中顯示出統計學上顯著的劑量依賴性抗腫瘤功效(**圖21**)。具有IgG4 FALA Fc變異體的$CD38_{HHY1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$三特異性結合蛋白在30μg/kg和10μg/kg的該播散性腫瘤模型中也顯示出統計學上顯著的劑量依賴性抗腫瘤功效(**圖22**)。

三特異性結合蛋白，含mAb2的$CD38_{VH1}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$ IgG4 FALA和含mAb6的$CD38_{hhy1370}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$ IgG4 FALA，顯示使用來自兩個供體的人源化NSG小鼠的人PBMC殺死針對NCI-H929-Luc骨髓瘤細胞的有效體外腫瘤殺傷活性(**圖23A&23B**)。與基準雙特異性抗體相比，$CD38_{VH1}$x$CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$ IgG4 FALA三特異性結合蛋白在播散性腫瘤模型中顯示出優異的體內腫瘤活性(**圖**

23C)。如下確定與媒劑對照(PBS)比較的P值：$CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA: p=0.0023；$CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}$ IgG4 FALA: p=0.0088；基準雙特異性CD38xCD3 Fab-scFv-Fc: p=0.6045。

總之，此等結果證明具有變異體Fc區的改進的抗CD38候選物顯示出增加的半衰期、減少的非特異性細胞因子釋放和更高的體內抗腫瘤功效。

實例9:抗CD38三特異性結合蛋白的進一步表徵

圖24顯示使用GloResponse™ IL2-luc2P Jurkat細胞(Promega)在10nM濃度的$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$及其單一結合位點KO和三重KO突變體刺激後進行的熒光素酶報告基因測定。此等數據說明了CD28對T細胞刺激(例如，NFAT信號傳導)的貢獻。

圖25顯示由$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$誘導的初級T細胞中Bcl-2家族成員Bcl-xL的上調是CD28依賴性的。此等數據說明了CD28對T細胞存活的貢獻。

圖26顯示三特異性Ab中的抗CD28提供了在體外支持初級T細胞增生所必需的二級信號傳導。此等數據說明了CD28對T細胞增生的貢獻。

總之，此等數據顯示$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性抗體中的抗$CD28_{sup}$在體外T細胞活化、存活和增生中提供了顯著的功能。

圖27顯示了由親本抗體編碼的三特異性抗體的組態。還顯示了基於抗CD38 VH1 Fab和$CD28_{sup}/CD3_{mid}$ CODV Fab (右圖)的晶體結構獲得的$CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}$三特異性Ab的結構模型。

圖28A和28B顯示具有高(RPMI-8226;**圖28A**)和低(KMS-11;**圖28B**)CD38表面表現的多發性骨髓瘤(MM)細胞被用各種濃度的三特異性Ab溫育的人PBMC

(E:T = 10:1)有效裂解。通過結合位點KO突變證明了每個結合位點對殺傷活性的貢獻。此等數據表明CD38三特異性抗體通過識別CD38和CD28裂解人MM細胞。在多發性骨髓瘤細胞上表現的CD28通過$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體提供二級靶標，顯著增強其殺傷活性。

圖29A-29C顯示三特異性Ab的抗$CD28_{sup}$KO突變體在體外對$CD38_{high}$、$CD38_{mid}$和$CD38_{low}$ MM細胞顯示出顯著降低的抗腫瘤活性。所顯示的是使用RPMI-8226(**圖29A**)、U266(**圖29B**)或KMS-11(**圖29C**)細胞的測定。MM細胞上的CD28表現增加了它們對CD38三特異性抗體介導的細胞溶解的易感性。

圖30顯示使用用體外擴增的人初級T細胞重構的NSG小鼠在播散性人多發性骨髓瘤細胞株模型中的體內功效研究的結果。$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體治療組中腫瘤負荷的減少是劑量依賴性的並且在統計學上是不同的。因此，CD38三特異性抗體賦予對體內播散性人MM細胞腫瘤生長的保護。

顯微鏡研究進一步證明了體外由三特異性抗體介導的初級人T細胞對癌細胞的殺傷作用。**圖31A和31B**顯示了顯示由$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體介導的人PBMC裂解的RPMI-8226(人MM細胞，用CellTracker深紅色染料標記)的顯微圖像。**圖31A**顯示了對照，而**圖31B**顯示了由$CD38_{VH1}$/ $CD28_{sup}$x$CD3_{mid}$_FALA三特異性抗體介導的裂解。使用10:1 E:T比例溫育24小時。此等數據表明CD38/CD3xCD28三特異性抗體通過T細胞介導骨髓瘤細胞的細胞溶解。

儘管本公開包括多種實施例，但應理解，熟習此項技術者會想到變化和修改。因此，意圖是所附申請專利範圍覆蓋落入本公開範圍內的所有此等等同變化。另外，這裡使用的章節標題僅用於組織目的，不應解釋為限制所述主題。

除非明確地相反指出，否則本文所述的每個實施例可以與任何其他一個或多個實施例組合。特別地，除非明確地相反指出，否則被指示為較佳或有利的任何特徵或實施例可以與被指示為較佳或有利的任何其他一個或多個特徵或實施例組合。

本申請中引用的所有參考文獻通過提述明確併入本文。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

【序列表】

<110> 法商賽諾菲公司(SANOFI)

<120> 抗CD38抗體及其使用方法

<130> TW 107135898

<140>
<141>

<150> US 62/570,655
<151> 2017-10-10

<150> US 62/570,660
<151> 2017-10-11

<150> US 62/676,221
<151> 2018-05-24

<150> EP 18187186.4
<151> 2018-08-03

<160> 110

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 256
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> CD38胞外域 (同功異型物A)

<400> 1

```
Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
 1               5                  10                  15
Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
            20                  25                  30
Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
        35                  40                  45
Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
    50                  55                  60
Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65                  70                  75                  80
Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
                85                  90                  95
Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
```

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

<210> 2
<211> 265
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 在C末端含有histag的CD38胞外域

<400> 2

```
Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
 1               5                  10                  15
Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
            20                  25                  30
Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
        35                  40                  45
Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
    50                  55                  60
Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65                  70                  75                  80
Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
                85                  90                  95
Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
            100                 105                 110
Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser
        115                 120                 125
Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
    130                 135                 140
Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val
145                 150                 155                 160
```

His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser
165 170 175
Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln
180 185 190
Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp
195 200 205
Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys
210 215 220
Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe
225 230 235 240
Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
245 250 255
Ser Ala Ser His His His His His His
260 265

<210> 3
<211> 485
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 在C末端融合人Fc結構域的CD38胞外域

<400> 3
Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
1 5 10 15
Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
20 25 30
Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
35 40 45
Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
50 55 60
Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65 70 75 80
Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
85 90 95
Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
100 105 110
Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser
115 120 125
Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
130 135 140
Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val
145 150 155 160
His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser
165 170 175
Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln
180 185 190
Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp

195 200 205
Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys
210 215 220
Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe
225 230 235 240
Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
245 250 255
Gly Ala Leu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
260 265 270
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
275 280 285
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
290 295 300
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
305 310 315 320
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
325 330 335
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
340 345 350
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
355 360 365
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
370 375 380
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
385 390 395 400
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
405 410 415
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
420 425 430
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
435 440 445
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
450 455 460
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
465 470 475 480
Ser Leu Ser Pro Gly
485

<210> 4
<211> 265
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<220>
<223> 在C末端含有histag的CD38胞外域

<400> 4
Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro
1 5 10 15

Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu
            20   25   30
Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
        35   40   45
Phe Ile Ser Lys Tyr Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
    50   55   60
Leu Val Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Thr Leu Leu
65   70   75   80
Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
                85   90   95
Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Met Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
            100   105   110
Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Phe Glu Ile Asn Tyr Gln Ser
        115   120   125
Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
    130   135   140
Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val
145   150   155   160
His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser
                165   170   175
Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln
            180   185   190
Ala Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp
        195   200   205
Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys
    210   215   220
Arg Asn Ile Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe
225   230   235   240
Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile
                245   250   255
Ser Ala Ser His His His His His His
            260   265

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1的VH胺基序列

<400> 5
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
            20   25   30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1的VL胺基序列

<400> 6
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1的HC胺基序列

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

```
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
225                 230                 235                 240
Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
```

435 440 445
Gly

<210> 8
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1的LC胺基序列

<400> 8
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> mAb6的VH胺基序列

<400> 9
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6的VL胺基序列

<400> 10
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
            20   25   30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105

<210> 11
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6的HC胺基序列

<400> 11

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val
225                 230                 235                 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
```

```
        355                 360                 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
```

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6的LC胺基序列

<400> 12

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

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2的VH1胺基序列

<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2的VL1胺基序列

<400> 14
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Gln Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95

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

<210> 15
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2的HC1胺基序列

<400> 15
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
225 230 235 240
Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 16
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2的LC1胺基序列

<400> 16
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Gln Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb3的VH3胺基序列

<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb3及mAb4及mAb5的VL3胺基序列

<400> 18
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb3的HC3胺基序列

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

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

<210> 20
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb3及mAb4及mAb5的LC3胺基序列

<400> 20
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb4的VH5胺基序列

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Ser Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb4的CH5胺基序列

<400> 22

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Ser	Gly	Ala
1				5					10						15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Phe
			20					25					30		
Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Glu	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Thr	Gly	Gly	Leu	Arg	Arg	Ala	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115					120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170					175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
		195					200					205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210					215					220				
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly
225					230					235					240
Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290					295					300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Glu
				325					330					335	

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb5的VH6胺基序列

<400> 23
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb5的HC6胺基序列

<400> 24

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
            20                  25                  30
Asn Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly
225                 230                 235                 240
Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
Gly
```

<210> 25
<400> 25
000

<210> 26
<400> 26
000

<210> 27
<400> 27
000

<210> 28
<400> 28
000

<210> 29
<400> 29
000

<210> 30
<211> 256
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<220>
<223> CD38胞外域

<400> 30

```
Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro
 1               5                  10                  15
Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu
```

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

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-H1

<400> 31
```
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Asn
 1               5
```

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-H2

<400> 32
Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr
 1   5

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1/mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-H3

<400> 33
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr
 1   5   10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-L1

<400> 34
Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Gly Phe
 1   5   10

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-L2

<400> 35
Leu Ala Ser
 1

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb1/mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 CDR-L3

<400> 36
Gln Gln Asn Lys Glu Asp Pro Trp Thr
 1   5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2 CDR-H1

<400> 37
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala
 1   5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2 CDR-H2

<400> 38
Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr
 1   5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2 CDR-L1

<400> 39
Gln Ser Val Ser Ser Tyr Gly Gln Gly Phe
 1   5   10

<210> 40
<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2 CDR-L2

<400> 40
Gly Ala Ser
 1

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 CDR-H1

<400> 41
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1   5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 CDR-H2

<400> 42
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1   5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 CDR-H3

<400> 43
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
 1   5   10

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 CDR-L1

<400> 44
Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1   5

<210> 45
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 CDR-L2

<400> 45
Ala Ala Ser
 1

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 CDR-L3

<400> 46
Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro Thr
 1   5

<210> 47
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb7 VH結構域

<400> 47
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1   5   10   15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb7 VL結構域

<400> 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD28sup VH結構域

<400> 49

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys
            100                 105                 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD28sup VL結構域

<400> 50

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD28cvn VH結構域

<400> 51
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD28cvn VL結構域

<400> 52
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asn Asp Val Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3mid VH結構域

<400> 53
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala
            20   25   30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50   55   60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65   70   75   80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85   90   95
Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
            100   105   110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3mid VL結構域

<400> 54
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1   5   10   15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
            20   25   30
Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35   40   45
Pro Gln Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50   55   60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65   70   75   80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
                85   90   95
Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105   110

<210> 55
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 55
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 56
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10   15

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 57
Thr Lys Gly Pro Ser
 1   5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 58
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 1   5

<210> 59

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 59
Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Gly
 1   5   10

<210> 60
<211> 570
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG4(臼) FALA重鏈1多肽序列

<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20   25   30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35   40   45
Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50   55   60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys
            100   105   110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
        115   120   125
Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
    130   135   140
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met His Trp Val Arg Gln
145   150   155   160
Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser
                165   170   175
Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
            180   185   190
Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
        195   200   205
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr
    210   215   220
Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

225 230 235 240
Ser Ser Arg Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
245 250 255
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
260 265 270
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
275 280 285
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
290 295 300
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305 310 315 320
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
325 330 335
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
340 345 350
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
355 360 365
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
370 375 380
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
385 390 395 400
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
405 410 415
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
420 425 430
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
435 440 445
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
450 455 460
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
465 470 475 480
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
485 490 495
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
500 505 510
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
515 520 525
Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
530 535 540
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
545 550 555 560
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 61
<211> 338
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid輕鏈1多肽序列

<400> 61

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
            20                  25                  30
Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Gln Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
                85                  90                  95
Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
        115                 120                 125
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala
    130                 135                 140
Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
145                 150                 155                 160
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly
                165                 170                 175
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
            180                 185                 190
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
        195                 200                 205
Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
    210                 215                 220
Ile Lys Thr Lys Gly Pro Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
                245                 250                 255
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
            260                 265                 270
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
        275                 280                 285
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
    290                 295                 300
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
305                 310                 315                 320
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
                325                 330                 335
Glu Cys
```

<210> 62
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1 IgG4(杵) FALA重鏈2多肽序列

<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 63
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1輕鏈2多肽序列

<400> 63
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Gln Gly Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Lys
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 64
<211> 573
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG1(臼) LALA P329A重鏈1多肽序列

<400> 64
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met His Trp Val Arg Gln
145 150 155 160
Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser
165 170 175
Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190
Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr
210 215 220
Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240
Ser Ser Arg Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
245 250 255
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
260 265 270
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

275 280 285
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
290 295 300
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305 310 315 320
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
325 330 335
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
340 345 350
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
370 375 380
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
385 390 395 400
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
405 410 415
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
420 425 430
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
435 440 445
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
450 455 460
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
465 470 475 480
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
485 490 495
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
500 505 510
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
515 520 525
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
530 535 540
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545 550 555 560
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

<210> 65
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2多肽序列

<400> 65
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 66
<211> 573
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG1(臼) NNSA重鏈1多肽序列

<400> 66
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met His Trp Val Arg Gln
145 150 155 160
Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser
165 170 175
Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190
Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr
210 215 220
Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240
Ser Ser Arg Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
245 250 255
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

```
            260                 265                 270
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
        275                 280                 285
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
    290                 295                 300
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305                 310                 315                 320
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
                325                 330                 335
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            340                 345                 350
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
    370                 375                 380
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
385                 390                 395                 400
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
                405                 410                 415
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg Val Val Ser Val
            420                 425                 430
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
        435                 440                 445
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
    450                 455                 460
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
465                 470                 475                 480
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
                485                 490                 495
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
            500                 505                 510
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
        515                 520                 525
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
    530                 535                 540
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545                 550                 555                 560
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                565                 570
```

<210> 67
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1 IgG1(杵) NNSA重鏈2多肽序列

<400> 67

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Thr Gly Gly Leu Arg Arg Ala Tyr Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
```

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 68
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370 IgG4(杵) FALA P329A重鏈2多肽序列

<400> 68
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

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

<210> 69
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370輕鏈2多肽序列

<400> 69
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Ile Tyr Tyr Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 70
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2多肽序列

<400> 70
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

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

<210> 71
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370 IgG1(杵) NNSA重鏈2多肽序列

<400> 71

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Met Phe Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 72
<211> 1710
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG4(臼) FALA重鏈1多肽序列

<400> 72
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgag gtcgtgaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctactaca tccactgggt gcgccaggcc 120
cctggacagg gactggaatg gatcggcagc atctaccccg gcaacgtgaa caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca ccagcatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcac ccggtcccac 300
tacggcctgg attggaactt cgacgtgtgg ggcaagggca ccaccgtgac agtgtctagc 360
agccaggtgc agctggtgga atctggcggc ggagtggtgc agcctggcag aagcctgaga 420
ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc accaaggcct ggatgcactg ggtgcgccag 480
gcccctggaa agcagctgga atgggtggcc cagatcaagg acaagagcaa cagctacgcc 540
acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac 600
accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgtcgg 660
ggcgtgtact atgccctgag ccccttcgat tactggggcc agggaaccct cgtgaccgtg 720
tctagtcgga ccgccagcac aaagggccca tcggtgttcc ctctggcccc ttgcagcaga 780
agcaccagcg aatctacagc cgccctgggc tgcctcgtga aggactactt tcccgagccc 840
gtgaccgtgt cctggaactc tggcgctctg acaagcggcg tgcacacctt tccagccgtg 900
ctccagagca gcggcctgta ctctctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagcagcctg 960
ggcaccaaga cctacacctg taacgtggac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020
cgggtggaat ctaagtacgg ccctccctgc cctccttgcc cagcccctga agctgccggc 1080
ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 1140
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tcccaggaag atcccgaggt gcagttcaat 1200
tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggaacagttc 1260
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 1320
aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag ggcctgccca gctccatcga gaaaaccatc 1380
agcaaggcca agggccagcc ccgcgagcct caagtgtgta ccctgccccc tagccaggaa 1440
gagatgacca agaaccaggt gtccctgagc tgtgccgtga aaggcttcta ccccagcgac 1500
attgccgtgg aatgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cacccccccc 1560
gtgctggaca gcgacggctc attcttcctg gtgtccaagc tgaccgtgga caagagccgg 1620
tggcaggaag gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1680
acccagaagt ccctgtctct gtccctgggc 1710

<210> 73
<211> 1014
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid輕鏈1多肽序列

<400> 73
gacatcgtga tgacccagac ccccctgagc ctgagcgtga cacctggaca gcctgccagc 60
atcagctgca agagcagcca gagcctggtg cacaacaacg ccaacaccta cctgagctgg 120

tatctgcaga agcccggcca gagcccccag tccctgatct acaaggtgtc caacagattc 180
agcggcgtgc ccgacagatt ctccggcagc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc 240
agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactattgtg gccagggcac ccagtacccc 300
ttcacctttg gcagcggcac caaggtggaa atcaagggcc agcccaaggc cgcccccgac 360
atccagatga cccagagccc cagcagcctg tctgccagcg tgggcgacag agtgaccatc 420
acctgtcagg ccagccagaa catctacgtg tggctgaact ggtatcagca gaagccccgc 480
aaggccccca agctgctgat ctacaaggcc agcaacctgc acaccggcgt gcccagcaga 540
ttttctggca gcggctccgg caccgacttc accctgacaa tcagctccct gcagccccgag 600
gacattgcca cctactactg ccagcagggc cagacctacc cctacacctt tggccagggc 660
accaagctgg aaatcaagac caagggcccc agccgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 720
atcttcccac ctagcgacga gcagctgaag tccggcacag cctctgtcgt gtgcctgctg 780
aacaacttct acccccgcga ggccaaagtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 840
ggcaacagcc aggaaagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 900
agcaccctga cactgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg 960
acccaccagg gcctgtctag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgt 1014

<210> 74
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1 IgG4(杵) FALA重鏈2多肽序列

<400> 74
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacgcca tgcactgggt caaagaggcc 120
cctggccaga gactggaatg gatcggctac atctaccccg gccagggcgg caccaactac 180
aaccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgata caagcgccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaacaggc 300
ggcctgaggc gggcctactt tacctattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360
gctagcacaa agggcccatc ggtgttccct ctggcccctt gcagcagaag caccagcgaa 420
tctacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaactctg gcgctctgac aagcggcgtg cacaccttcc cagccgtgct ccagagcagc 540
ggcctgtact ctctgagcag cgtcgtgaca gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 660
aagtacggcc ctccctgccc tccttgccca gcccctgaag ctgccggcgg accctccgtg 720
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 780
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 840
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa cagcacctac 900
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1020
ggccagcccc gcgagcctca agtgtatacc ctgccccctt gccaggaaga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgtggtg tctcgtgaaa ggcttctacc ccagcgacat tgccgtggaa 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 1200
gacggctcat tcttcctgta ctccaagctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 1260
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320
ctgtctctgt ccctgggc 1338

<210> 75

<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1輕鏈2多肽序列

<400> 75
gacatcgtgc tgacacagag ccctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
atcagctgta gagccagcca gagcgtgtcc agctacggcc agggcttcat gcactggtat 120
cagcagaagc ccggccagcc ccccagactg ctgatctatg gcgccagcag cagagccaca 180
ggcatccccg ccagattttc tggctctggc agcggcaccg acttcaccct gacaatcagc 240
cccctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agaacaaaga ggacccctgg 300
accttcggcg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 360
atcttcccac ctagcgacga gcagctgaag tccggcacag cctctgtcgt gtgcctgctg 420
aacaacttct accccccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 480
ggcaacagcc aggaaagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
agcaccctga ccctgtccaa ggccgattac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg 600
acccaccagg gcctgtctag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgc 654

<210> 76
<211> 1719
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG1(臼) LALA P329A重鏈1多肽序列

<400> 76
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgag gtcgtgaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctactaca tccactgggt gcgccaggcc 120
cctggacagg gactggaatg gatcggcagc atctaccccg gcaacgtgaa caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca ccagcatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcac ccggtcccac 300
tacggcctgg attggaactt cgacgtgtgg ggcaagggca ccaccgtgac agtgtctagc 360
agccaggtgc agctggtgga atctggcggc ggagtggtgc agcctggcag aagcctgaga 420
ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc accaaggcct ggatgcactg ggtgcgccag 480
gcccctggaa agcagctgga atgggtggcc cagatcaagg acaagagcaa cagctacgcc 540
acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac 600
accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgtcgg 660
ggcgtgtact atgccctgag ccccttcgat tactggggcc agggaaccct cgtgaccgtg 720
tctagtcgga ccgccagcac aaagggcccc agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 780
agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc tgcctcgtga aggactactt tcccgagccc 840
gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg accagcggcg tgcacacctt tccagctgtg 900
ctgcagtcca gcggcctgta cagcctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg 960
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020
aaggtggaac ccaagagctg cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgccccgaa 1080
gccgccggag gcccttccgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1140
agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1200
aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccaagagag 1260

gaacagtaca acagcaccta ccgggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1320
ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg ccctggccgc ccccatcgag 1380
aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc cgcgaacccc aggtgtgcac actgccccca 1440
agcagggacg agctgaccaa gaaccaggtg tccctgagct gtgccgtgaa aggcttctac 1500
ccctccgata tcgccgtgga atgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1560
acccccccctg tgctggacag cgacggctca ttcttcctgg tgtccaagct gacagtggac 1620
aagtcccggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac 1680
aaccactaca cccagaagtc cctgagcctg agccccggc 1719

<210> 77
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2多肽序列

<400> 77
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacgcca tgcactgggt caaagaggcc 120
cctggccaga gactggaatg gatcggctac atctaccccg gccagggcgg caccaactac 180
aaccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgata caagcgccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaacaggc 300
ggcctgaggc gggcctactt tacctattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360
gctagcacaa agggccccag cgtgttccct ctggccccta gcagcaagag cacatctggc 420
ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaattctg gcgccctgac cagcggcgtg cacacctttc cagctgtgct gcagtccagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtcgtgaca gtgcccagca gctctctggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 660
aagagctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccccgaagc cgccggaggc 720
ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggacccct 780
gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc caagagagga acagtacaac 900
agcacctacc gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctggccgccc ccatcgagaa aaccatcagc 1020
aaggccaagg gccagccccg cgaaccccag gtgtacacac tgcccccatg cagggacgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtgaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
gccgtggaat gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccctgtg 1200
ctggacagcg acggctcatt cttcctgtac tccaagctga cagtggacaa gtcccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggc 1347

<210> 78
<211> 1719
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28supxCD3mid IgG1(臼) NNSA重鏈1多肽序列

<400> 78
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgag gtcgtgaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctactaca tccactgggt gcgccaggcc 120
cctggacagg gactggaatg gatcggcagc atctaccccg gcaacgtgaa caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca ccagcatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcac ccggtcccac 300
tacggcctgg attggaactt cgacgtgtgg ggcaagggca ccaccgtgac agtgtctagc 360
agccaggtgc agctggtgga atctggcggc ggagtggtgc agcctggcag aagcctgaga 420
ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc accaaggcct ggatgcactg ggtgcgccag 480
gcccctggaa agcagctgga atgggtggcc cagatcaagg acaagagcaa cagctacgcc 540
acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac 600
accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgtcgg 660
ggcgtgtact atgccctgag ccccttcgat tactggggcc agggaaccct cgtgaccgtg 720
tctagtcgga ccgccagcac aaagggcccc agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 780
agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc tgcctcgtga aggactactt tcccgagccc 840
gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg accagcggcg tgcacacctt tccagctgtg 900
ctgcagtcca gcggcctgta cagcctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg 960
ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020
aaggtggaac ccaagagctg cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgccccgaa 1080
ctgctgggag gcccttccgt gttcctgttc ccccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1140
agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1200
aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccaagagag 1260
gaacagtaca acaatgcctc ccgggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1320
ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg ccctgcctgc ccccatcgag 1380
aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc cgcgaacccc aggtgtgcac actgccccca 1440
agcagggacg agctgaccaa gaaccaggtg tccctgagct gtgccgtgaa aggcttctac 1500
ccctccgata tcgccgtgga atgggagagc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc 1560
acccccccctg tgctggacag cgacggctca ttcttcctgg tgtccaagct gacagtggac 1620
aagtcccggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac 1680
aaccactaca cccagaagtc cctgagcctg agccccggc 1719

<210> 79
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38VH1 IgG1(杵) NNSA重鏈2多肽序列

<400> 79
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agctacgcca tgcactgggt caaagaggcc 120
cctggccaga gactggaatg gatcggctac atctaccccg gccagggcgg caccaactac 180
aaccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgata caagcgccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaacaggc 300
ggcctgaggc gggcctactt tacctattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360
gctagcacaa agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tatgttgacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
aatgcctccc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080
ctgaccaaga atcaagtcag cctgtggtgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac tcaaaactca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcaggggа acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 80
<211> 1329
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370 IgG4(杵) FALA P329A重鏈2多肽序列

<400> 80
caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ctggcaggtc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggaa tgcactgggt gcgccaggcc 120
cctggcaaag gactggaatg ggtggccgtg atttggtacg acggcagcaa caagtactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcggcgaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaatgttc 300
agaggcgcct tcgactactg gggccagggc acactcgtga ccgtgtctag tgcgtcgacc 360
aagggcccat cggtgttccc tctggccccct tgcagcagaa gcaccagcga atctacagcc 420
gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaactct 480
ggcgctctga caagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tccagagcag cggcctgtac 540
tctctgagca gcgtcgtgac agtgcccagc agcagcctgg gcaccaagac ctacacctgt 600
aacgtggacc acaagcccag caacaccaag gtggacaagc gggtggaatc taagtacggc 660
cctccctgcc ctccttgccc agcccctgaa gctgccggcg gaccctccgt gttcctgttc 720
cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg 780
gtggatgtgt cccaggaaga tcccgaggtg cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
gtgcacaacg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttca acagcaccta ccgggtggtg 900
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg 960
tccaacaagg gcctgcccag ctccatcgag aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc 1020
cgcgagcctc aagtgtatac cctgcccccct tgccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
tccctgtggt gtctcgtgaa aggcttctac cccagcgaca ttgccgtgga atgggagagc 1140
aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccctg tgctggacag cgacggctca 1200
ttcttcctgt actccaagct gaccgtggac aagagccggt ggcaggaagg caacgtgttc 1260
agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtctctg 1320
tccctgggc 1329

<210> 81
<211> 642
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370輕鏈2多肽序列

<400> 81
gccatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacctgta gagccagcca gggcatccgg aacgacctgg gctggtatca gcagaagcct 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gctagctctc tgcagtccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatctctgg cctgcagccc 240
gaggacagcg ccacctacta ctgtctgcaa gactacatct actaccccac cttcggccag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccacct 360
agcgacgagc agctgaagtc cggcacagcc tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgcgagg ccaaagtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gaaagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgaca 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600
ctgtctagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gt 642

<210> 82
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370 IgG1(杵) LALA P329A重鏈2多肽序列

<400> 82
caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ctggcaggtc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggaa tgcactgggt gcgccaggcc 120
cctggcaaag gactggaatg ggtggccgtg atttggtacg acggcagcaa caagtactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcggcgaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaatgttc 300
agaggcgcct tcgactactg gggccagggc acactcgtga ccgtgtctag tgcgtcgacc 360
aagggcccca gcgtgttccc tctggccccc agcagcaaga gcacatctgg cggaacagcc 420
gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaattct 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcagtccag cggcctgtac 540
agcctgagca gcgtcgtgac agtgcccagc agctctctgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggaacc caagagctgc 660
gacaagaccc acacctgtcc ccttgtcct gccccgaag ccgccggagg ccccttccgtg 720
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 780
tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 840
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg aacagtacaa cagcacctac 900
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
tgcaaggtgt ccaacaaggc cctggccgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1020
ggccagcccc gcgaacccca ggtgtacaca ctgccccccat gcagggacga gctgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgtggtg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200
gacggctcat tcttcctgta ctccaagctg acagtggaca agtcccggtg gcagcagggc 1260
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320
ctgagcctga gccccggc 1338

<210> 83
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38hhy1370 IgG1(杵) NNSA重鏈2多肽序列

<400> 83
caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ctggcaggtc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacggaa tgcactgggt gcgccaggcc 120
cctggcaaag gactggaatg ggtggccgtg atttggtacg acggcagcaa caagtactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcggcgaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaatgttc 300
agaggcgcct tcgactactg gggccagggc acactcgtga ccgtgtctag tgcgtcgacc 360
aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtatgttgac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa caatgcctcc 900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag 1080
aatcaagtca gcctgtggtg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttcctcta ctcaaaactc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggt 1338

<210> 84
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3low VH結構域

<400> 84
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala
            20   25   30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

```
    50                  55                  60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Arg Gly Val Tyr Tyr Ala Leu Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 85
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CD3low VL結構域

<400> 85

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
            20                  25                  30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
                85                  90                  95
Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 86
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3 VH FW1

<400> 86

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
            20                  25
```

<210> 87
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb4 VH FW1

<400> 87
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Ser Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
            20   25

<210> 88
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb5 VH FW1

<400> 88
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1   5   10   15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
            20   25

<210> 89
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VH FW1

<400> 89
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
            20   25

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3/mAb5 VH FW2

<400> 90
Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
 1   5   10   15
Tyr

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb4 VH FW2

<400> 91
Met His Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1   5   10   15
Tyr

<210> 92
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VH FW2

<400> 92
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1   5   10   15
Val

<210> 93
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3 VH FW3

<400> 93

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr
1 5 10 15
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Phe Cys
35

<210> 94
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb4/mAb5 VH FW3

<400> 94
Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr
1 5 10 15
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Phe Cys
35

<210> 95
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VH FW3

<400> 95
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn
1 5 10 15
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5/mAb6 VH FW4

<400> 96
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1   5   10

<210> 97
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW1

<400> 97
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
            20   25

<210> 98
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VL FW1

<400> 98
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
            20   25

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW2

<400> 99
Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 1   5   10   15
Tyr

<210> 100
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VL FW2

<400> 100
Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1   5   10   15

<210> 101
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW3

<400> 101
Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1   5   10   15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
            20   25   30
Val Tyr Tyr Cys
        35

<210> 102
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VL FW3

<400> 102
Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1   5   10   15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala
            20   25   30
Thr Tyr Tyr Cys
        35

<210> 103
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> mAb2/mAb3/mAb4/mAb5 VL FW4

<400> 103
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1   5   10

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb6 VL FW4

<400> 104
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1   5   10

<210> 105
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD38 同功異型物E序列

<400> 105
Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro
 1   5   10   15
Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu
            20   25   30
Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala
        35   40   45
Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro
    50   55   60
Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu
65   70   75   80
Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg
                85   90   95
Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp
            100   105   110
Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser
        115   120   125
Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe
    130   135   140

Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg His Phe Trp Glu Cys Gly Ser Pro
145 150 155

<210> 106
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb7輕鏈

<400> 106
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 107
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mAb7重鏈

