

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 5 月 22 日 (22.05.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/103451 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) **C12N 15/85** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/132266

(22) 国际申请日: 2024 年 11 月 15 日 (15.11.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202311518247.8 2023年11月15日 (15.11.2023) CN

(71) 申请人: 上海盛迪医药有限公司 (SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号 201210 (CN)。江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号 222047 (CN)。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(72) 发明人: 胡雅丽 (HU, Yali); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号 201210 (CN)。施佳杰 (SHI, Jiajie); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号 201210 (CN)。陈思萌 (CHEN, Simeng); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号 201210 (CN)。张伟 (ZHANG, Wei); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号 201210 (CN)。廖成 (LIAO, Cheng); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 10 层 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: TRGV9 BINDING PROTEINS AND MEDICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: TRGV9 结合蛋白及其医药用途

(57) Abstract: The present disclosure relates to TRGV9 binding proteins and the medical use thereof. Specifically, the present disclosure relates to a TRGV9 binding protein, a GPC3/TRGV9 binding protein, a method for treating cancer using same, and the pharmaceutical use thereof.

(57) 摘要: 本公开涉及 TRGV9 结合蛋白及其医药用途。具体而言, 本公开涉及 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白及其治疗癌症的方法和制药用途。

WO 2025/103451 A1

TRGV9 结合蛋白及其医药用途

本申请要求2023年11月15日提交的中国专利申请CN202311518247.8的优先权。

5

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及TRGV9结合蛋白、GPC3/TRGV9结合蛋白及其治疗癌症的方法和制药用途。

10 背景技术

$\gamma\delta$ T 细胞是一群天然识别和能够杀伤肿瘤细胞的 T 细胞，既有抗原递呈，又有杀伤功能，桥接固有免疫和适应性免疫。与 $\alpha\beta$ TCR 不同，组成 $\gamma\delta$ T 细胞 TCR 的两条链分别为 γ 链和 δ 链，其对抗原的识别不受 MHC 限制 (Exp Mol Med. 2021 Mar;53 (3) :318-327)。 $\gamma\delta$ T 细胞数目相对较少的，约占 PBMC 的 1%-5%。根据 δ 链的不同，可分为 $\delta 1$ ， $\delta 2$ ， $\delta 3$ ， $\delta 5$ 四类 (Front Immunol. 2022 Jun 16;13:915837)，而其中的 $\delta 1$ 和 $\delta 2$ 所占数目最多。 $\delta 1$ 可与不同的 γ 链配对，形成不同的 TCR，主要分布于皮肤，粘膜等组织； $\delta 2$ 主要与 $\gamma 9$ 配对，形成 $\gamma 9\delta 2$ 亚型，主要分布于外周血，占外周血 $\gamma\delta$ T 细胞总量高达 95% (Front Immunol. 2022 Jun 16;13:915837)。

$\gamma\delta$ T 细胞在抗肿瘤中发挥着重要作用，有多种杀伤肿瘤细胞的机制，其中包括通过 TCR 识别靶细胞上经磷酸化抗原活化的 BTN2A/BTN3A 复合物，启动杀伤信号，发挥杀伤功能；此外还有与 NK 细胞类似的杀伤途径，其细胞表面表达 NKG2D 等受体，通过结合肿瘤细胞上的相应配体发挥肿瘤杀伤作用。 $\gamma\delta$ T 细胞在多种肿瘤中有不同程度的浸润。通过对 25 个肿瘤类型，5782 个肿瘤的大样本分析发现， $\gamma\delta$ T 细胞的浸润预示着病人的良好预后，而且是所有免疫细胞中的最有利细胞群体。对 14 个非脑癌实体瘤的 3238 份样本分析同样表明其在肿瘤中的浸润是良好预后的指征 (Oncoimmunology. 2017 Feb 6;6 (3) :e1284723)。针对 $\gamma\delta$ T 细胞的早期临床研究主要以体内激活和体外扩增后回输两种方式为主，尽管不同研究所显示的抗肿瘤效果比较有限，但均没有报道严重的副作用，提示了 $\gamma\delta$ T 细胞具有良好的安全性。

Glypican-3 (GPC3) 是肝癌治疗的一个潜在靶点。2020 年全球肝癌新增病例 90 万，死亡病例 83 万；而在中国，2020 年新增 41 万病例，死亡 39 万；全球一半左右的肝癌都发生在中国。近些年，晚期肝癌的一线或者二线治疗已经取得了长足的进展，但后线治疗仍缺乏有效治疗手段。GPC3 是一种由 580 个氨基酸组成的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖，通过糖基磷脂酰肌醇锚定于细胞膜。GPC3 在多种肿瘤组织中高表达，例如，在肝细胞癌中 GPC3 阳性率高达 90%。正常组织中 GPC3 表达则非常局限，只表达于胎盘和子宫内膜；而且子宫内膜的表达量远低于肿瘤组织，是一个理想的抗肿瘤靶点 (Sci Transl Med. 2017 Oct 4;9 (410) :eaal4291)。

本公开提供了新序列结构的靶向 $\gamma\delta$ TCR 的抗体，并将其与肿瘤相关抗原（例如，GPC3）结合结构域（例如，抗体）构建双特异性抗体，所述双特异性抗体一端结合 TAA（例如，GPC3），另一端结合 $\gamma\delta$ TCR，能招募并激活 $\gamma\delta$ T 细胞特异性地杀伤 TAA（例如，GPC3）阳性肿瘤细胞，这显著提高了 $\gamma\delta$ T 细胞治疗的有效性。

5 本公开的双特异性抗体有良好的肿瘤杀伤活性、安全性和成药性。

发明内容

本公开提供 T 细胞受体（TCR）结合蛋白，磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3（GPC3）和 T 细胞受体（TCR）结合蛋白，其编码核酸，其制备方法，及其用于治疗疾病的方法和用途。

T 细胞受体 γ 可变区 9（TRGV9）结合蛋白

本公开提供 TRGV9 结合蛋白。一些实施方案中，其能够结合 TCR。一些实施方案中，其能够结合 $\gamma\delta$ TCR。一些实施方案中，其能够结合 TCR 的 γ 9 链。一些实施方案中，其能够结合 γ 9 δ 2 TCR。另一些实施方案中，其能够结合 γ 9 δ 1 TCR。

15 一些实施方案中，提供 TRGV9 结合蛋白，其包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，例如，免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR3；或，

20 2) 重链可变区（VH）和/或轻链可变区（VL），所述 VH 包含 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

所述 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。

25 一些实施方案中，提供 TRGV9 结合蛋白，其包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，其中，CDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列，CDR2 包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列，CDR3 包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列；或，

30 2) VH 和/或 VL，所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和/或 HCDR3，其中，HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列；所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3，其中，LCDR1 包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列，LCDR3 包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列。

35 一些实施方案中，提供 TRGV9 结合蛋白，其包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含分别如

SEQ ID NO: 6-8 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 或,

2) VH 和 VL, 所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO: 11-13 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

5 一些实施方案中, 前述蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域或 VH 或 VL 各自独立地为人源化的、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, 前述蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域人源化所使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-64; VH 在人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-21, VL 在人源化改造过程使用的人种系模板的轻链框架区源自 IGKV1-12。

一些实施方案中, 提供 TRGV9 结合蛋白, 其包含:

1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列; 或,

2) VH 和 VL, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 9、30-33 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中, TRGV9 结合蛋白包含如下的 VH 和 VL:

20 2-1) VH 包含如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL 包含 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列,

2-2) VH 包含如 SEQ ID NO: 30 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列;

2-3) VH 包含如 SEQ ID NO: 31 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列;

30 2-4) VH 包含如 SEQ ID NO: 32 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

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, 前述 TRGV9 结合蛋白包含或为抗 TRGV9 抗体或其抗原结

合片段。一些实施方案中，所述抗 TRGV9 抗体或其抗原结合片段为重组抗体或其片段。一些实施方案中，所述抗 TRGV9 抗体为单特异性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体（例如，三特异性抗体）。

其中，当前述 TRGV9 结合蛋白中包含免疫球蛋白单一可变结构域时，其可以为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段，例如，免疫球蛋白单一可变结构域是为单域抗体或 VHH。作为一个示例，前述 TRGV9 结合蛋白本身即为单域抗体或 VHH。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和 diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv。

其中，当前述 TRGV9 结合蛋白中包含 VH 和 VL 时，其可以为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，所述抗原结合片段包括但不限于：Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体（peptibody）、结构域抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv。一些具体实施方案中，所述抗原结合片段包括 Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂。

一些实施方案中，前述 TRGV9 结合蛋白中可以包含一个或多个（例如 2、3、4、5、6、7、8 个）前述免疫球蛋白单一可变结构域。所述免疫球蛋白单一可变结构域可以形成二聚体或多聚体分子。所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是同二聚体或异二聚体。

一些实施方案中，前述 TRGV9 结合蛋白中可以包含一个或多个（例如 2、3、4、5、6、7、8 个）前述 VH、VL 或其组合。

一些实施方案中，前述 TRGV9 结合蛋白中还包含人免疫球蛋白 Fc 区；例如，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1 的 Fc 区，例如 SEQ ID NO: 51 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性。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)；L234F/L235E (IgG1)；L234F 或 L235E (IgG1)；L234A 或 L235A (IgG1) 或 S267E/L328F (IgG1)。例如，L234A/L235A 表示为序列包含 L234A 和 L235A。

一些实施方案中，前述 TRGV9 结合蛋白中免疫球蛋白单一可变结构域或 VH、VL 与 Fc 区直接或通过连接子连接。所述连接子可以是长 1-20 个或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如，所述连接子如 (G_mS_n)_h 或 (G_mQ_n)_h 或 (GGNGT)_h (SEQ ID NO: 62) 或 (YGNGT)_h (SEQ ID NO: 63) 或 (EPKSS)_h (SEQ ID NO: 64) 或 (A_mS_n)_h 所示，其中，m、n 各自独立地选自 1-8 的整数，h 独立地选自 1-20 的整数。例如，所述连接子选自 G₄S (SEQ ID NO: 65)、GS、GAP、(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 66)、(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 67)、(G₄S)₄ (SEQ

ID NO: 68)、(G4S)₅(SEQ ID NO: 69)、ASGS (SEQ ID NO: 70)、A₃S (SEQ ID NO: 71)等;

一些实施方案中,前述 TRGV9 结合蛋白为:特异性结合 $\gamma\delta$ TCR 的蛋白,或抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体或其抗原结合片段;特异性结合 TCR 的 γ 9 链的蛋白,或抗 TCR 的 γ 9 链的抗体或其抗原结合片段;特异性结合 TCR 的 γ 9 链的可变区(V γ 9)的蛋白,或抗 V γ 9 TCR 的抗体或其抗原结合片段;特异性结合 γ 9 δ 2 TCR 的蛋白,或抗 γ 9 δ 2 TCR 抗体或其抗原结合片段;特异性结合 γ 9 δ 1 TCR 的蛋白,或抗 γ 9 δ 1 TCR 抗体或其抗原结合片段;特异性结合 TRGV9 的蛋白,或抗 TRGV9 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中,前述 TRGV9 结合蛋白包含:

1) 如 SEQ ID NO: 36 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的氨基酸序列;

2) 重链和轻链,其中,重链如 SEQ ID NO: 37 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性,轻链如 SEQ ID NO: 38 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

一些实施方案中,前述 TRGV9 结合蛋白具有选自以下至少一项的功能或性质:

(a)以 $\leq 10\text{nM}$ 的 EC_{50} 与 γ 9 δ 2 T 细胞结合,所述 EC_{50} 例如 $\leq 5\text{nM}$ 、 $\leq 4\text{nM}$ 、 $\leq 3\text{nM}$ 、 $\leq 2\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.5\text{nM}$ 、 $\leq 0.2\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 。所述 EC_{50} 是通过 FACS 检测获得,FACS 是本领域常用的亲和力检测方法,例如本公开实施例 5 中所述。

(b) 特异性结合 TCR 的 γ 9 链,例如,特异性结合 γ 9 δ 1 TCR、 γ 9 δ 2 TCR;

(c)不结合(通过测试方法,检测不到)TCR 的 γ 8 链,例如,不结合 γ 8 δ 2 TCR;

(d) 特异性结合 TCR 的 γ 9 链的可变区 (TRGV9);

(e) 特异性结合 V γ δ C α β 嵌合 TCR,不结合 V α β C γ δ 嵌合 TCR;

(f) 结合食蟹猴 γ 9 δ 2 TCR;

其中,(b) - (e)可通过本领域常规检测方法获知,例如本公开实施例 4 中所述。

一些实施方案中,前述蛋白结合 TRGV9 的 K_D 值可以 $\leq 1 \times 10^{-7}\text{M}$,例如 $\leq 1 \times 10^{-8}\text{M}$,或 $\leq 1 \times 10^{-9}\text{M}$,或 $\leq 1 \times 10^{-10}\text{M}$ 。

一些实施方案中,前述 TRGV9 结合蛋白涵盖免疫球蛋白单一可变结构域的变体,所述变体与 SEQ ID NO: 5、26-29 任一相比,具有一个或多个氨基酸突变。

一些实施方案中,前述 TRGV9 结合蛋白涵盖 VH 和/或 VL 的变体,所述 VH 的变体与 SEQ ID NO: 9、30-32 任一相比,具有一个或多个氨基酸突变,所述 VL 的变体与 SEQ ID NO: 10、33-35 任一相比,具有一个或多个氨基酸突变。“多个”涵盖 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个。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,其与前述本公开的 TRGV9 结合蛋白中的免疫球

蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的抗原表位。

一些实施方案中，提供蛋白，其与前述本公开的 TRGV9 结合蛋白中的 VH 和 VL 结合或竞争结合相同的抗原表位。

一些实施方案中，提供蛋白，其与 TRGV9 的结合被前述本公开的 TRGV9 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域或 VH 和 VL 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（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个）免疫球蛋白单一可变结构域，例如，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 6-8 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3，或包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示序列。所述蛋白或分子可以为与其他化合物、其他多肽形成的缀合物或融合蛋白，所述缀合物例如可包含任意可检测标记。

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（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个）VH 和 VL，例如，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 11-13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。所述蛋白或分子可以为与其他化合物、其他多肽形成的缀合物、偶联物或融合蛋白。例如，缀合物可包含任意可检测标记。

GPC3/TRGV9 结合蛋白

本公开提供蛋白，其结合 GPC3 和 TCR。一些实施方案中，提供蛋白，其结合 GPC3 和 $\gamma\delta$ TCR。一些实施方案中，提供蛋白，其结合 GPC3 和 TCR 的 $\gamma 9$ 链。一些实施方案中，提供蛋白，其结合 GPC3 和 TCR 的 $\gamma 9$ 链的可变区（V $\gamma 9$ ）。一些实施方案中，提供蛋白，其结合 GPC3 和 $\gamma 9\delta 2$ TCR。一些实施方案中，提供蛋白，其结合 GPC3 和 $\gamma 9\delta 1$ TCR。一些实施方案中，提供蛋白，其结合 GPC3 和 TRGV9。一些实施方案中，所述“结合”为同时或先后结合。

本公开提供结合肿瘤相关抗原（TAA）、肿瘤特异性抗原和 TRGV9 的结合蛋白，其包含结合 TAA（或肿瘤特异性抗原）的结合结构域和结合 TRGV9 的结合结构域。一些实施方案中，其包含特异性结合 TAA（或肿瘤特异性抗原）的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域。一些实施方案中，所述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域为前述本公开的 TRGV9 结合蛋白。一些实施方案中，所述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域为前述本公开的 TRGV9 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域，和/或 VH 和 VL 的组合。

一些实施方案中，提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白，其包含特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域。

一些具体实施方案中，所述第一抗原结合结构域包含重链可变区（VH1）和/或轻链可变区（VL1），所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 40 所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。一些具体实施方案中，所述第一抗原结合结构域包含重链可变区（VH1）和轻链可变区（VL1），所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序

列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 40 所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 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。

一些具体实施方案中，所述第一抗原结合结构域包含重链可变区（VH1）和轻链可变区（VL1），所述 VH1 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 41-43 所示氨基酸序列；所述 VL1 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 44-46 所示氨基酸序列。

一些具体实施方案中，所述第一抗原结合结构域包含重链可变区（VH1）和轻链可变区（VL1），所述 VH1 包含分别如 SEQ ID NO: 41-43 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；所述 VL1 包含分别如 SEQ ID NO: 44-46 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中，所述第一抗原结合结构域的氨基酸序列包含任意一个或多个选自 SEQ ID NO: 41-46 的序列。

一些具体实施方案中，所述 VH1 和/或 VL1 为人源化的、回复突变、亲和力成熟、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。

一些具体实施方案中，所述 VH1 包含如 SEQ ID NO: 39 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，和/或 VL1 包含如 SEQ ID NO: 40 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，所述 VH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示，所述 VL1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

一些实施方案中，提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白，其包含前述任意的特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域，其中，所述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，例如，免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR3；或，

2) 重链可变区（VH2）和/或轻链可变区（VL2），所述 VH2 包含 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL2 包含 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

所述 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，提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白，其包含前述任意的特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域，其中，所述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 CDR1、CDR2 和/或 CDR3, 其中, CDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列, CDR2 包含 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列, CDR3 包含 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列; 或,

5 2) VH2 和/或 VL2, 所述 VH2 包含 HCDR1、HCDR2 和/或 HCDR3, 其中, HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列; 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3, 其中, LCDR1 包含 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示氨基酸序列, LCDR3 包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸
10 序列。

一些实施方案中, 提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其包含前述任意的特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域, 其中, 所述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含:

1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含分别如
15 SEQ ID NO: 6-8 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 和/或,

2) VH2 和 VL2, 所述 VH2 包含分别如 SEQ ID NO: 11-13 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL2 包含分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些实施方案中, 前述免疫球蛋白单一可变结构域或 VH、VL 为人源化的、
20 回复突变、亲和力成熟、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, 前述免疫球蛋白单一可变结构域人源化所使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-64; VH 在人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-21, VL 在人源化改造过程使用的人种系模板的轻链框架区源自 IGKV1-12。
25 自 IGKV1-12。

一些实施方案中, 提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其包含前述任意的特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域, 其中, 所述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含:

1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ
30 ID NO: 5、26-29 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列; 或,

2) VH2 和/或 VL2, 所述 VH2 包含如 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, 所述 VL2 包含如 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

35 一些具体实施方案中, VH2 和 VL2 的组合选自如下:

2-1) VH2 包含如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL2 包含 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同

一性的氨基酸序列，

2-2) VH2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL2 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列；

5 2-3) VH2 包含如 SEQ ID NO: 31 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL2 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列；

2-4) VH2 包含如 SEQ ID NO: 32 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL2 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白包含或为抗 GPC3/TRGV9 抗体或其抗原结合片段。一些实施方案中，所述抗 GPC3/TRGV9 抗体或其抗原结合片段为重组抗体或其片段。一些实施方案中，所述抗 GPC3/TRGV9 抗体为双特异性抗体、多特异性抗体(例如，三特异性抗体)。一些实施方案中，所述抗 GPC3/TRGV9 抗体或其抗原结合片段中的免疫球蛋白单一可变结构域为单域抗体或 VHH。一些具体实施方案中，所述抗原结合片段包括但不限于：Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体(peptibody)、结构域抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6、7、8 个)前述免疫球蛋白单一可变结构域。一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6、7、8 个)前述 VH1 和 VL1 的组合。一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6、7、8 个)前述 VH2 和 VL2 的组合。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中还包含人免疫球蛋白 Fc 区；例如，人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中还包含人免疫球蛋白 Fc 区；例如，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1 的 Fc 区，例如 SEQ ID NO: 51 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。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)；L234F/L235E(IgG1)；L234F 或 L235E(IgG1)；L234A 或 L235A (IgG1) 或 S267E/L328F (IgG1)。

一些具体实施方案中，所述 Fc 区包含第一亚基(Fc1)和第二亚基(Fc2)。一些具体实施方案中，引入使 Fc 区的两个亚基(Fc1、Fc2)配对形成二聚体的突变，或减少同源二聚化的突变。一些实施具体方案中，所述第一亚基和所述第二亚基含有的 knob-into-hole 突变。例如在 CH3/CH3 界面内，Fc1 的 CH3 域中的一

个、二个或多个氨基酸残基突变为一个或多个具有更大侧链体积的氨基酸残基，从而在 Fc1 的 CH3 域表面产生凸起（或杵，Knob）。相应地，Fc2 的 CH3 域中与 Fc1 的 CH3 域相互作用的一个、二个或多个氨基酸残基突变为具有更小侧链体积的氨基酸残基，从而在 Fc2 的 CH3 域表面产生凹陷（或臼，Hole）。第一亚基（Fc1）
5 和第二亚基（Fc2）仅在于区分不同的两个亚基，因此二者是可互换的。

一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有选自 354、356、358 和 366 的位点的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc2 含有选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点的一个或多个氨基酸取代。一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 366 位突变，Fc2 含有选自 366、368 和 407 位的突变或其任意组合。一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 354 或 356 位突变，Fc2 含有 349 位突变。一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 354 或 356 位突变，Fc2 含有 349、366、368 和 407 位突变。

一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有选自 354C、356E、358M 和 366W 的一个或多个氨基酸取代，所述 Fc2 含有选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的一个或多个氨基酸取代。一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 366W 突变，Fc2 含有选自 366S、368A 和 407V 的突变或其任意组合。一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 354C 或 356C 突变，Fc2 含有 349C 突变。或一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 354C/366W 突变，Fc2 含有 349C/366S/368A/407V 突变。

一些具体实施方案中，所述 Fc1 含有 T366W 突变，Fc2 含有选自 T366S、L368A 和 Y407V 的突变或其任意组合；所述 Fc1 含有 S354C 或 E356C 突变，Fc2 含有 Y349C 突变；或所述 Fc1 含有 S354C/T366W 突变，Fc2 含有 Y349C/T366S/L368A/Y407V 突变。一些具体实施方案中，Fc1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，且 Fc2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白包含通过对重链 CH1 和轻链 CL 界面氨基酸进行氨基酸大小和电荷突变，减少了轻重链之间的错配。示例性地，Roche 交换了 CH1 和 CL 的结构域，并且创造了 CrossMab 平台（Schaefer 等，*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (27), pp.11187 - 11192 (2011))，MedImmune 突变重链 F126C 和轻链 S121C 引入了二硫键（Mazor 等，*mAbs*, 7 (2), pp.377 - 389 (2015))，Amgen 在 CH1-CL 区进一步做了静电作用修饰（Liu 等，*Journal of Biological Chemistry*, 290 (12), pp.7535 - 7562 (2015))，并且 Lilly（Lewis 等，*Nature Biotechnology*, 32 (2), pp.191 - 198 (2014)) 和 Genentech（Dillon 等，*mAbs*, 9 (2), pp.213 - 230 (2017)) 在可变结构域和恒定结构域均引入了突变。”药明将抗体的恒定区替换为 TCR 的恒定区，在 CN109535257A（引用且并入全文）描述。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白包含 Obscurin-O 链（如 SEQ ID NO: 47 所示）和 Titin-T 链（如 SEQ ID NO: 48 所示），以防止或降低不同 VH 和 VL 之间的错配。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中包含连接子。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中免疫球蛋白单一可变结构域或 VH、VL 与 Fc 区直接或通过连接子连接。所述连接子可以是长 1-20 个或更多

