BTN3A 结合蛋白及其医药用途

本公开要求 2023 年 08 月 04 日提交的中国专利申请《BTN3A 结合蛋白及其医药用途》（申请号：2023109765101）的优先权，通过引用并入此处。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及 BTN3A 结合蛋白及其用于激活 γδ T 细胞、治疗癌症的方法和相关制药用途。

背景技术

免疫疗法的出现改变了传统治疗癌症的格局。目前大多数免疫治疗方法侧重于增强 αβ T 细胞抗肿瘤免疫反应，然而仍然有其他具有抗肿瘤潜力的淋巴细胞亚群值得关注。γδ T 细胞是一类特殊的具有先天免疫特征的 T 细胞亚群，在人体中约占总 T 细胞的 0.5%-5%，其可以在不依赖主要组织相容性复合体（MHC）和抗原呈递细胞（APC）的情况下直接识别特定配体传递的抗原信号进行活化。T 细胞均表达 TCR，根据 TCR 的基因不同，分为 αβ T 和 γδ T，其中 αβ T 细胞表达 Vα 和 Vβ TCR 链，而 γδ T 细胞表达 Vγ 和 Vδ TCR 链。γδ T 细胞总共有 7 种 Vγ TCR 链（Vγ2、3、4、5、8、9 和 11）和 4 种 Vδ 链（Vδ1、2、3 和 5），根据 δ 链的不同，人类 γδ T 细胞分为 3 个主要亚群：Vδ1 T，Vδ2 T 和 Vδ3 T。Vδ1 T 细胞主要在粘膜上皮组织中，Vδ2 T 细胞主要在外周血中，Vδ3 T 主要分布肝和肠。而约占外周血总 T 细胞 1 至 5%的 Vγ9Vδ2 T 细胞亚群，是目前研究最多的亚群。研究表明，活化的 Vγ9Vδ2 T 可以通过分泌 IFN-γ 和 TNF-α 等细胞因子或者释放穿孔素和颗粒酶来杀伤癌细胞，而激活的 Vγ9Vδ2 T 细胞同时也会增殖，进一步起到抗肿瘤的作用。

近年来，嗜乳脂蛋白亚家族 3 成员 A（BTN3A）已成为调控 Vγ9Vδ2 T 细胞功能的重要分子。BTN3A 家族包括 BTN3A1（又叫 CD277）、BTN3A2 和 BTN3A3 三种亚型，分别由人类第 6 号染色体上的三个不同基因表达，它们在人类和非人灵长类动物（NHP）中表达。BTN3A 家族是I型跨膜蛋白，每个 BTN3A 亚型的胞外段均由远离细胞膜的一个 IgV 结构域和靠近细胞膜的一个 IgC 结构域组成，三个亚型的胞外段序列同源性高达 95%。BTN3A1 和 BTN3A3 的细胞质区域包含一个 B30.2 结构域，而 BTN3A2 中没有该结构域。最近有研究发现，在细菌或病毒刺激及在应激压力条件下，细胞内逐渐积累的磷酸化抗原（pAg）会被 BTN3A 蛋白的胞内段 B30.2 结构域识别并结合，结合 pAg 后的 BTN3A 蛋白的胞外段构象发生变化，进一步促进自身与细胞膜表面 BTN2A1 蛋白形成复合物，并通过 BTN2A1 的 IgV 结构域结合 Vγ9Vδ2 T 细胞的 Vγ9 链，从而激活 Vγ9Vδ2 T 细胞发挥功能。由于 BTN3A3 对 pAg 的亲和力较差，因此只有 BTN3A1 能感知细胞内 pAg 的增加并激活 Vγ9Vδ2 T 细胞。

最近的研究发现，通过设计靶向结合 BTN3A1 胞外段的抗体，可以替代细胞内的 pAg，更高效地行使激活 Vγ9Vδ2 T 细胞的功能。此外，BTN3A1 抗体具有提高 αβ T 细胞的抗肿瘤能力。

本公开提供了新序列结构的抗 BTN3A 抗体，具有优异的激活 γδ T 细胞、促进 γδ T 细胞释放细胞因子的活性，进而能够增强 γδ T 细胞杀伤肿瘤细胞，具有良好的成药性和成为临床药物的潜力。

发明内容

本公开提供 BTN3A 结合蛋白，其编码核酸、载体、宿主细胞、药物组合物及其用于激活 γδ T 细胞、促进 γδ T 细胞释放细胞因子、治疗或预防疾病（例如癌症）的方法和相关制药用途。

BTN3A 结合蛋白

本公开提供 BTN3A 结合蛋白，其包含特异性结合 BTN3A 的结构域，所述结构域包含重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL）。一些实施方案中，所述 BTN3A 结合蛋白中的特异性结合 BTN3A 的结构域为一个或多个。

本公开提供 BTN3A 结合蛋白，其包含重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL）。

一些实施方案中，所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：17-19 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：20-22 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

HCDR1（SEQ ID NO：17）：$X_1YYX_2X_3$，其中，X_1 选自 D 或 N，X_2 选自 I 或 M，X_3 选自 T 或 N；

HCDR2（SEQ ID NO：18）：$X_4IYGSX_5NTX_6YASWAKG$，其中，X_4 选自 V 或 I，X_5 选自 S 或 D，X_6 选自 V 或 Y；

HCDR3（SEQ ID NO：19）：$X_7X_8X_9X_{10}SSAX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$，其中，$X_7$ 选自 G 或 N，X_8 选自 Y 或 L，X_9 选自 L 或 D，X_{10} 选自 A 或 Y，X_{11} 选自 D 或 Y，X_{12} 选自 I 或 F，X_{13} 不存在或为 H，X_{14} 不存在或为 I；

LCDR1（SEQ ID NO：20）：$QX_{15}SQSVYNNNRLA$，其中，X_{15} 选自 S 或 A；

LCDR2（SEQ ID NO：21）：$X_{16}ASX_{17}LAS$，其中，X_{16} 选自 D 或 E，X_{17} 选自 T 或 K；

LCDR3（SEQ ID NO：22）：$QX_{18}YYSGX_{19}IX_{20}X_{21}$，其中，$X_{18}$ 选自 T 或 G，X_{19} 选自 Y 或 F，X_{20} 选自 W 或 Y，X_{21} 选自 A 或 P。

一些实施方案中，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：1、3、31-35、39-44 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2、4、36-38、45-47 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

一些实施方案中，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：1、31-35 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2、

36-38 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

一些实施方案中，所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：5-7 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：8-10 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

一些实施方案中，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：3、39-44 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：4、45-47 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

一些实施方案中，所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：11-13 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

上述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含如 SEQ ID NO：1、3、31-35、39-44 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和/或如 SEQ ID NO：2、4、36-38、45-47 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区。

一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含如 SEQ ID NO：1、31-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：2、36-38 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区。

一些具体实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含：

如 SEQ ID NO：1 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：2 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

如 SEQ ID NO：31-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：36 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

如 SEQ ID NO：31-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；或

如 SEQ ID NO：31-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区。

一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含如 SEQ ID NO：3、39-44 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：4、45-47 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链

可变区。

一些具体实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含：

如 SEQ ID NO：3 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：4 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

如 SEQ ID NO：39-44 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：45 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

如 SEQ ID NO：39-44 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：46 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

如 SEQ ID NO：39-44 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：47 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区。

一些实施方案中，前述 BTN3A 结合蛋白为抗 BTN3A 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，前述抗体为兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或全人抗体。

一些实施方案中，前述抗体为重组抗体。

一些实施方案中，前述抗体为单特异性抗体或多特异性抗体（例如，双特异性抗体、三特异性抗体、四特异性抗体）。

一些实施方案中，前述抗体或其抗原结合片段为单链抗体（即全长重链和轻链）；Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 Fab’、F（ab’）$_2$、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体（例如 VH 或 VL 或 VHH）、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段。

一些实施方案中，前述抗体或其抗原结合片段为人源化、回复突变、亲合力成熟、去除/减少 T 细胞表位（TCE）、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的。

一些实施方案中，经过去除/减少 TCE 改造后，在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致 BTN3A 结合蛋白的免疫原性降低。

一些实施方案中，人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-66，轻链框架区源自 IGkV1-27。