<400> 107

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
```

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 108
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基準重鏈1 (結合CD38)

<400> 108
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Asn Pro Gln Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Thr Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Gly Asn Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asp Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu

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

<210> 109
<211> 485
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基準重鏈2 (結合CD3)

<400> 109
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Lys Pro
115 120 125
Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly
130 135 140
Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly
145 150 155 160
Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr
165 170 175
Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg
180 185 190
Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
195 200 205
Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly
210 215 220
Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
225 230 235 240
Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Pro
245 250 255
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
260 265 270
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
275 280 285
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
290 295 300
Lys His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
305 310 315 320
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
325 330 335
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
340 345 350
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
355 360 365
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
370 375 380
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met Thr Lys Asn Gln
385 390 395 400
Val Lys Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
405 410 415
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
420 425 430
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
435 440 445
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
450 455 460
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
465 470 475 480
Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 110
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基準輕鏈（結合CD38）

<400> 110
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Trp
            20   25   30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
        35   40   45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Leu
                85   90   95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100   105   110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115   120   125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130   135   140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145   150   155   160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165   170   175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180   185   190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195   200   205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的構建體

<400> 132

Gln Ser Val Ser Ser Tyr Gly Gln Gly
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種結合蛋白，其包含結合CD38多肽的抗原結合位點，其中所述抗原結合位點包含：

(a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和

(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項2】 如請求項1的結合蛋白，其中所述抗原結合位點包含：

(a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和

(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項3】如請求項1或請求項2的結合蛋白，其中所述VH結構域從N末端

至C末端包含序列FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4；其中FR1包含序列QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:86)、QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:87)或QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO:88)；其中FR2包含序列MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO:90)或MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO:91)；其中FR3包含序列NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:93)或NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:94)；和其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)。

【請求項4】如請求項1或請求項2的結合蛋白，其中所述VH結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列，和所述VL結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項4的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:7的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:8的胺基酸序列的抗體輕鏈。

【請求項6】如請求項1或請求項2的結合蛋白，其中所述VH結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列，和所述VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。

【請求項7】 如請求項6的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:19的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。

【請求項8】如請求項1或請求項2的結合蛋白，其中所述VH結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列，和所述VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。

【請求項9】 如請求項8的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:22的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。

【請求項10】 如請求項1或請求項2的結合蛋白，其中所述VH結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列，和所述VL結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列。

【請求項11】 如請求項10的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:24的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:20的胺基酸序列的抗體輕鏈。

【請求項12】 如請求項1的結合蛋白，其中所述抗原結合位點包含:

(a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和