个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如，所述连接子如 $(G_mS_n)_h$ 或 $(G_mQ_n)_h$ 或 $(GGNGT)_h$ 或 $(YGNGT)_h$ 或 $(EPKSS)_h$ 或 $(A_mS_n)_h$ 所示，其中， m 、 n 各自独立地选自 1-8 的整数， h 独立地选自 1-20 的整数。例如，所述连接子选自 G_4S 、 GS 、 GAP 、 $(G_4S)_2$ 、 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_4$ 、 $(G_4S)_5$ 、 $ASGS$ 、 A_3S 等。

一些实施方案中，所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白包含选自以下的组合：

1) 第一重链、第二重链和轻链，其中，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[免疫球蛋白单一可变结构域]-[连接子 1]-[Fc1]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 2]-[CH1]-[连接子 3]-[Fc2]，

轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 4]-[CL]；

或

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[免疫球蛋白单一可变结构域]-[连接子 1]-[Fc2]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 2]-[CH1]-[连接子 3]-[Fc1]，

轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 4]-[CL]；

其中，-表示肽键，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3 和连接子 4 可以相同或不相同，可以独立的存在或不独立存在，可以独立的选自前述本公开的连接子；

一些具体实施方案中，连接子 1 为 AAAS，连接子 2、连接子 3 和连接子 4 不存在。

2) 第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 2]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[连接子 3]-[Titin-T 链]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[Fc2]，

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 6]-[CL]；

或，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 2]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 3]-[Titin-T 链]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[Fc2]，

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[连接子 6]-[CL]

其中，-表示肽键，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 和连接子 6 可以相同或不相同，可以独立的存在或不独立存在，可以独立的选自前述本公开的连接子；

一些具体实施方案中，连接子 1、连接子 3 为 GGGGS，连接子 2、连接子 4、连接子 5、连接子 6 不存在。

3) 第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接

子 2]-[Fc1],

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[连接子 3]-[Titin-T 链],

第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[VH1]-[连接子 6]-[CH1]-[连接子 7]-[Fc2],

5 第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 8]-[CL];

或,

第一重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接子 2]-[Fc1],

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 3]-[Titin-T 链],

10 第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[VH2]-[连接子 6]-[CH1]-[连接子 7]-[Fc2],

第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[连接子 8]-[CL];

其中, -表示肽键, 所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5、连接子 6、连接子 7、连接子 8 可以相同或不相同, 可以独立的存在或不存在, 可以独立的选自前述本公开的连接子;

一些具体实施方案中, 连接子 1、连接子 3 为 GGGGS, 连接子 5 为 GGGSGGGGS, 连接子 2、连接子 4、连接子 6、连接子 7 和连接子 8 不存在;

一些具体实施方案中, 第一重链: 第一轻链: 第二重链: 第二轻链的摩尔比为 1: 1: 1: 2。

20 一些具体实施方案中, Obscurin-O 链和 Titin-T 链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 47、48 所示。一些具体实施方案中, CL 为 Cκ, CH1 和 Cκ 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 49、50 所示。一些具体实施方案中, Fc1 和 Fc2 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 52、53 所示。

一些实施方案中, 提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白选自:

25 1) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的轻链;

30 2) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第一轻链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二轻链; 或,

35 3) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第一轻链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二轻链。

一些实施方案中, 提供 GPC3/TRGV9 结合蛋白选自:

1) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54-56 所示的多肽组合; 一些实施方案中, GPC3/TRGV9 结合蛋白中 SEQ ID NO: 54 所示多肽: SEQ ID NO: 55 所示多肽: SEQ ID NO: 56 所示多肽的摩尔比为 1: 1: 1;

2) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56-59 所示的多肽组合; 一些实施方案中, GPC3/TRGV9 结合蛋白中 SEQ ID NO: 56 所示多肽: SEQ ID NO: 57 所示多肽: SEQ ID NO: 58: SEQ ID NO: 59 所示多肽的摩尔比为 1: 1: 1: 1;

3) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57、58、60、61 所示的多肽组合; 一些实施方案中, GPC3/TRGV9 结合蛋白中 SEQ ID NO: 57 所示多肽: SEQ ID NO: 58 所示多肽: SEQ ID NO: 60: SEQ ID NO: 61 所示多肽的摩尔比为 1: 1: 1: 2。

一些实施方案中, 前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白为: 特异性结合 GPC3 和 $\gamma\delta$ TCR 的蛋白, 或抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 抗体或其抗原结合片段; 特异性结合 GPC3 和 TCR 的 $\gamma 9$ 链的蛋白, 或抗 GPC3/TCR $\gamma 9$ 链的抗体或其抗原结合片段; 特异性结合 GPC3 和 TCR 的 $\gamma 9$ 链的可变区 (V $\gamma 9$) 的蛋白, 或抗 GPC3/V $\gamma 9$ TCR 的抗体或其抗原结合片段; 特异性结合 GPC3 和 $\gamma 9\delta 2$ TCR 的蛋白, 或抗 GPC3/ $\gamma 9\delta 2$ TCR 抗体或其抗原结合片段; 特异性结合 GPC3 和 $\gamma 9\delta 1$ TCR 的蛋白, 或抗 GPC3/ $\gamma 9\delta 1$ TCR 抗体或其抗原结合片段; 特异性结合 GPC3 和 TRGV9 的蛋白, 或抗 GPC3/TRGV9 抗体或其抗原结合片段

一些实施方案中, 前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白具有选自以下至少一项的功能或性质:

(a) 以 $\leq 10\text{nM}$ 的 EC_{50} 与 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞结合, 所述 EC_{50} 例如 $\leq 5\text{nM}$ 、 $\leq 4\text{nM}$ 、 $\leq 3\text{nM}$ 、 $\leq 2\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.5\text{nM}$ 、 $\leq 0.2\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 。所述 EC_{50} 是通过 FACS 检测获得, FACS 是本领域常用的亲和力检测方法, 例如本公开实施例 5 中所述;

(b) 特异性结合 TCR 的 $\gamma 9$ 链, 例如, 特异性结合 $\gamma 9\delta 1$ TCR, 特异性结合 $\gamma 9\delta 2$ TCR;

(c) 不结合 TCR 的 $\gamma 8$ 链, 例如, 不结合 $\gamma 8\delta 2$ TCR;

(d) 特异性结合 TCR 的 $\gamma 9$ 链的可变区 (TRGV9);

(e) 特异性结合 V $\gamma\delta$ C $\alpha\beta$ 嵌合 TCR, 不结合 V $\alpha\beta$ C $\gamma\delta$ 嵌合 TCR;

其中, (b) - (e) 可通过本领域常规检测方法获知, 例如本公开实施例 4 中所述;

(f) 特异性结合 GPC3 蛋白或 GPC3 阳性细胞, 不结合或几乎不结合 GPC3 阴性细胞 (例如 PBMC), 例如使用本公开实施例 8 检测方法;

(g) 结合食蟹猴 GPC3 和 $\gamma 9\delta 2$ 蛋白;

(h) 不阻断 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号, 例如使用本公开实施例 9 检测方法;

(i) 介导 $\gamma\delta$ T 细胞对 GPC3 阳性肿瘤细胞杀伤或以 GPC3 表达水平依赖性方式介导 $\gamma\delta$ T 细胞对 GPC3 阳性肿瘤细胞杀伤, 例如使用本公开实施例 10 检测方法; 以效靶比依赖性方式, 介导 $\gamma\delta$ T 细胞对 GPC3 阳性肿瘤细胞杀伤, 例如使用本公开实施例 12 检测方法; 以低个体差异性的方式, 介导 $\gamma\delta$ T 细胞对 GPC3 阳性肿瘤

细胞杀伤，例如使用本公开实施例 11 检测方法；

(j) $\gamma\delta$ T 细胞对 GPC3 阳性肿瘤细胞杀伤过程中，诱导更少的细胞因子（如 IFN γ 、TNF α ）的释放，例如使用本公开实施例 13 检测方法；

(k) 促进 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞增殖，例如使用本公开实施例 14 检测方法；

5 (1) 体内抑制 GPC3 阳性肿瘤细胞增殖，和/或抑制 GPC3 阳性肿瘤生长，和/或消除 GPC3 阳性肿瘤；小鼠体内模型如本公开实施例 15 检测方法。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白结合 TRGV9 的 K_D 值可以 $\leq 1 \times 10^{-7}M$ ，例如 $\leq 1 \times 10^{-8}M$ ，或 $\leq 1 \times 10^{-9}M$ ，或 $\leq 1 \times 10^{-10}M$ 。

10 一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白结合 GPC3 的 K_D 值可以 $\leq 1 \times 10^{-7}M$ ，例如 $\leq 1 \times 10^{-8}M$ ，或 $\leq 1 \times 10^{-9}M$ ，或 $\leq 1 \times 10^{-10}M$ 。

一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域涵盖变体，所述变体与 SEQ ID NO: 5、26-29 任一相比，具有一个或多个氨基酸突变。一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中的 VH1 和/或 VL1 涵盖变体，所述 VH1 的变体与 SEQ ID NO: 39 相比，具有一个或多个氨基酸突变，所述 VL 的变体与 SEQ ID NO: 40 相比，具有一个或多个氨基酸突变。一些实施方案中，前述 GPC3/TRGV9 结合蛋白中的 VH2 和/或 VL2 涵盖变体，所述 VH2 的变体与 9、30-32 任一相比，具有一个或多个氨基酸突变，所述 VL 的变体与 SEQ ID NO: 10、33-35 任一相比，具有一个或多个氨基酸突变。“多个”例如为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个。所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或

15 20 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，其与前述本公开 GPC3/TRGV9 结合蛋白结合或竞争结合相同的 TRGV9 和/或 GPC3 抗原表位。

一些实施方案中，提供蛋白，其与 TRGV9 和/或 GPC3 的结合被前述本公开 GPC3/TRGV9 结合蛋白阻断。

25 一些实施方案中，提供蛋白或分子，其包含前述本公开任意的 GPC3/TRGV9 结合蛋白。所述蛋白或分子可以为与其他化合物、其他多肽形成的缀合物、偶联物或融合蛋白。例如，缀合物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 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白的多核苷酸。本公开的核酸可为 RNA、DNA 或 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。

30

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 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白的载体。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

35 技术人员的常识。对本公开的 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 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。

5 一些实施方案中，提供多核苷酸，其编码 TRGV9 结合蛋白，所述 TRGV9 结合蛋白，其包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，例如，免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR3；

10 和/或，

2) 重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和/或 HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3，

15 所述 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，提供多核苷酸，其编码 TRGV9 结合蛋白，所述 TRGV9 结合蛋白，其包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含分别如 SEQ ID NO: 6-8 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3；和/或，

20 2) VH 和 VL，所述 VH 包含分别如 SEQ ID NO: 11-13 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些实施方案中，提供多核苷酸，其编码 TRGV9 结合蛋白，所述 TRGV9 结合蛋白，其包含：1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列；和/或，

25 2) VH 和/或 VL，所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 9、30-33 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列。

30 一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 TRGV9 结合蛋白，所述 TRGV9 结合蛋白包含如下的 VH 和 VL：

2-1) VH 包含如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列，

35 2-2) VH 包含如 SEQ ID NO: 30 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列；

2-3) VH 包含如 SEQ ID NO: 31 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少

90%同一性的氨基酸序列；

2-4) VH 包含如 SEQ ID NO: 32 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

5 一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 TRGV9 结合蛋白，所述 TRGV9 结合蛋白包含：

1) 如 SEQ ID NO: 36 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

2) 重链和轻链，其中，重链如 SEQ ID NO: 37 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，轻链如 SEQ ID NO: 38 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

一些实施方案中，提供多核苷酸，其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白，所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白，其包含特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域。

15 一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白，前述第一抗原结合结构域包含重链可变区 (VH1) 和/或轻链可变区 (VL1)，所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 39 所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 40 所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白，前述第一抗原结合结构域所述第一抗原结合结构域包含重链可变区 (VH1) 和轻链可变区 (VL1)，所述 VH1 包含分别如 SEQ ID NO: 41-43 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；所述 VL1 包含分别如 SEQ ID NO: 44-46 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白，前述第一抗原结合结构域所述第一抗原结合结构域包含重链可变区 (VH1) 和轻链可变区 (VL1)，所述 VH1 包含如 SEQ ID NO: 39 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和/或 VL1 包含如 SEQ ID NO: 40 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白，前述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，例如，免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示氨基酸序列中的 CDR3；或，

35 2) 重链可变区 (VH2) 和/或轻链可变区 (VL2)，所述 VH2 包含 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL2 包含 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中，提供多核苷酸，其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白，前述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含：

1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含分别如 SEQ ID NO: 6-8 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 和/或,

2) VH2 和 VL2, 所述 VH2 包含分别如 SEQ ID NO: 11-13 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL2 包含分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中, 提供多核苷酸, 其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 前述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含:

1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 5、26-29 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列;

或,

2) VH2 和/或 VL2, 所述 VH2 包含如 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, 所述 VL2 包含如 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中, 提供多核苷酸, 其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 前述特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域包含如下的 VH2 和 VL2:

2-1) VH2 包含如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL2 包含 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列,

2-2) VH2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL2 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列;

2-3) VH2 包含如 SEQ ID NO: 31 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL2 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列;

2-4) VH2 包含如 SEQ ID NO: 32 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL2 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中, 提供多核苷酸, 其编码 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白选自:

1) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的轻链;

2) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一轻链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二轻链; 或,

3) 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%、至少 90%

同一性的第一重链，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第一轻链，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二重链，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的第二轻链。

5 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 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 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 TRGV9 结合蛋白或 GPC3/TRGV9 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°C，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。通过表达与人源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 TRGV9 结合蛋白和/或 GPC3/TRGV9 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 TRGV9 结合蛋白和/或 GPC3/TRGV9 结合蛋白，和至少一种可药用的赋形剂、
5 稀释剂或辅料。

在一些具体实施方案中，所述药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量% 的 TRGV9 结合蛋白和/或 GPC3/TRGV9 结合蛋白，或药物组合物单位剂量中含 TRGV9 结合蛋白和/或 GPC3/TRGV9 结合蛋白的量为 0.1-2000mg。在一些具体实施方案中为 1-1000mg。

10 一些实施方案中，提供制品或产品（例如药盒），包含前述 TRGV9 结合蛋白和/或 GPC3/TRGV9 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药物组合物。容器上或与容器相连的标签表明所述药物组合物用于治疗所选病症。

一些实施方案中，前述疾病为细胞增殖性疾病或癌症。

治疗方法和制药用途

15 本公开提供前述 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白，其编码多核苷酸、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，包括向受试者施用改善、缓解、治疗或预防有效量的：

- 20 1) 前述本公开的 TRGV9 结合蛋白或其编码多核苷酸、药物组合物；
2) 前述本公开的 GPC3/TRGV9 结合蛋白或其编码多核苷酸、药物组合物。

一些实施方案中，提供前述 1) -2) 项用于制备改善、缓解、治疗或预防疾病的药物的用途。

一些实施方案中，提供本公开的 TRGV9 结合蛋白与 $\gamma\delta$ T 细胞联合治疗疾病的方法。一些实施方案中，提供本公开的 GPC3/TRGV9 结合蛋白与 $\gamma\delta$ T 细胞联合治疗疾病的方法。一些实施方案中， $\gamma\delta$ T 细胞是自体的或同种异体的。
25

一些实施方案中，本公开前述任意的 TRGV9 结合蛋白用于治疗疾病，包括与 $\gamma\delta$ T 细胞联合使用。一些实施方案中， $\gamma\delta$ T 细胞用于治疗疾病，包括与本公开前述任意的 TRGV9 结合蛋白联合使用。

30 一些实施方案中，本公开前述任意的 GPC3/TRGV9 结合蛋白用于治疗疾病，包括与 $\gamma\delta$ T 细胞联合使用。一些实施方案中， $\gamma\delta$ T 细胞用于治疗疾病，包括与本公开前述任意的 GPC3/TRGV9 结合蛋白联合使用。

一些实施方案中，提供治疗疾病的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开前述任意的 TRGV9 结合蛋白和 $\gamma\delta$ T 细胞。一些实施方案中，提供治疗疾病的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开前述任意的
35 GPC3/TRGV9 结合蛋白和 $\gamma\delta$ T 细胞。

一些实施方案中，前述疾病为与 GPC3 超量表达导致的疾病或病症。

一些实施方案中，前述疾病为细胞增殖性疾病或癌症。

一些具体实施方案中，为 GPC3 阳性癌症。

一些实施方案中，前述疾病为肝癌。

一些具体实施方案中，为 GPC3 阳性肝癌。

检测

5 本公开提供 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白，其编码多核苷酸、组合物的检测用途。本公开还提供用于体内或体外检测 GPC3、TRGV9 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，还提供试剂盒，所述试剂盒包含前述 TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白，其编码多核苷酸、组合物，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，TRGV9 结合蛋白、GPC3/TRGV9 结合蛋白，其编码多核苷酸可以配制为药物组合物。

附图说明

图 1 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体结构示意图。

15 图 2A 至图 2D 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体与 GPC3 阳性细胞和人 $\gamma\delta$ 2 T 细胞的 FACS 结合活性检测结果。其中，图 2A 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体在 HepG2 细胞上的结合；图 2B 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体在 DLD-1 细胞上的结合；图 2C 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体在人 $\gamma\delta$ T 细胞上的结合；图 2D 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体在 PBMC 上的结合。

20 图 3A 至图 3B 为抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体对 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号的影响。图 3A 为 SDP01378 对 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号的影响；图 3B 为 SDP01315 对 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号的影响。

图 4A 至图 4D 为抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体对不同 GPC3 表达量肿瘤细胞的杀伤活性结果。其中，图 4A 为对 HepG2 细胞的杀伤活性，图 4B 为对 Huh-7 细胞的杀伤活性，图 4C 为对 MKN-45 细胞的杀伤活性，图 4D 为对 DLD-1 细胞的杀伤活性。

25 图 5A 至图 5D 为不同供体来源 $\gamma\delta$ T 细胞对 HepG2 杀伤活性结果。其中，图 5A-图 5D 所采用 $\gamma\delta$ T 细胞分别来源于供体 #SC12004，#SC12392，#XC11053，#XC11061 的诱导扩增。

图 6A 至图 6C 为不同效靶比下抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体对抗原低表达肿瘤细胞的杀伤结果。其中，图 6A 效靶比为 1:1，图 6B 效靶比为 10:1，图 6C 效靶比为 30:1。

图 7A 至图 7D 为提高 PBMC 中比例提升 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性结果。图 7A 为供体#XC11053 PBMC 细胞杀伤；图 7B 为供体#XC11053 掺入 30%的 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性；图 7C 为供体#SC12392 PBMC 细胞杀伤；图 7D 为供体#SC12392 掺入 30% $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性。

35 图 8A 至图 8D 为细胞因子释放检测结果。其中图 8A-图 8B 分别为对供体 #XC11053 杀伤时 IFN γ 和 TNF α 的释放；图 8C-8D 分别为对供体#SC12392 杀伤时

IFN γ 和 TNF α 的释放。

图 9 为抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体促进 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞增殖检测结果。

图 10 A 至图 10B 为 SDP01716 在 Huh-7 移植瘤模型中的抗肿瘤活性，其中图 10A 为小鼠肿瘤体积变化图，图 10B 为小鼠体重变化图。

5 图 11 A 至图 11B 为不同抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体在 Huh-7 移植瘤模型中的抗肿瘤活性，其中图 11A 为小鼠肿瘤体积变化图，图 11B 为小鼠体重变化图。

具体实施方式

定义

10 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。除显而易见在本公开中的它处另有明确定义，否则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。

15 “TRGV9”是指当在 $\gamma\delta$ T 细胞的表面表达时能够形成 T 细胞受体的多肽。表达 TRGV9 的 $\gamma\delta$ T 细胞是最早在人胎儿中发育的 T 细胞之一，并且是健康成人外周血细胞中的主要 $\gamma\delta$ T 细胞亚群。“TRGV9”包括由细胞（包括 T 细胞）天然表达或者能够在用编码所述多肽的基因或 cDNA 转染的细胞上表达的任何 TRGV9 变体、同种型和物种同源物。在具体的实施方案中，TRGV9 是人 TRGV9。示例性人
20 TRGV9 氨基酸序列由 GenBank 登录号 NG_001336.2 提供。

“GPC3”是指 Glypican 3，磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3，通过磷脂酰肌醇锚定在细胞膜上，是肝细胞癌标志物。示例性人 GPC3 的氨基酸序列由 uniprot 登录号 P51654 提供。

“TRGV9 结合蛋白”涵盖任何能够特异性结合 TRGV9 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子，包括但不限于针对 TRGV9 的如本公开定义的抗体、其抗原结合片段或其融合蛋白。一些实施方案中，“TRGV9 结合蛋白”可以包含至少一个（例如 1、2、3、4、5、6 或更多个）本公开实施例中特异性结合 TRGV9 的单域抗体或 VHH。一些实施方案中，“TRGV9 结合蛋白”可以包含至少一个（例如 1、2、3、4、5、6 或更多个）本公开实施例中特异性结合 TRGV9 的 VH 和 VL 组合。一些实施方案中，本公开的“TRGV9 结合蛋白”除包含 TRGV9 的免疫球蛋白单一可变结构域或 VH 和 VL 组合外，也可包含连接子和/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。一些实施方案中，“TRGV9 结合蛋白”涵盖本公开实施例中的抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体或其抗原结合
35 片段。

“GPC3/TRGV9 结合蛋白”涵盖任何能够特异性结合 GPC3 和 TRGV9 的蛋白

或包含所述蛋白的任何分子，包括但不限于抗体、多肽、抗体和多肽的融合蛋白或其缀合物。一些实施方案中，“GPC3/TRGV9 结合蛋白”涵盖本公开实施例中的抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体。

“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。

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，Proc Natl Acad Sci (USA)，86：9268-9272；“AbMTM，A Computer Program for Modeling Variable 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 Hierarchical Approach”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。

