(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
2023 年 2 月 23 日 (23.02.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/020551 A1

(51) 国际专利分类号:
*C07K 16/40* (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
*C12N 15/13* (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
*G01N 33/573* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/113106

(22) 国际申请日: 2022 年 8 月 17 日 (17.08.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110950740.1 2021年8月18日 (18.08.2021) CN

(71) 申请人: 和迈生物科技有限公司 (NANOMAB TECHNOLOGY LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区中环德辅道中249-253号东宁大厦9楼, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 黄仲廉 (WONG, Chung Lim); 中国香港特别行政区中环德辅道中249-253号东宁大厦9楼, Hong Kong (CN)。 丁航海 (TING, Hong Hoi); 中国香港特别行政区中环德辅道中249-253号东宁大厦9楼, Hong Kong (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU&PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, 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。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))。

WO 2023/020551 A1

(54) **Title:** ANTI-PTK7 SINGLE-DOMAIN ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗PTK7单域抗体及其应用

(57) **Abstract:** Provided are a set of specific single-domain antibody coding sequences targeting PTK7 and an application thereof. The provided anti-PTK7 single-domain antibody may effectively bind to a PTK7 antigen, which provides a basis for the research and development of drugs targeting PTK7, comprising radionuclide drug conjugates, antibody drug conjugates, multispecific antibody drugs and so on.

(57) 摘要: 提供了一组针对PTK7的特异性单域抗体编码序列及其应用。提供的抗PTK7单域抗体能有效与PTK7抗原结合，为靶向PTK7的药物包括核素偶联药物，抗体偶联药物及多特异性抗体药物等研发提供了基础。

# 抗 PTK7 单域抗体及其应用

## 技术领域

本发明涉及抗体领域，具体地涉及针对 PTK7 的特异性单域抗体，更具体地涉及其编码序列和其在疾病诊断和治疗中的应用。

## 背景技术

蛋白酪氨酸激酶 7（PTK7），又名结肠癌激酶 4（CCK4），是一种高度保守、无催化活性的跨膜蛋白酪氨酸激酶（PTK），参与造血细胞，体细胞祖细胞以及干细胞发育过程的非标准 Wnt 信号转导收体 （Peradziryi，2012）。

研究表明，PTK7 在多种肿瘤组织中过度表达，包括乳腺癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌，其过度表达与预后不良和转移风险增加有关。另外，PTK7 也被证实病人源性肿瘤组织中的肿瘤启动细胞（TIC）或肿瘤干细胞高度富集。因此，靶向 PTK7 不单消除一般癌细胞，更能消除负责肿瘤复发的 TIC，成为靶向治疗的一个天然候选靶点（Damelin，2017）。然而，由于 PTK7 没有催化活性，因此对此开发典型酪氨酸激酶抑制剂是不切实际的，以其为靶点的不同抗体偶联物以及不用型式的等多种药物正处于临床研发中。其中新型抗体偶联药物（ADC），利用人源化抗体 hu6M024 作为靶向载体与金盏花素微管抑制剂 Aur0101 偶联而成的 cofetuzumab pelidotin，已于转移性三阴性乳腺癌，铂耐药卵巢癌和非小细胞肺癌进行首次人体临床试验。其中早期研究数据证明，每 3 周一次 2.8 mg/kg cofetuzumab pelidotin 是安全的，并在接受治疗的患者中观察到抗肿瘤活性，总体客观有效率分别为铂耐药卵巢癌 27%（n=63），非小细胞肺癌 19%（n=31）和三阴性乳腺癌 21%（n=29）(Maitland, 2021)。此外，利用 F-18 标记的 Aptamer 核酸适体作为靶向 PTK7 的免疫显像示踪剂能够在种肿瘤细胞系(HCT116 和 UMG)的异种移植模型中特异性、选择性和高亲和力地监察 PTK7 表达，并可能进一步开发 PTK7 靶向治疗（Jacobson, 2015）。

截至目前，市场上尚未有针对 PTK7 靶点的单域抗体药物。单域抗体即骆驼重链单域抗体 VHH（variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody），是目前可以得到的具有完整功能的稳定的可结合抗原的最小单位。单域抗体其分子量是传统抗体的 1/10, 具有稳定性高、水溶性好、人源化简单、靶向性高、穿透性强等特点，作为放射性同位素靶向载体，能够快速、特异性地穿透肿瘤组织结合靶标，而

无结合抗体能很快从血液清除，减低身体放射性剂量，对比传统抗体用于开发放射免疫成像及放射免疫疗法具有众多明显优势（D'Huyvetter, 2014）。

因此，本领域需要开发一种抗 PTK7 单域抗体，尤其是能够单一有效地结合PTK7 的特异性单域抗体，开发新一代放射免疫成像及放射免疫疗法。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种具备良好的PTK7 抗原结合性的抗 PTK7 单域抗体。

本发明的第一方面，提供了一种抗PTK7单域抗体VHH链的互补决定区CDR，所述VHH链的互补决定区CDR包含：

SEQ ID NO: 9-11所示的CDR1；

SEQ ID NO: 12-14所示的CDR2；和

SEQ ID NO: 15-18所示的CDR3。

在另一优选例中，所述的CDR1、CDR2和CDR3由VHH链的框架区FR1、FR2、FR3和FR4所隔开。

在另一优选例中，所述VHH链的互补决定区CDR包含：

SEQ ID NO: 9 所示的CDR1；

SEQ ID NO: 12 所示的CDR2；和

SEQ ID NO: 15 所示的CDR3。

在另一优选例中，所述VHH链的互补决定区CDR包含选自下组的CDR1、CDR2和CDR3：

| 组 | CDR1序列编号 | CDR2序列编号 | CDR3序列编号 |
|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 12 | 15 |
| 2 | 10 | 13 | 16 |
| 3 | 10 | 13 | 17 |
| 4 | 11 | 14 | 18。. |

本发明的第二方面，提供了一种抗PTK7单域抗体的VHH链，所述VHH链包括框架区FR和本发明第一方面所述的互补决定区CDR。

在另一优选例中，所述框架区由选自下组的FR1、FR2、FR3和FR4组成：

| 组 | FR1序列编号 | FR2序列编号 | FR3序列编号 | FR4序列编号 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 19 | 22 | 25 | 29 |
| 2 | 20 | 23 | 26 | 30 |
| 3 | 20 | 23 | 27 | 29 |
| 4 | 21 | 24 | 28 | 31。 |

在另一优选例中，所述的框架区由：

SEQ ID NO: 19 所示的FR1，SEQ ID NO: 22 所示的FR2，SEQ ID NO: 25 所示的FR3，和SEQ ID NO: 29 所示的FR4组成。

在另一优选例中，所述的抗PTK7单域抗体的VHH链具有如SEQ ID NO: 1-4任一所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的抗PTK7单域抗体的VHH链具有如SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列。

本发明的第三方面，提供了一种抗PTK7单域抗体，所述单域抗体是针对PTK7蛋白的单域抗体，并且具有如SEQ ID NO: 1-4任一所示的氨基酸序列的VHH链。

在另一优选例中，所述单域抗体具有如SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的VHH链。

本发明的第四方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：本发明第一方面所述的CDR区、本发明第二方面所述的抗PTK7单域抗体的VHH链、或本发明第三方面所述的抗PTK7单域抗体。

在另一优选例中，所述多核苷酸具有如SEQ ID NO.: 5-8任一所示的核苷酸序列。

在另一优选例中，所述的多核苷酸包括DNA、cDNA或RNA。

本发明的第五方面，提供了一种表达载体，所述表达载体含有本发明第四方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述表达载体包括：细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

本发明的第六方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明的第五方面所述的表达载体，或其基因组中整合有本发明第四方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

在另一优选例中，所述的宿主细胞选自下组：大肠杆菌、酵母细胞。

本发明的第七方面，提供了一种产生抗PTK7单域抗体的方法，包括步骤：

(a)在适合产生单域抗体的条件下，培养本发明第六方面所述的宿主细胞，从而获得含所述抗PTK7单域抗体的培养物；以及(b)从所述培养物中分离或回收所述的抗PTK7单域抗体。

在另一优选例中，所述的抗PTK7单域抗体具有如SEQ ID NO: 1-4任一所示的氨基酸序列。

本发明的第八方面，提供了一种免疫偶联物，所述免疫偶联物含有：

(a)如本发明第二方面所述的抗PTK7单域抗体的VHH链、或如本发明第三方面所述的抗PTK7单域抗体；和(b)选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