(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序

列。

【請求項13】 如請求項1或請求項12的結合蛋白，其中所述VH結構域從N末端至C末端包含序列FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4；其中FR1包含序列QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:86)、QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:87)或QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO:88)；其中FR2包含序列MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO:90)或MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO:91)；其中FR3包含序列NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:93)或NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO:94)；和其中FR4包含序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)。

【請求項14】 如請求項1或請求項12的結合蛋白，其中所述VH結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和所述VL結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。

【請求項15】 如請求項14的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:15的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:16的胺基酸序列的抗體輕鏈。

【請求項16】 一種結合蛋白，其包含結合CD38多肽的抗原結合位點，其中所述抗原結合位點包含：

(a) 抗體重鏈可變(VH)結構域，其包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和

(b) 抗體輕鏈可變(VL)結構域，其包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項17】如請求項16的結合蛋白，其中所述VH結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和所述VL結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。

【請求項18】 如請求項16或請求項17的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有SEQ ID NO:11的胺基酸序列的抗體重鏈和含有SEQ ID NO:12的胺基酸序列的抗體輕鏈。

【請求項19】 如請求項1-18中任一項的結合蛋白，其中所述抗原結合位點與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應。

【請求項20】如請求項19的結合蛋白，其中所述抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽。

【請求項21】 如請求項20的結合蛋白，其中所述抗原結合位點結合所述包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列的人CD38多肽，平衡解離常數(K_D)是2.1nM或更

小。

【請求項22】如請求項19的結合蛋白，其中所述抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:105的胺基酸序列的人同功異型物E CD38多肽。

【請求項23】如請求項19-22中任一項的結合蛋白，其中所述抗原結合位點結合包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽。

【請求項24】 如請求項23的結合蛋白，其中所述抗原結合位點結合所述包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽，平衡解離常數(K_D)是1.3nM或更小。

【請求項25】 如請求項1-24中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白是嵌合或人源化抗體。

【請求項26】如請求項16-24中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白是人抗體。

【請求項27】 如請求項1-24中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白是單克隆抗體。

【請求項28】 如請求項1-24中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含含有Fc區的一個或多個全長抗體重鏈。

【請求項29】 如請求項28的結合蛋白，其中所述Fc區是人Fc區，其包含降低或消除Fc受體結合和/或Fc區的效應子功能的一個或多個突變。

【請求項30】 如請求項28的結合蛋白，其中所述Fc區是人IgG1 Fc區。

【請求項31】 如請求項30的結合蛋白，其中根據EU Index，所述人IgG1 Fc區在對應於人IgG1的234、235和329位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是L234A、L235A和P329A。

【請求項32】 如請求項30的結合蛋白，其中根據EU Index，所述人IgG1 Fc區在對應於人IgG1的298、299和300位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S298N、T299A和Y300S。

【請求項33】 如請求項28的結合蛋白，其中Fc區是人IgG4 Fc區。

【請求項34】 如請求項33的結合蛋白，其中根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的228和409位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S228P和R409K。

【請求項35】 如請求項33或請求項34的結合蛋白，其中根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的234和235位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是F234A和L235A。

【請求項36】 如請求項33或請求項34的結合蛋白，其中根據EU Index，所述人IgG4 Fc區在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。

【請求項37】 如請求項1-24中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含抗體F(ab)、F(ab')2、Fab'-SH、Fv或scFv片段。

【請求項38】 如請求項1-37中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白與細胞毒性劑或標記物綴合。

【請求項39】 如請求項1-37中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白是雙特異性結合蛋白，其包含結合CD38多肽的第一抗原結合位點，和第二抗原結合位點。

【請求項40】 如請求項1-37中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白是三特異性結合蛋白，其包含結合CD38多肽的第一抗原結合位點、第二抗原結合位點和第三抗原結合位點。

【請求項41】 如請求項40的結合蛋白，其中所述第一抗原結合位點結合人CD38多肽的胞外域，和其中所述第二和第三抗原結合位點各自結合T細胞表面蛋白。

【請求項42】 如請求項41的結合蛋白，其中所述第一抗原結合位點結合人CD38多肽的胞外域，和其中(a) 所述第二抗原結合位點結合人CD28多肽，和所述第三抗原結合位點結合人CD3多肽，或(b) 所述第二抗原結合位點結合人CD3多肽，和所述第三抗原結合位點結合人CD28多肽。

【請求項43】一種結合蛋白，其包含3個抗原結合位點，其各自結合一個或多個靶蛋白，其中所述3個抗原結合位點的至少一個與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應。

【請求項44】 如請求項43的結合蛋白，其中所述結合蛋白與包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:105的胺基酸序列的人CD38多肽交叉反應。

【請求項45】 如請求項43或請求項44的結合蛋白，其中所述結合蛋白與包含SEQ ID NO:30的胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽交叉反應。

【請求項46】如請求項43-45中任一項的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應的抗原結合位點，和各自結合T細胞表面蛋白的2個抗原結合位點。

【請求項47】如請求項46的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含與人CD38多肽的胞外域和食蟹猴CD38多肽的胞外域交叉反應的抗原結合位點，結合人CD28多肽的抗原結合位點，和結合人CD3多肽的抗原結合位點。

【請求項48】如請求項43-47的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含形成所述3個抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [II]

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H3}-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [III]

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對，和

其中：

(a) 所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(b) 所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或

(c) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)或GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)或IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)或QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)或GAS (SEQ ID

NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項49】 如請求項48的結合蛋白，其中