技术人员理解，尽管在具体的实施例、或在具体的 SEQ ID NO 中采用了特定的编号系统（如 Kabat），但是技术人员可以确定该序列在其他编号系统下对应的序列，这样的序列仍视为落入本公开的范围。

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，并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。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链（例如常规四肽链结构抗体的链或重链抗体的链）的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”的四个“框架区”，和“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”组成。免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

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

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其他可变结构域相互作用的情况下（例如在没有如常规四链单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域之间所需要的 VH/VL 相互作用的情况下），形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域（其可以是重链或轻链结构域，包括 VH、VHH 或 VL 结构域）。“免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体（包括 VHH、人源化 VHH 和/或骆驼化 VH，例如骆驼化人 VH）、IgNAR、结构域、作为 VH 结构域或衍生自 VH 结构域的（单结构域）抗体（诸如 dAbsTM）和作为 VL 结构域或衍生自 VL 结构域的（单结构域）抗体（诸如 dAbsTM）。基于和/或衍生自重链可变结构域（诸如 VH 或 VHH 结构域）的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选的。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH 结构域”（或简称为“VHH”）。

“VHH”亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗体片段、VHH

抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”（即“缺乏轻链的抗体”）的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域（Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)）。使用“VHH”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域（其在本公开中称为“VH 结构域”或 VH）以及轻链可变结构域（其在本公开中称为“VL 结构域”或 VL）进行区分。VHH 结构域特异性结合表位，而无需其他抗原结合结构域；这种结合行为与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域不同，在该情况下 VL 结构域与 VH 结构域一起识别表位。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_HH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody®”以及“Nanobody®结构域”（“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司，Ghent, Belgium 的商标）可互换使用。VHH 包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体，也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的，也可以是经噬菌体展示技术筛选获得的。VHH 中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内，常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法，先前已公开于以下文献中：R.van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240 (2000) 185-195; Li et al., J Biol Chem., 287 (2012) 13713-13721; Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol.8 (12), pp.2645-2652, 17June, 2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的，各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同，且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数（即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据，或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基）。这意味着一般而言，根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“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”（本公开中亦称为“序列优化”，除人源化外，“序列优化”也可涵盖通过提供 VHH 改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰，例如移除潜在的翻译后修饰位点）。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 进行亲和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, “亲和力成熟”的 TRGV9 结合蛋白或抗 TRGV9 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和力相比于其亲本抗体有所增加。亲和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.Mol.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 GPC3/TRGV9 结合蛋白、TRGV9 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 (K_A) 结合所要结合的抗原或靶蛋白 (即, GPC3、TRGV9)。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 k_a (或 k_{on}) 和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。 K_D 通过方程 $K_D = k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 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 IGF-1R 或 TRGV9 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 $\times 100\%$ 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。

“Titin-T 链”或“T 链”是指 Titin 蛋白中一段长度为 78-118 个氨基酸的包含 Titin Ig-样 152 结构域的肽段或其功能变体，所述 Titin-T 链能够与 Obscurin Ig-样 1 结构域彼此结合形成二聚化复合物。所述 T 链功能变体是对野生型 T 链的部分氨基酸进行突变，但依然具有与 Obscurin Ig-样 1 结构域彼此结合形成二聚化复合物的多肽。例如，在 Titin Ig-样 152 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸；可增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基；例如在 Titin Ig-样 152 结构域 N 端增加 5 个野生型 Titin 蛋白中紧邻 Titin Ig-样 152 结构域 N 端的“KAGIR”这 5 个氨基酸，其仍具有与 Obscurin Ig-样 1 结构域彼此缔合形成复合物的功能。还可对 Titin Ig-样 152 结构域氨基酸进行其它突变，例如，对某些氨基酸突变以便改善链间二硫键，提高复合物稳定性等。

“Obscurin-O 链”或“O 链”是指 Obscurin 蛋白上一段长度为 87-117 个氨基酸的包含 Obscurin Ig-样 1 结构域的肽段或其功能变体，所述 Obscurin-O 链能够与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物。所述的 Obscurin-O 链功能变体是对野生型 O 链的部分氨基酸进行突变，但依然具有与 Titin Ig-样 152 结构域相互结合形成二聚化复合物的多肽。例如，在 Obscurin-O 结构域 C 端和/或 N 端增加或截短合适长度的氨基酸，例如增加或截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸；例如在 Obscurin-O 结构域 N 端增加 5 个野生型 Obscurin 蛋白中紧邻 Obscurin Ig-样 1 结构域 N 端的“DQPQF”这 5 个氨基酸，其仍具有与 Titin Ig-样 152 结构

域相互结合形成二聚化复合物的功能。还可对 Obscurin Ig-样 1 结构域部分氨基酸进行其它突变，例如，对某些氨基酸突变以便改善链间二硫键，或提高抗体稳定性等。

“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、倾向于患有的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。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

5 “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
10 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，“354C/366W”表示“354C 和 366W”，即，Fc 中包含 354C 和 366W 突变；本公开 Fc 区的突变的氨基酸位置均是根据 EU 编号系统编号的。

15 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。

实施例

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本公开的范围。

20 本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

25 实施例 1. 抗原的设计与制备

$\gamma\delta$ T 细胞表面的 TCR ($\gamma\delta$ T cell receptor) 是由 γ 链和 δ 链复合形成异质二聚体膜蛋白。选取人 $\gamma\delta$ TCR 胞外区蛋白 $\gamma 9$ 链 (Protein data bank, 编号 1HXM, chain B) 的 1-242 位氨基酸，其中 C 端依次添加 3C 酶切位点、Leucine zipper、FLAG 标签；选取人 $\gamma\delta$ TCR 胞外区蛋白 $\delta 2$ 链 (Protein data bank, 编号 1HXM, chain A) 的 1-229
30 位氨基酸，其中 C 端依次添加 3C 酶切位点、Leucine zipper、His8 标签。此外， γ 链和 δ 链的恒定区分别引入 Q180C 和 V168C 突变，形成链间二硫键。

重组猴 (*Macaca mulatta*) $\gamma 9\delta 2$ TCR 蛋白选取猴 $\gamma 9$ 链 (序列见公开专利号：US2019144540A1 SEQ ID NO: 42) 的 1-241 位氨基酸，其中 C 端依次添加 3C 酶切位点、Leucine zipper、FLAG 标签；选取猴 $\delta 2$ 链 (序列见公开专利号：
35 US20190144540A1 SEQ ID NO: 37) 的 1-229 位氨基酸，其中 C 端依次添加 3C 酶切位点、Leucine zipper、His8 标签；此外， γ 链和 δ 链的恒定区分别引入 Q179C 和 V168C 突变，形成链间二硫键。

>重组人 $\gamma 9$ 链

AGHLEQPQISSTKTL SKTARLECVVSGITISATSVYWYRERPGEVIQFLVSISYDG
TVRKESGIPSGKFEVD RIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEAQQELGKKIK
VFGPGTKLIITDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIH
WEEKKSNTILGSCEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKEHRCIVRHENNKNG
5 VDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNGSGLEVL FQGP GSGAQL EKELQALEKENA QLE
WELQALEKELAQKGS GDYKDDDDK (SEQ ID NO: 1)

>重组人 $\delta 2$ 链

AIELVPEHQTVPV SIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRK TQGNTMTFIYREKDI
YGP GFKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDTLGMGGEYTDKLI F
10 GKGTRVTVEPRSQPHTKPSVFVMKNGTNVACLVKEFY PKDIRINLVSSKKITEFD
PAICISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQH DNKTVHSTDFEVKTDSTDHVKPK
ETENTKQPSKSGSGLEVL FQGP GSGAQL KKKLQALKKKNAQLKWK LQALKKK
LAQKGS GHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2)

>重组猴 $\gamma 9$ 链

15 AGHLEQPQISSTKML SKTARLECVVSGVTISETSIYWYRERPGEVIQFLVCIFYDG
TVKKESSIPSGKFEVD RIPKTSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEVQQFGRKVKL
FPGGTKLIITDKHLDADVSPKPTIFLPSIAETNLHKAGTYLCLLENFFPDVIKIH W
QEKKSNLILGSCEGNTVKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKEHRCIVRHENNKNGV
DQEIIFFPIKTDVTTMDPKDNGSGLEVL FQGP GSGAQL EKELQALEKENA QLEW
20 ELQALEKELAQKGS GDYKDDDDK (SEQ ID NO: 3)

>重组猴 $\delta 2$ 链

AVELVPEHQTVIVSVGDPATLKCSMKGEAISNYYINWYRK TQGNTMTFIYREKG
IYGP GFKDNFQGDIDTEENQAVLKILAPSERDEGSYYCASDILSWVDSYTDKLI F
GKGTRVTVEPKRQPHTKPSVFVMKNGTNVACLVKDFY GKD IRINLESSKKITEF
25 DPAICVSPSGKYNAVKLGQYADSNSVTCSVQHNKEVVYSTDFEVKTNSTDHLK
PTETENTKQPSKSGSGLEVL FQGP GSGAQL KKKLQALKKKNAQLKWK LQALK
KKLAQKGS GHHHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

30 分别合成携带目的蛋白编码基因的质粒，将人 $\gamma 9$ 链 (SEQ ID NO: 1) 和人 $\delta 2$ 链 (SEQ ID NO: 2) 质粒按 1: 1 的比例进行混合，将猴 $\gamma 9$ 链 (SEQ ID NO: 3) 和猴 $\delta 2$ 链 (SEQ ID NO: 4) 质粒按 1: 1 的比例进行混合，分别于 Expi293 细胞 (购自 Thermo) 中瞬时转染表达 7 天，分离、纯化，获得人 $\gamma\delta 2$ TCR 蛋白和猴 $\gamma\delta 2$ TCR 蛋白， -80°C 储存备用。

实施例 2. 抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体的筛选

35 1. 抗 $\gamma\delta$ TCR 单域抗体筛选

使用体外扩增的人 $\gamma\delta 2$ T 细胞作为免疫原免疫成年健康羊驼 (Alpaca)，采用噬菌体展示的方法使用实施例 1 中的重组人 $\gamma\delta 2$ TCR 蛋白筛选特异性抗体。

具体地，初次免疫剂量为每只羊驼 $2\text{E}7$ 细胞数。初次免疫 3 周后，加强免疫，免疫剂量为每只羊驼 $2\text{E}7$ 细胞数。以后每次加强免疫间隔 3 周。每次加强免疫一

周后采集血清样品，采用 Protein ELISA 和 FACS 检测羊驼血清中抗体效价。

Protein ELISA 具体检测过程如下：用 0.05M 碳酸盐 buffer（pH 9.6）将重组人 $\gamma 9\delta 2$ TCR 蛋白稀释至 2 $\mu\text{g/mL}$ ，100 μL /孔，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜；用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 缓冲液封闭 1 小时，洗板 3 次；在封闭缓冲液中以 1: 2000 开始，两倍梯度稀释羊驼血清，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min，洗板 5 次；每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗 Alpaca 二抗（AlpVHHs, 053-404-005, 用 PBS 按 1:10000 稀释），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min，洗板 5 次。最后每孔加入 100 μL TMB 显色液显色，5 分钟后加入 50 μL 终止液终止反应。使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光值。

FACS 具体检测过程如下：收集细胞重悬至 4E6/mL，50 μL 细胞加入梯度稀释的羊驼血清，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。用 1% BSA/PBS 缓冲液洗涤两遍后弃上清，加入 1: 200 稀释的 Anti alpaca IgG iFluor647（AlpVHHs, 053-404-009），4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 45 min。用 1% BSA/PBS 缓冲液洗涤两遍，200 μL 缓冲液重悬后 FACS 检测。

经检测，免疫后羊驼血清效价大于 128 k。

免疫三次后每次免疫后一周采 50mL 外周血分离淋巴细胞(PBMC)，用 RNAiso Plus 试剂提取 PBMC 总 RNA 进行噬菌体文库建立，获得滴度为 3.08 $\times 10^{13}$ cfu/mL 的噬菌体文库。

采用噬菌体展示的方法对针对重组人 $\gamma 9\delta 2$ TCR 蛋白的抗体进行淘选，用 ELISA 鉴定出交叉结合于猴 $\gamma 9\delta 2$ TCR 蛋白的抗体，用 FACS 确定对体外扩增的人 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞的结合活性。使用上述 ELISA 和 FACS 检测方法筛选出阳性单克隆单域抗体，序列如下。

> SDP01346 可变区（克隆号 ac-025）
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGSTFSDDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISW
TGGR~~TY~~YADSVKGRFAISRDN~~GE~~NTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAASRD~~CS~~GP~~G~~
CRVHEYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 5)

表 1. 抗人 $\gamma\delta$ TCR 单域抗体的 CDR 序列（Kabat 编号规则）

抗体编号	CDR 序列		序列号
SDP01346	CDR1	DFAMG	SEQ ID NO: 6
	CDR2	AISWTGGR TY YADSVK G	SEQ ID NO: 7
	CDR3	SRDCSGPGCRVHE Y DY	SEQ ID NO: 8

2. 鼠源抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体筛选

使用体外扩增的人 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞作为免疫原，免疫 6-8 周龄的 Balb/c 和 SJL 小鼠，采用杂交瘤融合的方法使用实施例 1 中的重组人 $\gamma 9\delta 2$ TCR 蛋白筛选特异性抗体。

具体地，初次免疫剂量为每只小鼠 1E7。初次免疫 2 周后，加强免疫，免疫剂量为每只小鼠 1E7。以后每次加强免疫间隔 2-3 周。每次加强免疫一周后采集血清样品，用 Protein ELISA 和 FACS 检测小鼠血清中抗体活性。

Protein ELISA 具体检测过程如下：用 1 μg/mL 重组人 γ9δ2 TCR 蛋白包板，4 °C 过夜，用含 1% BSA 的 PBST 缓冲液封闭 1 小时，洗板 3 次。在封闭缓冲液中以 1：200 开始，三倍梯度稀释小鼠血清，37 °C 孵育 1 小时，洗板 3 次，与 1：10000 稀释的抗小鼠 IgG-Fc-HRP 的二抗（Sigma, AP127P）孵育 1 小时。PBST 洗涤 3 次，
5 每孔加入 100 μL TMB 显色液显色，15 min 后用终止液终止反应。使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光值。

FACS 具体检测过程如下：细胞铺板每孔 1E5 细胞，离心弃上清加入梯度稀释的小鼠血清。4 °C 孵育 1 h。用 1% BSA/PBS 缓冲液洗涤两遍后弃上清，加入 1：500 稀释的 Alexa Flour 488 羊抗鼠二抗（Jackson immuno research. 115-545-071），
10 4 °C 避光孵育 30 min。用 1% BSA/PBS 缓冲液洗涤两遍，200 μL 缓冲液重悬后 FACS 检测。经免疫后小鼠血清效价大于 72900。

最后一次免疫腹腔注射 50 μg 重组人 γ9δ2 TCR 蛋白，4 天后处死小鼠后取脾脏，碾磨收集脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 混合，电融合获得杂交瘤细胞。将 OD 450 nm > 0.2 的阳性克隆加测 FACS，将与人 γ9δ2 T 细胞结合 MFI 值 > 5000
15 的阳性克隆进行亚克隆。经过亚克隆初筛与复测，使用上述 ELISA 和 FACS 检测方法筛选出鼠源抗 γδTCR 抗体，SDP01315（克隆号 bph-003）序列如下。

> SDP01315（克隆号 bph-003）VH
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSG
GSTIYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDDGYPPFDYWG
20 QGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 9)
> SDP01315（克隆号 bph-003）VL
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASY
RYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSFPLTFGSGTKLEIK
25 (SEQ ID NO: 10)

25 表2. 鼠源抗γδTCR抗体的CDR序列（Kabat编号规则）

抗体编号	CDR 序列		序列号
SDP01315	HCDR1	SYAMS	SEQ ID NO: 11
	HCDR2	SISSGGSTIYPDSVKG	SEQ ID NO: 12
	HCDR3	DGYPPFDY	SEQ ID NO: 13
	LCDR1	KASQNVGTNVA	SEQ ID NO: 14
	LCDR2	SASYRYS	SEQ ID NO: 15
	LCDR3	QQYNSFPLT	SEQ ID NO: 16

实施例 3. 抗 γδTCR 嵌合抗体的构建和功能效果验证

1. 嵌合抗体的表达

单域抗体将编码抗体的核苷酸序列克隆到 pTT5 载体上后转染 ExpiCHO 细胞，
30 8 天后离心去除细胞收集并过滤细胞培养液，将收获的细胞培养液使用镍亲和柱

(HisTrap excel, GE) 纯化, 使用 300 mM 咪唑洗脱结合的抗体, 脱盐换液至 PBS, 获得目的抗体。

> SDP01346 全长

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGSTFSDFAMGWLRLQAPGKEREFVAAISW
5 TGGRTYYADSVKGRFAISRDNAGENTVYLQMNSLKSEDTAIYYCAASRDCSGPG
CRVHEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSHHHHHH

(SEQ ID NO: 17)

鼠源抗体将编码抗体的核苷酸序列克隆到 pTT5 载体上后转染 ExpiCHO 细胞, 8 天后离心去除细胞收集并过滤细胞培养液, 将收获的细胞培养液使用 Protein A 亲和柱 (MabSelect SuRe, GE) 纯化, 使用甘氨酸洗脱结合的抗体, 1M Tris 中和洗脱液后脱盐, 获得目的抗体。

> SDP01315 重链全长

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSG
GSTYYPD^{SVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDGYPPFDYWG}
15 QGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
20 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 18)

> SDP01315 轻链全长

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASY
RYS^{GV}PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSFPLTFGSGTKLEIKRT
25 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSK^DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 19)

2. 嵌合抗体与 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞的结合

抗 $\gamma\delta$ TCR 单域抗体细胞水平亲和力检测过程如下: 将梯度稀释的抗体分子于
30 1×10^5 个 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞, 4°C 孵育 1 小时, 洗掉多余的抗体, 加入 DyLight
405-AffiniPure Goat Anti-Alpaca IgG₁ VHH domain 抗体 (Jackson,
Cat#128-475-232), 在 4°C 孵育 30 分钟, 洗掉多余的抗体后, 用 $200\mu\text{L}$ 2% FBS/PBS
缓冲液重悬, 通过 Thermo Attune NxT 流式细胞仪读取细胞表面的荧光信号。结果
如表 3 所示。

鼠源抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体细胞水平亲和力检测过程如下: 将梯度稀释的抗体分子于
35 1×10^5 个 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞, 4°C 孵育 1 小时, 洗掉多余的抗体, 加入鼠源 Alexa Flour 647
标记的抗人 Fc 抗体 (Jackson, Cat#209-605-098), 在 4°C 孵育 30 分钟, 洗掉多余的
抗体后, 用 $200\mu\text{L}$ 2% FBS/PBS 缓冲液重悬, 通过 Thermo Attune NxT 流式细胞
仪读取细胞表面的荧光信号。结果如表 3 所示。

40

表 3. 抗 $\gamma\delta$ TCR 嵌合抗体的结合能力

抗体编号	与 $\gamma 9\delta 2$ T 细胞的结合	
	EC ₅₀ (nM)	Max MFI
SDP01346	0.44	3279
SDP01315	0.99	11123

结果显示, SDP01346、SDP01315 在 γ 9 δ 2 T 细胞上具有良好的结合活性。

5 实施例 4. 抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体与抗原结合区域的鉴定

本实施例采用基于蛋白的 ELISA 检测抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体与抗原的结合区域。采用实施例 1 类似的方法，制备重组人 $\gamma 9\delta 1$ TCR 蛋白 (SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 20 的二聚体蛋白)、人 $\gamma 8\delta 2$ TCR 蛋白 (SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 2 的二聚体蛋白)、人 $V\gamma\delta C\alpha\beta$ 嵌合 TCR 蛋白 (SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 的二聚体蛋白) 以及人 $V\alpha\beta C\gamma\delta$ 嵌合 TCR 蛋白 (SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 的二聚体蛋白)。

采用 ELISA 分别鉴定抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体与上述抗原的结合活性, 判断抗体结合的大致区域。Protein ELISA 具体检测过程如下: 用 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 重组 TCR 蛋白分别包板, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用含 1% BSA 的 PBST 缓冲液封闭 1 小时, 洗板 3 次。用封闭缓冲液将抗体稀释至 30 nM , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时, 洗板 3 次, 与 1: 10000 稀释的抗小鼠 IgG-Fc-HRP 的二抗 (Sigma, AP127P) 孵育 1 小时。PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ TMB 显色液显色, 15 min 后用终止液终止反应。使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光值。

>重组人 $\delta 1$ 链

[illegible]

>重组人 $\gamma 8$ 链

ADLSSNLEGRTKSVTRPTGSSAVITCDLPVENAVYTHWYHLHQEGKAPQRLLYYD
SYNSRVVLESGISREKYHTYASTGKSLKFILENLIERDSGVYYCATWASSDWIKT
FAKGTRLIVTSPDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDIIKI
30 WQEKKSNTILGSCGNTMKTNDTYMKFSWLTVPESLDKEHRCIVRHENNKNG
IDQEIIFPPIKTDVTTVDPKYNYSKDANDVITMDPKDNGSGLEVLFGPGSGAQL
EKELOALEKENAOLEWELOALEKELAOKGSGDYKDDDDK (SEO ID NO: 21)

>重组人 V γ 9C β 链

AGHLEOPOISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVYWYRERPGEVIOFLVSIISYDG

TVRKESGIPSGKFEVD RIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEVHELGKKIKVF
GPGTKLIITEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWW
VNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQ
FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADSGSGLEVL FQGP GSGA QLEKEL
5 QALEKENA QLEWELQALEKELAQKGS GDYKDDDDK (SEQ ID NO: 22)
>重组人 Vδ2Cα 链
AIELVPEHQTVPV SIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNTMTFIYREKDI
YGP GFKDNFQGDIDI AKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDPVQVTGGYKVDKLI
FGKGTRVTVEPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYI
10 TDKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSSGSGL
EVL FQGP GSGA QLK KKLQAL KKKNAQLKWK LQAL KKKLAQKGS GH HHHHHH
H (SEQ ID NO: 23)
>重组人 Vβ7Cγ 链
GVSQTPSNKVTEKGKYVELRCDPISGHTALYWYRQSLGQGPEFLIYFQGTGAAD
15 DSGLPNDRFFAVRPEGSVSTLKIQRTERGDSAVYLCATSALGDTQYFGPGTR LTV
LDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIH WEEKKSNTIL
GSCEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEII FPIK
TDVITMDPKDNGSGLEVL FQGP GSGA QLEKELQALEKENA QLEWELQALEKEL
AQKGS GDYKDDDDK (SEQ ID NO: 24)
20 >重组人 Vα13Cδ 链
ENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGE
KKDQRIAVTLNKTAKHFS LHITETQPEDSAVYFCAASSFGNEKLTFGTGTRLTIIPS
QPHTKPSVFVMKNGTNVACL VKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNA
VKLGKYEDSNSVTCSVQH DNKTVHSTDFEVKTDSTDHV KPKETENTKQPSKSG
25 SGLEVL FQGP GSGA QLK KKLQAL KKKNAQLKWK LQAL KKKLAQKGS GH HHHH
HHHH (SEQ ID NO: 25)

