



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116490206 A

(43) 申请公布日 2023.07.25

(21) 申请号 202180062285.X

曾竣玮

(22) 申请日 2021.09.17

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(66) 本国优先权数据

专利代理师 刘海罗

202010981835.5 2020.09.17 CN

202011025265.9 2020.09.25 CN

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/00 (2006.01)

2023.03.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2021/118955 2021.09.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/057875 ZH 2022.03.24

(71) 申请人 普米斯生物技术(珠海)有限公司

地址 519080 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

(72) 发明人 翟天航 缪小牛 徐祎凤 王超

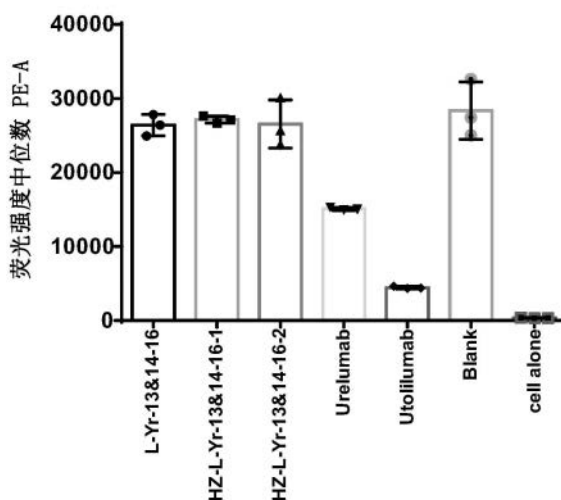
(54) 发明名称

靶向4-1BB的单域抗体、其融合蛋白、药物组合物及用途

(57) 摘要

涉及一种靶向4-1BB的单域抗体、其融合蛋白、药物组合物及用途。具体地,涉及的单域抗体包含一个重链可变区,所述重链可变区包含的CDR1-CDR3的氨基酸序列分别如表B中的任一项所示。单域抗体可以结合人的4-1BB,同时交叉结合食蟹猴的4-1BB;借助外部交联的情况下激活T细胞,兼备优异的抗肿瘤活性和安全性。

4-1BB配体阻断试验



(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
2022年3月24日 (24.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/057875 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/118955

(22) 国际申请日: 2021年9月17日 (17.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010981835.5 2020年9月17日 (17.09.2020) CN
202011025265.9 2020年9月25日 (25.09.2020) 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: 翟天航(ZHAI, Tianhang); 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)。 繆小牛(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)。 徐祎凤(XU, Yifeng); 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)。 曾竣玮(TSUN, Andy); 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)。

(54) Title: SINGLE-DOMAIN ANTIBODY TARGETING 4-1BB, FUSION PROTEIN THEREOF, PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向4-1BB的单域抗体、其融合蛋白、药物组合物及用途