(a) 所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(b) 所述V_{H1}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(c) 所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(d) 所述V_{H2}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的

CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(e) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或

(h) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項50】 如請求項49的結合蛋白，其中

(a) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGNGGT (SEQ ID NO:32)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34)的胺基酸序列的CDR-L1

序列，含有LAS (SEQ ID NO:35)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或

(b) 所述V_{H3}結構域包含含有GYTFTSYA (SEQ ID NO:37)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IYPGQGGT (SEQ ID NO:38)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有GAS (SEQ ID NO:40)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項51】 如請求項50的結合蛋白，其中

(a) 所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:5的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:6的胺基酸序列；

(b) 所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:17的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列；

(c) 所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:21的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列；

(d) 所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:23的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:18的胺基酸序列；或

(e) 所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列。

【請求項52】 如請求項43-47的結合蛋白，其中所述結合蛋白包含形成所述3個抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一多肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [II]

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H3}-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [III]

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區，和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對，和

其中：

(a) 所述V_{H1}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的

CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L1}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列；

(b) 所述V_{H2}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L2}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列；或

(c) 所述V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項53】 如請求項52的結合蛋白，其中所述V_{H3}結構域包含含有GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列的CDR-H1序列，含有IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)的胺基酸序列的CDR-H2序列，和含有ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)的胺基酸序列的CDR-H3序列；和所述V_{L3}結構域包含含有QGIRND (SEQ ID NO:44)的胺基酸序列的CDR-L1序列，含有AAS (SEQ ID NO:45)的胺基酸序

列的CDR-L2序列，和含有LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)的胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項54】如請求項53的結合蛋白，其中所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。

【請求項55】 如請求項48-54的結合蛋白，其中

(a) 所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；

(b) 所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；

(c) 所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；

(d) 所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列；

(e) 所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列；

(f) 所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含

SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列；

(g) 所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列；或

(h) 所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:51的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:52的胺基酸序列，所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:84的胺基酸序列，和所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:85的胺基酸序列。

【請求項56】 如請求項55的結合蛋白，其中

(a) 所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列，所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:13的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:14的胺基酸序列；或

(b) 所述V_{H1}結構域包含SEQ ID NO:49的胺基酸序列，所述V_{L1}結構域包含SEQ ID NO:50的胺基酸序列，所述V_{H2}結構域包含SEQ ID NO:53的胺基酸序列，所述V_{L2}結構域包含SEQ ID NO:54的胺基酸序列，所述V_{H3}結構域包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列，和所述V_{L3}結構域包含SEQ ID NO:10的胺基酸序列。

【請求項57】 如請求項48-56中任一項的結合蛋白，其中L_1、L_2、L_3或L_4的至少一個的長度獨立地是0個胺基酸。

【請求項58】 如請求項48-56中任一項的結合蛋白，其中L_1、L_2、L_3或L_4的

長度各自獨立地是至少一個胺基酸。

【請求項59】如請求項48-56中任一項的結合蛋白，其中(a) L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地是0個胺基酸的長度或包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)；或(b) L_1、L_2、L_3和L_4各自獨立地包含選自下組的序列：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)、GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)、S、RT、TKGPS (SEQ ID NO:57)、GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)和GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)。

【請求項60】如請求項48-56中任一項的結合蛋白，其中

(a) L_1包含序列GQPKAAP (SEQ ID NO: 58)，L_2包含序列TKGPS (SEQ ID NO:57)，L_3包含序列S，和L_4包含序列RT；

(b) L_1包含序列GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)，L_2包含序列GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55)，L_3的長度是0個胺基酸，和L_4的長度是0個胺基酸；

(c) L_1包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_2包含序列GGSGSSGSGG (SEQ ID NO:59)，L_3的長度是0個胺基酸，和L_4的長度是0個胺基酸；或

(d) L_1包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，L_2的長度是0個胺基酸，L_3包含序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56)，和L_4的長度是0個胺基酸。

【請求項61】如請求項48-60中任一項的結合蛋白，其中所述第二和所述第

三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的234和235位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是F234A和L235A。

【請求項62】如請求項48-60中任一項的結合蛋白，其中所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。

【請求項63】如請求項48-60中任一項的結合蛋白，其中所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的228和409位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S228P和R409K。