在另一优选例中，所述偶联部分为药物或毒素。

在另一优选例中，所述偶联部分为可检测标记物。

在另一优选例中，所述偶联物选自：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(例如，DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))、化疗剂(例如，顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

在另一优选例中，所述免疫偶联物含有：多价(如二价)的如本发明第二方面所述的抗PTK7单域抗体的VHH链、如本发明第三方面所述的抗PTK7单域抗体。

在另一优选例中，所述多价是指，在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明第二方面所述的抗PTK7单域抗体的VHH链、本发明第三

方面所述的抗PTK7单域抗体。

本发明的第九方面，提供了如本发明第二方面所述的VHH链，如本发明第三方面所述的抗PTK7单域抗体，或如本发明第八方面所述的免疫偶联物的用途，用于制备(a)用于检测PTK7分子的试剂；(b)用于治疗肿瘤的药物。

在另一优选例中，所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

在另一优选例中，所述肿瘤为PTK7高表达的肿瘤。

在另一优选例中，所述肿瘤选自下组：乳腺癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌，或其组合。

本发明的第十方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含：(i) 如本发明第三方面所述的单域抗体或如本发明第八方面所述的免疫偶联物；和(ii)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂型。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备治疗肿瘤的药物，所述的肿瘤选自下组：乳腺癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌，或其组合。

本发明的第十一方面，提供了一种体外（诊断和非诊断性）检测样品中PTK7蛋白的方法，包括步骤：

(1) 将样品与本发明第三方面所述的单域抗体接触；

(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在PTK7蛋白。

本发明的第十二方面，提供了一种治疗肿瘤的方法，包括向需要的对象施用如本发明第三方面所述的单域抗体，如本发明第八方面所述的免疫偶联物，或如本发明第十方面所述的药物组合物。

在另一优选例中，所述肿瘤为PTK7高表达的肿瘤。

在另一优选例中，所述肿瘤选自下组：乳腺癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌，或其组合。

在另一优选例中，所述对象包括人或非人类哺乳动物。

本发明的第十三方面，提供了一种放射性免疫成像方法，包括使用如本发明第三方面所述的单域抗体，或如本发明第八方面所述的免疫偶联物进行成像。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

## 附图说明

图 1 是人 PTK7-Fc 蛋白抗原的检测结果。结果表明，该蛋白在 SDS-PAGE 纯度达到 90%以上。

图 2 是两个抗 PTK7 单域抗体噬菌体展示文库的构建和质量检测结果。图 A 为两个文库第一次和第二次 PCR 扩增产物的 PCR 鉴定图，结果表明，最终获得大小约为 400bp 的 VHH 基因片段；图 B 为两个文库的库容检测图，结果表明，两个文库库容分别为 $2.2x10^9$ 和 $3.4x10^9$ CFU；图 C 为两个文库的插入率检测图，结果表明，两个文库的 VHH 插入率分别为 96%和 100%；图 D 为两个文库的富集检测图，结果表明，两个文库的特异性噬菌体经三轮筛选后分别达到 60 和 84 倍富集。

图 3 是抗 PTK7 单域抗体与 PTK7 阳性表达 HCT116 细胞结合活性的流式细胞术检测结果。结果表明，4 株单域抗体均能够有效结合 HCT116 细胞表面的 PTK7 蛋白。

## 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，经过大量的筛选，首次成功地研发出了一组抗PTK7单域抗体。实验结果表明，本发明获得的4株PTK7单域抗体均能以高亲和力特异性结合人或猴PTK7蛋白。

具体地，本发明利用人源的 PTK7 胞外段抗原蛋白免疫骆驼，获得高质量的免疫单域抗体基因文库。然后将 PTK7 蛋白分子偶联在酶标板上，展示 PTK7 蛋白的正确空间结构，以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫单域抗体基因库（骆驼重链抗体噬菌体展示基因库），从而获得了 PTK7 特异性的单域

抗体基因。再将此基因转至大肠杆菌中，从而获得了能在大肠杆菌中高效表达的、且特异性高的单域抗体株。

**术语**

如本文所用，术语“本发明单域抗体”、“本发明的抗 PTK7 单域抗体”、“本发明 PTK7 单域抗体”可互换使用，均指特异性识别和结合于 PTK7（包括人、小鼠和猴 PTK7）的单域抗体。本发明包括氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-4 任一项所述的的单域抗体，特别优选的是 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的单域抗体。

如本文所用，术语“单域抗体”、“VHH”、“纳米抗体”(nanobody) 具有相同的含义并可互换使用，指克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)，它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区 1(CH1)的抗体后，再克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个 FR 区，它们大致上呈β-折叠构型，由形成连接环的三个 CDR 相连，在某些情况下可形成部分β折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位(参见 Kabat 等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷 I，647-669 页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

如本文所用，术语“重链可变区”与“$V_H$”可互换使用。

如本文所用，术语“可变区”与“互补决定区(Complementarity Determining Region，CDR)”可互换使用。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链可变区包括三个互补决定区 CDR1、CDR2、和 CDR3。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

在本发明中，术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合 PTK7 蛋白的多肽，例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地，本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物（即免疫偶联物及融合表达产物），只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少 90%同源性，较佳地至少 95%同源性。

一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的 3 个特定区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成 4 个框架区域(FR)，4 个 FR 的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些 CDR 形成环状结构，通过其间的 FR 形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的 CDR 和相应轻链上的 CDR 构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了 FR 或 CDR 区域。

本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣，因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此，本发明包括那些具有带 CDR 的抗体重链可变区的分子，只要其 CDR 与此处鉴定的 CDR 具有 90%以上（较佳地 95%以上，最佳地 98%以上）的同源性。

本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基（优选保守性氨基酸残基）被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与

另一个化合物（比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇）融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽（如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与 6His 标签形成的融合蛋白）。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

本发明抗体指具有 PTK7 蛋白结合活性的、包括上述 CDR 区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述 CDR 区的多肽的变异形式。这些变异形式包括（但并不限于）：一个或多个氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

本发明还提供了其他多肽，如包含单域抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了本发明单域抗体的片段。通常，该片段具有本发明抗体的至少约 50 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

在本发明中，“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 A 进行氨基酸替换而产生。

表A

| 最初的残基 | 代表性的取代 | 优选的取代 |
|---|---|---|
| Ala(A) | Val；Leu；Ile | Val |
| Arg(R) | Lys；Gln；Asn | Lys |
| Asn(N) | Gln；His；Lys；Arg | Gln |
| Asp(D) | Glu | Glu |
| Cys(C) | Ser | Ser |
| Gln(Q) | Asn | Asn |
| Glu(E) | Asp | Asp |
| Gly(G) | Pro；Ala | Ala |
| His(H) | Asn；Gln；Lys；Arg | Arg |

| | | |
|---|---|---|
| Ile(I) | Leu；Val；Met；Ala；Phe | Leu |
| Leu(L) | Ile；Val；Met；Ala；Phe | Ile |
| Lys(K) | Arg；Gln；Asn | Arg |
| Met(M) | Leu；Phe；Ile | Leu |
| Phe(F) | Leu；Val；Ile；Ala；Tyr | Leu |
| Pro(P) | Ala | Ala |
| Ser(S) | Thr | Thr |
| Thr(T) | Ser | Ser |
| Trp(W) | Tyr；Phe | Tyr |
| Tyr(Y) | Trp；Phe；Thr；Ser | Phe |
| Val(V) | Ile；Leu；Met；Phe；Ala | Leu |

本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。

编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列（和任选的附加编码序列）以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC，0.1%SDS，60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1%Ficoll，42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上，更好是 95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签（如 6His）融合在一起，形成融合蛋白。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通

常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子（核酸、蛋白等）包括以分离的形式存在的生物分子。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白（或其片段，或其衍生物）的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子（或如载体）和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 $CaCl_2$ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 $MgCl_2$。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔，脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析（HPLC）和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

本发明的抗体可以单独使用，也可与可检测标记物（为诊断目的）、治疗剂、PK（蛋白激酶）修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

用于诊断目的可检测标记物包括但不限于：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI（磁共振成像）或 CT（电子计算机 X 射线断层扫描技术）造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于：1.放射性核素；2.生物毒；3.细胞因子如 IL-2 等；4.金纳米颗粒/纳米棒；5.病毒颗粒；6.脂质体；7.纳米磁粒；8.药激活酶（例如，DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL)）；9.疗剂（例如，顺铂）或任何形式的纳米颗粒等。