一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白中还包含免疫球蛋白的 Fc 区。一些具体实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 的 Fc 区。一些具体实施方案中，所述 Fc 区可以是效应器功能降低的 Fc 区，例如，所述 Fc 区可以具有突变，效应器功能降低的示例性 IgG Fc 区包括具有以下的取代：N297A 或 N297Q（IgG1）；L234A/L235A（IgG1）；V234A/G237A（IgG2）；L235A/G237A/E318A（IgG4）；H268Q/V309L/A330S/A331S（IgG2）；C220S/C226S/C229S/P238S（IgG1）；C226S/C229S/E233P/L234V/L235A（IgG1）；L234F/L235E/P331S（IgG1）；或

S267E/L328F（IgG1），其中“/”表示“和”。一些具体实施方案中，所述 Fc 区是具有 L234F、L235E 和/或 P331S 突变的人 IgG1 的 Fc 区，可选地，K446 是去除的。一些具体实施方案中，Fc 区具有 SEQ ID NO：23、24 或与之具有至少 80%、90%同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，Fc 区是稳定性增高的，或具有使得所述 Fc 区较之野生型 Fc 区稳定性增高的突变。一些实施方案中，Fc 区可以使所述结合蛋白形成二聚体分子。一些实施方案中，Fc 区可以延长所述结合蛋白的体内半衰期。

一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含如 SEQ ID NO：25、27、48-52、56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和/或，如 SEQ ID NO：26、28、53-55、62-64 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链。

一些具体实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含：

如 SEQ ID NO：25 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：26 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

如 SEQ ID NO：48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：53 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

如 SEQ ID NO：48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；或，

如 SEQ ID NO：48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链。

一些具体实施方案中，BTN3A 结合蛋白中包含：

如 SEQ ID NO：27 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：28 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

如 SEQ ID NO：56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：62 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

如 SEQ ID NO：56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：63 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；或，

如 SEQ ID NO：56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：64 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨

基酸序列的轻链。

本公开中，“至少 80%（序列）同一性”涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、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%（序列）同一性；“至少 90%（序列）同一性”涵盖至少 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%（序列）同一性。

一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白特异性结合 BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3 中的一个或多个，例如：

单独特异性结合 BTN3A1，不特异性结合 BTN3A2、BTN3A3；

单独特异性结合 BTN3A2，不特异性结合 BTN3A1、BTN3A3；

单独特异性结合 BTN3A3，不特异性结合 BTN3A1、BTN3A2；

特异性结合 BTN3A1、BTN3A2，不特异性结合 BTN3A3；

特异性结合 BTN3A2、BTN3A3，不特异性结合 BTN3A1；

特异性结合 BTN3A1、BTN3A3，不特异性结合 BTN3A2；

同时特异性结合 BTN3A1、BTN3A2 和 BTN3A3。

一些具体实施方案中，上述 BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3 是灵长类或人类的 BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3。

一些实施方案中，本公开的 BTN3A 结合蛋白具有以下的一项或多项特性：

（i）通过 ELISA 所测量的，其以 0.1 nM、0.05 nM、0.02nM、0.01nM 或更低的 EC_{50} 与人 BTN3A1 结合，所述 ELSIA 检测方法是本领域公知的，例如本公开实施例 3 第 1 部分所记载的；

（ii）通过 FACS 所测量的，其以 50 nM、20 nM、15nM、10nM、8nM、5nM 或更低的 EC_{50} 与细胞上的人 BTN3A1 结合，所述 FACS 检测方法是本领域公知的，例如本公开实施例 3 第 2 部分所记载的；

（iii）通过 Biacore 所测量的，其以 5E-10M、2E-10M、1E-10M 或更低的 K_D 与人 BTN3A1 结合，所述 Biacore 检测方法是本领域公知的，例如本公开实施例 3 第 3 部分所记载的；

（iv）以 10nM、5nM、2nM、1nM 或更低的 EC_{50} 诱导 γδT 细胞（例如，Vγ9Vδ2T 细胞）的活化和增殖，所述 EC_{50} 的检测方法是本领域公知的，例如本公开实施例 3 第 4 部分所记载的；一些实施方案中，所述诱导是 γδT 细胞与癌细胞（例如，SKOV-3 细胞）共培养时产生的；

（v）诱导 γδT 细胞（例如，Vγ9Vδ2T 细胞）分泌细胞因子（例如，IFNγ）；一些实施方案中，所述诱导是 γδT 细胞与癌细胞（例如，SKOV-3 细胞）共培养时产生的。

本公开还提供 BTN3A 结合蛋白，其包含如下 CDR 中的任意一个或其任意组

合：分别如 SEQ ID NO：17-19 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分别如 SEQ ID NO：20-22 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

一些实施方案中，本公开提供前述 BTN3A 结合蛋白变体，所述变体与 SEQ ID NO：1、3、31-35、39-44 任一所示氨基酸序列的重链可变区和/或 SEQ ID NO：2、4、36-38、45-47 任一所示氨基酸序列的轻链可变区相比，具有一个或多个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个）氨基酸突变；所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加；所述氨基酸突变可以发生在 CDR 区和/或 FR 区。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，其与前述本公开的 BTN3A 结合蛋白结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，其阻断前述本公开的 BTN3A 结合蛋白与 BTN3A（包括 BTN3A1、BTN3A2 和/或 BTN3A3）的结合。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，其与 BTN3A（包括 BTN3A1、BTN3A2 和/或 BTN3A3）的结合被前述本公开的 BTN3A 结合蛋白阻断。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，其包含前述本公开任意一个或多个重链可变区和轻链可变区的组合，所述重链可变区选自 SEQ ID NO：1、3、31-35、39-44，所述轻链可变区选自 SEQ ID NO：2、4、36-38、45-47。例如，所述蛋白或分子为缀合物，所述缀合物例如可包含任意可检测标记。

多核苷酸和载体

本公开提供编码本公开的 BTN3A 结合蛋白的多核苷酸。本公开的核酸可为 RNA、DNA（如 cDNA）。根据本公开的一些实施方案，本公开的核酸是基本上分离的核酸。

本公开的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供 BTN3A 结合蛋白体外和/或体内（即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中）表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件（例如启动子、增强子、终止子等）。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的 BTN3A 结合蛋白表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的核酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式（例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术）制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的 BTN3A 结合蛋白和/或含有本公开的多核苷酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、

真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株（例如大肠杆菌（*Escherichia coli*）菌株、变形杆菌属（*Proteus*）菌株及假单胞菌属（*Pseudomonas*）菌株）及革兰氏阳性细菌菌株（例如芽孢杆菌属（*Bacillus*）菌株、链霉菌属（*Streptomyces*）菌株、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）菌株及乳球菌属（*Lactococcus*）菌株）的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属（*Trichoderma*）、脉孢菌属（*Neurospora*）及曲菌属（*Aspergillus*）的物种的细胞；或者包括酵母属（*Saccharomyces*）（例如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*））、裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）（例如粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*））、毕赤酵母属（*Pichia*）（例如巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）及嗜甲醇毕赤酵母（*Pichia methanolica*））及汉森酵母属（*Hansenula*）的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

制备方法

本公开提供一种用于制备 BTN3A 结合蛋白的方法，包括：在如前所述的宿主细胞中表达所述目的蛋白，并自该宿主细胞中分离目的蛋白。可选地，还可以包含纯化步骤，例如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化，洗去非特异性结合的组分，再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测，收集。可选地，用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南（5-8 章和 15 章）。

本公开结合蛋白（如工程化的抗体或抗原结合片段）可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。

组合物

本公开提供组合物，包含前述本公开的 BTN3A 结合蛋白。例如，提供药物组合物，其含有对治疗、缓解或预防疾病有效量的前述 BTN3A 结合蛋白，和至少一种可药用的赋形剂、稀释或载体。

在一些具体实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%

的 BTN3A 结合蛋白，或药物组合物单位剂量中含 BTN3A 结合蛋白的量为 0.1-2000mg，在一些具体实施方案中为 1-1000mg。

一些实施方案中，提供制品或产品（如药盒），包含前述 BTN3A 结合蛋白。可选地，制品包含容器和标签。容器例如瓶、注射器和试管。容器容纳有效于治疗病症的组合物。容器上或与容器相连的标签表明所述组合物用于治疗所选病症。