【請求項64】如請求項48-60中任一項的結合蛋白，其中所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的234、235和329位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是L234A、L235A和P329A。

【請求項65】如請求項48-60中任一項的結合蛋白，其中所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的298、299和300位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S298N、T299A和Y300S。

【請求項66】 如請求項48-65中任一項的結合蛋白，其中根據EU Index，所述第二多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V，和其中根據EU Index，所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S354C和T366W。

【請求項67】 如請求項48-65中任一項的結合蛋白，其中根據EU Index，所述第二多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的354和366位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S354C和T366W；和其中根據EU Index，所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域在對應於人IgG1或IgG4的349、366、368和407位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是Y349C、T366S、L368A和Y407V。

【請求項68】 如請求項48或請求項52的結合蛋白，其中所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:60的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:62的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。

【請求項69】 如請求項48或請求項52的結合蛋白，其中所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:64的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:65的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含

SEQ ID NO:63的胺基酸序列。

【請求項70】 如請求項48或請求項52的結合蛋白，其中所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:66的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:67的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:63的胺基酸序列。

【請求項71】 如請求項48或請求項52的結合蛋白，其中所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:60的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:68的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。

【請求項72】 如請求項48或請求項52的結合蛋白，其中所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:64的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:70的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。

【請求項73】 如請求項48或請求項52的結合蛋白，其中所述第一多肽鏈包含SEQ ID NO:61的胺基酸序列，所述第二多肽鏈包含SEQ ID NO:66的胺基酸序列，所述第三多肽鏈包含SEQ ID NO:71的胺基酸序列，和所述第四多肽鏈包含SEQ ID NO:69的胺基酸序列。

【請求項74】一種結合蛋白，其包含各自結合一個或多個靶蛋白的3個抗原

結合位點，其中所述結合蛋白包含形成3個抗原結合位點的4個多肽鏈，其中第一所肽鏈包含由下式表示的結構：

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

和第二多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H1}-L_3-V_{H2}-L_4-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [II]

和第三多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{H3}-C_{H1}-鉸鏈-C_{H2}-C_{H3} [III]

和第四多肽鏈包含由下式表示的結構：

V_{L3}-C_L [IV]

其中：

V_{L1}是第一免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L2}是第二免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{L3}是第三免疫球蛋白輕鏈可變結構域；

V_{H1}是第一免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H2}是第二免疫球蛋白重鏈可變結構域；

V_{H3}是第三免疫球蛋白重鏈可變結構域；

C_L是免疫球蛋白輕鏈恒定結構域；

C_{H1}是免疫球蛋白C_{H1}重鏈恒定結構域；

C_{H2}是免疫球蛋白C_{H2}重鏈恒定結構域；

C_{H3}是免疫球蛋白C_{H3}重鏈恒定結構域；

鉸鏈是連接所述C_{H1}和C_{H2}結構域的免疫球蛋白鉸鏈區；和

L_1、L_2、L_3和L_4是胺基酸連接子；

其中式I的多肽和式II的多肽形成交叉輕鏈-重鏈對；和

其中：

(a) 所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG1鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG1的298、299和300位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是S298N、T299A和Y300S；或

(b) 所述第二和所述第三多肽鏈的鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域是人IgG4 C_{H3}結構域，和其中根據EU Index，所述鉸鏈-C_{H2}-C_{H3}結構域各自在對應於人IgG4的233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中所述胺基酸取代是E233P、F234V、L235A和在236處的缺失。

【請求項75】 如請求項74的結合蛋白，其中V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的至少一對形成結合CD38多肽的抗原結合位點。

【請求項76】 如請求項74的結合蛋白，其中V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的1、2或3對形成結合選自下組的抗原靶標的抗原結合位點：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL15、CCL17、CCL19、CCL20、CCL21、CCL24、CCL25、CCL26、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80、CD86、CD122、CD137、CD137L、CD152、CD154、CD160、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD278、CD279、CDH1、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1、CSF-2、CSF-3、CX3CL1、CXCL12、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外核苷三磷酸二磷

酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2、STEAP2、Syk激酶、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM和XCR1。

【請求項77】 如請求項74的結合蛋白，其中V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的第一對形成結合人CD3多肽的抗原結合位點，V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的第二對形成結合人CD28多肽的抗原結合位點，和V_{H1}和V_{L1}、V_{H2}和V_{L2}以及V_{H3}和V_{L3}的第三對形成結合選自下組的人抗原靶標的抗原結合位點：A2AR、APRIL、ATP二磷酸水解酶、BAFF、BAFFR、BCMA、BlyS、BTK、BTLA、B7DC、B7H1、B7H4、B7H5、B7H6、B7H7、B7RP1、B7-4、C3、C5、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL15、CCL17、CCL19、CCL20、CCL21、CCL24、CCL25、CCL26、CCR3、CCR4、CD3、CD19、CD20、CD23、CD24、CD27、CD28、CD38、CD39、CD40、CD70、CD80、CD86、CD122、CD137、CD137L、CD152、CD154、CD160、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD278、CD279、CDH1、殼多糖酶、CLEC9、CLEC91、CRTH2、CSF-1、CSF-2、CSF-3、CX3CL1、CXCL12、CXCL13、CXCR3、DNGR-1、外

核苷三磷酸二磷酸水解酶1、EGFR、ENTPD1、FCER1A、FCER1、FLAP、FOLH1、Gi24、GITR、GITRL、GM-CSF、Her2、HHLA2、HMGB1、HVEM、ICOSLG、IDO、IFNα、IgE、IGF1R、IL2Rβ、IL1、IL1A、IL1B、IL1F10、IL2、IL4、IL4Ra、IL5、IL5R、IL6、IL7、IL7Ra、IL8、IL9、IL9R、IL10、rhIL10、IL12、IL13、IL13Ra1、IL13Ra2、IL15、IL17、IL17Rb、IL18、IL22、IL23、IL25、IL27、IL33、IL35、ITGB4、ITK、KIR、LAG3、LAMP1、瘦素、LPFS2、MHC II類、NCR3LG1、NKG2D、NTP二磷酸水解酶-1、OX40、OX40L、PD-1H、血小板受體、PROM1、S152、SISP1、SLC、SPG64、ST2、STEAP2、Syk激酶 、TACI、TDO、T14、TIGIT、TIM3、TLR、TLR2、TLR4、TLR5、TLR9、TMEF1、TNFa、TNFRSF7、Tp55、TREM1、TSLP、TSLPR、TWEAK、VEGF、VISTA、Vstm3、WUCAM和XCR1。