ELISA 结果如表 4 所示, 抗体 SDP01346 和 SDP01315 对不同抗原的结合吸光
值是不同的, 这两个抗体均是结合 γ9δ1 TCR 蛋白而不结合 γ8δ2 TCR 蛋白, 说明
抗体结合的是 γ9 链; 这两个抗体结合 VγδCαβ 嵌合 TCR 蛋白而不结合 VαβCγδ 嵌
30 合 TCR, 说明抗体结合的是 TCR 可变区 (V 区), 综上可以明确抗体 SDP01346
和 SDP01315 结合的是 TRGV9。

表 4. 嵌合抗体与抗原结合区域的鉴定结果

抗体编号	人 γ9δ2 TCR	猴 γ9δ2 TCR	人 γ9δ1 TCR	人 γ8δ2 TCR	VγδCαβ 嵌合 TCR	VαβCγδ 嵌合 TCR
SDP01346	3.52	0.769	2.444	0.108	2.345	0.094
SDP01315	3.71	1.646	3.057	0.192	3.045	0.176

35 实施例 5. 抗 γδTCR 抗体的人源化改造

将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，SDP01346 所使用的人种系重链模板为 IGHV3-30；SDP01315 使用的人种系重链模板为 IGHV3-21，人种系轻链模板为 IGKV1-12。通过同源建模预测单抗的结构后，将鼠源抗体的 VH、VL 或单域抗体的 CDR 嵌合到合适的人 GermLine 框架上
5 (Bioinformation. 2014; 10 (4) : 180-186; Methods Mol Biol. 2019;1904:213-230)，随后引入回复突变。

获得的人源化分子序列如下：

> SDP01346 VH1

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFSDFAMGWLRQAPGKREFVAAISW
10 TGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPG
CRVHEYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 26)

> SDP01346 VH2

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISW
15 TGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPG
CRVHEYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 27)

> SDP01346 VH3

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISW
20 TGGRTYYADSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCAASRDCSGPG
CRVHEYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 28)

20 > SDP01346 VH4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWT
GGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRDCSGPGC
RVHEYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 29)

> SDP01315 VH1

25 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVSSISSG
GSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWG
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 30)

> SDP01315 VH2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSG
30 GSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWG
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 31)

> SDP01315 VH3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSG
GSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWG
35 QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 32)

> SDP01315 VL1

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYR
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 33)

> SDP01315 VL2
DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYR
YSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 34)

5 > SDP01315 VL3
DIQMTQSPSSVSASVGDRVITVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGKSPKALIYSASY
RYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYFCQQYNSFPLTFGQGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 35)

单域抗体人源化后构建全长抗体，在对应 VHH 后加入 GGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 72)。或单域抗体人源化后构建全长抗体，在对应 VHH 后加入接头和 Fc。
鼠源抗体人源化后构建全长抗体，轻链恒定区使用的是 Cκ，重链恒定区使用的是带 L234F，L235E 突变的 IgG1。

表 5. 抗体名称与抗体结构的对应关系。

抗体编号	重链可变区	轻链可变区
SDP01375	SDP01346 VH1	/
SDP01376	SDP01346 VH2	/
SDP01377	SDP01346 VH3	/
SDP01378	SDP01346 VH4	/
SDP05576	SDP01346 VH4	/
SDP01365	SDP01315 VH1	SDP01315 VL1
SDP01366	SDP01315 VH2	SDP01315 VL1
SDP01367	SDP01315 VH3	SDP01315 VL1
SDP01368	SDP01315 VH1	SDP01315 VL2
SDP01369	SDP01315 VH2	SDP01315 VL2
SDP01370	SDP01315 VH3	SDP01315 VL2
SDP01371	SDP01315 VH1	SDP01315 VL3
SDP01372	SDP01315 VH2	SDP01315 VL3
SDP01373	SDP01315 VH3	SDP01315 VL3

15 以下示例性给出 SDP01378、SDP05576 和 SDP01369 的全长序列。
> SDP01378 全长
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWT
GGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRD CSGPGC
RVHEYDYWGQGT LVT VSSGGGSHHHHHH
(SEQ ID NO: 36)

>SDP05576
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWT
GGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASRD CSGPGC
RVHEYDYWGQGT LVT VSSAAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
25

LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 73)

5 > SDP01369 重链全长

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSG
GSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
10 CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 37)

15 > SDP01369 轻链全长

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYR
YSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 38)

以下进行人源化单抗与 γ 9 δ 2 T 细胞结合的 FACS 检测。

单域抗体 SDP01346 人源化后亲和力检测：将梯度稀释的抗体分子于 1×10^5
个 γ 9 δ 2 T 细胞，4℃孵育 1 小时，洗掉多余的抗体，加入 DyLight 405-AffiniPure Goat
Anti-Alpaca IgG₁ VHH domain 抗体（Jackson，Cat#128-475-232），在 4℃孵育 30
25 分钟，洗掉多余的抗体后 200 μ L 2% FBS/PBS 缓冲液重悬，通过 Thermo Attune NxT
流式细胞仪读取细胞表面的荧光信号。结果如表 6 所示。

鼠源嵌合抗体 SDP01315 人源化后亲和力检测：将梯度稀释的抗体分子于 $1 \times$
 10^5 个 γ 9 δ 2 T 细胞，4℃孵育 1 小时，洗掉多余的抗体，加入鼠源 Alexa Flour 647 标
记的抗人 Fc 抗体（Jackson，Cat#209-605-098），在 4℃孵育 30 分钟，洗掉多余的
30 抗体后 200 μ L 2% FBS/PBS 缓冲液重悬，通过 Thermo Attune NxT 流式细胞仪读取
细胞表面的荧光信号。结果如表 6 所示。

表 6. SDP01346 和 SDP01315 人源化分子亲和力检测

抗体编号	与 γ 9 δ 2 T 细胞的结合	
	EC ₅₀ (nM)	Max MFI
SDP01375	1.27	1093
SDP01376	0.70	1252
SDP01377	0.77	1237
SDP01378	1.06	1496
SDP01365	2.42	15519
SDP01366	2.11	14836
SDP01367	1.79	14698

SDP01368	1.67	14854
SDP01369	1.74	15014
SDP01370	2.00	14922
SDP01371	1.70	15385
SDP01372	1.69	15470
SDP01373	2.50	15678

结果说明，单域抗体人源化分子 SDP01378 亲和力最强，SDP01346 人源化分子 SDP01365- SDP01373 亲和力相当，选择回复突变数目居中的 SDP01369。

5 **实施例 6. 抗 GPC3/γδTCR 双特异性抗体的设计和制备**

GPC3 端选择的具有纳摩尔级亲和力的抗体 G，重链可变区和轻链可变区的序列如下。抗体 G 结合的是 C-末端亚基，不结合可溶性 GPC3。

> GPC3 VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV**SCKASGYTFTD****YEMH**WVRQAPGQGLEWMGAL
10 **DPKTGDTAYSQKFKGR**VTLTADKSTSTAYMELSSLTSED**TAVYYCTRF****YSYTYW**
GQGT**LVTVSS** (SEQ ID NO: 39)

> GPC3 VL
DVVMTQSPSLPVT**PGEPASISCRSSQSLVHSNRNTYL****HWYLQKPGQSPQLLIYK**
VSNRFSGV**PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC****SQNT****HVPPTFGQGTKL**
15 **EIK** (SEQ ID NO: 40)

表 7. 抗体 G 的 VH 和 VL (Kabat 编号规则)

抗体编号	CDR 序列		序列号
抗体 G	HCDR1	DYEMH	SEQ ID NO: 41
	HCDR2	ALDPKTGDTAYSQKFKG	SEQ ID NO: 42
	HCDR3	FYSYTY	SEQ ID NO: 43
	LCDR1	RSSQSLVHSNRNTYLH	SEQ ID NO: 44
	LCDR2	KVSNRFS	SEQ ID NO: 45
	LCDR3	SQNT HVPPT	SEQ ID NO: 46

我们设计了多种 GPC3/γδTCR 双抗，最终选择了与 SDP01346H4（即，SDP01378）组成 1+1 非对称结构，采用 KIH（knob into hole）避免重链错配；与
20 SDP01315H2L2 组成 2+1 非对称结构，采用 KIH 避免重链错配，HOT 避免轻链错配。结构示意图见图 1。

为防止、降低重链和轻链错配，使用的 Obscurin-O 和 Titin-T 见 SEQ ID NO: 47-48，CH1 和 Cκ 见 SEQ ID NO: 49-50。为防止、降低两条重链之间错配，使用了 IgG 的突变。双抗全长序列如下，其中，下划线部分为 CDR 序列，波浪下划线的为 Obscurin-O 或 Titin-T 序列，点下划线为 CH1 或 Cκ，斜体为 IgG1 Fc 区，斜
25 体加粗为 Fc 区的点突变，粗体为连接子。

>Obscurin-O

SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAGVRFRLAQ
DGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACGLGLQVDAEA

(SEQ ID NO: 47)

5 >Titin-T

GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQQGRFHIENT
DDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

(SEQ ID NO: 48)

> CH1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
10 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

(SEQ ID NO: 49)

> Cκ

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 (SEQ ID NO: 50)

> IgG1 Fc (WT)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
20 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 51)

> IgG1 Fc1 (突变为 S354C/T366W/L234F/L235E)

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
25 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 52)

> IgG1 Fc2 (突变为 Y349C/T366S/L368A/Y407V/L234F/L235E)

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
30 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 53)

> SDP01716 H1

35 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGSTFSDFAMGWLRQAPGKEREFVAAISWT
GGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASSRDCSGPGC
RVHEYDYWGQGTLVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
40 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 54)

> SDP01716 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAL
DPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYW
5 GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP

10 ENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD

(SEQ ID NO: 55)

> SDP01716 L

DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
15 SOESVTEODSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

(SEQ ID NO: 56)

> SDP01696 H1

EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKRLEWVASISSG
GSTYYPDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYPPFDYWG
20 QGTTTVTVSSGGGGSSGAPRFLTRPKASVSVSGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEK
DKQPVTAGVRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQ
YDAEADKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
25 QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

(SEQ ID NO: 57)

> SDP01696 L1

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYR
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSFPLTFGQGTKLEIKGGG
30 GSGIPPKIECLPIDISIDEKGLTVASAFTEPTPEVTWSTGGRKIHSEQGRFHIE
NTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

(SEQ ID NO: 58)

> SDP01696 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAL
DPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYW
35 GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP
40 ENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

PGK

(SEQ ID NO: 59)

> SDP01696 L2

同SDP01716 L (SEQ ID NO: 56)。

> SDP01704 H1

5 同SDP01696 H1 (SEQ ID NO: 57)。

> SDP01704 L1

同SDP01696 L1 (SEQ ID NO: 58)。

> SDP01704 H2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAL
10 DPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYW
GQGT~~LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~TVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS~~SSLGTQTYICNVNHKPSNTK~~VDDKKVE
PKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHW
VRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSE
15 DTAVYYCTRFYSYTYWGQGT~~LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL~~
VKDYFPEPVTTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS~~SSLGTQTYIC~~
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA
20 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 60)

> SDP01704 L2

DVVM~~TQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYK~~
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNT~~HVPPTFGQGTKL~~
25 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC~~LLNNFY~~PREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSS~~TLT~~LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO: 61)

将编码抗体的核苷酸序列克隆到 pTT5 载体上后转染 ExpiCHO 细胞，8 天后
离心去除细胞收集并过滤细胞培养液，将收获的细胞培养液使用 Protein A 亲和柱
30 (MabSelect SuRe, GE) 纯化，使用甘氨酸洗脱结合的抗体，1M Tris 中和洗脱液
后脱盐，经检测，获得目的抗体 SDP01716、SDP01696 和 SDP01704。

实施例 7. 抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体与人和猴抗原结合亲和力检测

采用 Protein A 生物传感芯片 (Cat. # 29139121-AB, Cytiva)。用 HBS-EP+缓冲
35 溶液分别配制各待测抗体作为配体与芯片通道上的 Protein A 进行捕获，人 GPC3
(Sino Biological, Cat# 10088-H08H) / 食蟹猴 GPC3 (Acrobiosystems, Cat#
GP3-C5225) / 人 $\gamma\delta$ 2/食蟹猴 $\gamma\delta$ 2 抗原作为分析物用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，
分析物进行 2 倍梯度稀释。将稀释好的抗原在 30 μ L/min 的流速下流过实验通道和
参比通道，结合 80 秒，解离 300 秒。再生缓冲液选择 10 mM Glycine pH1.5 (GE

Healthcare, BR-1003-54) 在 10 μL/min 的流速下运行 30 秒。数据用 Biacore 8K evaluation software 软件进行分析。

结果如表 8 和表 9 所示，三个抗体对人、食蟹猴 GPC3 蛋白的抗原结合亲和力均在 2nM 左右，与抗体 G 的亲和力相近；三个抗体与食蟹猴 γ9δ2 TCR 蛋白的结合 K_D 均为 50nM 左右。

5

表 8. 抗体与人/食蟹猴 GPC3 蛋白的结合动力学参数

抗体编号	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
SDP01716	人 GPC3	1.47E+05	2.42E-04	1.65E-09
SDP01696		1.42E+05	2.47E-04	1.74E-09
SDP01704		1.36E+05	2.50E-04	1.84E-09
SDP01716	食蟹猴 GPC3	1.87E+05	2.75E-04	1.47E-09
SDP01696		1.96E+05	2.88E-04	1.47E-09
SDP01704		1.78E+05	2.89E-04	1.63E-09

表 9. 抗体与人/食蟹猴 γ9δ2 蛋白的结合动力学参数

抗体编号	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
SDP01716	人 γ9δ2	4.26E+05	4.27E-04	1.00E-09
SDP01696		2.54E+04	1.03E-03	4.06E-08
SDP01704		2.67E+04	1.02E-03	3.83E-08
SDP01716	食蟹猴 γ9δ2	1.99E+05	1.37E-02	6.88E-08
SDP01696		1.40E+05	5.92E-03	4.24E-08
SDP01704		1.48E+05	6.01E-03	4.06E-08

10 **实施例 8. 抗 GPC3/γδTCR 双特异性抗体与 GPC3 阳性细胞和人 γ9δ2 T 细胞的结合活性检测**

用 FACS 实验检测 γδT 双抗与天然高表达人 GPC3 的 HepG2 细胞(购自 ATCC) 和不表达人 GPC3 的 DLD-1 细胞 (购自 ATCC) 的结合活性。抗 GPC3/γδTCR 双特异性抗体在细胞上的 GPC3 结合活性实验通过检测细胞表面结合抗体的荧光信号，根据荧光信号的强弱来评价抗体的结合强度。具体地，将梯度稀释的抗体分子和对照分子于 1 x 10⁵ 个细胞，4℃孵育 1 小时，洗掉多余的抗体，加入鼠源 Alexa Flour 647 标记的抗人 Fc 抗体 (Jackson, Cat#209-605-098)，在 4℃孵育 30 分钟，洗掉多余的抗体后 200μL 2% FBS/PBS 缓冲液重悬，通过 Thermo Attune NxT 流式细胞仪读取细胞表面的荧光信号，所使用的细胞为 HepG2 细胞系。

15

20 用 FACS 实验检测抗 GPC3/γδTCR 双特异性抗体与人 γ9δ2 T 细胞的结合活性以及与人 PBMC 结合活性。人 γ9δ2 T 细胞采用唑来膦酸和 IL-2 进行诱导获得。抗 GPC3/γδTCR 双特异性抗体在 γδT 细胞上的结合活性实验通过检测细胞表面结合

抗体的荧光信号，根据荧光信号的强弱来评价抗体的结合强度。具体地，将梯度稀释的抗体分子和对照分子于 1×10^5 个细胞， 4°C 孵育 1 小时，洗掉多余的抗体，加入鼠源 Alexa Flour 647 标记的抗人 Fc 抗体 (Jackson, Cat#209-605-098)，在 4°C 孵育 30 分钟，洗掉多余的抗体后 $200\mu\text{L}$ 2% FBS/PBS 缓冲液重悬，通过 Thermo Attune NxT 流式细胞仪读取细胞表面的荧光信号。

结果如图 2A-图 2D 所示，其中，如图 2A 和图 2B，SDP01716 和 SDP01696 的 GPC3 端亲和力相当， EC_{50} 分别为 4.853nM 和 5.166nM 。SDP01704 显示出二价结合特征， EC_{50} 为 2.466nM ；所测抗体在 GPC3 阴性细胞上均没有非特异性结合。如图 2C 和图 2D，SDP01716 对 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的亲和力为 0.9064nM ，SDP01696 为 2.676nM ，SDP01704 为 4.289nM ；所测抗体在 PBMC 上均没有非特异性结合。

实施例 9. 抗 GPC3/ $\gamma\delta\text{TCR}$ 双特异性抗体对 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号的影响

在天然状态下，细胞内的磷酸化抗原与 BTN3A 结合后，改变了 BTN3A 的分子张力；2 个 BTN3A 分子和 2 个 BTN2A 分子结合形成异源四聚体，进而与 TCR 相互作用，激活 TCR，诱导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化、增殖、杀伤等功能。由于抗 $\gamma\delta\text{TCR}$ 抗体同样结合 TCR，因此，本实施例评估本公开的抗体对 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号影响。SDP01378 是 SDP01716 的 $\gamma\delta\text{T}$ 端单价分子，SDP01315 是 SDP01696 和 SDP01704 的单价分子。

A375-Luc 细胞培养基为 RPMI1640，含有 10% 灭活胎牛血清。 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞由 PBMC 扩增获得。调整 A375-Luc 密度，以 $25\mu\text{L}/\text{孔}$ 每孔接种于 96 孔板，细胞量为 $1 \times 10^4/\text{孔}$ ；取 $25\mu\text{L}/\text{孔}$ $\gamma\delta\text{T}$ 细胞 ($1 \times 10^5/\text{孔}$) 与 A375-Luc 混合；再加入 $25\mu\text{L}/\text{孔}$ SDP01378 或者 SDP01315 (终浓度为 10nM)，以及 $25\mu\text{L}/\text{孔}$ 梯度稀释的 BTN3A 激动性抗体。在 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 小时。24 小时后加入 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, E2650) 试剂进行检测。具体操作参考试剂说明书。

结果如图 3A 和图 3B 所示，SDP01378 和 SDP01315 都不阻断 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号。因此，可以认为，本公开的抗 GPC3/ $\gamma\delta\text{TCR}$ 双特异性抗体不阻断 BTN2A/BTN3A-TCR 天然信号。

实施例 10. 抗 GPC3/ $\gamma\delta\text{TCR}$ 双特异性抗体体外介导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞对肿瘤细胞杀伤活性检测

本实施例使用乳酸脱氢酶 (LDH) 检测法评估抗体介导 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞对不同 GPC3 表达量靶细胞的杀伤活性。

HepG2 细胞天然高表达 GPC3，细胞培养基为 DMEM (Gibco, Cat#11995-065，下同)，含有 15% 灭活胎牛血清；Huh-7 表达中等水平 GPC3，细胞培养基为

DMEM；MKN-45 表达低水平 GPC3，细胞培养基为 RPMI 1640（Gibco，Cat#10491A-01，下同）；DLD-1 不表达 GPC3，细胞培养基为 RPMI 1640。将靶细胞消化后用 2%血清的 RPMI1640 培养基重悬，密度调整为 7×10^4 细胞/mL；随后以 50 μ L/孔接种于 96 孔板，并加入 50 μ L 梯度稀释后的待测抗体。每孔补 50 μ L 培养基。收集 $\gamma\delta$ T 细胞，重悬于含有 2%胎牛血清的 RPMI1640 中，调整细胞密度。以 50 μ L/孔接种于上述实验板，在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。取出细胞培养板，离心（400g，5 分钟）收集细胞培养上清，采用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒（Promega，G1780）检测 LDH 的水平。具体操作参考试剂说明书。

结果如图 4A 至图 4D、表 10 显示，随着抗原表达量的降低，本公开的双抗对肿瘤细胞的杀伤活性减弱；抗体 $\gamma\delta$ T 端亲和力强弱与对肿瘤细胞杀伤活性成正相关，且 GPC3 端二价分子强于单价分子。

表 10. 抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体对不同抗原表达细胞杀伤

抗体编号	$\gamma\delta$ T 杀伤（EC ₅₀ , nM）							
	HepG2		Huh-7		MKN-45		DLD-1	
	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}
SDP01716	0.01	70.3%	0.06	93.8%	0.004	10.3%	-	-
SDP01696	0.06	70.1%	0.21	50.9%	0.024	11.0%	-	-
SDP01704	0.03	72.0%	0.11	61.7%	0.016	6.6%	-	-
hIgG1	-	-	-	-	-	-	-	-

注：- 为没有检测到杀伤活性。

实施例 11. 抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体对不同 PBMC 供体来源 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤的影响

本实施例使用乳酸脱氢酶（LDH）检测法评估抗体介导 $\gamma\delta$ T 细胞对表达 GPC3 的靶细胞的杀伤活性。

将 HepG2 细胞消化后用 2%血清的 RPMI1640 培养基重悬，细胞密度调整为 7×10^4 个/mL；随后以 50 μ L/孔接种于 96 孔板，并加入 50 μ L 梯度稀释后的待测抗体。每孔补 50 μ L 培养基。收集不同供体扩增的 $\gamma\delta$ T 细胞，重悬于含有 2%胎牛血清的 RPMI1640 中，调整细胞密度。以 50 μ L/孔接种于上述实验板，在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。取出细胞培养板，离心（400g，5 分钟）收集细胞培养上清，采用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒（Promega，G1780）检测 LDH 的水平。

示例性展示了 SDP01716 的结果。结果如图 5A 至图 5D、表 11 所示，SDP01716

能介导不同供体来源的 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肿瘤细胞，EC₅₀ 及最大杀伤值没有较大差异。