**药物组合物**

本发明还提供了一种组合物。优选地，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地 pH 约为 6-8，尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括（但并不限于）：瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明的药物组合物可直接用于结合 PTK7 蛋白分子，因而可用于治疗肿瘤。此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量（如 0.001-99wt%，较佳地 0.01-90wt%，更佳地 0.1-80wt%）的本发明上述的单域抗体（或其偶联物）以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括（但并不限于）：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 10 微克/千克体重-约 50 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 50 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 10 毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

**标记的单域抗体**

在本发明的一个优选例中，所述单域抗体带有可检测标记物。更佳地，所述的标记物选自下组：同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中，抗 PTK7 的单域抗体用胶体金标记，得到胶体金标记的单域抗体。在本发明的另一个优选的方案中，抗 PTK7 的单域抗体用放射性同位素标记，得到同位素标记的单域抗体。

本发明的抗 PTK7 单域抗体具有很好的特异性，很高的效价，可用于针对 PTK7 的临床诊断。

**检测方法**

本发明还涉及检测 PTK7 蛋白的方法。该方法步骤大致如下：获得细胞和/或组织样本；将样本溶解在介质中；检测在所述溶解的样本中 PTK7 蛋白的水平。

在本发明的检测方法中，所使用的样本没有特别限制，代表性的例子是存在于细胞保存液中的含细胞的样本。

**试剂盒**

本发明还提供了一种含有本发明的抗体（或其片段）或检测板的试剂盒，在本发明的一个优选例中，所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

本发明还提供了用于检测 PTK7 水平的检测试剂盒，该试剂盒包括识别 PTK7 蛋白的抗体，用于溶解样本的裂解介质，检测所需的通用试剂和缓冲液，如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

**应用**

如上所述，本发明的单域抗体有广泛生物应用价值和临床应用价值，其应用涉及到与 PTK7 相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对 PTK7 的临床诊断和靶向治疗。

本发明提供了抗 PTK7 单域抗体在诊断和治疗肿瘤中的应用，所述肿瘤为 PTK7 异常高表达（包括 mRNA 和/或蛋白水平）的肿瘤，具体地，所述肿瘤包括但不限于：乳腺癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌等。

本发明的主要优点包括：

(a) 本发明首次研发了针对 PTK7 靶点的单域抗体；

(b) 本发明的单域抗体与 PTK7 蛋白结合的亲和力高；

(c) 本发明的单域抗体特异性好，可以与人、鼠和恒河猴PTK7结合；

(d) 本发明的单域抗体能够于PTK7高表达肿瘤模型有效积聚，可应用于PTK7靶向的癌症诊断及疗效评估，同时用于开发新一代PTK7靶向治疗；

(e) 本发明的单域抗体制备方法简单，易于大量生产。

下面结合具体实施例，进一步详陈本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如美国Sambrook. J 等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译，北京：科学出版社，2002年)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

**实施例1：人PTK7-Fc蛋白抗原表达**

利用哺乳动物细胞 HEK293F 瞬转表达人 PTK7 胞外段蛋白：将人 PTK7 胞外段基因克隆至 pFUSE-IgG 重组质粒，与转染试剂 PEI 1:3 混合后转染至 HEK293F 细胞；37℃，6% CO2 摇床培养箱中培养 6 天；随后收集细胞上清，与 Protein A 珠子在室温下结合 1 h；再用磷酸盐缓冲液 pH 7.0 洗涤珠子后，用 0.1M pH3.0 甘氨酸溶液洗脱蛋白；再将洗脱的蛋白超滤至 PBS 溶液中，测定产量后取样进行 SDS-PAGE 检测。

检测结果如图 1 所示，PTK7-Fc 蛋白抗原的纯度大于 90%，可用于骆驼免疫及抗体筛选。

**实施例2：人PTK7胞外段蛋白免疫文库构建及筛选**

将纯化的 PTK7-Fc 蛋白蛋白免疫 2 只新疆双峰驼，7 次免疫结束后从骆驼外周血中分离 total RNA，经反转录和 PCR 扩增出 VHH 基因（图 2A），再将 VHH 基因克隆至噬菌体载体 pMECS 上，转化至 TG1 宿主细胞中构建成噬菌体展示文库。两个构建文库被梯度稀释后涂板并测定库容，同时每个构建文库随

机挑取 24 颗克隆进行菌落 PCR 检测。

结果表明，两个构建文库库容分别为 $2.2x10^9$ 和 $3.4x10^9$ CFU（图 2B），文库插入率为分别为 96%和 100 %（图 2C）。

随后利用噬菌体展示技术进行 3 轮“吸附-洗涤-富集”，最终两个文库的特异性噬菌体分别达到 60 和 84 倍富集（图 2D）。从以上富集的噬菌体克隆中随机挑选 400 颗针对人 PTK7-Fc 进行 PE-ELISA 鉴定，将获得的阳性克隆（比值＞3）全部进行测序鉴定，将所有序列不同的单域抗体（107 株）均作为候选对象。

**实施例3：抗PTK7单域抗体的表达和純化**

从实施例 2 测序分析所获得的抗体克隆挑选出 40 株，将各质粒电转至大肠杆菌 WK6 中，并将其涂布在 LA+glucose 的培养平板上，37℃培养过夜；挑选单个菌落接种在 5 mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃摇床培养过夜；接种 1 mL 的过夜菌种至 330 mL TB 培养液中，37℃摇床培养，培养到 OD0.6-1 时，加入 IPTG，28℃摇床培养过夜；离心收菌，并利用渗透法获得抗体粗提液；经镍柱离子亲和层析制备纯化的单域抗体。经检测表达纯化的单域抗体纯度大于 90%，用于候选功能活性研究，最终获得下列 4 株先导单域抗体。

表 1 PTK7 单域抗体序列编号

| 抗体编号 | 氨基酸序列编号 | 核苷酸序列编号 |
|---|---|---|
| MY2132-4-22 | SEQ ID NO：1 | SEQ ID NO：5 |
| MY2132-4-55 | SEQ ID NO：2 | SEQ ID NO：6 |
| MY2132-4-79 | SEQ ID NO：3 | SEQ ID NO：7 |
| MY2132-5-51 | SEQ ID NO：4 | SEQ ID NO：8 |

4株单域抗体的序列如下，三个CDR区分别用下划线标出。

SEQ ID NO：1

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTFDDYDMVWYRQAPGNEYEWLSTVSRGGNLYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLNMSRVKPEDTAVYYCAADLRSVPSTYRARTCRGRYCRDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO：2

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIWSRYCMGWFRQAPGKAREGVAR

FNSDGNTRYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLQPEDTARYYCAADPRF
DCGYDAVFNPTHFPYWGRGTQVTVSS

SEQ ID NO：3

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIWSRYCMGWFRQAPGKAREGVAR
FNSDGNTRYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLQPEDTARYYCAADPRF
DCGYDAVFNPTHFPYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO：4

QVQLQESGGGLVQPGGSLTLACAASGFAFSSYAMRWVRQAPGKGLEGVSSI
SAGGDETYYADFAKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLKTEDTAMYYCAKGDRN
SPRYSSWPITPVGQGTQVTVSS

SEQ ID NO：5

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTACAGGCTGGAGGGT
CTCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTTTGATGATTATGACA
TGGTCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAATGAGTACGAGTGGCTCTCAACT
GTTAGTCGTGGTGGTAATTTATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATT
CACCATCTCCCGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTTAATATGAGCA
GAGTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGCGCGGCAGACCTTCGC
TCGGTTCCCTCGACGTATCGGGCGAGAACTTGTCGCGGTCGTTACTGCCG
CGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO：6

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGT
CTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATACATCTGGAGTAGGTACTGC
ATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGCGCGCGAGGGGGTCGCGC
GCTTTAATAGTGATGGTAACACAAGGTACGTAGACTCCGTGAAGGGCCGA
TTCACCATCTCCCGAGACAACGCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAA
CAACCTGCAACCTGAGGACACTGCCAGGTACTACTGTGCGGCAGATCCTC
GCTTCGATTGCGGCTATGACGCCGTGTTTAACCCGACGCACTTTCCTTACT
GGGGCCGGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO：7

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGT
CTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATACATCTGGAGTAGGTACTGC

ATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGCGCGCGAGGGGGTCGCGC
GCTTTAATAGTGATGGTAACACAAGGTACGTAGACTCCGTGAAGGGCCGA
TTCACCATCTCCCGAGACAACGCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAA
CAACCTGCAACCTGAGGACACTGCCAGGTACTACTGTGCGGCAGATCCTC
GCTTCGATTGCGGCTATGACGCCGTGTTTAACCCGACGCACTTTCCTTACT
GGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO：8

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGT
CTCTGACACTCGCCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGCCA
TGCGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTCGAGGGGGTCTCAAG
TATTAGTGCTGGTGGTGATGAAACATACTATGCAGACTTCGCGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGCTGTATTTGCAGCTG
AACAGCCTGAAAACTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAAGGGGG
ATCGTAACTCCCCCAGATACAGTAGTTGGCCCATCACACCCGTAGGTCAG
GGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

**实施例4：抗PTK7单域抗体与不同种属PTK7的酶联免疫法（ELISA）检测**

利用人或鼠种属的 PTK7-Fc 或恒河猴种属的 PTK7-His 抗原蛋白包备酶标板，4℃过夜；第二天用 PBS-T 洗涤 4 次，加入 1%BSA，室温下封闭 2 小时；用 PBS-T 洗涤 4 次，加入按梯度稀释的抗 PTK7 单域抗体，37℃放置 1 小时；用 PBS-T 洗涤 4 次，加入鼠抗 His-HRP 抗体或鼠抗 HA-HRP 抗体，37℃放置 1 小时; 用 PBS-T 洗涤 4 次，加入 TMB 可溶性底物，室温下放置 10 分钟；在 450 nm 波长读取吸收值，根据吸收值计算各单域抗体 Kd 值。

检测结果如表 2 所示，本发明的抗 PTK7 单域抗体可与人,鼠或恒河猴 PTK7 结合。

表2 抗PTK7单域抗体ELISA结果

| 抗体编号 | 人PTK7 Kd (nM) | 鼠PTK7 Kd (nM) | 恒河猴PTK7 Kd (nM) |
|---|---|---|---|
| MY2132-4-22 | 0.33 | 12.74 | 0.30 |
| MY2132-4-55 | 0.49 | ND | ND |
| MY2132-4-79 | 0.59 | ND | ND |

| | | | |
|---|---|---|---|
| MY2132-5-51 | 0.61 | ND | 1.03 |

**实施例5：抗PTK7单域抗体与人PTK7的蛋白结合动力学（Biacore 8K）检测**

利用羧基氨基反应将固定相人 PTK7-Fc 抗原蛋白固定在 CM-5 传感芯片表面；将抗 PTK7 单域抗体用 HBS 缓冲液稀释成不同浓度，以 30ul/分钟流速加入抗 PTK7 单域抗体，结合 90s 和解离 600s，观察抗 PTK7 单域抗体与抗原结合过程；用 10mM Glycine 冲洗进行芯片再生，进行下一个抗 PTK7 单域抗体测定时。

检测结果如表 3 所示，本发明的抗 PTK7 单域抗体与 PTK7-Fc 蛋白的结合能够达到 0.18~3.45nM。

表3 抗PTK7单域抗体Biacore 8K结果

| 抗体编号 | $K_{on}$ (1/Ms) | $K_{off}$ (1/s) | Kd (nM) |
|---|---|---|---|
| MY2132-4-22 | 1.51E+07 | 3.22E-02 | 2.13 |
| MY2132-4-55 | 1.76E+06 | 3.14E-04 | 0.18 |
| MY2132-4-79 | 1.64E+06 | 3.58E-04 | 0.22 |
| MY2132-5-51 | 4.82E+05 | 1.66E-03 | 3.45 |

**实施例 6：抗 PTK7 单域抗体与人 PTK7 表位鉴定分组的 ELISA 检测**

利用不同抗 PTK7 单域抗体包备酶标板，4℃过夜；第二天用 PBS-T 洗涤 4 次，加入 13%BSA，室温下封闭 1 小时；用 PBS-T 洗涤 5 次，加入人 PTK7-Fc 和抗 PTK7 单域抗体，37℃放置 1 小时；加入抗人 Fc-HRP 抗体，37℃放置 1 小时; 用 PBS-T 洗涤 5 次，加入 TMB 可溶性底物，室温下放置 2 分钟；在 450 nm 波长读取吸收值，根据吸收值计算各单域抗体竞争结果。

检测结果如表 5 所示，本发明的抗 PTK7 单域抗体按结合表位能分成 2 组，其中 MY2132-4-22 为组 1, MY2132-4-55、MY2132-4-79 和 MY2132-5-51 为组 2。

表4 抗PTK7单域抗体表位鉴定ELISA结果

| 抗体编号 | MY2132-4-22 | MY2132-4-55 | MY2132-4-79 | MY2132-5-51 | 结论 |
|---|---|---|---|---|---|
| MY2132-4-22 | 竞争 | 非竞争 | 非竞争 | 非竞争 | 1 |
| MY2132-4-55 | 非竞争 | 竞争 | 竞争 | 竞争 | 2 |
| MY2132-4-79 | 非竞争 | 竞争 | 竞争 | 竞争 | 2 |
| MY2132-5-51 | 非竞争 | 竞争 | 竞争 | 竞争 | 2 |

**实施例 7：抗 PTK7 单域抗体与肿瘤细胞的流式细胞分析术（FACS）检测**

利用高表达 PTK7 的肿瘤细胞 HCT116 进行抗体结合功能验证：将培养的 BxPc3 细胞用胰酶消化并用完全培养基中和后，用 PBS 洗涤细胞一次，然后收集细胞；平均分装至 96 孔板中，加入人 Fc 阻断抗体，4℃孵育 15 分钟；离心后用 PBS 洗涤细胞一次，加入抗 PTK7 单域抗体或非靶向单域抗体（阴性对照），4℃孵育 30 分钟；离心后用 PBS 洗涤细胞一次，再加入 anti-HA-Alexa Fluor488 或鼠抗 PTK7-FITC 抗体（阳性对照），4℃孵育 20 分钟；用 PBS 洗涤一次细胞后，4℃离心 5 分钟，弃上清，加入 200 ul PBS 重悬细胞，流式检测每个样本 Alexa Fluor488 信号。

结果如图 3 所示，本发明的抗 PTK7 单域抗体能够有效结合肿瘤细胞表面的 PTK7 蛋白。

**实施例 8：抗 PTK7 单域抗体在小鼠肿瘤异种移植模型的 SPECT/CT 显像**

在三羰基试剂盒，加入高锝酸盐，99℃孵育 20 分钟；冷却试剂瓶至室温，加入盐酸，中和三羰基锝至 pH7-7.5; 加入抗 PTK7 单域抗体，37℃孵育 1 小时；用薄层色谱法对锝标记抗 PTK7 单域抗体进行放射纯度鉴定。

在裸鼠右侧背部皮下接种 $1\times10^7$ 个 PTK7 高表达（HCT116）细胞，待肿瘤长至 150-200$mm^3$ 用于正式实验研究；通过异氟烷麻醉荷瘤鼠，尾静脉注射锝标记抗 PTK7 单域抗体(～10ug, 37MBq)；给药后 90 分钟进行扫描，采集方式为静态 15 分钟 SPECT、中分辨率全身 CT。

本发明的抗 PTK7 单域抗体能够于 PTK7 高表达肿瘤模型有效积聚，应用于 PTK7 靶向的癌症诊断及疗效评估，同时开发新一代 PTK7 靶向治疗。

本发明的氨基酸序列

| 名称 | 序列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| MY2132-4-22 VHH | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTFDDY DMVWYRQAPGNEYEWLSTVSRGGNLYYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLNMSRVKPEDTAVY YCAADLRSVPSTYRARTCRGRYCRDYWGQGT QVTVSS | 1 |
| MY2132-4-55 VHH | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIWSR YCMGWFRQAPGKAREGVARFNSDGNTRYVD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLQPEDTARY YCAADPRFDCGYDAVFNPTHFPYWGRGTQVT VSS | 2 |
| MY2132-4-79 VHH | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIWSR YCMGWFRQAPGKAREGVARFNSDGNTRYVD SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLQPEDTARY YCAADPRFDCGYDAVFNPTHFPYWGQGTQVT VSS | 3 |
| MY2132-5-51 VHH | QVQLQESGGGLVQPGGSLTLACAASGFAFSSY AMRWVRQAPGKGLEGVSSISAGGDETYYADF AKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLKTEDTAMYY CAKGDRNSPRYSSWPITPVGQGTQVTVSS | 4 |
| MY2132-4-22 CDR1 | GFTFDDYDMV | 9 |
| MY2132-4-55 CDR1 | GYIWSRYCMG | 10 |
| MY2132-4-79 CDR1 | GYIWSRYCMG | 10 |
| MY2132-5-51 CDR1 | GFAFSSYAMR | 11 |
| MY2132-4-22 CDR2 | TVSRGGN | 12 |
| MY2132-4-55 CDR2 | RFNSDGN | 13 |
| MY2132-4-79 CDR2 | RFNSDGN | 13 |
| MY2132-5-51 CDR2 | SISAGGDE | 14 |
| MY2132-4-22 CDR3 | AADLRSVPSTYRARTCRGRYCRDY | 15 |
| MY2132-4-55 CDR3 | AADPRFDCGYDAVFNPTHFPY | 16 |
| MY2132-4-79 CDR3 | YYCAADPRFDCGYDAVFNPTHFPY | 17 |
| MY2132-5-51 CDR3 | AKGDRNSPRYSSWPITP | 18 |
| MY2132-4-22 | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAS | 19 |