【請求項78】 一種多核苷酸類的套組，其包含：

(a) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:72的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:74的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸；

(b) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:76的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:77的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸；

(c) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:78的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:79的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:75的序列的第四多核苷酸；

(d) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:72的序列的

第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:80的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸；

(e) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:76的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:82的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸；或

(f) 包含SEQ ID NO:73的序列的第一多核苷酸，包含SEQ ID NO:78的序列的第二多核苷酸，包含SEQ ID NO:83的序列的第三多核苷酸，和包含SEQ ID NO:81的序列的第四多核苷酸。

【請求項79】 一種多核苷酸，其編碼如請求項1-77中任一項的結合蛋白。

【請求項80】 一種載體，其包含如請求項79的多核苷酸。

【請求項81】 一種主體細胞，其包含如請求項78的多核苷酸類的套組、如請求項79的多核苷酸或如請求項80的載體。

【請求項82】 一種產生結合蛋白的方法，所述方法包括培養如請求項81的主體細胞從而產生所述結合蛋白。

【請求項83】 如請求項82的方法，其進一步包括從所述主體細胞回收所述結合蛋白。

【請求項84】 一種醫藥組合物，其包含如請求項1-77中任一項的結合蛋白

和醫藥上可接受的載劑。

【請求項85】一種預防和/或治療患者中的癌症的方法，其包括向所述患者投予治療有效量的至少一種如請求項1-73中任一項的結合蛋白或如請求項84的醫藥組合物。

【請求項86】如請求項85的方法，其中所述結合蛋白包含結合T細胞表面蛋白的一個抗原結合位點，和結合人CD38多肽的胞外域的另一個抗原結合位點。

【請求項87】如請求項86的方法，其中所述結合蛋白是三特異性結合蛋白，其包含結合CD3的第一抗原結合位點、結合CD28的第二抗原結合位點和結合人CD38多肽的胞外域的第三抗原結合位點。

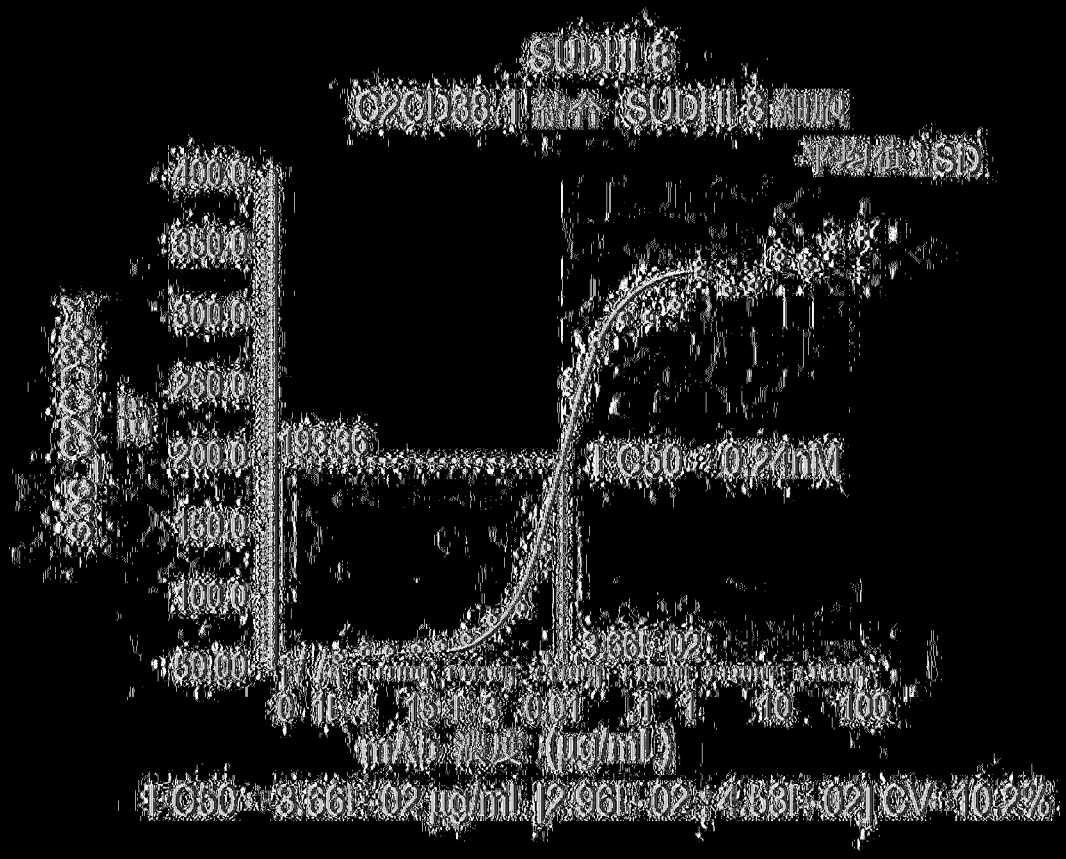
【請求項88】如請求項85-87中任一項的方法，其中至少一種結合蛋白與化療劑共同投予。

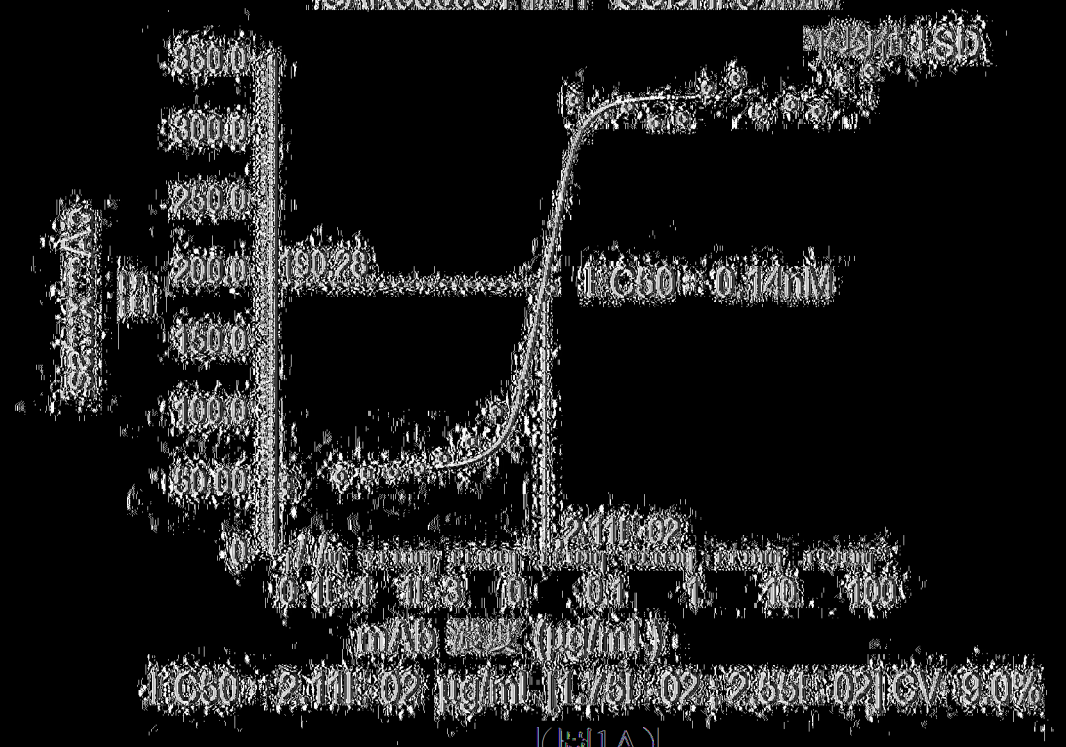
【請求項89】如請求項85-88中任一項的方法，其中所述癌症是多發性骨髓瘤。

【請求項90】如請求項85-88中任一項的方法，其中所述癌症是急性髓樣白血病(AML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)或B細胞淋巴瘤。

【請求項91】 如請求項85-90中任一項的方法，其中所述患者是人。

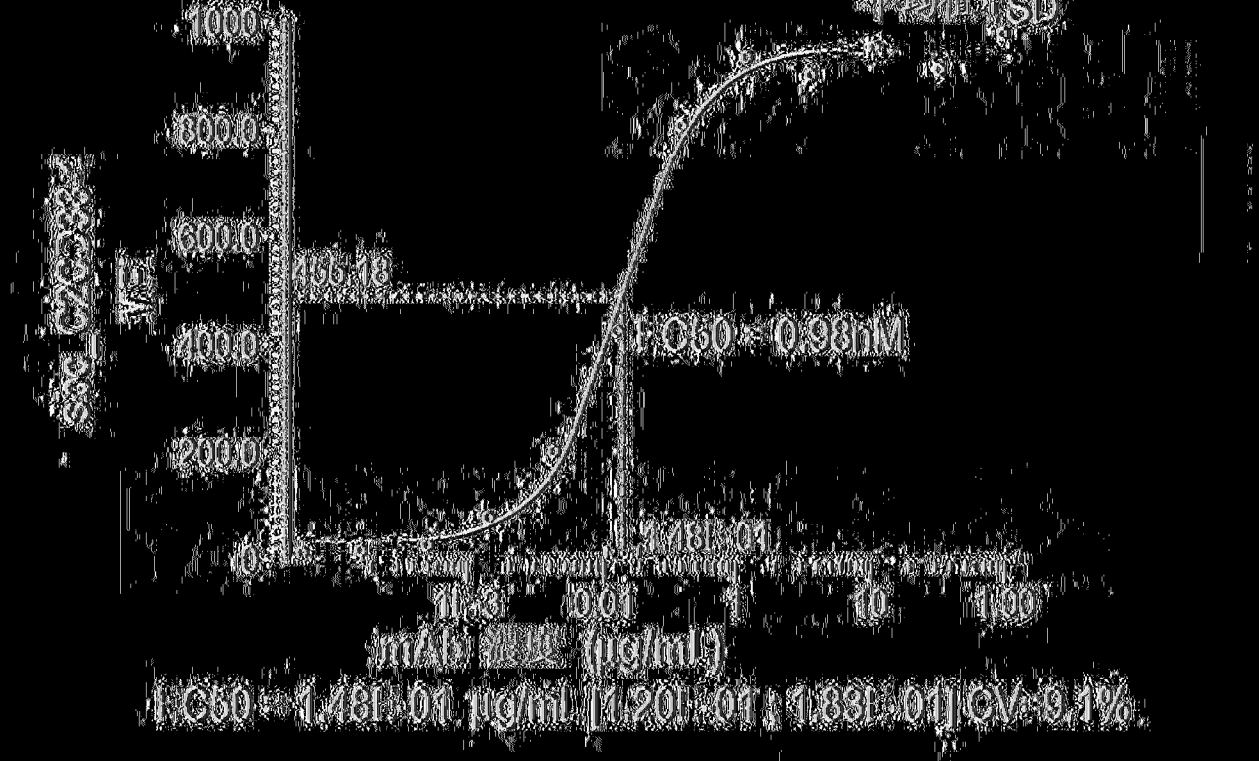
【請求項92】 如請求項85-91中任一項的方法，其中選擇所述患者進行治療，因為癌症的細胞在其細胞表面表現人CD38同功異型物E多肽。


SUDI[I 8
C20]388 1 個 SUDI[I 8 細胞
平均值 SD
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
193.86
IC50 0.24nM
3.86E-02
0 [E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 100
mAb 濃度 (μg/ml)
IC50 3.86E-02 μg/ml [2.96E-02 - 4.68E-02] CV 10.2%


SARS60984 個 SUDI[I 8 細胞
平均值 SD
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
190.28
IC50 0.14nM
2.11E-02
0 1E-4 1E-3 0.01 0.1 1 10 100
mAb 濃度 (μg/ml)
IC50 2.11E-02 μg/ml [1.75E-02 - 2.65E-02] CV 9.0%

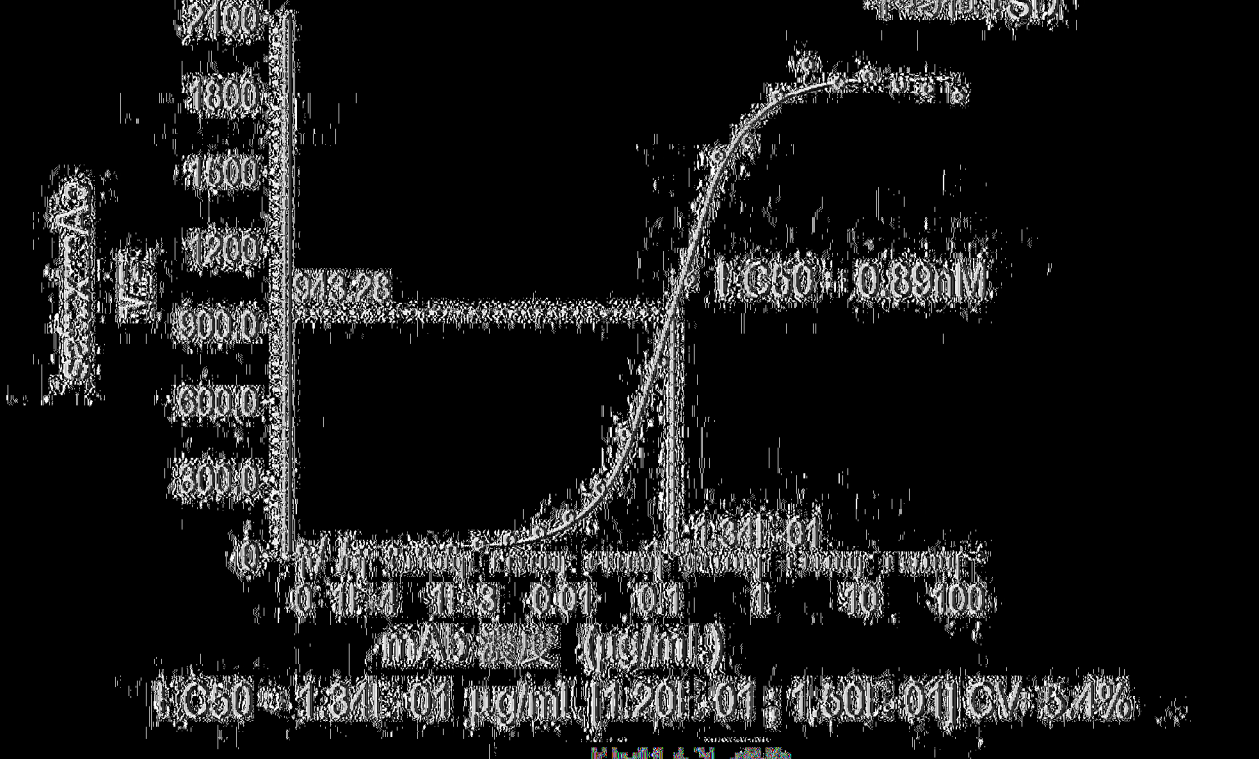
[(圖1A)]

MOLP-8 (WM)
C260388-1 結合 MOLP-8 細胞
平均值±SD



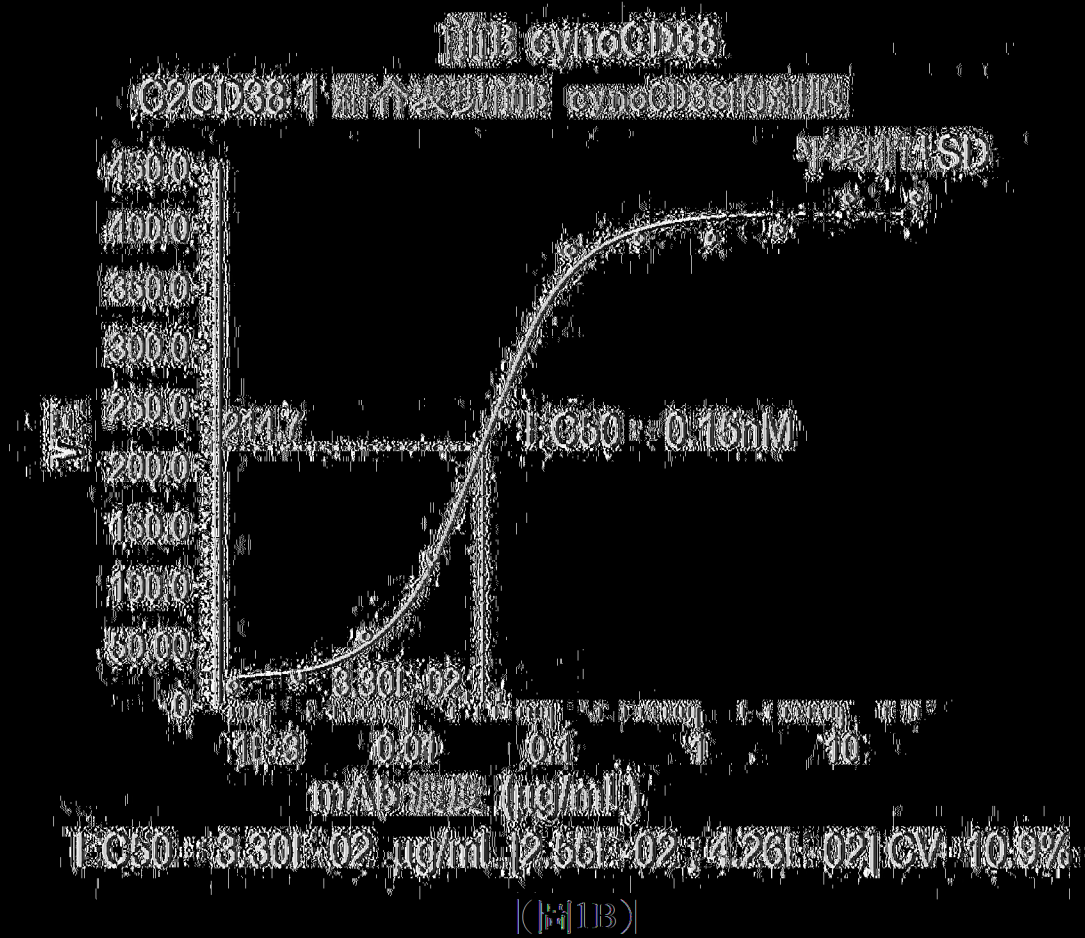
EC50 = 1.48E-01 μg/ml [1.20E-01 ; 1.83E-01] CV = 9.1%

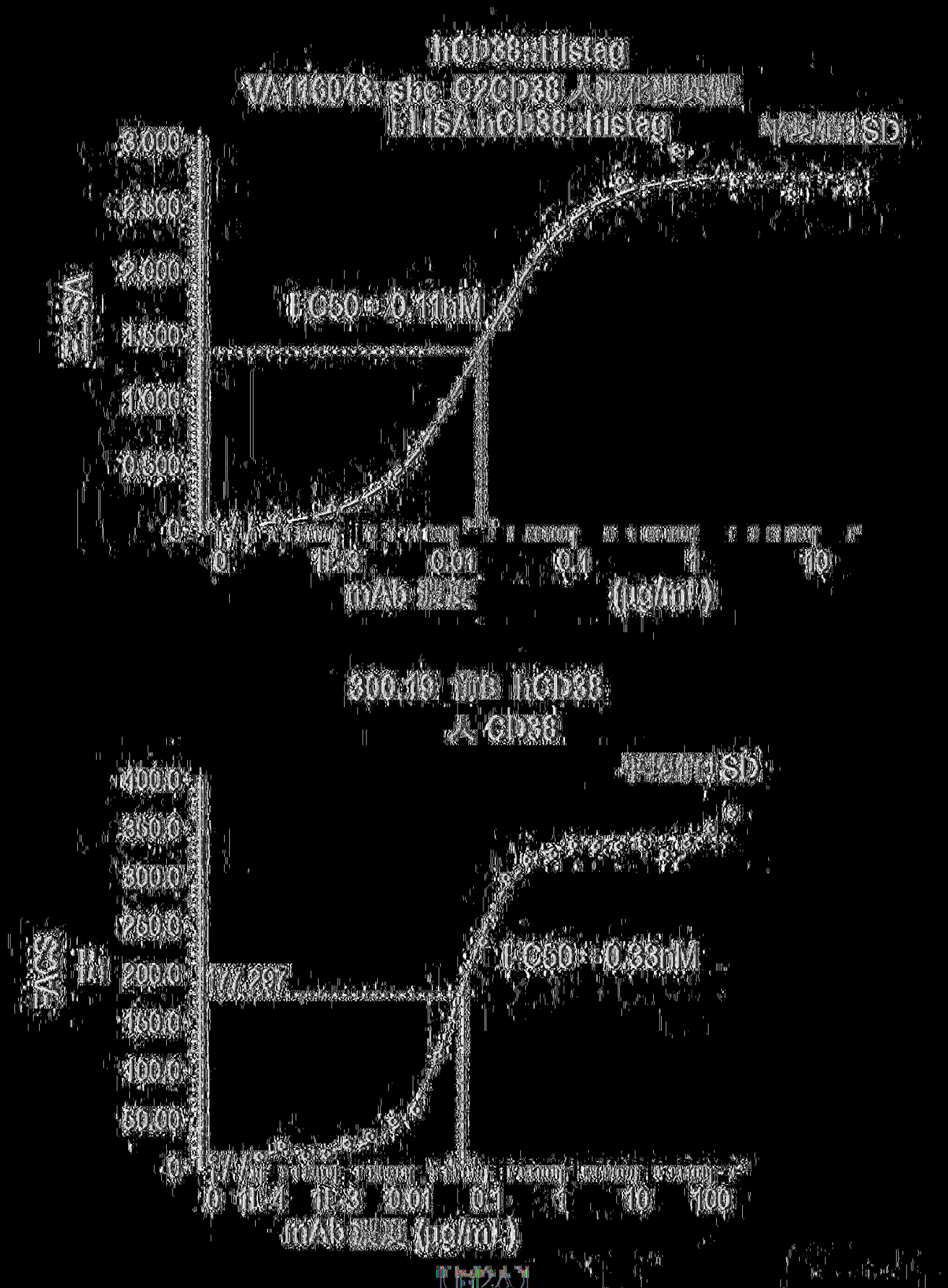
SAR650984 結合 MOLP-8 細胞
平均值±SD

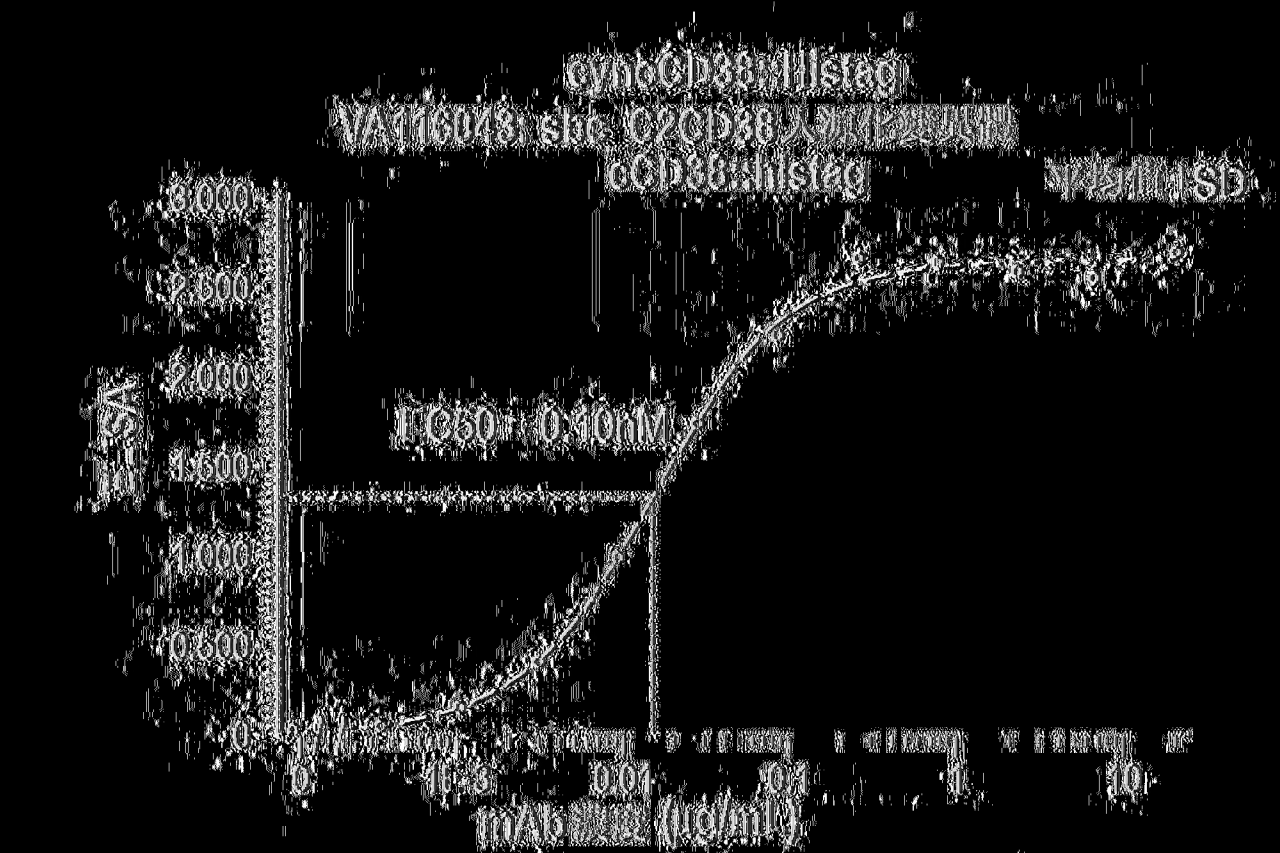


EC50 = 1.34E-01 μg/ml [1.20E-01 ; 1.50E-01] CV = 5.4%

[空白]

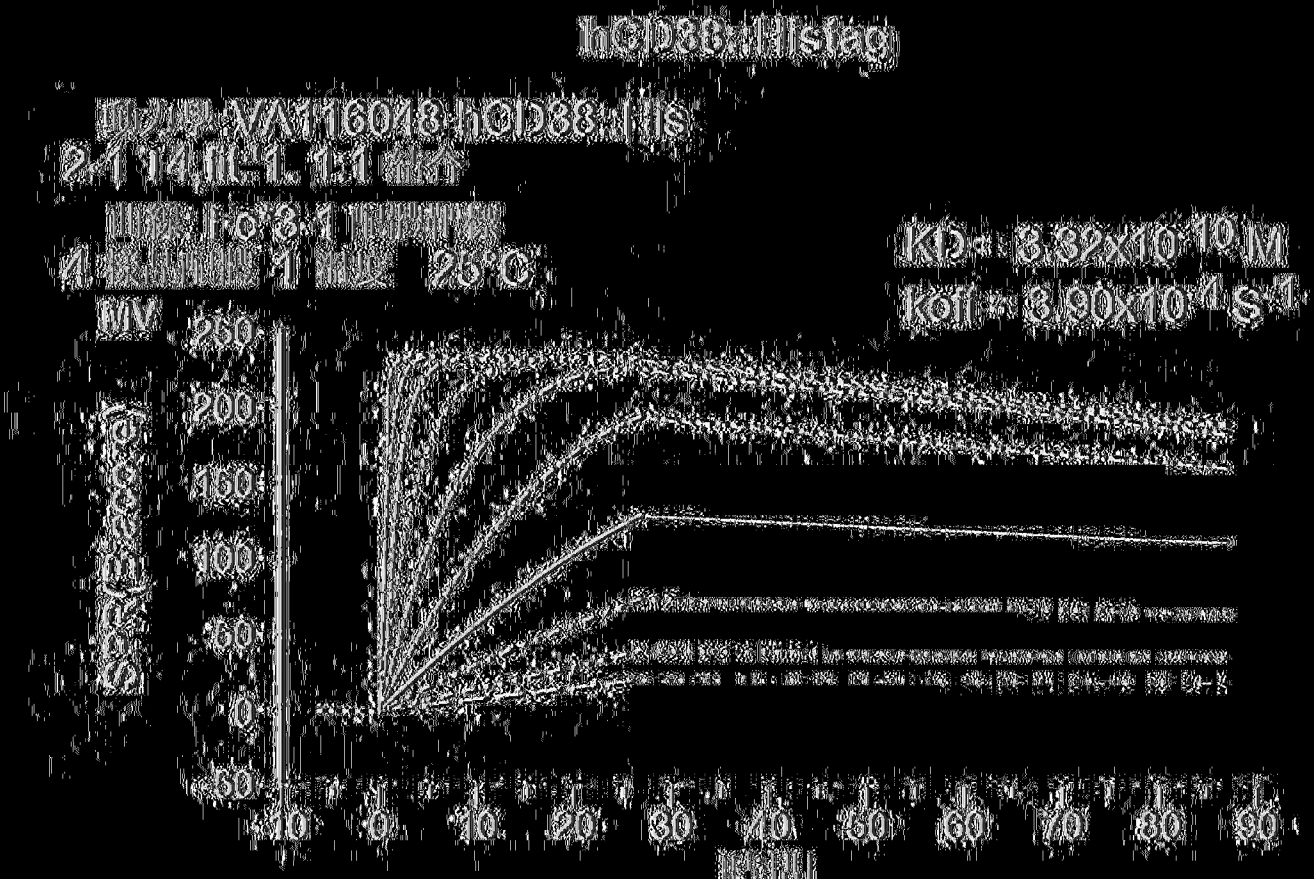

抗hCynoCD38
C20D38-1 嵌合型抗體 cynoCD38結合活性
平均值±SD
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.00
0
S
2.1x
EC50：0.16nM
3.301e-02
0.01
0.1
1
10
mAb濃度 (ug/ml)
EC50 = 3.301e-02 ug/ml [2.551e-02, 4.261e-02] CV= 10.9%
(抗hCynoCD38)


hCD38-His tag
VA1160/48: she-CD38 人源化抗体
ELISA hCD38-His tag
OD450
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.11nM
0
0.01
0.1
1
10
mAb 浓度 (μg/ml)
800.19 mAb hCD38
人-CD38
OD450
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.00
0
EC50 = 0.33nM
0
0.01
0.1
1
10
100
mAb 浓度 (μg/ml)

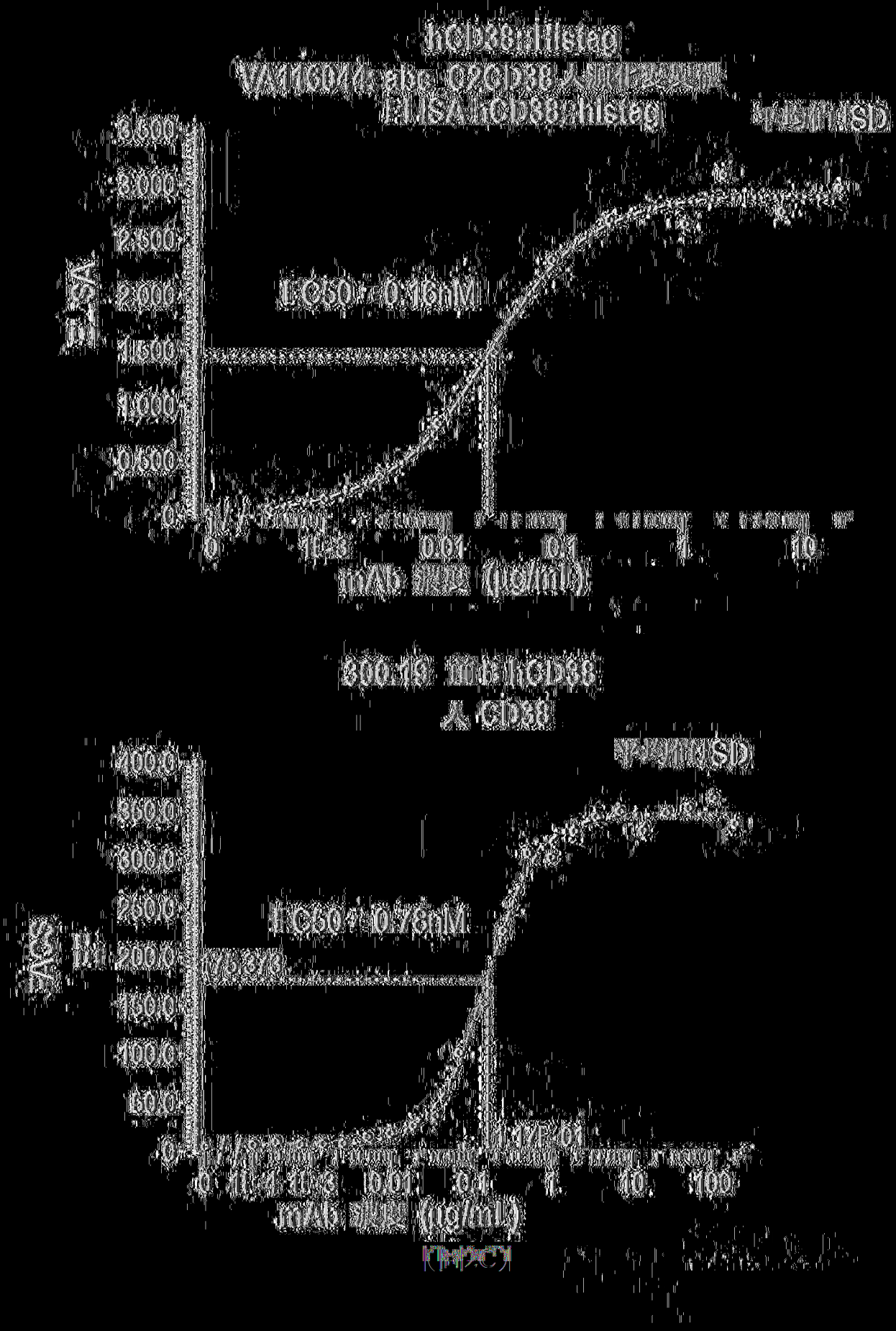

cynoCD38;His tag
VA116043 sbc cynoCD38 人源化抗体
cCD38;His tag
SPR 1:1 Sb
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
RU
IC50 = 0.10nM
0
0.01
0.1
1
10
mAb 浓度 (ug/ml)

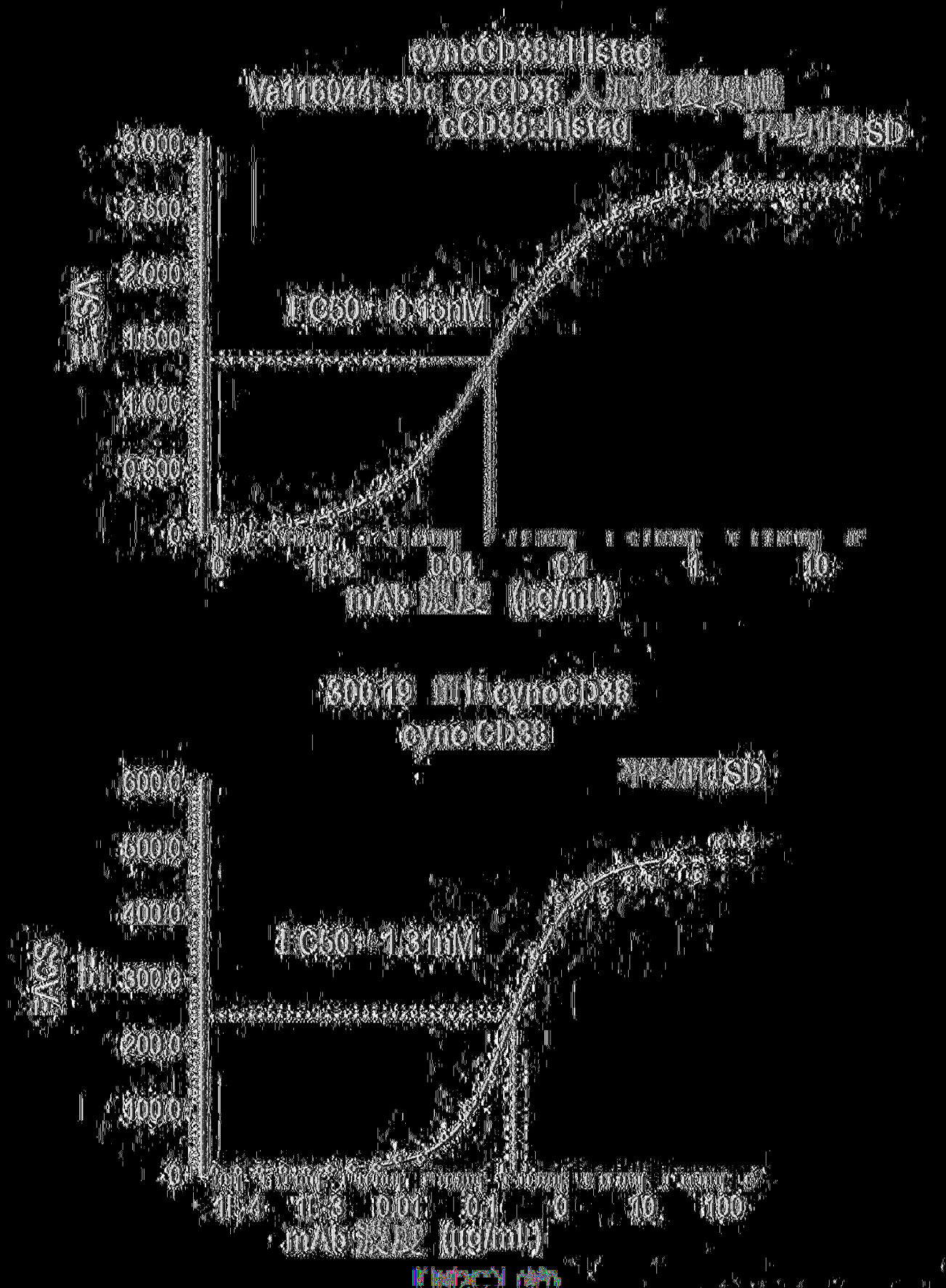

300.19 nM cynoCD38
cyno CD38
SPR 1:1 Sb
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
RU
IC50 = 0.76nM
255.665
0
0.01
0.1
1
10
100
mAb 浓度 (ug/ml)

圖 7 (續)


hCD38-His tag
VA116048-hCD38-His
2-14 μM-1.5-1 結合
1:3
4 濃度 25°C
KD = 3.32x10-10 M
koff = 3.90x10-4 S-1
MV
250
200
150
100
50
0
-50
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
秒
cyno CD38-His tag
VA116048-cCD38-His
2-14 μM-1.5-1 結合
1:3
4 濃度 25°C
KD = 8.14x10-9 M
koff = 7.84x10-4 S-1
MV
250
200
150
100
50
0
-50
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
秒

[圖2B]


hCD38-His tag
VA1160(4-ebc-C26CD38人源重组蛋白)
ELISA hCD38-His tag
4-5-1 mSD
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
OD450
EC50 = 0.16nM
0.01
0.1
1
10
mAb浓度 (μg/mL)
800-18 mAb-hCD38
人 CD38
4-5-1 mSD
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
OD450
EC50 = 0.78nM
0.01
0.1
1
10
100
mAb浓度 (μg/mL)


cynoCD38-His tag
Val16044-Ser300 cynoCD38 人源化单克隆抗体
cCD38-his tag
SPR亲和力-SD
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
RU
1:C50 = 0.45nM
0
1E-3
0.01
0.1
1.0
mAb 浓度 (μg/ml)
300.19 抗体 cynoCD38
cyno CD38
SPR亲和力-SD
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
RU
1:C50 = 1.31nM
0
1E-4
1E-3
0.01
0.1
1.0
10
100
mAb 浓度 (μg/ml)

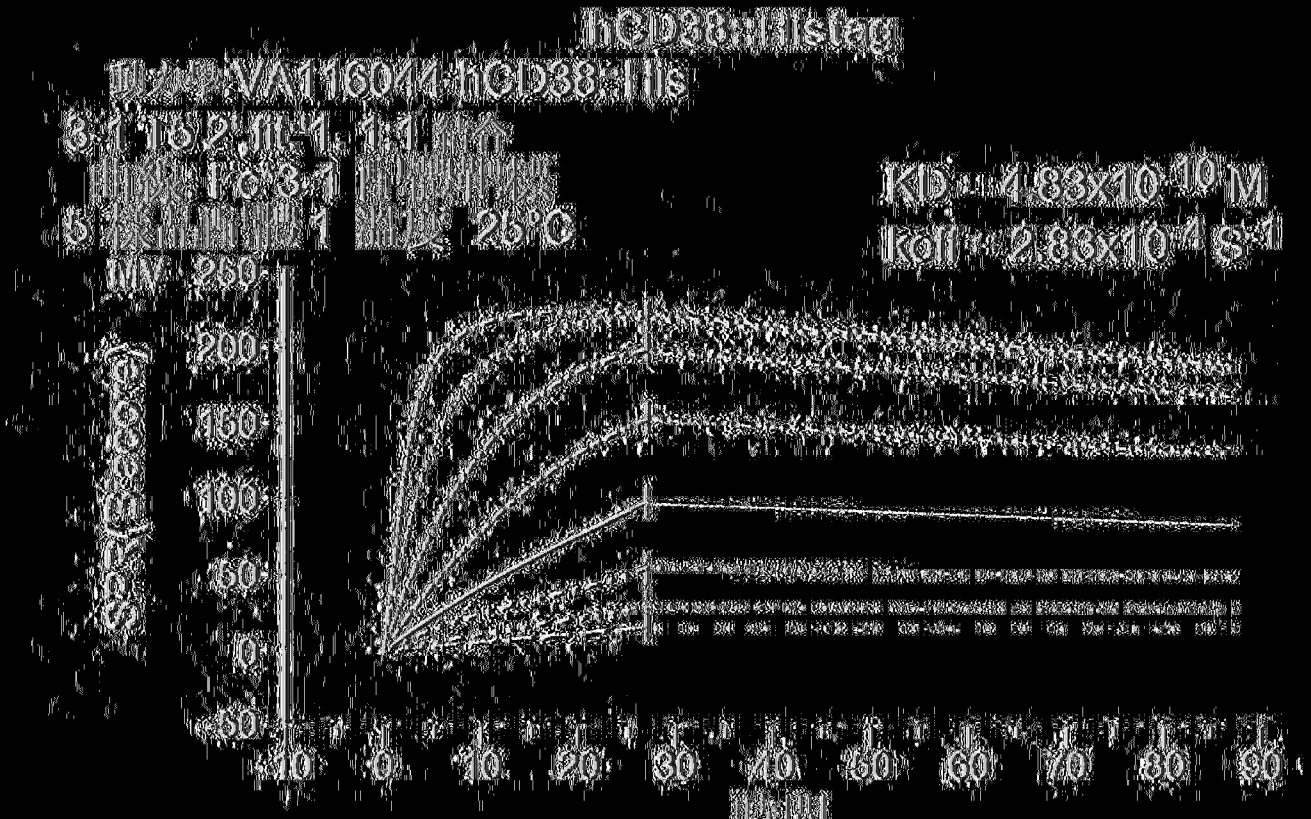
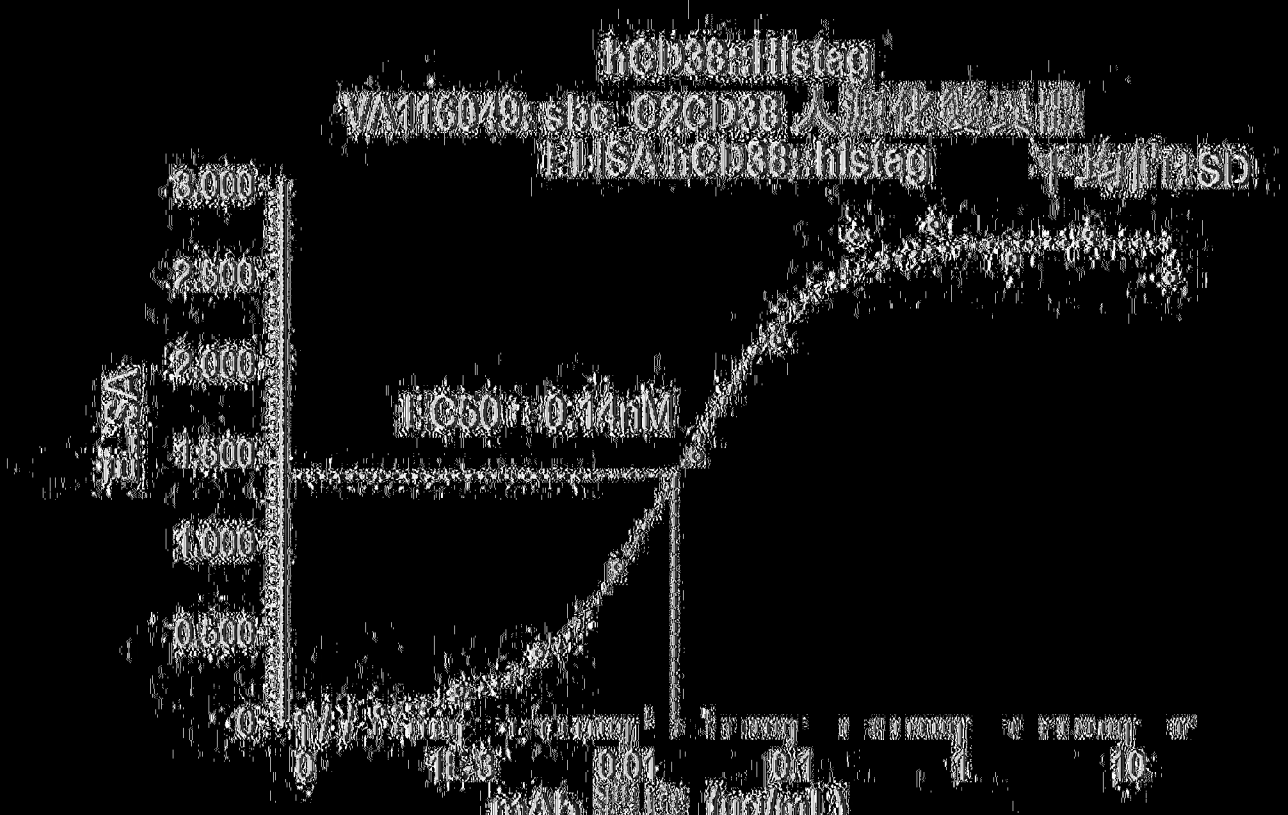
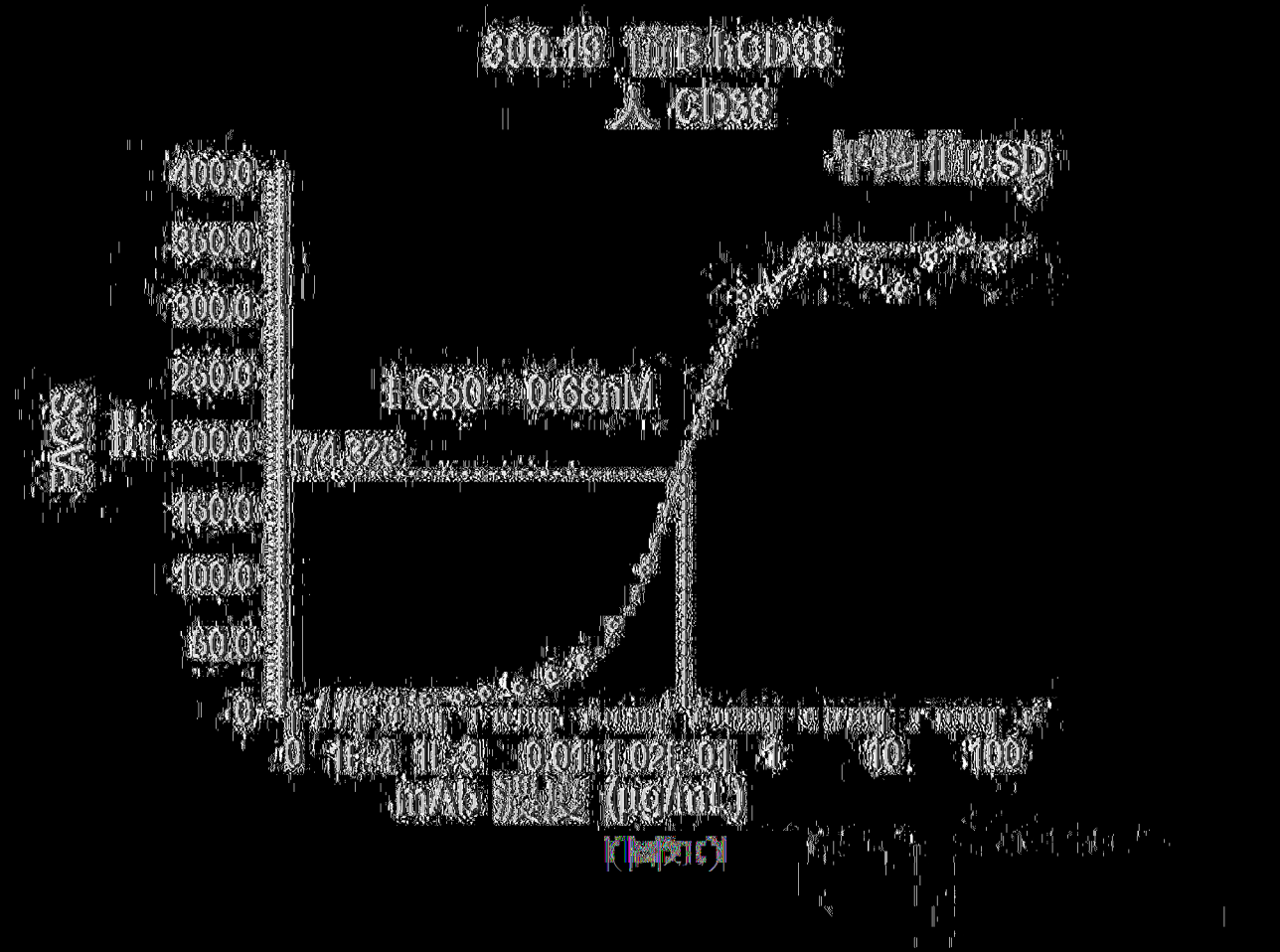
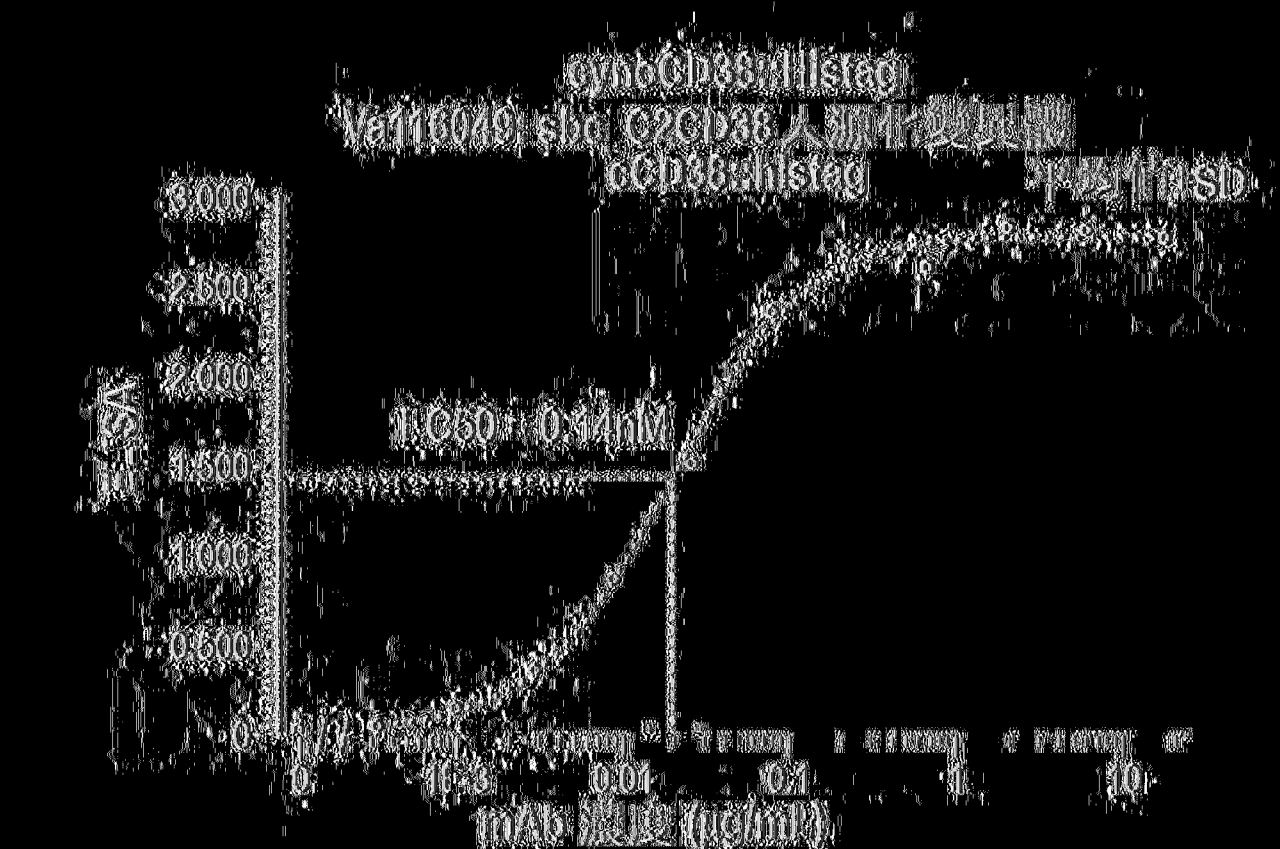

hCD38-His tag
KD = 4.83x10^-10 M
koff = 2.83x10^-4 s^-1
cynoCD38-His tag
KD = 7.10x10^-10 M
koff = 1.29x10^-4 s^-1

圖 2D


hCD38:Hlsteg
VA116049: shc_C2CD38 人源化单克隆抗体
FLISA hCD38 hlstag 平均值 (OD)
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0
EC50 = 0.14nM
0.01
0.1
1
10
mAb 浓度 (ug/ml)


