

(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
2024 年 3 月 28 日 (28.03.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/061223 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/119761

(22) 国际申请日: 2023 年 9 月 19 日 (19.09.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202211142594.0 2022年9月20日 (20.09.2022) CN

(71) 申请人: 普米斯生物技术(珠海)有限公司(BIOTHEUS INC.) [CN/CN]; 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

(72) 发明人: 罗羿(LUO, Yi); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 陈连娣(CHEN, Liandi); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 黄威峰(HUANG, Weifeng); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 缪小牛(MIAO, Xiaoniu); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 闫尧(YAN, Yao); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 王超(WANG, Chao); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (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, 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, 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))。

(54) Title: ANTIBODY AND USE THEREOF IN RESISTING TUMOR

(54) 发明名称: 抗体及其在抗肿瘤中的应用

(57) Abstract: Provided are an antibody and use thereof in resisting a tumor. Provided are a single-domain antibody capable of specifically binding to 4-1BB or an antigen-binding fragment thereof, and a multi-specific antibody. The antibody has improved anti-tumor activity and lower liver toxicity.

(57) 摘要: 提供抗体及其在抗肿瘤中的应用。提供能够特异性结合4-1BB的单域抗体或其抗原结合片段、以及多特异性抗体, 抗体具有提高的抗肿瘤活性以及更低的肝脏毒性。

WO 2024/061223 A1

抗体及其在抗肿瘤中的应用

本申请是以 CN 申请号为 202211142594.0，申请日为 2022 年 9 月 20 日的申请为基础，并主张其优先权，该 CN 申请的公开内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

5 本申请涉及生物治疗技术领域，具体涉及靶向 4-1BB 以及 HER2 的抗体及其在抗肿瘤中的应用。

背景技术

人表皮生长因子受体 2 (HER2/ErbB2/Neu) 是 ERBB 受体酪氨酸激酶家族的成员之一，在许多实体肿瘤中过表达，其能通过形成同源二聚体或与 ERBB 家族的其他成员形成
10 异源二聚体引起受体胞质域内酪氨酸残基的磷酸化，从而引起细胞内多种信号通路被启动导致癌细胞增殖和肿瘤发生^[1]。作为最早被用于肿瘤治疗的靶点之一，靶向 HER2 的治疗药物包括单克隆抗体(mAb，如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗)，酪氨酸激酶抑制剂(TKIs，如来那替尼和拉帕替尼)，抗体-药物结合物(ADC，如 T-DM1)等，这些药物在 HER2 过表达和/或扩增的乳腺癌或胃癌的治疗中已被广泛应用^[2]。尽管这些 HER2 靶向治疗药有良好的临床
15 效益，但是医疗需求仍未得到满足，需要持续开发新的药物以进一步提高对复发或转移患者的临床疗效。

T 细胞共刺激受体 TNFRSF9 (4-1BB)是 TNF 受体家族的一员，主要表达在活化的 T 细胞上，当被激活时，可以提高 T 细胞的效应活性和记忆反应^[3, 4]。Urelumab 是一款靶向 4-1BB 的单克隆抗体药，通过结合并激活 T 细胞上的 4-1BB 发挥疗效。但不幸的是，在
20 Urelumab 的临床开发过程中观察到了明显的肝脏相关毒性。

开发具有更好疗效以及更高安全性的抗肿瘤药物仍是本领域亟需解决的问题。

发明内容

本申请公开一种对 4-1BB 具有高结合活性的单域抗体，以及在此基础上开发得到的靶向 4-1BB 和 HER2 的多特异性抗体。特别的，本申请公开一种 HER2xHER2x4-1BB 三特
25 异性抗体，其具有独特的抗肿瘤活性，且有很强的免疫记忆效应。该抗体是一种由曲妥珠单抗和帕妥珠单抗组成的 1+1 IgG1 样异源二聚体抗体，其 C 端通过 G4S 连接子连接了一个抗 4-1BB 的单域抗体(sdAb)。该抗体保留了 Fc 效应功能，这对曲妥珠单抗和帕妥珠单抗发挥抗肿瘤活性至关重要。此外，该抗体具有更低的肝脏毒性，安全性得到提高。

单域抗体

在一个方面，本申请提供能够特异性结合 **4-1BB** 的单域抗体或其抗原结合片段，所述单域抗体包含：

(a) **CDR1**，其具有：如 **SEQ ID NO: 43** 所示的序列，或与 **SEQ ID NO: 43** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；

(b) **CDR2**，其具有：如 **SEQ ID NO: 44** 所示的序列，或与 **SEQ ID NO: 44** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；以及

10 (c) **CDR3**，其具有：如 **SEQ ID NO: 45** 所示的序列，或与 **SEQ ID NO: 45** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列。

在一些实施方案中，所述单域抗体或其抗原结合片段包含：如 **SEQ ID NO: 43** 所示的 **CDR1**、如 **SEQ ID NO: 44** 所示的 **CDR2**、如 **SEQ ID NO: 45** 所示的 **CDR3**。

15 所述单域抗体包含选自下列的氨基酸序列：

(i) 如 **SEQ ID NO: 7** 所示的序列；

(ii) 与 **SEQ ID NO: 7** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）的序列；或

20 (iii) 与 **SEQ ID NO: 7** 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、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% 的序列同一性的序列。

在一些实施方案中，所述的置换是保守置换。

术语“**4-1BB**”，也称为 **CD137** 或 **TNFRSF9**（**TNF** 受体超家族成员 9），是 **TNF** 受体超家族（**TNFRSF**）的成员，并且是一种共刺激分子，其在免疫细胞（固有免疫细胞和适应性免疫细胞两者）活化后表达。**4-1BB** 在调节各种免疫细胞的活性中起重要作用。如本文所用，**4-1BB** 可以源自哺乳动物，例如智人（**Homo sapiens**）（人）（**NCBI** 登录号 **NP_001552.2**）。

在一些实施方案中，所述单域抗体特异性结合 **4-1BB** 表位 **CRD-4**。

多肽构建体

本申请还提供特异性结合 **4-1BB** 的多肽构建体，其包含前文所述的单域抗体或其抗原结合片段，以及免疫球蛋白 **Fc** 结构域。

5 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 **Fc** 结构域直接或通过肽接头连接至所述单域抗体或其抗原结合片段的 **N** 端和/或 **C** 端（例如 **C** 端）。

在一些实施方案中，所述肽接头具有 $(G_m X_n)_l G_{m'}$ 所示结构，**m**、**m'**、**n** 和 **l** 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，**X** 选自 **A** 和 **S**；优选地，**m** 选自 1、2、3、4 或 5，**n** 选自 1 和 2，**l** 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，**m'** 选自 0 和 1，**X** 选自 **A** 和 **S**。

10 在一些实施方案中，所述肽接头具有 SEQ ID NO: 17 或 18 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 **Fc** 结构域是 **IgG** 的 **Fc** 结构域（例如 **IgG1** 的 **Fc** 结构域，例如包含 **CH2** 和 **CH3**）。

15 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 **Fc** 结构域包含 SEQ ID NO: 19 所示的序列，或与其相比具有至少 80%、至少 85%、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% 的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 **Fc** 结构域包含 SEQ ID NO: 19 或 20 所示的序列。

20 在一些实施方案中，所述多肽构建体含有如 SEQ ID NO: 31 或 32 所示的氨基酸序列或由其组成。

多特异性抗体

本申请进一步提供一种多特异性抗体，所述多特异性抗体可仅在与表达 **HER2** 的肿瘤细胞交联时活化 **4-1BB** 信号传导。此外，多特异性抗体中所包含的抗 **4-1BB** 抗体或其抗原结合片段的特征可以是，仅在肿瘤微环境(TME)中定位和/或激活，和/或与现有的抗 **4-1BB** 25 抗体相比显著地降低肝脏毒性，同时维持免疫应答增强和/或肿瘤治疗的功效。

具体地，本申请提供一种多特异性抗体，其包含前文所述的单域抗体或其抗原结合片段或多肽构建体。

本申请进一步提供一种多特异性抗体，其包含对 **4-1BB** 特异的第一抗原结合结构域，

所述第一抗原结合结构域包含前文所述的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中,所述第一抗原结合结构域包含前文所述的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中,上述任意多特异性抗体特异性结合 **4-1BB**,并且额外地特异性结合一个或多个其它靶标。

5 在一些实施方案中,所述靶标为肿瘤抗原。

在一些实施方案中,所述肿瘤抗原选自下述的一个或多个:**CD19、CD20、CD22、CD23、CD38、CD40、CD49、CD52、CD56、CD74、CD80、CD95、CD138、CS1/SLAMF7、KiR、Thy-1、Ly-6、Fas、APO-1、EGFR、HER2、CXCR4、HLA、GM1 和 DRD**。

10 在一些实施方案中,所述多特异性抗体可以结合多个相同或不同的肿瘤抗原。

在一些实施方案中,所述多特异性抗体可以结合同一肿瘤抗原上的相同或不同表位。

在一些实施方案中,所述多特异性抗体特异性结合 **HER2**。

“**HER2(人表皮生长因子受体 2)**”由 **ERBB2** 基因编码,是表皮生长因子受体(**EGFR/ErbB**)的成员。已知 **HER2** 在调节细胞增殖和分化中起重要作用。特别是,当与细胞外生长因子结合时,它具有与其他 **HER** 受体一起组装成同源和/或异源二聚体的强烈趋势,这导致数种形式的信号转导通路的活化并诱导细胞凋亡、存活或细胞增殖。例如,**HER2** 蛋白可以是以 **GenBank** 登录号 **NP_004439.2**、**NP_001005862.1** 等保藏的多肽,其分别由 **GenBank** 登录号 **NM_004448.4**、**NM_001005862.3** 等保藏的核苷酸序列(mRNA)编码。

20 将 **HER2** 识别为抗原的与 **HER2** 结合的部分可以是选自抗 **HER2** 抗体的 **scFv**、**(scFv)₂**、**Fab**、**Fab'**和 **F(ab')₂**。

在一些实施方案中,所述多特异性抗体含有抗 **HER2** 抗体的重链可变区的至少一个(例如 1、2 或 3 个) **CDR**,和/或抗 **HER2** 抗体的轻链可变区的至少一个(例如 1、2 或 3 个) **CDR**。

25 在一些实施方案中,所述多特异性抗体含有抗 **HER2** 抗体的重链可变区,和/或抗 **HER2** 抗体的轻链可变区。

在一些实施方案中,所述抗 **HER2** 抗体选自曲妥珠单抗、帕妥珠单抗及其变体。

在一些实施方案中,所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如,至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、

缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 抗体为曲妥珠单抗的变体。具体的，所述抗 HER2 抗体含有下述 3 个重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR)：

SEQ ID NO: 46 所示的 VH CDR1, SEQ ID NO: 47 所示的 VH CDR2, 和 SEQ ID NO: 5 48 所示的 VH CDR3；和/或，

下述 3 个轻链可变区 (VL) 互补决定区 (CDR)：

SEQ ID NO: 49 所示的 VL CDR1；SEQ ID NO: 50 所示的 VL CDR2, 和 SEQ ID NO: 8 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述多特异性抗体含有对 HER2 特异的第二抗原结合结构域。

10 在一些实施方案中，所述第一抗原结合结构域是 VHH；所述第二抗原结合结构域是 Fab，所述多特异性抗体包含：

(1) 肽链 I-A，其包含所述第二抗原结合结构域的轻链可变区和轻链恒定区 (CL)；

和，

(2) 肽链 I-B，其包含所述第二抗原结合结构域的重链可变区，重链恒定区，和所述 15 第一抗原结合结构域；优选地，所述肽链 I-B 从 N 端至 C 端包含相邻的所述第二抗原结合结构域的重链可变区和重链恒定区和所述第一抗原结合结构域。

在一些实施方案中，所述重链恒定区可以选自(例如，Fc 区)：IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4 的重链恒定区，具体地，人 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的重链恒定区，例如，人 IgG1 的重链恒定区，例如，人 IgG1 的 CH1、CH2 和/或 CH3，再例如，人 IgG1 的 Fc 区。

20 在一些实施方案中，所述重链恒定区被改变（例如，突变）以增加或减少以下中的一种或多种：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数量、效应细胞功能、或补体功能。

在一些实施方案中，所述重链恒定区含有 LALA 突变、CH3 Knob 突变、CH3 Hole 突变、CH1/CL 偏好性突变 CH SET1、CH1/CL 偏好性突变 CH SET2CH SET2、及其任意组合。

25 在一些实施方案中，所述重链恒定区选自：

HC-1: SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列；

HC-2: SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列；

HC-3: SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列;

HC-4: SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列;

HC-5: SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列;

HC-6: SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列;

5 HC-7: SEQ ID NO: 20 所示氨基酸序列;

HC-8: SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列; 以及

HC-9: SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列;

10 所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如, 至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加; 例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。

在一些实施方案中, 所述轻链恒定区选自 κ 或 λ 的轻链恒定区或其变体;

所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如, 至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加; 例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。

15 在一些实施方案中, 所述轻链恒定区选自:

LC-1: SEQ ID NO: 9;

LC-2: SEQ ID NO: 15; 以及,

LC-3: SEQ ID NO: 16;

20 所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如, 至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加; 例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。

在一些实施方案中, 所述肽链 I-A 的 CL 能够与所述肽链 I-B 的重链恒定区 CH1 结构域形成二聚体。

25 在一些实施方案中, 所述多特异性抗体包含两条所述肽链 I-A 以及两条所述肽链 I-B; 优选地, 两条所述肽链 I-B 的重链恒定区形成二聚体。

在一些实施方案中, 各结构域之间直接或通过肽接头连接。

在一些实施方案中，所述肽接头具有 $(G_mX_n)_lG_{m'}$ 所示结构， m 、 m' 、 n 和 l 各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10， X 选自A和S；优选地， m 选自1、2、3、4或5， n 选自1和2， l 选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10， m' 选自0和1， X 选自A和S。

5 在一些实施方案中，所述肽接头具有 SEQ ID NO: 17 或 18 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述多特异性抗体特征在于下述的一项或多项：

(i)所述第一抗原结合结构域含有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或由其组成；

(ii)所述第二抗原结合结构域的重链可变区含有如 SEQ ID NO: 1、3 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成；

10 (iii)所述第二抗原结合结构域的轻链可变区含有如 SEQ ID NO: 2、4 或 6 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述肽链 I-A 含有如 SEQ ID NO: 22、24 或 26 所示的氨基酸序列或由其组成。

15 在一些实施方案中，所述肽链 I-B 含有如 SEQ ID NO: 21、23 或 25 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述多特异性抗体选自：

(1)包含所述肽链 I-A 和 I-B 的多特异性抗体，其中，所述肽链 I-A 含有如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 I-B 含有如 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列或由其组成；

20 (2)包含所述肽链 I-A 和 I-B 的多特异性抗体，其中，所述肽链 I-A 含有如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 I-B 含有如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列或由其组成；

和，

25 (3)包含所述肽链 I-A 和 I-B 的多特异性抗体，其中，所述肽链 I-A 含有如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 I-B 含有如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列或由其组成；

优选地，所述多特异性抗体包含两条所述肽链 I-A 以及两条所述肽链 I-B；

优选地，两条所述肽链 I-B 的重链恒定区形成二聚体。

在一些实施方案中，所述多特异性抗体进一步含有对 **HER2** 特异的第三抗原结合结构域。

5 在一些实施方案中，所述第一抗原结合结构域是 **VHH**；所述第二抗原结合结构域和所述第二抗原结合结构域是 **Fab**，所述多特异性抗体包含：

(1) 肽链 **II-A**，其包含所述第二抗原结合结构域的轻链可变区和轻链恒定区 (**CL**)；

(2) 肽链 **II-B**，其包含所述第二抗原结合结构域的重链可变区，重链恒定区，和所述第一抗原结合结构域；优选地，所述肽链 **II-B** 从 **N** 端至 **C** 端包含相邻的所述第二抗原结合结构域的重链可变区和重链恒定区和所述第一抗原结合结构域；

10 (3) 肽链 **II-C**，其包含所述第三抗原结合结构域的轻链可变区和轻链恒定区 (**CL**)；
和，

(4) 肽链 **II-D**，其包含所述第三抗原结合结构域的重链可变区，重链恒定区，和所述第一抗原结合结构域；优选地，所述肽链 **II-D** 从 **N** 端至 **C** 端包含相邻的所述第三抗原结合结构域的重链可变区和重链恒定区和所述第一抗原结合结构域。