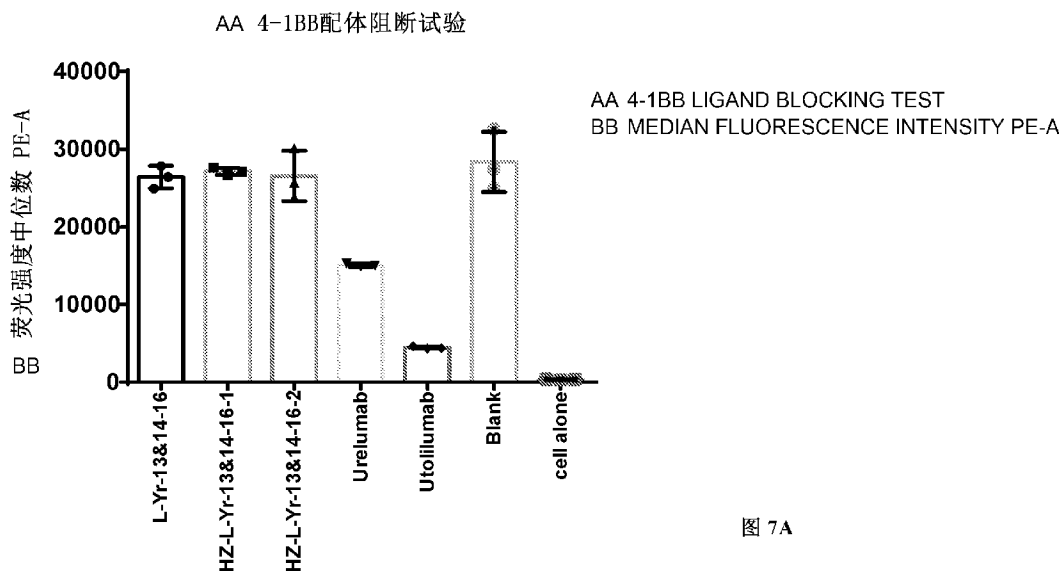


图 7A

(57) Abstract: Related is a single-domain antibody targeting 4-1BB, a fusion protein thereof, a pharmaceutical composition and a use thereof. Specifically, the related single-domain antibody comprises one heavy chain variable region, and the amino acid sequences of CDR1-CDR3 contained in the heavy chain variable region are as shown in any item in table B, respectively. The single-domain antibody can bind to human 4-1BB and at the same time cross-bind to cynomolgus 4-1BB; in addition, with the help of external cross-linking, T cells are activated, which have excellent anti-tumor activity and safety.

(57) 摘要: 涉及一种靶向4-1BB的单域抗体、其融合蛋白、药物组合物及用途。具体地, 涉及的单域抗体包含一个重链可变区, 所述重链可变区包含的CDR1-CDR3的氨基酸序列分别如表B中的任一项所示。单域抗体可以结合人的4-1BB, 同时交叉结合食蟹猴的4-1BB; 借助外部交联的情况下激活T细胞, 兼备优异的抗肿瘤活性和安全性。



WO 2022/057875 A1

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务有限公司(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市复兴门内大街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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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))。

靶向 4-1BB 的单域抗体、其融合蛋白、药物组合物及用途

技术领域

5 本发明属于生物医药领域，涉及一种靶向 4-1BB 的单域抗体、其融合蛋白、药物组合物及用途。

背景技术

10 肿瘤坏死因子受体超家族(4-1BB)又名 CD137，或 TNFRF9，是 TNF 受体家族的成员之一。4-1BB 是一个阅读框含有 255 个氨基酸(NCBI: NP_001552)的 I 型跨膜蛋白，由含有 17 个氨基酸的 N 端信号肽，169 个氨基酸的胞外区，27 个氨基酸的跨膜区和 42 个氨基酸的 C 端胞内区组成。4-1BB 分子主要表达在活化的 T 细胞、NK 细胞、调节性 T 细胞、树突状细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性细胞中，肿瘤血管的内皮细胞也有报道表达 4-1BB。

15 在 T 细胞的活化过程中，4-1BB 分子能为其提供共刺激信号。当 T 细胞受体接触到抗原后，会增加 4-1BB 的表达量，4-1BB 与配体结合后会引起 NF κ B 信号通路的激活，从而导致 T 细胞的活化增殖，并且 4-1BB 还能抑制活化细胞凋亡。动物模型和体外实验证实，抗 4-1BB 单抗具有抗肿瘤活性。它能够选择性地引起 CD8⁺ T 细胞的增殖、上调促炎性细胞因子 IFN γ 的表达，并且能够增强抗原特异性效应型 T 细胞的杀伤作用，从而促进肿瘤的清除。抗 4-1BB 单抗也能引起 NK 细胞的扩增，并能通过其
20 增加 CD8⁺ T 细胞的细胞毒活性。抗 4-1BB 抗体还能够引起肿瘤细胞的血管的内皮细胞上调粘附分子的表达，促进活化的 T 淋巴细胞浸润肿瘤组织。除此之外，在动物模型中，抗 4-1BB 激活性抗体还能减轻自身免疫性疾病，如自身免疫性脑脊髓炎，狼疮样综合征和胶原诱导性关节炎。

25 因此，在肿瘤治疗和一些自身免疫性疾病的治疗中，4-1BB 是一个重要潜在的靶点，具体的，在临床前结直肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤等动物模型种，靶向 4-1BB 的激动剂分子作为单药或者与 anti-PD-1、anti-PD-L1、anti-CTLA-4、anti-HER-2 等抗体的联用显示出显著的抗肿瘤活性 (Etxeberria I, et al. ESMO Open 2020;4:e000733.)。目前有两种 4-1BB 抗体正在进行临床实验: Urelumab(BMS-663513, Bristol-Myers Squibb 开发)和 Utomilumab(PF-05082566, Pfizer 开发)。研究表明，
30 Urelumab 是一种强效的激活剂，具有较好的激活活性，但是也具有肝毒性和疲劳等