800.18 pg/B hCD38
人 CD38
平均值 (OD)
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
EC50 = 0.68nM
0.01
0.1
1
10
100
mAb 浓度 (ug/ml)

[0015]


cynbCDp38;hlstag
cCb38;hlstag
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC50：0.14nM
0.01
0.1
1
10
cynbCDp38
cyno CD38
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
IC50：1.06nM
266.9%
1.60
0.01
0.1
10
100

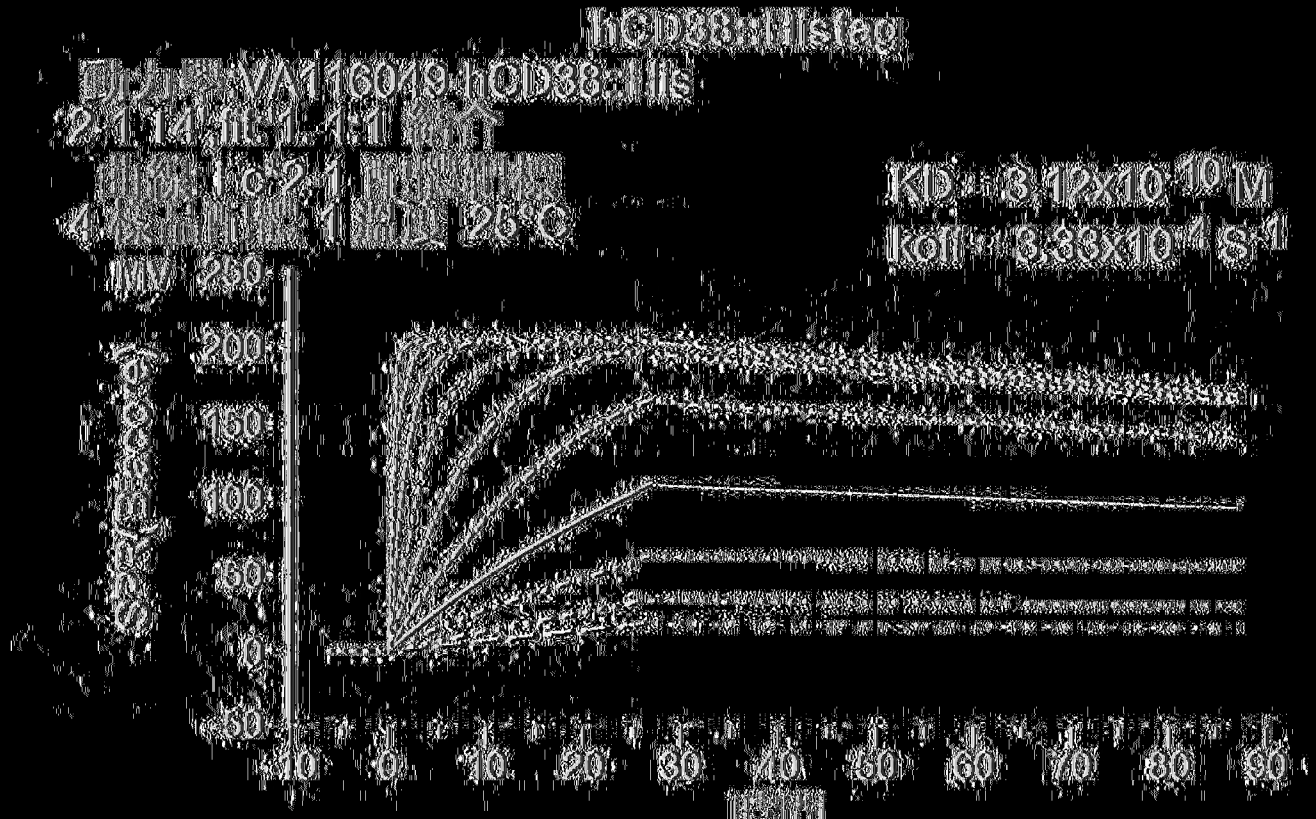
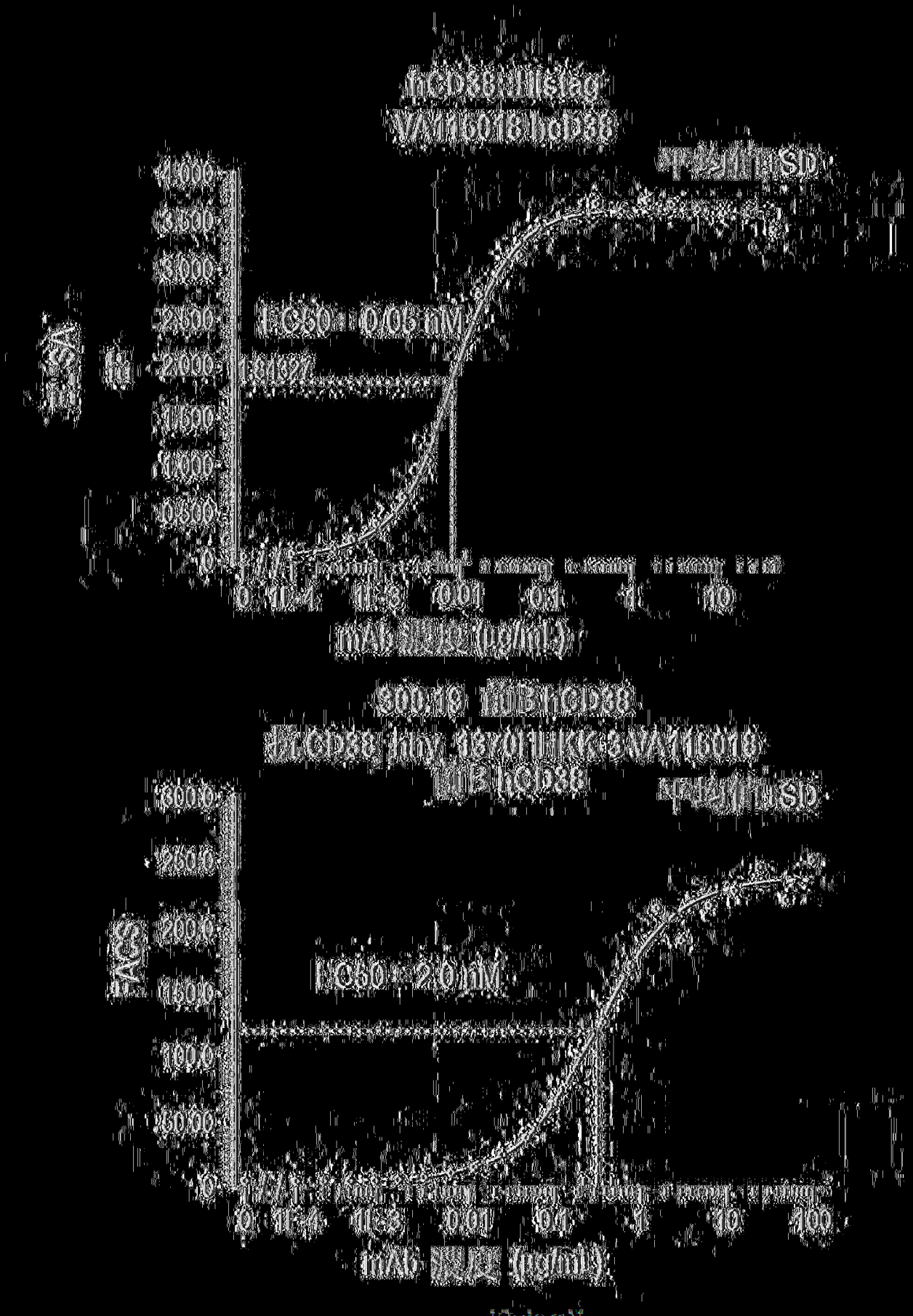
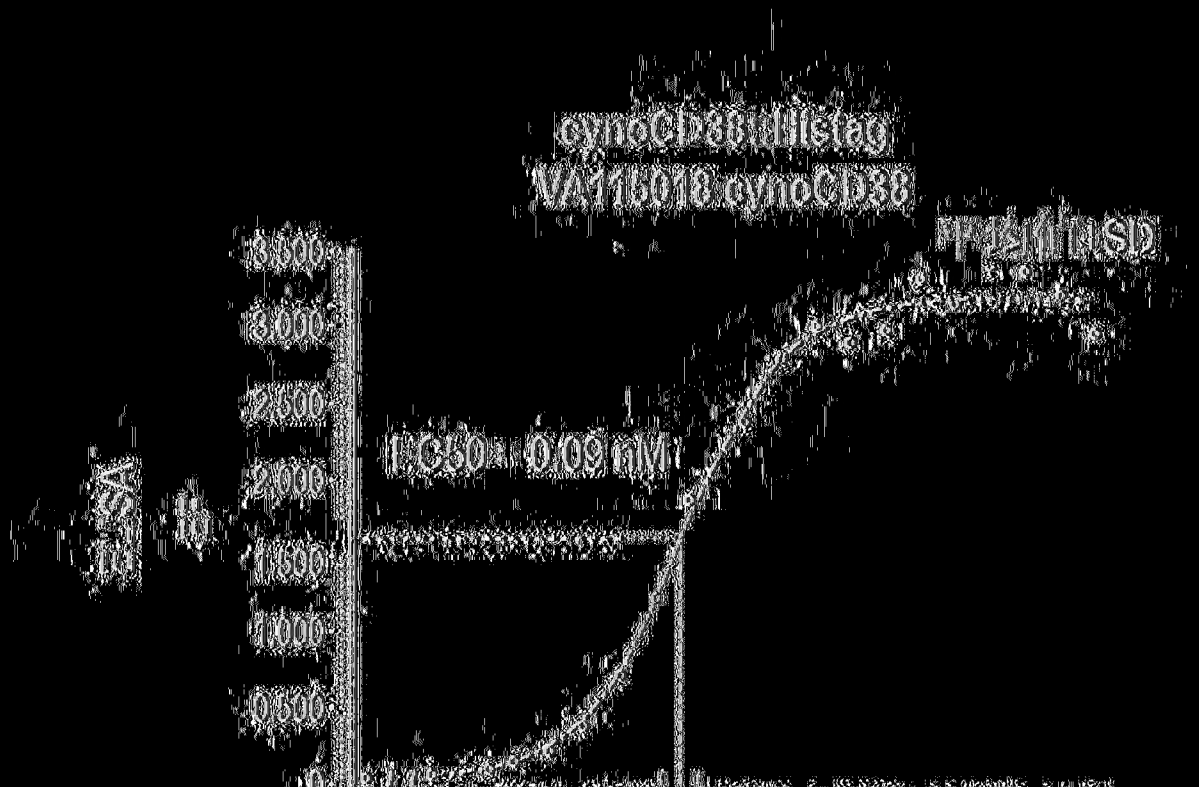
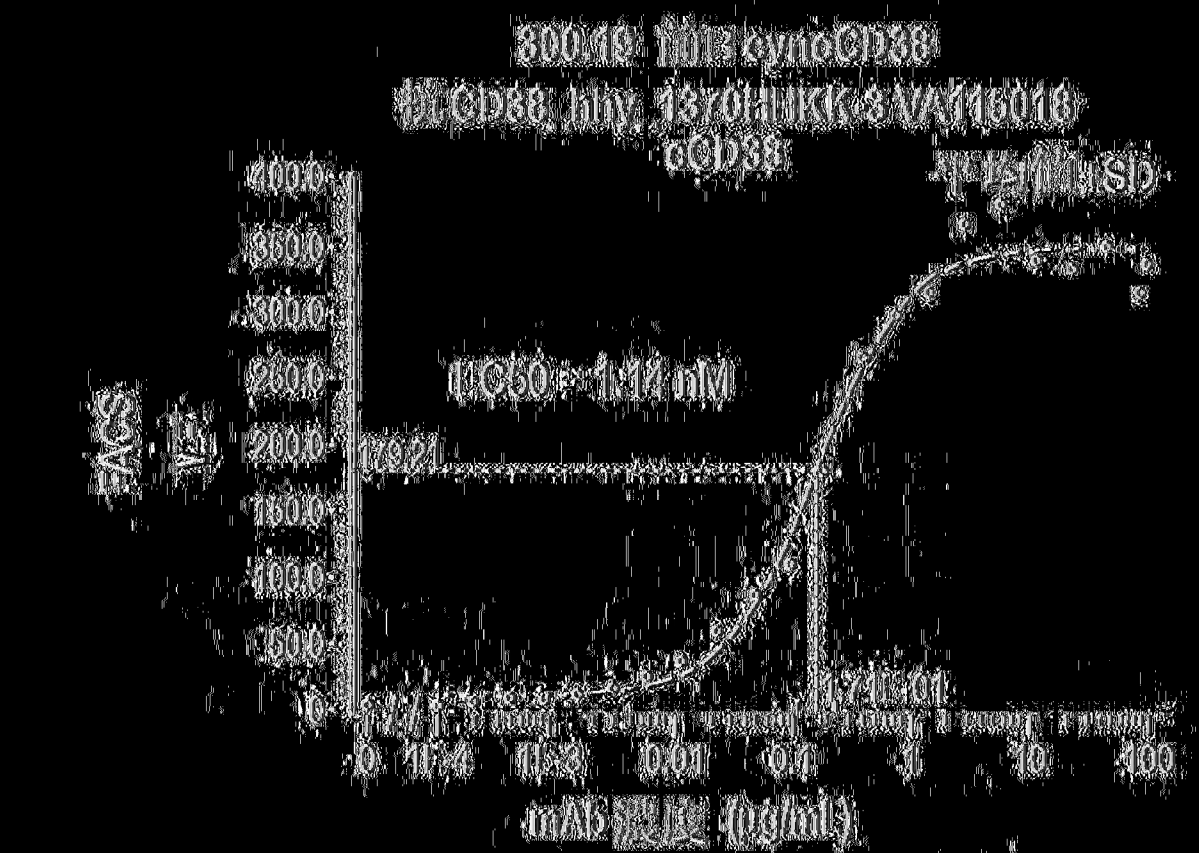

hCD38-His-tag
VA116049-hCD38-His
KD = 8.12x10^-10 M
koff = 3.38x10^-4 s^-1
RU
Time (s)
cyno CD38-His-tag
VA116049-cCD38-His
KD = 6.63x10^-10 M
koff = 1.76x10^-4 s^-1
RU
Time (s)

圖 21

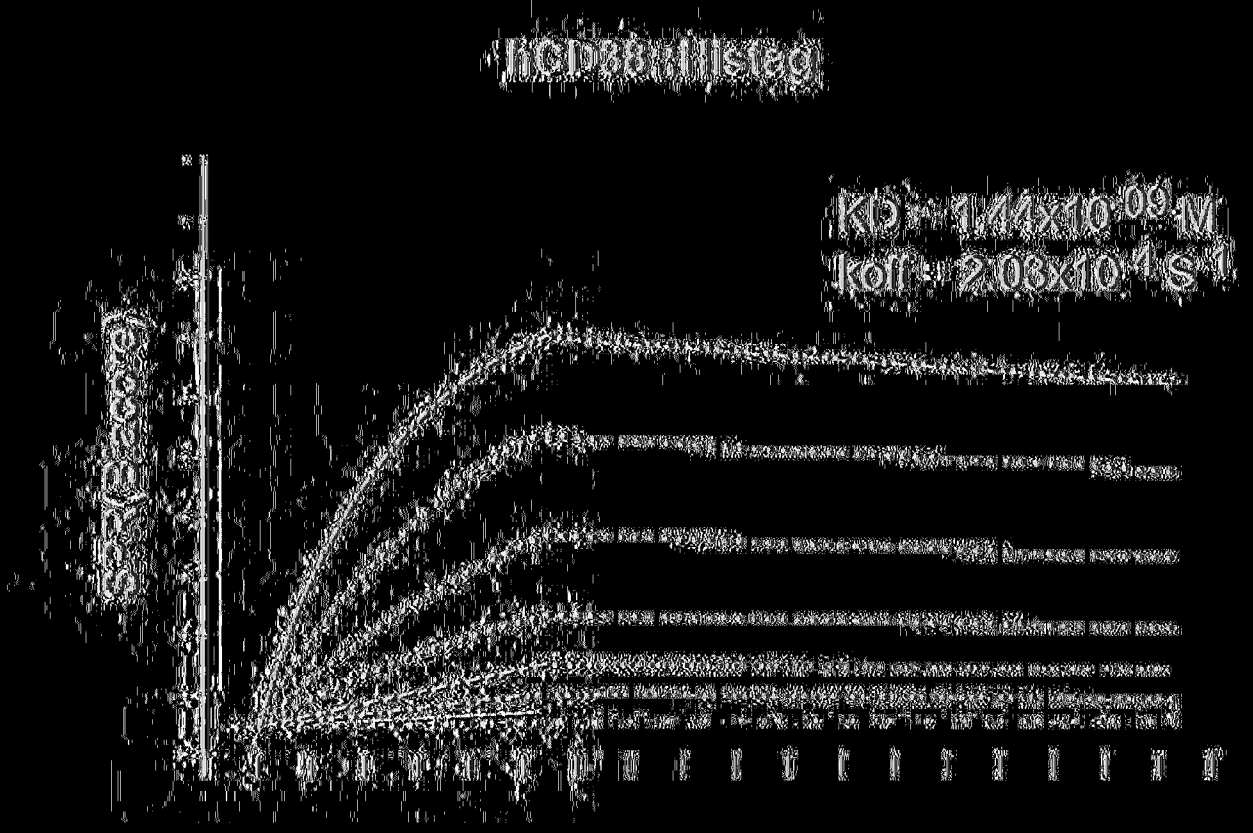

hCD38-His tag
V-1n6018hcd38
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.0
0.01
0.1
1
10
100
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.00
0.0
0.01
0.1
1
10
100

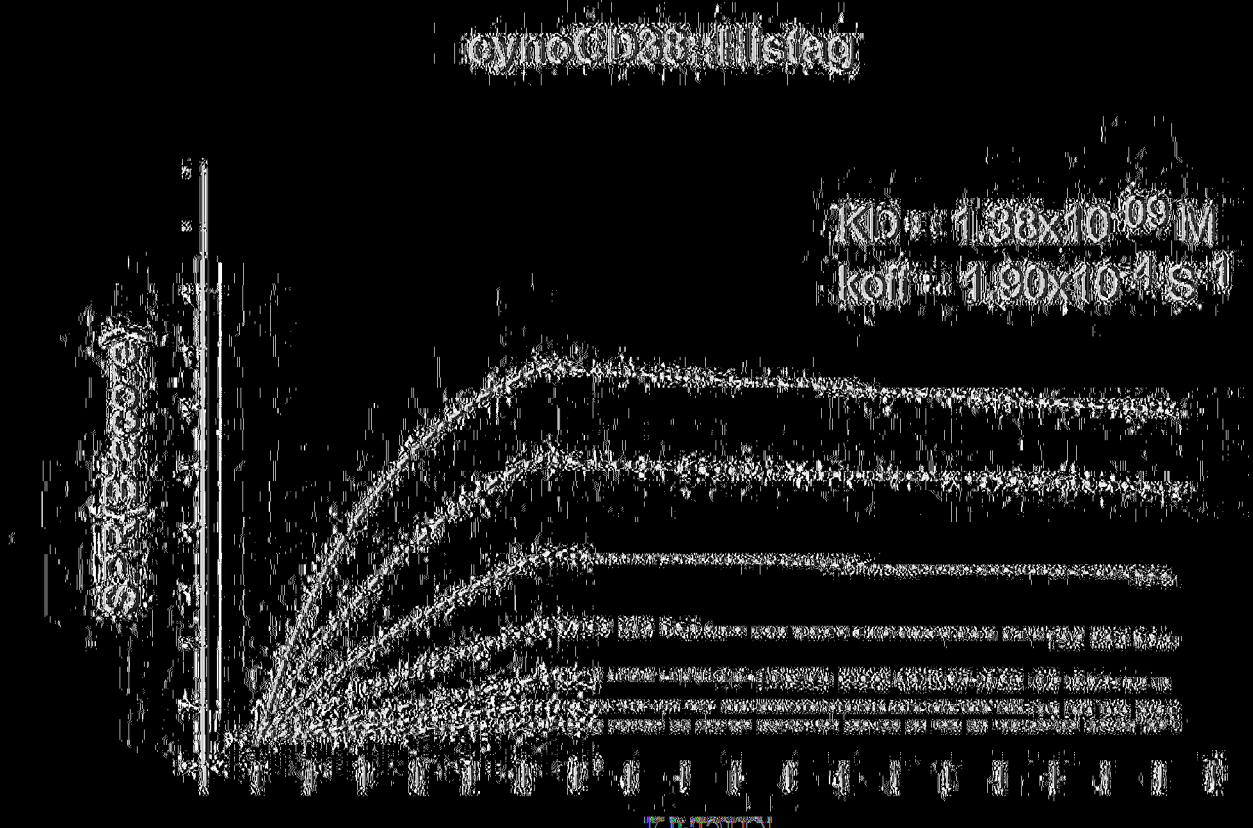
[(P-)2G]


cynoCD38.His tag
VA116018 cynoCD38
平均值 (nM)
3,500
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0.500
0
IC50 = 0.09 nM
0
0.4
1E-3
0.01
0.1
1
10
mAb 濃度 (ug/ml)

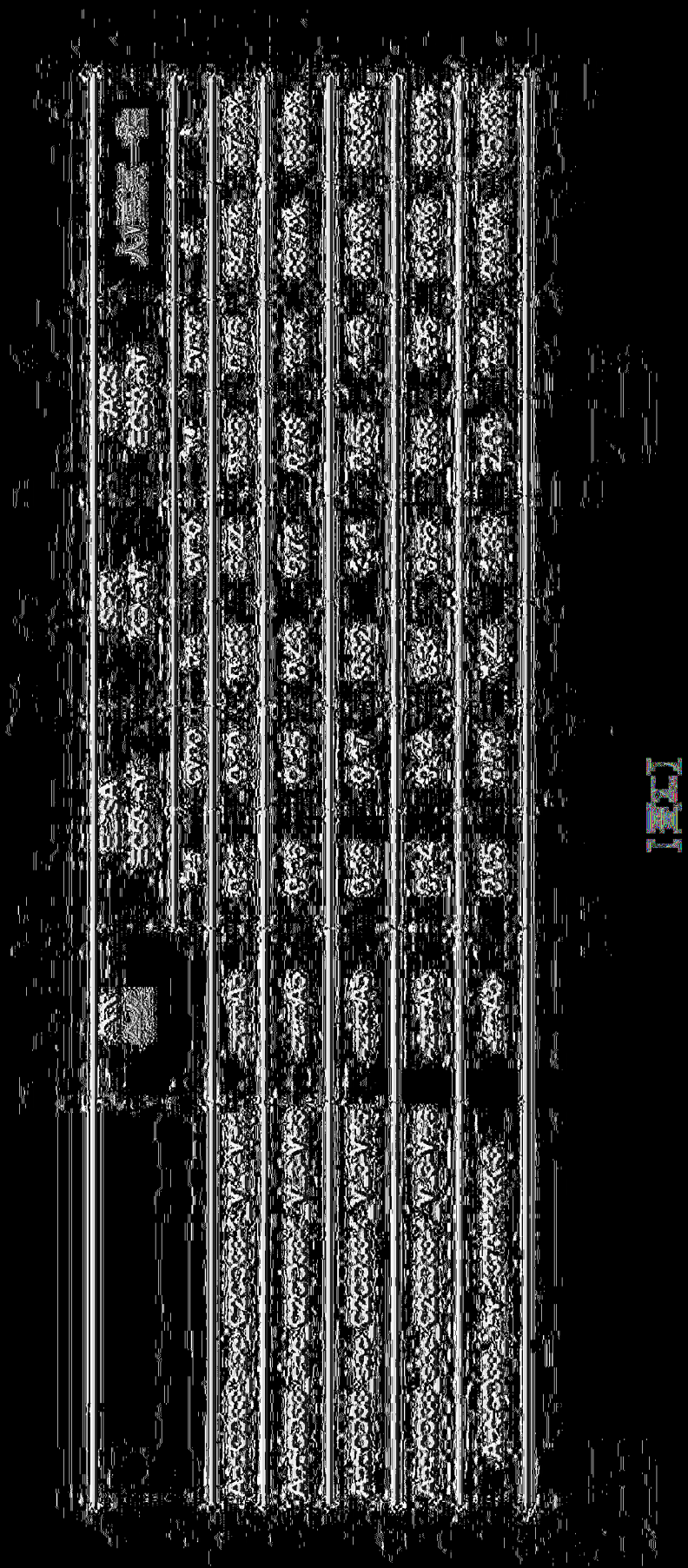

800 18 nM cynoCD38
抗CD38 hhy 1370HHKK-3 VA116018
cCD38
平均值 (nM)
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
IC50 = 1.14 nM
170.21
0
0.4
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
mAb 濃度 (ug/ml)

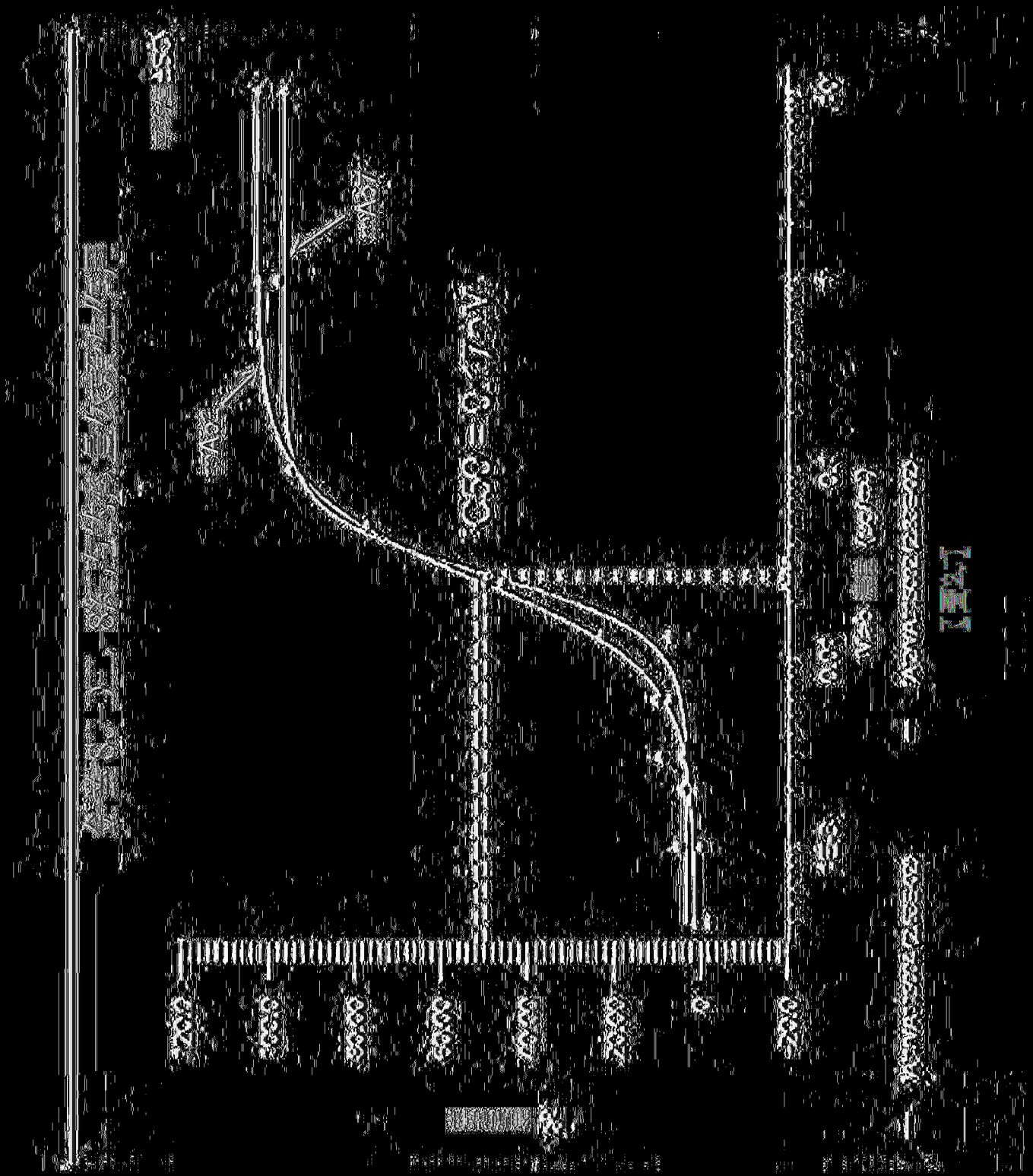
[圖2G] (續)

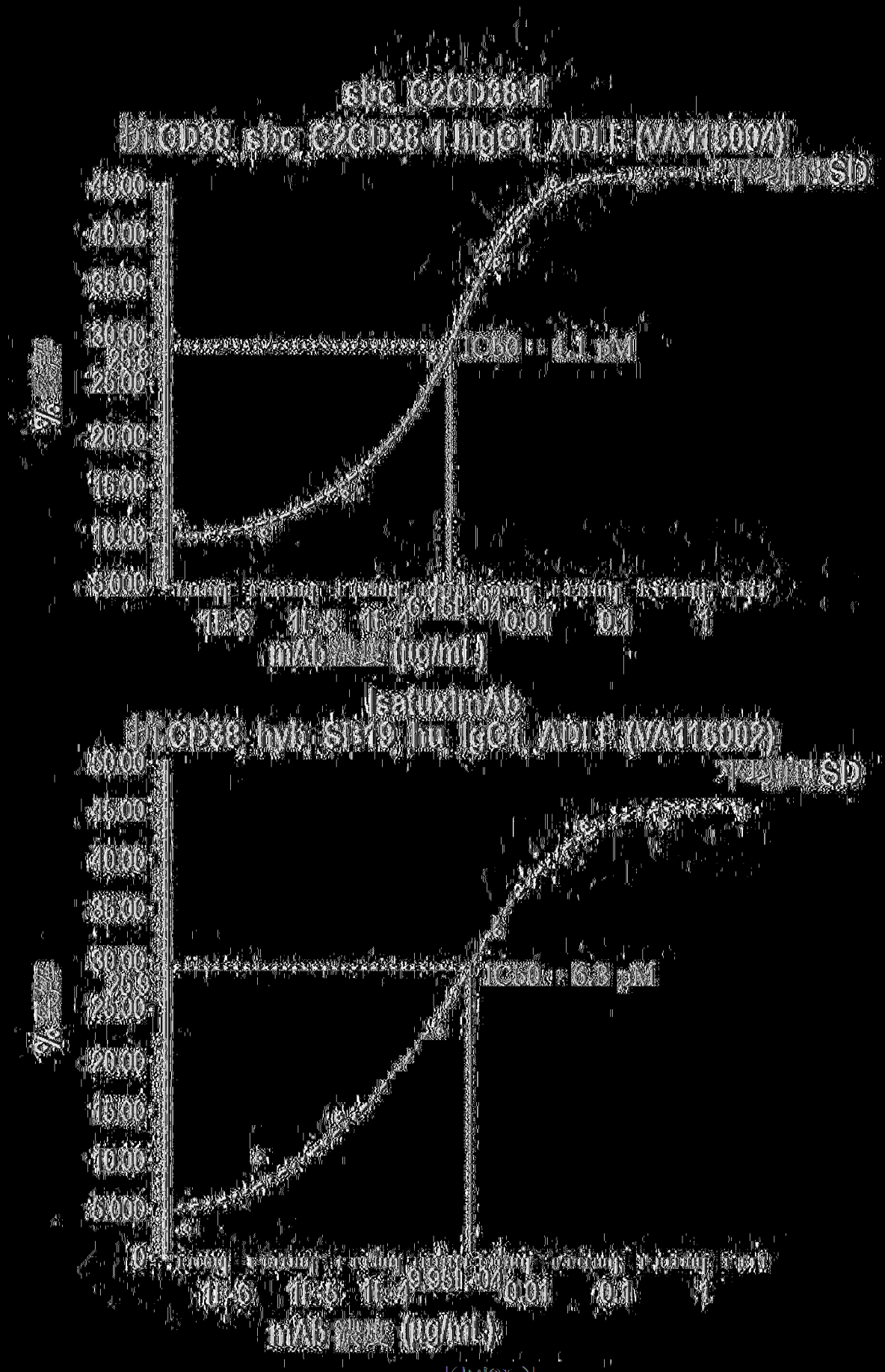

hCD38-His tag
KD = 1.14x10-09 M
koff = 2.08x10-4 S-1
Response (RU)


cynoCD38-His tag
KD = 1.38x10-09 M
koff = 1.90x10-4 S-1
Response (RU)

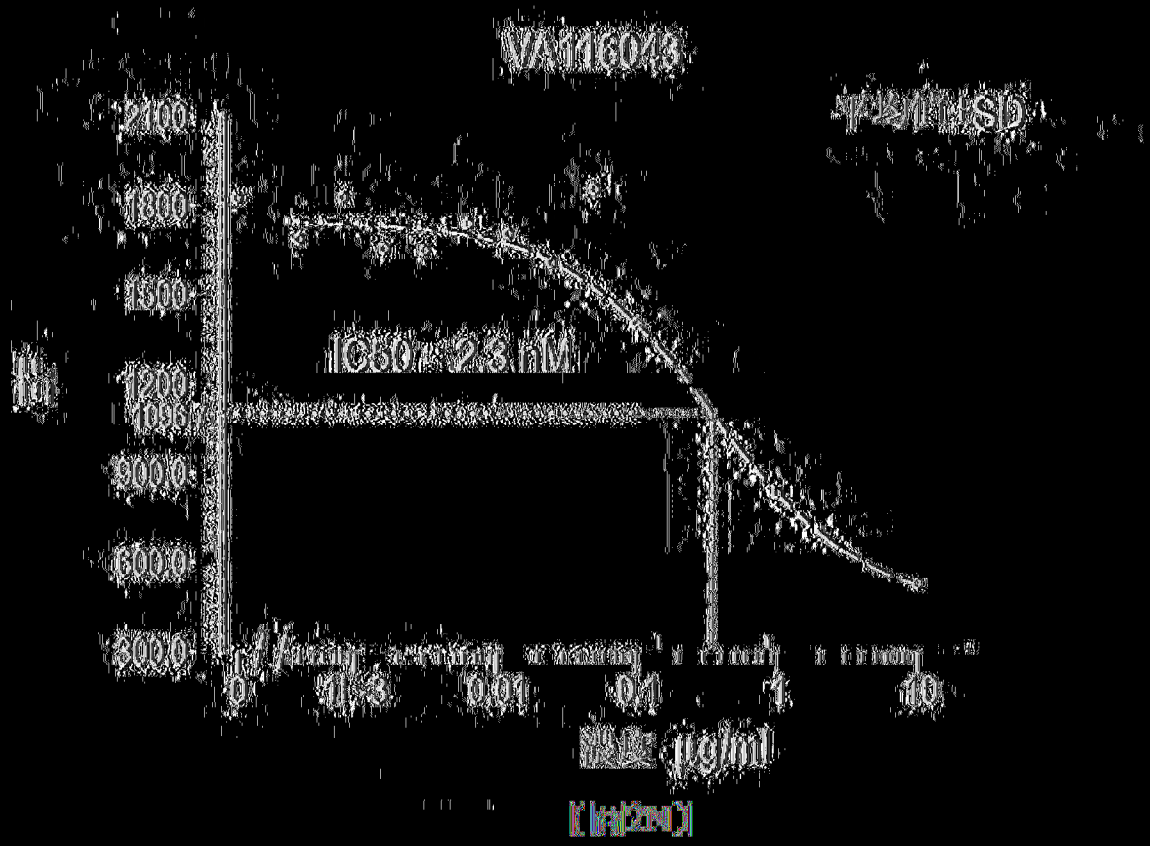
[圖21D]

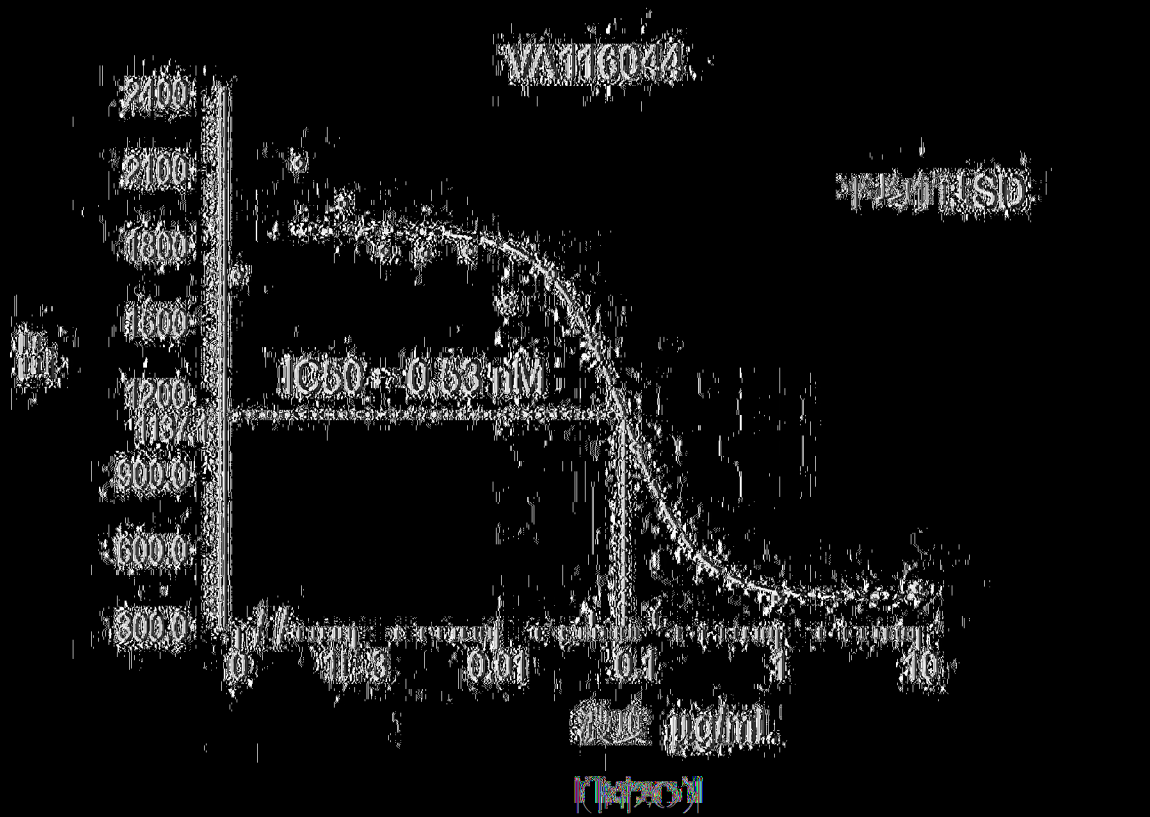





sbc (C2C)38.1
fig.C)38 sbc C2C)38.1 hlg01 ADLE (VA116002)
45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.000
0
11.6
11.5
11.4
0.01
0.1
1
mAb (ug/mL)
fig.C)38 hvlv SI319 luu lgG1 ADL3 (VA116002)
45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.000
0
11.6
11.5
11.4
0.01
0.1
1
mAb (ug/mL)




VA116043
IC50 = 2.3 nM
2400
1800
1500
1200
900.0
600.0
300.0
0
0.3
0.01
0.1
1
10
ug/ml


VA116044
IC50 = 0.53 nM
2400
2100
1800
1500
1200
900.0
600.0
300.0
0
0.3
0.01
0.1
1
10
ug/ml

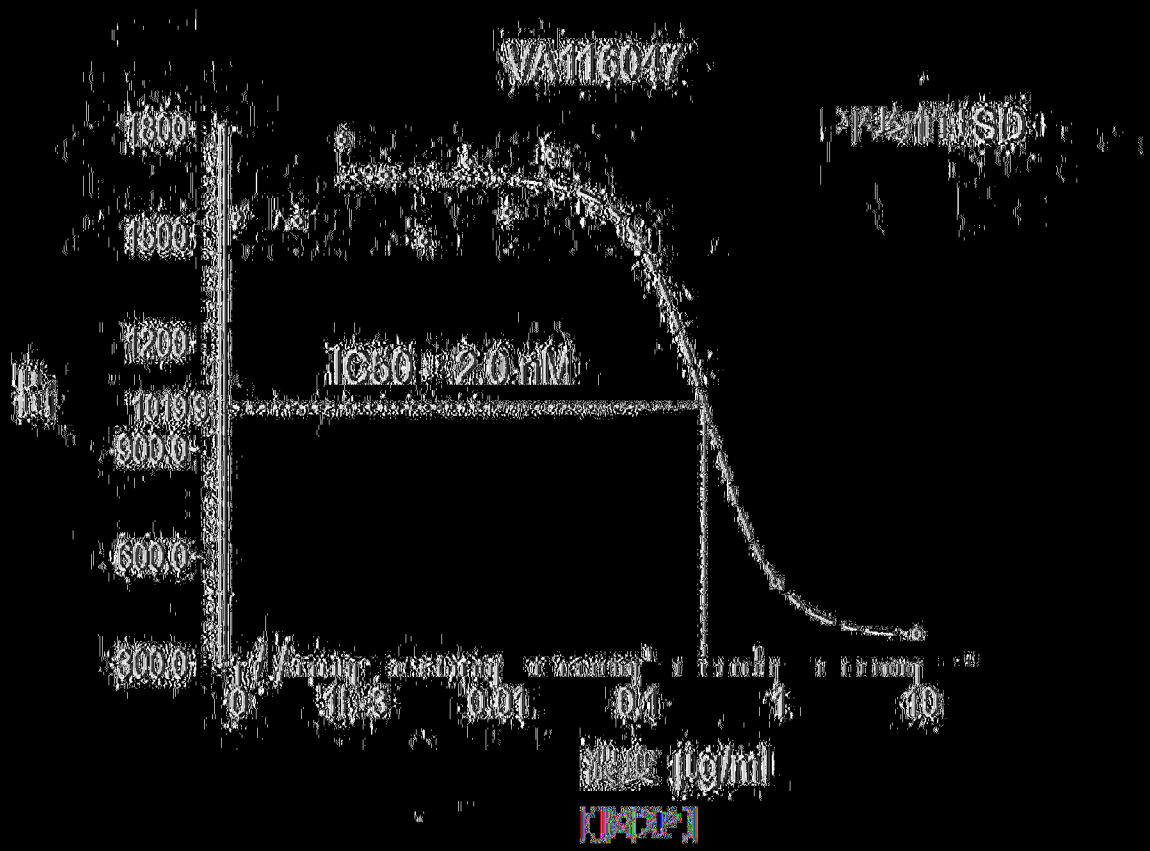

VA116047
1800
1500
1200
900.0
600.0
300.0
0
IC50 = 2.0 nM
0.001
0.01
1
10
濃度 μg/ml

圖 47

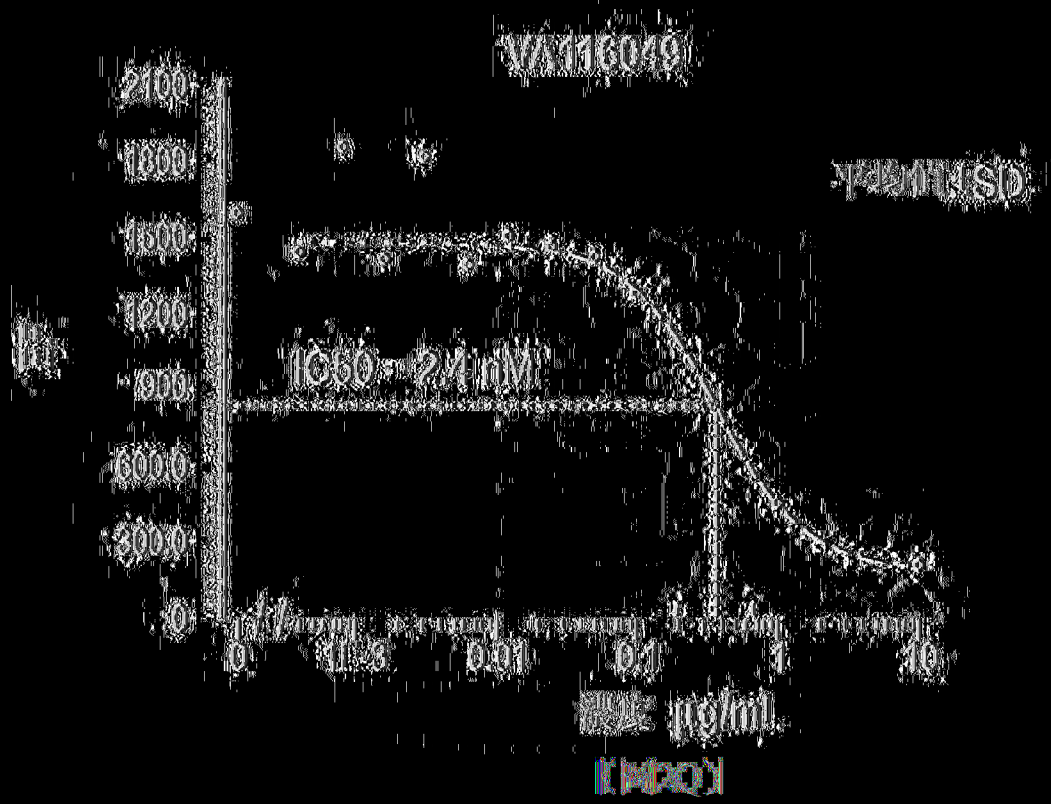
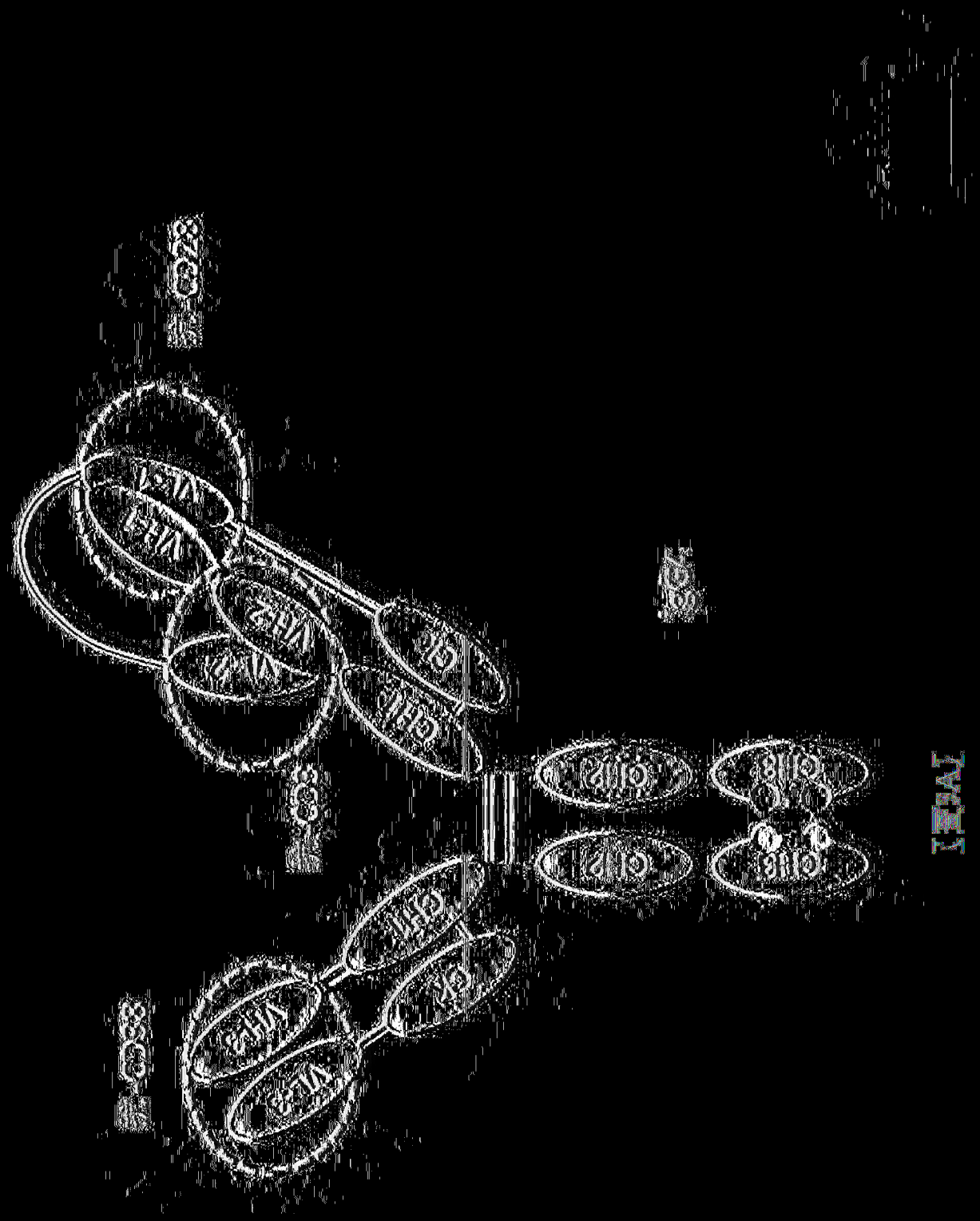
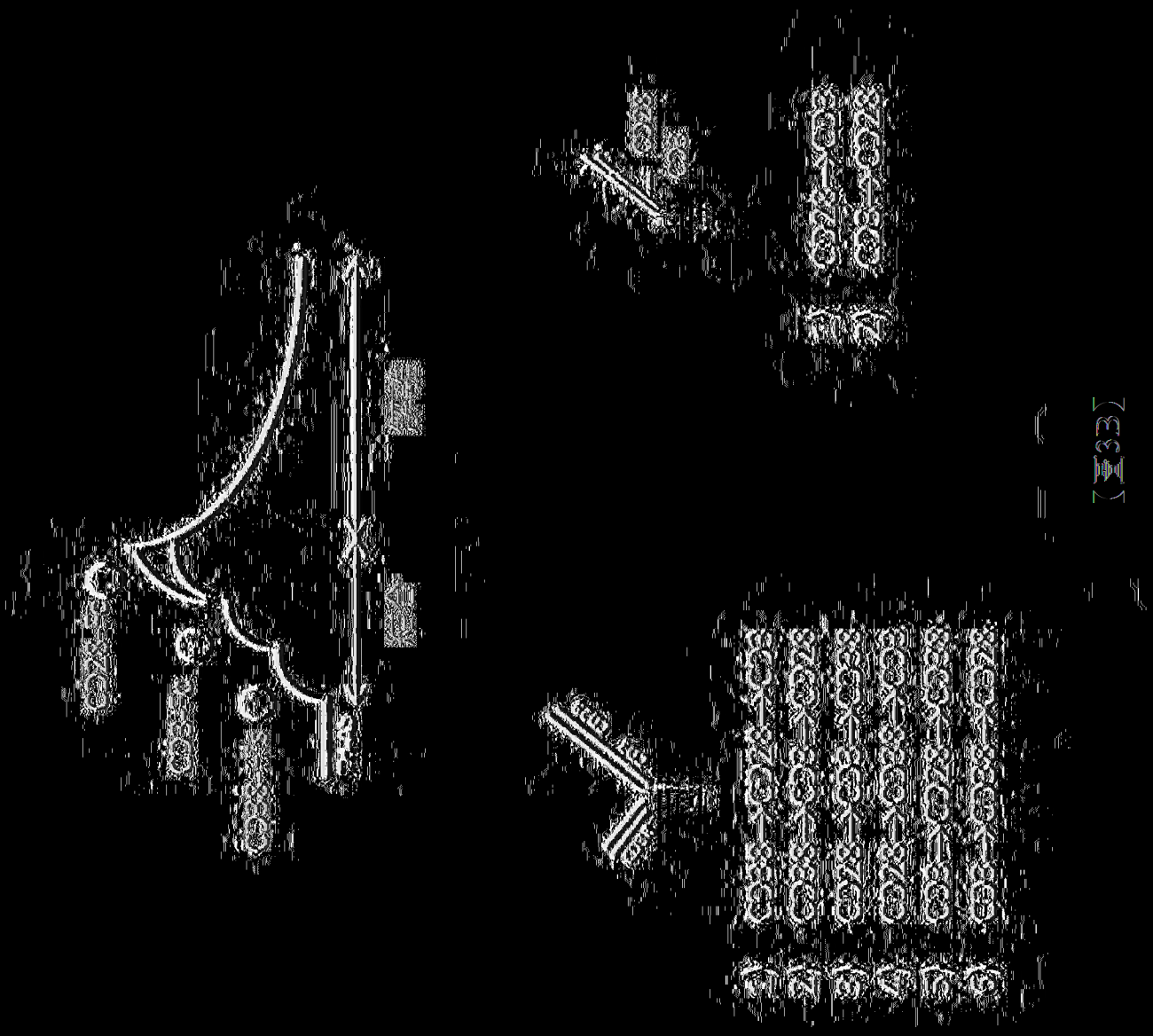
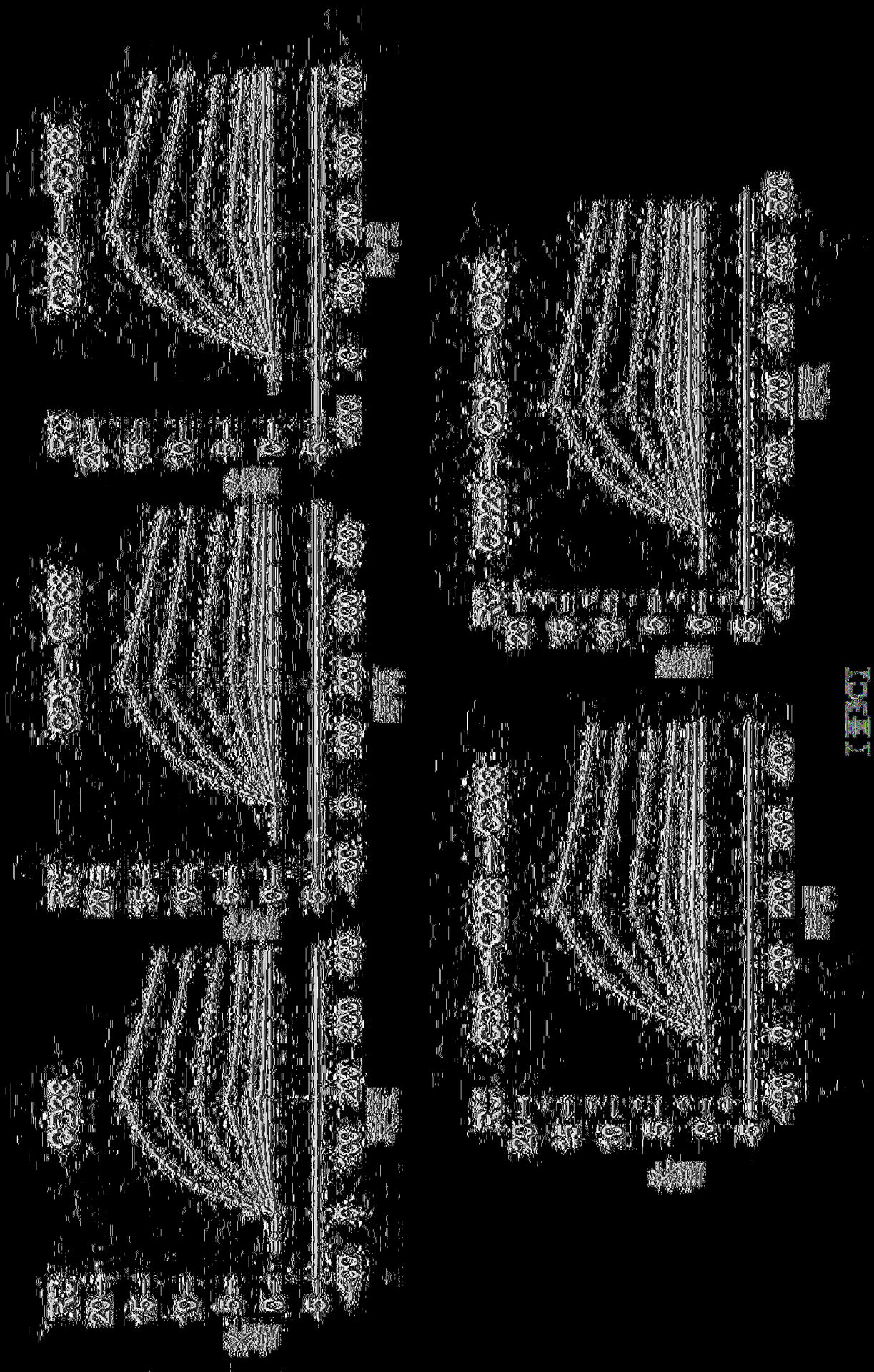
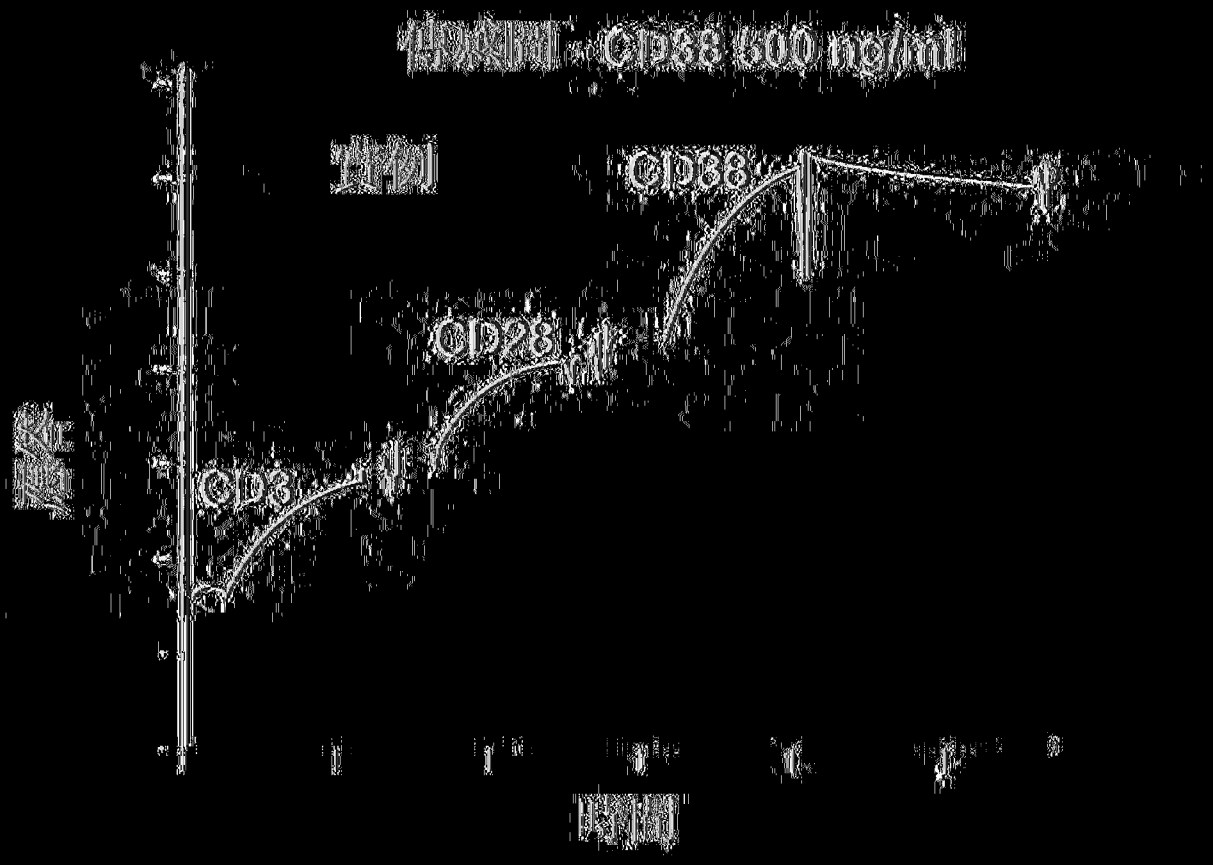

VA116049
2100
1800
1500
1200
900.0
600.0
300.0
0
IC50 = 2.4 nM
0.001
0.01
1
10
濃度 μg/ml

圖 48









圖(圖4)

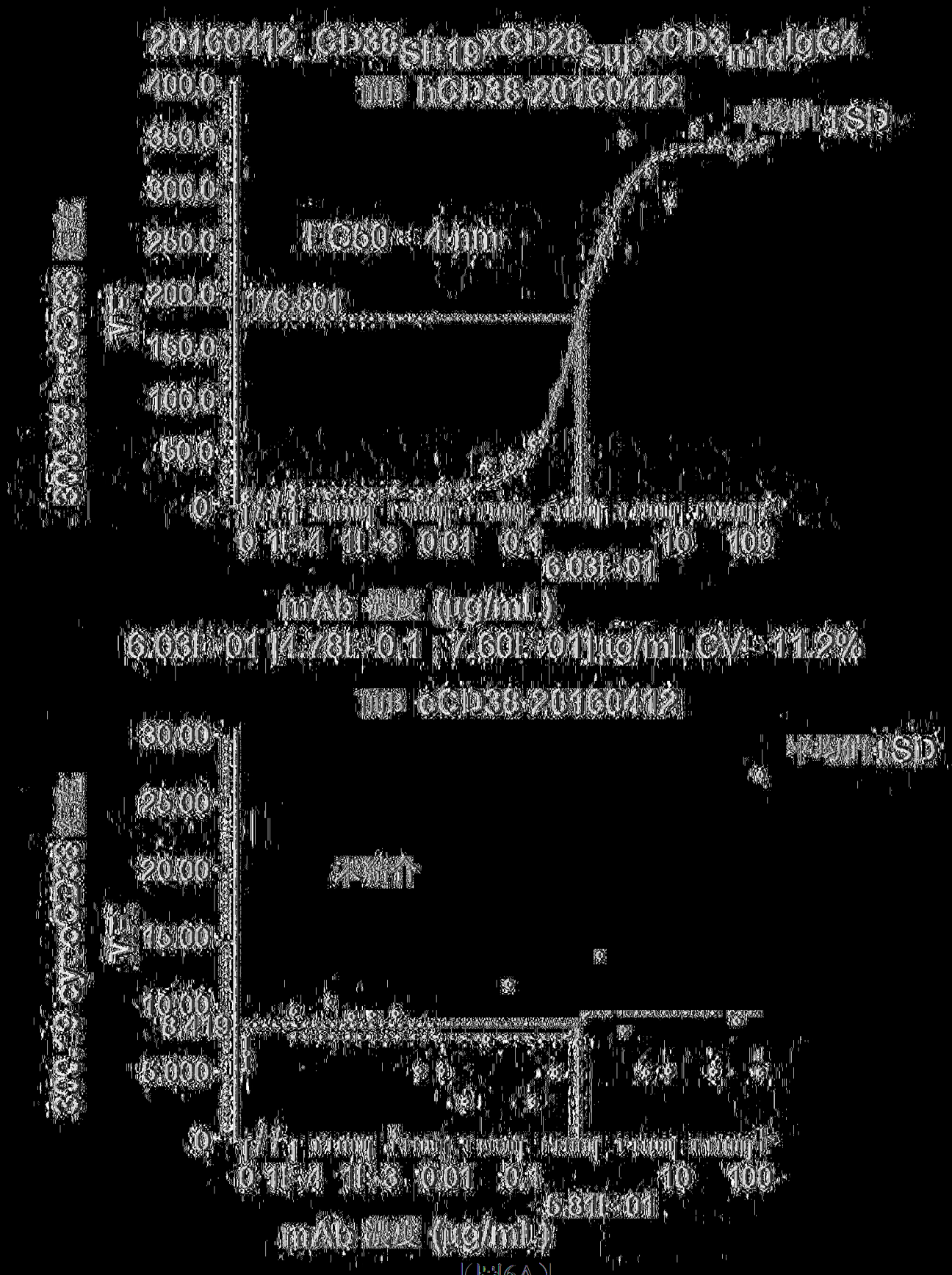
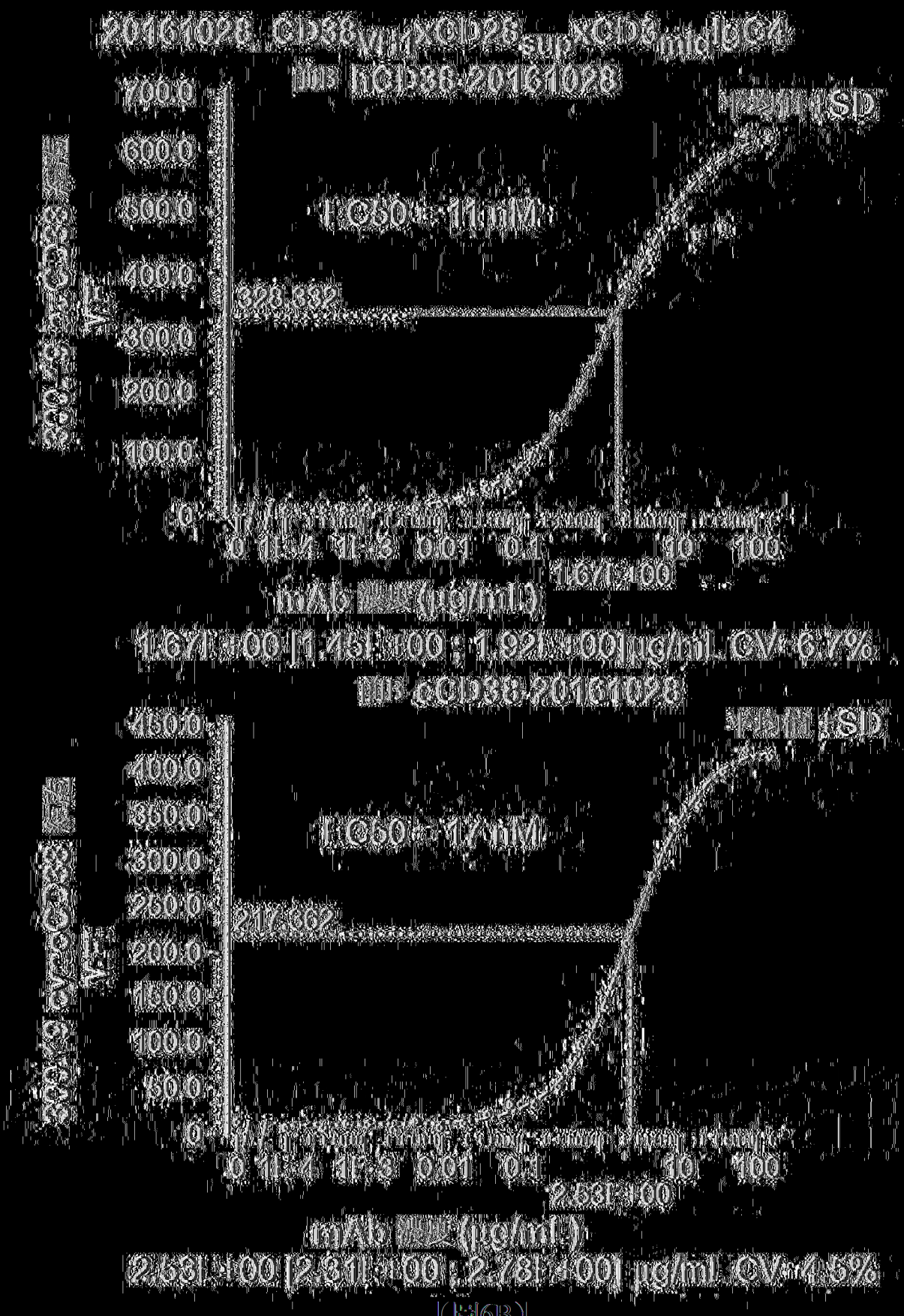

20160412_CD38_Std_CD28_sup_CD3_mid_gc4
hCD38_20160412
Std
IC50 = 4.hm
176.501
mAb 濃度 (ug/ml)
6.031E-01 1.478E-01 7.601E-01 ug/ml CV = 112%
hCD38_20160412
Std
mAb 濃度 (ug/ml)

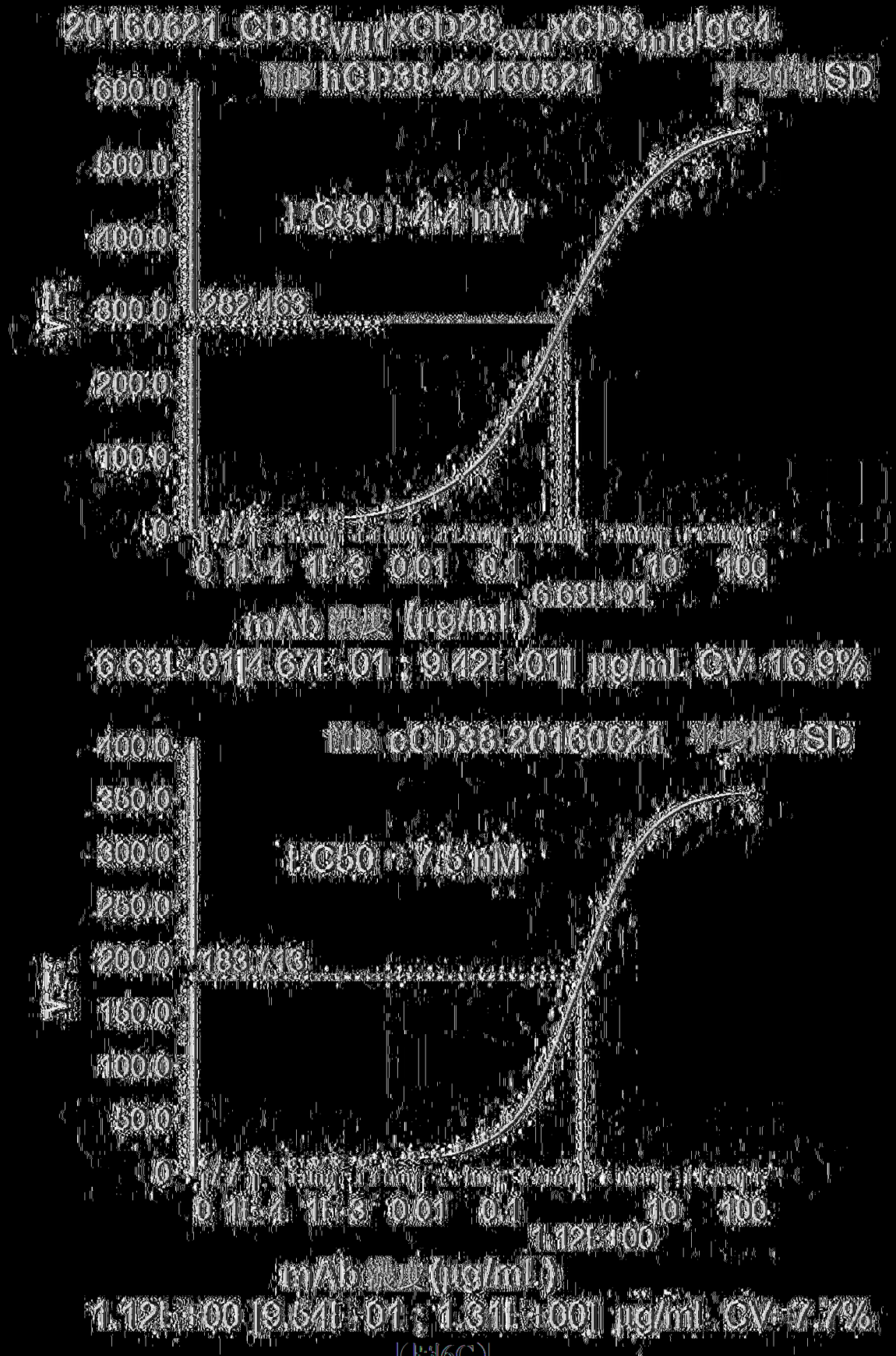
圖6A

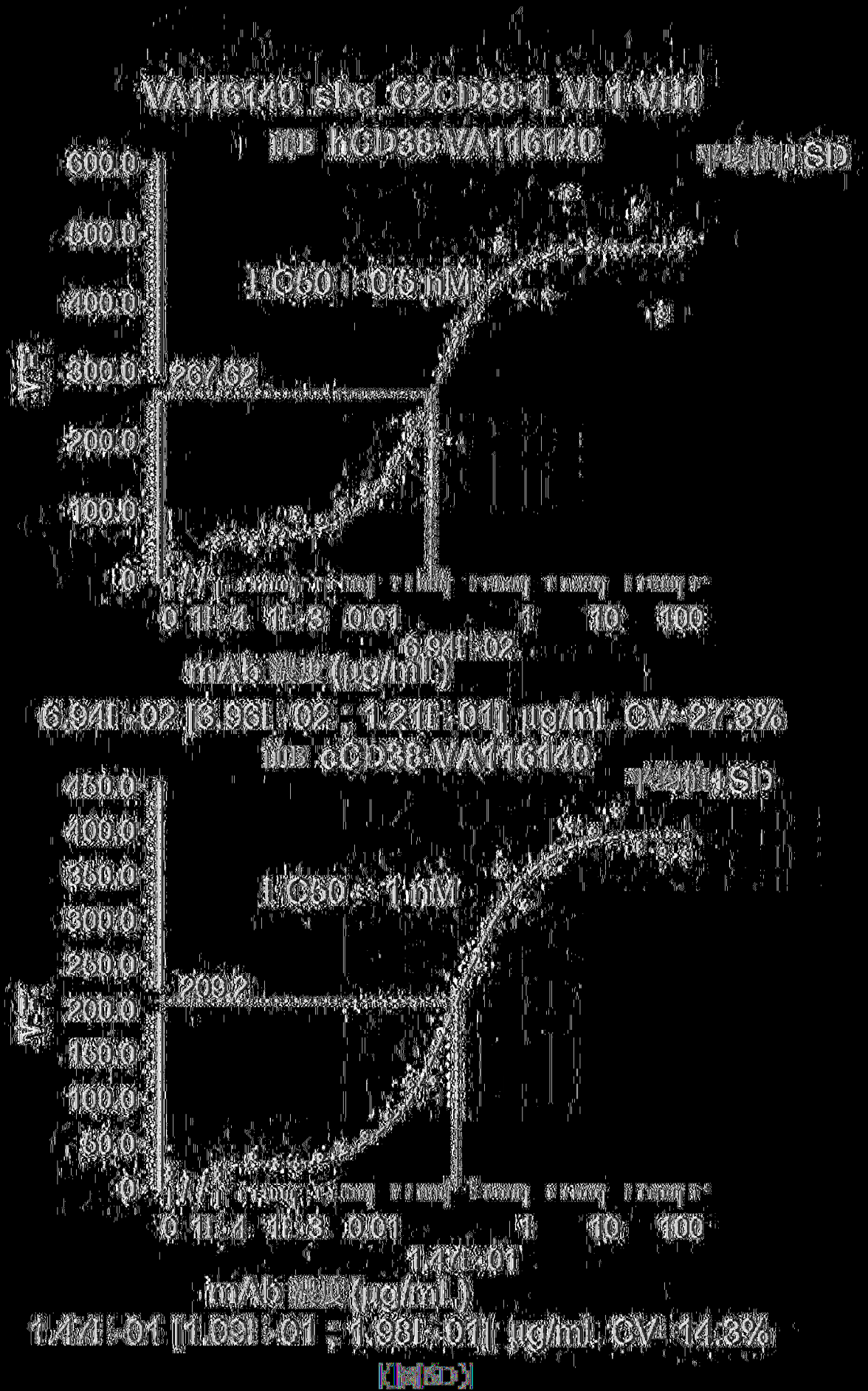

VA116149 SI519 ADI II SAI VA6108 6400
600.0
450.0
400.0
350.0
300.0
260.0
200.0
160.0
100.0
60.0
0
222.88
0 10 4 11 3 0.01 1 10 100
mAb 濃度 (ug/ml)
Y 621 02 15 601 02 1 041 01 ug/ml CV 14.8%
21.00
18.00
16.00
12.00
9.000
6.000
3.000
2.159
0 10 4 11 3 0.01 0.1 1 10
mAb 濃度 (ug/ml)

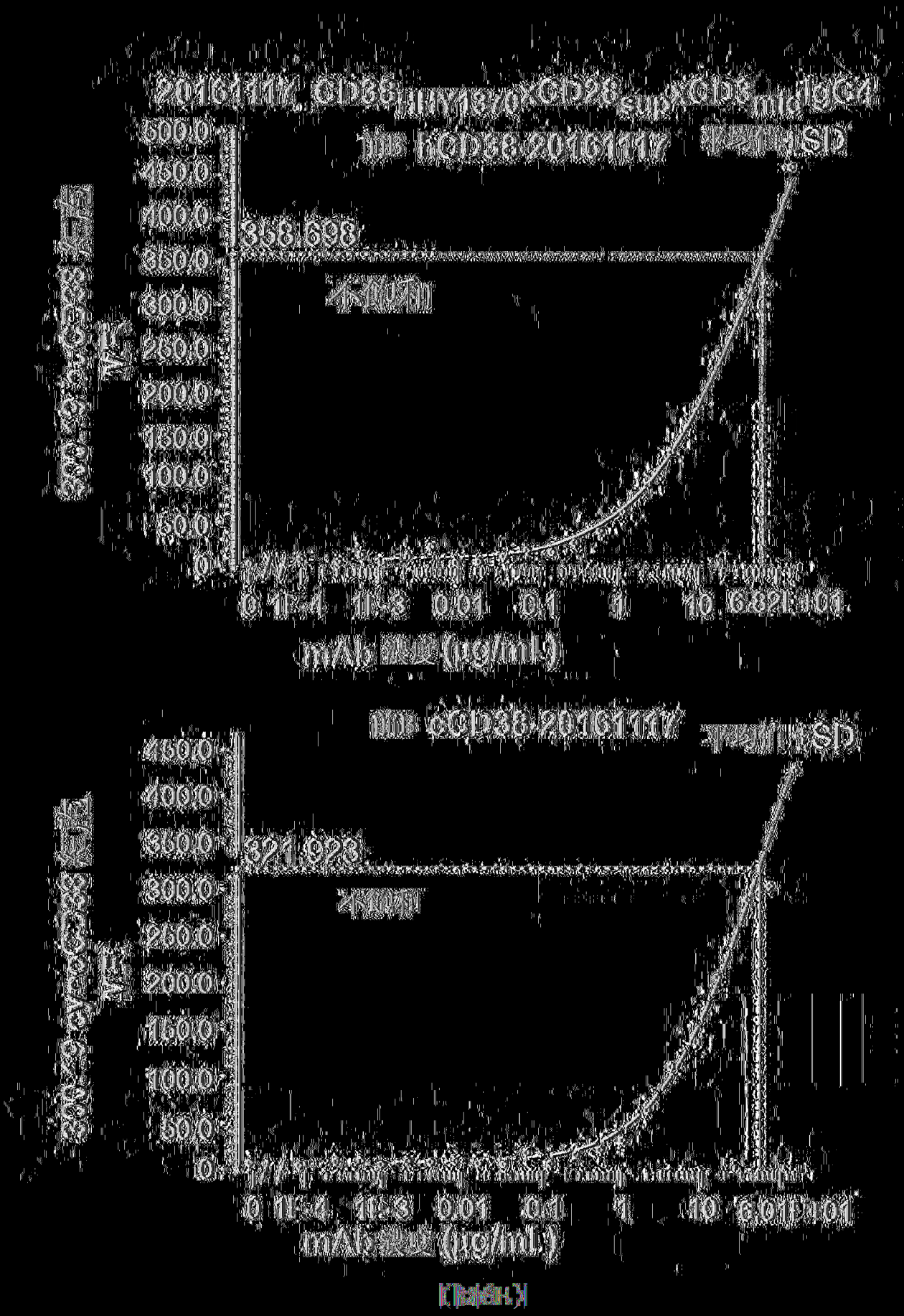
[圖6A] (續)

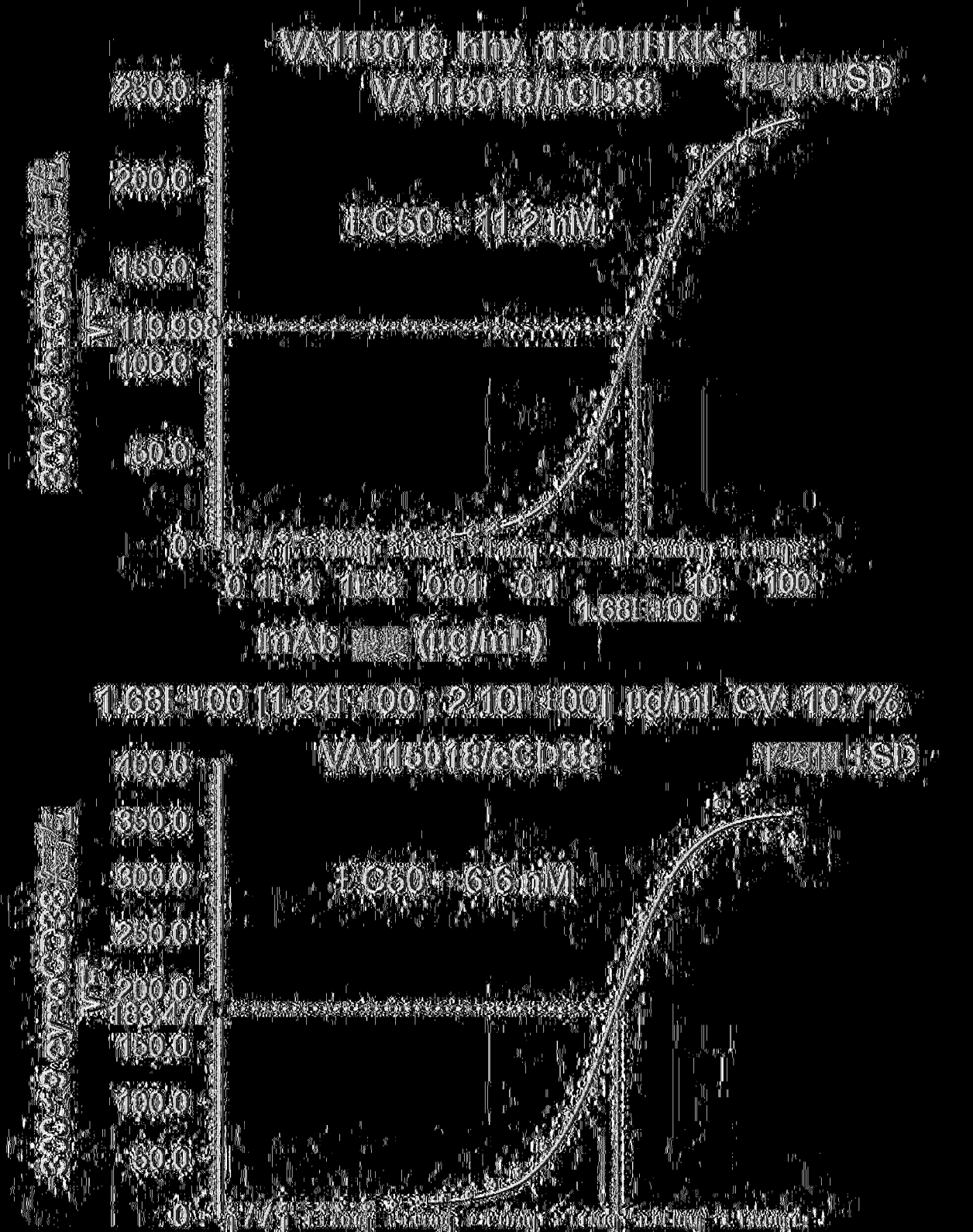

20161028_CD38_VH1xCD28_supxCD3_mid_log_4
hCD38-20161028
700.0
600.0
500.0
400.0
328.382
300.0
200.0
100.0
0
0.114
1.143
0.001
0.1
10
100
1.67E+00
mAb 濃度 (μg/mL)
1.67E+00 [1.45E+00 - 1.92E+00] μg/mL CV: 6.7%
hCD38-20161028
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
217.662
200.0
150.0
100.0
50.0
0
0.114
1.143
0.001
0.1
10
100
2.53E+00
mAb 濃度 (μg/mL)
2.53E+00 [2.31E+00 - 2.78E+00] μg/mL CV: 4.6%

(圖6B)

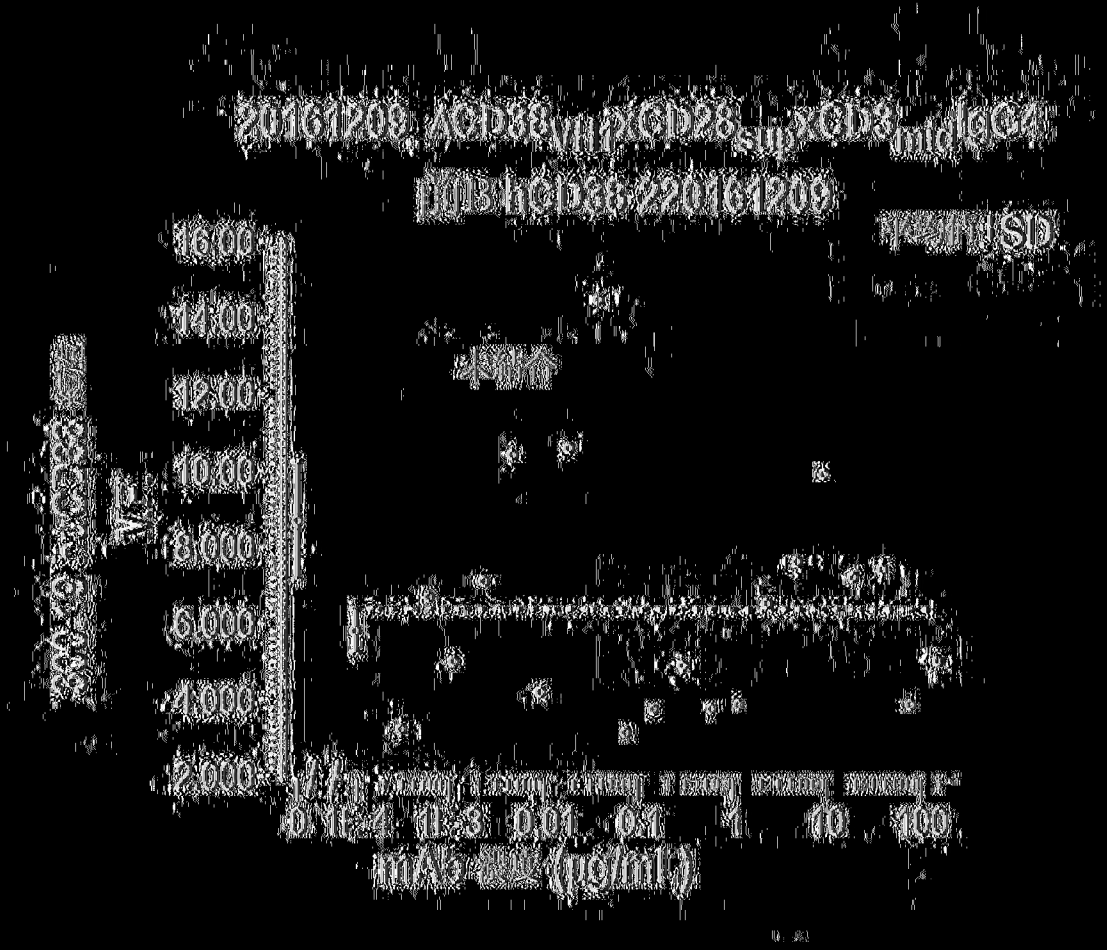

20160621_CD38_VHH×CD28_cyn×CD3_mid_gC4
hCD38_20160621
Mean ± SD
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
EC50 : 4.4 nM
282,463
0.01
0.1
1
10
100
(mAb 濃度 (μg/ml))
[6.63E-01 : 4.67E-01 : 9.42E-01] μg/ml CV: 16.9%
cCD38_20160621
Mean ± SD
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
EC50 : 7.6 nM
183,716
0.01
0.1
1
10
100
(mAb 濃度 (μg/ml))
[1.12E+00 : 8.54E-01 : 1.31E+00] μg/ml CV: 7.7%

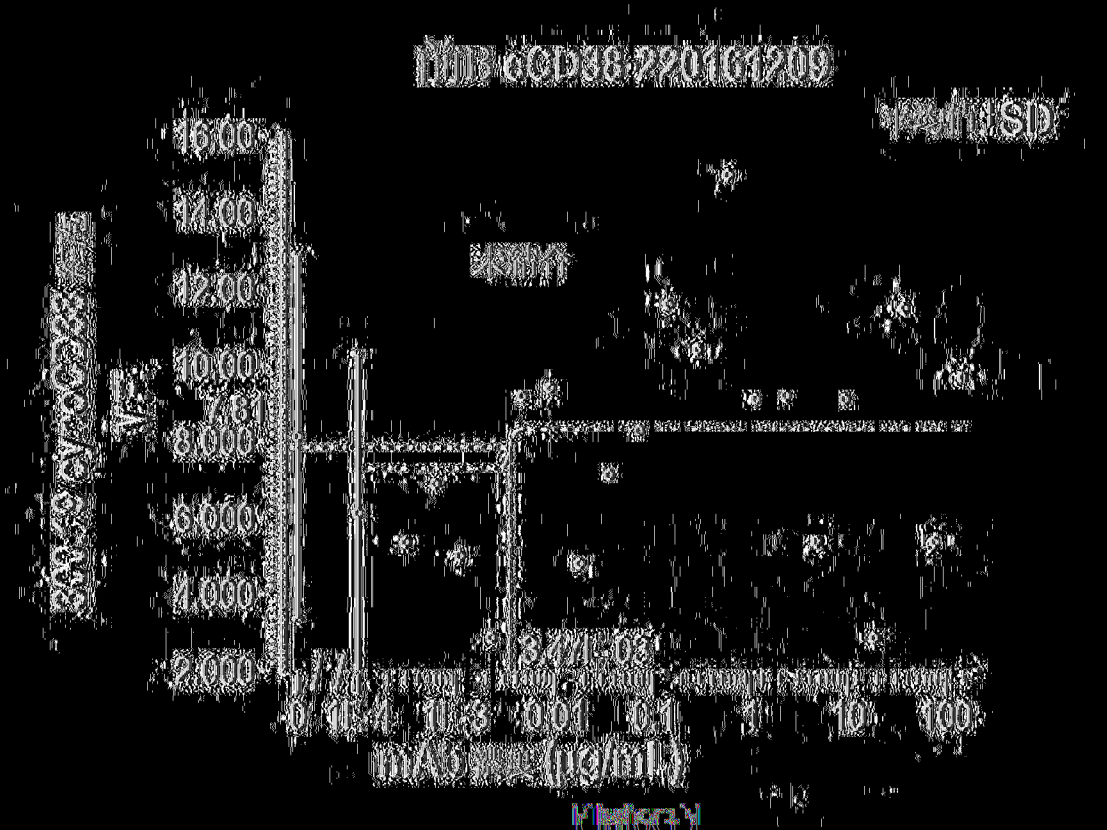

VA116140 sbc C26D38-1 VH1 VH1
hC26D38 VA116140
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0
1 C60 0.5 nM
267.62
0.01
1
10
100
6.94E-02
mAb濃度(μg/mL)
6.94E-02 6.96E-02 1.21E-01 μg/mL CV 27.3%
hC26D38 VA116140
160.0
400.0
360.0
300.0
260.0
200.0
160.0
100.0
60.0
0
1 C60 1 nM
209.2
1.47E-01
1.47E-01 1.09E-01 1.98E-01 μg/mL CV 14.3%

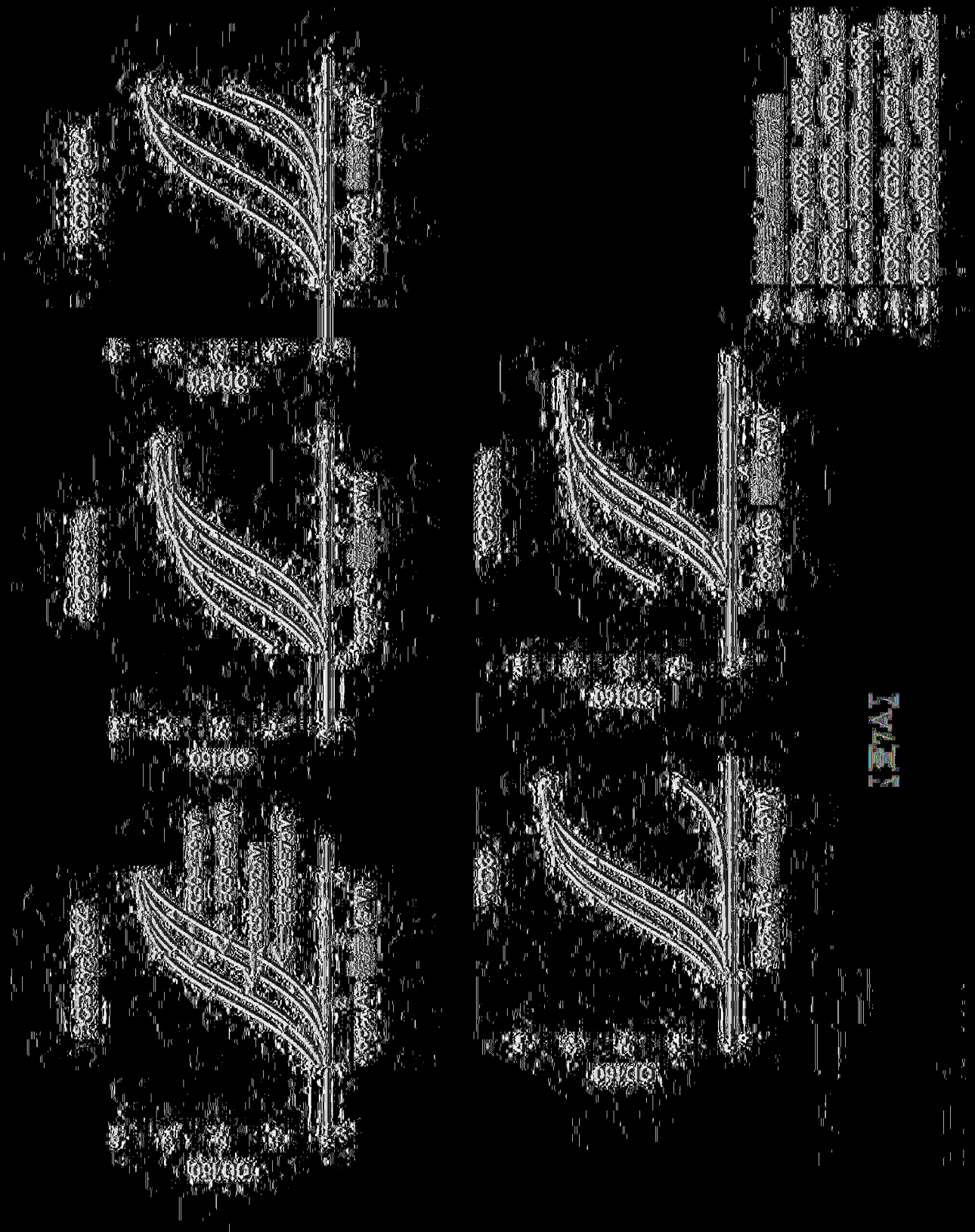

20161117_CD38HuMy1370xCD28supxCD3mIgG4
hCD38 20161117 不含Fc SD
500.0
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
358.698
不含Fc
0.01
0.1
1
10
6.821e-01
mAb濃度 (ug/mL)
hCD38 20161117 不含Fc SD
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0
321.923
不含Fc
0.01
0.1
1
10
6.01e-01
mAb濃度 (ug/mL)

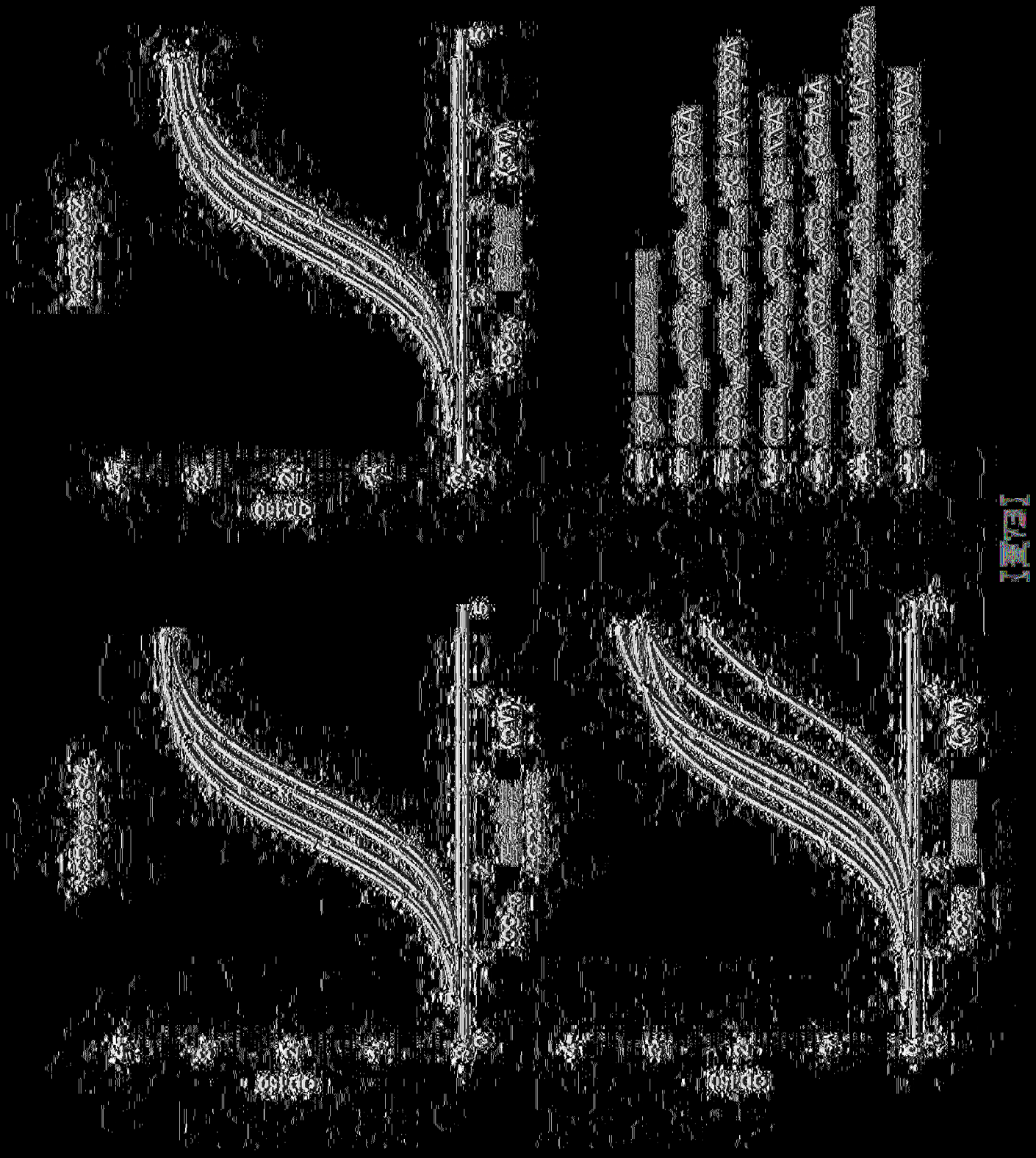

VA116018 kiiv 137011KK-8
VA116018/nCD38
250.0
200.0
150.0
119.98
100.0
50.0
0
0 11.4 11.8 0.01 0.1 1 10 100
1.68E+00
mAb 濃度 (μg/ml)
1.68E+00 [1.34E+00 ; 2.10E+00] μg/ml CV: 10.7%
VA116018/cCD38
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
183.47
150.0
100.0
50.0
0