一些实施方案中，前述疾病为癌症。

治疗方法和制药用途

本公开提供前述 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸、组合物（包括药物组合物）用于治疗、缓解、预防、诊断疾病或病症的方法。

一些实施方案中，提供改善、缓解、治疗或预防疾病的方法，包括向有需要的受试者施用改善、缓解、治疗或预防有效量的前述 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸、组合物（包括药物组合物）。

一些实施方案中，提供本公开的 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸、组合物（包括药物组合物）用于制备改善、缓解、治疗或预防疾病的药物的用途。

一些实施方案中，前述疾病为与 BTN3A 超量表达相关的疾病或病症。

一些实施方案中，前述疾病为与 BTN3A 介导的疾病或病症。

一些实施方案中，前述疾病为癌症。

一些实施方案中，提供激活 γδ T 细胞、促进 γδ T 细胞释放细胞因子的方法，包括向所述 γδ T 细胞施用或使所述 γδ T 细胞接触 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸、组合物（包括药物组合物），所述 γδ T 细胞可以是有需要的受试者体内或体外的。一些具体实施方案中，所述 γδ T 细胞为 Vγ9Vδ2 T 细胞。

检测

本公开提供 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸、组合物的检测用途。本公开还提供用于体内或体外检测 BTN3A 的方法、系统或装置，其包括用本公开的前述结合蛋白、多核苷酸、组合物处理样品。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括：

（1）使样品与本公开的 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸、组合物接触；

（2）检测在前述结合蛋白、多核苷酸和样品之间形成的复合物；和/或

（3）使参比样品（例如，对照样品）与结合蛋白、核酸接触；和

（4）通过与参比样品比较，确定复合物形成的程度。如与对照样品相比，样品中复合物形成的变化（例如，统计学上的显著变化）表示样品中存在 BTN3A。

一些实施方案中，还提供试剂盒，所述试剂盒包含前述 BTN3A 结合蛋白、多核苷酸，还可以包含诊断使用说明。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，BTN3A 结合蛋白可以配制为药物组合物。

术语定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本公开

中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem，243，p3558（1968）中所述。

“BTN3A”具有其在本领域中的一般含义且是指人 BTN3A 多肽，示例性地，为 NP_008979.3（Genbank Accession NO）所示的 BTN3A1、NP_008978.2（Genbank Accession NO）所示的 BTN3A2 或 NP_008925.1（Genbank Accession NO）所示的 BTN3A3。

“BTN3A 结合蛋白”涵盖任何能够特异性结合 BTN3A 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子，包括但不限于针对 BTN3A 的如本公开定义的抗 BTN3A 抗体、其抗原结合片段或其缀合物。一些实施方案中，BTN3A 结合蛋白中可包含连接子和/或具有效应器功能的部分，例如半衰期延长部分（如结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域）和/或融合配偶体（如血清白蛋白）和/或缀合的聚合物（如 PEG）和/或 Fc 区。

“抗体”涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体和抗体片段（或抗原结合片段，或抗原结合部分），只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、δ 链、γ 链、α 链和 ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（V 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区（C 区）。可变区包括 3 个高变区（HVR）和 4 个序列相对保守的框架区（FR）。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区（CDR）。每条轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、异种的、同种异体的、同基因的或其经过修饰的形式，其中单克隆抗体尤其适用于多个实施例中。一般来说，本公开的抗体是重组抗体。如本文所用的“重组”泛指例如细胞或核酸、蛋白质或载体等产品，表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而加以修饰，或所述细胞来源于如此修饰的细胞。例如，重组细胞表达天然（非重组）细胞形式内不存在的基因或表达原本异常表达、低表达或完

全不表达的天然基因。

“抗原结合片段”涵盖单链抗体（即全长重链和轻链）；Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 Fab’、F（ab’）$_2$、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体（例如 VH 或 VL 或 VHH）、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段（参见例如 Holliger and Hudson，2005，Nature Biotech.23（9）：1126-1136；Adair and Lawson，2005，Drug Design Reviews-Online 2（3），209-217）。产生和制备这些抗原结合片段的方法在本领域是公知的（参见例如 Verma 等人，1998，Journal of Immunological Methods，216，165-181）。

对于 CDR 的确定或定义，能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种，例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR，包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域（参见例如 Johnson&Wu，2000，Nucleic Acids Res.，28：214-8）。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似，但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置（参见例如 Chothia 等，1986，J.Mol.Biol.，196：901-17；Chothia 等人，1989，Nature，342：877-83）。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件（参见例如 Martin 等，1989，ProcNatl Acad Sci（USA），86：9268-9272；”AbMTM，A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies，”Oxford，UK；Oxford Molecular，Ltd）。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合，从基本序列建模抗体的三级结构（参见 Samudrala 等，1999，在 PROTEINS，Structure，Function and Genetics Suppl.，3：194-198 中的”Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些）。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析（参见例如 MacCallum 等，1996，J.Mol.Biol.，5：732-45）。构象定义中，CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基（参见例如 Makabe 等，2008，Journal of Biological Chemistry，283：1156-1166）。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一，但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠，尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果，它们可缩短或延长。如本公开使用的，CDR 可指通过本领域已知的任何方法（包括方法的组合）定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，且在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“抗体框架（FR）”，是指可变结构域的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环（CDR）的支架。

“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为CDR移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分，从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降，可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的VHH结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而“人源化”。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列，且在一些具体实施方案中，可含IGHV3的人框架区序列。人源化方法例如蛋白表面氨基酸人源化（resurfacing）及抗体人源化通用框架移植法（CDR grafting to a universal framework），即将CDR“移植”于其它“支架”（包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架）上。适于所述CDR移植的支架及技术在本领域中是已知的。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 VBase 人种系序列数据库，以及在Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版中找到。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对CDR进行亲合力成熟后的人源化抗体。此外，为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。

“亲和力成熟的”抗体指与不拥有此类改变的亲本抗体相比，在一个或多个高变区（HVR）中具有一处或多处改变的抗体，此类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。例如，“亲合力成熟”的BTN3A结合蛋白或抗BTN3A抗体，在一个或多个CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致对抗原的亲合力相比于其亲本抗体有所增加。亲合力成熟的抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备：Marks等人，1992，Biotechnology 10：779-783或Barbas等人，1994，Proc.Nat.Acad.Sci，USA 91：3809-3813.；Shier等人，1995，Gene 169：147-155；Yelton等人，1995，Immunol.155：1994-2004；Jackson 等人，1995，J.Immunol.154（7）：3310-9；及Hawkins等人，1992，J.MoI.Biol.226（3）：889896；KS Johnson及RE Hawkins，”Affinity maturation of antibodies using phage display”，Oxford University Press 1996。

通常，本公开的BTN3A结合蛋白将以如于Biacore或KinExA或Fortibio测定中测量的优选10^{-7}至10^{-10}摩尔/升（M）、更优选10^{-8}至10^{-10}摩尔/升、甚至更优选10^{-9}至10^{-10}或更低的解离常数（K_D），和/或以至少10^{-7}M、优选至少10^{-8}M、更优选至少10^{-9}M，更优选至少10^{-10}M的缔合常数（KA）结合所要结合的抗原或靶蛋白（即BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3）。任何大于10^{-4}M的K_D值一般都视为指示非特异性结合。抗原结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本公开所述的表面等离子体共振术（SPR）测定、Scatchard测定和/或竞争性结合测定（例如放射免疫测定（RIA）、酶免疫测定（EIA）及夹心式竞争性测定）。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子（例如抗体或其部分与抗原）之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数（K_D）来量化。可通过使用例如表面等离子共振（SPR）方法（Biacore）测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 ka（或 kon）和解离速率常数 kd（或 koff）。K_D 通过方程 K_D=kd/ka 与 ka 和 kd 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且甚至可通过例如 Caceci 等人（1984，Byte 9：340-362）中所述的那些方法对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman（1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432）中公开的那种来确定 K_D。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振（SPR），例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用（例如抗体和抗原之间的特异性相互作用）的 K_D 值与非目的相互作用（例如已知不结合 BTN3A 的对照抗体）的 K_D 值进行评价。