不良反应；而 Utomilumab 在安全性具有优势，但相对于 Urelumab，它对受体激动活性较低。

因此，本领域迫切需要开发出一种更高效地靶向 4-1BB 的抗体及其相关药物。

5 发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，开发了一种抗人 4-1BB 的纳米抗体。具体地，本发明人利用人源的 4-1BB 抗原蛋白免疫羊驼(Llama)，获得高质量的免疫纳米抗体基因文库。其中，本发明人在所述免疫纳米抗体基因文库中筛选获得可以同时结合人和食蟹猴 4-1BB，同时需要借助外部交联发挥激活作用的两株抗 4-1BB 纳米抗体。再将两株纳米抗体序列进行优化，将基因工程化的突变体表达纯化，从抗体亲和力和与食蟹猴 4-1BB 交叉结合，激活 T 细胞的活性等方面进行进一步的筛选，从而获得了一类能在体外高效表达的、且特异性高的纳米抗体株。实验结果表明，本发明的抗 4-1BB 纳米抗体和融合蛋白具有分子量小，和食蟹猴交叉，不阻断 4-1BB 配体与 4-1BB 的天然结合，T 细胞激活作用强，安全性好的优点。由此提供了下述发明。

15

本发明的一个方面涉及一种抗 4-1BB 单域抗体，其包含一个重链可变区，所述重链可变区包含 CDR1-CDR3，其中，CDR1 的氨基酸序列选自 SEQ ID NOs: 41-80，CDR2 的氨基酸序列选自 SEQ ID NOs: 81-120，CDR3 的氨基酸序列选自 SEQ ID NOs: 121-160。

20 本发明的一个方面涉及一种抗 4-1BB 单域抗体，其包含一个重链可变区，所述重链可变区包含的 CDR1-CDR3 的氨基酸序列分别如下面的 1-40 项中的任一项所示：

项目编号	CDR1 的 SEQ ID NO:	CDR2 的 SEQ ID NO:	CDR3 的 SEQ ID NO:
1	41	81	121
2	42	82	122
3	43	83	123
4	44	84	124
5	45	85	125
6	46	86	126
7	47	87	127

8	48	88	128
9	49	89	129
10	50	90	130
11	51	91	131
12	52	92	132
13	53	93	133
14	54	94	134
15	55	95	135
16	56	96	136
17	57	97	137
18	58	98	138
19	59	99	139
20	60	100	140
21	61	101	141
22	62	102	142
23	63	103	143
24	64	104	144
25	65	105	145
26	66	106	146
27	67	107	147
28	68	108	148
29	69	109	149
30	70	110	150
31	71	111	151
32	72	112	152
33	73	113	153
34	74	114	154
35	75	115	155
36	76	116	156
37	77	117	157

38	78	118	158
39	79	119	159
40	80	120	160

。

本发明中，抗 4-1BB 单域抗体的 CDR 均由 IMGT 编号系统定义，请参见 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J].Nucleic acids research,2009;38(suppl_1):D301-D307。

本发明中，所述 4-1BB，如果没有特别说明，是指人 4-1BB。在本发明的一些实施方式中，所述 4-1BB 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 168 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 4-1BB 单域抗体，其 4 个框架区中的任意一个、两个、三个或全部 4 个进行人源化改造；

优选地，对第二个框架区进行人源化改造；可选地，还对第一个、第三个或第四个框架区进行改造；

优选地，所述抗 4-1BB 单域抗体与人的同源性大于或等于 75%、大于或等于 76%、大于或等于 77%、大于或等于 78%、大于或等于 79%、或者大于或等于 80%；

优选地，所述抗 4-1BB 单域抗体的框架区 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示，框架区 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 或 SEQ ID NO: 172 所示，框架区 3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示，并且框架区 4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 4-1BB 单域抗体，其与 4-1BB 抗原的 K_D 为小于 $E-07$ 、小于 $5E-08$ 、小于 $4E-08$ 、小于 $3E-08$ 、或者小于 $2E-08$ ；优选地，所述 K_D 通过 ForteBio 测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 4-1BB 单域抗体，其与 4-1BB 抗原的结合位点不同于 Urelumbab 和 Utomilumab。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 4-1BB 单域抗体，其特异结合人 4-1BB，同时交叉结合食蟹猴 4-1BB。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 4-1BB 单域抗体，其不阻断天然状态（例如在哺乳动物体内特别是在人体内）下 4-1BB 配体与 4-1BB 的结合。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗 4-1BB 单域抗体，其氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 1-40 中的任一序列所示。

5 本发明的另一方面涉及一种融合蛋白，其包含本发明中任一项所述的抗 4-1BB 单域抗体，以及人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的恒定区。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其由本发明中任一项所述的抗 4-1BB 单域抗体，以及人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的恒定区组成。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其由本发明中任一项所述的抗 4-1BB 单域抗体、连接片段 (linker)、以及人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的恒定区组成。