0 11.4 11.8 0.01 0.1 1 10 100
mAb 濃度 (μg/ml)
9.97E-01 [9.91E-01 ; 1.00E+00] μg/ml CV: 10.6%

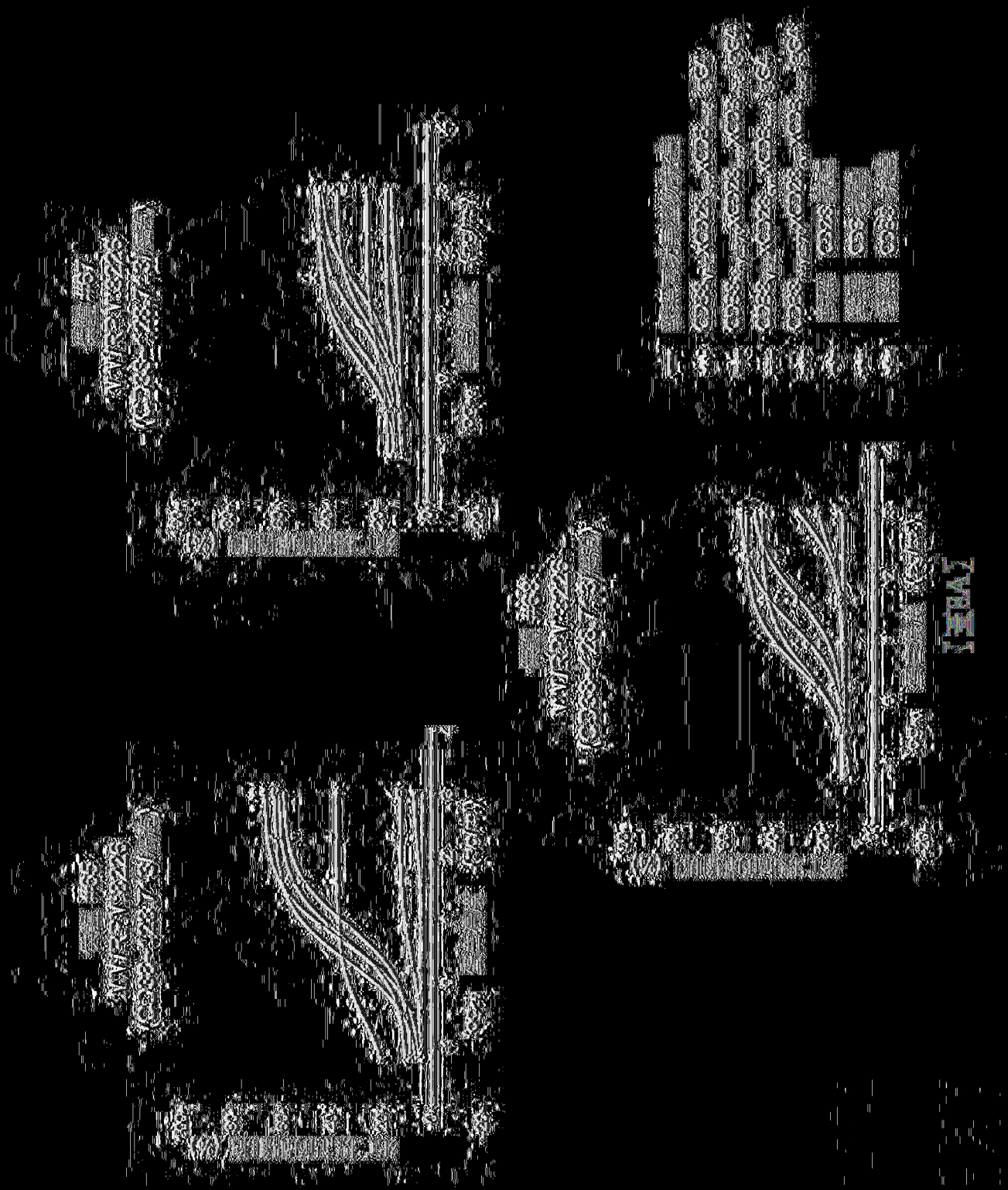
(圖6E) (續)

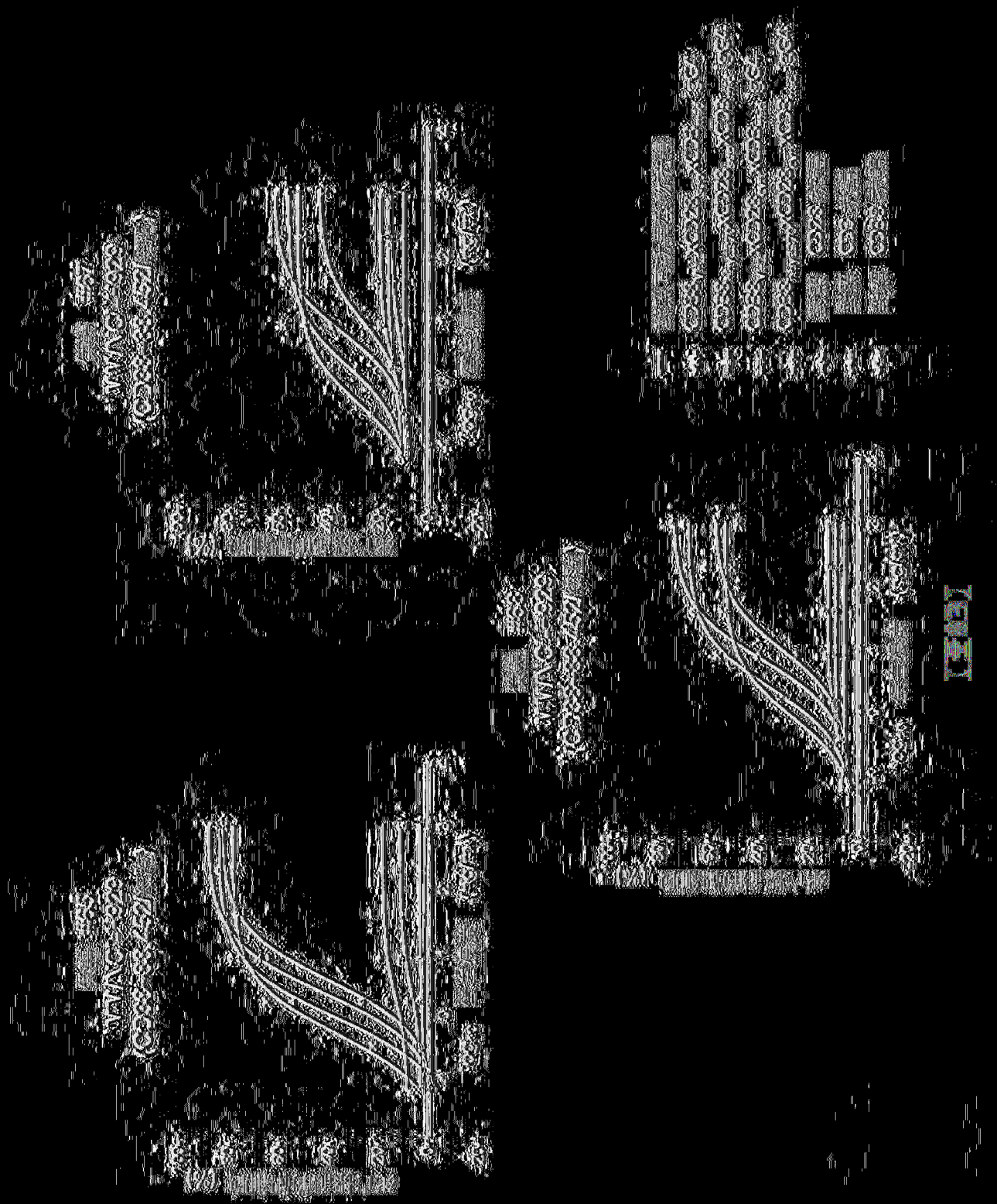

20161209 hCD38 vHH hCD38 stp hCD38 mIgG4
hCD38 220161209
16.00
14.00
12.00
10.00
8.000
6.000
4.000
2.000
0.01
0.1
1
10
100
mAb 濃度 (μg/mL)

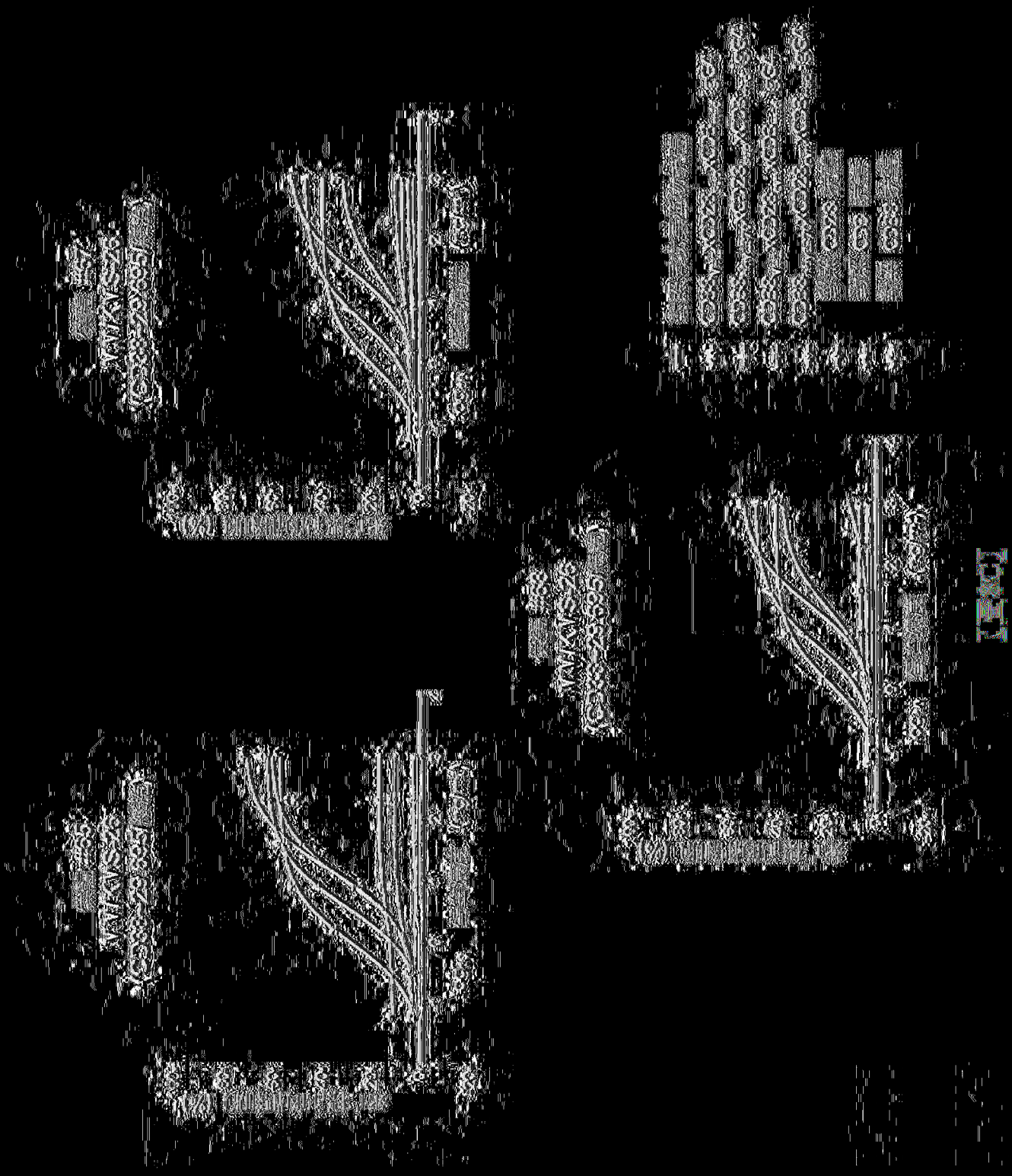

hCD38 220161209
16.00
14.00
12.00
10.00
8.000
6.000
4.000
2.000
0.01
0.1
1
10
100
mAb 濃度 (μg/mL)

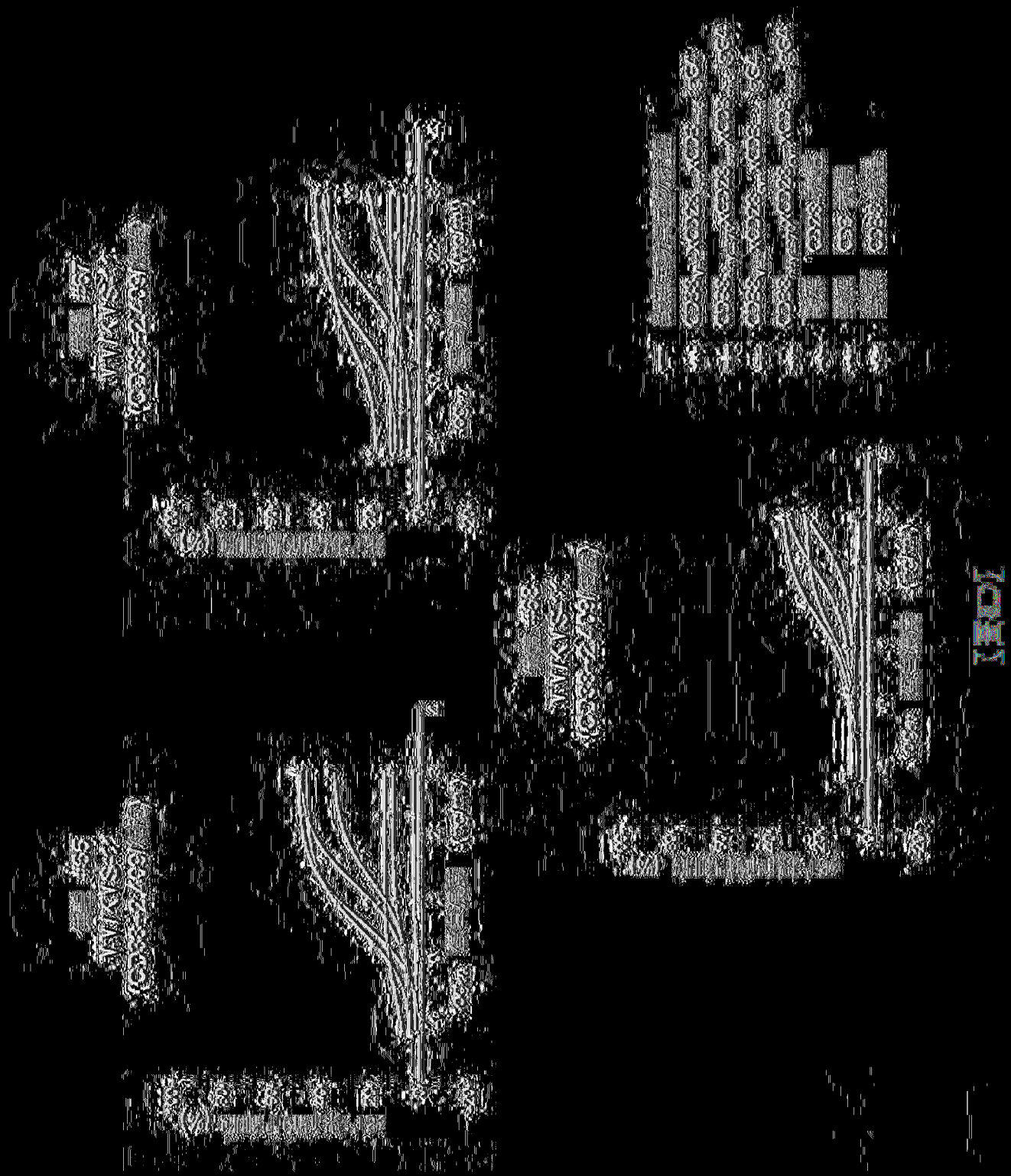


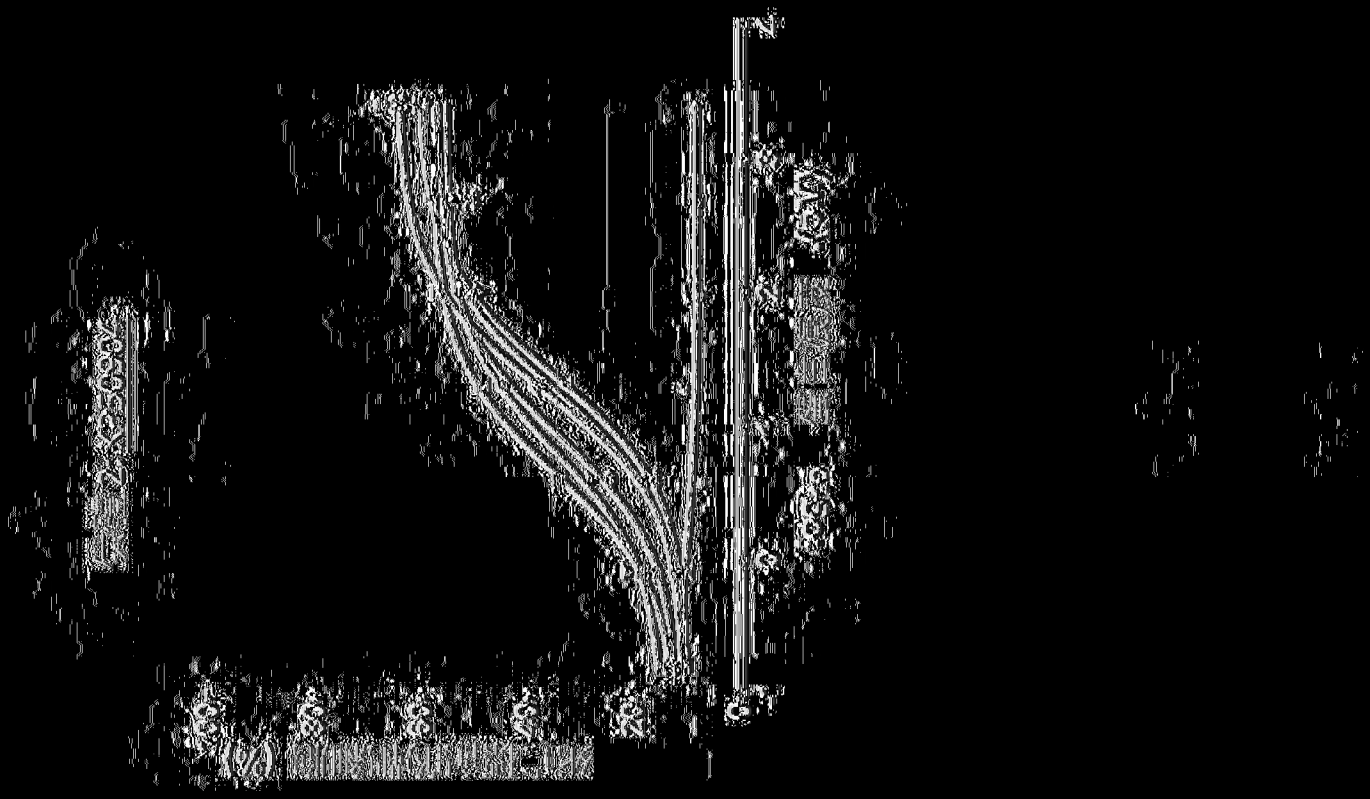


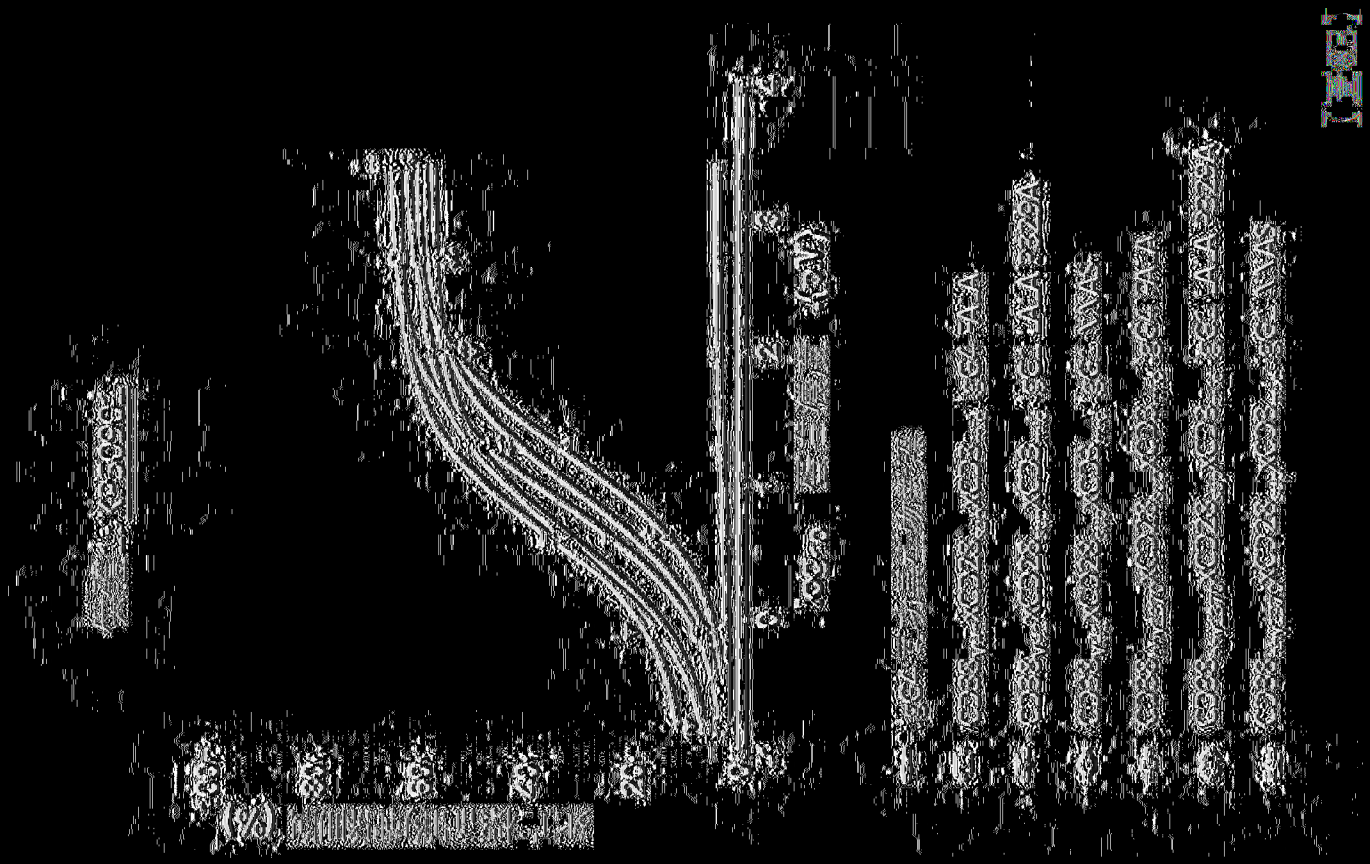




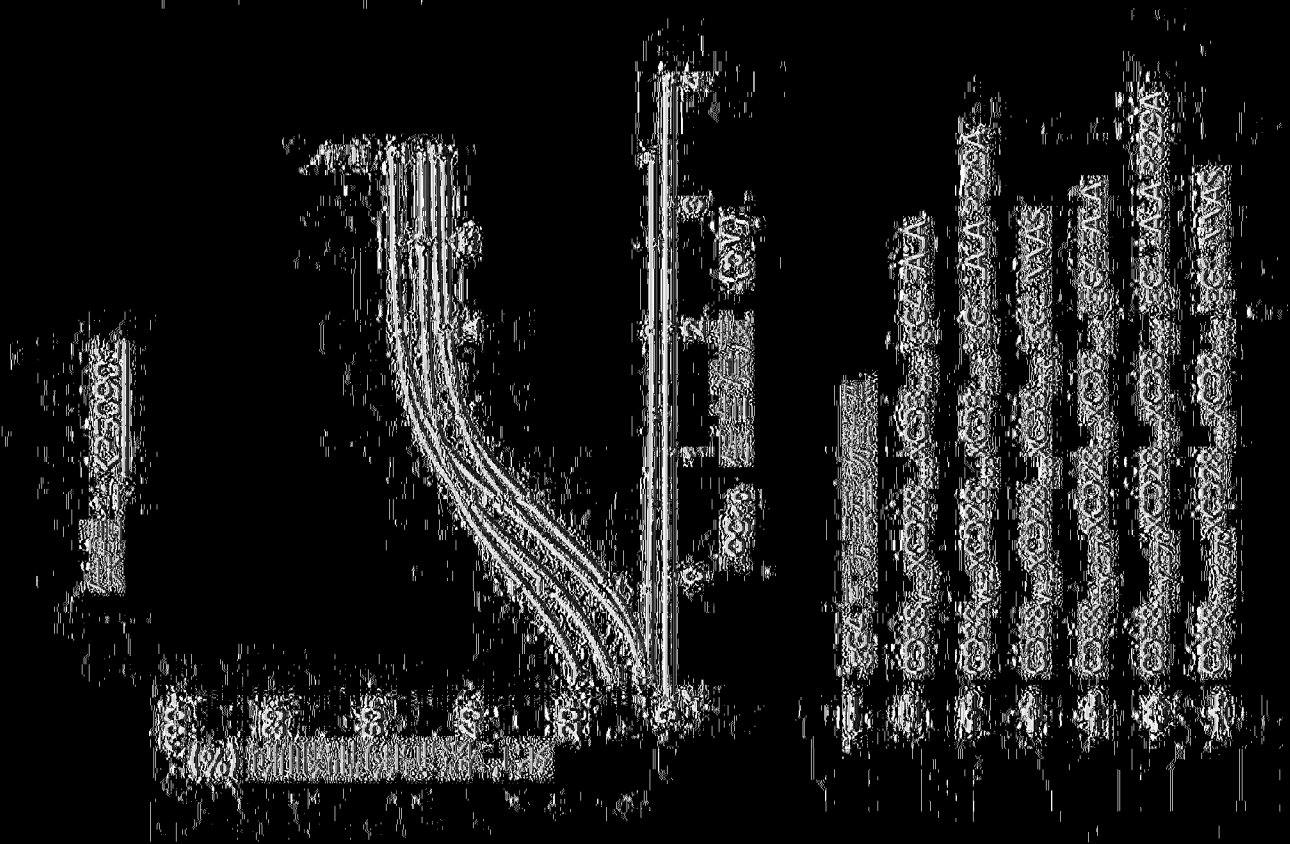


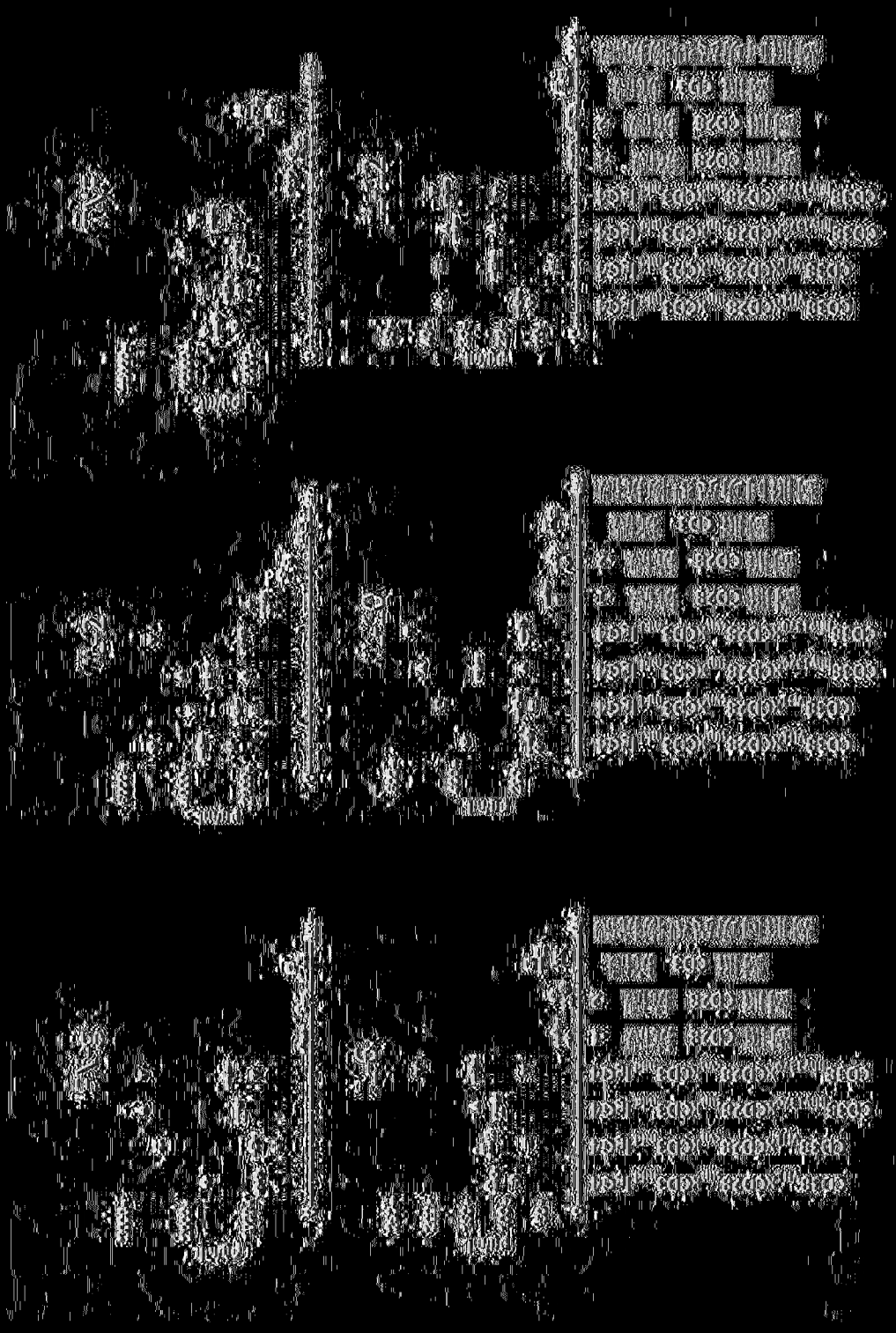


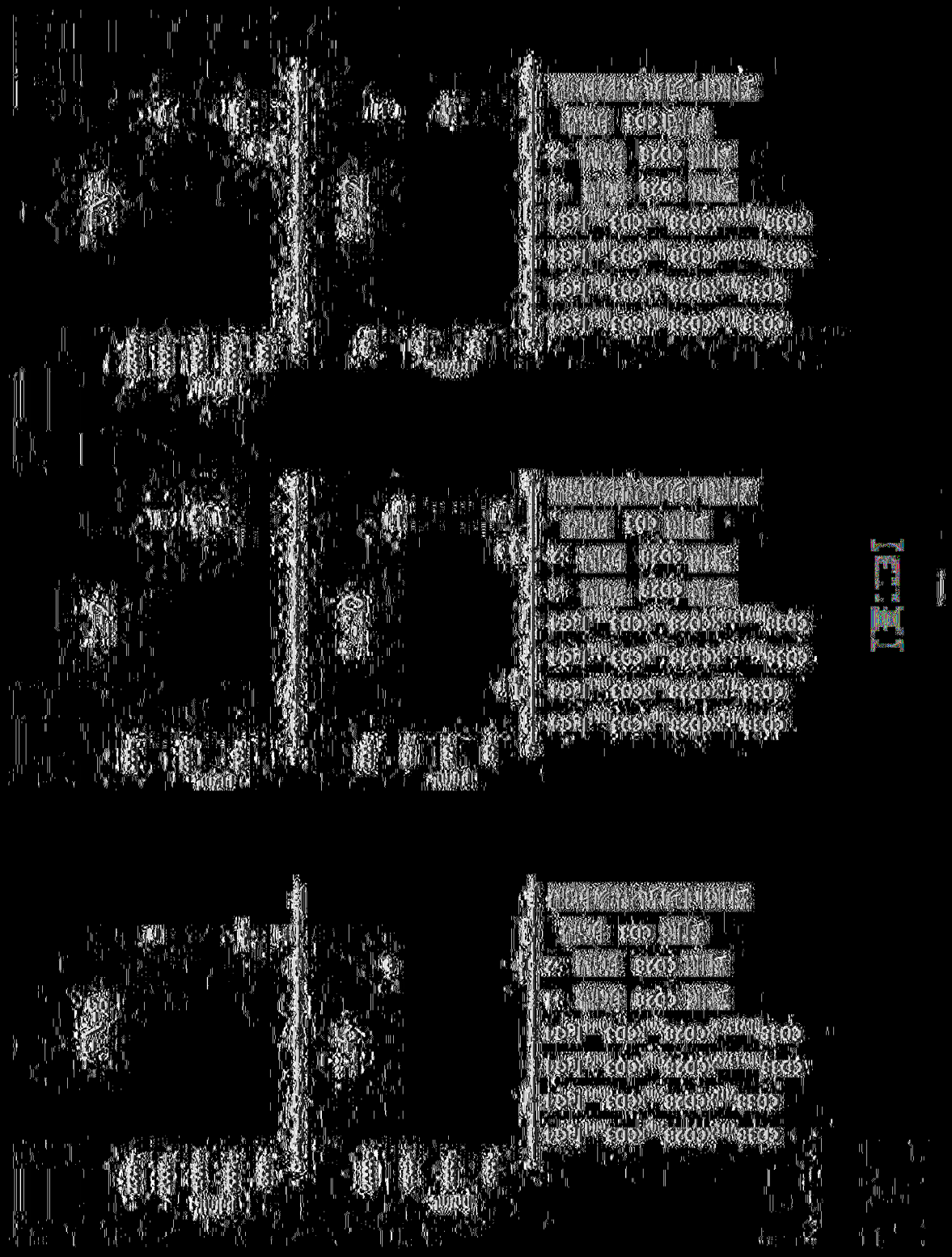


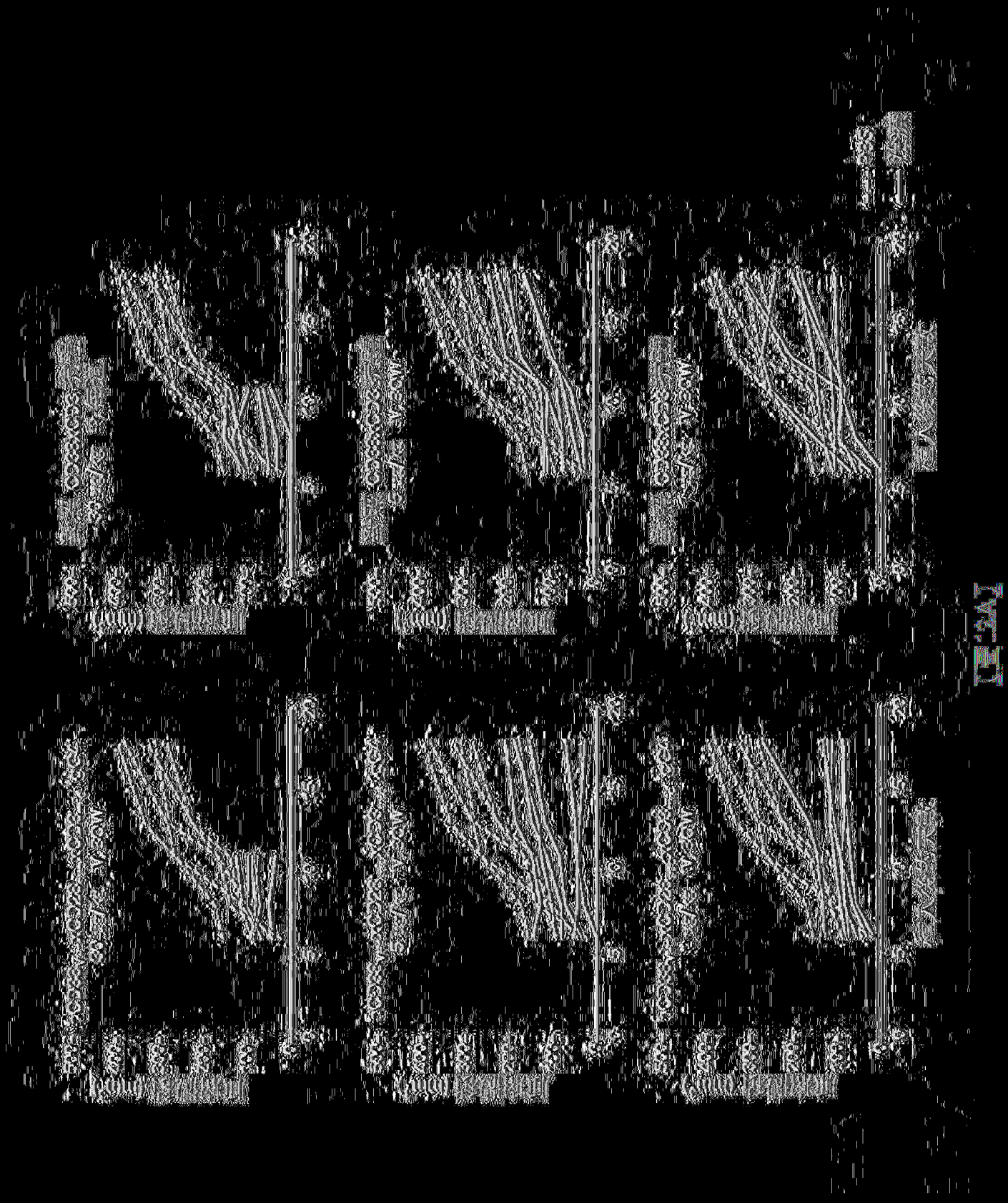


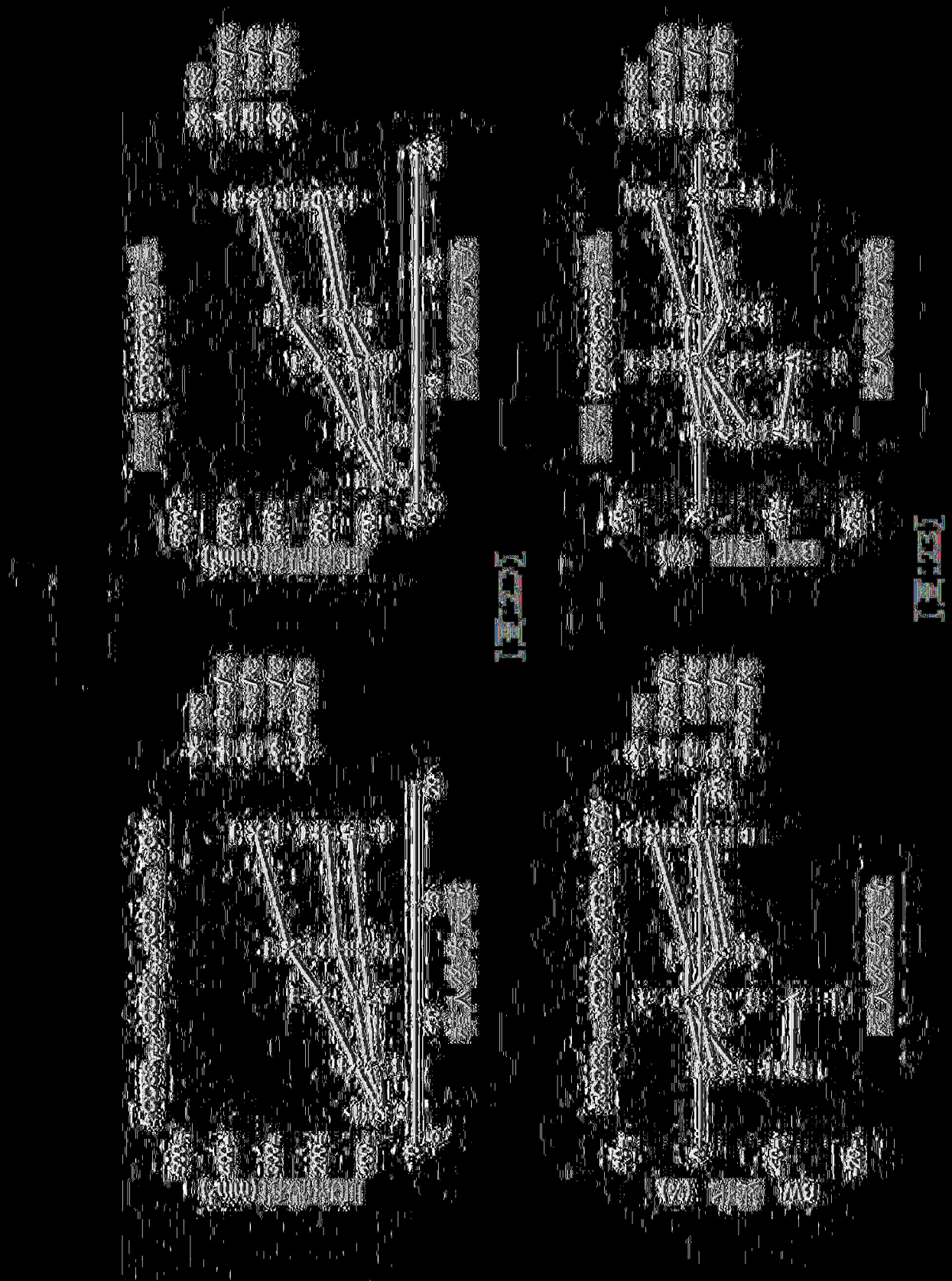


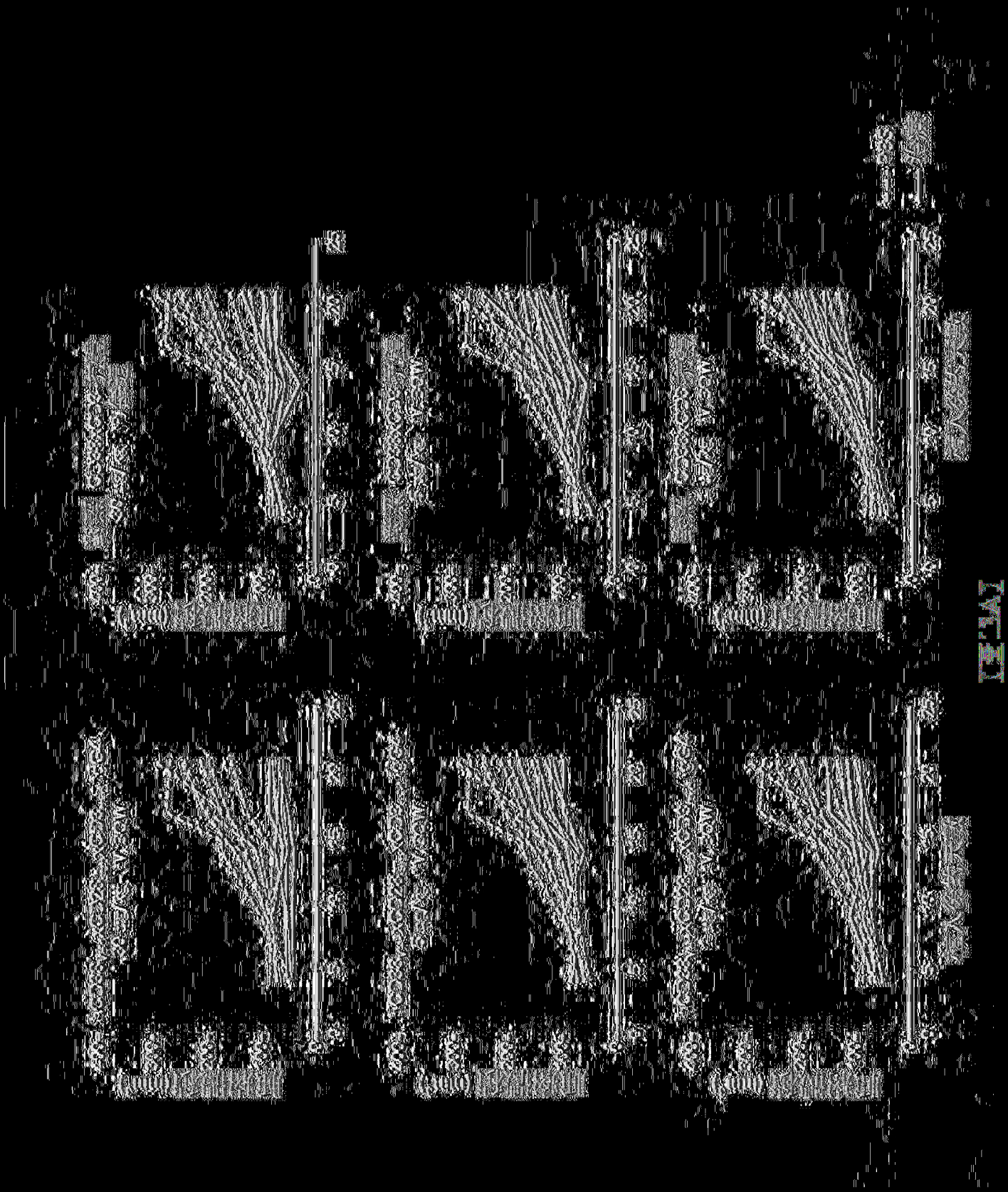


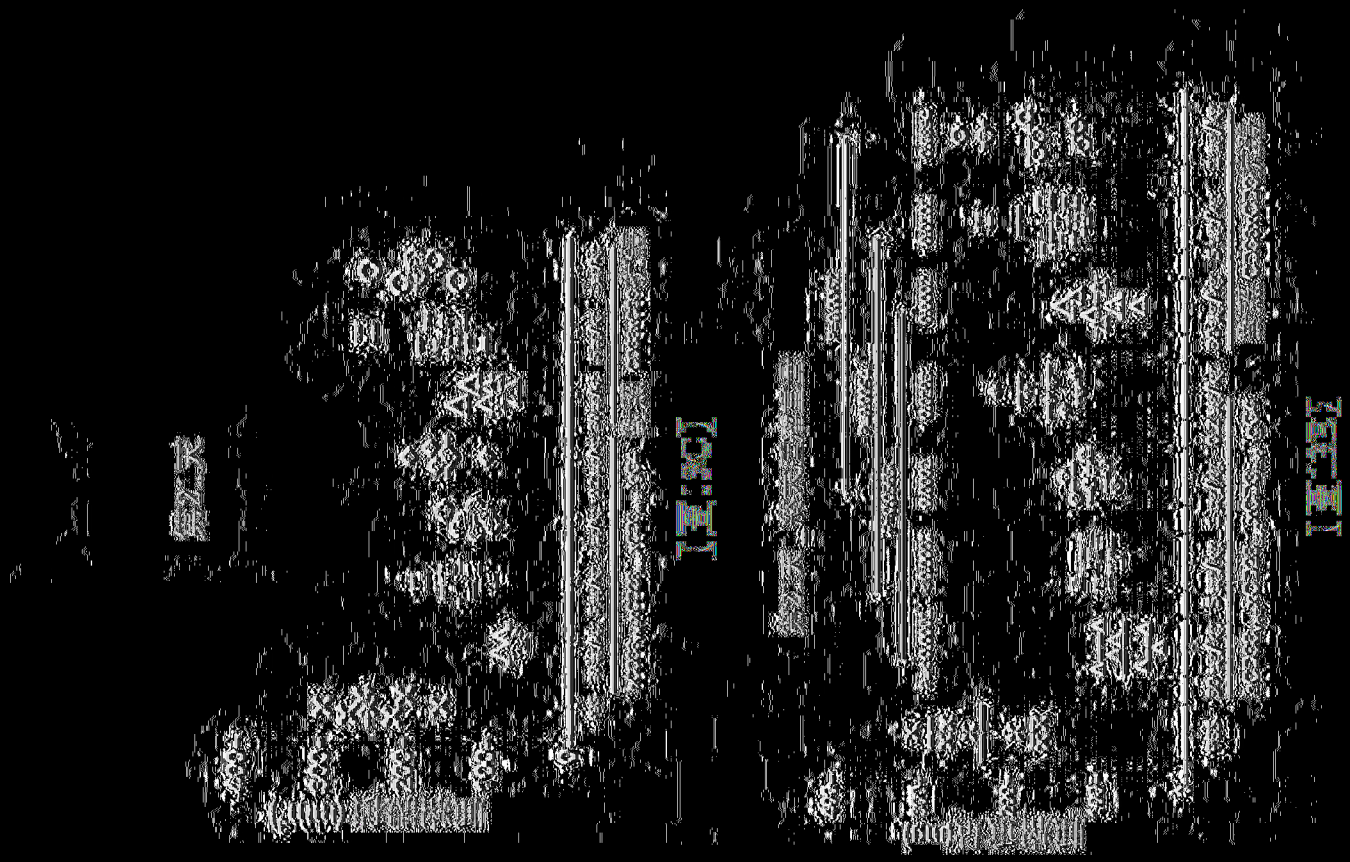


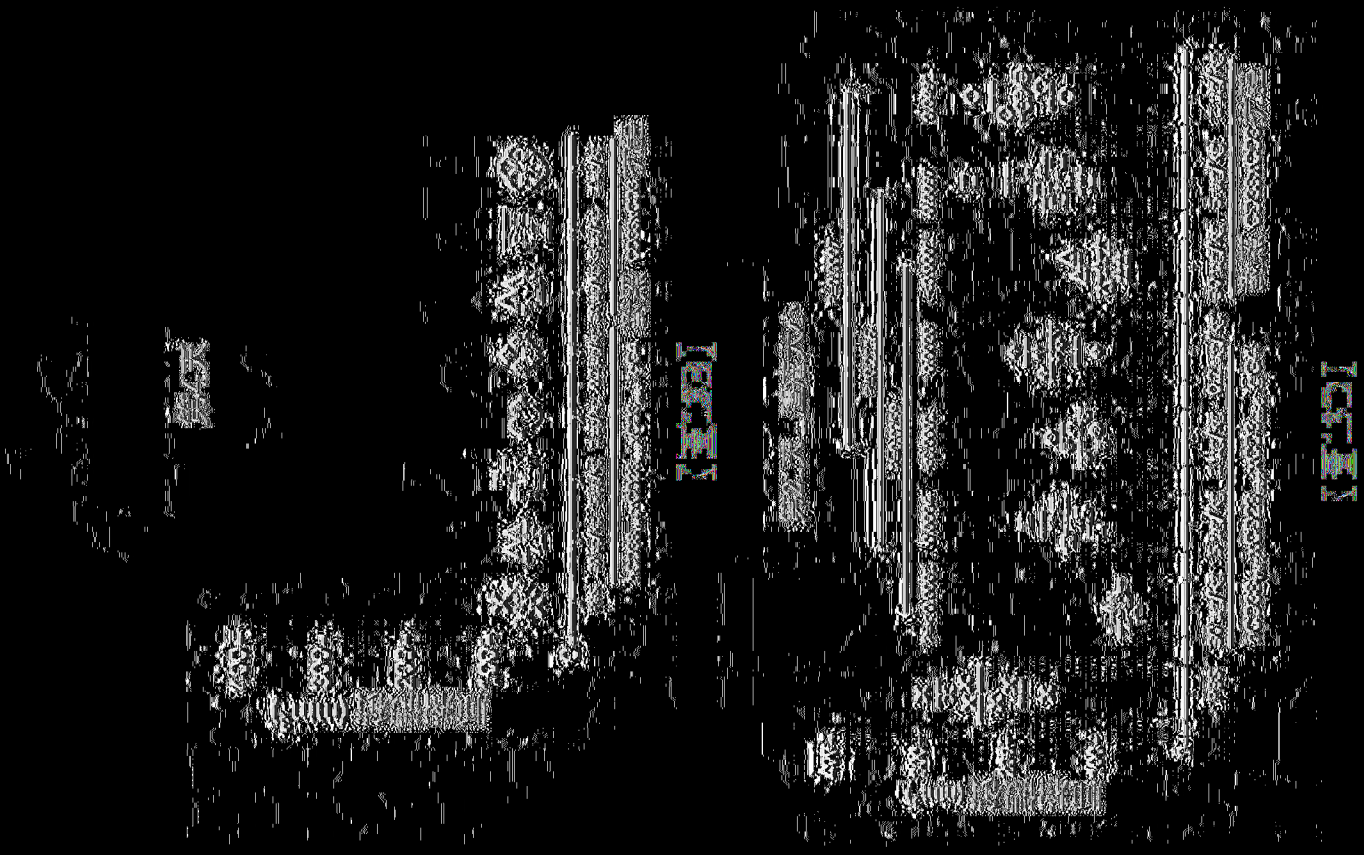


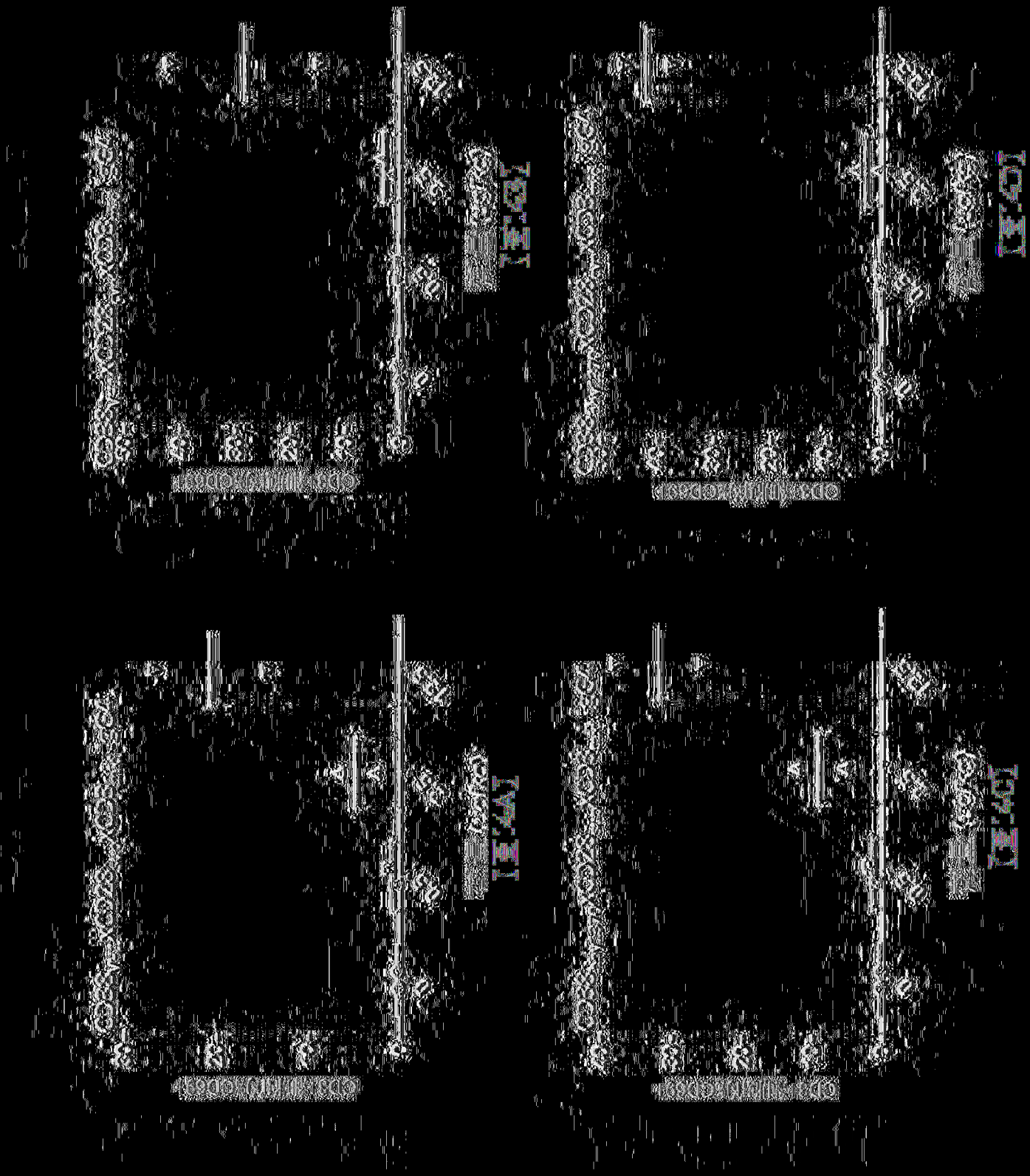


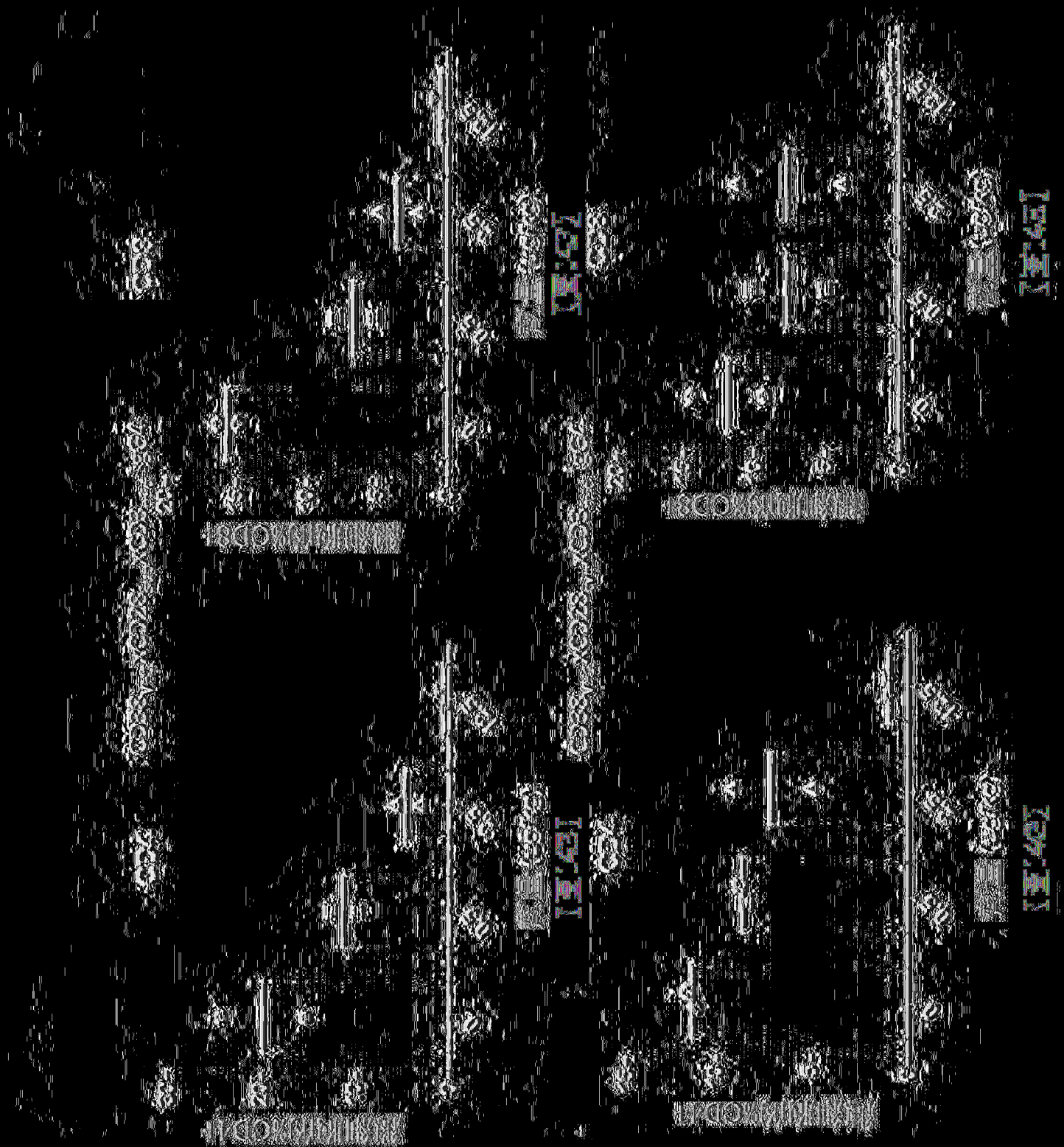


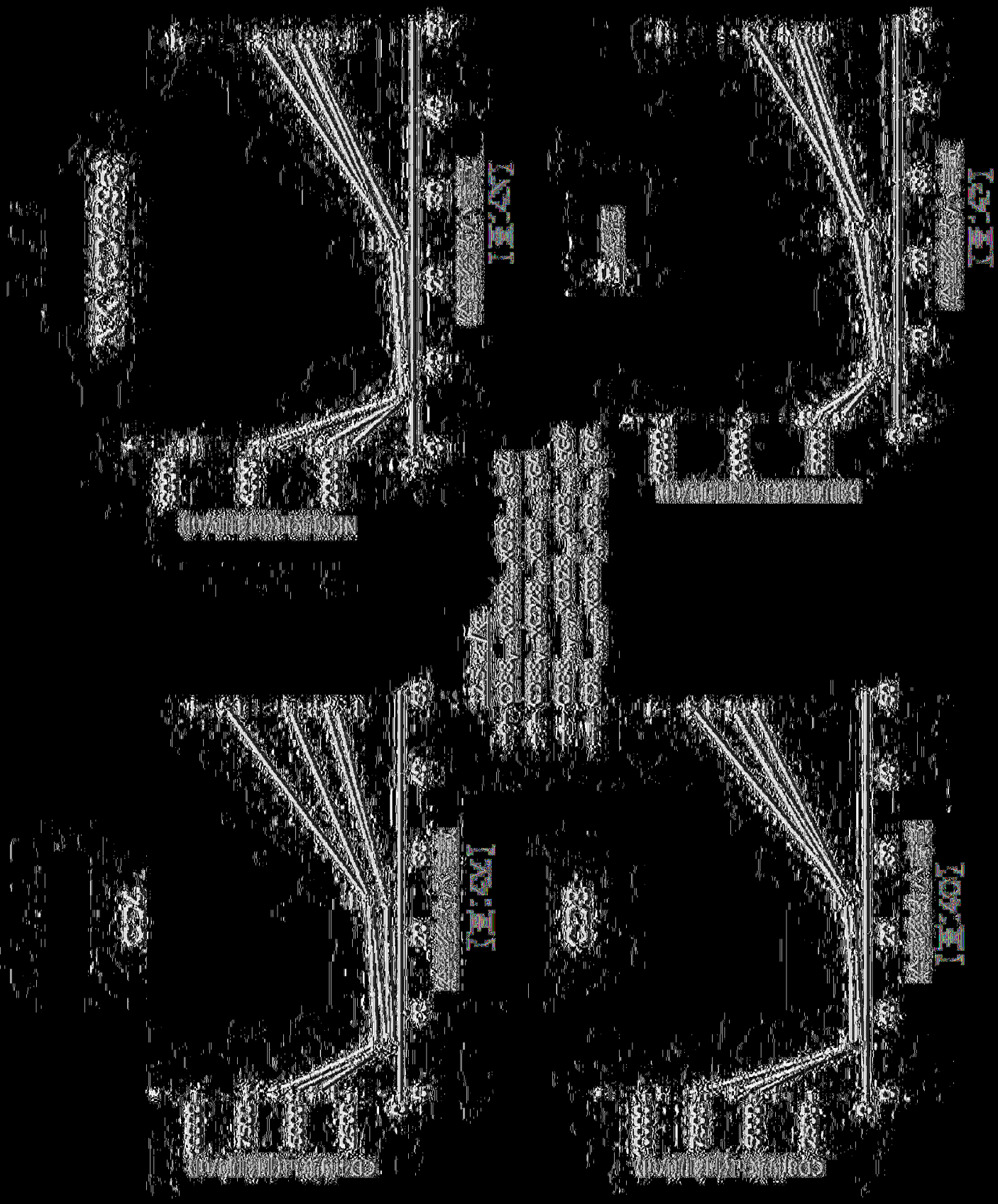


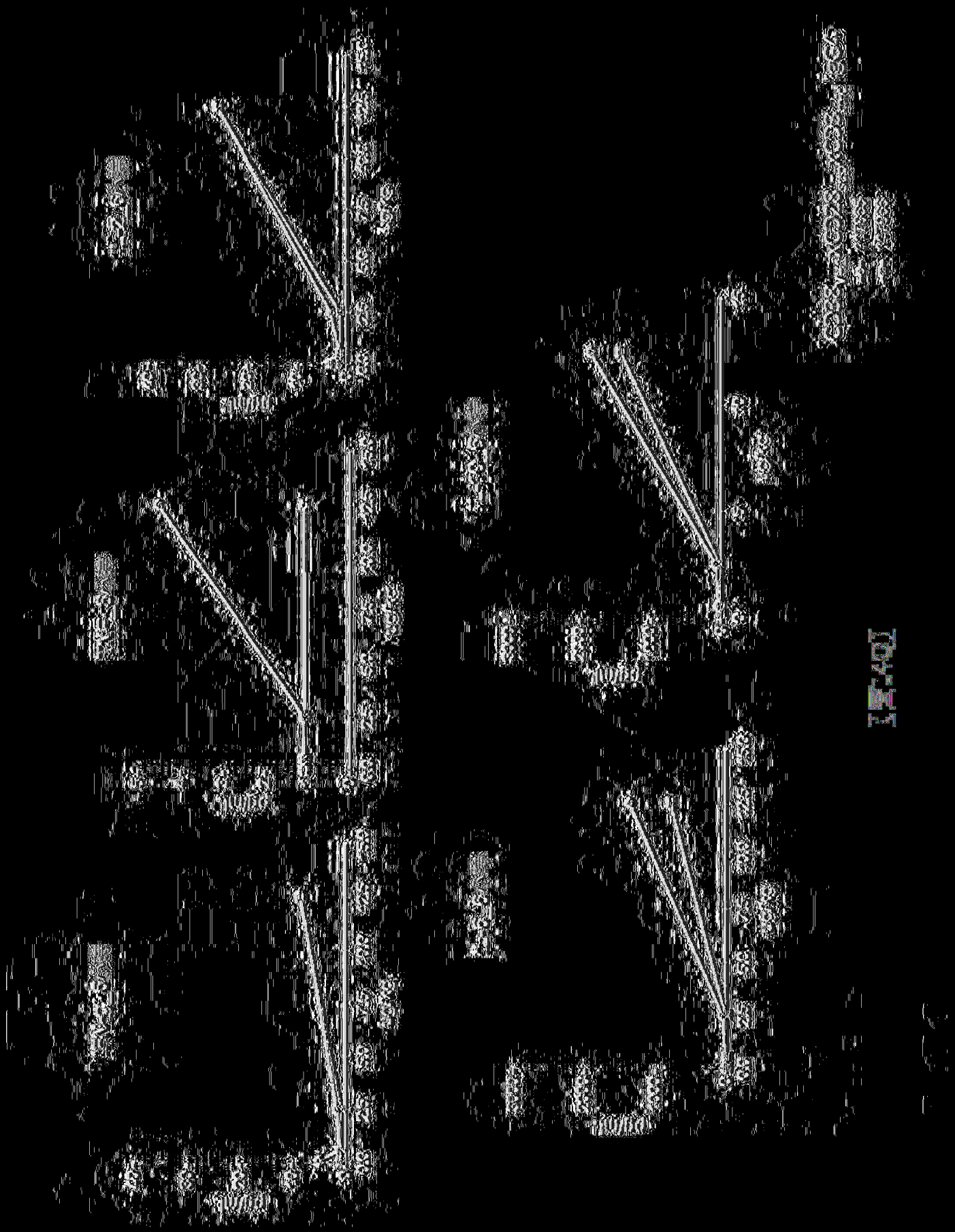


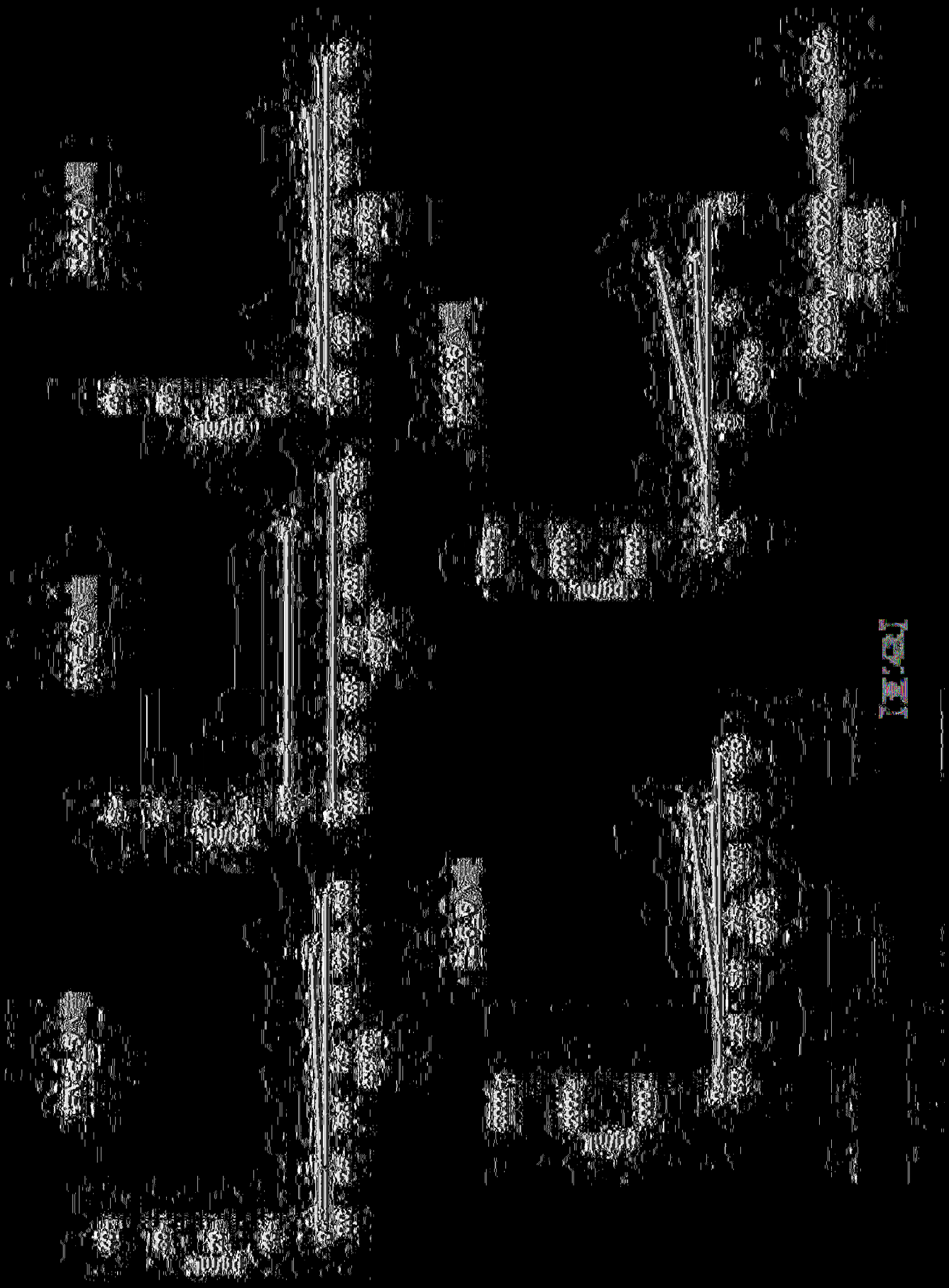






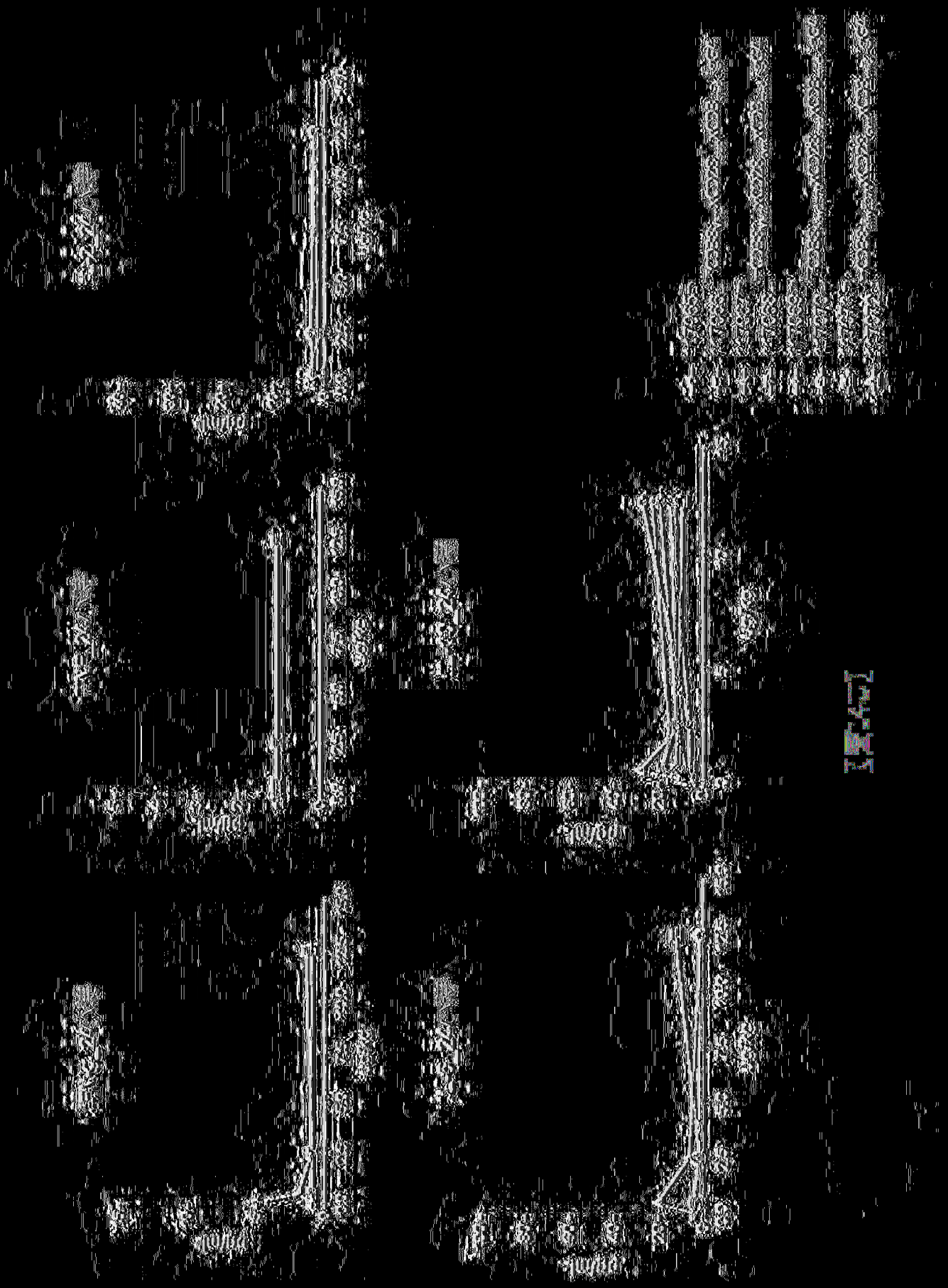




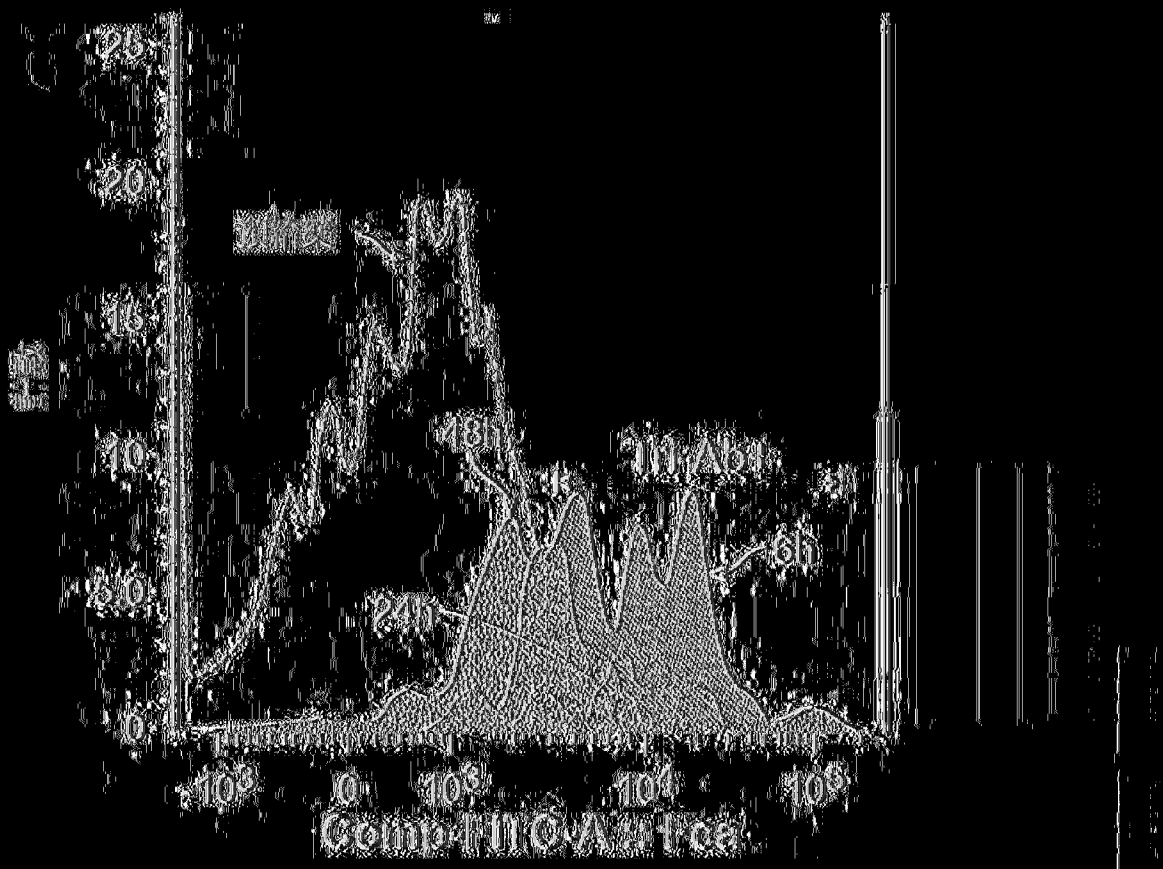


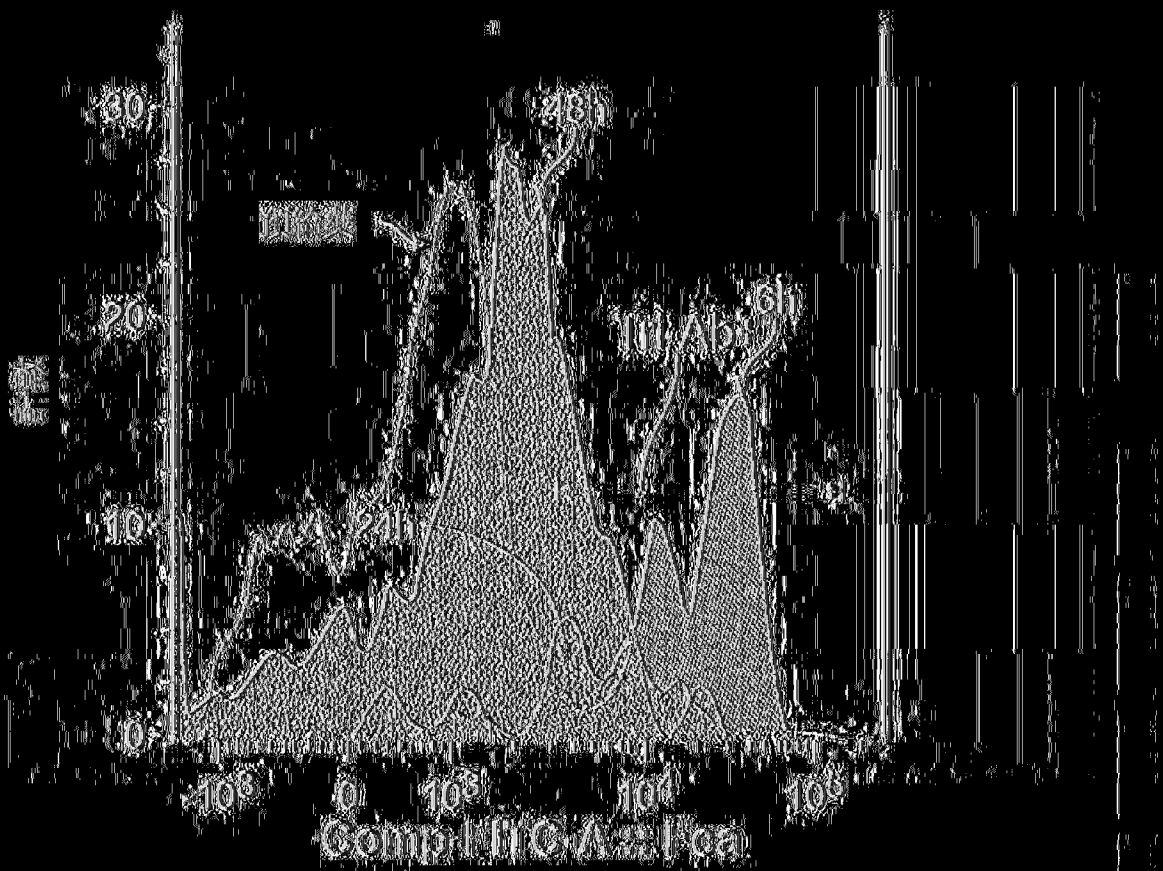






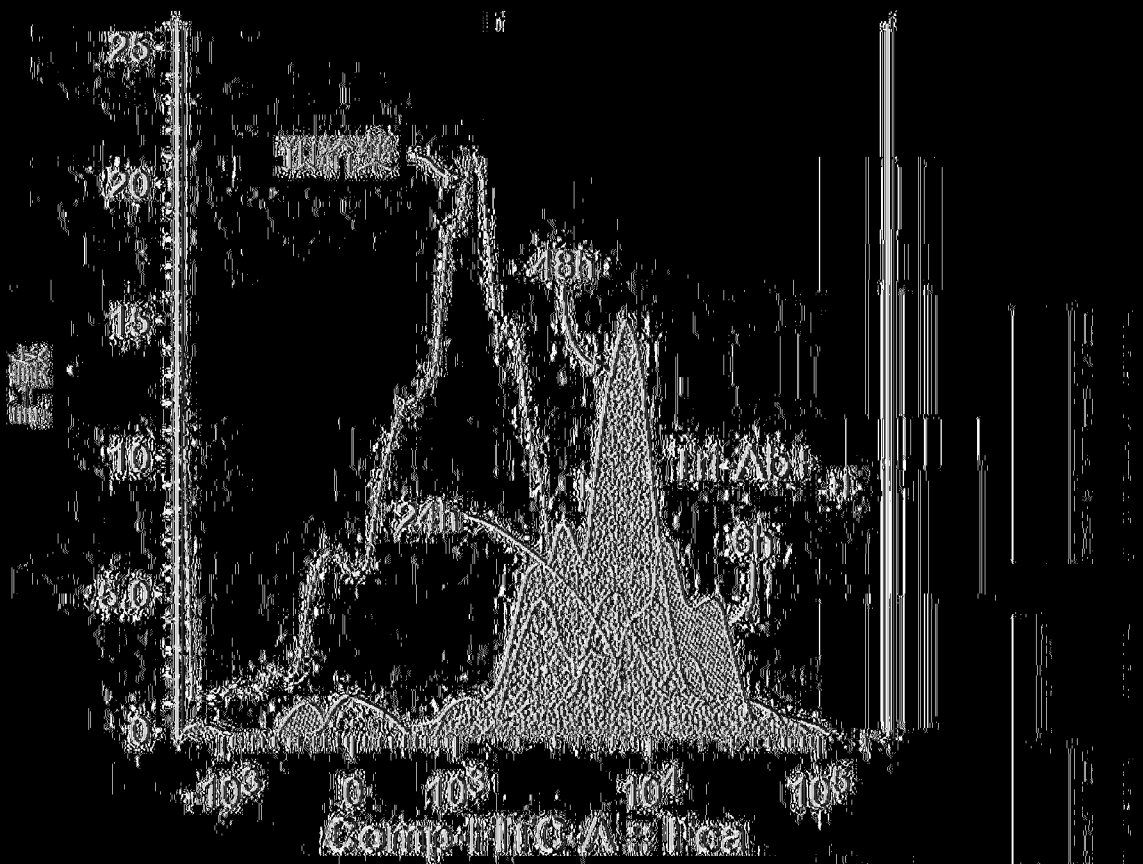


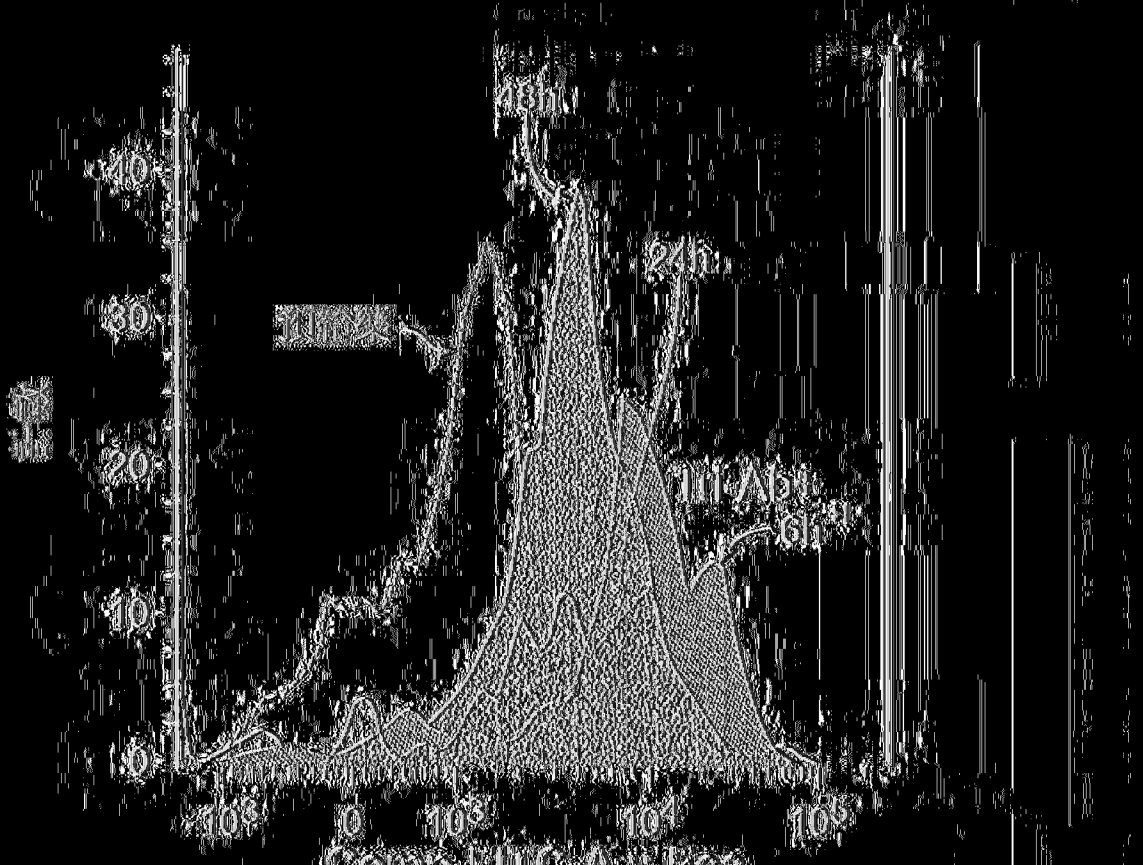

25
20
15
10
5
0
48h
In Ab1
6h
24h
10^3
0
10^3
10^4
10^5
Comp-InCA Area


30
28h
20
In Ab3
6h
24h
10
0
10^3
0
10^3
10^4
10^5
Comp-InCA Area

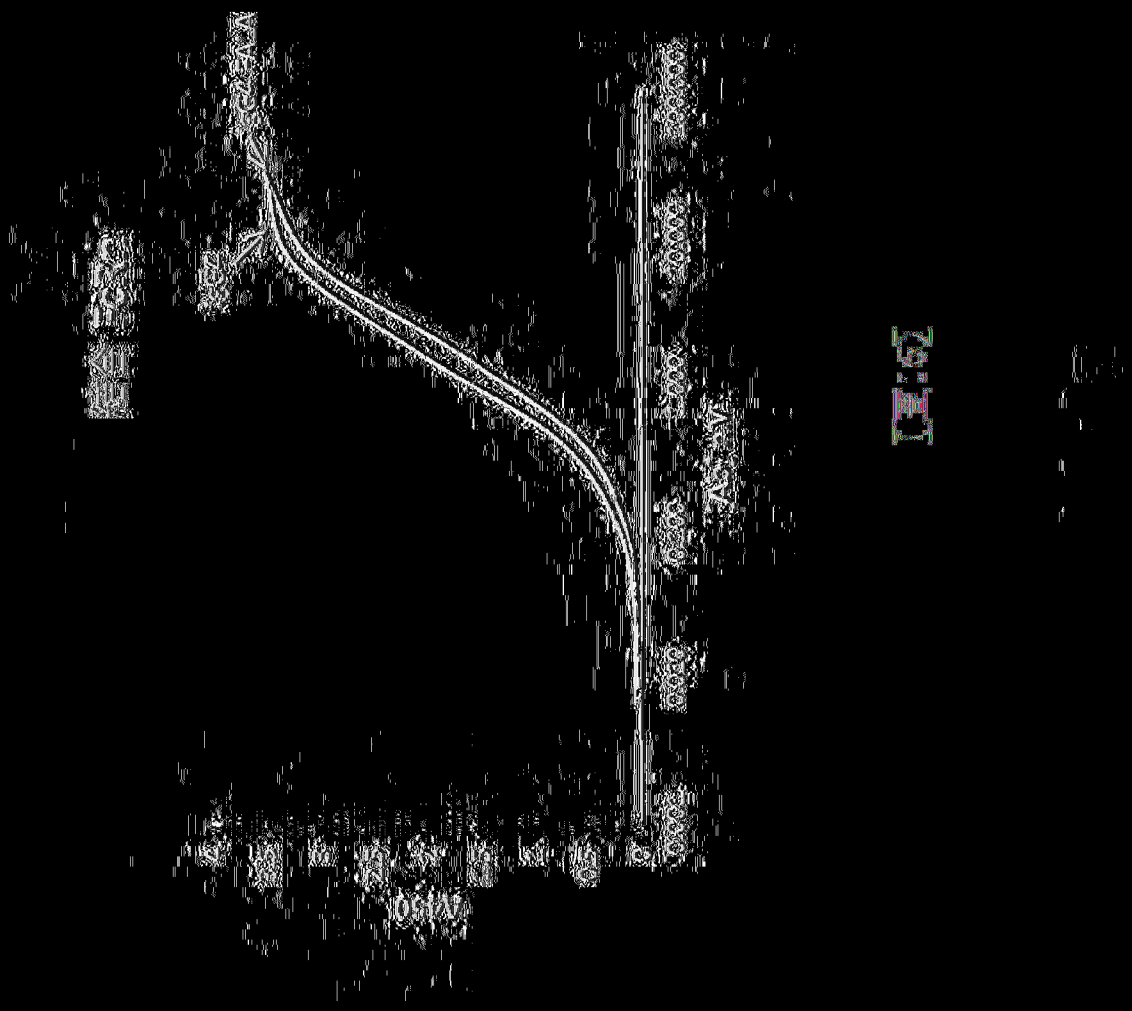
[圖14AE]

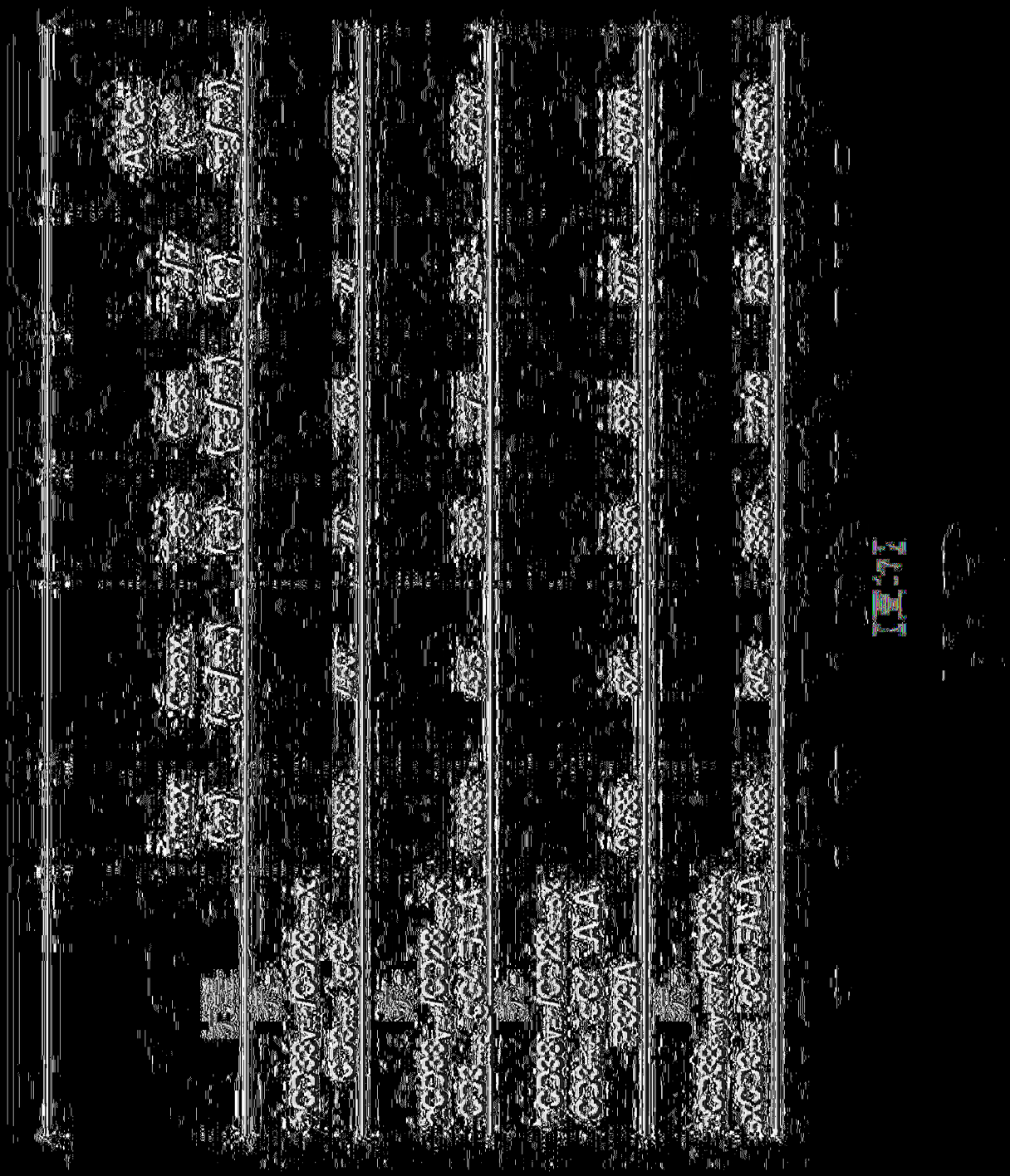



25
20
15
10
5
0
24h
6h
10^{3}
0
10^{3}
10^{4}
10^{5}

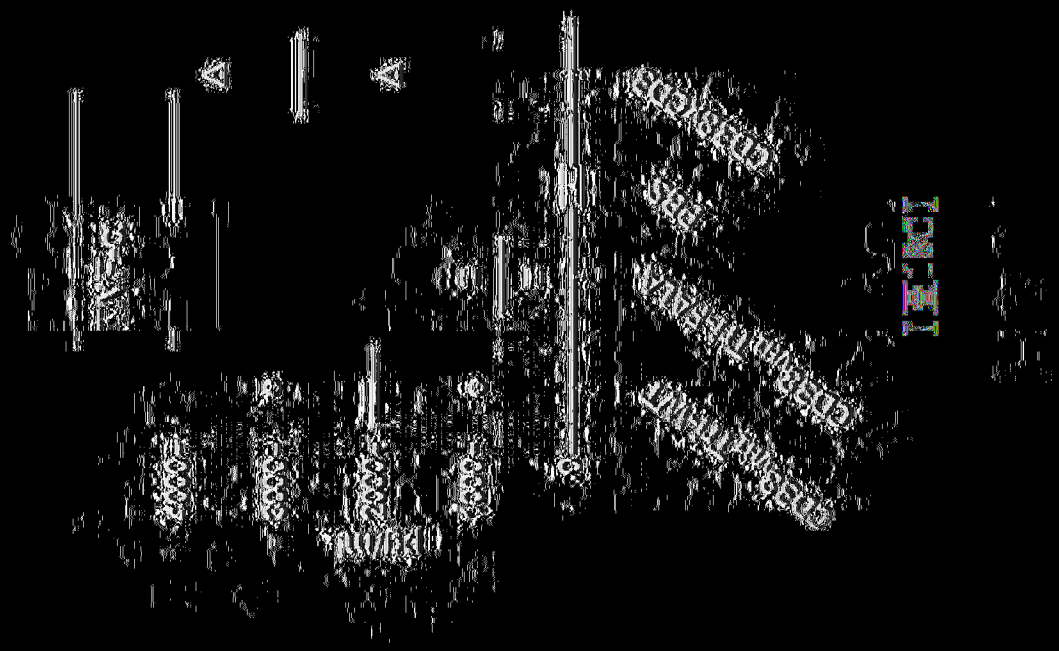

40
30
20
10
0
18h
24h
6h
10^{3}
0
10^{3}
10^{4}
10^{5}

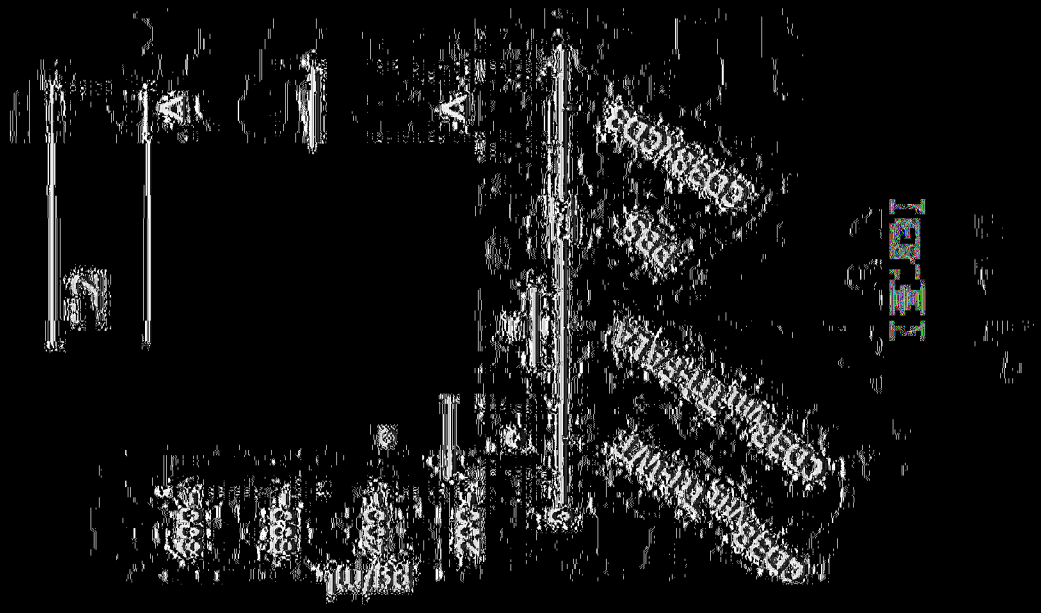
[0044]

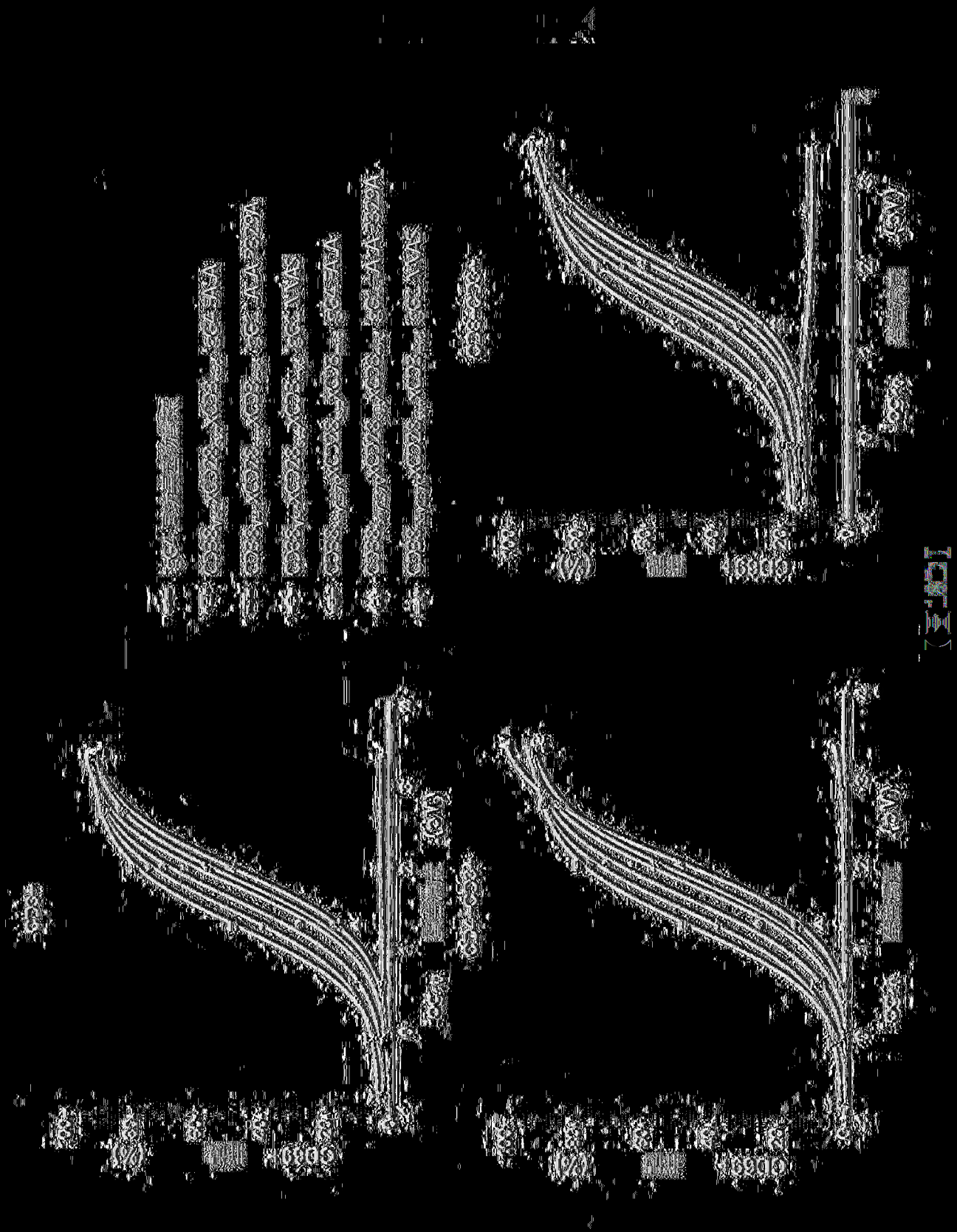


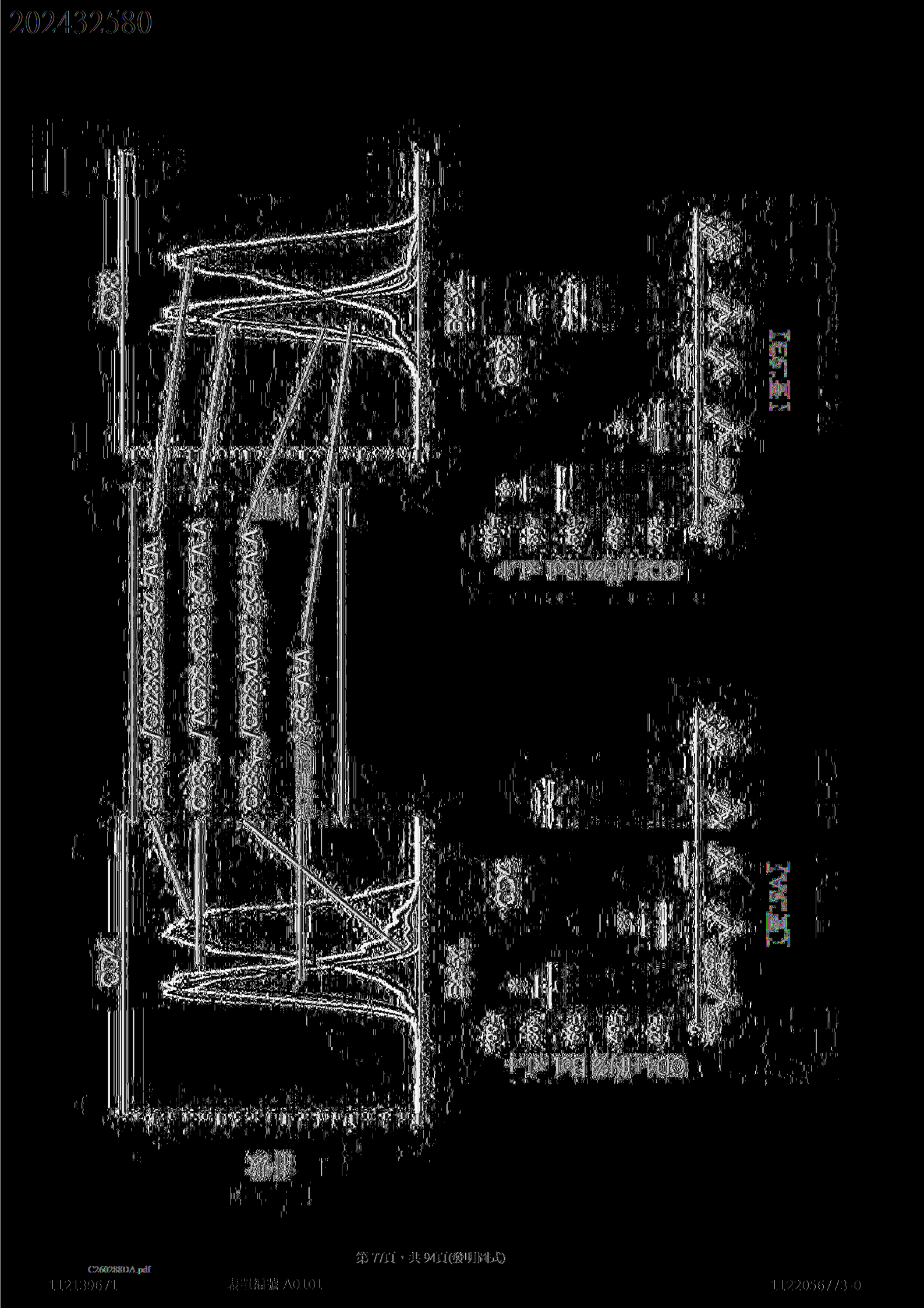


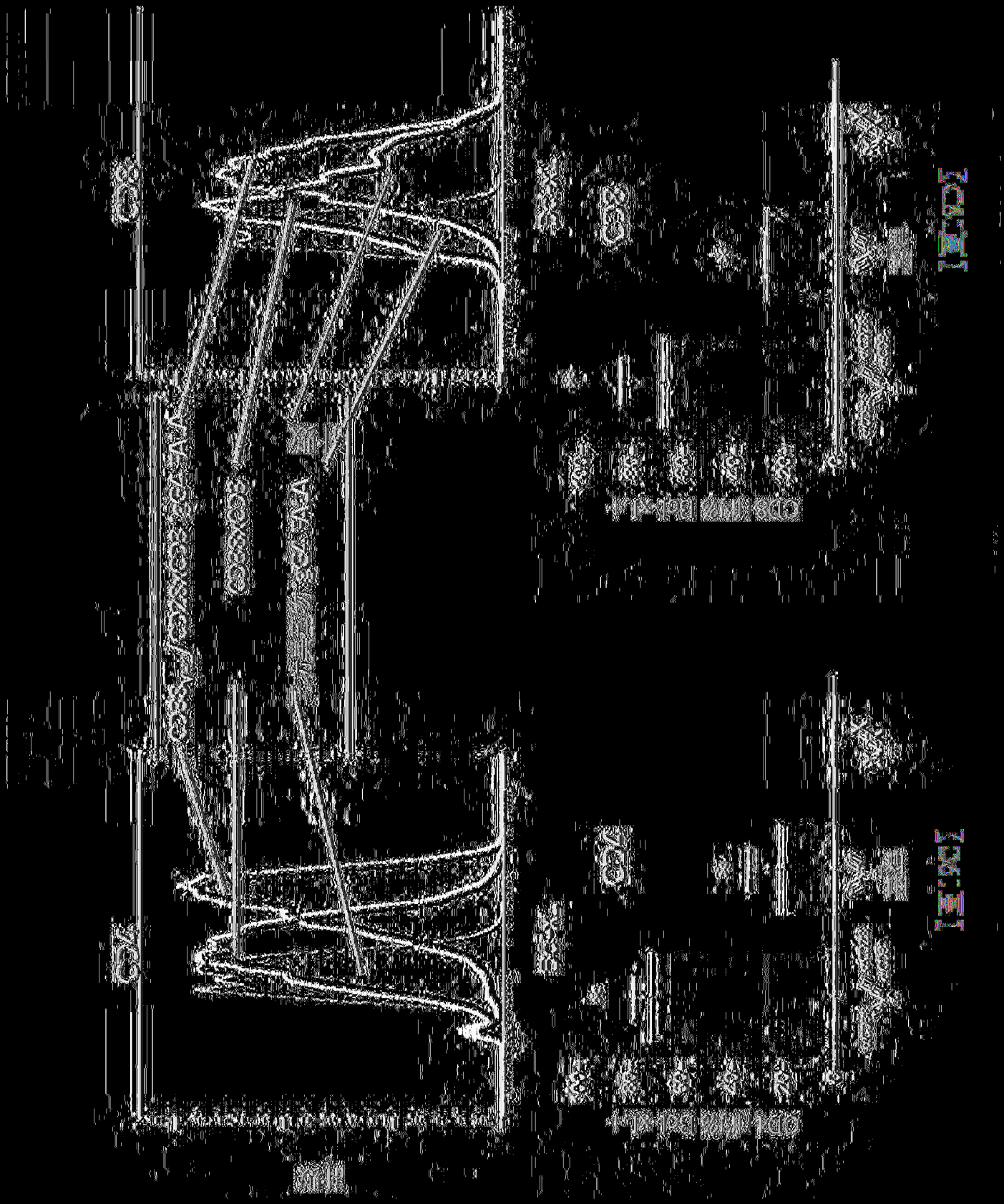


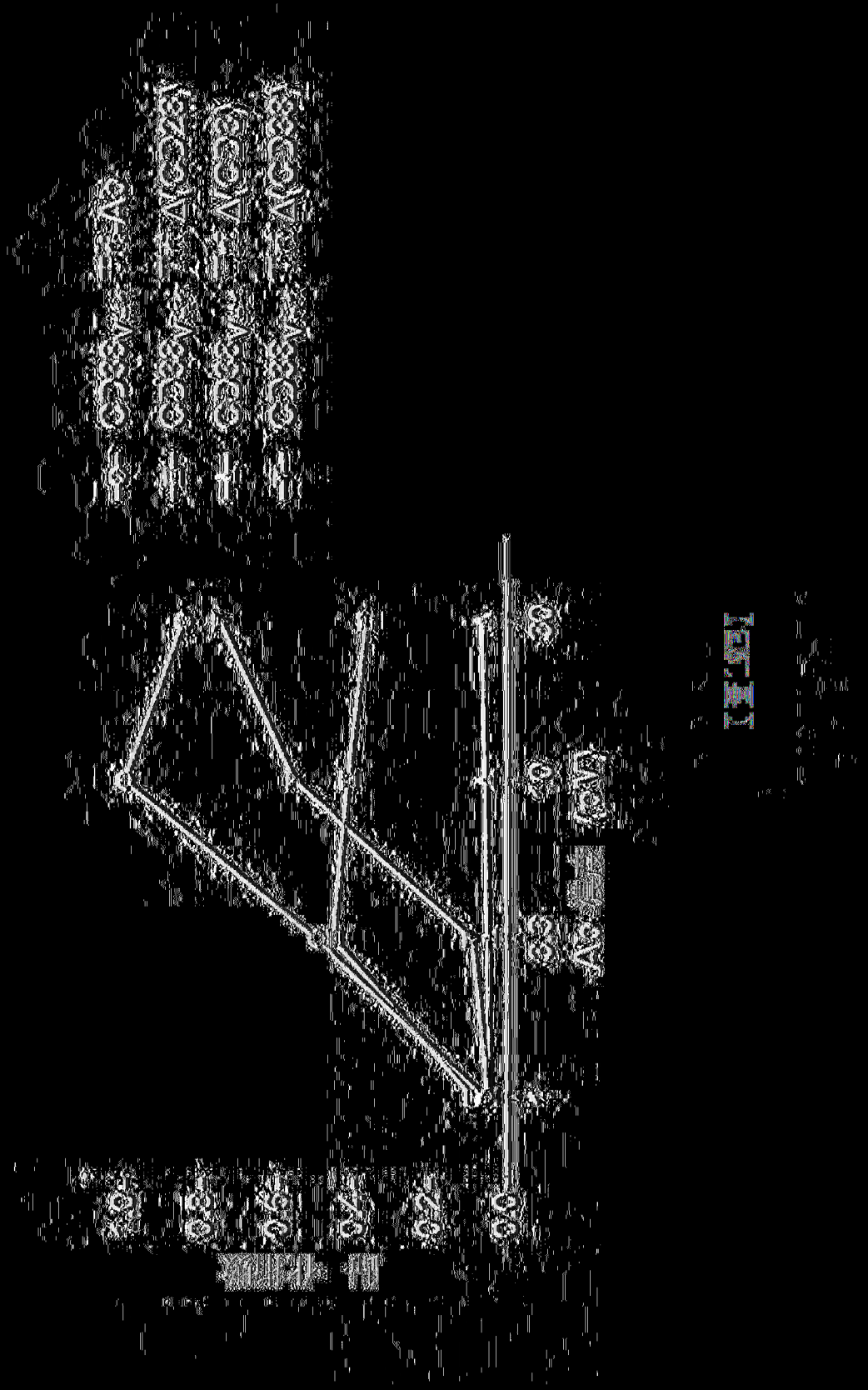


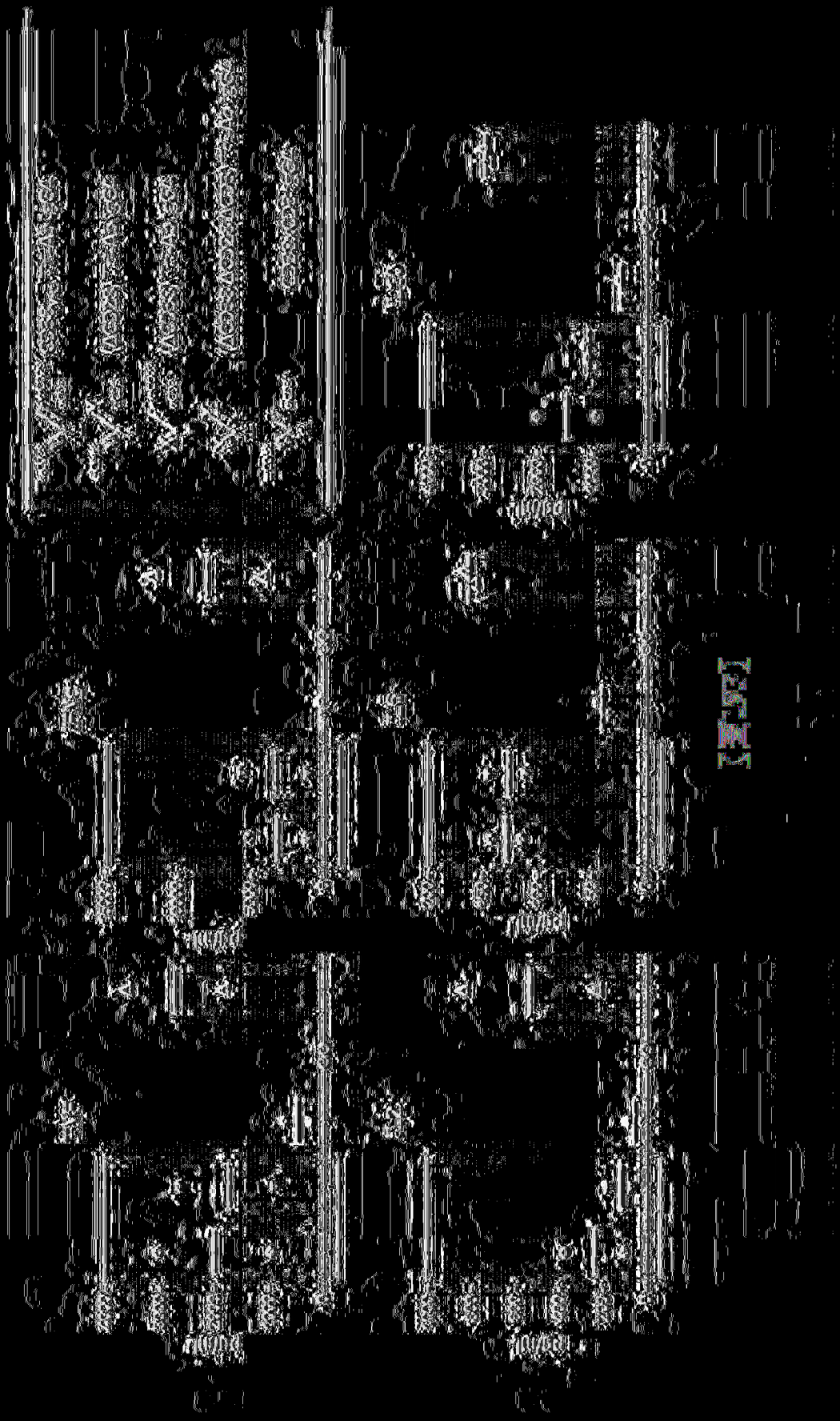


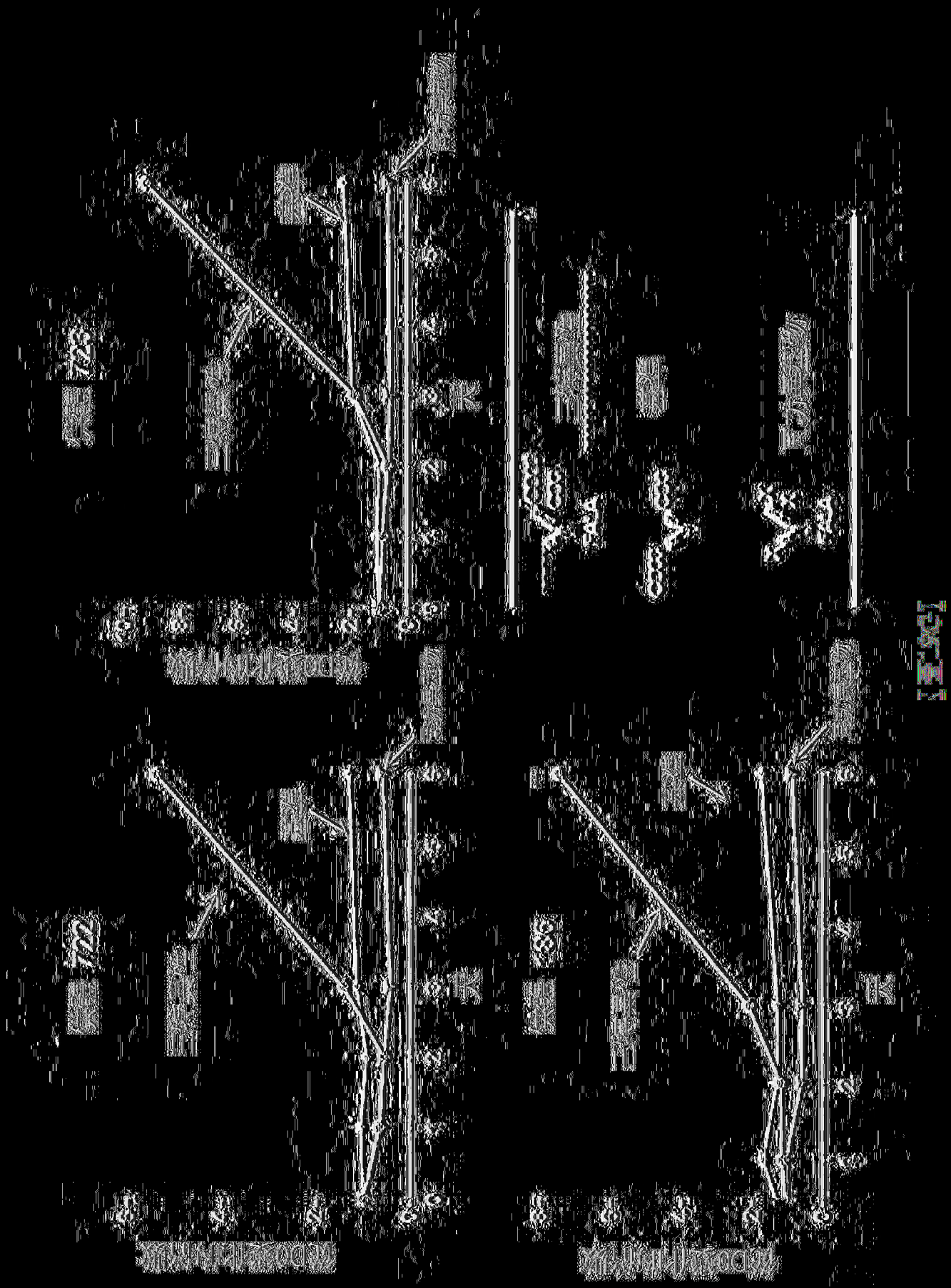


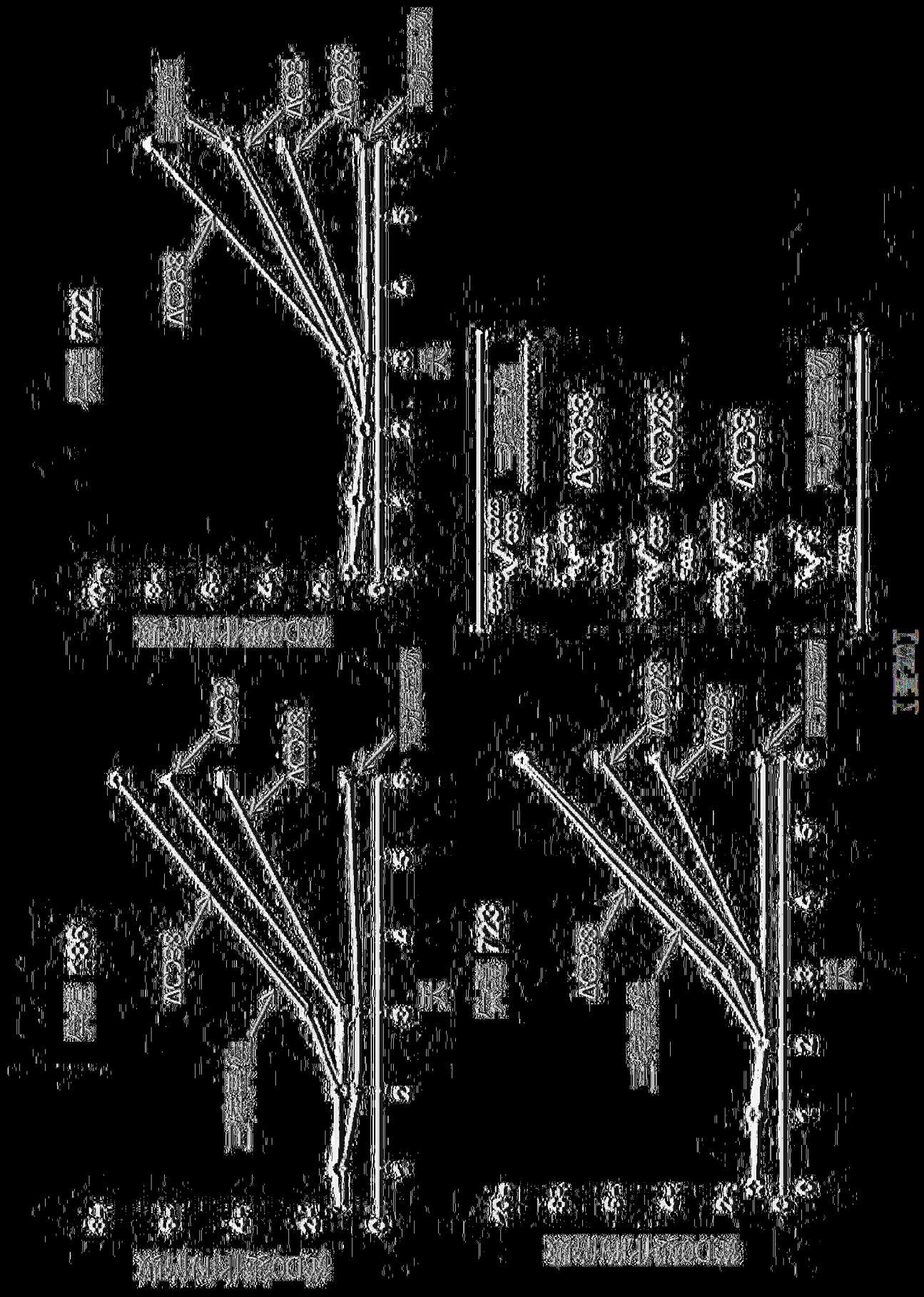


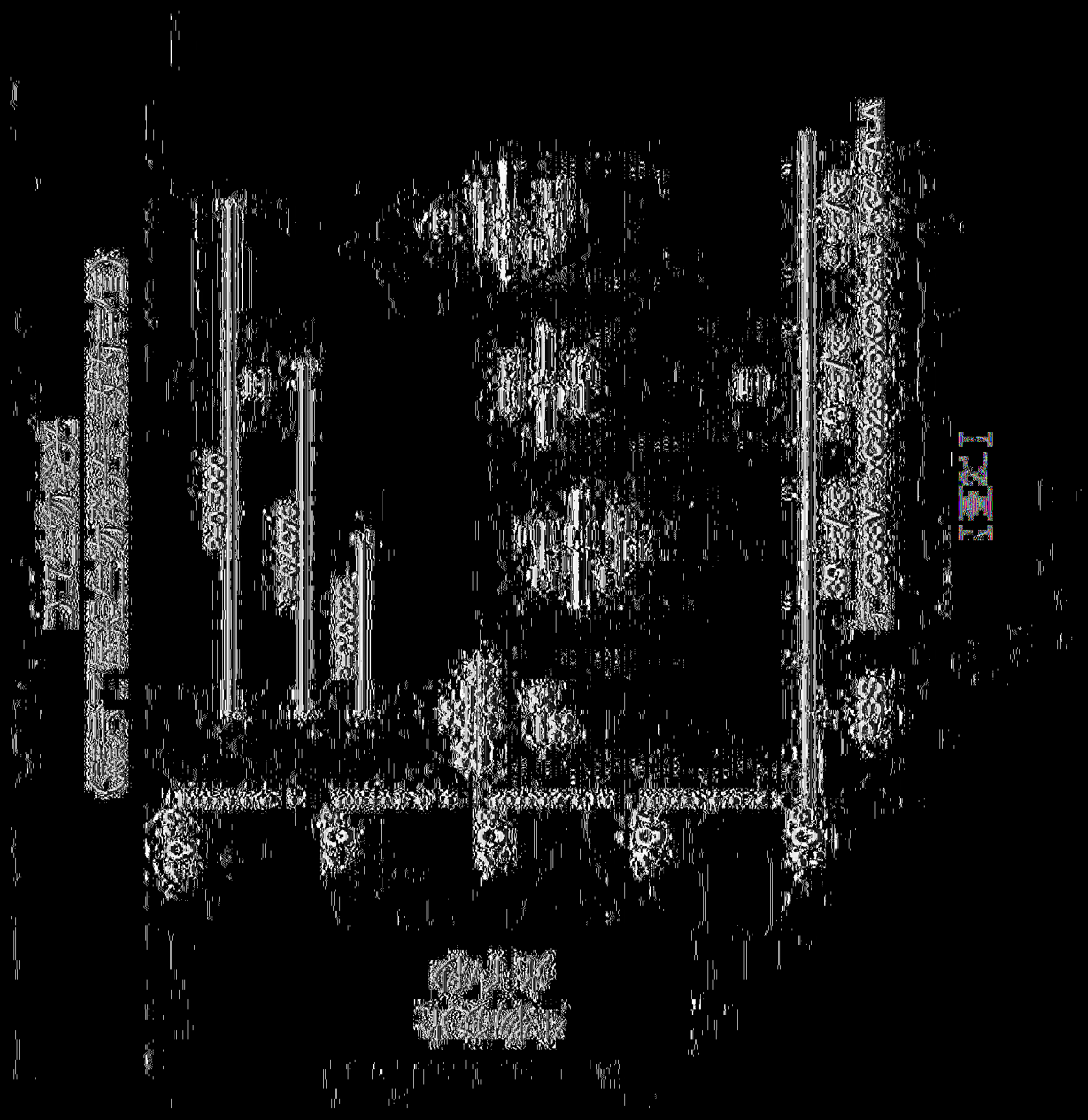


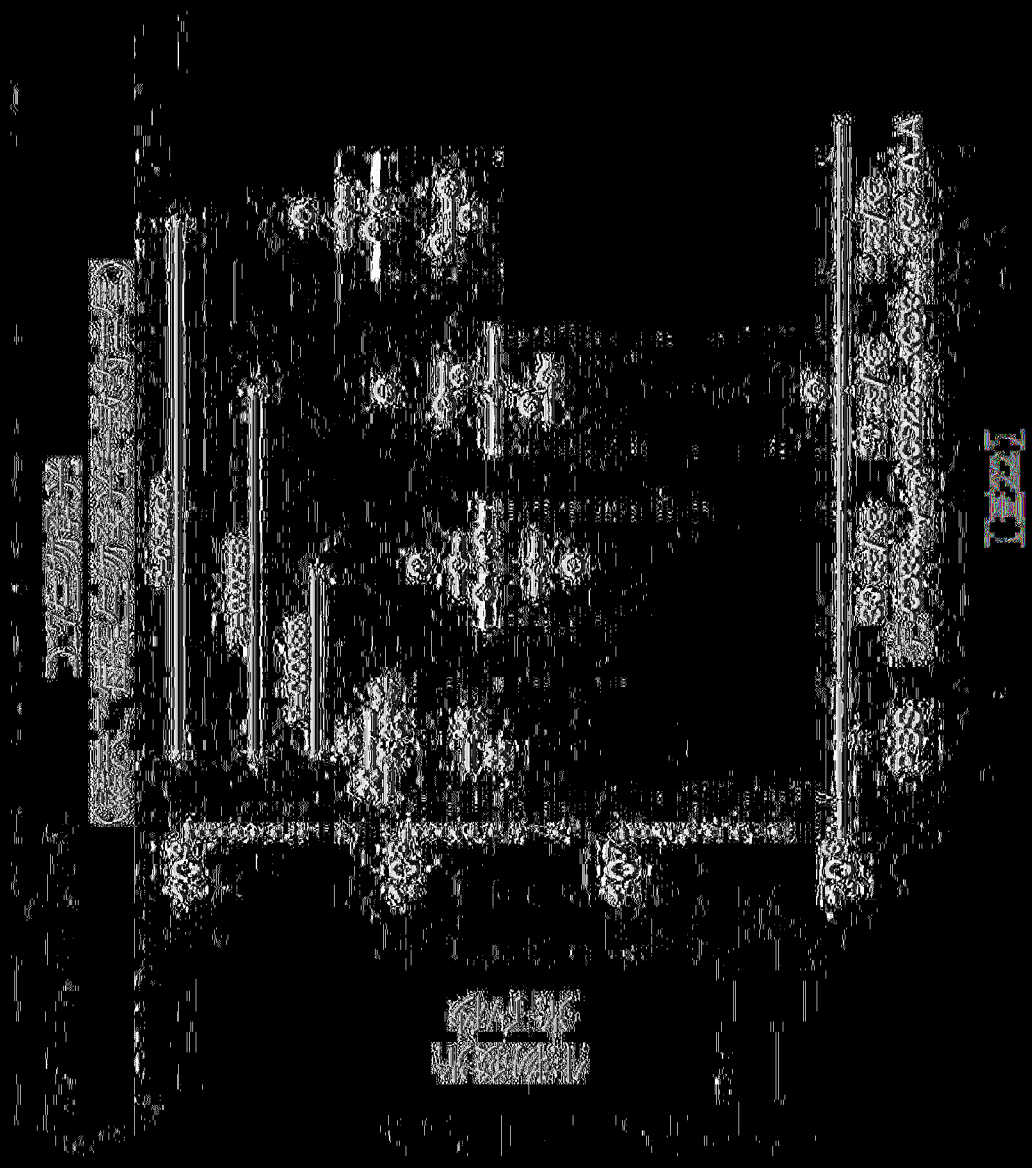


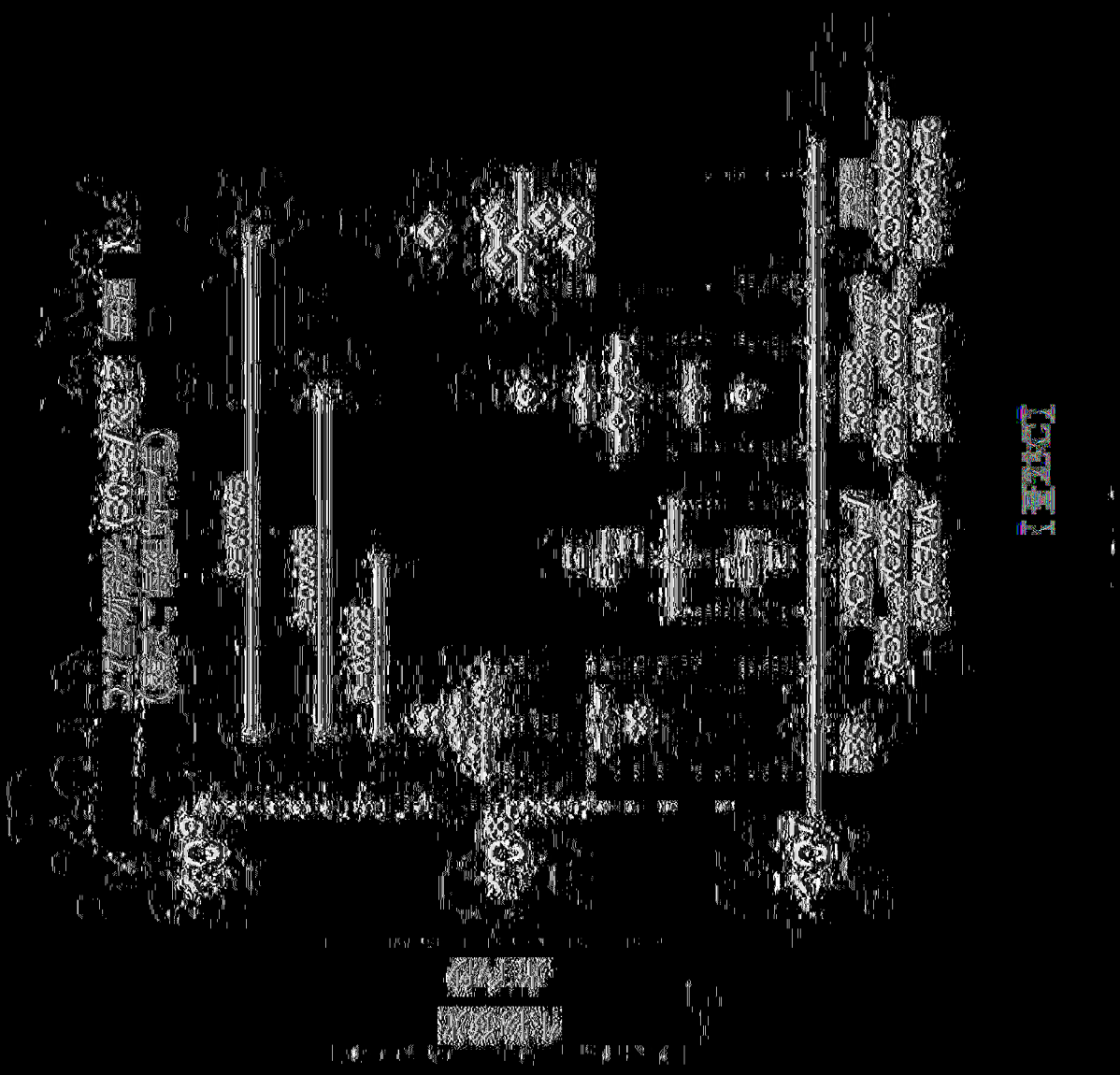


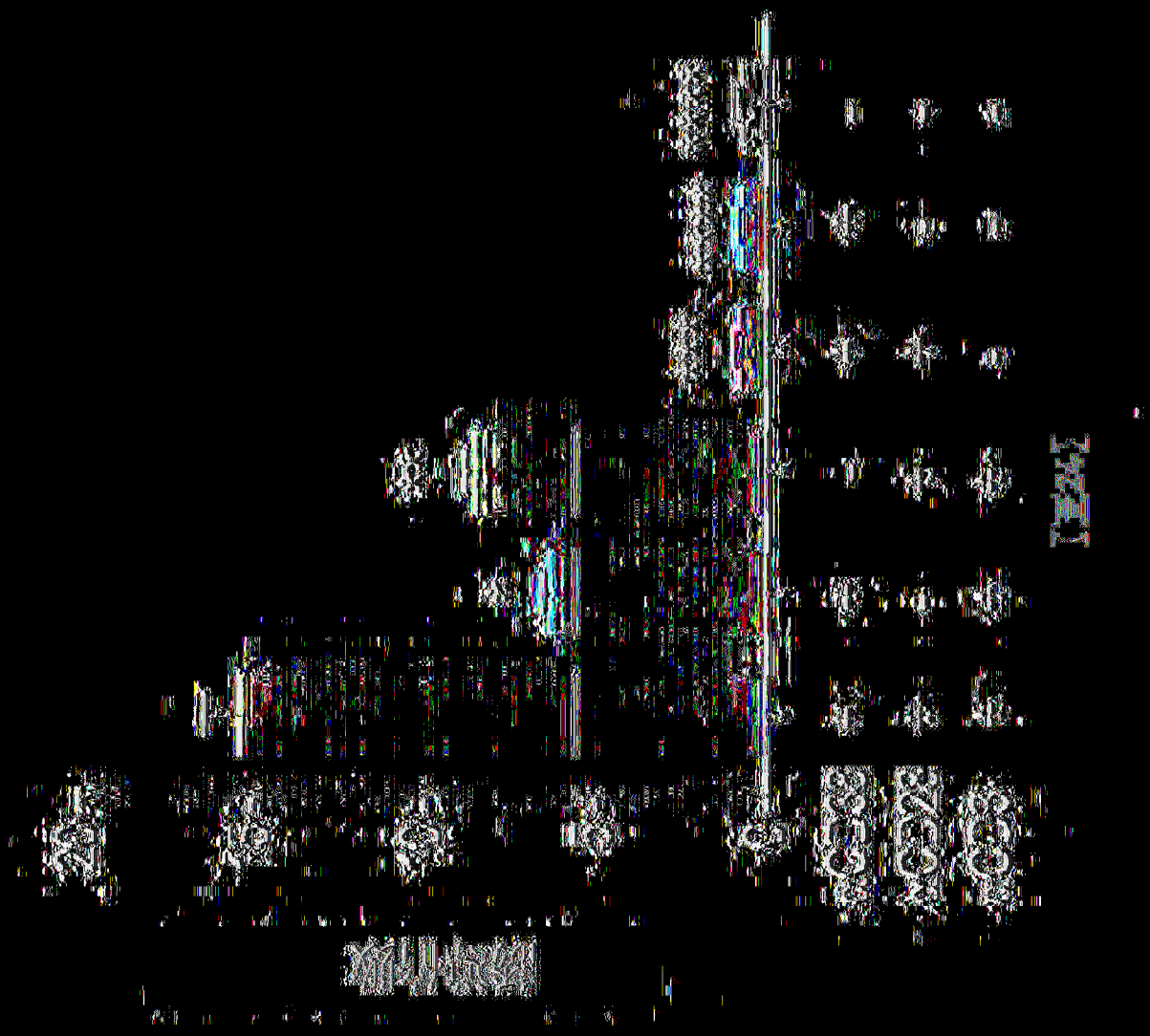


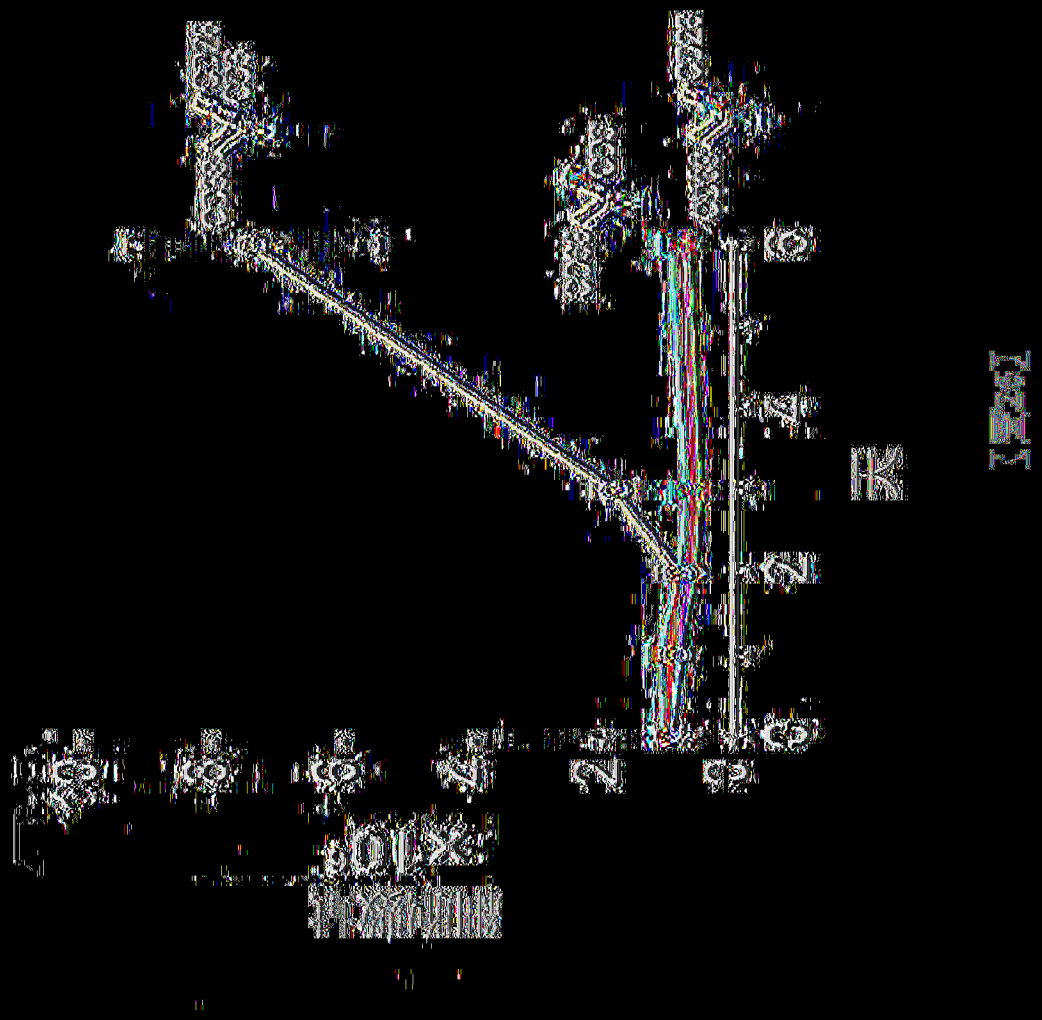


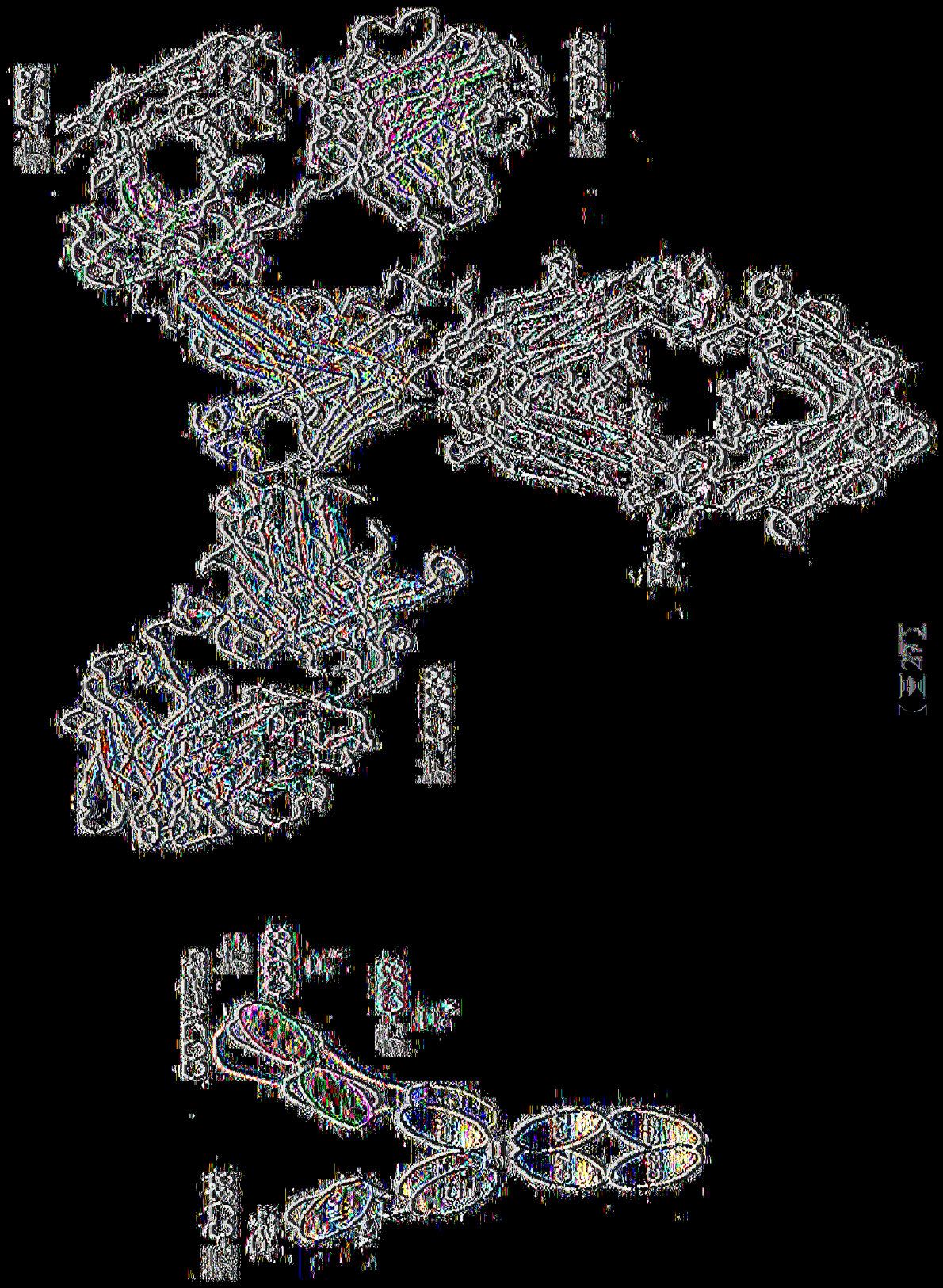


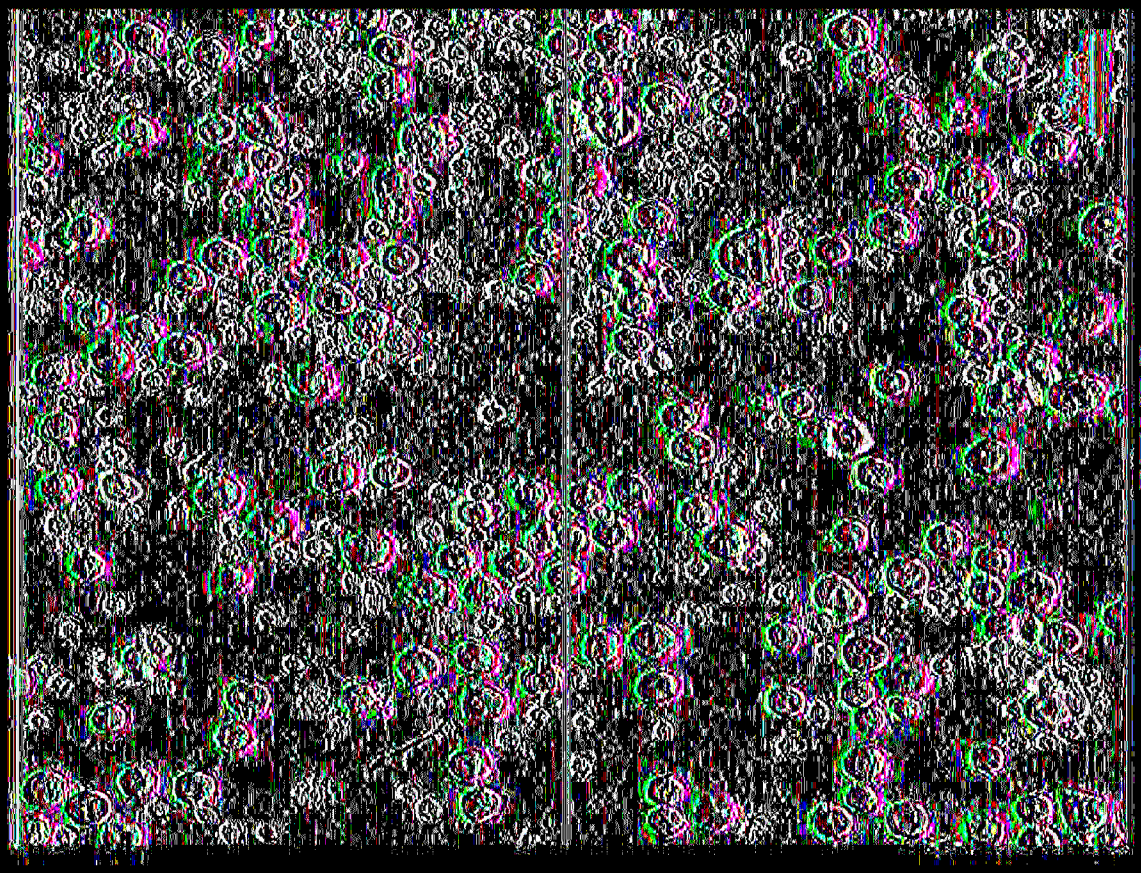


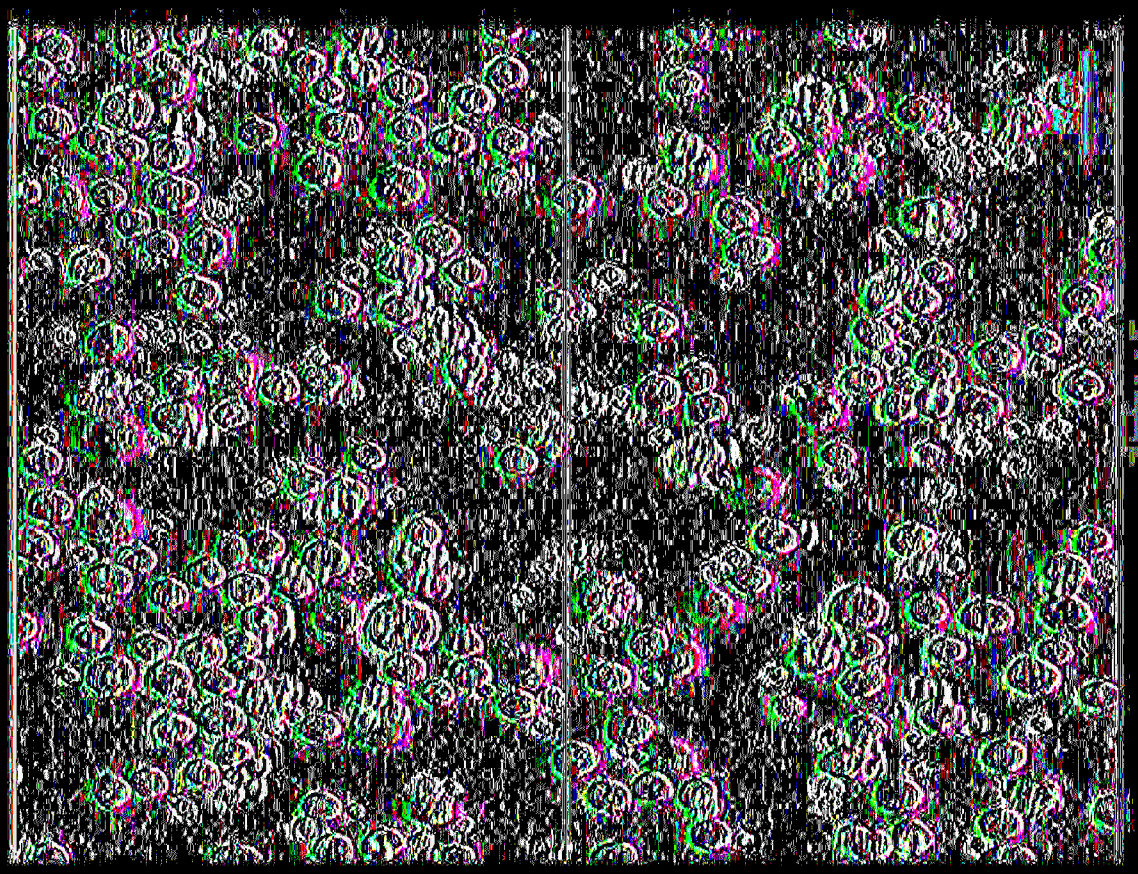












【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種單特異性結合蛋白，其結合CD38多肽，其中該單特異性結合蛋白包含：

(a) 抗體重鏈，其包含抗體重鏈可變(VH)結構域，該VH包含：包含GFTFSSYG (SEQ ID NO:41)的胺基酸序列之CDR-H1序列，包含IWYDGSNK (SEQ ID NO:42)之胺基酸序列的CDR-H2序列，及包含ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43)之胺基酸序列的CDR-H3序列；及

(b) 抗體輕鏈，其包含抗體輕鏈可變(VL)結構域，該VL包含：包含QGIRND (SEQ ID NO:44)之胺基酸序列的CDR-L1序列，包含AAS (SEQ ID NO:45)之胺基酸序列的CDR-L2序列，及包含LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46)之胺基酸序列的CDR-L3序列。

【請求項2】如請求項1的單特異性結合蛋白，其中該VH結構域包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，且該VL結構域包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列。

【請求項3】如請求項1或請求項2的單特異性結合蛋白，其中該抗體重鏈包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列，且該抗體輕鏈包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項1-3中任一項的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白與人CD38多肽之胞外域及食蟹猴CD38多肽之胞外域交叉反應。

【請求項5】 如請求項4的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白結合包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的人CD38多肽。

【請求項6】 如請求項5的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白以2.1nM或更小之平衡解離常數(K_D)結合該包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的人CD38多肽。

【請求項7】 如請求項4的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白結合包含SEQ ID NO:105之胺基酸序列的人同功異型物E CD38多肽。

【請求項8】 如請求項4-7中任一項的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白結合包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽。

【請求項9】 如請求項8的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白以1.3nM或更小之平衡解離常數(K_D)結合該包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的食蟹猴CD38多肽。

【請求項10】如請求項1-9中任一項的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白是人抗體。

【請求項11】如請求項1-9中任一項的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白是單株抗體。

【請求項12】如請求項1-9中任一項的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白包含一個或多個全長抗體重鏈，該一個或多個全長抗體重鏈包含Fc區。

【請求項13】 如請求項12的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白在其細胞表面誘導表現CD38之細胞的抗體依賴性細胞毒性。

【請求項14】 如請求項12的單特異性結合蛋白，其中該Fc區是人IgG1 Fc區。

【請求項15】 如請求項14的單特異性結合蛋白，其中根據EU Index，該人IgG1 Fc區在對應於人IgG1之234、235及329位的位置處包含胺基酸取代，其中該等胺基酸取代是L234A、L235A及P329A。

【請求項16】 如請求項14的單特異性結合蛋白，其中根據EU Index，該人IgG1 Fc區在對應於人IgG1之298、299及300位的位置處包含胺基酸取代，其中該等胺基酸取代是S298N、T299A及Y300S。

【請求項17】 如請求項12的單特異性結合蛋白，其中該Fc區是人IgG4 Fc區。

【請求項18】 如請求項17的單特異性結合蛋白，其中根據EU Index，該人IgG4 Fc區在對應於人IgG4之228及409位的位置處包含胺基酸取代，其中該等胺

基酸取代是S228P及R409K。

【請求項19】 如請求項18的單特異性結合蛋白，其中根據EU Index，該人IgG4 Fc區在對應於人IgG4之234及235位的位置處包含胺基酸取代，其中該等胺基酸取代是F234A及L235A。

【請求項20】 如請求項18的單特異性結合蛋白，其中根據EU Index，該人IgG4 Fc區在對應於人IgG4之233-236位的位置處包含胺基酸取代，其中該等胺基酸取代是E233P、F234V、L235A及在236處的缺失。

【請求項21】 如請求項1-20中任一項的單特異性結合蛋白，其中該單特異性結合蛋白與細胞毒性劑或標記物綴合。

【請求項22】 一種多核苷酸，其編碼如請求項1-21中任一項的單特異性結合蛋白。

【請求項23】 一種載體，其包含如請求項22的多核苷酸。

【請求項24】 一種宿主細胞，其包含如請求項22的多核苷酸或如請求項23的載體。

【請求項25】 一種產生單特異性結合蛋白的方法，該方法包含培養如請求項24的宿主細胞從而產生該單特異性結合蛋白。

【請求項26】 如請求項25的方法，其進一步包含從該宿主細胞回收該單特異性結合蛋白。

【請求項27】 一種醫藥組合物，其包含如請求項1-21中任一項的單特異性結合蛋白及醫藥上可接受的載劑。