“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“核酸”或“多核苷酸”在本公开中可互换使用，指的是单链或双链的任何 DNA 分子或 RNA 分子以及在单链的情况下，它的互补序列的分子，优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，

如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同（在形态学或基因组 DNA 互补体中）。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。“抑制生长”（例如涉及细胞）旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触，例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，例如包含本公开的任一种结合蛋白或其药物组合物作为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种增殖性疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该

说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。“和/或”应视为特定揭示两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者。因此，诸如本公开中“A 和/或 B”的词组中所用的术语“和/或”包括“A 及 B”、“A 或 B”、“A”（单独）及“B”（单独）。除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不仅限于”的意义。在本公开中 Fc 区所包含的突变的上下文中，“/”表示“和”，例如，“L234A/L235A”表示“L234A 和 L235A”，即，Fc 中包含 L234A 和 L235A 突变；本公开 Fc 区的突变的氨基酸位置均是根据 EU 编号系统定义的。

本公开的“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

附图说明

图 1 为抗 BTN3A1 嵌合抗体对人 BTN3A1 重组蛋白结合能力 ELISA 检测结果。

图 2 为抗 BTN3A1 嵌合抗体对人 BTN3A1 过表达细胞结合能力 FACS 检测结果。

图 3 为抗 BTN3A1 嵌合抗体对 γδ T 细胞的激活能力检测结果。将 Vγ9Vδ2 T 细胞与 A375 靶细胞共培养，加入待测抗体孵育，用 ELISA 测定细胞上清中分泌的人 IFNγ 的含量。

图 4 为 BTN3A1 嵌合抗体介导 γδ T 细胞对 A375 细胞的杀伤能力检测结果。将 Vγ9Vδ2 T 细胞和 A375 细胞共培养，加入待测抗体孵育，试剂裂解细胞后用酶标仪测量发光活性。

图 5 为 20A3 人源化抗体对 γδ T 细胞的激活能力检测结果。将 Vγ9Vδ2 T 细胞与 A375 靶细胞共培养，加入待测抗体孵育，用 ELISA 测定细胞上清中分泌的人 IFNγ 的含量。

图 6A 为 17G4 的人源化抗体对人 BTN3A1 过表达细胞结合能力 FACS 检测结果，图 6B 为 20A3 的人源化抗体对人 BTN3A1 过表达细胞结合能力 FACS 检测结果。

图 7A 为 20A3-H2L2 对人 BTN3A1 过表达细胞结合能力 FACS 检测结果，图 7B 为 20A3-H2L2 对人 BTN3A2 过表达细胞结合能力 FACS 检测结果，图 7C 为 20A3-H2L2 对人 BTN3A3 过表达细胞结合能力 FACS 检测结果。

图 8 为 20A3-H2L2 对 γδ T 细胞的激活能力检测结果。将 Vγ9Vδ2 T 细胞与 SKOV-3 靶细胞共培养，加入待测抗体孵育，用 ELISA 测定细胞上清中分泌的人 IFNγ 的含量。

图 9 为 20A3-H2L2 介导 γδ T 细胞对 SKOV-3 细胞的杀伤能力检测结果。将 Vγ9Vδ2 T 细胞和 SKOV-3 细胞共培养，加待测抗体孵育，试剂裂解细胞后用酶标

仪测量发光活性。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. 抗人 BTN3A1 兔源单克隆抗体的筛选和制备

1. 免疫抗原、筛选抗原

带小鼠 IgG2a Fc 和 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-mFc-his）重组蛋白，生物素修饰的带 his 和 avi 标签的人 BTN3A1（Bio-h-BTN3A1-his-avi）重组蛋白，带 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-his）重组蛋白均为商业蛋白试剂，各自序列来源见表 1。所述蛋白试剂可用于下述各实验中。

表 1.重组蛋白氨基酸序列来源

名称	氨基酸序列起止	Genkank 登录号	公司
h-BTN3A1-mFc-his	Gln30-Gly254	O00481-1	DIMA biotech
Bio-h-BTN3A1-his-avi			
h-BTN3A1-his			Kactus

2. 抗人 BTN3A1 兔源单克隆抗体的筛选

通过免疫新西兰大白兔产生抗体。

实验方法：免疫抗原为带小鼠 IgG2a Fc 和 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-mFc-his）重组蛋白。首次免疫用弗氏完全佐剂（CFA）与抗原等体积乳化，免疫剂量 300 μg/只，其余加强免疫用弗氏不完全佐剂（IFA）与抗原等体积乳化，免疫剂量 150 μg/只。免疫注射时间为第 0，22，36，50 天。于第 42 天采血进行血检，用 ELISA 方法检测新西兰大白兔血清，确定兔血清中的抗体滴度。取 ELISA 检测效价较高的兔的脾脏，进行脾脏细胞分离，使用流式细胞仪分选结合生物素化的人 BTN3A1（Bio-h-BTN3A1-his-avi）重组蛋白的 B 细胞，并于 96 孔板以每孔小于一个 B 细胞的密度铺板，培养两周后，收集 B 细胞上清液。

3. 抗 BTN3A1 兔源单抗对 BTN3A1 重组蛋白的 ELISA 结合实验

通过 ELISA 实验检测兔源 B 细胞上清液对人 BTN3A1 的结合特性。

实验方法：用带 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-his）重组蛋白包被 96 孔酶标板，加入兔源单抗上清后，通过加入二抗（HRP 偶联的抗一抗 Fc 的抗体）和 HRP 底物 TMB 检测抗体与抗原结合的活性。带有 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-his）重组蛋白包被 96 孔酶标板，按 1 μg/mL 浓度包被，4℃孵育过夜。

包被板甩干，并在吸水纸上拍干，加 150 μL/孔封闭液，酶标板于 37℃孵育 1 小时。甩干，并在吸水纸上拍干。每孔加入抗 BTN3A1 待测抗体，37℃孵育 1 小时。甩掉上清，并拍干，每孔加入 100 μL 用稀释液按 1:5000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗，37℃孵育 1 h。洗板机洗涤酶标板，用 PBS 液洗涤，程序为洗涤 5 次，浸泡 30 s/次。加入底物溶液（TMB）100 μL/孔，反应 5 min，终止结果，最后加入 100 μL 1 mol/L 硫酸终止反应。用酶标仪（Tecan-infinite F50）在 450 nm 波长下测定 OD450 值。

我们发现 2 株兔源单抗对人 BTN3A1 重组蛋白的结合活性较高，分别是 r17G4 和 r20A3。

表 2. 抗 BTN3A1 兔源单抗对人 BTN3A1 重组蛋白的 ELISA 结合实验结果

样品	ELISA（OD 450）
抗体株 r17G4	1.8404
抗体株 r20A3	2.1022
兔多抗血清（阳性对照）	2.3977
空白（阴性对照）	0.0539

4. 抗 BTN3A1 兔源单抗对表达 BTN3A1 细胞的结合实验

通过流式细胞仪（FACS）检测兔源 B 细胞上清液对表达人 BTN3A1 蛋白的 HEK293 细胞的结合特性。

实验方法：构建瞬时表达人 BTN3A1 的细胞株，加入抗体后，通过加入二抗检测抗体与抗原结合的特性。将带有人 BTN3A1 基因序列的表达质粒在 HEK293 细胞中进行瞬时转染。在 96 孔板中每孔接种 2×10^5 个瞬时转染的 HEK293 细胞。300 g 离心 5 分钟，去除上清，加入 100 μL 待测抗体，4℃孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μL 洗液（PBS+2%FBS）洗涤 3 次，加入 100 μL 1：500 稀释的抗兔 IgG 二抗，4℃孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μL 洗液（PBS+2% FBS）洗涤 3 次。用 100 μL PBS 重悬细胞，用流式细胞仪检测。

结果显示，r17G4 和 r20A3 能够明显结合表达有 BTN3A1 的 HEK293 细胞。

表 3. 抗 BTN3A1 兔源单抗对表达 BTN3A1 的 HEK293 细胞的结合实验结果

样品	MFI	百分比（%）
抗体株 r17G4	443884	99
抗体株 r20A3	189571	98.33
兔多抗血清（阳性对照）	176086	97.27
空白（阴性对照）	830	0.13