15 在一些实施方案中，所述重链恒定区可以选自(例如，**Fc** 区)：**IgG1**、**IgG2**、**IgG3**、和 **IgG4** 的重链恒定区，具体地，人 **IgG1**、**IgG2**、**IgG3**、或 **IgG4** 的重链恒定区，例如，人 **IgG1** 的重链恒定区，例如，人 **IgG1** 的 **CH1**、**CH2** 和/或 **CH3**，再例如，人 **IgG1** 的 **Fc** 区。

在一些实施方案中，所述重链恒定区被改变（例如，突变）以增加或减少以下中的一种或多种：**Fc** 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数量、效应细胞功能、或补体功能。

20 在一些实施方案中，所述重链恒定区含有 **LALA** 突变、**CH3 Knob** 突变、**CH3 Hole** 突变、**CH1/CL** 偏好性突变 **CH SET1**、**CH1/CL** 偏好性突变 **CH SET2**、及其任意组合。

在一些实施方案中，所述轻链恒定区选自 κ 或 λ 的轻链恒定区或其变体；

所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加(例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1
25 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)。

在一些实施方案中，所述肽链 **II-A** 的 **CL** 能够与所述肽链 **II-B** 的重链恒定区 **CH1** 结构域形成二聚体；优选地，所述肽链 **II-C** 的 **CL** 能够与所述肽链 **II-D** 的重链恒定区 **CH1** 结构域形成二聚体。

5 在一些实施方案中，所述多特异性抗体包含一条所述肽链 II-A、一条所述肽链 II-B、一条所述肽链 II-C、以及一条所述肽链 II-D。在一些实施方案中，所述肽链 II-B 和 II-D 的重链恒定区形成二聚体。在一些实施方案中，所述肽链 II-B 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列，所述肽链 II-D 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述肽链 II-B 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列，所述肽链 II-D 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，各结构域之间直接或通过肽接头连接。

在一些实施方案中，所述肽接头具有 $(G_mX_n)_lG_{m'}$ 所示结构， m 、 m' 、 n 和 l 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10， X 选自 A 和 S。

10 在一些实施方案中， m 选自 1、2、3、4 或 5， n 选自 1 和 2， l 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10， m' 选自 0 和 1， X 选自 A 和 S。

在一些实施方案中，所述肽接头具有 SEQ ID NO: 17 或 18 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述多特异性抗体的特征在于下述的一项或多项：

(i) 所述第一抗原结合结构域含有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或由其组成；

15 (ii) 所述第二抗原结合结构域的重链可变区含有如 SEQ ID NO: 1、3 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 所述第二抗原结合结构域的轻链可变区含有如 SEQ ID NO: 2、4 或 6 所示的氨基酸序列或由其组成；

20 (iv) 所述第三抗原结合结构域的重链可变区含有如 SEQ ID NO: 1、3 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成；

(v) 所述第三抗原结合结构域的轻链可变区含有如 SEQ ID NO: 2、4 或 6 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述肽链 II-A 含有如 SEQ ID NO: 28 或 40 所示的氨基酸序列或由其组成。

25 在一些实施方案中，所述肽链 II-B 含有如 SEQ ID NO: 27 或 39 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述肽链 II-C 含有如 SEQ ID NO: 30 或 42 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述肽链 II-D 含有如 SEQ ID NO: 29 或 41 所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述多特异性抗体选自：

(1) 包含所述肽链 II-A、II-B、II-C 和 II-D 的多特异性抗体，其中，所述肽链 II-A 含有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 II-B 含有如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 II-C 含有如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 II-D 含有如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列或由其组成；

和，

(2) 包含所述肽链 II-A、II-B、II-C 和 II-D 的多特异性抗体，其中，所述肽链 II-A 含有如 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 II-B 含有如 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 II-C 含有如 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列或由其组成，所述肽链 II-D 含有如 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列或由其组成。

肽接头

本文中所述与 4-1BB 结合的部分的 N 端或 C 端（优选 N 端）直接或通过肽接头与所述重链恒定区的 C 端或 N 端连接。

如本文所用，术语“肽接头”可以指包括 1 至 100 个氨基酸，特别是 2 至 50 个氨基酸的寡肽，每个氨基酸可以是任何种类的氨基酸，而没有任何限制。可以在有或没有适当修饰的情况下使用任何常规的肽接头以符合特定目的。在具体的实施方式中，肽接头可包含例如 Gly、Asn 和/或 Ser 残基，和/或包含中性氨基酸如 Thr 和/或 Ala。适用于肽接头的氨基酸序列可以是相关领域已知的。肽接头的长度可以在不影响多肽和/或 scFv 功能的限度内适当确定。例如，肽接头可通过包括总共约 1 至约 100 个氨基酸、约 2 至约 50 个氨基酸或约 5 至约 25 个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个）氨基酸而形成，每个氨基酸独立地选自由 Gly、Asn、Ser、Thr 和 Ala 组成的组。

在一些实施方案中，所述肽接头具有 $(G_m X_n)_l G_{m'}$ 所示结构，m、m'、n 和 l 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，X 选自 A 和 S。

在一些实施方案中，m 选自 1、2、3、4 或 5，n 选自 1 和 2，l 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，m' 选自 0 和 1，X 选自 A 和 S。

在一些实施方案中，所述肽接头具有 SEQ ID NO: 17 或 18 所示氨基酸序列。

多核苷酸、重组载体和抗体的制备

在一个方面，本发明提供一种多核苷酸，其编码前文任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

5 在一个方面，本发明提供一种载体，其包括前文所述的多核苷酸。

在一个方面，本发明提供一种重组细胞，其包括前文所述的多核苷酸或载体。重组细胞可以用重组载体转染的细胞。

10 在一个方面，本发明提供制备所述抗体或其抗原结合片段的方法，包括在细胞中表达多核苷酸。表达多核苷酸的步骤可以通过在允许多核苷酸表达的条件下培养包含多核苷酸（例如该多核苷酸在重组载体中）的细胞来进行。该方法可以进一步包括在表达或培养步骤之后，从细胞培养物中分离和/或纯化所述抗体或其抗原结合片段。

应用

本发明进一步提供本文所述抗体或其抗原结合片段在增强免疫应答和/或治疗肿瘤中的应用。

15 具体地，本发明提供一种药物组合物，其含有前文任一项所述的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、载体或重组细胞，以及药学上可接受的赋形剂。

在另一个方面，本发明提供一个提供前文任一项所述的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、载体、重组细胞或药物组合物在制备抗肿瘤药物中的用途。

20 在另一个方面，本发明提供一种抗肿瘤方法，其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的前文任一项所述的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、载体、重组细胞或药物组合物的步骤。

在一些实施方案中，所述肿瘤过表达 HER2。

25 在一些实施方案中，所述肿瘤选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌（例如，肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌）、腹膜癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、皮肤或眼球黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞腺瘤、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈部癌、

脑癌、胆道癌和胆囊癌。

在一些实施方案中，所述肿瘤为原发性或转移性肿瘤。

检测用途

5 在另一个方面，本发明还提供了缀合物，其包含如上任一方面所述的抗体或其抗原结合片段或多肽构建体，以及与所述单域抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记。

在一些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

10

在另一方面，本发明还提供了试剂盒，其包括如上任一方面所述的单域抗体或其抗原结合片段或多肽构建体、或缀合物。

在某些实施方案中，所述试剂盒还包含特异性识别所述抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体所特异性识别的抗原的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，
15 例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

在一些实施方案中，所述第二抗体与所述抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体靶向相同或不同的抗原表位。

20 在另一方面，本发明还提供了用于检测 **4-1BB** 在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用如上任一方面所述的抗体或其抗原结合片段或多肽构建体、或缀合物。

在某些实施方案中，所述方法是免疫学检测，例如免疫印迹法、酶免疫测定法（例如 ELISA）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在某些实施方案中，所述方法包括使用如上所述的缀合物。

25 在某些实施方案中，所述方法包括使用如上任一方面所述的抗体或其抗原结合片段或多肽构建体，并且所述方法还包括使用携带可检测的标记（例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素）的第二抗体来检测所述单域抗

体或其抗原结合片段或所述多肽构建体与抗原的结合。

在某些实施方案中，所述方法包括：(1) 将所述样品与所述抗体或其抗原结合片段接触；(2) 检测抗原-抗体免疫复合物的形成或检测所述免疫复合物的量。所述免疫复合物的形成表明存在 4-1BB 或表达 4-1BB 的细胞。

5

在另一方面，本申请还提供了如上任一方面所述的单域抗体或其抗原结合片段，或多肽构建体，或缀合物在制备检测试剂中的用途，所述检测试剂用于检测 4-1BB 在样品中的存在或其水平。

在某些实施方案中，所述检测试剂通过如上所述的用于检测 4-1BB 在样品中的存在或其水平的方法来检测 4-1BB 在样品中的存在或其水平。

在某些实施方案中，所述样品为来自受试者(例如哺乳动物，优选人或猴)的细胞样品(例如，肿瘤细胞)。

定义

在本文中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文所用，“至少一个(种)”或“一个(种)或多个(种)”可以表示 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个(种)或更多个(种)。

表述“包含”或与其同义的类似表述“包括”、“含有”和“具有”等是开放性的，不排除额外的未列举的元素、步骤或成分。表述“由...组成”排除未指明的任何元素、步骤或成分。表述“基本上由...组成”指范围限制在指定的元素、步骤或成分，加上任选存在的不会实质上影响所要求保护的主题的基本和新的特征的元素、步骤或成分。应当理解，表述“包含”涵盖表述“基本上由...组成”和“由...组成”。

术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。

如本文所用，“肽”、“多肽”是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸形成的聚合物。“蛋白”可以由一条或多条多肽以共价或非共价方式形成。除非另有说明，否则术语“多肽”和“蛋

白质”在本文可互换使用。

如本文所用，“抗体”指免疫球蛋白或其片段，其通过至少一个抗原结合位点特异性结合抗原表位。在本文中，抗体的定义涵盖抗原结合片段。因此，术语“抗体”包括多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单域抗体以及抗原结合片段。抗体可以是合成的(例如通过化学偶联或生物偶联产生的)、酶促处理得到的或重组产生的。本文所提供的抗体包括任何免疫球蛋白类型(例如，IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY)、任何类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类(例如，IgG2a 和 IgG2b)。在一实施方案中，本发明的抗体为鼠源单克隆抗体。在又一实施方案中，本发明的抗体为人源化单克隆抗体。

如本文所用，“传统抗体”或“全长抗体”通常包含四条多肽：两条重链(HC)和两条轻链(LC)。每条轻链从 N 末端到 C 末端包含“轻链可变区(VL)”和“轻链恒定区(CL)”。每条重链从 N 末端到 C 末端包含“重链可变区(VH)”以及“重链恒定区(CH)”。重链恒定区从 N 末端到 C 末端可以包含 CH1、CH2 和 CH3。在某些免疫球蛋白类型(例如 IgM 和 IgE)中，重链恒定区还可以包含 CH4。“Fc”片段指包含 CH2 和 CH3 的片段，其提供与 Fc 受体结合的位点。“铰链区”指抗体中连接免疫球蛋白 Fab 和 Fc 片段的部分。在有些情况下，铰链区指 T 细胞受体中连接恒定区和跨膜结构域的部分。在本文中，当对于嵌合抗原受体使用时，铰链区还可以指任何功能等同物。本领域技术人员可以根据已知的算法和软件判断 VH、VL、CL、CH1、CH2、CH3 和铰链区在抗体中的位置，可以应用的算法和软件描述可以参见例如 William R. Strohl, Lila M. Strohl, (2012), *Antibody structure-function relationships*, In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, *Therapeutic Antibody Engineering*, Woodhead Publishing, pp. 37-56。

通常，VL 和 VH 各自可以包含三个高度可变的“互补决定区(CDR)”和四个相对保守的“框架区(FR)”，并且从 N 末端到 C 末端以 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的次序连接。在本文中，轻链可变区的 CDR (CDRL)可以称为 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3，重链可变区的 CDR (CDRH)可以称为 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3。通常认为包含一对 VH 和 VL 的六个 CDR 决定抗原结合位点的结合特异性，但在某些情况下，包含少于六个 CDR(例如三、四或五个)的其他片段(例如单域抗体，又称为纳米抗体)同样具有结合抗原的能力。本领域技术人员可以使用本领域熟知的方法识别 CDR，例如使用 Kabat、Abm 或 Chothia 编号法。在本文中，对于同一个可变区可以使用多个 CDR 编号系统，例如 Chothia、Abm、Kabat 和 IMGT。本领域技术人员应当理解，尽管由不同编号系统定义的 CDR 可能会不同，但是同一编号系统对应的 CDR 代表能够结合抗原表位的有效抗原结合位点。

有关 CDR 编号系统的描述可以参见例如, Kabat 编号系统: Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia 编号系统: Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; IMGT 编号系统: Lefranc, M.-P., 2011(6), IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System Cold Spring Harb Protoc.; Abm 编号系统: Martin, A.C.R. and J. Allen (2007) "Bioinformatics tools for antibody engineering," in S. Dübel (ed.), Handbook of Therapeutic Antibodies. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, pp. 95-118.

在本文中,术语“框架区”和“构架区”可以互换使用。如本文中所使用的,术语“框架区”、“构架区”或“FR”残基是指,抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

通常认为,由一个 VH 和一个 VL 通过非共价作用构成的“Fv”片段为包含抗原结合位点的最小的抗原结合片段。但是只包含重链可变区的单域抗体(VHH, 又称 sdAb 或纳米抗体)也可以有抗原结合能力。可以通过肽接头将 VH 和 VL 连接来获得“单链 Fv (scFv)”。通过向 Fv 或 scFv 中引入二硫键可以分别获得“二硫键稳定的 Fv (dsFv)”或“单链二硫键稳定的 Fv (scdsFv 或 dsscFv)”。在一些实施方案中,例如本发明的单域抗体、双特异性抗体、多特异性抗体中的抗原结合片段优选使用 scFv 或 scdsFv。

如本文所用,“Fab”包含一个完整的抗体轻链(VL-CL)和抗体重链可变区和一个重链恒定区(VH-CH1, 也称为 Fd)。用肽接头将“Fab”中的 CL 和 CH1 连接可以获得单链“Fab (scFab)”。“F(ab')₂”基本上包含通过铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片段。“Fab”为 F(ab')₂ 的一半,其可以通过还原 F(ab')₂ 铰链区的二硫键获得。

抗体或抗原结合片段可以是“单价”、“二价”、“三价”或“四价”或更多价,是指其具有多个抗原结合位点(例如 1、2、3 或 4 个或者更多个)。

当抗体或抗原结合片段所结合的抗原为两种或更多种(例如 2、3、4、5 或 6 种)时,其又可以称为“多特异性抗体”,例如双特异性抗体、三特异性抗体或四特异性抗体,其分别表示能够结合 2、3 或 4 种抗原的多特异性抗体。

如本文所用,“双抗体(diabody)”指这样的抗体,其包含两个 scFv,具有两个抗原结合位点(二价),其中每个 scFv 中的 VH 和 VL 之间通过短肽接头(大约 5-10 个氨基酸残基)连接,使得 VH 和 VL 链间配对(即第一 scFv 的 VH 和第二 scFv 的 VL 配对,第一 scFv 的 VL 和第二 scFv 的 VH 配对)形成抗原结合位点。双抗体可以是双特异性抗体。

如本文所用，抗体的“抗原结合片段”指全长抗体的部分，其少于全长，但是至少包含全长抗体的部分可变区(例如包含一个或多个 **CDR** 和/或一个或多个抗原结合位点)，并因此保留全长抗体的至少部分特异性结合抗原的能力。抗原结合片段可以例如包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物、合成产生的衍生物、重组产生的衍生物。抗原结合片段的实例包括但不限于 **Fv**、**scFv**、**dsFv**、**scdsFv**、**Fab**、**scFab**、**Fab'**、**F(ab')₂**、双抗体、**Fd** 和 **Fd'** 片段以及其他片段(例如包含修饰的片段)。抗原结合片段可以包含多条肽链，例如通过二硫键和/或通过肽接头连接和/或非共价作用构成。

如本文使用，术语“单克隆抗体”是指一群高度均质的抗体，其中所包含的抗体分子之间除了可能少量存在的可能天然发生的突变之外是基本相同的。单克隆抗体通常特异性结合单一的抗原表位。本文所述单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方法制备，例如从转基因动物中产生(例如转基因小鼠)、由永生化的 **B** 细胞(例如 **B** 细胞杂交瘤)产生，或者使用重组 **DNA** 方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备，或者从噬菌体抗体文库中分离。本发明的抗体或抗原结合片段为单克隆抗体。在一实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段为人源化单克隆抗体。