表 11. 抗体介导不同供体来源的 $\gamma\delta$ T 细胞对 HepG2 杀伤活性

抗体编号	对 HepG2 杀伤活性 (EC ₅₀ , nM)							
	#SC12004		#SC12392		#XC11053		#XC11061	
	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}	EC ₅₀	E _{max}
SDP01716	0.038	60.30%	0.033	68.23%	0.017	46.94%	0.054	44.95%
hIgG1	-	-	-	-	-	-	-	-

注：#SC12004、#SC12392、#XC11053、#XC11061 为不同供体来源（健康同种异体的人类外周血）扩增的 $\gamma\delta$ T 细胞，-为未检测到杀伤。

5

实施例 12. 抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体对抗原低表达细胞不同效靶比下的杀伤活性检测

本实施例使用乳酸脱氢酶(LDH)检测法评估抗体介导 $\gamma\delta$ T 细胞对低表达 GPC3 靶细胞的杀伤活性。

10 MKN-45 细胞天然低表达 GPC3。将 MKN-45 细胞消化后用 2%血清的 RPMI1640 培养基重悬，细胞密度调整为 7×10⁴ 个/mL；随后以 50 μ L/孔接种于 96 孔板，并加入 50 μ L 梯度稀释后的待测抗体。每孔补 50 μ L 培养基。收集 $\gamma\delta$ T 细胞，重悬于含有 2%胎牛血清的 RPMI1640 中，调整细胞密度。以 50 μ L/孔接种于上述实验板，最终效靶比（ $\gamma\delta$ T 细胞：MKN-45 细胞）为 1:1；10:1；30:1。在 37℃、
15 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。取出细胞培养板，离心（400g，5 分钟）收集细胞培养上清，采用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒（Promega，G1780）检测 LDH 的水平。具体操作参考试剂说明书。

示例性展示了 SDP01716 的结果。如图 6A 所示，1:1 低效靶比时，SDP01716 对抗原低表达细胞杀伤活性弱，最大杀伤值为 17%；如图 6B 所示，提升效靶比到
20 10:1 后，SDP01716 能够增强对抗原低表达细胞的杀伤活性，最大杀伤达到 64%；如图 6C 所示，当效靶比提升到 30:1 时，几乎达到 100%杀伤。即，本公开的抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体能够效靶比依赖性的杀伤肿瘤靶细胞。

25 实施例 13. 提高 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞比例增强抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体的杀伤活性及细胞因子释放检测

本实施例使用乳酸脱氢酶（LDH）检测法评估抗体介导 $\gamma\delta$ T 细胞对表达 GPC3 靶细胞的杀伤活性。

HepG2 细胞天然高表达 GPC3，将 HepG2 细胞消化后用 2%血清的 RPMI1640 培养基重悬，细胞密度调整为 7×10⁴ 个/mL；随后以 50 μ L/孔接种于 96 孔板，并加

入 50 μ L 梯度稀释后的待测抗体。每孔补 50 μ L 培养基。收集 PBMC 细胞，重悬于含有 2% 胎牛血清的 RPMI1640 中，调整细胞密度。以 50 μ L/孔接种于上述实验板；或者在 PBMC 中加入 30% 的 $\gamma\delta$ T 细胞，以 50 μ L/孔接种于上述实验板，在 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。取出细胞培养板，离心（400g，5 分钟）收集细胞培养上清，采用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒（Promega, G1780）检测 LDH 的水平。同时采用试剂盒检测 IFN γ （Cisbio, S62HIFNGPEG），TNF α （Cisbio, 62HTNFAPEH）检测相应细胞因子分泌水平具体操作参考试剂说明书。

示例性展示了 SDP01716 的结果。结果如图 7A 至 7D 所示，其中，图 7A 为供体#XC11053 的 PBMC 细胞杀伤；图 7B 为供体#XC11053 的 PBMC 掺入 30% 的 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性；图 7C 为供体#SC12392 的 PBMC 细胞杀伤；图 7D 为供体#SC12392 的 PBMC 掺入 30% 的 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性。

图 7A 和图 7C 说明，SDP01716 在纯 PBMC 体系中肿瘤细胞的杀伤能力弱于同靶点 CD3 双抗 BMK-029（为 US20220348658 中的 ERY974），因为 CD3 双抗可以动用更多的 T 细胞作为效应细胞进行杀伤肿瘤；图 7B 和图 7D 说明，在 PBMC 中提高 $\gamma\delta$ T 细胞的比例可提升其杀伤活性。与此同时，与图 7A 至图 7D 对应的细胞因子释放检测结果如图 8A 至图 8D 所示，SDP01716 在杀伤肿瘤细胞时诱导更少的 IFN γ 和 TNF α 释放。

实施例 14. 抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体促进 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞增殖活性检测

本实施例使用流式细胞检测法评估抗 GPC3/ $\gamma\delta$ TCR 双特异性抗体诱导 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞增殖的活性。

取 PBMC 800 μ L（ 1×10^6 细胞）加入 24 孔板中；HepG2 细胞 PBS 洗两次后调整细胞密度 5×10^5 细胞/mL，取 1 mL 加入对应孔中；待测抗体用培养基配置成相应浓度后取 200 μ L 加入孔中。37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育，每 3 天进行板换液。6 至 7 天后细胞用 PBS 洗两遍，CD3 抗体（BD, Cat#564713），V δ 2 TCR 抗体（BD, Cat#555739），V γ 9 TCR 抗体（BD, Cat# 555732）染色，鉴定 $\gamma\delta$ T 细胞占比变化。

结果如图 9 所示，三个供体#XC11211、#XC11061、#XC11251 来源的 PBMC 细胞中，经 6-7 天的刺激，SDP01716、SDP01696 和 SDP01704 均能显著提升 $\gamma\delta$ T 细胞占比。

实施例 15. 小鼠的人肝癌 Huh-7 移植瘤模型验证

1. 将人肝癌 Huh-7 细胞（中科院细胞库）以 5×10^6 个/100 μ L/只接种于 NSG 小鼠（雌性，6-8 周龄，由维通利华提供）皮下并随机分组，每组 7 只，共 4 组（G1-G4），在分组当天接种肿瘤细胞，同时输注 $\gamma\delta$ T 细胞和药物，各组分别按照如下方案给

药:

- G1: 介质 G2: $\gamma\delta$ T 细胞+PBS
- G3: $\gamma\delta$ T 细胞+SDP01716 (3 mg/kg)
- G4: $\gamma\delta$ T 细胞+SDP01716 (0.3 mg/kg)

5 之后每周输注 $\gamma\delta$ T 细胞和给药 1 次。给药和观察期间每周测量 2 次肿瘤体积，并记录测量值。计算公式如下（下同）：

计算肿瘤体积（tumor volume, TV）= $1/2\times a\times b^2$ ，其中 a, b 分别代表测量肿瘤的长径和短径；

相对肿瘤增值率 $T/C\%=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100$ ；

10 抑瘤率 $TGI\%=1-T/C\%$ 。

结果见图 10A、图 10B 和表 12 所示， $\gamma\delta$ T 细胞单用组（G2）的 TGI 为 11%，抑制肿瘤生长作用有限；SDP01716 能剂量依赖性抑制肿瘤生长，3mpk 剂量下 TGI 达到 58%，且各给药组均未对小鼠体重产生显著影响。

表 12. SDP01716 在 Huh-7 移植瘤模型中的抗肿瘤活性

组别	$\gamma\delta$ T 细胞接种	待测药物	给药剂量	给药途径/频率	肿瘤体积 (mm ³)	TGI (%)
G1	PBS	PBS	/	ip, qw	536.6±60	-
G2	1E7 $\gamma\delta$ T 细胞/针， iv,qw	PBS	/		472.1±78	11
G3		SDP01716	3mpk		238.4±29	58**
G4		SDP01716	0.3mpk		302.2±32	45*

15 注：*代表 P<0.05; **代表 P<0.01。

2. 将 Huh-7 细胞以 5×10^6 个/100 μ L/只接种于 NSG 小鼠（雌性，6-8 周龄，由集萃药康提供）皮下并随机分组，每组 7 只，共 6 组，在分组当天接种肿瘤细胞，同时输注 $\gamma\delta$ T 细胞和药物，各组分别按照如下方案给药：

- 20 G1: 介质
- G2: $\gamma\delta$ T 细胞
- G3: $\gamma\delta$ T 细胞+SDP01716 (3 mg/kg)
- G4: $\gamma\delta$ T 细胞+SDP01696 (3.9 mg/kg)
- G5: $\gamma\delta$ T 细胞+SDP01704 (5.1 mg/kg)。

25 之后每周输注 $\gamma\delta$ T 细胞和给药 1 次，如是 $\gamma\delta$ T 细胞和抗体联用，则是同时给药。给药和观察期间每周测量 2 次肿瘤体积，并记录测量值。

结果见图 11A、图 11B 和表 13 所示，本公开的双抗均能够有效抑制肿瘤，各给药组小鼠均未出现体重的明显改变。

表 13. 双抗在 Huh-7 移植瘤模型中的抗肿瘤活性

组别	$\gamma\delta$ T 细胞接种	待测药物	给药剂量	给药途径/频率	肿瘤体积 (mm ³)	TGI (%)
G1	PBS	PBS	/	ip, qw	576.7±89	-
G2	1E7 $\gamma\delta$ T 细胞/针, iv,qw	PBS	/		579.0±79	-3
G3		SDP01716	3mpk		149.2±57	74**
G4		SDP01696	3.9mpk		296.5±60	49
G5		SDP01704	5.1mpk		217.6±69	64**

注： **代表 P<0.01。

权利要求书

1. GPC3/TRGV9 结合蛋白，其包含：
特异性结合 GPC3 的第一抗原结合结构域；和
5 特异性结合 TRGV9 的第二抗原结合结构域，其中，
其中：
所述第一抗原结合结构域包含重链可变区（VH1）和轻链可变区（VL1），
所述 VH1 包含 SEQ ID NO：39 所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和
HCDR3，
10 所述 VL1 包含 SEQ ID NO：40 所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和
LCDR3，
所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；
优选地，所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的；
优选地，所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：
15 41-43 所示，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：
44-46 所示。
2. 如权利要求 1 所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白，所述第二抗原结合结构域包
含免疫球蛋白单一可变结构域，或包含重链可变区（VH2）和轻链可变区（VL2），
20 其中，
所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO：29、26-28、5 任一所示氨
基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
所述 VH2 包含 SEQ ID NO：31、9、30、32 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、
HCDR2 和 HCDR3，所述 VL2 包含 SEQ ID NO：34、10、33、35 任一所示氨基酸
25 序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，
所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；
优选地，所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的；
优选地，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含分别如 SEQ ID NO：6-8 所示氨
基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
30 所述 VH2 的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：
11-13 所示，所述 VL2 的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID
NO：14-16 所示。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白，其中，
35 所述免疫球蛋白单一可变结构域、所述重链可变区和/或所述轻链可变区为人
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；
优选地，所述免疫球蛋白单一可变结构域在人源化改造过程使用的人种系模
板的框架区源自 IGHV3-64；
40 优选地，所述 VH2 在人源化改造过程使用的人种系模板的框架区源自

IGHV3-21, 和/或所述 VL2 在人源化改造过程使用的人种系模板的框架区源自 IGKV1-12。

4. 如权利要求 1 至 3 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其中,

5 所述第一抗原结合结构域中的 VH1 包含如 SEQ ID NO: 39 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL1 包含如 SEQ ID NO: 40 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1 至 4 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其中,

10 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 29、26-28、5 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列;

所述第二抗原结合结构域中的 VH2 包含如 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列, VL2 包含如 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

15

6. 如权利要求 1 至 5 任一项所述的 GPC3/TRGV9 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 区是人 IgG1 的 Fc 区;

20 最优选地, 所述 Fc 区是包含 L234F 和/或 L235E 突变的 IgG1 的 Fc 区。

7. 如权利要求 6 所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其中, 所述 Fc 区包含第一亚基和第二亚基;

优选地, 所述 Fc 区的第一亚基和第二亚基包含 knob-into-hole 突变;

25 优选地, 所述 Fc 区的第一亚基含有 366 位突变, 第二亚基含有选自 366、368 或 407 位的突变或其任意组合; 所述 Fc 区的第一亚基含有 354 或 356 位突变, 第二亚基含有 349 位突变; 或

所述 Fc 区的第一亚基含有 354 或 356 位突变, 第二亚基含有 349、366、368 或 407 位突变或其任意组合;

30 更优选地, 所述 Fc 区的第一亚基含有 366W 突变, 第二亚基含有选自 366S、368A 和 407V 的突变或其任意组合; 所述 Fc 区的第一亚基含有 354C 或 356C 突变, 第二亚基含有 349C 突变; 或所述 Fc 区的第一亚基含有 354C/366W 突变, 第二亚基含有 349C/366S/368A/407V 突变;

突变位点的编码规则为 Eu 编码。

35

8. 如权利要求 1 至 7 任一项所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其还含有连接子;

优选地, 所述连接子如 $(G_mS_n)_h$ 或 $(G_mQ_n)_h$ 或 $(GGNGT)_h$ 或 $(YGNGT)_h$ 或 $(EPKSS)_h$ 或 $(A_mS_n)_h$ 所示, 其中, m、n 各自独立地选自 1-8 的整数, h 独

立地选自 1-20 的整数；

更优选地，所述连接子为 A₃S 或 G₄S。

9. 如权利要求 1 至 8 任一项所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白，其包含选自 (1) -
5 (3) 任一组的多肽链：

(1) 第一重链、第二重链和轻链，其中，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[免疫球蛋白单一可变结构域]-[连接子
1]-[Fc1]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 2]-[CH1]-[连接子 3]-[Fc2]，

10 轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 4]-[CL]；

其中，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3 和连接子 4 可以相同或不相同，可以
独立的存在或不独立存在，可以独立的选自权利要求 8 所限定的连接子；

优选地，连接子 1 为 AAAS，连接子 2、连接子 3 和连接子 4 不存在；

(2) 第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中，

15 第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接
子 2]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[连接子 3]-[Titin-T 链]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[Fc2]，

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 6]-[CL]；

20 或，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接
子 2]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 3]-[Titin-T 链]，

第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[Fc2]，

25 第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[连接子 6]-[CL]；

其中，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 和连接子 6
可以相同或不相同，可以独立的存在或不独立存在，可以独立的选自权利要求 8 限定的
连接子；

30 优选地，连接子 1、连接子 3 为 G₄S，连接子 2、连接子 4、连接子 5、连接子
6 不存在；

(3) 第一重链、第一轻链、第二重链和第二轻链，其中，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH2]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接
子 2]-[Fc1]，

第一轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL2]-[连接子 3]-[Titin-T 链]，

35 第二重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子
5]-[VH1]-[连接子 6]-[CH1]-[连接子 7]-[Fc2]，

第二轻链，其从 N 端到 C 端依次为：[VL1]-[连接子 8]-[CL]；

或，

第一重链，其从 N 端到 C 端依次为：[VH1]-[连接子 1]-[Obscurin-O 链]-[连接

子 2]-[Fc1],

第一轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL1]-[连接子 3]-[Titin-T 链],

第二重链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VH2]-[连接子 4]-[CH1]-[连接子 5]-[VH2]-[连接子 6]-[CH1]-[连接子 7]-[Fc2],

5 第二轻链, 其从 N 端到 C 端依次为: [VL2]-[连接子 8]-[CL];

其中, 所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5、连接子 6、连接子 7、连接子 8、连接子 9、连接子 10 可以相同或不相同, 可以独立的存在或不存在, 可以独立的选自权利要求 8 所述的连接子;

10 优选地, 连接子 1、连接子 3 为 G_4S , 连接子 5 为 $(G_4S)_2$, 连接子 2、连接子 4、连接子 6、连接子 7 和连接子 8 不存在;

以上 (1) - (3) 中, -表示肽键,

优选地, 所述 Obscurin-O 链和 Titin-T 链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 47、48 所示;

15 优选地, 所述 CL 为 C_k , 所述 CH1 和 C_k 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 49、50 所示;

优选地, 所述 Fc1 和 Fc2 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 52、53 所示。

10. 如权利要求 1 至 9 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其包含选自(1) - (3) 任一组的多肽链:

20 (1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的轻链;

25 (2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一轻链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二轻链; 或,

30 (3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第一轻链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二重链, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的第二轻链;

优选地, 所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白包含选自 (1) - (3) 任一组的多肽链:

35 (1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54-56 所示的多肽链;

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56-59 所示的多肽链;

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57、58、60、61 所示的多肽链;

更优选地, 所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白包含选自 (1) - (3) 任一组的多肽链:

(1) 摩尔比为 1: 1: 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54-56 所示的多肽链;

(2) 摩尔比为 1: 1: 1: 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56-59 所示的多肽链;

(3) 摩尔比为 1: 1: 1: 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57、58、60、61 所示的多肽链。

5 11. 如权利要求 1 至 10 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白, 其为抗体或其抗原结合片段, 优选为抗 GPC3/TRGV9 抗体或其抗原结合片段。

12. TRGV9 结合蛋白, 其包含:

10 (1) 免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 29、26-28、5 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 优选地, 包含 SEQ ID NO: 6-8 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 或,

(2) 重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

15 所述 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。

13. 如权利要求 12 所述的 TRGV9 结合蛋白, 所述免疫球蛋白单一可变结构域、VH 和/或 VL 为人源化、回复突变、亲和力成熟、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;

20 优选地, 所述免疫球蛋白单一可变结构域在人源化改造过程使用的人种系模板的框架区源自 IGHV3-64;

25 优选地, 所述 VH 在人源化改造过程使用的人种系模板的框架区源自 IGHV3-21, 和/或所述 VL 在人源化改造过程使用的人种系模板的框架区源自 IGKV1-12。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的 TRGV9 结合蛋白, 其中,

(1) 免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 29、26-28、5 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列; 或,

30 (2) VH 和 VL, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 9、30-32 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 10、33-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 同一性的氨基酸序列;

优选地, 所述 TRGV9 结合蛋白是抗 TRGV9 抗体或其抗原结合片段;

35 更优选地, 当所述 TRGV9 结合蛋白包含免疫球蛋白单一可变结构域时, 其是抗 TRGV9 单域抗体或 VHH。

15. 如权利要求 12 至 14 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白, 其还包含免疫球蛋白 Fc 区;

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

区更优选为人 IgG1 的 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是包含 L234F 和/或 L235E 突变的 IgG1 的 Fc 区。

16. 如权利要求 12 至 15 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白，其进一步包含肿瘤
5 相关抗原（TAA）结合结构域、或肿瘤特异性抗原结合结构域，优选为特异性结
合 GPC3 的抗原结合结构域。

17. 如权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白或权利要求 12
至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白，其具有选自（a）-（d）任一项或多项的性
10 质或功能：

（a）特异性结合 TCR 的 $\gamma 9$ 链，优选地，特异性结合 $\gamma 9\delta 1$ TCR、 $\gamma 9\delta 2$ TCR；

（b）检测不到和 TCR 的 $\gamma 8$ 链结合，优选地，检测不到和 $\gamma 8\delta 2$ TCR 结合；

（c）特异性结合 TCR 的 $\gamma 9$ 链的可变区（TRGV9）；

（d）特异性结合 $V\gamma\delta C\alpha\beta$ 嵌合 TCR，检测不到和 $V\alpha\beta C\gamma\delta$ 嵌合 TCR 结合。

15

18. 多核苷酸，其编码权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白
或权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白，或其组合；

优选地，所述多核苷酸为 DNA 或 RNA。

20

19. 载体，其包含权利要求 18 所述的多核苷酸，

优选地，所述载体表达权利要求 18 所述的多核苷酸。

20. 宿主细胞，其含有或表达权利要求 18 所述的多核苷酸或权利要求 19 所述
的载体。

25

21. 制备权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白或权利要求 12
至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白的方法，包括：

在权利要求 20 所述的宿主细胞中表达权利要求 18 所述的多核苷酸或权利要求
19 所述的载体，以及从所述宿主细胞中分离表达的 GPC3/TRGV9 结合蛋白或
30 TRGV9 结合蛋白；

可选地，进一步包含纯化所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白或 TRGV9 结合蛋白的步
骤。

22. 药物组合物，其包含权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋
35 白、权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白、权利要求 18 所述的多核
苷酸和/或权利要求 19 所述的载体；

优选地，所述药物组合物进一步包含 T 细胞，所述 T 细胞优选为 $\gamma\delta$ T 细胞；

优选地，所述药物组合物进一步包含一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或辅
料。

40

23. 组合或者药盒，其包含：

- (1) 权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白和 T 细胞，或
- (2) 权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白和 T 细胞；

所述 T 细胞优选为 $\gamma\delta$ T 细胞。

5

24. 权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白、权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白、权利要求 18 所述的多核苷酸、权利要求 19 所述的载体、权利要求 23 的组合或者药盒在制备治疗疾病的药物中的用途；

所述疾病优选为癌症，

10 更优选为肝癌或 GPC3 阳性癌症，最优选为 GPC3 阳性肝癌。

25. 权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白、权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白、权利要求 18 所述的多核苷酸、权利要求 19 所述的载体在制备治疗疾病的药物中的用途，其中：

15 所述 GPC3/TRGV9 结合蛋白、所述 TRGV9 结合蛋白、所述多核苷酸、或所述载体与 T 细胞联用；

所述 T 细胞优选为 $\gamma\delta$ T 细胞；

所述疾病优选为癌症，更优选为肝癌或 GPC3 阳性癌症，最优选为 GPC3 阳性肝癌。

20

26. T 细胞用于制备治疗疾病的药物中的用途，其中：

所述 T 细胞与权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白、权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白、权利要求 18 所述的多核苷酸、或权利要求 19 所述的载体联用；

25 所述 T 细胞优选为 $\gamma\delta$ T 细胞；

所述疾病优选为癌症，更优选为肝癌或 GPC3 阳性癌症，最优选为 GPC3 阳性肝癌。

27. 治疗或缓解疾病的方法，包括向有需要的受试者施用治疗或缓解有效量的权利要求 1 至 11 任一项所述的 GPC3/TRGV9 结合蛋白、权利要求 12 至 16 任一项所述的 TRGV9 结合蛋白、权利要求 18 所述的多核苷酸、权利要求 19 所述的载体、权利要求 22 的药物组合物或权利要求 23 的组合或者药盒；