| | | |
|---|---|---|
| FR1 | | |
| MY2132-4-55 FR1 | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS | 20 |
| MY2132-4-79 FR1 | QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS | 20 |
| MY2132-5-51 FR1 | QVQLQESGGGLVQPGGSLTLACAAS | 21 |
| MY2132-4-22 FR2 | WYRQAPGNEYEWLS | 22 |
| MY2132-4-55 FR2 | WFRQAPGKAREGVA | 23 |
| MY2132-4-79 FR2 | WFRQAPGKAREGVA | 23 |
| MY2132-5-51 FR2 | WVRQAPGKGLEGVS | 24 |
| MY2132-4-22 FR3 | LYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLNMSRVKPEDTAVYYC | 25 |
| MY2132-4-55 FR3 | TRYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLQPEDTARYYC | 26 |
| MY2132-4-79 FR3 | TRYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLQPEDTAR | 27 |
| MY2132-5-51 FR3 | TYYADFAKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLKTEDTAMYYC | 28 |
| MY2132-4-22 FR4 | WGQGTQVTVSS | 29 |
| MY2132-4-55 FR4 | WGRGTQVTVSS | 30 |
| MY2132-4-79 FR4 | WGQGTQVTVSS | 29 |
| MY2132-5-51 FR4 | VGQGTQVTVSS | 31 |

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

# 权 利 要 求

1. 一种抗PTK7单域抗体VHH链的互补决定区CDR，其特征在于，所述VHH链的互补决定区CDR包含：

SEQ ID NO: 9-11任一项所示的CDR1；

SEQ ID NO: 12-14任一项所示的CDR2；和

SEQ ID NO: 15-18任一项所示的CDR3。

2. 如权利要求1所述的互补决定区CDR，其特征在于，包含选自下组的CDR1、CDR2和CDR3：

| 组 | CDR1序列编号 | CDR2序列编号 | CDR3序列编号 |
|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 12 | 15 |
| 2 | 10 | 13 | 16 |
| 3 | 10 | 13 | 17 |
| 4 | 11 | 14 | 18。. |

3. 一种抗PTK7单域抗体的VHH链，所述VHH链包括框架区FR和权利要求1所述的互补决定区CDR。

4. 一种抗PTK7单域抗体，其特征在于，所述单域抗体是针对PTK7蛋白的单域抗体，并且具有如SEQ ID NO: 1-4任一所示的氨基酸序列的VHH链。

5. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：权利要求1所述的CDR区、权利要求2所述的抗PTK7单域抗体的VHH链、或权利要求3所述的抗PTK7单域抗体。

6. 如权利要求5所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸具有如SEQ ID NO.: 5-8任一所示的核苷酸序列。

7. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有权利要求5所述的多核苷酸。

8. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求7所述的表达载体，或其基因组中整合有权利要求5所述的多核苷酸。

9. 一种产生抗PTK7单域抗体的方法，其特征在于，包括步骤：

(a)在适合产生单域抗体的条件下，培养权利要求8所述的宿主细胞，从而获得含所述抗PTK7单域抗体的培养物；以及(b)从所述培养物中分离或回收所述的抗PTK7单域抗体。

10. 一种免疫偶联物，其特征在于，该免疫偶联物含有：

(a)如权利要求3所述的抗PTK7单域抗体的VHH链、或如权利要求3所述的抗PTK7单域抗体；和(b)选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

11. 如权利要求3所述的VHH链，如权利要求4所述的抗PTK7单域抗体，或如权利要求10所述的免疫偶联物的用途，其特征在于，用于制备(a)用于检测PTK7分子的试剂；(b)用于治疗肿瘤的药物。

12. 如权利要求11所述的用途，其特征在于，所述肿瘤为PTK7高表达的肿瘤。

13. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含：(i) 如权利要求4所述的单域抗体或如权利要求10所述的免疫偶联物；和(ii) 药学上可接受的载体。

14. 一种体外（诊断和非诊断性）检测样品中PTK7蛋白的方法，包括步骤：

(1) 将样品与权利要求4所述的单域抗体接触；

(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在PTK7蛋白。

15. 一种治疗肿瘤的方法，包括向需要的对象施用如权利要求4所述的单域抗体，如权利要求10所述的免疫偶联物，或如权利要求13所述的药物组合物。

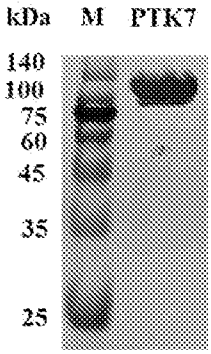

kDa
M
PTK7
140
100
75
60
45
35
25

图 1

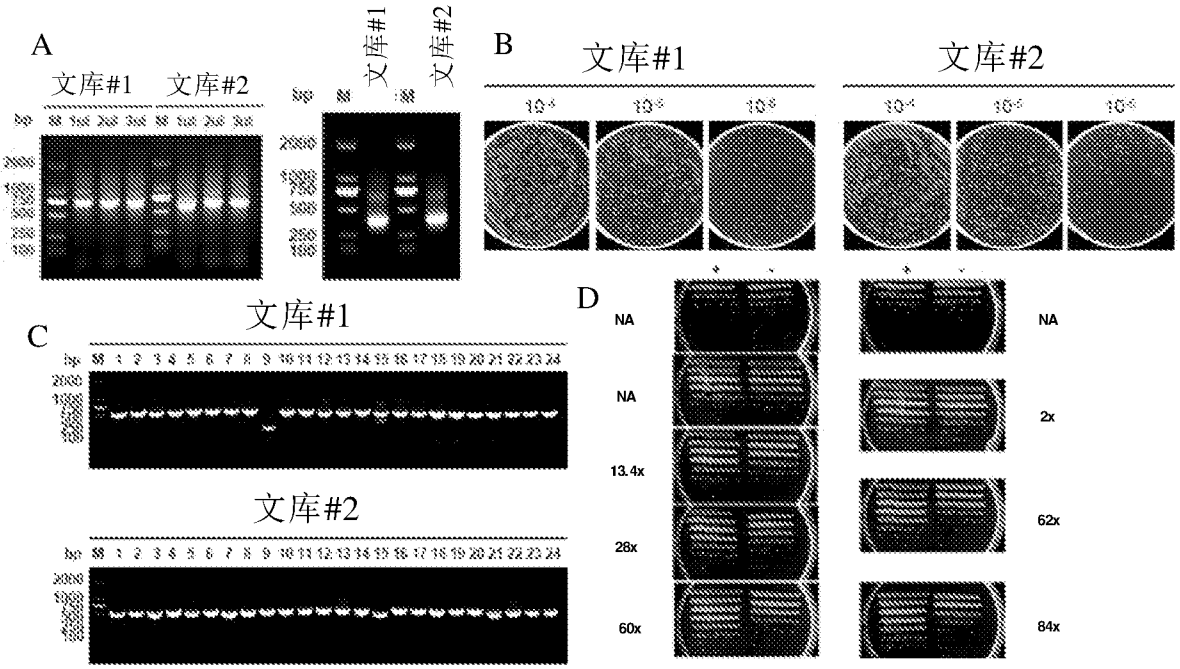

A
文库#1
文库#2
B
文库#1
文库#2
C
文库#1
文库#2
D
NA
NA
13.4x
28x
60x
NA
2x
62x
84x

图 2

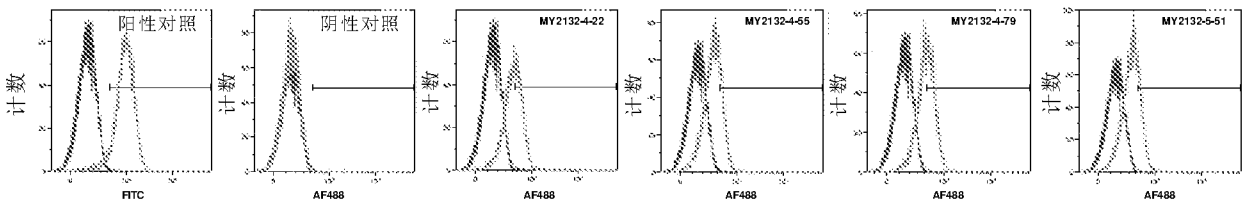

阳性对照
阴性对照
MY2132-4-22
MY2132-4-55
MY2132-4-79
MY2132-5-51
计数
FITC
AF488

图 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2022/113106**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/40(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; G01N 33/573(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)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)