5. 抗 BTN3A1 兔源单抗的 γδ T 细胞激活实验

通过功能实验测定 Vγ9Vδ2 T 细胞分泌 IFNγ 含量，以检测兔源 B 细胞上清液

的激活能力。

实验方法：将 Vγ9Vδ2 T 细胞与 A375 靶细胞共培养，加入兔源 B 细胞上清液混合，置于 37℃的 5% CO_2 培养箱中孵育 24 小时，用 ELISA 试剂盒测定细胞上清中分泌的人 IFNγ 的含量。

表 4 结果显示，r17G4 和 r20A3 与 Vγ9Vδ2 T 细胞孵育后能够明显产生 IFNγ，表明该抗体具有激活 Vγ9Vδ2 T 细胞的功能。

表 4. 抗 BTN3A1 兔源单抗对 Vγ9Vδ2 T 细胞的激活实验结果

样品	IFNγ（pg/mL）
抗体株 r17G4	1657
抗体株 r20A3	1839
空白（阴性对照）	500

实施例 2. 抗 BTN3A1 兔源单抗的人-兔嵌合抗体制备

1. 抗 BTN3A1 兔源单抗测序

取上述抗体株对应的处于对数生长期的 B 细胞，用 Trizol 提取 RNA，反转录成 cDNA，采用兔 Ig-Primer 进行 PCR 扩增，亚克隆至载体中，测序后最终得到兔源单抗的序列。

兔源单抗 r17G4、r20A3 的重链可变区（HCVR）和轻链可变区（LCVR）序列如下：

>r17G4 HCVR

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLN*DYYIT*WVRQAPGKGLEWIG*VIYGSSNT VYASWAKG*RFTISKTSTMVDLRITSPTTEDTATYFCAR*GYLASSADI*WGPGTLVTVS L （SEQ ID NO：1）

>r17G4 LCVR

QVLTQTPSPVSAAVGGTVTINC*QSSQSVYNNNRLA*WYQQKPGQPPKLLIY*DASTLA S*GVPSRFKGSGSGTDFTLTISDLECADAATYYC*QTYYSGYIWA*FGGGTEVVVK （SEQ ID NO：2）

>r20A3 HCVR

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTIN*NYYMN*WVRQAPGKGLEWIG*IIYGSDNT YYASWAKG*RFTISKTSTTVDLIMTSPTTEDTATYFCVR*NLDYSSAYFHI*WGPGTLVT VSS （SEQ ID NO：3）

>r20A3 LCVR

QVLTQTPSPVSAAVGGTVSISC*QASQSVYNNNRLA*WYQQKPGQPPNLLIY*EASKLA S*GVPSRFKGSGSGTQFTLIISEVQCEDAATYYC*QGYYSGFIYP*FGGGTEVVVK （SEQ ID NO：4）

其中下划线是根据 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列，见表 5。

表 5. r17G4 和 r20A3 的 CDR 序列（根据 Kabat 编号系统）

抗体	名称	序列	编号
r17G4	HCDR1	DYYIT	SEQ ID NO：5
	HCDR2	VIYGSSNTVYASWAKG	SEQ ID NO：6
	HCDR3	GYLASSADI	SEQ ID NO：7
	LCDR1	QSSQSVYNNNRLA	SEQ ID NO：8
	LCDR2	DASTLAS	SEQ ID NO：9
	LCDR3	QTYYSGYIWA	SEQ ID NO：10
r20A3	HCDR1	NYYMN	SEQ ID NO：11
	HCDR2	IIYGSDNTYYASWAKG	SEQ ID NO：12
	HCDR3	NLDYSSAYFHI	SEQ ID NO：13
	LCDR1	QASQSVYNNNRLA	SEQ ID NO：14
	LCDR2	EASKLAS	SEQ ID NO：15
	LCDR3	QGYYSGFIYP	SEQ ID NO：16

两个抗体具有如下的通式 CDR 结构：

HCDR1（SEQ ID NO：17）：X_1YYX_2X_3，其中，X_1 选自 D 或 N，X_2 选自 I 或 M，X_3 选自 T 或 N；

HCDR2（SEQ ID NO：18）：X_4IYGSX_5NTX_6YASWAKG，其中，X_4 选自 V 或 I，X_5 选自 S 或 D，X_6 选自 V 或 Y；

HCDR3（SEQ ID NO：19）：$X_7X_8X_9X_{10}$SSA$X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$，其中，X_7 选自 G 或 N，X_8 选自 Y 或 L，X_9 选自 L 或 D，X_{10} 选自 A 或 Y，X_{11} 选自 D 或 Y，X_{12} 选自 I 或 F，X_{13} 不存在或为 H，X_{14} 不存在或为 I；

LCDR1（SEQ ID NO：20）：QX_{15}SQSVYNNNRLA，其中，X_{15} 选自 S 或 A；

LCDR2（SEQ ID NO：21）：X_{16}ASX_{17}LAS，其中，X_{16} 选自 D 或 E，X_{17} 选自 T 或 K；

LCDR3（SEQ ID NO：22）：QX_{18}YYSGX_{19}I$X_{20}X_{21}$，其中，X_{18} 选自 T 或 G，X_{19} 选自 Y 或 F，X_{20} 选自 W 或 Y，X_{21} 选自 A 或 P。

2. 人-兔嵌合抗体的构建和制备

将获得的重链可变区和轻链可变区，分别与带有 L234F/L235E/P331S 突变（根据 Eu 命名系统编号）的人 IgG1 重链恒定区（Fc 区）和人 Cκ 轻链恒定区连接，构建人-兔嵌合的全长抗体 17G4、20A3。序列如下：

> IgG1 Fc 区（L234F/L235E/P331S）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK

TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK （SEQ ID NO：23）

> IgG1 Fc 区（L234F/L235E/P331S 且去除 K446）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG （SEQ ID NO：24）

>17G4 HC

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWIGVIYGSSN
TVYASWAKGRFTISKTSTMVDLRITSPTTEDTATYFCARGYLASSADIWGPGTLV
TVSLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK （SEQ ID NO：25）

>17G4 LC

QVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGQPPKLLIYDAST
LASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISDLECADAATYYCQTYYSGYIWAFGGGTEVVV
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO：26）

>20A3 HC

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIYGSD
NTYYASWAKGRFTISKTSTTVDLIMTSPTTEDTATYFCVRNLDYSSAYFHIWGPG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：27）

>20A3 LC

QVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGQPPNLLIYEASK
LASGVPSRFKGSGSGTQFTLIISEVQCEDAATYYCQGYYSGFIYPFGGGTEVVVK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（SEQ ID NO：28）

此处还提供阳性抗 BTN3A1 抗体 mAb1 的序列（源自 WO2020025703，为该专利中的 SEQ ID NO：4 和 6），其重链恒定区为 IgG1 Fc 区（L234F/L235E/P331S 且去除 K446）。

> mAb1 HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTRYYMYWVKQRPGQGLEWIGEINP
NNGGTKFNEKFKNRATLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCSREDDYDGTPF
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG （SEQ ID NO：29）

> mAb1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASNL
HTGVPSRFTGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGQTYPYTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（SEQ ID NO：30）

以上序列中，重链全长的下划线为人 IgG1 Fc 区，轻链全长的下划线为人 Cκ 区。

合成上述抗体的编码基因序列，亚克隆至 pcDNA3.1 表达载体中。将表达载体和转染试剂 PEI 以 1：2 的比例转染 CHO 细胞，并置于 CO_2 孵育箱中孵育 4-5 天。表达的抗体通过离心回收上清后，按常规方法进行抗体纯化，经检测，获得目的抗体。

实施例 3. 抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体的功能和效果验证

1. 嵌合抗体与 BTN3A1 重组蛋白的 ELISA 结合实验

通过 ELISA 实验检测抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体对人 BTN3A1 的结合特性。