“嵌合抗体”指这样的抗体，其中的一部分(例如 **CDR**、**FR**、可变区、恒定区或其组合)与衍生自特定物种的抗体中相应序列相同或同源，剩余的部分与衍生自另一物种的抗体中相应序列相同或同源。在本文中，“嵌合抗体”还涵盖包含属于不同抗体类型或亚类的部分的抗体。在一具体实施方案中，所述嵌合抗体具有鼠源抗体可变区和人源抗体恒定区。

如本文所用，“人源化抗体”指含有非人源抗体和人源抗体序列的抗体。因此，人源化抗体是含有衍生自非人免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。非人抗体可以是来源于任何非人物种的抗体或其中包含非人物种来源的部分的抗体(例如嵌合抗体)。非人物种例如可以包括小鼠、大鼠、兔、羊驼或非人灵长类动物。由非人抗体获得人源化抗体的技术是本领域技术人员熟知的。人源化抗体可以由非人抗体(例如鼠源抗体或嵌合抗体)产生，例如，将非人抗体(例如鼠源抗体)的 **CDR** 序列移植到人抗体框架区中。在某些情况下，为了保持人源化抗体的抗原结合能力和/或稳定性，可以在人抗体框架区中保留非人抗体(例如鼠源抗体)框架序列的关键氨基酸残基，即进行“回复突变”(参见，例如 **Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81(21): 6851-6855**; **Neuberger et al. (1984) Nature 312: 604-608**)。

如本文所用，氨基酸序列的“百分比(%)序列同一性”、“序列同一性”具有本领域公认的定义，其指通过序列比对(例如通过人工检视或可公知的算法)确定的两个多肽序列之间相同的百分比。可以使用本领域技术人员已知的方法确定，例如使用可公开获得的计算机

软件如 BLAST、BLAST-2、Clustal Omega、FASTA 软件。

“亲和力”或“结合亲和力”用来衡量抗体和抗原之间通过非共价作用相互结合的程度。
“亲和力”的大小通常可以报告为平衡解离常数 K_D 或 EC_{50} 。 K_D 可以通过测量平衡缔合常数 (ka) 和平衡解离常数(kd)来计算: $K_D = kd/ka$ 。可以用本领域已知的常规技术测定亲和力,
5 例如生物膜干涉技术(可以采用例如 Octet Fortebio 检测系统)、放射免疫法、表面等离子共振法、酶联免疫测定或流式细胞术等。

在本文中, 抗体和抗原“特异性结合”是指抗体和抗原之间以较高的亲和力相互结合。通常, 特异性结合的两个抗体和抗原之间的 K_D 值为至少约 10^{-6} 到至少约 10^{-9} M 或更低, 例如至少约 10^{-6} 、至少约 10^{-7} 、至少约 10^{-8} 、至少约 10^{-9} M 或更低。

10 在本文中, “源自”或“衍生自”参考氨基酸序列的氨基酸序列与所述参考氨基酸序列部分或者全部相同或同源。例如, 衍生自人免疫球蛋白的重链恒定区的氨基酸序列与其所源自的人免疫球蛋白重链恒定区的野生型序列具有至少 80%、至少 85%、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% 的序列同一性。

15 在本文中, 多肽或氨基酸序列的“变体”与其所源自的多肽或氨基酸序列相比, 具有一个或多个氨基酸突变或修饰。氨基酸突变包括氨基酸的置换、缺失或添加。本领域技术人员应当理解多肽或蛋白中非必需区中的氨基酸可以用合适的保守氨基酸置换, 并且一般不改变其生物活性(参见, 例如 Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224)。合适的保守置换是本领域技术人员熟知的。在
20 下表列出一些常见的氨基酸残基保守置换的非限制性实例。在某些情况下, 氨基酸置换是非保守置换。本领域即是人员应当理解, 可以对抗体或抗体片段进行氨基酸突变或修饰来改变其性能, 例如改变抗体糖基化修饰的类型, 改变形成链间二硫键的能力。包含这类氨基酸突变或修饰的抗体或其抗原结合片段也涵盖在本发明的抗体或其抗原结合片段的范围之内。

原始残基	示例性的保守置换	优选的置换
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser

Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	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)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu

在本文中，术语“多核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物，通常可以包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

如本文所用，“分离的”是指物质(例如核酸分子或多肽)与其存在的来源或环境是分离的，即基本上不包含其他任何成分。

5 在本文中，“载体”是用于将外源核酸导入宿主细胞的媒介，当载体转化入适当的宿主细胞时，外源核酸得以扩增或表达。载体通常保持游离，但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。如本文所用，载体的定义涵盖质粒、线性化质粒、病毒载体、粘粒、噬菌体载体、噬菌粒、人工染色体(例如，酵母人工染色体和哺乳动物人工染色体)等。

10 如本文所用，“表达载体”指能够表达 DNA 的载体，所述 DNA 与能够影响 DNA 表达的调控序列(如启动子、核糖体结合位点)可操作地连接。调控序列可以包含启动子和终止子序列，并且任选地可以包含复制起点、选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体可以是质粒、噬菌体载体、重组病毒或其他载体，当引入适当的宿主细胞时，导致克隆 DNA 的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的，并且包含在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

15 体。

如本文所用,“重组细胞”是用于接受、保持、复制或扩增载体的细胞。重组细胞还可以用来表达核酸或载体所编码的多肽。重组细胞可以是真核细胞或原核细胞。

如本文所用,术语“治疗”指对疾病/症状的改善,例如使疾病/症状减轻或消失、防止或减缓疾病/症状的发生、进展和/或恶化。因此,治疗包括预防、治疗和/或治愈。

5 “有效量”是指这样的剂量,其足以使疾病症状的严重性降低,疾病无症状期的频率和持续时间增加,或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。“有效量”指防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或症状所需的量。例如,对于肿瘤的治疗,相对于未接受治疗的对象,“有效量”的本发明的抗体或其抗原结合片段、或药物组合物优选地将肿瘤细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%,优选至少约 20%,更优选至少约 30%,更优选
10 至少约 40%,更优选至少约 50%,更优选至少约 60%,更优选至少约 70%,更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的效力可以利用本领域常规的肿瘤动物模型评估,例如自发性肿瘤、诱发性肿瘤、移植性肿瘤动物模型。或者,也可以利用本领域公知的体外检测方法检查抑制细胞生长的能力。有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段、或药物组合物能够减小肿瘤大小,或以其他方式缓解对象的症状(如预防和/或治疗转移或复
15 发)。本领域技术人员可以根据例如对象的年龄、身体状况、性别、症状的严重程度、特定组合物或给药途径等因素来确定有效量。有效量可以在一次或多次施用中给予。

如本文中所使用的,术语“药学上可接受的赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的赋形剂,其是本领域公知的(参见例如 **Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995**),
20 并且包括但不限于: pH 调节剂、表面活性剂、佐剂、离子强度增强剂、稀释剂、维持渗透压的试剂、延迟吸收的试剂、防腐剂。例如, pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子、阴离子或者非离子型表面活性剂,例如 **Tween-80**。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂,例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、**NaCl**
25 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水、水性缓冲液(如缓冲盐水)、醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂,例如硫柳汞、2-苯氧乙醇、对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义,其能够稳定药物中的活性成分的期望活性,包括但不限于谷氨酸钠、明胶、**SPGA**、糖类(如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、乳糖、葡
30 聚糖、或葡萄糖)、氨基酸(如谷氨酸、甘氨酸)、蛋白质(如干燥乳清、白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。

如本文所用，哺乳动物的实例包括但不限于人、非人灵长类动物、大鼠、小鼠、牛、马、猪、羊、狗、猫等。在本文中，术语“对象”是指哺乳动物，例如人。在一些实施方案中，对象是人。在一些实施方案中，对象是癌症患者、怀疑患有癌症或处于患癌风险中的人或者动物。在本文中，术语“对象”和“受试者”可以互换使用。

5 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本申请的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 显示本申请所述多特异性抗体结构示意图。

图 2 显示在过表达 **HER2** 的细胞 **N87** 和 **CT26** 上检测本发明所述多特异性抗体与人
10 **HER2** 的结合情况。

图 3 显示在过表达人 **4-1BB** 的细胞 **CHO-h4-1BB** 上检测本发明所述多特异性抗体与人
4-1BB 的结合情况。

图 4 显示本发明所述多特异性抗体与 **FcR** 的结合情况。

图 5 显示本发明所述多特异性抗体阻断 **HER2** 信号依赖的细胞 **N87** 或 **SK-OV-3** 的增
15 殖。

图 6 显示本发明所述多特异性抗体通过 **HER2** 介导 **ADCC** 作用。

图 7 显示 **HER2** 介导本发明所述多特异性抗体诱导 **Primary T cell** 释放细胞因子 **IL-2**、
IFN- γ 。

图 8 显示 **FcR** 介导本发明所述多特异性抗体诱导 **primary T** 细胞释放细胞因子 **IL-2**、
20 **IFN- γ** 。

图 9 显示本发明所述多特异性抗体 **HER2xHER2x4-1BB** 的 **SEC** 以及 **LC/MS** 检测结果。

图 10 显示本发明所述多特异性抗体在 **h-4-1BB KI BALB/c** 小鼠皮下接种
CT26-h-HER2 的肿瘤模型中对肿瘤抑制活性，图 10A：给药后 0-15 天对肿瘤体积影响，
图 10B：小鼠肿瘤内 **CD8+T** 细胞浸润情况。

25 图 11 显示本发明所述多特异性抗体在 **h-4-1BB KI BALB/c** 小鼠皮下接种
CT26-h-HER2 的肿瘤模型中对肿瘤抑制活性（给药后 11-27 天对肿瘤体积影响）。

图 12 显示本发明所述多特异性抗体在 **h-4-1BB KI C57** 小鼠皮下接种 **MC38-h-HER2**

的肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的，绝不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

序列信息简表

SEQ ID NO:	描述
1	anti-Trastuzumab mAb 重链可变区
2	anti-Trastuzumab mAb 轻链可变区
3	anti-Pertuzumab mAb 重链可变区
4	anti-Pertuzumab mAb 轻链可变区
5	anti-HER2 mAb 重链可变区
6	anti-HER2 mAb 轻链可变区
7	anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 4-1BB 结合区域
8	anti-HER2 mAb VLCDR3
9	人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列
10	人 IgG1 氨基酸序列
11	人 IgG1 氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能)
12	人 IgG1 氨基酸序列
13	CH1/CL 偏好性突变的人 IgG1 Fc 氨基酸序列 CH SET1 (引入 Knob 突变)
14	CH1/CL 偏好性突变的人 IgG1 Fc 氨基酸序列 CH SET2 (引入 Hole 突变)
15	CH1/CL 偏好性突变的人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列 CL SET1
16	CH1/CL 偏好性突变人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列 CL SET2
17	(G4S)4G
18	(G4A)4
19	人 IgG1 Fc 氨基酸序列

20	人 IgG1 Fc 氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能)
21	HER2x4-1BB-1 重链 (HER2x4-1BB-1 肽链#1)
22	HER2x4-1BB-1 轻链 (HER2x4-1BB-1 肽链#2)
23	HER2x4-1BB-2 重链 (HER2x4-1BB-2 肽链#1)
24	HER2x4-1BB-2 轻链 (HER2x4-1BB-2 肽链#2)
25	HER2x4-1BB-3 重链 (HER2x4-1BB-3 肽链#1)
26	HER2x4-1BB-3 轻链 (HER2x4-1BB-3 肽链#2)
27	HER2x HER2x4-1BB-1 重链 1 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#1)
28	HER2x HER2x4-1BB-1 轻链 1 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#2)
29	HER2x HER2x4-1BB-1 重链 2 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#3)
30	HER2x HER2x4-1BB-1 轻链 2 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#4)
31	Anti-4-1BB VHH-1
32	Anti-4-1BB VHH-2
33	Urelumab 重链 (Urelumab 肽链#1)
34	Urelumab 轻链 (Urelumab 肽链#2)
35	PRS-343 重链 (PRS-343 肽链#1)
36	PRS-343 轻链 (PRS-343 肽链#2)
37	人 IgG1 氨基酸序列 HC-1
38	人 IgG1 氨基酸序列 HC-2
39	HER2x HER2x4-1B-2 重链 1 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#1)
40	HER2x HER2x4-1B-2 轻链 1 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#2)
41	HER2x HER2x4-1BB-2 重链 2 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#3)
42	HER2x HER2x4-1BB-2 轻链 2 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#4)
43	anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 CDR1
44	anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 CDR2
45	anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 CDR3
46	anti-HER2 mAb VHCDR1
47	anti-HER2 mAb VHCDR2
48	anti-HER2 mAb VHCDR3
49	anti-HER2 mAb VLCDR1
50	anti-HER2 mAb VLCDR2

SEQ ID NO: 1: anti-Trastuzumab mAb 重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
5 WGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 2: anti-Trastuzumab mAb 轻链可变区

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

10

SEQ ID NO: 3: anti-Pertuzumab mAb 重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY
WGQGTTLVTVSS

15

SEQ ID NO: 4: anti-Pertuzumab mAb 轻链可变区

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK

20

SEQ ID NO: 5: anti-HER2 mAb 重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TQGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEGFYAMDY
WGQGTTLVTVSS

25

SEQ ID NO: 6: anti-HER2 mAb 轻链可变区

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVQGAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHSTTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 7: anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 4-1BB 结合区域

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITG
DGDNTYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGH
5 EYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 8: anti-HER2 mAb VLCDR3

QQHSTTPPT

10 SEQ ID NO: 9: 人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 10: 人 IgG1 氨基酸序列

15 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
20 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 11: 人 IgG1 氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
25 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 12: 人 IgG1 氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
5 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10 **SEQ ID NO: 13: CH1/CL 偏好性突变的人 IgG1 Fc 氨基酸序列 CH SET1 (引入 Knob 突变)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCQVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYELSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
15 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20 **SEQ ID NO: 14: CH1/CL 偏好性突变的人 IgG1 Fc 氨基酸序列 CH SET2 (引入 Hole 突变)**

ASTKGPSVFPRAPSSKSTSGGTAALGCLVRDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
25 PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 15: CH1/CL 偏好性突变的人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列 CL SET1

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGRASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSRLQLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 16: CH1/CL 偏好性突变人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列 CL SET2

5 RTVAAPSVFIFPPSDEELKSGTASVQCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSRLQLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 17: (G4S)4G

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG

10

SEQ ID NO: 18: (G4A)4

GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA

SEQ ID NO: 19: 人 IgG1 Fc 氨基酸序列

15 THTCPPEPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSFGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

20

SEQ ID NO: 20: 人 IgG1 Fc 氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能)

THTCPPEPAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
25 ENNYKTTTPVLDSFGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

SEQ ID NO: 21: HER2x4-1BB-1 重链 (HER2x4-1BB-1 肽链#1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
5 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM
GWYRQAPGKQRELVASITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNSTMYLQMNSLKPED
TAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 22: HER2x4-1BB-1 轻链 (HER2x4-1BB-1 肽链#2)

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 SEQ ID NO: 23: HER2x4-1BB-2 重链 (HER2x4-1BB-2 肽链#1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
25 KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM

GWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPED
TAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 24: HER2x4-1BB-2 轻链 (HER2x4-1BB-2 肽链#2 序列)

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO: 25: HER2x4-1BB-3 重链 (HER2x4-1BB-3 肽链#1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADV
NPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
15 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM
20 GWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPED
TAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 26: HER2x4-1BB-3 轻链 (HER2x4-1BB-3 肽链#2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDV SIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
25 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 27: HER2x HER2x4-1BB-1 重链 1 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TQGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEFGFYAMDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCQVEDYFPEPVTVSWNSGAL
5 TSGVHTFPAVLQSSGLYELSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM
GWYRQAPGKQRELVASITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPED
TAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 28: HER2x HER2x4-1BB-1 轻链 1 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#2)

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVQGAWAYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHSTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGRASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSRLQLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 SEQ ID NO: 29: HER2x HER2x4-1BB-1 重链 2 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVN
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPRAPSSKSTSGGTAALGCLVRDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
25 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM

GWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPED
TAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 30: HER2x HER2x4-1BB-1 轻链 2 (HER2x HER2x4-1BB-1 肽链#4)