C07K; C12N; G01N; 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, VEN, WOTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 万方, WANFANG, Pubmed, STN, Genbank, ISI web of knowledge: PTK7, 蛋白酪氨酸激酶7, CCK4, 结肠癌激酶4, protein tyrosine kinase 7, 纳米抗体, 单域抗体, 抗体, nanobody, single domain, 单结构域, antibody, 缀合物, 偶联, conjugate, SEQ ID NOs. 1-18, 和迈生物科技有限公司

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | CN 101360761 A (MEDAREX, INC.) 04 February 2009 (2009-02-04)<br>entire document | 1-15 |
| A | CN 101939028 A (BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY) 05 January 2011 (2011-01-05)<br>entire document | 1-15 |
| A | CN 106659801 A (PFIZER INC. et al.) 10 May 2017 (2017-05-10)<br>entire document | 1-15 |
| A | CN 109485726 A (NANOMAB TECHNOLOGY LIMITED) 19 March 2019 (2019-03-19)<br>entire document | 1-15 |
| A | CN 103547597 A (STEM CENTRX, INC.) 29 January 2014 (2014-01-29)<br>entire document | 1-15 |
| A | CN 112955472 A (CRISPR THERAPEUTICS AG) 11 June 2021 (2021-06-11)<br>entire document | 1-15 |

☑ 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
"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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| **31 October 2022** | **17 November 2022** |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br>**China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)**<br>**No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China**<br>Facsimile No. **(86-10)62019451** | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | MAITLAND, M. L. et al. "First-in-Human Study of PF-06647020 (Cofetuzumab Pelidotin), an Antibody-Drug Conjugate Targeting Protein Tyrosine Kinase 7, in Advanced Solid Tumors" *Clin Cancer Res,* Vol. 27, No. 16, 15 August 2021 (2021-08-15), pages 4511-4520 | 1-15 |
| A | DAMELIN, M. et al. "A PTK7-targeted antibody-drug conjugate reduces tumor-initiating cells and induces sustained tumor regressions" *Sci.Transl.Med.,* Vol. 9, 11 January 2017 (2017-01-11), eaag2611, pages 1-11 | 1-15 |
| A | YANG, E. Y. et al. "Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics" *Frontiers in Oncology,* Vol. 10, 23 July 2020 (2020-07-23), Article 1182, pages 1-17 | 1-15 |
| A | HU, Yaozhong et al. "Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy" *Frontiers in Oncology,* Vol. 8, 02 November 2017 (2017-11-02), Article 1442, pages 1-17 | 1-15 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/CN2022/113106**

**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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

   [1] The actually submitted sequence table is an XML file in Standard ST.26.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2022/113106**

**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.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 15 relates to a method for treating cancer, that is, claim 15 relates to subject matter defined in PCT Rule 39.1 that does not warrant a search conducted by the international searching authority: (4) a method for the treatment of a human or animal body by surgery or therapy and a diagnostic method implemented on the human or animal body. An international search was made on the basis of a use of the single-domain antibody according to claim 4, the immunoconjugate according to claim 10 or the pharmaceutical composition according to claim 13 in the preparation of a drug for treating tumors.

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/CN2022/113106**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| CN 101360761 A | 04 February 2009 | SI 1957539 T1 | 31 May 2013 |
| | | NZ 569236 A | 29 June 2012 |
| | | EP 1957539 A2 | 20 August 2008 |
| | | DK 1957539 T3 | 06 May 2013 |
| | | NZ 594466 A | 31 August 2012 |
| | | PL 1957539 T3 | 30 August 2013 |
| | | WO 2007067730 A2 | 14 June 2007 |
| | | HK 1121174 A1 | 17 April 2009 |
| | | EA 200801509 A1 | 30 December 2008 |
| | | US 2012207764 A1 | 16 August 2012 |
| | | KR 20080082660 A | 11 September 2008 |
| | | PT 1957539 E | 25 June 2013 |
| | | BR PI0619582 A2 | 11 December 2012 |
| | | SG 177194 A1 | 30 January 2012 |
| | | US 2010034826 A1 | 11 February 2010 |
| | | AU 2006321841 A1 | 14 June 2007 |
| | | US 2012219557 A1 | 30 August 2012 |
| | | CA 2632552 A1 | 14 June 2007 |
| | | RS 52804 B | 31 October 2013 |
| | | ES 2406063 T3 | 05 June 2013 |
| | | NO 20082559 L | 07 July 2008 |
| | | IN 3482CHENP2008 A | 06 March 2009 |
| | | ME 02002 B | 31 October 2013 |
| | | JP 2009518039 A | 07 May 2009 |
| | | IL 191788 D0 | 11 February 2009 |
| CN 101939028 A | 05 January 2011 | JP 2011505146 A | 24 February 2011 |
| | | US 2012027782 A1 | 02 February 2012 |
| | | AR 069903 A1 | 03 March 2010 |
| | | AU 2008334076 A1 | 11 June 2009 |
| | | KR 20100101124 A | 16 September 2010 |
| | | CL 2008003527 A1 | 09 October 2009 |
| | | WO 2009073546 A2 | 11 June 2009 |
| | | TW 200938223 A | 16 September 2009 |
| | | MX 2010005966 A | 15 June 2010 |
| | | EP 2229187 A2 | 22 September 2010 |
| CN 106659801 A | 10 May 2017 | HU E053287 T2 | 28 June 2021 |
| | | RU 2016143119 A | 30 May 2018 |
| | | ES 2856927 T3 | 28 September 2021 |
| | | KR 20210040182 A | 12 April 2021 |
| | | CA 2947148 A1 | 05 November 2015 |
| | | ZA 201607385 B | 25 May 2022 |
| | | PT 3137114 T | 26 February 2021 |
| | | IL 248475 D0 | 29 December 2016 |
| | | PE 17 May 2017 A1 | 18 May 2017 |
| | | BR 112016025291 A2 | 26 December 2017 |
| | | PL 3137114 T3 | 28 June 2021 |
| | | SG 10201809628 S A | 29 November 2018 |
| | | AU 2015253422 A1 | 10 November 2016 |
| | | DK 3137114 T3 | 25 January 2021 |
| | | MX 2016014247 A | 30 May 2017 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2022/113106**