10 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，按照 EU 编号系统，所述人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的重链恒定区包含 L234A 突变和 L235A 突变；可选地，所述 IgG 的 Fc 段还包含 G237A 突变。

在本发明的一些实施方式中，所述融合蛋白为抗 4-1BB 的重链抗体。重链抗体是指没有轻链的抗体。是目前对 VHH-Fc 类抗体的一个通用的名称。

15 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，
所述人 IgG 的 Fc 段为人 IgG1 的 Fc 段；

所述人 IgG 的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，

20 所述人 IgG 的 Fc 段为包含 L234A 突变和 L235A 突变的人 IgG1 的 Fc 段；可选地，
所述人 IgG1 的 Fc 段还包含 G237A 突变；

优选地，人 IgG1 的 Fc 段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 167 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，

所述人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的恒定区与所述抗 4-1BB 单域抗体的 C 末端直接连接或通过连接片段连接。

25 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，

所述人 IgG1 的 Fc 段或人 IgG1 的恒定区与所述抗 4-1BB 单域抗体的 C 末端直接连接或通过连接片段连接。

30 本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子，其编码本发明中任一项所述的抗 4-1BB 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白。

本发明还涉及一种载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明还涉及一种宿主细胞，其包含本发明的分离的核酸分子，或者本发明的载体。

5 本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述抗 **4-1BB** 单域抗体或融合蛋白的步骤。

本发明的再一方面涉及一种偶联物，其包括抗体部分以及偶联部分，其中，所述抗体部分为本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

10 本发明的再一方面涉及一种试剂盒，其包含本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白，或者包含本发明的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包含第二抗体，其能够特异性结合所述单域抗体或融合蛋白；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

15 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 **4-1BB** 在样品中的存在或其水平。

20 本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白或者包含本发明的偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的辅料。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤或自身免疫性疾病的药物中的用途；

25 优选地，所述恶性肿瘤选自直肠癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌和头颈癌；

优选地，所述自身免疫性疾病选自自身免疫性脑脊髓炎、狼疮样综合征和胶原诱导性关节炎。

30 本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防恶性肿瘤自身免疫性疾病的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗 **4-1BB** 单域抗体或者本发明中

任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物的步骤；

优选地，所述恶性肿瘤选自直肠癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌和头颈癌；

5 优选地，所述自身免疫性疾病选自自身免疫性脑脊髓炎、狼疮样综合征和胶原诱导型关节炎。

在本发明的一些实施方式中，所述的方法，其中，给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的单域抗体或融合蛋白的步骤为在手术治疗之前或之后，和/或在放射治疗之前或之后。

在本发明的一些实施方式中，所述的方法，其中，

10 本发明的单域抗体或融合蛋白的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选 4.8-24mg 或 1-10mg；或者，本发明的单域抗体或融合蛋白的单次给药剂量为每位受试者 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或 200mg；

优选地，每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周或 3 周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。

15

根据本发明中任一项所述的抗 4-1BB 单域抗体或者本发明中任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物，其用于治疗和/或预防恶性肿瘤或自身免疫性疾病；

优选地，所述恶性肿瘤选自直肠癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌和头颈癌；

20 优选地，所述自身免疫性疾病选自自身免疫性脑脊髓炎、狼疮样综合征和胶原诱导型关节炎。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经

30

典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)), 其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成 5 抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Bethesda M.d.,Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987;196:901-917; Chothia 等人 Nature 1989;342:878-883, 或者 IMGT 编号系统定义, 见 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for 10 immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009;38(suppl_1):D301-D307 的定义。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG(例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

15 如本文中所使用的, 术语“单抗”和“单克隆抗体”是指, 来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段, 也即除可能自发出现的自然突变外, 一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的, 其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体, 这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 20 (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature,1975;256(5517):495), 但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片 25 段, 其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如, 小鼠、大鼠或兔)抗体。此外, 受体抗体的构架区 (FR) 的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换, 或被其他抗体的氨基酸残基替换, 以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容, 可参见例如, Jones et al.,Nature 1986; 321:522 525; Reichmann et al.,Nature,1988;332:323329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 30 1992; 2:593-596;和 Clark,Immunol. Today 2000; 21: 397 402。在一些情况下, 抗体的

抗原结合片段是双抗体(Diabodies), 其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见, 例如, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448 和 Poljak R. J. et al., Structure 1994; 5 2:1121-1123)。

如本文中所述的融合蛋白是一种通过 DNA 重组得到的两个基因共表达的蛋白产物。现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法(如冷泉港的抗体实验技术指南, 5-8 章和 15 章)。