实验方法：用带 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-his）重组蛋白包被 96 孔酶标板，加入不同浓度的抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体后，通过加入二抗（HRP 偶联的抗一抗 Fc 的抗体）和 HRP 底物 TMB 检测抗体与抗原结合的活性。带有 his 标签的人 BTN3A1（h-BTN3A1-his）重组蛋白包被 96 孔酶标板，按 1 μg/mL 浓度包被，4℃孵育过夜。包被板甩干，并在吸水纸上拍干，加 150 μL/孔封闭液，酶标板于 37℃孵育 1 小时。甩干，并在吸水纸上拍干。每孔加入抗 BTN3A1 待测抗体，

37℃孵育 1 小时。甩掉上清，并拍干，每孔加入 100 μL 用稀释液按 1:5000 稀释的 HRP 标记抗人 IgG 二抗，37℃孵育 1 h。洗板机洗涤酶标板，用 PBS 液洗涤，程序为洗涤 5 次，浸泡 30 s/次。加入底物溶液（TMB）100 μL/孔，反应 5 min，终止结果，最后加入 100 μL 1 mol/L 硫酸终止反应。用酶标仪（Tecan-infinite F50）在 450 nm 波长下测定 OD 值。

结果如表 6 和图 1 所示。其中，IgG1 为同种型对照抗体，本公开其他实施例中也是如此。结果显示，17G4 和 20A3 与人 BTN3A1 重组蛋白有明显结合，且结合活性与 mAb1 相当。

表 6. 抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体对人 BTN3A1 重组蛋白的 ELISA 结合结果

抗体	与人 BTN3A1 结合的 EC_{50}（nM）
17G4	0.02283
20A3	0.01963
mAb1	0.02181
IgG1	无结合

2. 嵌合抗体对过表达 BTN3A1 细胞的 FACS 结合实验

利用流式细胞仪（FACS）来检测抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体的结合特性。

实验方法：构建敲除本底表达 BTN3A 蛋白的过表达人 BTN3A1 的细胞株，加入抗体后，通过加入二抗检测抗体与抗原结合的特性。

细胞株构建过程为，将带有敲除人 BTN3A（BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3）的短发夹 RNA 序列的慢病毒在 HEK293 中进行感染，并用抗生素筛选和无限稀释法获得过表达稳定转染单克隆细胞株。再将带有人 BTN3A1 基因序列的表达质粒在已经敲除本底表达 BTN3A 细胞中进行转染，并用抗生素筛选和无限稀释法获得过表达稳定转染单克隆细胞株。

在 96 孔板中每孔接种 2×10^5 个过表达细胞。300 g 离心 5 分钟，去除上清，加入 100 μL 待测抗体，4℃孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μL 洗液（PBS+2%FBS）洗涤 3 次，加入 100 μL 1：500 稀释的用 Alexa Fluor 488 标记的抗人 IgG 二抗（Invitrogen，A-11013），4℃孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μL 洗液（PBS+2% FBS）洗涤 3 次。用 100 μL PBS 重悬细胞，用流式细胞仪检测。

结果如表 7 和图 2 所示。结果显示，17G4 和 20A3 与人 BTN3A1 过表达细胞、有明显结合，且结合强度均略强于 mAb1。

表 7. 抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体对人 BTN3A1 的过表达细胞结合实验结果

抗体	人 BTN3A1 FACS EC_{50}（nM）
17G4	15.45
20A3	8.199
mAb1	21.19

IgG1	无结合

3. 嵌合抗体对 BTN3A1 重组蛋白的亲和力测定

实验方法：使用 Biacore 8K（GE Healthcare）仪器检测。选用 Protein A 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液（10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20）。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，用芯片通道上的 Protein A 蛋白进行捕获。将人 BTN3A1 抗原蛋白（恺佧，BTN-HM1A1）作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物从 100 nM 进行 2 倍梯度稀释，共稀释 7 个浓度点，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合时间 90s，解离时间 500s。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5（GE Healthcare，29238268-AA）在 10 μl/min 的流速下运行 30s。采用 Biacore 8K Evaluation 分析软件进行数据处理。检测通道（Fc 2）信号值减去相应参比通道（Fc 1）信号值，得到校正后的信号曲线。亲和动力学曲线按照 1:1 Langmuir 结合模型进行拟合，计算结合速率 Ka 和解离速率 Kd 以及解离常数（即亲合力 KD 值）。

抗 BTN3A1 抗体与人 BTN3A1 的亲和力如表 8 所示。结果显示，17G4 和 20A3 以高亲和力结合人 BTN3A1 蛋白，且强于 mAb1 对人 BTN3A1 的亲和力。

表 8. 抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体与人 BTN3A1 的亲和力

抗体	K_{on}（1/Ms）	K_{off}（1/s）	K_D（M）
17G4	8.00E+05	1.82E-04	2.28E-10
20A3	9.85E+05	1.72E-04	1.74E-10
mAb1	1.08E+05	1.18E-04	1.09E-09

4. 嵌合抗体对 γδ T 细胞的激活实验

通过测定 γδ T 细胞分泌 IFNγ 含量，检测抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体对 γδ T 细胞的体外激活功能。

实验方法：将 Vγ9Vδ2 T 细胞与 A375 靶细胞共培养，加入梯度浓度的抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体，置于 37°C 的 5% CO_2 培养箱中孵育，用 ELISA 试剂盒测定细胞上清中分泌的人 IFNγ 的含量。

结果如表 9 和图 3 所示，17G4、20A3 对 Vγ9Vδ2 T 细胞具有明显的激活功能。

表 9. 抗 BTN3A1 人-兔嵌合抗体对 γδ T 细胞的激活实验结果

抗体	EC_{50}（nM）	最大值 IFN-γ（pg/mL）
17G4	1.389	1540
20A3	0.8575	949.2
mAb1	1.140	1061
IgG1	无活性	无活性

实施例 4. 抗 BTN3A1 兔源抗体的人源化改造

本实施例在所获得的兔源单抗 17G4 和 20A3 的 VH/VL 典型结构的基础上，将重、轻链可变区序列与抗体种系数据库比较，获得同源性高的人种系模板。其中人类种系重链框架区来自人重链，人类种系轻链框架区来自人 κ 轻链。本公开抗体 17G4 和 20A3 优选人种系重链模板 IGHV3-66、人种系轻链模板 IGkV1-27。将兔源单抗的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，替换人源化模板原来存在的 CDR 区，构建成可变区。然后以兔源单抗的三维结构为基础，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 VH 和 VL 的构象有重要影响的残基进行回复突变，并对 CDR 区化学不稳定氨基酸残基优化，产生一系列人源化抗体。

17G4 各人源化抗体的重链可变区如下：

>17G4 H1CVR
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWVSVIYGSSNTVYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYLASSADIWGQGTLVTVSS
（SEQ ID NO：31）

>17G4 H2CVR
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWVSVIYGSSNTVYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADIWGQGTLVTVSS
（SEQ ID NO：32）

>17G4 H3CVR
EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWVSVIYGSSNTVYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADIWGQGTLVTVSS
（SEQ ID NO：33）

>17G4 H4CVR
EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWIGVIYGSSNTVYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADIWGQGTLVTVSS
（SEQ ID NO：34）

>17G4 H5CVR
EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWIGVIYGSSNTVYASWAKGRFTISKTSTMVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADIWGQGTLVTVSS
（SEQ ID NO：35）

17G4 各人源化抗体的轻链可变区如下：

>17G4 L1CVR
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGKVPKLLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQTYYSGYIWAFGGGTKVEI

K

（SEQ ID NO：36）

>17G4 L2CVR

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYDAST
LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQTYYSGYIWAFGGGTKVEIK

（SEQ ID NO：37）

>17G4 L3CVR

DQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYDAS
TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQTYYSGYIWAFGGGTKVEI
K （SEQ ID NO：38）

以上序列中，下划线为 CDR，同 SEQ ID NO：5-10。

20A3 各人源化抗体的重链可变区如下：

>20A3 H1CVR

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSS

（SEQ ID NO：39）

>20A3 H2CVR

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSS

（SEQ ID NO：40）

>20A3 H3CVR

EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSS

（SEQ ID NO：41）

>20A3 H4CVR

EQQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSS

（SEQ ID NO：42）

>20A3 H5CVR

EQQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSS

（SEQ ID NO：43）

>20A3 H6CVR

EQQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKTSTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYFHIW