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEELKSGTASVQCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSELTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO: 31: Anti-4-1BB VHH-1

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
15 SPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIV
AMGWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKP
EDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 32: Anti-4-1BB VHH-2

20 THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIV
25 AMGWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKP
EDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 33: Urelumab 重链 (Urelumab 肽链#1)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINH
GGYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPGNYDWYFDL
WGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
5 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

10 SEQ ID NO: 34: Urelumab 轻链 (Urelumab 肽链#2)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDEAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

SEQ ID NO: 35: PRS-343 重链 (PRS-343 肽链#1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPPTVSWNSGAL
20 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKGG
25 GGSGGGGGSGGGGSQDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL
REDKDPIKMMATIYELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTFVPGSQPGFTLGKI
KSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKVFQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRE
SKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

SEQ ID NO: 36: PRS-343 轻链 (PRS-343 肽链#2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
5 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 37: 人 IgG1 氨基酸序列 HC-1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
10 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTEPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLLSVLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

15 SEQ ID NO: 38: 人 IgG1 氨基酸序列 HC-2

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
20 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLR
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 39: HER2x HER2x4-1B-2 重链 1 (HER2x HER2x4-1B-2 肽链#1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
25 TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

KTISKAKGQPREPQVYTEPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLLSVLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAM
GWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPED
5 TAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 40: HER2x HER2x4-1B-2 轻链 1 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
10 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 41: HER2x HER2x4-1BB-2 重链 2 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADV N
15 PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
20 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLRSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVA
MGWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKP
DTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

25

SEQ ID NO: 42 HER2x HER2x4-1BB-2 轻链 2 (HER2x HER2x4-1BB-2 肽链#4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
TGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS

TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 43 anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 CDR1

GSTFSIVA

5

SEQ ID NO: 44 anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 CDR2

IITGDGDT

SEQ ID NO: 45 anti-4-1BB 纳米抗体 AB24 ME 的 CDR3

10

YARTGYGSSELEGHEYDY

SEQ ID NO: 46 anti-HER2 mAb VHCDR1

GFNIKDTY

15

SEQ ID NO: 47 anti-HER2 mAb VHCDR2

IYPTQGYT

SEQ ID NO: 48 anti-HER2 mAb VHCDR3

SRWGGE GFYAMDY

20

SEQ ID NO: 49 anti-HER2 mAb VLCDR1

QSVQGA

SEQ ID NO: 50 anti-HER2 mAb VLCDR2

25

SAS

实施例 1. 多特异性抗体的克隆和表达

在本实施例中, 构建了 3 种 HER2x4-1BB 双特异性抗体, 2 种抗 HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体和 2 种 4-1BB 单克隆抗体, 分别为:

HER2x4-1BB-1: 由 2 条多肽链组成, 其结构示意图如图 1 所示, 肽链#1 具有 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Trastuzumab (专利申请号: WO1992022653A1) 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 以及人 IgG1 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 10)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)₄ (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链#2 具有 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Trastuzumab (专利申请号: WO1992022653A1) 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)。

HER2x4-1BB-2: 由 2 条多肽链组成, 其结构示意图如图 1 所示, 肽链#1 具有 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Trastuzumab (专利申请号: WO1992022653A1) 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 以及人 IgG1 氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能, SEQ ID NO: 11)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)₄ (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链#2 具有 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Trastuzumab (专利申请号: WO1992022653A1) 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)。

HER2x4-1BB-3: 由 2 条多肽链组成, 其结构示意图如图 1 所示, 肽链#1 具有 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Pertuzumab (专利申请号: US7449184) 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3) 以及人 IgG1 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 12)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)₄ (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链#2 具有 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Pertuzumab (专利申请号: US7449184) 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)。

HER2xHER2x4-1BB-1: 由 4 条多肽链组成, 其结构示意图如图 1 所示, 肽链#1 具有 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体的重链可变区氨基酸序

列 (SEQ ID NO: 5) 以及人 IgG1 氨基酸序列引入 CH3 Knob 突变和 CH1/CL 偏好性突变 CH SET1 (专利申请号: WO2021067404A2, SEQ ID NO: 13)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)4 (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链#2 具有 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列引入 CH1/CL 偏好性突变 CL SET1 (专利申请号: WO2021067404A2, SEQ ID NO: 15)。肽链#3 具有 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Pertuzumab (专利申请号: US7449184) 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3) 以及人 IgG1 氨基酸序列引入 CH3 Hole 突变和 CH1/CL 偏好性突变 CH SET2 (专利申请号: WO2021067404A2, SEQ ID NO: 14)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)4 (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链 #4 具有 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Pertuzumab (专利申请号: US7449184) 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列引入 CH1/CL 偏好性突变 CL SET2 (专利申请号: WO2021067404A2, SEQ ID NO: 16)。

HER2xHER2x4-1BB-2: 由 4 条多肽链组成, 其结构示意图如图 1 所示, 肽链#1 按照专利 (专利申请号: 201611016435.0) 中描述的方法合成具有 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列, 包含抗 HER2 的单克隆抗体 Trastuzumab (专利申请号: WO1992022653A1) 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 及可以自发形成异源二聚体的人 IgG1 氨基酸序列 HC-1 (SEQ ID NO: 37, 专利申请号: PCT/CN2017/111310)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)4 (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链#2 具有 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列, 其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Trastuzumab (专利申请号: WO1992022653A1) 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区 (CL) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)。肽链#3 按照专利 (专利申请号: 201611016435.0) 中描述的方法合成具有 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列, 包含抗 HER2 的单克隆抗体 Pertuzumab (专利申请号: US7449184) 的重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3) 及可以自发形成异源二聚体的人 IgG1 氨基酸序列 HC-2 (SEQ ID NO: 38, 专利申请号: PCT/CN2017/111310)。将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)4 (SEQ ID NO: 18) 的

柔性肽连接于 Fc 的 C 端。肽链#4 具有 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列,其包含抗 HER2 的单克隆抗体 Pertuzumab (专利申请号: US7449184) 的轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4), 以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列 (SEQ ID NO: 9)。

5 **Anti-4-1BB-VHH-1:** 由 2 条多肽链组成, 具有 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列, 其包含人 IgG1 Fc 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 19) 以及将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 21 个氨基酸残基(G4S)4G (SEQ ID NO: 17) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。

10 **Anti-4-1BB-VHH-2:** 由 2 条多肽链组成, 具有 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列, 其包含人 IgG1 Fc 氨基酸序列 (引入 LALA 突变以降低 Fc 功能, SEQ ID NO: 20) 以及将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 21 个氨基酸残基(G4S)4G (SEQ ID NO: 17) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。

在本实施例中, 构建了阳性对照分子 Urelumab 和 PRS343:

15 **Urelumab:** 对照分子 Urelumab (专利申请号: WO2004010947) 由 2 条多肽链组成, 肽链#1 具有 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列, 肽链#2 具有 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

PRS-343: 对照分子 PRS-343 (专利申请号: WO2016177802A1) 由 2 条多肽链组成, 肽链#1 具有 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列, 肽链#2 具有 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

20 实施例 2. 多特异性抗体与人 HER2 结合

本实验将扩大培养的 N87 细胞 (自身表达 HER2) 和 CT26-hHER2 (过表达人 HER2) 细胞用 0.25% EDTA trypsin 消化, 用培养基清洗一次后调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml, 100 μ l/孔加入 96 孔流式板, 离心备用。将梯度稀释后的抗体按 100 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中, 4°C 孵育 60 min。PBS 清洗两次后, 100 μ l/孔加入用 2% BSA 溶液稀释 25 1000 倍的 Goat anti-human IgG-Fc (PE) (Abcam, ab98596), 4°C 孵育 60 min。PBS 清洗两次, 最后按 100 μ l/孔加入 PBS 重悬细胞, 在 CytoFlex(Beckman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的平均荧光强度 (MFI)。

实验结果如图 2 和表 1-2 所示, 本发明的 HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体和 HER2x4-1BB 双特异性抗体与人胃癌细胞 N87(图 2A)和过表达人 HER2 的 CT26 细胞(图

2B) 上表达的 HER2 均结合，且结合活性与 HER2 单抗 (Trastuzumab 或 Pertuzumab) 相当。

表 1: 多特异性抗体与人胃癌细胞 N87 上过表达的 HER2 的结合情况

Antibody	EC50 (nM)
HER2×4-1BB-1	1.876
HER2×4-1BB-3	2.769
HER2×HER2×4-1BB-1	2.650
HER2×HER2×4-1BB-2	2.877
Trastuzumab	1.441
Pertuzumab	1.737
PRS-343 Analog	1.253
anti-4-1BB vHH-1	N/A
Urelumab Analog	N/A
Neg Ctrl	N/A

表 2: 多特异性抗体与 CT26 上过表达的人 HER2 的结合情况

Antibody	EC50 (nM)
HER2×4-1BB-1	1.170
HER2×4-1BB-3	1.755
HER2×HER2×4-1BB-1	1.823
HER2×HER2×4-1BB-2	1.812
Trastuzumab	1.084
Pertuzumab	1.171
PRS-343 Analog	1.080
anti-4-1BB vHH-1	N/A
Urelumab Analog	N/A
Neg Ctrl	N/A

5 实施例 3. 多特异性抗体与人 4-1BB 结合

本实验将扩大培养的 CHOS-h4-1BB (过表达人 4-1BB) 细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml, 100 μ l/孔加入 96 孔流式板, 离心备用。将梯度稀释后的抗体按 100 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中, 4°C 孵育 60 min。PBS 清洗两次, 100 μ l/孔加入用 2% BSA

溶液稀释 1000 倍的 Goat anti-human IgG-Fc (PE) (Abcam,ab98596), 4°C 孵育 60 min。PBS 清洗两次, 最后按 100 μl/孔加入 PBS 重悬细胞, 在 CytoFlex (Beckman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的 MFI。

实验结果如图 3 和表 3 所示, 本发明的 HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体及
5 HER2x4-1BB 双特异性抗体与 CHOS-h4-1BB 细胞均有结合活性, 且结合活性与 4-1BB 的
单抗分子(anti-4-1BB VHH)相当, 弱于对照抗体 Urelumab 和 PRS-343。

表 3: 多特异性抗体与 CHOS 细胞上过表达的人 4-1BB 的结合情况

Antibody	EC50 (nM)
HER2x4-1BB-1	7.853
HER2x4-1BB-3	10.900
HER2xHER2x4-1BB-1	6.990
HER2xHER2x4-1BB-2	6.003
Trastuzumab	N/A
Pertuzumab	N/A
PRS-343 Analog	2.960
anti-4-1BB vHH-1	4.605
Urelumab Analog	0.316
Neg Ctrl	N/A

实施例 4. 多特异性抗体与人 FcR 结合

本实验将扩大培养的细胞 THP-1 (自身表达 FcRs) 和 CHOS-hCD32b (过表达人
10 FcγRIIb) 细胞调整细胞密度至 2×10⁶ 细胞/ml, 100 μl/孔加入 96 孔流式板, 离心备用。将
梯度稀释后的抗体按 100 μl/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中, 4°C 孵育 60 min。PBS
清洗两次, 100 μl/孔加入用 2% BSA 溶液稀释 1000 倍的 Goat anti-human IgG-Fc (PE)
(Abcam, ab98596), 4°C 孵育 60 min。PBS 清洗两次, 最后按 100 μl/孔加入 PBS 重悬细胞,
在 CytoFlex(Beckman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的平均荧光强度 (MFI)。

15 实验结果如图 4 和表 4-5 所示, 本发明保留 Fc effector 功能的 HER2xHER2x4-1BB 三
特异性抗体及 HER2x4-1BB 双特异性抗体与 THP-1 (自身表达 FcRs, 图 4A) 和
CHOS-hCD32b(过表达人 FcR, 图 4B)细胞上表达的 FcγRIIb 均结合。HER2xHER2x4-1BB
三特异性抗体的 Fc 采用了 Knob in Hole 突变, 因此其与 FcR 的结合活性略弱于采用了野
生型人 IgG1 Fc 的 HER2x4-1BB 双特异性抗体和 HER2 单克隆抗体。Urelumab 和 PRS-343

的 Fc 分别采用的是野生型人 IgG4 Fc 或人 IgG4 Fc 携带 FALA 突变，因此其与 FcR 的亲
和力要弱于保留了 Fc effector 功能的多特异性抗体。

表 4：多特异性抗体与 FcR 的结合情况 (THP-1)

Antibody	EC50 (nM)
HER2×4-1BB-1	1.224
HER2×4-1BB-3	1.053
HER2×HER2×4-1BB-1	1.224
HER2×HER2×4-1BB-2	2.274
Trastuzumab	0.731
Pertuzumab	0.716
PRS-343 Analog	N/A
anti-4-1BB vHH-1	N/A
Urelumab Analog	0.462
Neg Ctrl	N/A

表 5：多特异性抗体与 FcR 的结合情况(CHOS-hCD32b)

Antibody	EC50 (nM)
HER2×4-1BB-1	52.600
HER2×4-1BB-3	3.416
HER2×HER2×4-1BB-1	1.064
Trastuzumab	14.120
Pertuzumab	1.355
PRS-343 Analog	N/A
anti-4-1BB vHH-1	N/A
Urelumab Analog	65.240
Neg Ctrl	N/A

5 实施例 5. 多特异性抗体阻断 HER2 信号依赖的细胞增殖

本实验将扩大培养的 N87 和 SK-OV-3（自身表达 HER2）细胞用 0.25% EDTA trypsin 消化，用培养基清洗一次后调整细胞密度至 5×10⁴ 细胞/ml，80μl/孔加入 96 孔板中，备用。将梯度稀释后的抗体按 80 μl/孔加入上述带有细胞的 96 孔板中，置于细胞培养箱中孵育 3-5 天。最后用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(Promega,G7572)试剂盒显色后

用酶标仪收集化学发光信号。

结果如图 5A 和 5B 所示,多特异性抗体均能够明显抑制 N87 或 SK-OV-3 细胞的增殖,其中 HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体对细胞增殖抑制作用要明显强于 HER2-4-1BB 双特异性抗体或者 HER2 单克隆抗体。此外,HER2 抗体对肿瘤细胞的抑制作用与细胞上

5 HER2 的表达量紧密相关,HER2 表达量越高,抗体对细胞的增殖抑制作用更加明显。

实施例 6. 多特异性抗体诱导 ADCC 效应 (报告基因)

本实验将扩大培养的 N87 (自身表达 HER2) 细胞和 CHOS-h4-1BB (过表达人 4-1BB) 细胞按照 3×10^4 个/孔与 1.2×10^5 个/孔的 NFAT Luciferase/Jurkat CD16a (过表达 CD16a 和 NFAT-Luc) 效应细胞混合接种至 96 孔细胞培养白底板中,随后将梯度稀释后的多特异性

10 抗体加入 96 孔板中并混匀,置于细胞培养箱中孵育 6 小时。使用 Bio-Glo luciferase assay system (Promega,G7940)试剂盒显色后用酶标仪收集化学发光信号。

实验结果如图 6A 和 6C 和表 6-7 所示,保留 Fc effector 功能的多特异性抗体都能通过 N87 细胞上表达的 HER2 介导 ADCC 作用,从而激活 Jurkat 细胞上的 CD16a-NFAT 信号通路。相反地,通过 LALA 突变去除 Fc effector 功能的 HER2x4-1BB-2 双抗及在 IgG4 Fc

15 基础上引入 FALA 突变的对照分子 PRS-343 均不能诱导 ADCC 效应。另外,当使用 CHOS-h4-1BB 细胞作为靶细胞时,如图 6B 结果表明,所有的多特异性抗体均没有观察到针对 4-1BB 细胞的 ADCC 效应。

表 6: 多特异性抗体诱导的 ADCC 效应 (对应图 6A)

Antibody	EC50 (nM)
HER2x4-1BB-1	0.232
HER2x4-1BB-3	0.367
HER2x4-1BB-1+HER2x4-1BB-3	0.114
HER2xHER2x4-1BB-1	0.313
HER2xHER2x4-1BB-2	0.391
Trastuzumab	0.097
Pertuzumab	0.185
Trastuzumab+Pertuzumab	0.051
PRS-343 Analog	N/A
Urelumab Analog	N/A
anti 4-1BB vHH-1	N/A

Neg Ctrl	N/A
----------	-----

表 7: 多特异性抗体诱导的 ADCC 效应 (对应图 6C)