所述疾病优选为癌症，更优选为肝癌或 GPC3 阳性癌症，最优选为 GPC3 阳性肝癌。

35

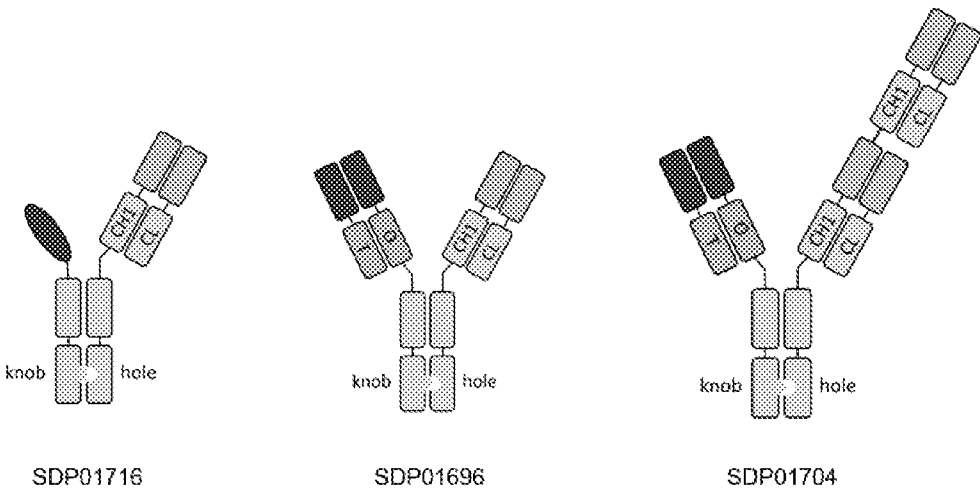


图 1

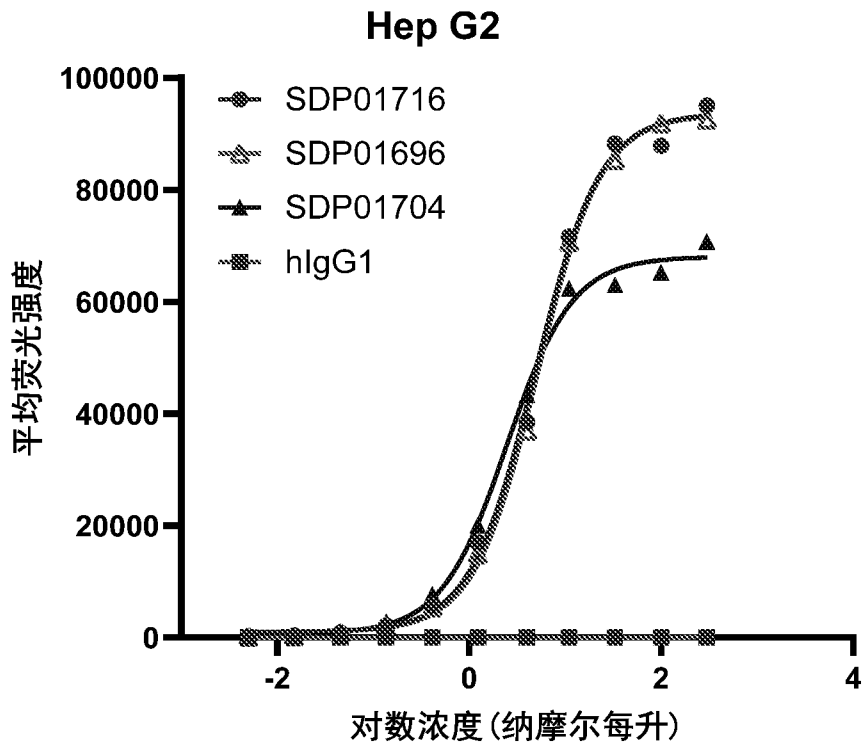


图 2A

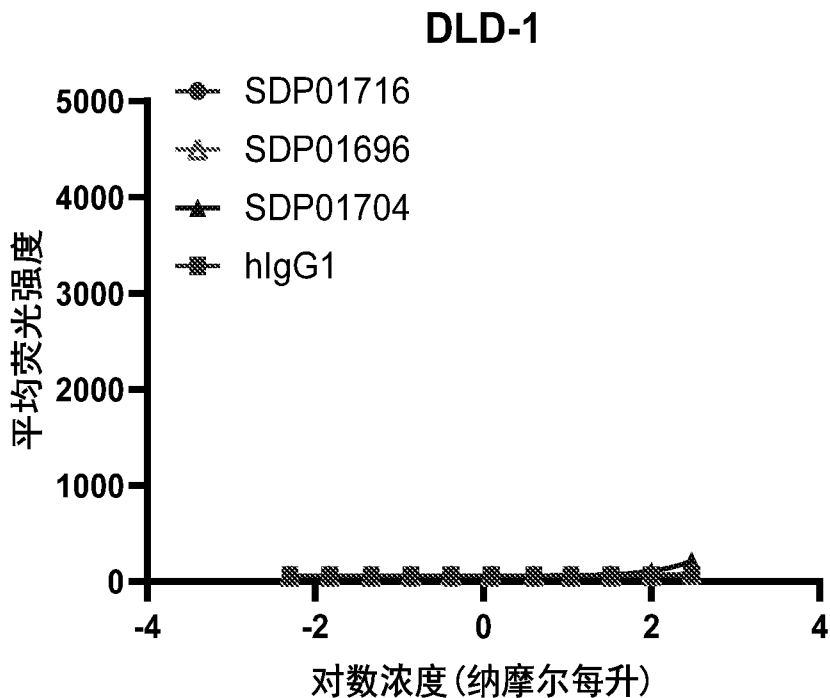


图 2B

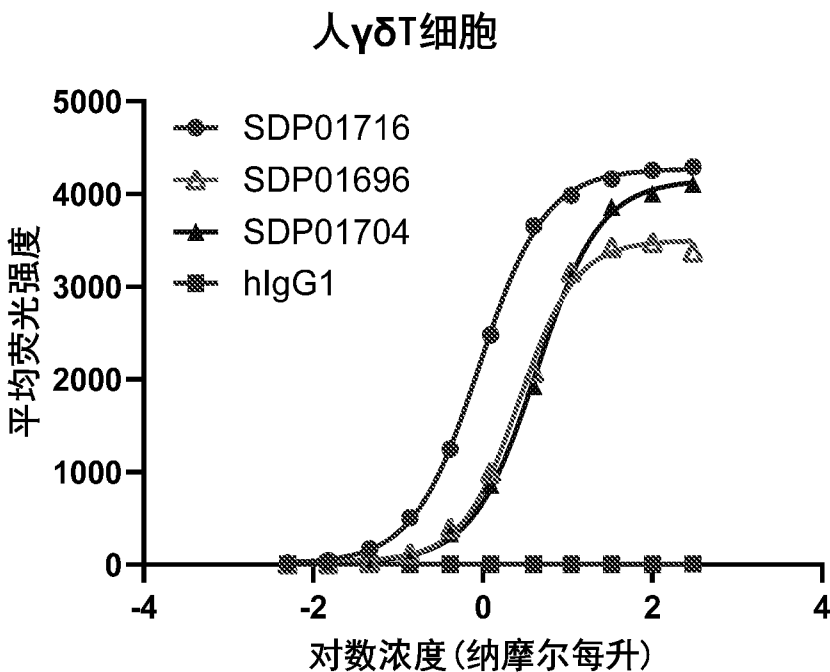


图 2C

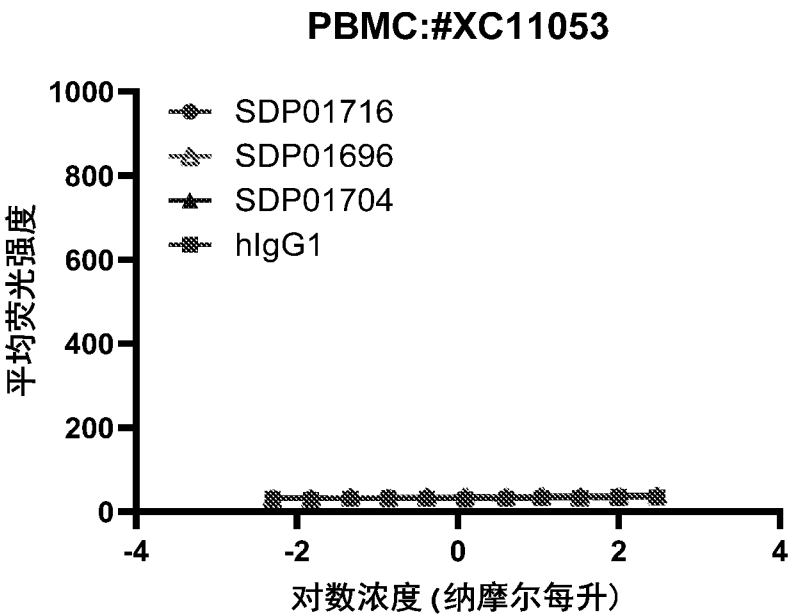


图 2D

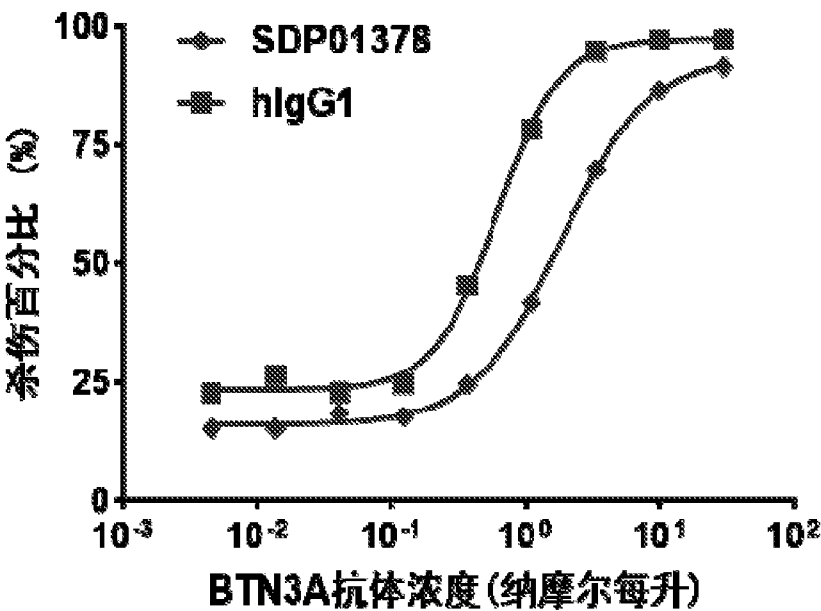


图 3A

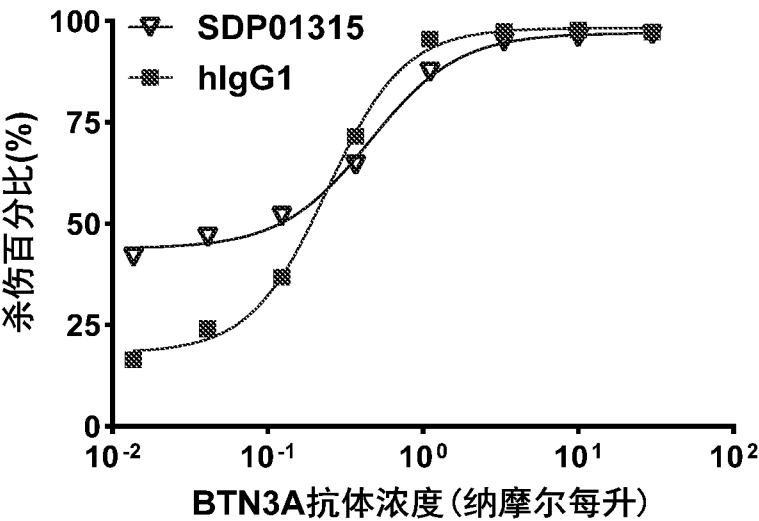


图 3B

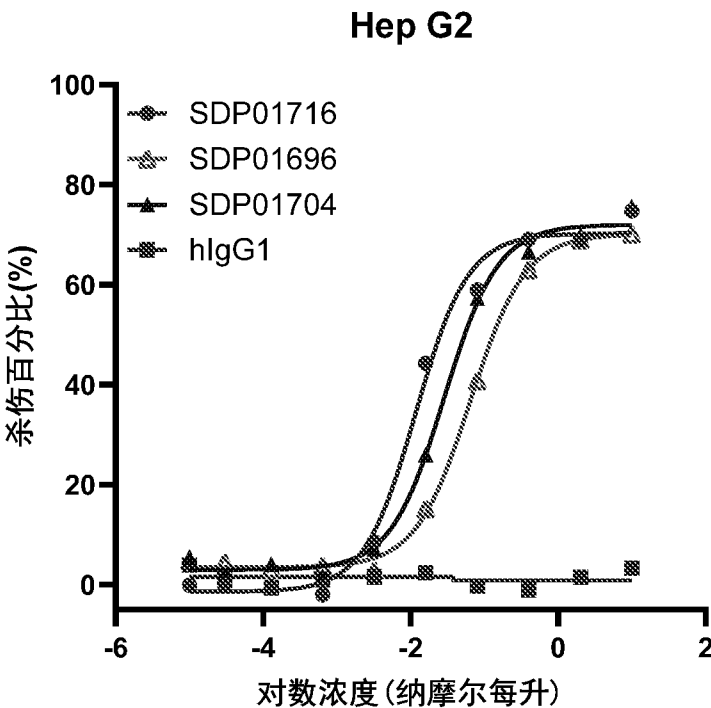


图 4A

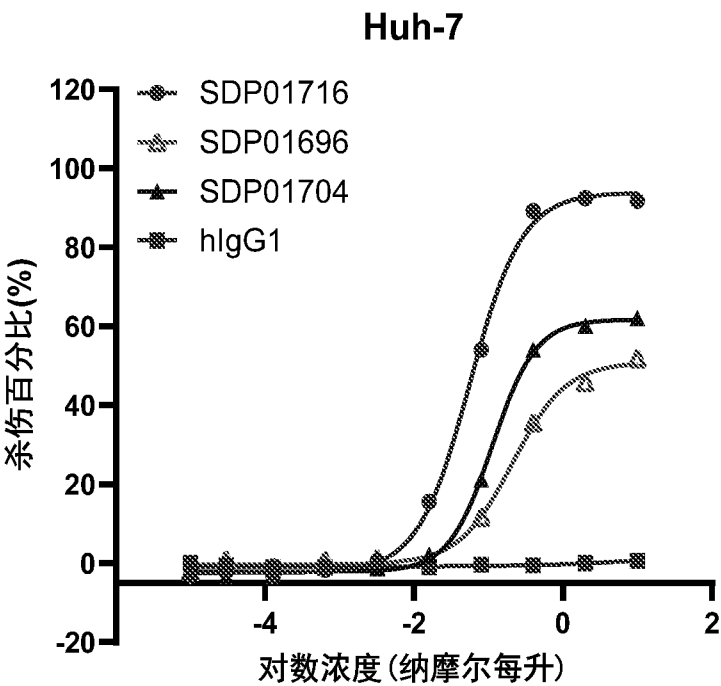


图 4B

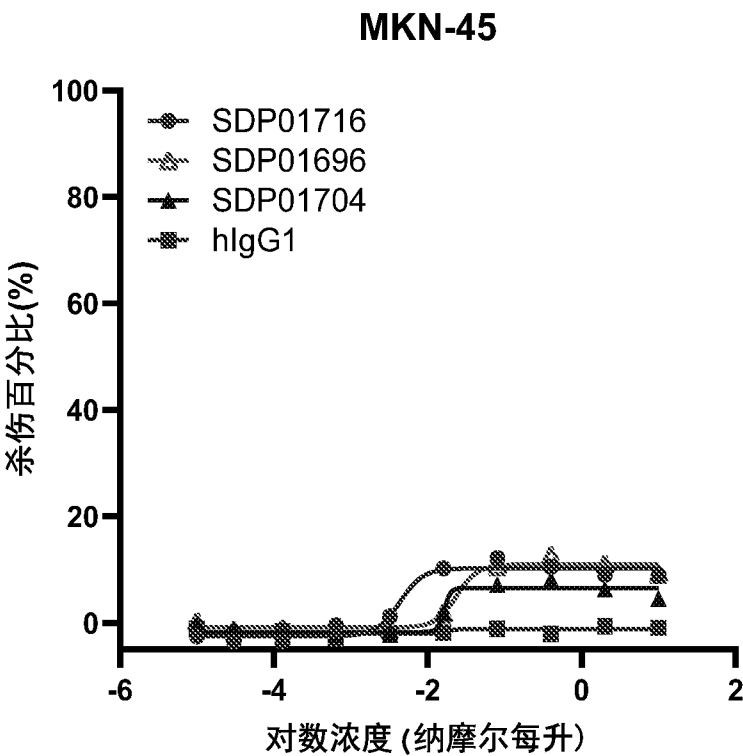


图 4C

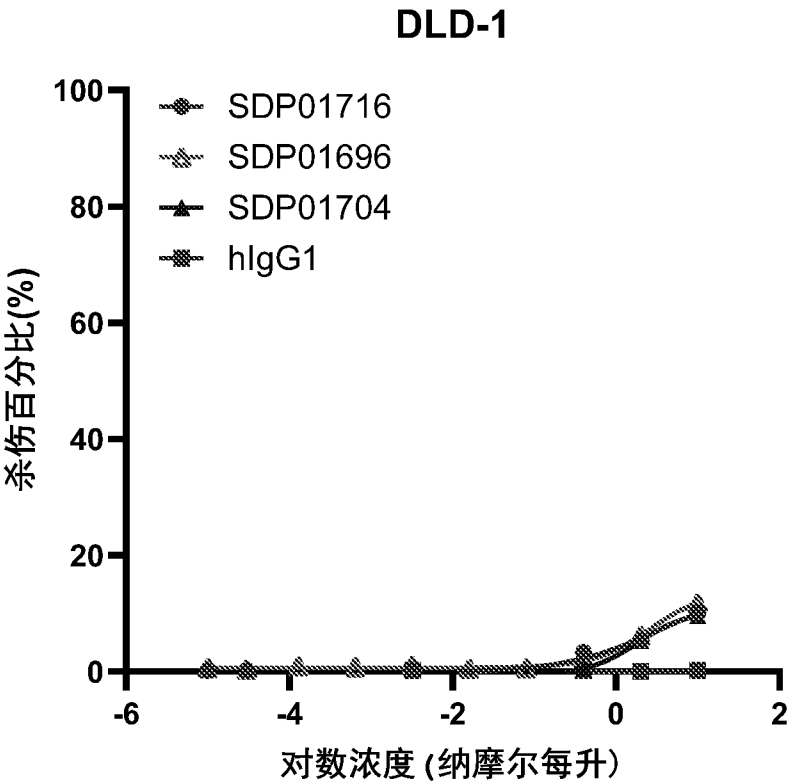


图 4D

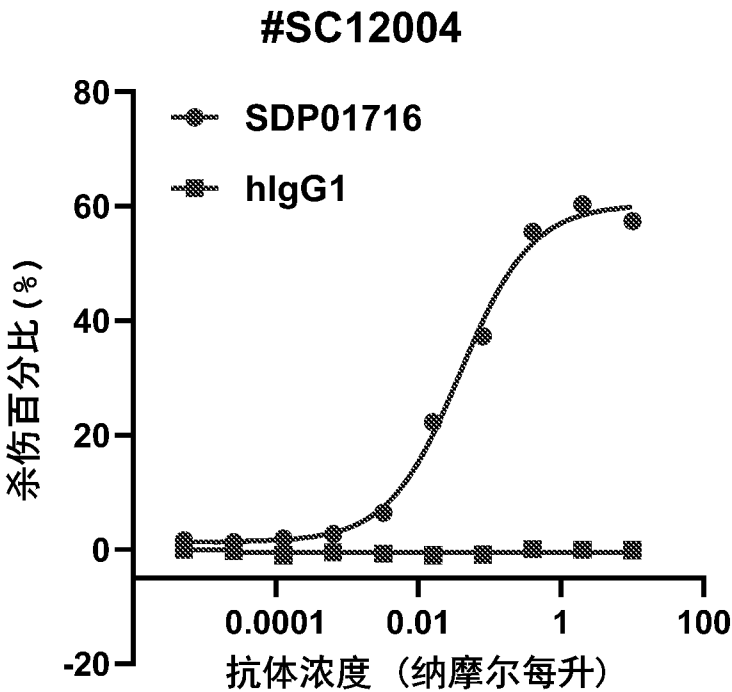


图 5A

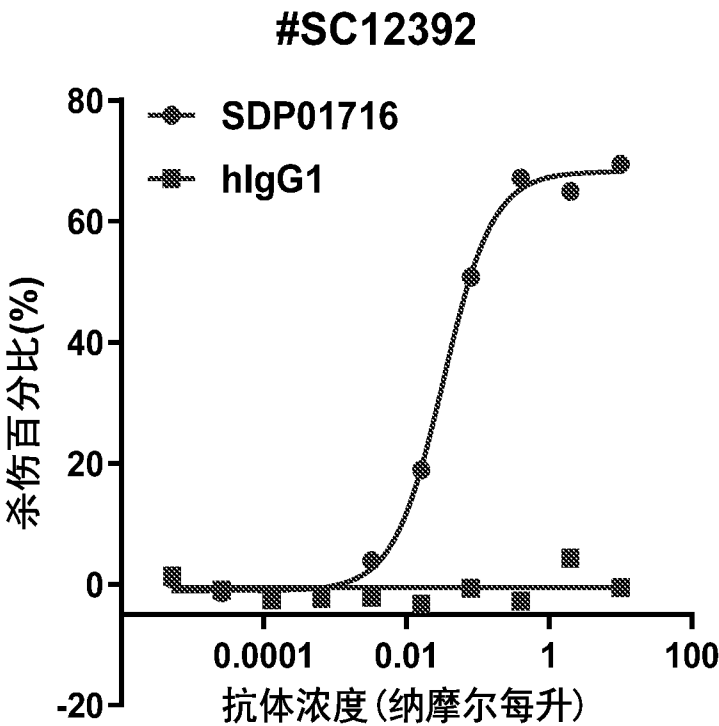


图 5B

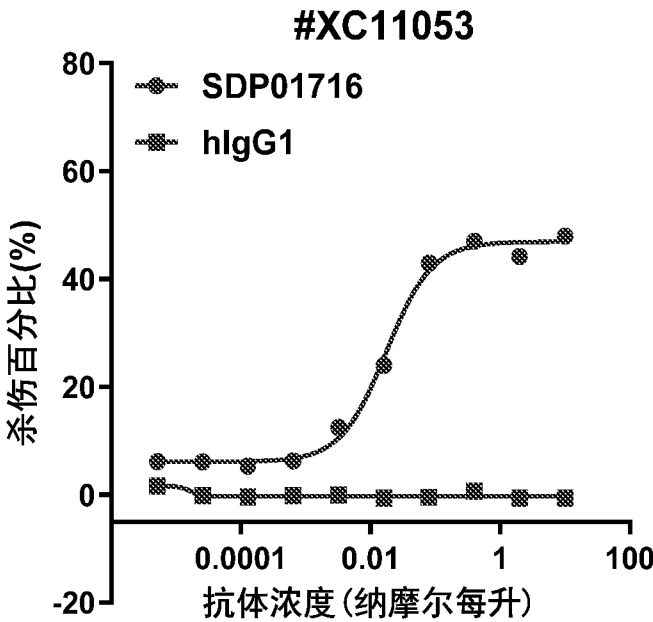


图 5C

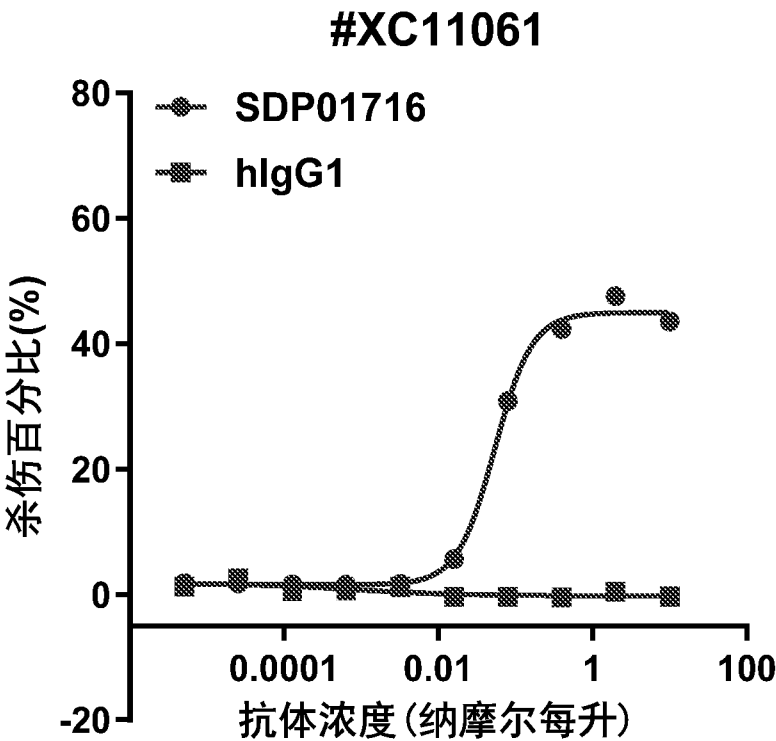


图 5D

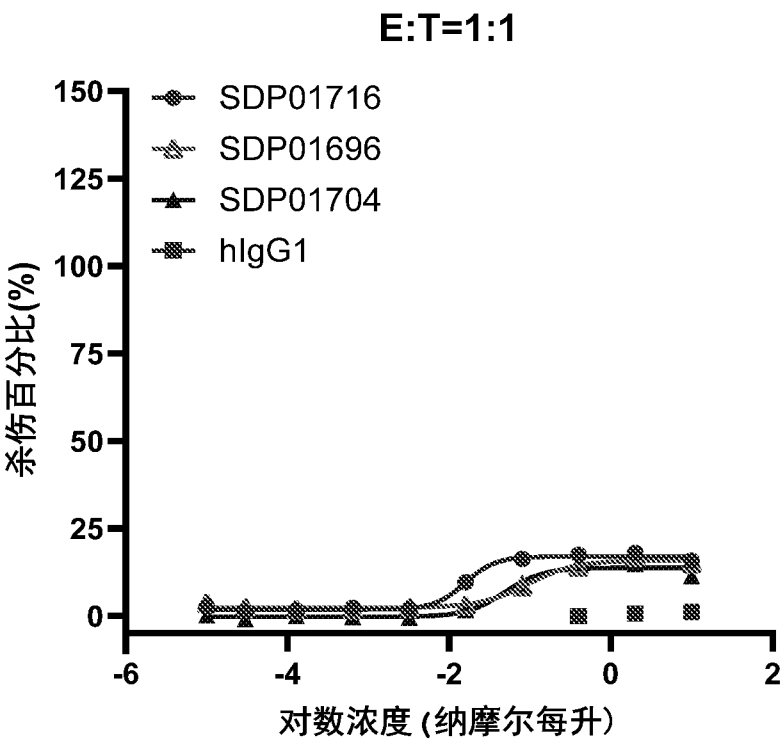


图 6A

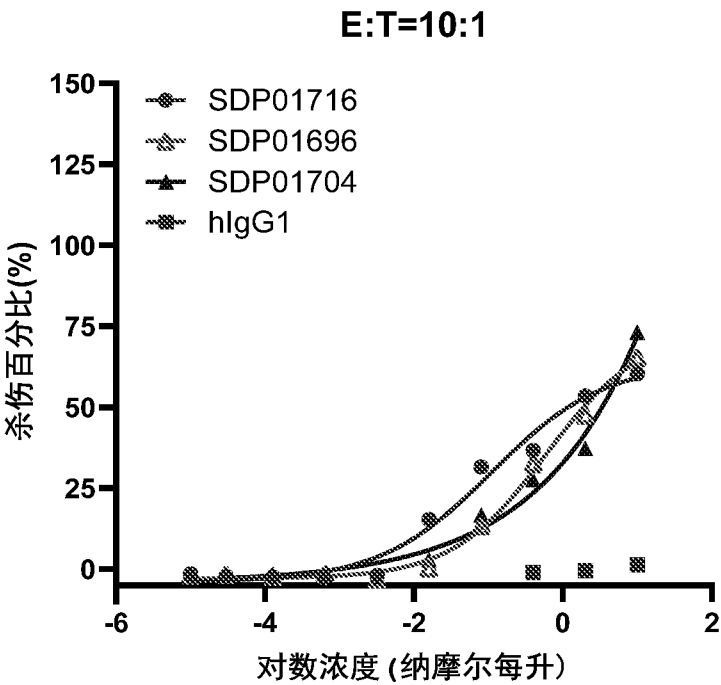


图 6B

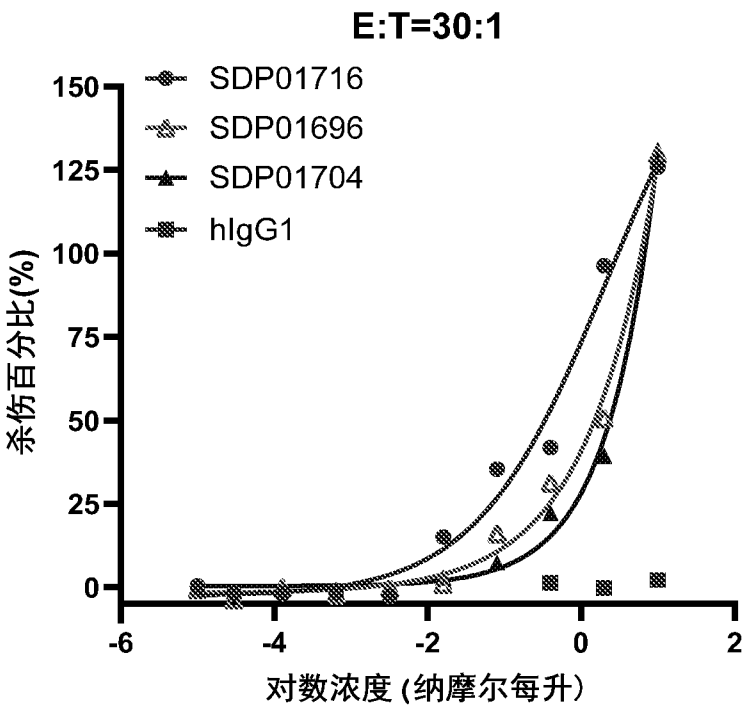


图 6C

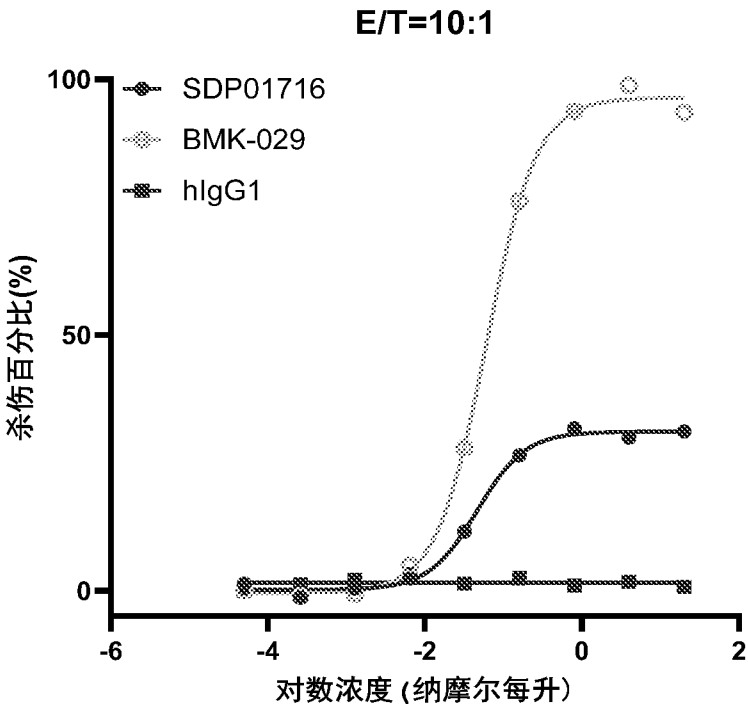


图 7A

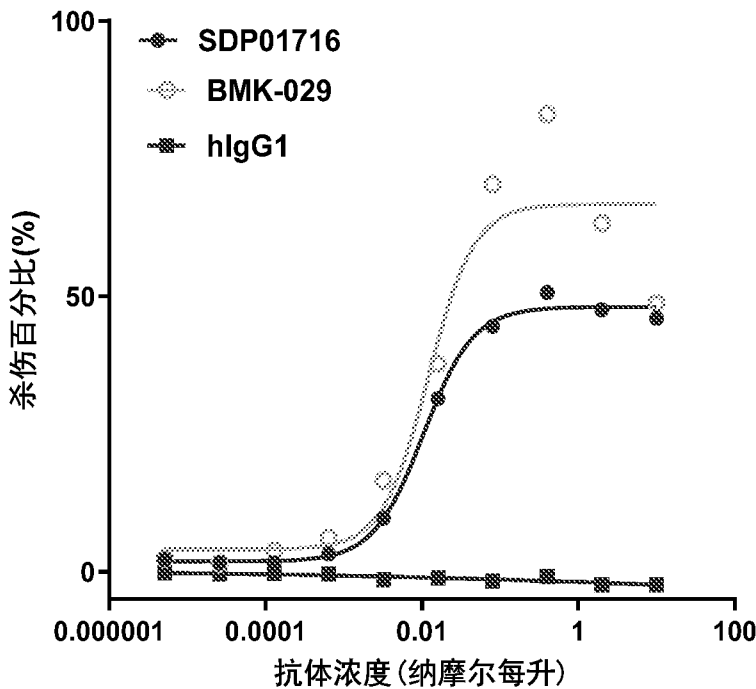


图 7B

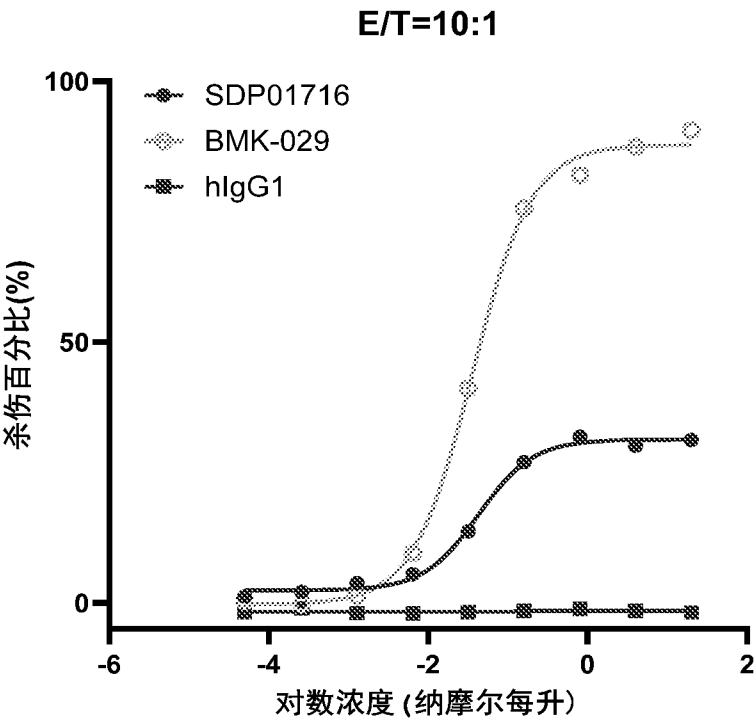


图 7C

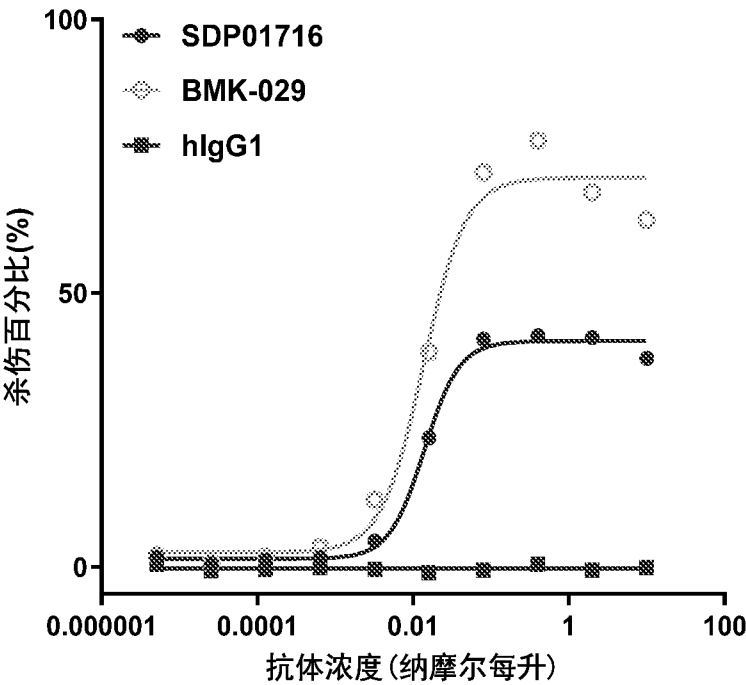


图 7D

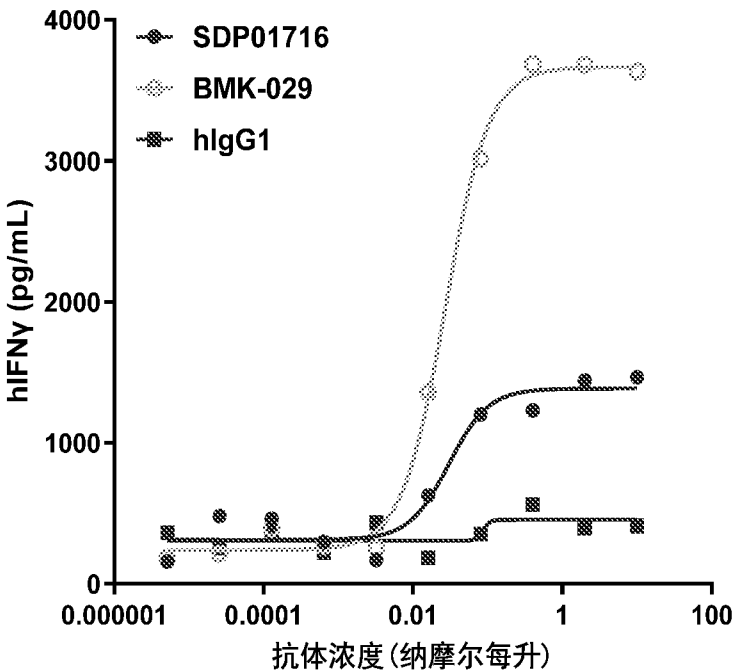


图 8A

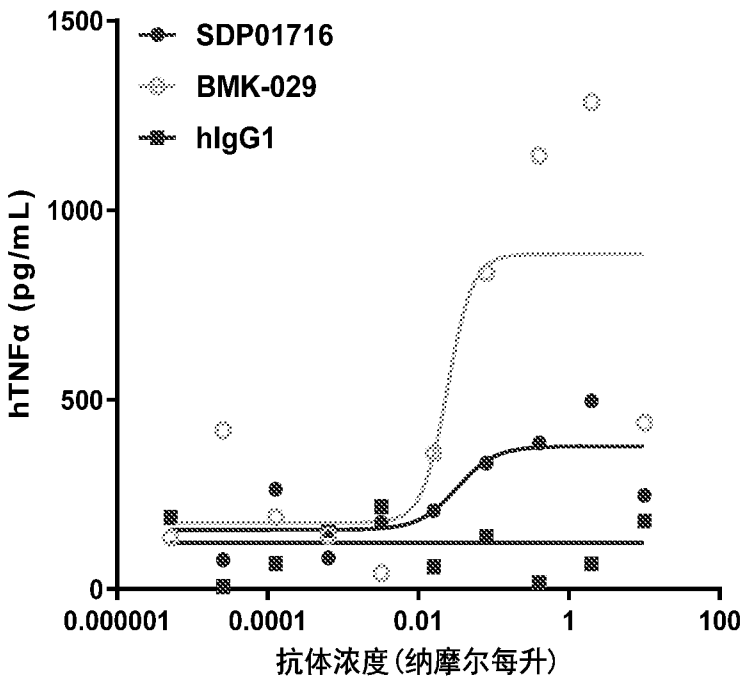


图 8B

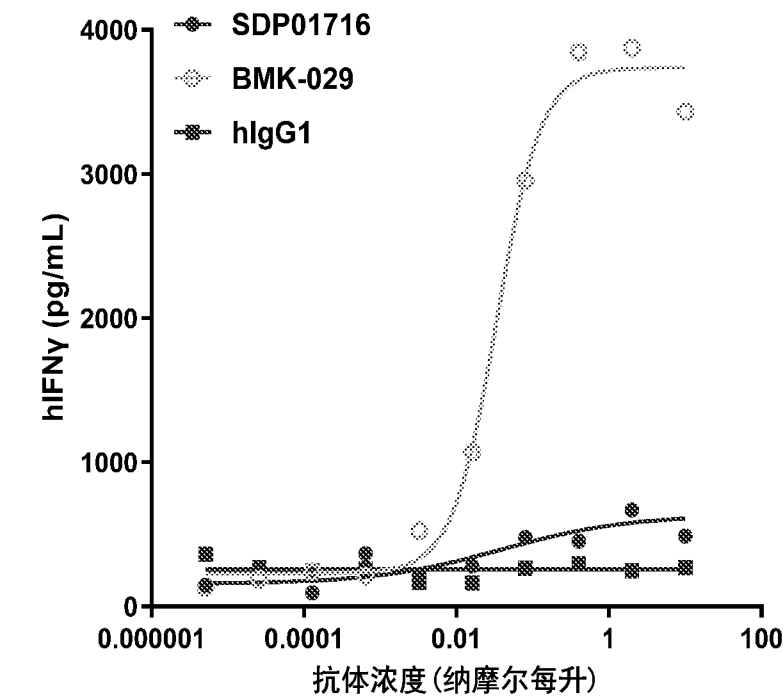


图 8C

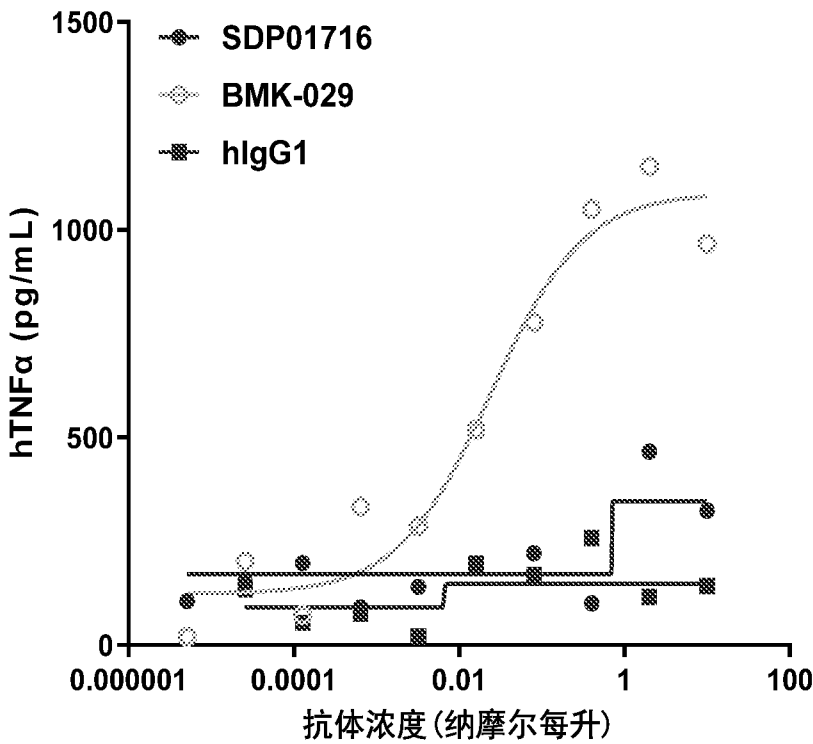


图 8D

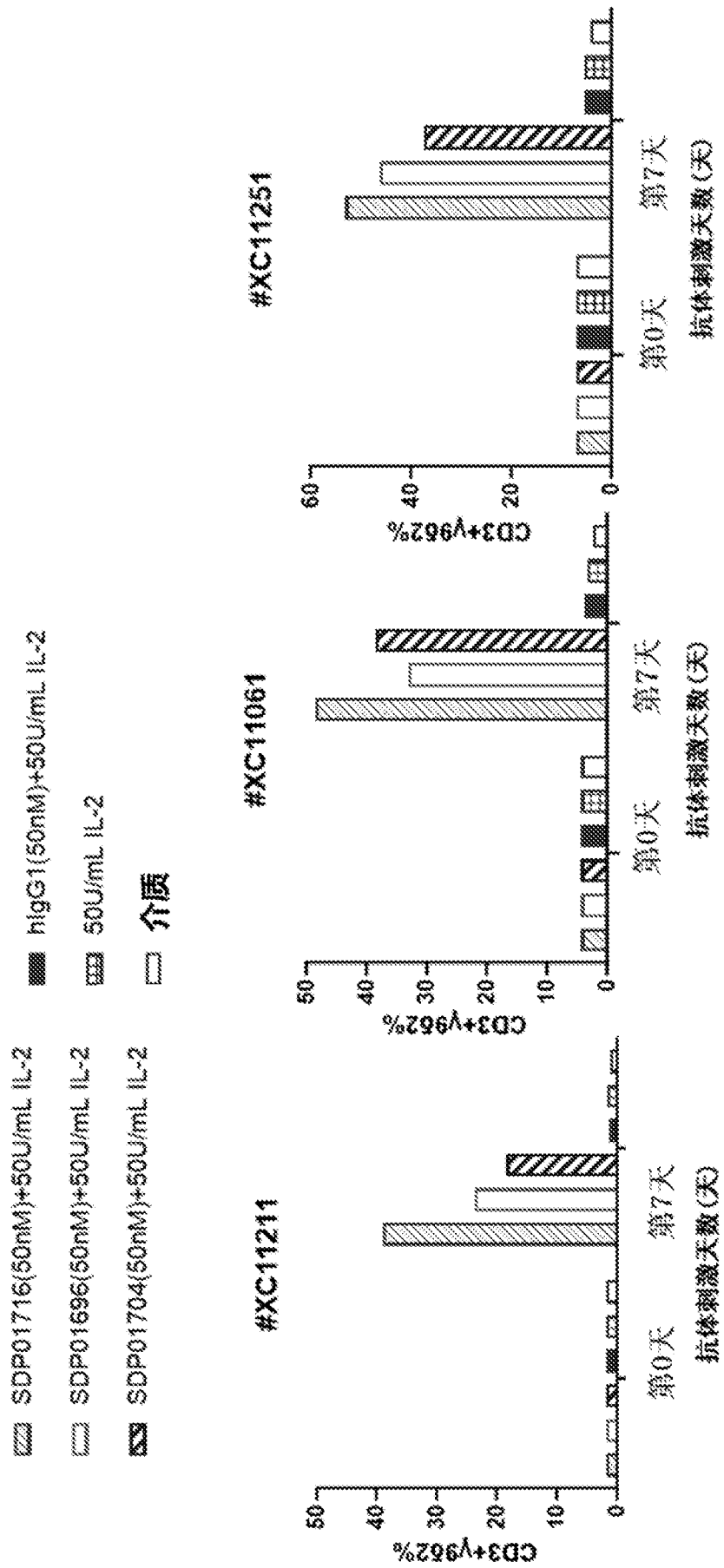


图 9

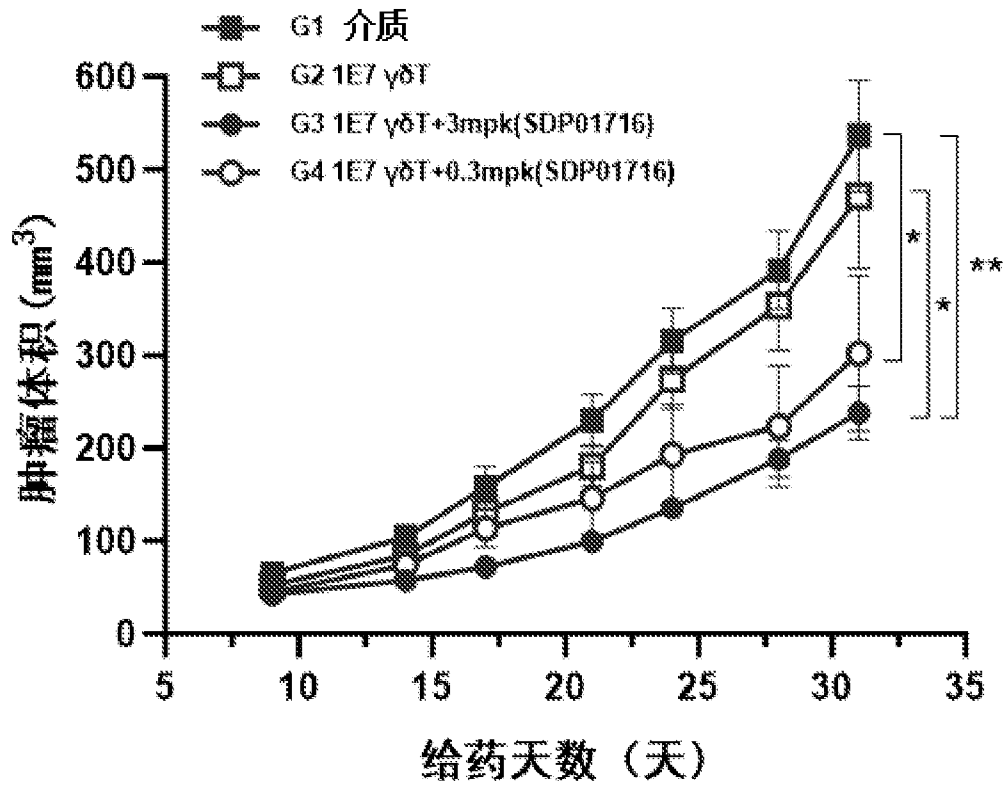


图 10A

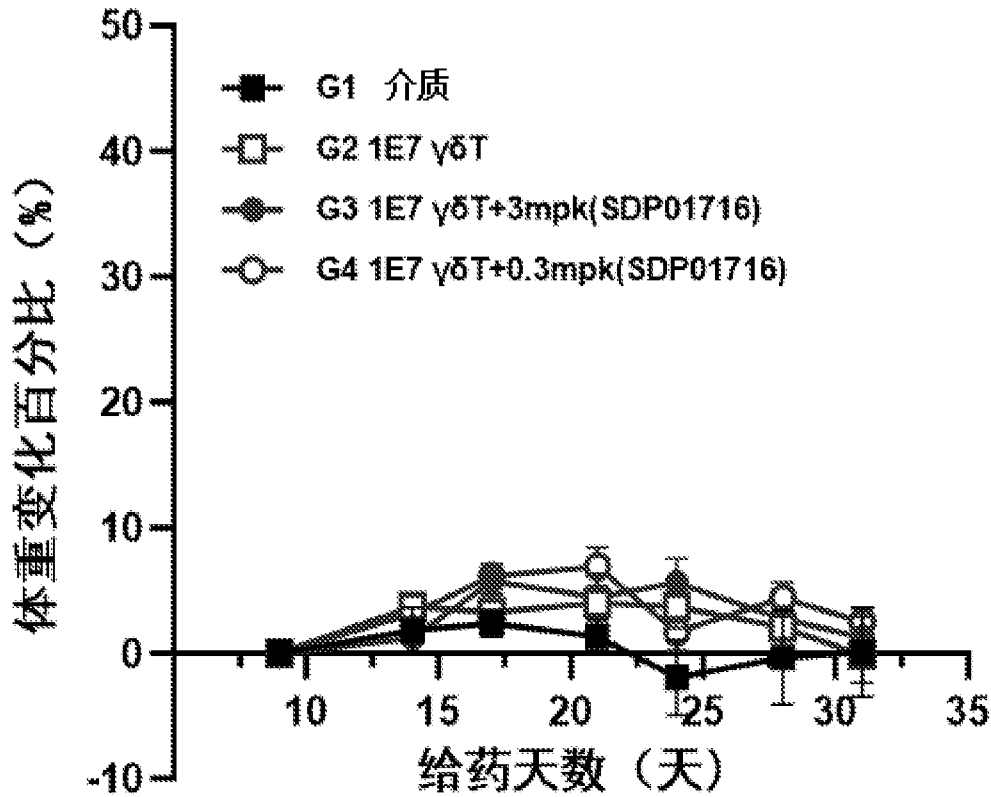


图 10B

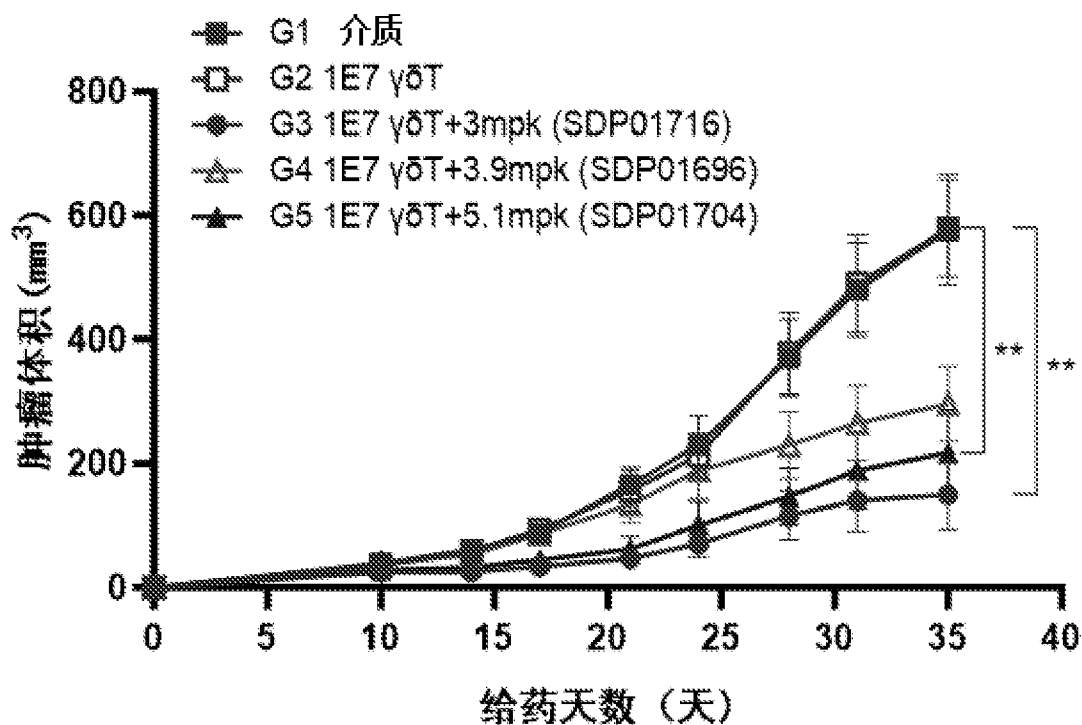


图 11A

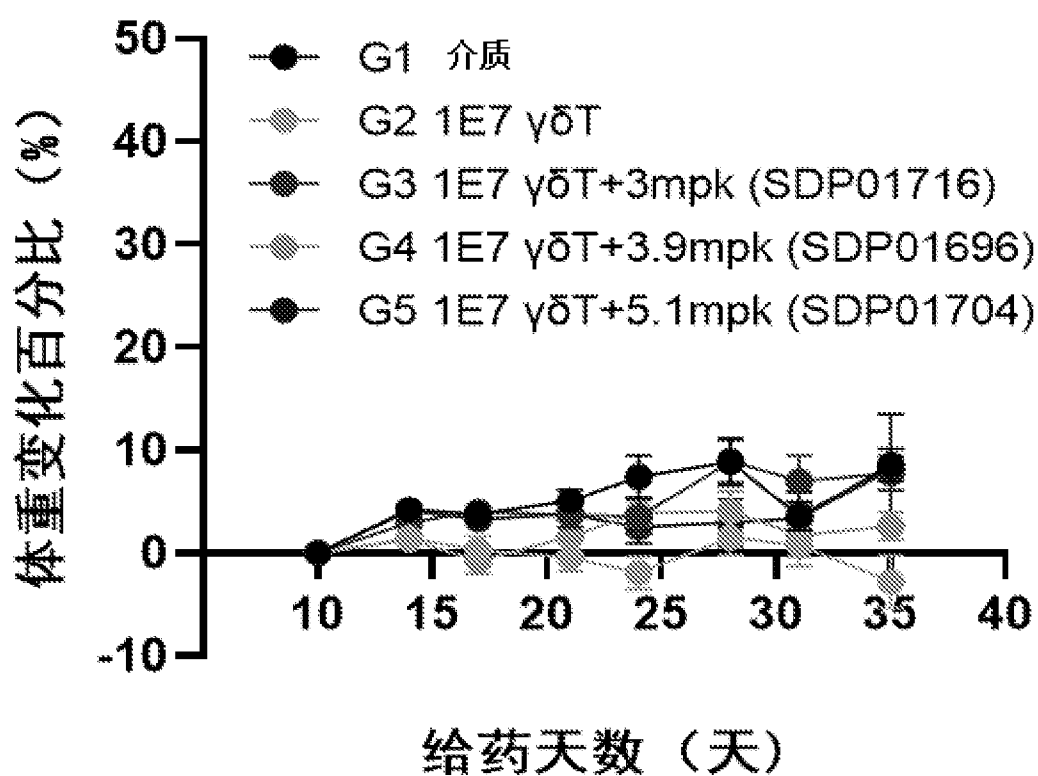


图 11B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/132266

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:C07K C12N A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; CJFD; DWPI; ENTXTC; ENTXT; CNKI; 万方, Wanfang; ISI Web of Science; GenBank; 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System; STN: 上海盛迪医药, 江苏恒瑞医药, 胡雅丽, T细胞受体γ可变区9, 抗体, 双特异性抗体, 双抗, 双功能蛋白, 融合蛋白, 癌, 肿瘤, 肝癌, γδT细胞, TRGV9, TCR Vγ9, GPC3, Glypican-3, anti-TRGV9/anti-GPC3, anti-GPC3 /anti-TRGV9, antibody, bispecific antibody, bifunctional protein, fusion protein, BsAb, cancer, tumor, liver cancer, 序列5-16, 26-29, 30-35, 39-46, sequences 5-16, 26-29, 30-35 and 39-46		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110072533 A (ADICET BIO INC.) 30 July 2019 (2019-07-30) claim 38	26
Y	US 2022306739 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 29 September 2022 (2022-09-29) claims 1, 25, 58-65, 72 and 75	1, 3, 4, 6-9, 11, 17-25
Y	CN 109153719 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 04 January 2019 (2019-01-04) description, paragraphs [0384]- [0391]	1, 3, 4, 6-9, 11, 17-25
A	US 2022306739 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 29 September 2022 (2022-09-29) claims 1-82	2-25
A	CN 113966231 A (JANSSEN BIOTECH, INC.) 21 January 2022 (2022-01-21) claims 1-218	1-26
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 February 2025		Date of mailing of the international search report 25 February 2025
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/132266

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/132266

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **27**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 27 relates to a method for treating or relieving a disease. The solution is a treatment method implemented on a human or animal body, and falls within subject matter for which no search is required as defined in PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/132266