GQGTLVTVSS

（SEQ ID NO：44）

20A3 各人源化抗体的轻链可变区如下：

>20A3 L1CVR

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGKVPKLLIYEAS
KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGYYSGFIYPFGGGTKVEIK

（SEQ ID NO：45）

>20A3 L2CVR

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYEAS
KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGYYSGFIYPFGGGTKVEIK

（SEQ ID NO：46）

>20A3 L3CVR

DQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYEAS
KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGYYSGFIYPFGGGTKVEIK

（SEQ ID NO：47）

以上序列中，下划线为 CDR，同 SEQ ID NO：11-16。

将上述各重链可变区和轻链可变区，分别与带有 L234F/L235E/P331S 突变的人 IgG1 重链恒定区和人 Cκ 轻链恒定区连接，获得全长序列。

17G4 各人源化抗体的重链全长序列如下：

>17G4 H1C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWVSVIYG
SSNTVYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYLASSADI
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：48）

>17G4 H2C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWVSVIYG
SSNTVYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADI
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：49）

>17G4 H3C
EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWVSVIYG
SSNTVYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADI
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：50）

>17G4 H4C
EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWIGVIYGS
SNTVYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADIW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：51）

>17G4 H5C
EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNDYYITWVRQAPGKGLEWIGVIYGS
SNTVYASWAKGRFTISKTSTMVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYLASSADIWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：52）

17G4 各人源化抗体的轻链全长序列如下：

>17G4 L1C
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGKVPKLLIYDAST
LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQTYYSGYIWAFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO：53）

>17G4 L2C
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYDAST
LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQTYYSGYIWAFGGGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO：54）

>17G4 L3C

DQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYDAS
TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQTYYSGYIWAFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO：55）

20A3 各人源化抗体的重链全长序列如下：

>20A3 H1C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：56）

>20A3 H2C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：57）

>20A3 H3C

EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：58）

>20A3 H4C

EQQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWVSIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：59）

>20A3 H5C

EQQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYF
HIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：60）

>20A3 H6C

EQQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINNYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIYG
SDNTYYASWAKGRFTISKTSTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCVRNLDYSSAYFHIW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：61）

20A3 各人源化抗体的轻链全长序列如下：

>20A3 L1C

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGKVPKLLIYEAS
KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGYYSGFIYPFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO：62）

>20A3 L2C

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYEASK
LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGYYSGFIYPFGGGTKVEIKR

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（SEQ ID NO：63）

>20A3 L3C

DQQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSVYNNNRLAWYQQKPGKPPKLLIYEAS
KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQGYYSGFIYPFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（SEQ ID NO：64）

将上述人源化的重链全长序列和轻链全长序列分别组合，获得如下人源化分子：

表 10. 抗 BTN3A1 人源化抗体

抗体	重链	轻链
17G4 （人兔嵌合抗体，母本）	17H4 HC （SEQ ID NO：25）	17G4 LC （SEQ ID NO：26）
17G4-H1L1	17G4 H1C （SEQ ID NO：48）	17G4 L1C （SEQ ID NO：53）
17G4-H2L1	17G4 H2C （SEQ ID NO：49）	
17G4-H3L1	17G4 H3C （SEQ ID NO：50）	
17G4-H1L2	17G4 H1C （SEQ ID NO：48）	17G4 L2C （SEQ ID NO：54）
17G4-H2L2	17G4 H2C （SEQ ID NO：49）	
17G4-H3L2	17G4 H3C （SEQ ID NO：50）	
17G4-H1L3	17G4 H1C （SEQ ID NO：48）	17G4 L3C （SEQ ID NO：55）
17G4-H2L3	17G4 H2C （SEQ ID NO：49）	
17G4-H3L3	17G4 H3C （SEQ ID NO：50）	
17G4-H4L3	17G4 H4C （SEQ ID NO：51）	
17G4-H5L3	17G4 H5C （SEQ ID NO：52）	
20A3 （人兔嵌合抗体，母本）	20A3 HC （SEQ ID NO：27）	20A3 LC （SEQ ID NO：28）
20A3-H1L1	20A3 H1C （SEQ ID NO：56）	20A3 L1C （SEQ ID NO：62）
20A3-H2L1	20A3 H2C （SEQ ID NO：57）	
20A3-H3L1	20A3 H3C	

	（SEQ ID NO：58）	
20A3-H4L1	20A3 H4C （SEQ ID NO：59）	
20A3-H1L2	20A3 H1C （SEQ ID NO：56）	20A3 L2C （SEQ ID NO：63）
20A3-H2L2	20A3 H2C （SEQ ID NO：57）	
20A3-H3L2	20A3 H3C （SEQ ID NO：58）	
20A3-H4L2	20A3 H4C （SEQ ID NO：59）	
20A3-H1L3	20A3 H1C （SEQ ID NO：56）	20A3 L3C （SEQ ID NO：64）
20A3-H2L3	20A3 H2C （SEQ ID NO：57）	
20A3-H3L3	20A3 H3C （SEQ ID NO：58）	
20A3-H4L3	20A3 H4C （SEQ ID NO：59）	
20A3-H5L3	20A3 H5C （SEQ ID NO：60）	
20A3-H6L3	20A3 H6C （SEQ ID NO：61）	

实施例 5. 抗 BTN3A1 人源化抗体功能和效果验证

1. 抗体对 γδ T 细胞的激活实验

将前述 17G4 和 20A3 的人源化分子进行表达和纯化，依照实施例 3 第 4 部分的方法，检测人源化抗体对 γδ T 细胞的激活能力。

结果如表 11，图 5 所示。结果显示，20A3 的所有人源化分子活性相比母本 20A3 均无明显下降。

表 11. 20A3 人源化抗体对 γδ T 细胞的激活实验结果

抗体	EC_{50}（nM）
20A3	0.9583
20A3-H1L1	2.641
20A3-H2L1	1.354
20A3-H3L1	2.602
20A3-H4L1	2.514
20A3-H1L2	2.302
20A3-H2L2	1.102
20A3-H3L2	1.920
20A3-H4L2	1.435
20A3-H1L3	1.587

20A3-H2L3	1.648
20A3-H3L3	1.484
20A3-H4L3	1.502
20A3-H5L3	1.185
20A3-H6L3	0.816
mAb1	2.865

2. 抗体对过表达 BTN3A1 细胞的结合实验

依照实施例 3 第 2 部分的方法，检测抗 BTN3A1 人源化抗体对过表达人 BTN3A1 的细胞的结合能力。

结果如表 12，图 6A、图 6B 所示，17G4 和 20A3 的人源化分子对细胞的结合能力均与其对应的嵌合抗体相当，并且均优于对照抗体。

表 12. 17G4、20A3 人源化抗体对过表达人 BTN3A1 细胞的结合实验结果

抗体	人 BTN3A1 FACS EC_{50}（nM）	人 BTN3A1 FACS 最大值（MFI）
17G4	17.37	97974
17G4-H5L3	19.83	89676
20A3	11.65	95819
20A3-H2L2	10.20	91243
mAb1	36.82	99709
IgG1	无结合	无结合

3. 抗体与 BTN3A1 重组蛋白的亲和力测定

依照实施例 3 第 3 部分的方法，检测 20A3-H2L2 对人 BTN3A1 重组蛋白的亲和力。

结果如表 13 所示。结果显示，20A3-H2L2 对人 BTN3A1 重组蛋白具有高结合亲和力，且 20A3-H2L2 对人 BTN3A1 的亲和力强于 mAb1。

表 13. 20A3-H2L2 对人 BTN3A1 重组蛋白的亲和力

抗体	人 BTN3A1		
	K_{on}（1/Ms）	K_{off}（1/s）	K_D（M）
20A3-H2L2	9.85E+05	1.72E-04	1.74E-10
mAb1	1.08E+05	1.18E-04	1.09E-09

4. 抗体对过表达 BTN3A 细胞的结合实验

利用流式细胞仪（FACS）来检测 20A3-H2L2 对 BTN3A 家族其他蛋白的结合能力。依照实施例 3 第 2 部分的方法，构建敲除本底 BTN3A 蛋白的过表达人 BTN3A2、人 BTN3A3 的 HEK293 细胞株。分别检测 20A3-H2L2 对敲除本底 BTN3A 蛋白的过表达人 BTN3A1、人 BTN3A2、人 BTN3A3 的 HEK293 细胞的结合特性。