Antibody	EC50 (nM)
HER2×4-1BB-2	N/A
HER2×4-1BB-1	0.360
PRS-343 Analog	N/A
Urelumab Analog	N/A
Trastuzumab	0.121
anti 4-1BB vHH-2	N/A
Neg Ctrl	N/A

实施例 7. 多特异性抗体诱导 primary T 细胞释放细胞因子 (HER2+细胞介导)

将扩大培养的靶细胞 N87(自身表达 HER2)用 0.25% EDTA trypsin 消化, 并按照每孔 1×10^4 个/孔接种至 96 孔培养板中 (该培养板提前一天包被 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 anti-CD3 抗体, 按 100 μl /孔铺板)。收集提前一天复苏的 PBMC, 用 T 细胞分离试剂盒(Stemcell, 17951)分离 PBMC 中的 T 细胞并按照每孔 5×10^4 个/孔加入靶细胞孔中, 随后将梯度稀释后的多特异性抗体加入到细胞孔中共孵育 48 小时后收集上清液。上清中的 IL-2 和 IFN γ 水平用 human IL-2 ELISA kit (Invitrogen, 88-7025-77) 和 human IFN γ ELISA kit (Invitrogen, 88-7316-77) 试剂盒检测。

实验结果如图 7 所示, 本发明的多特异性抗体均可在 N87 细胞存在的情况下诱导 Primary T cell 释放 IL-2 (图 7A) 或者 IFN- γ (图 7B), 并且呈现剂量依赖性。此外, HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体诱导的细胞因子释放能力要明显强于 HER2x4-1BB 双特异性抗体, 也强于对照抗体 PRS-343 和 Urelumab。

实施例 8. 多特异性抗体诱导 primary T 细胞释放细胞因子 (FcR+ 细胞介导)

将扩大培养的靶细胞 CHOS-hCD32b(过表达人 Fc γ RIIb)离心计数, 并按照每孔 1×10^4 个/孔接种至 96 孔培养板中 (该培养板提前一天包被 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 anti-CD3 抗体, 按 100 μl /孔铺板)。收集提前一天复苏的 PBMC, 用 T 细胞分离试剂盒(Stemcell, 17951)分离 PBMC 中的 T 细胞并按照每孔 5×10^4 个/孔加入靶细胞孔中, 随后将梯度稀释后的多特异性抗体加入到细胞孔中共孵育 48 小时后收集上清液。上清中的 IL-2 和 IFN γ 水平用 human IL-2 ELISA kit (Invitrogen, 88-7025-77) 和 human IFN γ ELISA kit (Invitrogen, 88-7316-77) 试剂

盒检测。

实验结果如图 8 所示，本发明的多特异性抗体在 CHOS-hCD32b 细胞存在的情况下均不能诱导 Primary T cell 释放 IL2（图 8A）或者 IFN- γ （图 8B）。相反地，阳性对照抗体 Urelumab 能够通过 FcR 诱导 T 细胞活化并释放促炎因子。另外，阴性对照分子 PRS-343 5 由于与 CHOS-hCD32b 细胞不结合，因此同样不会通过 FcR 诱导 Primary T cell 释放细胞因子。

实施例 9. 细胞株的筛选

本实施例使用 CH1/CL 偏好性突变（专利号：WO2021/067404A2）以及 Knob in hole 技术，将抗 HER2 抗体和 Pertuzumab 抗体的重链可变区分别构建入 CH1 突变的 CH SET1 10 （SEQ ID NO: 13）和 CH SET2 (SEQ ID NO: 14) 上且将抗 CD137 的单域抗体 AB24 ME 的 CD137 结合区域氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 的 N 端通过 20 个氨基酸残基 (G4A)4 (SEQ ID NO: 18) 的柔性肽连接于 Fc 的 C 端。抗 HER2 抗体和 Pertuzumab 抗体的轻链可变区分别构建入 CL 突变型的轻链恒定区上 CL SET1 (SEQ ID NO: 15) 和 CL SET2 (SEQ ID NO: 16) 上。构建了 1+1 非对称式抗 HER2xHER2x4-1BB-1 三特异性抗体细胞株。

15 细胞株构建

采用电击转染的方法将含有抗 HER2 抗体和抗 4-1BB 抗体的重链基因 (SEQ ID NO: 27) 以及轻链基因 (SEQ ID NO: 28) 的载体 pCHO2.0-GS-Puro-H1-L1 以及含有抗 Pertuzumab 抗 4-1BB 抗体的重链基因 (SEQ ID NO: 29) 以及轻链基因 (SEQ ID NO: 30) 的载体 pCHO2.0-GS-Puro-H2-L2 共转入宿主细胞 CHOS-ADP，利用 Puromycin 和 MSX 20 筛选压力对细胞进行加压筛选获得高产 minipool，然后通过一轮有限稀释和单克隆鉴定，得到高产稳定的克隆细胞株。

细胞培养

以 Dynamis AGT Medium 为基础培养基，接种密度 $(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$ cells/ml，培养至第 3、5、7、9、11 天分别流加 $5.0 \pm 0.5\%$ (w/w) 初始培养重量的 7a 补料，流加 $0.5 \pm 0.05\%$ (w/w) 25 初始培养重量的 7b。溶氧设置 40%，初始培养温度 36.5°C，第 4 天降温至 33.0°C。每天根据葡萄糖浓度检测结果，补加 300 g/kg 葡萄糖浓缩液使细胞液中葡萄糖浓度达到 6.0 g/L，收获当天除外。培养至第 14 天或细胞活率低于 80% 时结束培养。在培养过程中，使用 Vicell (Beckman 公司) 对细胞密度及活率进行检测，从第 7 天开始，每天使用 Cedex (Roche 公司) 对抗体产量进行检测。

稳定细胞株产物质量鉴定

一步纯化方法同实施例 1 中单臂抗体的纯化方法。利用 HPLC 检测获得蛋白的纯度。HPLC 方法如下，流动相：150 mM Na₂HPO₄·12H₂O，pH7.0。色谱条件：检测波长：280 nm，柱温：25°C，流速：0.5 ml/min，检测时间：30 min，TSKgel G3000SWXL 色谱柱。

5 SEC 结果如图 9A 显示，一步亲和纯化获得的双特异性抗体纯度为 98.3%。

利用高效液相质谱检测获得蛋白的重轻链配对情况，使用仪器为液相系统 Vanquish UHPLC (Thermo)、质谱仪 Q Exactive (Thermo) 及色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C4, 2.1 mm×100 mm。取样品 50 µg，加入超纯水稀释至 25 µl，离心取 20 µl 样品至进样瓶，进样 5 µl，采用 LC-MS 分析完整分子量。色谱条件为：柱温：80°C；紫外检测波长：280
10 nm；流速：0.3 mL/min；流动相 A：水溶液（含 0.1% 甲酸）；流动相 B：乙腈溶液（含 0.1% 甲酸）。质谱参数为：ESI 离子源：离子传输管温度 320°C，电压 3.8 kV，气体流速 36 L/min；模式：正离子 Full MS；分辨率：17500；扫描范围：600-4000 m/z。结果如图 9B 和 9C 所示，纯化的三特异性抗体 HER2xHER2x4-1BB-1 的正确配对产物比例为>98%。

实施例 10. 多特异性抗体的肿瘤抑制活性研究

15 本实验在 h-4-1BB KI BALB/c 小鼠皮下接种 CT26-h-HER2 的肿瘤模型中对本发明的多特异性抗体的抗肿瘤活性进行概念验证。

首先采用皮下接种 CT26-h-HER2 细胞的方式建立荷瘤小鼠模型，待肿瘤体积长至约 180 mm³ 左右时进行分组，腹腔注射分别给予 G1: PBS、G2: 2.5mg/kg 的 PRS-343、G3: 2mg/kg 的 Trastuzumab、G4: 2.3mg/kg 的 HER2x4-1BB-1 和 G5: 2.3mg/kg 的
20 HER2x4-1BB-2（所有组别采用相等的摩尔剂量）治疗，监测各组小鼠肿瘤体积和体重变化，监测频率为 2-3 天/次，连续监测 2~3 周，给药剂量和方式如表 8。实验结束后，取小鼠的肿瘤进行免疫组化检测，比较不同组别的肿瘤内 CD8+T 细胞的浸润情况。

实验结果如图 10A 所示，保留 Fc effector 功能的双特异性抗体 HER2x4-1BB-1 的抗肿瘤活性明显优于 LALA 突变去除 Fc effector 功能的 HER2x4-1BB-2 双抗（TGI: 73.2% vs
25 26.6%），同时也强于对照抗体 PRS-343（TGI: 6.5%）和 HER2 单克隆抗体 Trastuzumab（TGI: 4.2%）。相同地，免疫组化检测的结果（图 10B）也显示采用 HER2x4-1BB-1 双特异性抗体治疗后的小鼠肿瘤内的 CD8+T 细胞浸润明显强于对照抗体 PRS-343，Trastuzumab 以及 HER2x4-1BB-2 双抗。

表 8: 多特异性抗体的肿瘤抑制活性研究的给药方案

组别	给药剂量	给药次数×给药频率
G1:阴性对照(PBS)	N/A	Q2d×4
G2:PRS-343	2.5 mg/kg	Q2d×4
G3:Trastuzumab	2mg/kg	Q2d×4
G4:HER2x4-1BB-1	2.3 mg/kg	Q2d×4
G5:HER2x4-1BB-2	2.3 mg/kg	Q2d×4

实施例 11.多特异性抗体的肿瘤抑制活性研究

本实验在 h-4-1BB KI BALB/c 小鼠皮下接种 CT26-h-HER2 的肿瘤模型中测定本发明的多特异性抗体的抗肿瘤活性。

首先采用皮下接种 h-HER2 CT26 细胞的方式建立荷瘤小鼠模型，待肿瘤体积长至约 180 mm³左右时进行分组，腹腔注射给予 G1: PBS、G2: 3mg/kg 的 Trastuzumab 联合 3mg/kg 的 Pertuzumab、G3: 3.6mg/kg 的 PRS-343、G4: 3mg/kg 的 Enhertu (DS8201)、G5: 3.6mg/kg 的 HER2x4-1BB-1、G6: 3.6mg/kg 的 HER2x4-1BB-3、G7: 1.8mg/kg 的 HER2x4-1BB-1 联合 1.8mg/kg 的 HER2x4-1BB-3、G8: 3.6mg/kg 的 HER2xHER2x4-1BB-2（所有组别采用相等的摩尔剂量）治疗，监测各组小鼠瘤体积和体重变化，监测频率均为 2-3 天/次，连续监测 2~3 周，给药剂量和方式如表 9。

实验结果如图 11 所示，HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体分子的抗肿瘤活性（TGI: 85.7%）明显优于等摩尔剂量的对照抗体 PRS-343（TGI: 37.7%）、Enhertu（TGI: 47.7%）及 HER2 单克隆抗体 Trastuzumab 和 Pertuzumab 的组合（TGI: 39.5%）。此外，HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体的抗肿瘤活性也明显强于 HER2x4-1BB 双特异性抗体 HER2x4-1BB-1（TGI: 66.9%）和 HER2x4-1BB-3（TGI: 59.7%），与 HER2x4-1BB 双特异性抗体的联合治疗组（HER2x4-1BB-1+HER2x4-1BB-3，TGI: 83.7%）的治疗效果相当。

表 9：多特异性抗体的肿瘤抑制活性研究的给药方案

组别	给药剂量	给药次数×给药频率
G1:阴性对照(PBS)	N/A	Q2d×4
G2:Trastuzumab+Pertuzumab	3+3 mg/kg	Q2d×4
G3:PRS-343	3.6mg/kg	Q2d×4
G4:Enhertu	3 mg/kg	Q2d×4
G5:HER2x4-1BB-1	3.6 mg/kg	Q2d×4

G6:HER2x4-1BB-3	3.6 mg/kg	Q2d×4
G7:HER2x4-1BB-1+ HER2x4-1BB-3	1.8+1.8mg/kg	Q2d×4
G8:HER2x HER2x4-1BB-2	3.6 mg/kg	Q2d×4

实施例 12. 多特异性抗体的肿瘤抑制活性研究

本实验在 h-4-1BB KI C57 小鼠皮下接种 MC38-h-HER2 的肿瘤模型中测定本发明的多特异性抗体的抗肿瘤活性。

首先采用皮下接种 MC38-h-HER2 细胞的方式建立荷瘤小鼠模型，待肿瘤体积长至约 100 mm³ 左右时进行分组，腹腔注射给予 G1: PBS、G2: 3mg/kg 的 Trastuzumab 联合 3mg/kg 的 Pertuzumab、G3: 3.6mg/kg 的 PRS-343、G4: 3mg/kg 的 Enhertu (DS8201)、G5: 1.8mg/kg 的 HER2x4-1BB-1 联合 1.8mg/kg 的 HER2x4-1BB-3、G6: 3.6mg/kg 的 HER2xHER2x4-1BB-1（所有组别采用相等的摩尔剂量）治疗，监测各组小鼠瘤体积和体重变化，监测频率均为 3-6 天/次，连续监测 2~3 周，给药剂量和方式如表 10。

结果如图 12 所示，经 HER2xHER2x4-1BB 三特异性抗体治疗后的所有小鼠都达到了肿瘤完全消退，明显优于等摩尔剂量的对照抗体 PRS-343 (TGI: 54.9%) 及 HER2 单克隆抗体的联合用药 (Trastuzumab+Pertuzumab, TGI: 63.8%)。另外，在此肿瘤模型中，HER2x4-1BB 双特异性抗体的联合治疗组 (HER2x4-1BB-1+HER2x4-1BB-3) 和 Enhertu 的治疗也都达到了肿瘤完全消退。

表 10: 多特异性抗体的肿瘤抑制活性研究的给药方案

组别	给药剂量	给药次数×给药频率
G1:阴性对照(PBS)	N/A	Q3d×2
G2:Trastuzumab+Pertuzumab	3+3 mg/kg	Q3d×2
G3:PRS-343	3.6mg/kg	Q3d×2
G4:Enhertu	3 mg/kg	Q3d×2
G5:HER2x4-1BB-1+ HER2x4-1BB-3	1.8+1.8mg/kg	Q3d×2
G6:HER2x HER2x4-1BB-1	3.6 mg/kg	Q3d×2

1. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(2): p. 127-37.

2. Oh, D.Y. and Y.J. Bang, *HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. 17(1): p. 33-48.

3. Schaer, D.A., D. Hirschhorn-Cymerman, and J.D. Wolchok, *Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy*. J Immunother Cancer, 2014. 2: p. 7.

4. Chen, S., et al., *Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model*. Cancer Immunol Res, 2015. 3(2): p. 149-60.