如本文中所使用的, 术语“分离的”或“被分离的”指的是, 从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分, 那么可能是其所处的天然环境发生了改变, 或从天然环境下分离出该物质, 或二者情况均有发生。例如, 某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽, 而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质, 也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的, 术语“载体 (vector)”是指, 可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时, 载体称为表达载体。载体可以通过转化, 转导或者转染导入宿主细胞, 使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的, 包括但不限于: 质粒; 噬菌粒; 柯斯质粒; 人工染色体, 例如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC); 噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于, 逆转录酶病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒 (如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件, 包括但不限于, 启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外, 载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的, 术语“宿主细胞”是指, 可用于导入载体的细胞, 其包括但不限于, 如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞, 如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞, 如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞, 或者如纤维原细胞, CHO 细胞, GS 细胞, COS 细胞, NSO 细胞, HeLa 细胞, BHK 细胞, HEK293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的, 术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受

试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，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**），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。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

5 括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患

10 者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途的有效量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

15 本发明还涉及如下 1 至 11 项中的任意一项：

1. 一种抗**4-1BB**纳米抗体，其特征在于，所述抗**4-1BB**纳米抗体的**VHH**链具有如 **SEQ ID NOs: 1-40**中任一所示的氨基酸序列；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代**1-8**个(较佳地**1-5**个，更佳地**1-3**个)氨基酸残基，并能够保留**4-1BB**纳米抗

20 体的**4-1BB**结合亲和力的衍生序列。

2. 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白从**N**端到**C**端具有如式**I**所示的结构：

Z1-L-Z2 (式**I**)

式中，

Z1为一个或多个（较佳地**1-2**个，更佳地**1**个）如第**1**项所述的抗**4-1BB**纳米抗体的

25 **VHH**链；

Z2为免疫球蛋白的**Fc**段；

L为任选的接头序列。

3. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码如第**1**项所述的抗**4-1BB**纳米抗体或如第**2**项所述的融合蛋白。

30 4. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有如第**3**项所述的多核苷酸。

5. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有如第4项所述的表达载体，或其基因组中整合有如第3项所述的多核苷酸。

6. 一种产生抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白的方法，其特征在于，包括步骤：

(a) 在适合产生抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白的条件下，培养如第5项所述的宿主细胞，从而获得含所述抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白的培养物；和

(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白。

7. 一种免疫偶联物，其特征在于，所述免疫偶联物含有：

(a) 如第1项所述的抗4-1BB纳米抗体，或如第2项所述的融合蛋白；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。

8. 如第1项所述的抗4-1BB纳米抗体或如第2项所述的融合蛋白的用途，用于制备 (a)用于检测4-1BB分子的试剂； (b)用于治疗肿瘤的药物。

9. 一种药物组合物，其特征在于，包括：

(i) 如第1项所述的抗4-1BB纳米抗体、如第2项所述的融合蛋白，或如第7项所述的免疫偶联物；和

(ii) 药学上可接受的载体。

10. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白具有：

(i) 如第1项所述的抗4-1BB纳米抗体，或如第2项所述的融合蛋白的序列；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

11. 一种蛋白复合物，其特征在于，所述的复合物由4-1BB蛋白和抗4-1BB抗体或其抗原结合片段通过氢键和/或疏水相互作用而形成；

其中，所述的氢键作用位点包括4个以上（较佳地5个以上，更佳地6个以上，最佳地为7个）位于4-1BB蛋白中选自下组的位点：第118位Asp、第123位Leu、第130位Arg、第132位Val、第134位Cys、第135位Gly，和第137位Ser；

并且，所述的疏水性相互作用界面的构成位点包括2个以上（较佳地3个以上，更佳地4个以上）位于4-1BB蛋白中选自下组的位点：第123位Leu、第124位Val、第133位Val，和第136位Pro；

其中，所述的4-1BB蛋白的氨基酸编号是基于SEQ ID NO: 168的编号。

本发明还涉及如下的第一方面至第十五方面中的任一方面：

在本发明的第一方面，提供了一种抗 4-1BB 纳米抗体，所述抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链具有如 SEQ ID NO: 1-40 中任一所示的氨基酸序列；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代 1-8 个(较佳地 1-5 个，更佳地 1-3 个)氨基酸残基，并能够保留 4-1BB 纳米抗体的 4-1BB 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3、35、37、38、39 或 40 中任一所示。