结果如表 14 和图 7A、图 7B、图 7C 所示。结果显示，20A3-H2L2 和 mAb1 均可以结合人 BTN3A1、人 BTN3A2、人 BTN3A3，20A3-H2L2 结合能力均强于 mAb1。

表 14. 20A3-H2L2 对过表达 BTN3A 家族蛋白细胞的结合实验结果

检测项	抗体		
	20A3-H2L2	mAb1	IgG1
人 BTN3A1 FACS EC_{50}（nM）	2.979	12.310	无结合
人 BTN3A1 FACS 最大值（MFI）	79089	78017	无结合
人 BTN3A2 FACS EC_{50}（nM）	6.760	18.25	无结合
人 BTN3A2 FACS 最大值（MFI）	122205	115012	无结合
人 BTN3A3 FACS EC_{50}（nM）	5.122	12.51	无结合
人 BTN3A3 FACS 最大值（MFI）	94368	89496	无结合

5. 抗体的 γδ T 细胞的激活实验

通过测定 γδ T 细胞分泌 IFNγ 含量检测 20A3-H2L2 对 γδ T 细胞的体外激活功能。将 Vγ9Vδ2 T 细胞与高表达 BTN3A 蛋白的 SKOV-3 细胞在体外进行共培养，加入梯度浓度的待测抗体，于 37°C 的 5% CO_2 培养箱中孵育 24 小时，用 ELISA 试剂盒测定细胞上清中分泌的人 IFNγ 的含量。

结果如表 15 和图 8 所示。结果显示，20A3-H2L2 对 Vγ9Vδ2 T 细胞的激活能力强于 mAb1，EC_{50} 下降了 2.6 倍。相比实施例 5 第 1 部分采用 BTN3A 低表达的 A375 细胞的实验结果，本实施例中 20A3-H2L2 显示出比 mAb1 更强的激活活性，表明肿瘤细胞上更高的 BTN3A 表达，有助于进一步提高 20A3-H2L2 对 Vγ9Vδ2 T 细胞的激活活性。

表 15. 20A3-H2L2 对 γδ T 细胞的激活实验

抗体	EC_{50}（nM）	最大值（pg/mL）
20A3-H2L2	0.2841	2473
mAb1	0.7366	1762
IgG1	无活性	无活性

6. 抗体激活 γδ T 细胞对 SKOV-3 的杀伤实验

通过测定 γδ T 细胞对肿瘤靶细胞的杀伤来评估 20A3-H2L2 介导 γδ T 杀伤靶细胞能力。将 Vγ9Vδ2 T 细胞和 SKOV-3 细胞（luc 标记）混合接种在 96 孔板中，加入梯度浓度的 20A3-H2L2、mAb1 或同种型对照（IgG1），共培养 24 小时后，用 Bright-GloTM 试剂（Promega）裂解细胞 5min，并通过 Envision 多模式酶标仪（Perkinelmer）测量发光活性。

结果如表 16 和图 9 所示。结果显示，20A3-H2L2 激活 Vγ9Vδ2 T 细胞对 SKOV-

3 杀伤能力强于 mAb1，20A3-H2L2 的 EC_{50} 是对照抗体 EC_{50} 的约 1/3。

表 16. 20A3-H2L2 激活 γδ T 细胞杀伤 SKOV-3 细胞的实验结果

抗体	EC_{50}（nM）	最大杀伤比例（%）
20A3-H2L2	0.1109	98.15
mAb1	0.3487	97.67
IgG1	无活性	无活性

权利要求书

1. BTN3A 结合蛋白，其包含特异性结合 BTN3A 的结构域，所述结构域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：1、3、31-35、39-44 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2、4、36-38、45-47 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，

其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；

优选地，

1）所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：3、39-44 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：4、45-47 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

2）所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：1、31-35 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2、36-38 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

更优选地，

1）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：11-13 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

2）所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：5-7 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：8-10 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

2. 如权利要求 1 所述的 BTN3A 结合蛋白，其包含：

如 SEQ ID NO：1、3、31-35、39-44 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和

如 SEQ ID NO：2、4、36-38、45-47 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

优选地，

1）包含如 SEQ ID NO：1、31-35 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：2、36-38 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；或，

2）包含如 SEQ ID NO：3、39-44 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：4、45-47 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

更优选地，

1）包含如 SEQ ID NO：1 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：2 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

包含如 SEQ ID NO：31-35 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：36 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

包含如 SEQ ID NO：31-35 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

包含如 SEQ ID NO：31-35 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；或，

2）包含如 SEQ ID NO：3 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：4 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

包含如 SEQ ID NO：39-44 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：45 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

包含如 SEQ ID NO：39-44 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：46 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区；

包含如 SEQ ID NO：39-44 任一所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的重链可变区，和如 SEQ ID NO：47 所示或与之具有至少 90%同一性氨基酸序列的轻链可变区。

3. BTN3A 结合蛋白，其包含特异性结合 BTN3A 的结构域，所述结构域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：17-19 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，

所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：20-22 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白，其为抗 BTN3A 抗体或其抗原结合片段，所述抗体优选为兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体；所述抗原结合片段优选为 scFv、Fab 或 F（ab′）2 片段。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白，其为人源化、回复突变、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的抗 BTN3A 抗体或其抗原结合片段；

优选地，人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-66，轻链框架区源自 IGkV1-27。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白，其还包含免疫球蛋白的 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述 Fc 区是具有 L234F、L235E 和/或 P331S 突变的人 IgG1 的 Fc 区，所述 Fc 区的突变的氨基酸位置根据 EU 编号系统定义，可选地，K446 是去除的。

7. 如权利要求 1-3、5-6 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白，其包含：

如 SEQ ID NO：25、27、48-52、56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和

如 SEQ ID NO：26、28、53-55、62-64 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

优选地，

1）包含如 SEQ ID NO：25、48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：26、53-55 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；或

2）如 SEQ ID NO：27、56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：28、62-64 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

更优选地，

1）包含如 SEQ ID NO：25 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：26 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

包含如 SEQ ID NO：48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：53 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

包含如 SEQ ID NO：48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

包含如 SEQ ID NO：48-52 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；或，

2）包含如 SEQ ID NO：27 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：28 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

包含如 SEQ ID NO：56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：62 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

包含如 SEQ ID NO：56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：63 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链；

包含如 SEQ ID NO：56-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的重链，和如 SEQ ID NO：64 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性氨基酸序列的轻链。

8. 如权利要求 1-7 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白，其特异性结合 BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3 中的一个或多个，优选地，特异性结合 BTN3A1、BTN3A2 和 BTN3A3。

9. 多核苷酸，其编码权利要求 1-8 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白；

优选地，所述多核苷酸为 DNA 或 RNA。

10. 载体，其包含权利要求 9 所述的多核苷酸。

11. 宿主细胞，其含有或表达权利要求 9 所述的多核苷酸或权利要求 10 所述的载体。

12. 制备 BTN3A 结合蛋白的方法，包括：

在权利要求 11 所述的宿主细胞中表达权利要求 9 所述的多核苷酸或权利要求 10 所述的载体，以及从所述宿主细胞中分离表达的 BTN3A 结合蛋白；

可选地，进一步包含纯化所述 BTN3A 结合蛋白的步骤。

13. 药物组合物，其包含：

权利要求 1-8 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白，以及，

至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

14. 治疗或预防癌症的方法，包括：

向有需要的受试者施用治疗或预防有效量的权利要求 1-8 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白、权利要求 9 所述的多核苷酸、权利要求 10 所述的载体或权利要求 13 所述的药物组合物。

15. 激活 γδ T 细胞和/或促进 γδ T 细胞释放细胞因子的方法，包括：

向所述 γδ T 细胞施用或使所述 γδ T 细胞接触权利要求 1-8 任一项所述的 BTN3A 结合蛋白、权利要求 9 所述的多核苷酸、权利要求 10 所述的载体或权利要求 13 的药物组合物，所述 γδ T 细胞可以是体内或体外的；

所述 γδ T 细胞优选为 Vγ9Vδ2 T 细胞。