10 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解，根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 能够特异性结合 **4-1BB** 的单域抗体或其抗原结合片段, 所述单域抗体包含:

(a) **CDR1**, 其具有: **SEQ ID NO: 43** 所示的序列, 或与 **SEQ ID NO: 43** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

(b) **CDR2**, 其具有: 如 **SEQ ID NO: 44** 所示的序列, 或与 **SEQ ID NO: 44** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 以及

(c) **CDR3**, 其具有: 如 **SEQ ID NO: 45** 所示的序列, 或与 **SEQ ID NO: 45** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列;

优选地, 所述的置换是保守置换;

优选地, 所述单域抗体或其抗原结合片段包含: 如 **SEQ ID NO: 43** 所示的 **CDR1**、如 **SEQ ID NO: 44** 所示的 **CDR2**、以及如 **SEQ ID NO: 45** 所示的 **CDR3**。

2. 权利要求 1 所述的单域抗体或其抗原结合片段, 所述单域抗体包含选自下列的氨基酸序列:

(i) 如 **SEQ ID NO: 7** 所示的序列;

(ii) 与 **SEQ ID NO: 7** 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加) 的序列; 或

(iii) 与 **SEQ ID NO: 7** 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、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% 的序列同一性的序列;

优选地, 所述的置换是保守置换。

3. 特异性结合 **4-1BB** 的多肽构建体, 其包含权利要求 1 或 2 所述的单域抗体或其抗

原结合片段，以及免疫球蛋白 Fc 结构域；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域直接或通过肽接头连接至所述单域抗体或其抗原结合片段的 N 端和/或 C 端（例如 C 端）；优选地，所述肽接头具有 $(G_m X_n)_l G_m$ 所示结构，m、m'、n 和 l 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，X 选自 A 和 S；优选地，m 选自 1、2、3、4 或 5，n 选自 1 和 2，l 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，m' 选自 0 和 1，X 选自 A 和 S；优选地，所述肽接头具有 SEQ ID NO: 17 或 18 所示氨基酸序列；优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域是 IgG 的 Fc 结构域（例如 IgG1 的 Fc 结构域，例如包含 CH2 和 CH3）；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 19 所示的序列，或与其相比具有至少 80%、至少 85%、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% 的序列同一性的序列，或与其相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸置换、缺失或添加）的序列；

优选地，所述免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 19 或 20 所示的序列；

优选地，所述多肽构建体含有如 SEQ ID NO: 31 或 32 所示的氨基酸序列或由其组成。

4. 一种多特异性抗体，其包含权利要求 1 或 2 所述的单域抗体或其抗原结合片段、或权利要求 3 所述的多肽构建体；

优选地，所述多特异性抗体特异性结合 4-1BB，并且额外地特异性结合一个或多个其它靶标；

优选地，所述靶标为肿瘤抗原；

优选地，所述肿瘤抗原选自下述的一个或多个：CD19、CD20、CD22、CD23、CD38、CD40、CD49、CD52、CD56、CD74、CD80、CD95、CD138、CS1/SLAMF7、KiR、Thy-1、Ly-6、Fas、APO-1、EGFR、HER2、CXCR4、HLA、GM1 和 DRD。

5. 一种多特异性抗体，其包含对 4-1BB 特异的第一抗原结合结构域，和对 HER2 特异的第二抗原结合结构域，其中，

所述第一抗原结合结构域包含权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段；

所述第二抗原结合结构域含有抗 **HER2** 抗体的重链可变区的至少一个 **CDR**，和/或抗 **HER2** 抗体的轻链可变区的至少一个 **CDR**；

优选地，所述第二抗原结合结构域含有抗 **HER2** 抗体的重链可变区，和/或抗 **HER2** 抗体的轻链可变区；

优选地，所述抗 **HER2** 抗体选自曲妥珠单抗、帕妥珠单抗及其变体；

所述变体与其所源自的野生型序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个氨基酸的置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加）。

6. 一种多特异性抗体，其包含对 **4-1BB** 特异的第一抗原结合结构域，和对 **HER2** 特异的第二抗原结合结构域；其中，

所述第一抗原结合结构域是 **VHH**；所述第二抗原结合结构域是 **Fab**，所述多特异性抗体包含：

(1) 肽链 **I-A**，其包含所述第二抗原结合结构域的轻链可变区和轻链恒定区（**CL**）；

和，

(2) 肽链 **I-B**，其包含所述第二抗原结合结构域的重链可变区，重链恒定区，和所述第一抗原结合结构域；优选地，所述肽链 **I-B** 从 **N** 端至 **C** 端包含相邻的所述第二抗原结合结构域的重链可变区和重链恒定区和所述第一抗原结合结构域；

优选地，所述肽链 **I-A** 的 **CL** 能够与所述肽链 **I-B** 的重链恒定区 **CH1** 结构域形成二聚体；

优选地，所述多特异性抗体包含两条所述肽链 **I-A** 以及两条所述肽链 **I-B**；优选地，两条所述肽链 **I-B** 的重链恒定区形成二聚体；

优选地，各结构域之间直接或通过肽接头连接；优选的，所述肽接头具有 $(G_mX_n)_lG_{m'}$ 所示结构，**m**、**m'**、**n** 和 **l** 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，**X** 选自 **A** 和 **S**；优选地，**m** 选自 1、2、3、4 或 5，**n** 选自 1 和 2，**l** 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10，**m'** 选自 0 和 1，**X** 选自 **A** 和 **S**；优选地，所述肽接头具有 **SEQ ID NO: 17** 或 **18** 所示氨基酸序列。

7. 权利要求 5 或 6 所述的多特异性抗体，其特征在于下述的一项或多项：

(i)所述第一抗原结合结构域含有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或由其组成；

(ii)所述第二抗原结合结构域的重链可变区含有如 SEQ ID NO: 1、3 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成；

(iii)所述第二抗原结合结构域的轻链可变区含有如 SEQ ID NO: 2、4 或 6 所示的氨基酸序列或由其组成；

优选地，所述肽链 I-A 含有如 SEQ ID NO: 22、24 或 26 所示的氨基酸序列或由其组成；

优选地，所述肽链 I-B 含有如 SEQ ID NO: 21、23 或 25 所示的氨基酸序列或由其组成。

8. 权利要求 4-7 任一项所述的多特异性抗体，其进一步含有对 HER2 特异的第三抗原结合结构域；

优选地，所述第一抗原结合结构域是 VHH；所述第二抗原结合结构域和第二抗原结合结构域是 Fab，所述多特异性抗体包含：

(1) 肽链 II-A，其包含所述第二抗原结合结构域的轻链可变区和轻链恒定区 (CL)；

(2) 肽链 II-B，其包含所述第二抗原结合结构域的重链可变区，重链恒定区，和所述第一抗原结合结构域；优选地，所述肽链 II-B 从 N 端至 C 端包含相邻的所述第二抗原结合结构域的重链可变区和重链恒定区和所述第一抗原结合结构域；

(3) 肽链 II-C，其包含所述第三抗原结合结构域的轻链可变区和轻链恒定区 (CL)；
和，

(4) 肽链 II-D，其包含所述第三抗原结合结构域的重链可变区，重链恒定区，和所述第一抗原结合结构域；优选地，所述肽链 II-D 从 N 端至 C 端包含相邻的所述第三抗原结合结构域的重链可变区和重链恒定区和所述第一抗原结合结构域；

优选地，所述肽链 II-A 的 CL 能够与所述肽链 II-B 的重链恒定区 CH1 结构域形成二聚体；优选地，所述肽链 II-C 的 CL 能够与所述肽链 II-D 的重链恒定区 CH1 结构域形成二聚体；优选地，所述肽链 II-B 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列，所述肽链 II-D 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列；优选地，所述肽链

II-B 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 37 所示氨基酸序列, 所述肽链 II-D 的重链恒定区含有如 SEQ ID NO: 38 所示氨基酸序列;

优选地, 所述多特异性抗体包含一条所述肽链 II-A、一条所述肽链 II-B、一条所述肽链 II-C、以及一条所述肽链 II-D; 优选地, 所述肽链 II-B 和 II-D 的重链恒定区形成二聚体;

优选地, 各结构域之间直接或通过肽接头连接; 优选的, 所述肽接头具有 $(G_m X_n)_l G_{m'}$ 所示结构, m 、 m' 、 n 和 l 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10, X 选自 A 和 S; 优选地, m 选自 1、2、3、4 或 5, n 选自 1 和 2, l 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10, m' 选自 0 和 1, X 选自 A 和 S; 优选地, 所述肽接头具有 SEQ ID NO: 17 或 18 所示氨基酸序列。

9. 权利要求 8 所述的多特异性抗体, 其特征在于下述的一项或多项:

(i) 所述第一抗原结合结构域含有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 所述第二抗原结合结构域的重链可变区含有如 SEQ ID NO: 1、3 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成;

(iii) 所述第二抗原结合结构域的轻链可变区含有如 SEQ ID NO: 2、4 或 6 所示的氨基酸序列或由其组成;

(iv) 所述第三抗原结合结构域的重链可变区含有如 SEQ ID NO: 1、3 或 5 所示的氨基酸序列或由其组成;

(v) 所述第三抗原结合结构域的轻链可变区含有如 SEQ ID NO: 2、4 或 6 所示的氨基酸序列或由其组成;

优选地, 所述肽链 II-A 含有如 SEQ ID NO: 28 或 40 所示的氨基酸序列或由其组成;

优选地, 所述肽链 II-B 含有如 SEQ ID NO: 27 或 39 所示的氨基酸序列或由其组成;

优选地, 所述肽链 II-C 含有如 SEQ ID NO: 30 或 42 所示的氨基酸序列或由其组成;

优选地, 所述肽链 II-D 含有如 SEQ ID NO: 29 或 41 所示的氨基酸序列或由其组成。

10. 一种多核苷酸, 其编码权利要求 1-9 任一项所述的抗体。

11. 一种载体，其包括权利要求 10 所述的多核苷酸。

12. 一种重组细胞，其包括权利要求 10 所述的多核苷酸或权利要求 11 所述的载体。

13. 一种药物组合物，其含有权利要求 1、2、4-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 3 所述的多肽构建体、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的载体或权利要求 12 所述的重组细胞，以及药学上可接受的赋形剂。

14. 权利要求 1、2、4-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 3 所述的多肽构建体、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的重组细胞或权利要求 13 所述药物组合物在制备抗肿瘤药物中的用途；

优选地，所述肿瘤过表达 **HER2**；

优选地，所述肿瘤选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌（例如，肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌）、腹膜癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、皮肤或眼球黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞腺瘤、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈部癌、脑癌、胆道癌和胆囊癌；

优选地，所述肿瘤为原发性或转移性肿瘤。

15. 权利要求 1、2、4-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 3 所述的多肽构建体、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的重组细胞或权利要求 13 所述药物组合物，其用于抗肿瘤；

优选地，所述肿瘤过表达 **HER2**；

优选地，所述肿瘤选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌（例如，肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌）、腹膜癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、皮肤或眼球黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、

软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞腺瘤、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈部癌、脑癌、胆道癌和胆囊癌；

优选地，所述肿瘤为原发性或转移性肿瘤。

16. 一种抗肿瘤方法，其包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1、2、4-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 3 所述的多肽构建体、权利要求 10 所述的多核苷酸、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的重组细胞或权利要求 13 所述药物组合物；

优选地，所述肿瘤过表达 HER2；

优选地，所述肿瘤选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌（例如，肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌）、腹膜癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、皮肤或眼球黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌症、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞腺瘤、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈部癌、脑癌、胆道癌和胆囊癌；

优选地，所述肿瘤为原发性或转移性肿瘤。

17. 一种缀合物，其包含权利要求 1、2、4-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或权利要求 3 所述的多肽构建体，以及与所述抗体或其抗原结合片段或多肽构建体连接的可检测的标记；

优选地，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

18. 一种试剂盒，其包括权利要求 1、2、4-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 3 所述的多肽构建体、或权利要求 17 所述缀合物；

优选地，所述试剂盒还包含特异性识别所述抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体所特异性识别的抗原的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

19. 用于检测 **4-1BB** 在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用权利要求 **1**、**2**、**4-9** 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 **3** 所述的多肽构建体、或权利要求 **17** 所述缀合物；

优选地，所述方法是免疫学检测，例如免疫印迹法、酶免疫测定法（例如 **ELISA**）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法；

优选地，所述方法包括使用所述抗体或其抗原结合片段或多肽构建体，并且所述方法还包括使用携带可检测的标记（例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素）的第二抗体来检测所述抗体或其抗原结合片段或所述多肽构建体与抗原的结合；

优选地，所述方法包括：**(1)** 将所述样品与所述抗体或其抗原结合片段接触；**(2)** 检测抗原-抗体免疫复合物的形成或检测所述免疫复合物的量，所述免疫复合物的形成表明存在 **4-1BB** 或表达 **4-1BB** 的细胞。

20. 权利要求 **1**、**2**、**4-9** 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 **3** 所述的多肽构建体、或权利要求 **17** 所述缀合物在制备检测试剂中的用途，所述检测试剂用于检测 **4-1BB** 在样品中的存在或其水平；

优选地，所述检测试剂通过权利要求 **19** 所述的方法来检测 **4-1BB** 在样品中的存在或其水平；

优选地，所述样品为来自受试者（例如哺乳动物，优选人或猴）的细胞样品（例如，肿瘤细胞）。

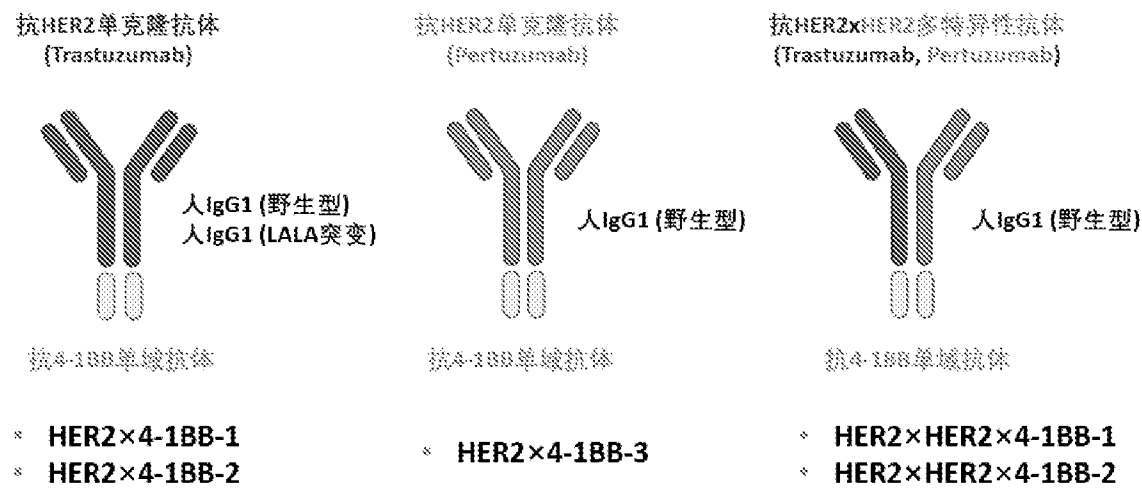


图 1

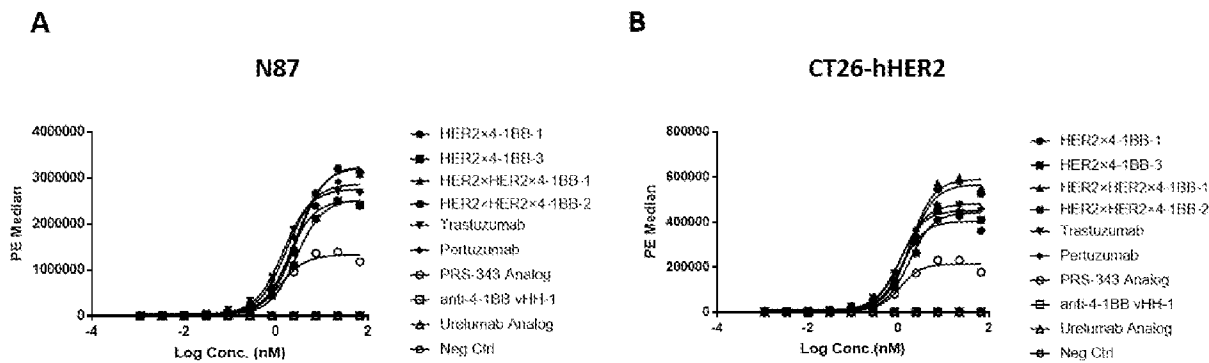


图 2

CHOS-h4-1BB

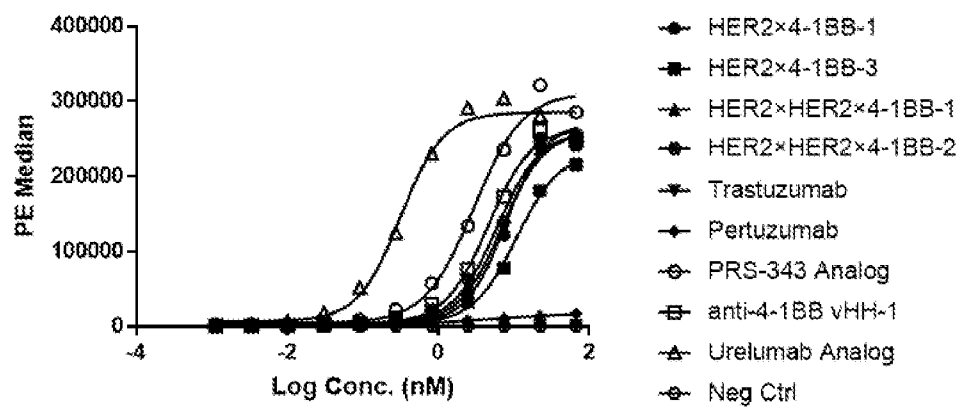


图 3

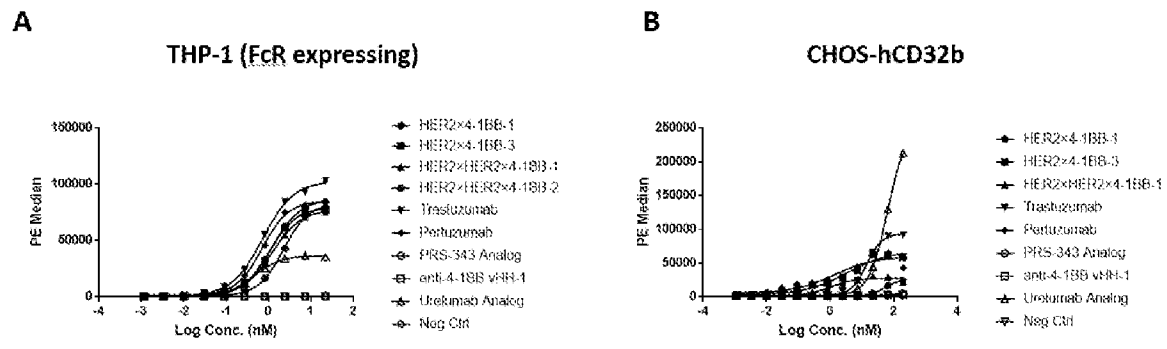
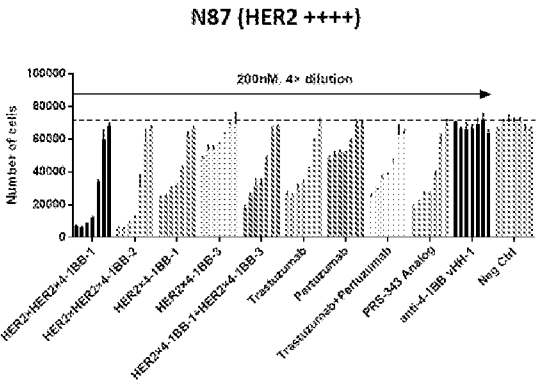