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | | | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | TW | 201625312 | A | 16 July 2016 |
| | | | | RS | 61516 | B1 | 31 March 2021 |
| | | | | PH | 12016502142 | A1 | 09 January 2017 |
| | | | | SG | 11201608953 W | A | 29 November 2016 |
| | | | | EP | 3711780 | A2 | 23 September 2020 |
| | | | | JP | 2020055846 | A | 09 April 2020 |
| | | | | AR | 100215 | A1 | 21 September 2016 |
| | | | | KR | 20170020753 | A | 24 February 2017 |
| | | | | AU | 2020281105 | A1 | 07 January 2021 |
| | | | | EP | 3137114 | A2 | 08 March 2017 |
| | | | | HR | P20210292 | T1 | 16 April 2021 |
| | | | | LT | 3137114 | T | 25 March 2021 |
| | | | | SI | 3137114 | T1 | 30 November 2021 |
| | | | | WO | 2015168019 | A2 | 05 November 2015 |
| | | | | US | 2018094075 | A1 | 05 April 2018 |
| | | | | US | 2015315293 | A1 | 05 November 2015 |
| | | | | JP | 2017514905 | A | 08 June 2017 |
| CN | 109485726 | A | 19 March 2019 | US | 2020276330 | A1 | 03 September 2020 |
| | | | | EP | 3682907 | A1 | 22 July 2020 |
| | | | | JP | 2020533370 | A | 19 November 2020 |
| | | | | WO | 2019052508 | A1 | 21 March 2019 |
| CN | 103547597 | A | 29 January 2014 | SG | 192816 | A1 | 30 September 2013 |
| | | | | BR | 112013021134 | A2 | 29 November 2016 |
| | | | | IL | 228018 | D0 | 30 September 2013 |
| | | | | RU | 2017126476 | A | 31 January 2019 |
| | | | | RU | 2013141976 | A | 27 March 2015 |
| | | | | HR | P20201399 | T1 | 27 November 2020 |
| | | | | JP | 2018104409 | A | 05 July 2018 |
| | | | | PE | 20181076 | A1 | 04 July 2018 |
| | | | | MX | 2013009541 | A | 30 April 2014 |
| | | | | KR | 20140018905 | A | 13 February 2014 |
| | | | | TW | 201800421 | A | 01 January 2018 |
| | | | | IL | 254062 | D0 | 31 October 2017 |
| | | | | NZ | 615285 | A | 25 September 2015 |
| | | | | LT | 2675827 | T | 26 October 2020 |
| | | | | ZA | 201306958 | B | 30 March 2022 |
| | | | | US | 2014105888 | A1 | 17 April 2014 |
| | | | | NZ | 708615 | A | 24 February 2017 |
| | | | | AR | 085281 | A1 | 18 September 2013 |
| | | | | PH | 12018500452 | A1 | 18 November 2019 |
| | | | | AU | 2017202934 | A1 | 25 May 2017 |
| | | | | PL | 2675827 | T3 | 25 January 2021 |
| | | | | DK | 2675827 | T3 | 07 September 2020 |
| | | | | SA | 4398 | B1 | 09 October 2015 |
| | | | | HU | E050657 | T2 | 28 January 2021 |
| | | | | MX | 317347 | B | 22 January 2014 |
| | | | | IL | 263020 | A | 31 December 2018 |
| | | | | AU | 2010219313 | B2 | 22 November 2012 |
| | | | | SG | 10201603926 S | A | 28 July 2016 |
| | | | | ES | 2829206 | T3 | 31 May 2021 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2022/113106**

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | | | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | US | 2016272723 | A1 | 22 September 2016 |
| | | | | EP | 2675827 | A1 | 25 December 2013 |
| | | | | AU | 2012219313 | A1 | 02 May 2013 |
| | | | | EP | 3763388 | A1 | 13 January 2021 |
| | | | | JP | 2014511179 | A | 15 May 2014 |
| | | | | CN | 107056945 | A | 18 August 2017 |
| | | | | WO | 2012112943 | A1 | 23 August 2012 |
| | | | | AU | 2019201258 | A1 | 14 March 2019 |
| | | | | PT | 2675827 | T | 29 October 2020 |
| | | | | CO | 6791571 | A2 | 14 November 2013 |
| | | | | US | 2018162952 | A1 | 14 June 2018 |
| | | | | CA | 2827637 | A1 | 30 August 2012 |
| | | | | PE | 20141028 | A1 | 30 August 2014 |
| | | | | RS | 60841 | B1 | 30 October 2020 |
| | | | | TW | 201309729 | A | 01 March 2013 |
| | | | | SI | 2675827 | T1 | 30 November 2020 |
| | | | | MY | 173880 | A | 26 February 2020 |
| CN | 112955472 | A | 11 June 2021 | US | 2020140815 | A1 | 07 May 2020 |
| | | | | PH | 12021551047 | A1 | 13 December 2021 |
| | | | | BR | 112021008083 | A2 | 10 August 2021 |
| | | | | CA | 3118830 | A1 | 14 May 2020 |
| | | | | WO | 2020095248 | A1 | 14 May 2020 |
| | | | | IL | 282532 | A | 30 June 2021 |
| | | | | CO | 2021005471 | A2 | 30 April 2021 |
| | | | | SG | 11202104631 S | A | 29 June 2021 |
| | | | | US | 2021290678 | A1 | 23 September 2021 |
| | | | | EP | 3877421 | A1 | 15 September 2021 |
| | | | | JP | 2022509017 | A | 20 January 2022 |
| | | | | KR | 20210092236 | A | 23 July 2021 |
| | | | | AU | 2019374523 | A1 | 20 May 2021 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/113106

A. 主题的分类

C07K 16/40(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; G01N 33/573(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)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)

C07K; C12N; G01N; 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, VEN, WOTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 万方，Pubmed，STN，Genbank，ISI web of knowledge, PTK7,蛋白酪氨酸激酶7，CCK4，结肠癌激酶4，protein tyrosine kinase 7，纳米抗体，单域抗体，抗体，nanobody，single domain，单结构域，antibody，缀合物，偶联，conjugate，SEQ ID NO,1-18，和迈生物科技有限公司

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 |
|---|---|---|
| A | CN 101360761 A (米德列斯公司) 2009年2月4日 (2009-02-04)<br>全文 | 1-15 |
| A | CN 101939028 A (百时美施贵宝公司) 2011年1月5日 (2011-01-05)<br>全文 | 1-15 |
| A | CN 106659801 A (辉瑞大药厂 等) 2017年5月10日 (2017-05-10)<br>全文 | 1-15 |
| A | CN 109485726 A (和迈生物科技有限公司) 2019年3月19日 (2019-03-19)<br>全文 | 1-15 |
| A | CN 103547597 A (施特姆森特RX股份有限公司) 2014年1月29日 (2014-01-29)<br>全文 | 1-15 |
| A | CN 112955472 A (克里斯珀医疗股份公司) 2021年6月11日 (2021-06-11)<br>全文 | 1-15 |

☑ 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

“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 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 2022年10月31日 | 2022年11月17日 |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451 | 受权官员<br>蔡玉品<br>电话号码 86-(10)-53961968 |

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 |
|---|---|---|
| A | MAITLAND, M.L. 等. "First-in-Human Study of PF-06647020 (Cofetuzumab Pelidotin), an Antibody-Drug Conjugate Targeting Protein Tyrosine Kinase 7, in Advanced Solid Tumors"<br>Clin Cancer Res, 第27卷, 第16期, 2021年8月15日 (2021-08-15),<br>第4511-4520页 | 1-15 |
| A | DAMELIN, M. 等. "A PTK7-targeted antibody-drug conjugate reduces tumor-initiating cells and induces sustained tumor regressions"<br>Sci.Transl.Med., 第9卷, 2017年1月11日 (2017-01-11),<br>eaag2611 第1-11页 | 1-15 |
| A | YANG, E.Y. 等. "Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics"<br>Frontiers in Oncology, 第10卷, 2020年7月23日 (2020-07-23),<br>Article 1182 第1-17页 | 1-15 |
| A | HU, Y. 等. "Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy"<br>Frontiers in Oncology, 第8卷, 2017年11月2日 (2017-11-02),<br>Article 1442 第1-17页 | 1-15 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/113106

## 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：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

[1] 实际提交的序列表是ST.26标准的XML文件。

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/113106

## 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： 15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求15涉及一种治疗癌症的方法，也即权利要求15涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于权利要求4所述的单域抗体、权利要求10所述的免疫偶联物或权利要求13所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途作出。