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110072533	A	30 July 2019	IL	262919	A	31 December 2018
				IL	262919	B1	01 April 2023
				IL	262919	B2	01 August 2023
				WO	2017197347	A1	16 November 2017
				US	2022372439	A1	24 November 2022
				EP	3454870	A1	20 March 2019
				EP	3454870	A4	04 March 2020
				JP	2022180371	A	06 December 2022
				AU	2023278051	A1	01 February 2024
				IL	301527	A	01 May 2023
				MX	2018013864	A	10 June 2019
				ZA	201808140	B	27 March 2024
				KR	20190016960	A	19 February 2019
				KR	102519861	B1	10 April 2023
				US	2019119634	A1	25 April 2019
				US	11299708	B2	12 April 2022
				JP	2019519210	A	11 July 2019
				JP	7210286	B2	23 January 2023
				MX	2023006546	A	16 June 2023
				AU	2017261804	A1	29 November 2018
				CA	3023993	A1	16 November 2017
US	2022306739	A1	29 September 2022	IL	295897	A	01 October 2022
				AU	2021225870	A1	20 October 2022
				KR	20220147631	A	03 November 2022
				TW	202144415	A	01 December 2021
				CA	3173268	A1	02 September 2021
				WO	2021173896	A1	02 September 2021
				WO	2021173896	A8	06 October 2022
				MX	2022010664	A	30 November 2022
				JP	2023515199	A	12 April 2023
CN	109153719	A	04 January 2019	KR	20180120063	A	05 November 2018
				KR	102046235	B1	18 November 2019
				AU	2017235097	A1	20 September 2018
				AU	2017235097	B2	31 August 2023
				BR	112018067923	A2	05 February 2019
				JP	2023002720	A	10 January 2023
				JP	7507829	B2	28 June 2024
				JP	2019031552	A	28 February 2019
				CA	3016552	A1	21 September 2017
				MX	2018010546	A	20 February 2019
				ES	2904286	T3	04 April 2022
				EP	3430054	A1	23 January 2019
				EP	3430054	B1	29 December 2021
				TW	201740975	A	01 December 2017
				IL	261781	A	31 October 2018
				US	11767362	B1	26 September 2023
				TW	202248213	A	16 December 2022
				EP	4112641	A1	04 January 2023
				JP	2018516842	A	28 June 2018
				JP	6430025	B2	28 November 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/132266

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
-----				WO	2017159699	A1	21 September 2017
CN	113966231	A	21 January 2022	IL	287817	A	01 January 2022
				WO	2020227457	A1	12 November 2020
				US	2021032338	A1	04 February 2021
				US	11667712	B2	06 June 2023
				AU	2020267504	A1	02 December 2021
				JP	2024170410	A	10 December 2024
				TW	202108618	A	01 March 2021
				KR	20220017892	A	14 February 2022
				US	2024150464	A1	09 May 2024
				EP	3965818	A1	16 March 2022
				EP	3965818	A4	31 May 2023
				CA	3139508	A1	12 November 2020
				BR	112021022089	A2	08 February 2022
				MX	2021013532	A	11 February 2022
				SG	11202112021	QA	29 November 2021
				CL	2021002905	A1	17 June 2022
				JP	2022533538	A	25 July 2022

A. 主题的分类

C07K16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C07K C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;CJFD;DWPI;ENTXTC; ENTXT;CNKI;万方;ISI Web of Science;GenBank;中国专利生物序列检索系统; STN; 上海盛迪医药, 江苏恒瑞医药, 胡雅丽, T细胞受体 γ 可变区9, 抗体, 双特异性抗体, 双抗, 双功能蛋白, 融合蛋白, 癌, 肿瘤, 肝癌, γ δ T细胞, TRGV9, TCR V γ 9, GPC3, Glypican-3, anti-TRGV9/anti-GPC3, anti-GPC3/anti-TRGV9, antibody, bispecific antibody, bifunctional protein, fusion protein, BsAb, cancer, tumor, liver cancer, 序列5-16、26-29、30-35、39-46