图 4

A



B

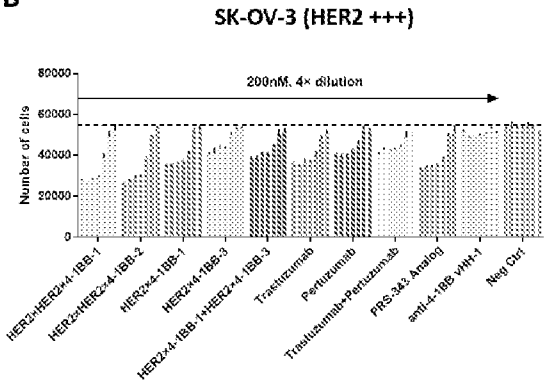
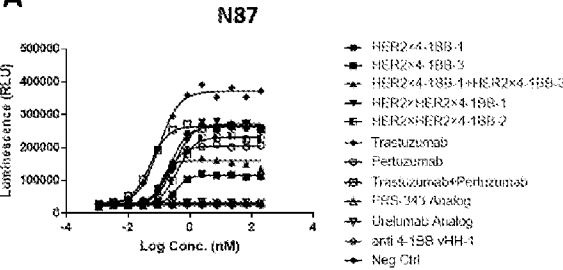
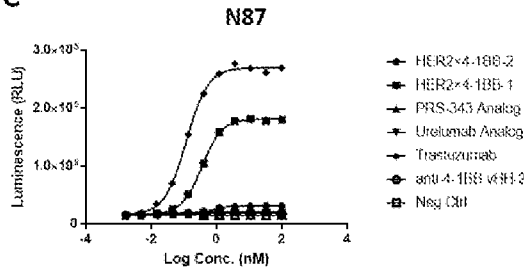


图 5

A



C



B

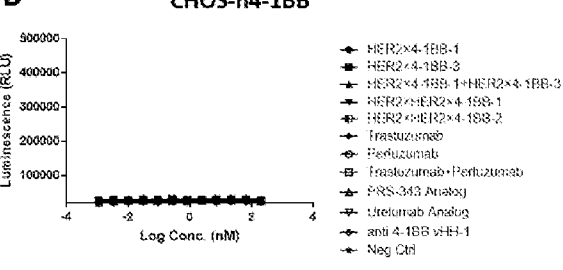


图 6

N87 + Primary T Cell

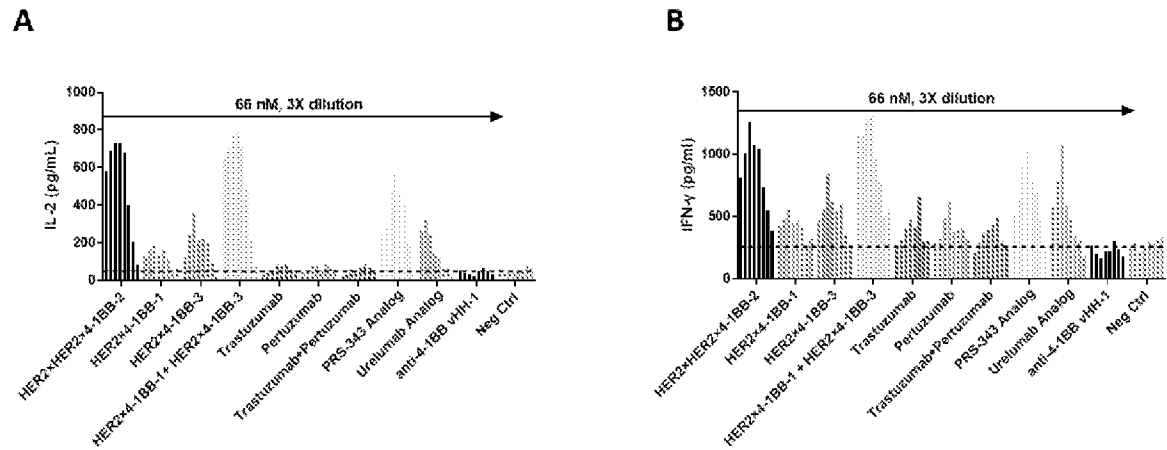


图 7

CHOS-hCD32b + Primary T Cell

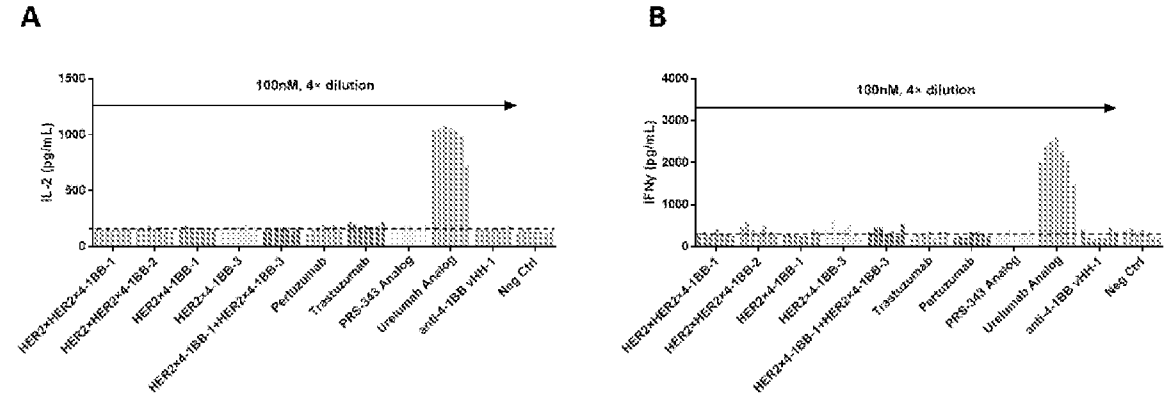


图 8

The SEC and LC/MS of HER2×HER2×4-1BB-1

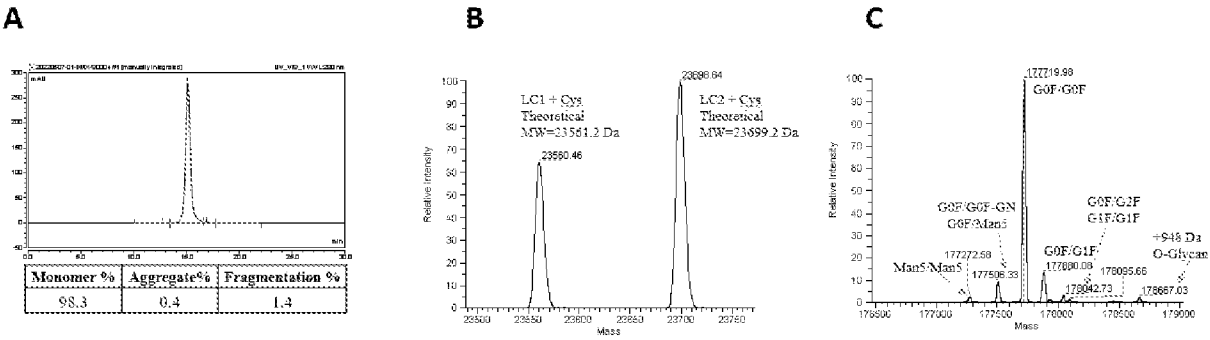


图 9

CT26-hHer2 in human 41BB KI Balb/c mice

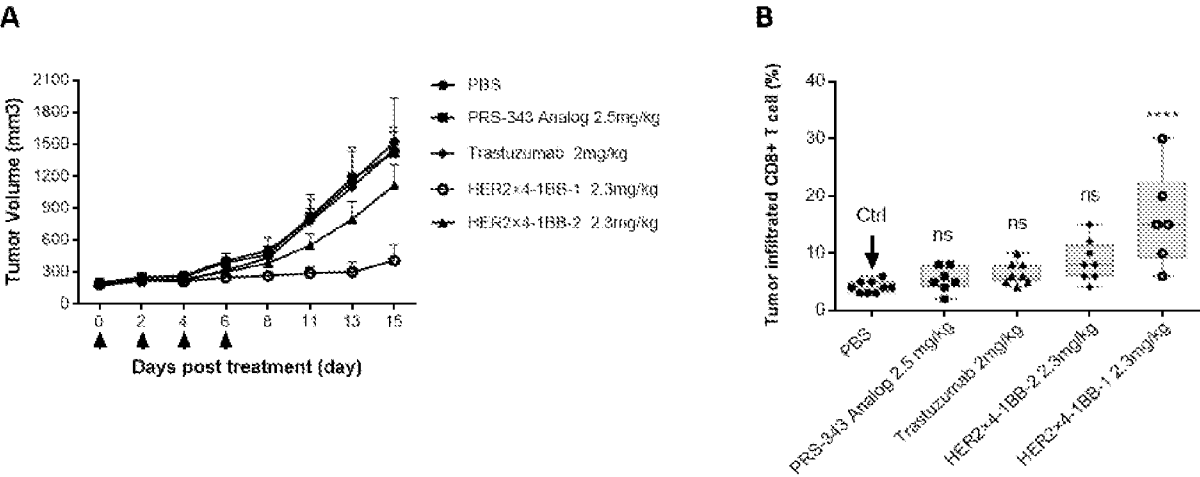


图 10

CT26-hHer2 in human 41BB KI Balb/c mice

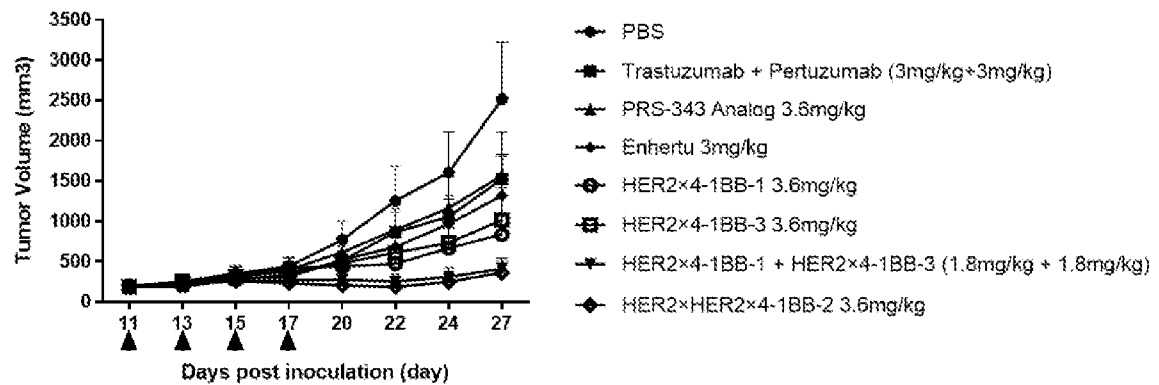


图 11

MC38-hHer2 in human 41BB KI C57 mice

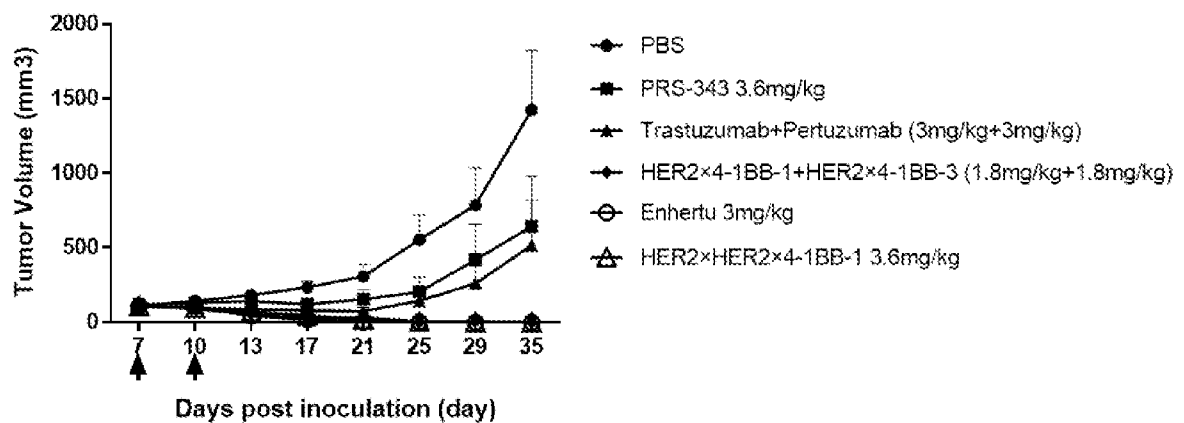


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/119761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K16/28(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i; G01N33/574(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 G01N		
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) CJFD, CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, VEN, WPABS, WPABSC, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, BAIDU, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI WEB OF KNOWLEDGE, SCIENCEDIRECT, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 智能化检索系统序列检索, intelligent search system sequence search: 4-1BB, CD137, TNFRSF9, 表皮生长因子受体2, HER2, 单抗抗体, 单域抗体, 纳米抗体, nanobody, VHH, 曲妥珠, 帕妥珠, trastuzumab, pertuzumab, 普米斯生物技术(珠海)有限公司, biotheus, 发明人, inventor, SEQ ID NOS: 1-50		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022057871 A1 (BIOTHEUS INC.) 24 March 2022 (2022-03-24) claims 1-21, description, page 2 line 19 - page 8 line 4, page 22 line 21 - page 27 line 9	1-6, 8, 10-20
Y	WO 2022057871 A1 (BIOTHEUS INC.) 24 March 2022 (2022-03-24) claims 1-21, description, page 2 line 19 - page 8 line 4, page 22 line 21 - page 27 line 9	7-20
X	CN 114195894 A (BIOTHEUS (ZHUHAI) CO., LTD.) 18 March 2022 (2022-03-18) claims 1-10, SEQ ID NOS: 35, 39, 40	1-6, 8, 10-20
Y	CN 114195894 A (BIOTHEUS (ZHUHAI) CO., LTD.) 18 March 2022 (2022-03-18) claims 1-10, SEQ ID NOS: 35, 39, 40	7-20
X	CN 114195900 A (BIOTHEUS (ZHUHAI) CO., LTD.) 18 March 2022 (2022-03-18) claims 1-10, description paragraphs 0008-0108, embodiment 1, SEQ ID NO: 2	1-6, 8, 10-20
Y	CN 114195900 A (BIOTHEUS (ZHUHAI) CO., LTD.) 18 March 2022 (2022-03-18) claims 1-10, description paragraphs 0008-0108, embodiment 1, SEQ ID NO: 2	7-20
☒ 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 11 December 2023		Date of mailing of the international search report 15 December 2023
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/CN2023/119761