在本发明的第二方面，提供了一种融合蛋白，所述融合蛋白从 N 端到 C 端具有如式 I 所示的结构：

10 Z1-L-Z2 (式 I)

式中，

Z1 为一个或多个(较佳地 1-2 个，更佳地 1 个)如本发明第一方面所述的抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链；

Z2 为免疫球蛋白的 Fc 段；

15 L 为任选的接头序列。

在另一优选例中，所述的融合蛋白为二聚体，所述的二聚体由 Z2 中的 Fc 段之间的二硫键所形成。

在另一优选例中，所述免疫球蛋白是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；优选为 IgG1、IgG2 或 IgG4。

20 在另一优选例中，所述免疫球蛋白是 IgG1，或其突变型。

在另一优选例中，所述 L 具有选自下组的氨基酸序列：GGGGS、(GGGGS)₂、(GGGGS)₃、(GGGGS)₄、(GGGGS)₅，或其组合。

在另一优选例中，所述 Z2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 167 所示。

25 在另一优选例中，所述 Z2 的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 167 所示的氨基酸序列相同或基本相同。

在另一优选例中，所述的基本相同是至多有 50 个(较佳地为 1-20 个，更佳地为 1-10 个、更佳地 1-5 个，最佳地为 1-3 个)氨基酸不相同，其中，所述的不相同包括氨基酸的取代、缺失或添加。

30 在另一优选例中，所述的基本相同是氨基酸序列与相应氨基酸序列的序列同一性至少为 70%、至少为 75%、至少为 80%、至少为 85%、至少为 86%、至少为 87%、

至少为 88%、至少为 89%、至少为 90%、至少为 91%、至少为 92%、至少为 93%、至少为 94%、至少为 95%、至少为 96%、至少为 97%、至少为 98%，或者至少为 99%。

在另一优选例中，所述融合蛋白的式 I 中，Z1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-40 中任一所示，并且 L 为无，并且 Z2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 167 所示；

5 其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代 1-8 个(较佳地 1-5 个，更佳地 1-3 个)氨基酸残基，并能够保留 4-1BB 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述融合蛋白的式 I 中，Z1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3、35、37、38、39 或 40 中任一所示，并且 L 为无，并且 Z2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 167 所示；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代 1-8 个(较佳地 1-5 个，更佳地 1-3 个)氨基酸残基，并能够保留 4-1BB 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述融合蛋白的氨基酸序列中，从 N 端到 C 端依次为：如 SEQ 15 ID NO: 1-40 中任一所示的序列和如 SEQ ID NO: 167 所示的序列。

在另一优选例中，所述融合蛋白的氨基酸序列中，从 N 端到 C 端依次为：如 SEQ ID NO: 3、35、37、38、39 或 40 中任一所示的序列，和如 SEQ ID NO: 167 所示的序列。

在本发明的第三方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码如本发明第一方面 20 面所述的抗 4-1BB 纳米抗体或如本发明第二方面所述的融合蛋白。

在另一优选例中，所述的多核苷酸包括 DNA 或 RNA。

在本发明的第四方面，提供了一种表达载体，所述表达载体含有如本发明第三方面所述的多核苷酸。

在本发明的第五方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有如本发明第四方面 25 面所述的表达载体，或其基因组中整合有如本发明第三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、哺乳动物细胞。

在本发明的第六方面，提供了一种产生抗 4-1BB 纳米抗体或融合蛋白的方法，包 30 括步骤：

(a) 在适合产生抗 **4-1BB** 纳米抗体或融合蛋白的条件下，培养如本发明第五方面所述的宿主细胞，从而获得含所述抗 **4-1BB** 纳米抗体或融合蛋白的培养物；和

(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体或融合蛋白。

在本发明的第七方面，提供了一种免疫偶联物，所述免疫偶联物含有：

5 (a) 如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体，或如本发明第二方面所述的融合蛋白；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。

10 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-15** 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)的如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体，或如本发明第二方面所述的融合蛋白。

20 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一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体，或如本发明第二方面所述的融合蛋白。

在本发明的第八方面，提供了如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体或如本发明第二方面所述的融合蛋白的用途，用于制备(a)用于检测 **4-1BB** 分子的试剂；(b) 用于治疗肿瘤的药物。

25 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。

在本发明的第九方面，提供了一种药物组合物，包括：

(i) 如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体、如本发明第二方面所述的融合蛋白，或如本发明第七方面所述的免疫偶联物；和

(ii) 药学上可接受的载体。

30 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：胃癌、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、宫颈癌、淋巴癌、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、黑色素瘤、头颈癌、鼻咽癌、甲状腺肿瘤、舌癌或其组合。