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/CN2022/113106

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CN | 101360761 | A | 2009年2月4日 | SI | 1957539 | T1 | 2013年5月31日 |
| | | | | NZ | 569236 | A | 2012年6月29日 |
| | | | | EP | 1957539 | A2 | 2008年8月20日 |
| | | | | DK | 1957539 | T3 | 2013年5月6日 |
| | | | | NZ | 594466 | A | 2012年8月31日 |
| | | | | PL | 1957539 | T3 | 2013年8月30日 |
| | | | | WO | 2007067730 | A2 | 2007年6月14日 |
| | | | | HK | 1121174 | A1 | 2009年4月17日 |
| | | | | EA | 200801509 | A1 | 2008年12月30日 |
| | | | | US | 2012207764 | A1 | 2012年8月16日 |
| | | | | KR | 20080082660 | A | 2008年9月11日 |
| | | | | PT | 1957539 | E | 2013年6月25日 |
| | | | | BR | PI0619582 | A2 | 2012年12月11日 |
| | | | | SG | 177194 | A1 | 2012年1月30日 |
| | | | | US | 2010034826 | A1 | 2010年2月11日 |
| | | | | AU | 2006321841 | A1 | 2007年6月14日 |
| | | | | US | 2012219557 | A1 | 2012年8月30日 |
| | | | | CA | 2632552 | A1 | 2007年6月14日 |
| | | | | RS | 52804 | B | 2013年10月31日 |
| | | | | ES | 2406063 | T3 | 2013年6月5日 |
| | | | | NO | 20082559 | L | 2008年7月7日 |
| | | | | IN | 3482CHENP2008 | A | 2009年3月6日 |
| | | | | ME | 02002 | B | 2013年10月31日 |
| | | | | JP | 2009518039 | A | 2009年5月7日 |
| | | | | IL | 191788 | D0 | 2009年2月11日 |
| CN | 101939028 | A | 2011年1月5日 | JP | 2011505146 | A | 2011年2月24日 |
| | | | | US | 2012027782 | A1 | 2012年2月2日 |
| | | | | AR | 069903 | A1 | 2010年3月3日 |
| | | | | AU | 2008334076 | A1 | 2009年6月11日 |
| | | | | KR | 20100101124 | A | 2010年9月16日 |
| | | | | CL | 2008003527 | A1 | 2009年10月9日 |
| | | | | WO | 2009073546 | A2 | 2009年6月11日 |
| | | | | TW | 200938223 | A | 2009年9月16日 |
| | | | | MX | 2010005966 | A | 2010年6月15日 |
| | | | | EP | 2229187 | A2 | 2010年9月22日 |
| CN | 106659801 | A | 2017年5月10日 | HU | E053287 | T2 | 2021年6月28日 |
| | | | | RU | 2016143119 | A | 2018年5月30日 |
| | | | | ES | 2856927 | T3 | 2021年9月28日 |
| | | | | KR | 20210040182 | A | 2021年4月12日 |
| | | | | CA | 2947148 | A1 | 2015年11月5日 |
| | | | | ZA | 201607385 | B | 2022年5月25日 |
| | | | | PT | 3137114 | T | 2021年2月26日 |
| | | | | IL | 248475 | D0 | 2016年12月29日 |
| | | | | PE | 20170517 | A1 | 2017年5月18日 |
| | | | | BR | 112016025291 | A2 | 2017年12月26日 |
| | | | | PL | 3137114 | T3 | 2021年6月28日 |
| | | | | SG | 10201809628S | A | 2018年11月29日 |
| | | | | AU | 2015253422 | A1 | 2016年11月10日 |
| | | | | DK | 3137114 | T3 | 2021年1月25日 |
| | | | | MX | 2016014247 | A | 2017年5月30日 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/113106

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | TW | 201625312 | A | 2016年7月16日 |
| | | | | RS | 61516 | B1 | 2021年3月31日 |
| | | | | PH | 12016502142 | A1 | 2017年1月9日 |
| | | | | SG | 11201608953W | A | 2016年11月29日 |
| | | | | EP | 3711780 | A2 | 2020年9月23日 |
| | | | | JP | 2020055846 | A | 2020年4月9日 |
| | | | | AR | 100215 | A1 | 2016年9月21日 |
| | | | | KR | 20170020753 | A | 2017年2月24日 |
| | | | | AU | 2020281105 | A1 | 2021年1月7日 |
| | | | | EP | 3137114 | A2 | 2017年3月8日 |
| | | | | HR | P20210292 | T1 | 2021年4月16日 |
| | | | | LT | 3137114 | T | 2021年3月25日 |
| | | | | SI | 3137114 | T1 | 2021年11月30日 |
| | | | | WO | 2015168019 | A2 | 2015年11月5日 |
| | | | | US | 2018094075 | A1 | 2018年4月5日 |
| | | | | US | 2015315293 | A1 | 2015年11月5日 |
| | | | | JP | 2017514905 | A | 2017年6月8日 |
| CN | 109485726 | A | 2019年3月19日 | US | 2020276330 | A1 | 2020年9月3日 |
| | | | | EP | 3682907 | A1 | 2020年7月22日 |
| | | | | JP | 2020533370 | A | 2020年11月19日 |
| | | | | WO | 2019052508 | A1 | 2019年3月21日 |
| CN | 103547597 | A | 2014年1月29日 | SG | 192816 | A1 | 2013年9月30日 |
| | | | | BR | 112013021134 | A2 | 2016年11月29日 |
| | | | | IL | 228018 | D0 | 2013年9月30日 |
| | | | | RU | 2017126476 | A | 2019年1月31日 |
| | | | | RU | 2013141976 | A | 2015年3月27日 |
| | | | | HR | P20201399 | T1 | 2020年11月27日 |
| | | | | JP | 2018104409 | A | 2018年7月5日 |
| | | | | PE | 20181076 | A1 | 2018年7月4日 |
| | | | | MX | 2013009541 | A | 2014年4月30日 |
| | | | | KR | 20140018905 | A | 2014年2月13日 |
| | | | | TW | 201800421 | A | 2018年1月1日 |
| | | | | IL | 254062 | D0 | 2017年10月31日 |
| | | | | NZ | 615285 | A | 2015年9月25日 |
| | | | | LT | 2675827 | T | 2020年10月26日 |
| | | | | ZA | 201306958 | B | 2022年3月30日 |
| | | | | US | 2014105888 | A1 | 2014年4月17日 |
| | | | | NZ | 708615 | A | 2017年2月24日 |
| | | | | AR | 085281 | A1 | 2013年9月18日 |
| | | | | PH | 12018500452 | A1 | 2019年11月18日 |
| | | | | AU | 2017202934 | A1 | 2017年5月25日 |
| | | | | PL | 2675827 | T3 | 2021年1月25日 |
| | | | | DK | 2675827 | T3 | 2020年9月7日 |
| | | | | SA | 4398 | B1 | 2015年10月9日 |
| | | | | HU | E050657 | T2 | 2021年1月28日 |
| | | | | MX | 317347 | B | 2014年1月22日 |
| | | | | IL | 263020 | A | 2018年12月31日 |
| | | | | AU | 2010219313 | B2 | 2012年11月22日 |
| | | | | SG | 10201603926S | A | 2016年7月28日 |
| | | | | ES | 2829206 | T3 | 2021年5月31日 |

# 国际检索报告
## 关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/113106

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | US | 2016272723 | A1 | 2016年9月22日 |
| | | | | EP | 2675827 | A1 | 2013年12月25日 |
| | | | | AU | 2012219313 | A1 | 2013年5月2日 |
| | | | | EP | 3763388 | A1 | 2021年1月13日 |
| | | | | JP | 2014511179 | A | 2014年5月15日 |
| | | | | CN | 107056945 | A | 2017年8月18日 |
| | | | | WO | 2012112943 | A1 | 2012年8月23日 |
| | | | | AU | 2019201258 | A1 | 2019年3月14日 |
| | | | | PT | 2675827 | T | 2020年10月29日 |
| | | | | CO | 6791571 | A2 | 2013年11月14日 |
| | | | | US | 2018162952 | A1 | 2018年6月14日 |
| | | | | CA | 2827637 | A1 | 2012年8月30日 |
| | | | | PE | 20141028 | A1 | 2014年8月30日 |
| | | | | RS | 60841 | B1 | 2020年10月30日 |
| | | | | TW | 201309729 | A | 2013年3月1日 |
| | | | | SI | 2675827 | T1 | 2020年11月30日 |
| | | | | MY | 173880 | A | 2020年2月26日 |
| CN | 112955472 | A | 2021年6月11日 | US | 2020140815 | A1 | 2020年5月7日 |
| | | | | PH | 12021551047 | A1 | 2021年12月13日 |
| | | | | BR | 112021008083 | A2 | 2021年8月10日 |
| | | | | CA | 3118830 | A1 | 2020年5月14日 |
| | | | | WO | 2020095248 | A1 | 2020年5月14日 |
| | | | | IL | 282532 | A | 2021年6月30日 |
| | | | | CO | 2021005471 | A2 | 2021年4月30日 |
| | | | | SG | 11202104631S | A | 2021年6月29日 |
| | | | | US | 2021290678 | A1 | 2021年9月23日 |
| | | | | EP | 3877421 | A1 | 2021年9月15日 |
| | | | | JP | 2022509017 | A | 2022年1月20日 |
| | | | | KR | 20210092236 | A | 2021年7月23日 |
| | | | | AU | 2019374523 | A1 | 2021年5月20日 |