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022057875 A1 (BIOTHEUS INC.) 24 March 2022 (2022-03-24) claims 1-33, SEQ ID NOs: 35, 39, 40	1-6, 8, 10-20
Y	WO 2022057875 A1 (BIOTHEUS INC.) 24 March 2022 (2022-03-24) claims 1-33, SEQ ID NOs: 35, 39, 40	7-20
X	ZHAI, Tianhang et al. "Generation of a Safe and Efficacious Llama Single-Domain Antibody Fragment (vHH) Targeting the Membrane-Proximal Region of 4-1BB for Engineering Therapeutic Bispecific Antibodies for Cancer" <i>Journal for ImmunoTherapy of Cancer</i> , Vol. vol. 9, 31 December 2021 (2021-12-31), e002131, pages 1-12, Protein Data Bank: 7D4B	1-6, 8, 10-20
Y	ZHAI, Tianhang et al. "Generation of a Safe and Efficacious Llama Single-Domain Antibody Fragment (vHH) Targeting the Membrane-Proximal Region of 4-1BB for Engineering Therapeutic Bispecific Antibodies for Cancer" <i>Journal for ImmunoTherapy of Cancer</i> , Vol. vol. 9, 31 December 2021 (2021-12-31), e002131, pages 1-12, Protein Data Bank: 7D4B	7-20
Y	US 5821337 A (GENENTECH, INC.) 13 October 1998 (1998-10-13) SEQ ID NOs: 41 and 42	7-20
Y	US 2006165702 A1 (GENENTECH, INC.) 27 July 2006 (2006-07-27) figure 3	7-20
Y	WO 2021067404 A2 (ADIMAB, LLC) 08 April 2021 (2021-04-08) claims 1-53	8-20
Y	WO 2018090950 A1 (BEIJING HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 24 May 2018 (2018-05-24) SEQ ID NOs: 8 and 14	8-20
PX	WO 2023020537 A1 (BIOTHEUS INC.) 23 February 2023 (2023-02-23) claims 1-15, SEQ ID NO: 25	1-4, 10-20
A	CN 113004415 A (HEFEI HANKEMAB BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 22 June 2021 (2021-06-22) claims 1-10	1-20
A	HINNER, M.J. et al. "Tumor-Localized Costimulatory T-Cell Engagement by the 4-1BB/ HER2 Bispecific Antibody-Anticalin Fusion PRS-343" <i>Clinical Cancer Research</i> , Vol. 25, No. (19), 01 October 2019 (2019-10-01), pp. 5878-5889	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/119761

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:

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 16 sets forth an anti-tumor method, comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of an antibody or an antigen-binding fragment thereof, a polypeptide construct, a polynucleotide, a vector, a recombinant cell or a pharmaceutical composition, that is, claim 16 relates to subject matter for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1: (iv) methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. The international search is performed on the basis of the use of the antibody or the antigen-binding fragment thereof, the polypeptide construct, the polynucleotide, the vector, the recombinant cell or the pharmaceutical composition in the preparation of an anti-tumor drug.
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/CN2023/119761

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022057871	A1	24 March 2022	AU	2021345856	A1	18 May 2023
				US	2023348627	A1	02 November 2023
				CA	3195675	A1	24 March 2022
				EP	4215549	A1	26 July 2023
				KR	20230069955	A	19 May 2023
				JP	2023541473	A	02 October 2023
CN	114195894	A	18 March 2022	None			
CN	114195900	A	18 March 2022	None			
WO	2022057875	A1	24 March 2022	US	2023357422	A1	09 November 2023
				CA	3195676	A1	24 March 2022
				JP	2023542900	A	12 October 2023
				KR	20230070238	A	22 May 2023
				AU	2021342525	A1	27 April 2023
				AU	2021342525	A9	06 July 2023
				EP	4215547	A1	26 July 2023
US	5821337	A	13 October 1998	DE	122004000008	I1	09 June 2005
				WO	9222653	A1	23 December 1992
				GEP	20074141	B	10 July 2007
				ES	2206447	T3	16 May 2004
				ATE	255131	T1	15 December 2003
				US	6719971	B1	13 April 2004
				US	6639055	B1	28 October 2003
				NL	300145	I1	01 June 2004
				EP	0590058	A1	06 April 1994
				EP	0590058	B1	26 November 2003
				EP	0940468	A1	08 September 1999
				JP	2008291036	A	04 December 2008
				JP	4836147	B2	14 December 2011
				DE	69233254	D1	08 January 2004
				DE	69233254	T2	16 September 2004
				AU	2250992	A	12 January 1993
				AU	675916	B2	27 February 1997
				DK	0590058	T3	29 March 2004
				CA	2103059	A1	15 December 1992
				CA	2103059	C	22 March 2005
				CY	2500	B1	02 September 2005
				JP	2006083180	A	30 March 2006
				EP	1400536	A1	24 March 2004
				JP	2005000169	A	06 January 2005
				LU	91067	I2	02 April 2004
				JPH	06508267	A	22 September 1994
				JP	4124480	B2	23 July 2008
				US	6407213	B1	18 June 2002
US	2006165702	A1	27 July 2006	PL	1846030	T3	31 May 2019
				EP	3698807	A1	26 August 2020
				EP	1846030	A1	24 October 2007
				EP	1846030	B1	21 November 2018
				US	2020239595	A1	30 July 2020
				NZ	556095	A	29 January 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/119761

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		IL 248614 A0	31 January 2017
		IL 248614 B	30 May 2019
		MX 2007008768 A	19 October 2007
		TR 201901841 T4	21 March 2019
		KR 20150083139 A	16 July 2015
		US 2009081223 A1	26 March 2009
		US 8404234 B2	26 March 2013
		KR 20190016616 A	18 February 2019
		ES 2710439 T3	25 April 2019
		CR 9253 A	31 July 2008
		US 2017037147 A1	09 February 2017
		AR 050418 A1	25 October 2006
		US 2013142865 A1	06 June 2013
		ZA 200706017 B	31 December 2008
		UA 94899 C2	25 June 2011
		NO 20074238 L	19 October 2007
		RU 2007131693 A	27 February 2009
		RU 2438705 C2	10 January 2012
		US 2015093381 A1	02 April 2015
		KR 20180080371 A	11 July 2018
		CA 2592177 A1	27 July 2006
		JP 2015063525 A	09 April 2015
		US 2018327510 A1	15 November 2018
		JP 2013136601 A	11 July 2013
		BRPI 0518104 A	28 October 2008
		BRPI 0518104 B1	10 September 2019
		BRPI 0518104 B8	25 May 2021
		IL 184244 A0	31 October 2007
		US 2023212311 A1	06 July 2023
		US 7449184 B2	11 November 2008
		MA 29369 B1	01 April 2008
		KR 20070094928 A	27 September 2007
		KR 20200058588 A	27 May 2020
		AU 2005325200 A1	27 July 2006
		IL 266336 A	30 June 2019
		WO 2006078307 A1	27 July 2006
		KR 20190110637 A	30 September 2019
		KR 20170134771 A	06 December 2017
		KR 20130089280 A	09 August 2013
		TW 200626171 A	01 August 2006
		TWI 441646 B	21 June 2014
		JP 2008528486 A	31 July 2008
WO 2021067404	A2 08 April 2021	None	
WO 2018090950	A1 24 May 2018	None	
WO 2023020537	A1 23 February 2023	None	
CN 113004415	A 22 June 2021	None	

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： 16
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求16请求保护一种抗肿瘤方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、多核苷酸、载体、重组细胞或药物组合物，也即权利要求16涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题：（iv）处置人体或动物体的外科手术方法或治疗方法，以及诊断方法。国际检索基于所述抗体或其抗原结合片段、多肽构建体、多核苷酸、载体、重组细胞或药物组合物在制备抗肿瘤药物中的用途作出。
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。

A. 主题的分类		
C07K16/28(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i; G01N33/574(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 G01N		
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))		
CJFD,CNTEXT,DWPL,ENTXT,ENTXTC,VEN,WPABS,WPABSC,CNKI,万方数据库,BAIDU,PUBMED,ELSEVIER, SPRINGER,ISI WEB OF KNOWLEDGE,SCIENCEDIRECT,NCBI,Genbank,EMBL,STN,智能化检索系统序列检索:4-1BB,CD137,TNFRSF9,表皮生长因子受体2,HER2,单链抗体,单域抗体,纳米抗体,nanobody,VHH,曲妥珠,帕妥珠, trastuzumab,pertuzumab,普米斯生物技术(珠海)有限公司,biotheus,发明人,SEQ ID NOs:1-50		
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	WO 2022057871 A1 (BIOTHEUS INC.) 2022年3月24日 (2022 - 03 - 24) 权利要求1-21, 说明书第2页第19行-第8页第4行, 第22页第21行-第27页第9行	1-6,8,10-20
Y	WO 2022057871 A1 (BIOTHEUS INC.) 2022年3月24日 (2022 - 03 - 24) 权利要求1-21, 说明书第2页第19行-第8页第4行, 第22页第21行-第27页第9行	7-20
X	CN 114195894 A (普米斯生物技术(珠海)有限公司) 2022年3月18日 (2022 - 03 - 18) 权利要求1-10, SEQ ID NO:35,39,40	1-6,8,10-20
Y	CN 114195894 A (普米斯生物技术(珠海)有限公司) 2022年3月18日 (2022 - 03 - 18) 权利要求1-10, SEQ ID NO:35,39,40	7-20
X	CN 114195900 A (普米斯生物技术(珠海)有限公司) 2022年3月18日 (2022 - 03 - 18) 权利要求1-10, 说明书第0008-0108段, 实施例1, SEQ ID NO:2	1-6,8,10-20
Y	CN 114195900 A (普米斯生物技术(珠海)有限公司) 2022年3月18日 (2022 - 03 - 18) 权利要求1-10, 说明书第0008-0108段, 实施例1, SEQ ID NO:2	7-20
☒ 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		国际检索报告邮寄日期
2023年12月11日		2023年12月15日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
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		郝佳
		电话号码 (+86) 010-53961967

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	WO 2022057875 A1 (BIOTHEUS INC.) 2022年3月24日 (2022 - 03 - 24) 权利要求1-33, SEQ ID NO:35,39,40	1-6,8,10-20
Y	WO 2022057875 A1 (BIOTHEUS INC.) 2022年3月24日 (2022 - 03 - 24) 权利要求1-33, SEQ ID NO:35,39,40	7-20
X	ZHAI, T. 等. "Generation of a safe and efficacious llama single-domain antibody fragment (vHH) targeting the membrane-proximal region of 4-1BB for engineering therapeutic bispecific antibodies for cancer" Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 第9卷, 2021年12月31日 (2021 - 12 - 31), e002131, 第1-12页, Protein Data Bank: 7D4B	1-6,8,10-20
Y	ZHAI, T. 等. "Generation of a safe and efficacious llama single-domain antibody fragment (vHH) targeting the membrane-proximal region of 4-1BB for engineering therapeutic bispecific antibodies for cancer" Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 第9卷, 2021年12月31日 (2021 - 12 - 31), e002131, 第1-12页, Protein Data Bank: 7D4B	7-20
Y	US 5821337 A (GENENTECH, INC.) 1998年10月13日 (1998 - 10 - 13) SEQ ID NO:41和42	7-20
Y	US 2006165702 A1 (GENENTECH, INC.) 2006年7月27日 (2006 - 07 - 27) 图3	7-20
Y	WO 2021067404 A2 (ADIMAB, LLC) 2021年4月8日 (2021 - 04 - 08) 权利要求1-53	8-20
Y	WO 2018090950 A1 (BEIJING HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2018年5月24日 (2018 - 05 - 24) SEQ ID NO:8和14	8-20
PX	WO 2023020537 A1 (BIOTHEUS INC.) 2023年2月23日 (2023 - 02 - 23) 权利要求1-15, SEQ ID NO:25	1-4,10-20
A	CN 113004415 A (合肥瀚科迈博生物技术有限公司) 2021年6月22日 (2021 - 06 - 22) 权利要求1-10	1-20
A	HINNER, M.J. 等. "Tumor-Localized Costimulatory T-Cell Engagement by the 4-1BB/HER2 Bispecific Antibody-Anticalin Fusion PRS-343" Clinical Cancer Research, 第25卷, 第19期, 2019年10月1日 (2019 - 10 - 01), 第5878-5889页	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/119761

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)
WO	2022057871	A1	2022年3月24日	AU	2021345856	A1	2023年5月18日
				US	2023348627	A1	2023年11月2日
				CA	3195675	A1	2022年3月24日
				EP	4215549	A1	2023年7月26日
				KR	20230069955	A	2023年5月19日
				JP	2023541473	A	2023年10月2日

CN	114195894	A	2022年3月18日	无			

CN	114195900	A	2022年3月18日	无			

WO	2022057875	A1	2022年3月24日	US	2023357422	A1	2023年11月9日
				CA	3195676	A1	2022年3月24日
				JP	2023542900	A	2023年10月12日
				KR	20230070238	A	2023年5月22日
				AU	2021342525	A1	2023年4月27日
				AU	2021342525	A9	2023年7月6日
EP	4215547	A1	2023年7月26日				

US	5821337	A	1998年10月13日	DE	122004000008	I1	2005年6月9日
				WO	9222653	A1	1992年12月23日
				GEP	20074141	B	2007年7月10日
				ES	2206447	T3	2004年5月16日
				ATE	255131	T1	2003年12月15日
				US	6719971	B1	2004年4月13日
				US	6639055	B1	2003年10月28日
				NL	300145	I1	2004年6月1日
				EP	0590058	A1	1994年4月6日
				EP	0590058	B1	2003年11月26日
				EP	0940468	A1	1999年9月8日
				JP	2008291036	A	2008年12月4日
				JP	4836147	B2	2011年12月14日
				DE	69233254	D1	2004年1月8日
				DE	69233254	T2	2004年9月16日
				AU	2250992	A	1993年1月12日
				AU	675916	B2	1997年2月27日
				DK	0590058	T3	2004年3月29日
				CA	2103059	A1	1992年12月15日
				CA	2103059	C	2005年3月22日
				CY	2500	B1	2005年9月2日
				JP	2006083180	A	2006年3月30日
				EP	1400536	A1	2004年3月24日
				JP	2005000169	A	2005年1月6日
				LU	91067	I2	2004年4月2日
				JPH	06508267	A	1994年9月22日
				JP	4124480	B2	2008年7月23日
				US	6407213	B1	2002年6月18日

US	2006165702	A1	2006年7月27日	PL	1846030	T3	2019年5月31日
				EP	3698807	A1	2020年8月26日
				EP	1846030	A1	2007年10月24日
				EP	1846030	B1	2018年11月21日
				US	2020239595	A1	2020年7月30日
				NZ	556095	A	2010年1月29日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/119761

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)
		IL 248614 A0	2017年1月31日
		IL 248614 B	2019年5月30日
		MX 2007008768 A	2007年10月19日
		TR 201901841 T4	2019年3月21日
		KR 20150083139 A	2015年7月16日
		US 2009081223 A1	2009年3月26日
		US 8404234 B2	2013年3月26日
		KR 20190016616 A	2019年2月18日
		ES 2710439 T3	2019年4月25日
		CR 9253 A	2008年7月31日
		US 2017037147 A1	2017年2月9日
		AR 050418 A1	2006年10月25日
		US 2013142865 A1	2013年6月6日
		ZA 200706017 B	2008年12月31日
		UA 94899 C2	2011年6月25日
		NO 20074238 L	2007年10月19日
		RU 2007131693 A	2009年2月27日
		RU 2438705 C2	2012年1月10日
		US 2015093381 A1	2015年4月2日
		KR 20180080371 A	2018年7月11日
		CA 2592177 A1	2006年7月27日
		JP 2015063525 A	2015年4月9日
		US 2018327510 A1	2018年11月15日
		JP 2013136601 A	2013年7月11日
		BR-PI 0518104 A	2008年10月28日
		BR-PI 0518104 B1	2019年9月10日
		BR-PI 0518104 B8	2021年5月25日
		IL 184244 A0	2007年10月31日
		US 2023212311 A1	2023年7月6日
		US 7449184 B2	2008年11月11日
		MA 29369 B1	2008年4月1日
		KR 20070094928 A	2007年9月27日
		KR 20200058588 A	2020年5月27日
		AU 2005325200 A1	2006年7月27日
		IL 266336 A	2019年6月30日
		WO 2006078307 A1	2006年7月27日
		KR 20190110637 A	2019年9月30日
		KR 20170134771 A	2017年12月6日
		KR 20130089280 A	2013年8月9日
		TW 200626171 A	2006年8月1日
		TWI 441646 B	2014年6月21日
		JP 2008528486 A	2008年7月31日
WO 2021067404 A2	2021年4月8日	无	
WO 2018090950 A1	2018年5月24日	无	
WO 2023020537 A1	2023年2月23日	无	
CN 113004415 A	2021年6月22日	无	