5 在本发明的第十方面，提供了如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体或如本发明第二方面所述的融合蛋白的一种或多种的用途：

(i) 用于检测人 **4-1BB** 分子；

(ii) 用于流式检测；

(iii) 用于细胞免疫荧光检测；

10 (iv) 用于治疗肿瘤；和

(v) 用于肿瘤诊断。

在另一优选例中，所述用途为非诊断的和非治疗的。

在本发明的第十一方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

15 (i) 如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体，或如本发明第二方面所述的融合蛋白的序列；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括：**6His** 标签、**HA** 标签、**Flag** 标签、**Fc** 标签，或其组合。

在另一优选例中，所述的重组蛋白特异性结合于 **4-1BB** 蛋白。

20 在本发明的第十二方面，提供了如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体、如本发明第二方面所述的融合蛋白，或如本发明第七方面所述的免疫偶联物的用途，被用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒；

其中，所述试剂、检测板或试剂盒用于：检测样品中 **4-1BB** 蛋白；

其中，所述药剂用于治疗或预防各种血液肿瘤与实体肿瘤。

25 在另一优选例中，所述肿瘤包括：胃癌、淋巴瘤、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、肾上腺肿瘤、黑色素瘤、头颈癌、鼻咽癌、甲状腺肿瘤、舌癌或其组合。

在本发明的第十三方面，提供了一种检测样品中 **4-1BB** 蛋白的方法，包括步骤：

30 (1) 将样品与如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体或如本发明第二方面所述的融合蛋白接触；

(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 **4-1BB** 蛋白。

在另一优选例中，所述检测包括定性检测和定量检测。

在本发明的第十四方面，提供了一种治疗疾病的方法，所述方法包括，给需要的对象施用如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体、如本发明第二方面所述的融合蛋白或如本发明第七方面所述的免疫偶联物。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物。

在另一优选例中，所述哺乳动物为人。

在本发明的第十五方面，提供了一种蛋白复合物，所述的复合物由 **4-1BB** 蛋白和抗 **4-1BB** 抗体或其抗原结合片段通过相互作用而形成。

在另一优选例中，所述的相互作用包括氢键作用和疏水性作用。

在另一优选例中，所述抗 **4-1BB** 抗体是抗 **4-1BB** 纳米抗体。

在另一优选例中，所述抗 **4-1BB** 抗体是如本发明第一方面所述的抗 **4-1BB** 纳米抗体。

在另一优选例中，所述的复合物由 **4-1BB** 蛋白和抗 **4-1BB** 抗体或其抗原结合片段通过氢键和/或疏水相互作用而形成；

其中，所述的氢键作用位点包括 4 个以上（较佳地 5 个以上，更佳地 6 个以上，最佳地 7 个）位于 **4-1BB** 蛋白中选自下组的位点：第 118 位 Asp、第 123 位 Leu、第 130 位 Arg、第 132 位 Val、第 134 位 Cys、第 135 位 Gly，和第 137 位 Ser；

并且，所述的疏水性相互作用界面的构成位点包括 2 个以上（较佳地 3 个以上，更佳地 4 个以上）位于 **4-1BB** 蛋白中选自下组的位点：第 123 位 Leu、第 124 位 Val、第 133 位 Val，和第 136 位 Pro；

其中，所述的 **4-1BB** 蛋白的氨基酸编号是基于 SEQ ID NO: 168 的编号。

在另一优选例中，所述的疏水性相互作用界面还包括 4 个以上（较佳地 5 个以上，更佳地 6 个以上，最佳地 7 个以上或 8 个以上）位于抗 **4-1BB** 抗体或其抗原结合片段中选自下组的位点：第 32 位 Val、第 33 位 Ala、第 37 位 Tyr、第 47 位 Leu、第 52 位 Ile、第 97 位 Tyr、第 102 位 Tyr，和第 115 位 Trp；

其中，所述的抗 **4-1BB** 抗体或其抗原结合片段的氨基酸编号是基于 SEQ ID NO: 169 或 39 的编号。

在另一优选例中，所述复合物中的 **4-1BB** 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 168

所示。

在另一优选例中,所述复合物中的抗 4-1BB 纳米抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 169 或 39 所示。

在另一优选例中,所述的氢键作用位于 4-1BB 蛋白的第 118 位 Asp、第 123 位 Leu、
5 第 130 位 Arg、第 132 位 Val、第 134 位 Cys、第 135 位 Gly, 和/或第 137 位 Ser;
其中,所述的氨基酸编号是基于 SEQ ID NO: 168 的编号。