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 110072533 A (阿迪塞特生物股份有限公司) 2019年7月30日 (2019 - 07 - 30) 权利要求38	26
Y	US 2022306739 A1 (JANSSEN BIOTECH INC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1、25、58-65、72、75	1、3、4、6-9、11、17-25
Y	CN 109153719 A (中外制药株式会社 等) 2019年1月4日 (2019 - 01 - 04) 说明书第[0384]- [0391]段	1、3、4、6-9、11、17-25
A	US 2022306739 A1 (JANSSEN BIOTECH INC) 2022年9月29日 (2022 - 09 - 29) 权利要求1-82	2-25
A	CN 113966231 A (詹森生物科技公司) 2022年1月21日 (2022 - 01 - 21) 权利要求1-218	1-26

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2025年2月21日

国际检索报告邮寄日期

2025年2月25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

夏文静

电话号码 (+86) 0512-88996514

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.

☒

权利要求： 27
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求27涉及治疗或缓解疾病的方法，该方案为在人体或动物体上实施的治疗方法，属于PCT细则39.1（iv）定义的不要求检索单位检索的主题。
2.

☐

权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.

☐

权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/132266

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110072533	A	2019年7月30日	IL	262919	A	2018年12月31日
				IL	262919	B1	2023年4月1日
				IL	262919	B2	2023年8月1日
				WO	2017197347	A1	2017年11月16日
				US	2022372439	A1	2022年11月24日
				EP	3454870	A1	2019年3月20日
				EP	3454870	A4	2020年3月4日
				JP	2022180371	A	2022年12月6日
				AU	2023278051	A1	2024年2月1日
				IL	301527	A	2023年5月1日
				MX	2018013864	A	2019年6月10日
				ZA	201808140	B	2024年3月27日
				KR	20190016960	A	2019年2月19日
				KR	102519861	B1	2023年4月10日
				US	2019119634	A1	2019年4月25日
				US	11299708	B2	2022年4月12日
				JP	2019519210	A	2019年7月11日
				JP	7210286	B2	2023年1月23日
				MX	2023006546	A	2023年6月16日
				AU	2017261804	A1	2018年11月29日
				CA	3023993	A1	2017年11月16日
US	2022306739	A1	2022年9月29日	IL	295897	A	2022年10月1日
				AU	2021225870	A1	2022年10月20日
				KR	20220147631	A	2022年11月3日
				TW	202144415	A	2021年12月1日
				CA	3173268	A1	2021年9月2日
				WO	2021173896	A1	2021年9月2日
				WO	2021173896	A8	2022年10月6日
				MX	2022010664	A	2022年11月30日
				JP	2023515199	A	2023年4月12日
CN	109153719	A	2019年1月4日	KR	20180120063	A	2018年11月5日
				KR	102046235	B1	2019年11月18日
				AU	2017235097	A1	2018年9月20日
				AU	2017235097	B2	2023年8月31日
				BR	112018067923	A2	2019年2月5日
				JP	2023002720	A	2023年1月10日
				JP	7507829	B2	2024年6月28日
				JP	2019031552	A	2019年2月28日
				CA	3016552	A1	2017年9月21日
				MX	2018010546	A	2019年2月20日
				ES	2904286	T3	2022年4月4日
				EP	3430054	A1	2019年1月23日
				EP	3430054	B1	2021年12月29日
				TW	201740975	A	2017年12月1日
				IL	261781	A	2018年10月31日
				US	11767362	B1	2023年9月26日
				TW	202248213	A	2022年12月16日
				EP	4112641	A1	2023年1月4日
				JP	2018516842	A	2018年6月28日
				JP	6430025	B2	2018年11月28日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/132266

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN			113966231	A			2022年1月21日
				WO	2017159699	A1	2017年9月21日
				IL	287817	A	2022年1月1日
				WO	2020227457	A1	2020年11月12日
				US	2021032338	A1	2021年2月4日
				US	11667712	B2	2023年6月6日
				AU	2020267504	A1	2021年12月2日
				JP	2024170410	A	2024年12月10日
				TW	202108618	A	2021年3月1日
				KR	20220017892	A	2022年2月14日
				US	2024150464	A1	2024年5月9日
				EP	3965818	A1	2022年3月16日
				EP	3965818	A4	2023年5月31日
				CA	3139508	A1	2020年11月12日
				BR	112021022089	A2	2022年2月8日
				MX	2021013532	A	2022年2月11日
				SG	11202112021	QA	2021年11月29日
				CL	2021002905	A1	2022年6月17日
				JP	2022533538	A	2022年7月25日