在另一优选例中,所述的疏水性作用的作用界面位于 4-1BB 蛋白的第 123 位 Leu、
第 124 位 Val、第 133 位 Val 和/或第 136 位 Pro, 与抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链的
第 32 位 Val、第 33 位 Ala、第 37 位 Tyr、第 47 位 Leu、第 52 位 Ile、第 97 位 Tyr、
10 第 102 位 Tyr 和/或第 115 位 Trp;

其中,所述的 4-1BB 蛋白的氨基酸编号是基于 SEQ ID NO: 168 的编号, 并且所
述的抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链的氨基酸编号是基于 SEQ ID NO: 169 或 39 的编号。

术语

15 为了可以更容易地理解本公开, 首先定义某些术语。如本申请中所使用的, 除非
本文另有明确规定, 否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。

如本文所用, 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可
接受误差范围内的值或组成, 其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

如本文所用, 术语“给予”、“施用”可互换使用, 是指使用本领域技术人员已知的
20 各种方法和递送系统中的任一种将本发明的产品物理引入受试者, 包括静脉内, 肌内,
皮下, 腹膜内, 脊髓或其它肠胃外给药途径, 例如通过注射或输注。

本发明纳米抗体

如本文所用, 术语“本发明纳米抗体”、“本发明的抗 4-1BB 纳米抗体”、“本发明
25 4-1BB 纳米抗体”可互换使用, 均指特异性识别和结合于 4-1BB(包括人 4-1BB)的纳米
抗体。特别优选的是 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-40 中任一所示的纳米抗
体, 更加优选地是 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3、35、37、38、39 或 40 中
任一所示的纳米抗体。

如本文所用, 术语“单域抗体(VHH)”、“纳米抗体”(nanobody)具有相同的含义,
30 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。

如本领域技术人员所知，免疫偶联物及融合表达产物包括：药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的抗 4-1BB 蛋白抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

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 4-1BB 蛋白的多肽，例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含有起始甲硫氨酸。

5 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。

10 一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的 3 个特定的区域来描述，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。纳米抗体也有 4 个框架区 (framework)，其中第 1、3、4 个框架区 (框架区 1、框架区 3 和框架区 4) 和人抗体同源性较高，在人源化过程中改造的必要性较小；优选
15 改造第 2 个框架区即框架区 2 (framework 2)。

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。

20 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
25 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。

30 本发明抗体指具有 4-1BB 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(通常为 1-50 个, 较佳地 1-30 个, 更佳地 1-20 个, 最佳地 1-10 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(通常为 20 个以内, 较佳地为 10 个以内, 更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如, 5 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 10 码的蛋白、以及利用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, 如包含纳米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纳米抗体的片段。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。

15 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。

5 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。

10 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
15 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
20 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。

5 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。

10 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。

15 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。

20 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。

25 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。

30 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. 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))；9. 化疗剂(例如，顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

本发明融合蛋白

如本文所述，“本发明融合蛋白”是指既具有本发明第一方面所述的抗 4-1BB 纳米抗体，又具有免疫球蛋白的 Fc 段的融合蛋白。

在本发明中，提供了一种融合蛋白，所述纳米抗体融合蛋白从 N 端到 C 端具有如式 I 所示的结构：

Z1-L-Z2 (式 I)

式中，

Z1 为一个或多个如本发明第一方面所述的抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链；

Z2 为免疫球蛋白的 Fc 段；

L 为任选的接头序列。

优选地，所述的免疫球蛋白可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 等。(优选 IgG1、IgG2 或 IgG4)，也可以是 IgG1 的不同突变型。

在一个实施方式中，所述的融合蛋白为二聚体，所述的二聚体由 Z2 中的 Fc 段之间的二硫键所形成。

在一个实施方式中，所述 L 具有选自下组的氨基酸序列：GGGGS、(GGGGS)₂、(GGGGS)₃、(GGGGS)₄、(GGGGS)₅，或其组合。

在优选的实施方式中，所述 Z2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 167 所示。

在另一个实施方式中，所述 Z2 的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 167 所示的氨基酸序列相同或基本相同。

优选地，所述的基本相同是至多有 50 个(较佳地为 1-20 个，更佳地为 1-10 个、更佳地 1-5 个，最佳地为 1-3 个)氨基酸不相同，其中，所述的不相同包括氨基酸的取代、缺失或添加。

优选地，所述的基本相同是氨基酸序列与相应氨基酸序列的序列同一性至少为

70%、至少为 75%、至少为 80%、至少为 85%、至少为 86%、至少为 87%、至少为 88%、至少为 89%、至少为 90%、至少为 91%、至少为 92%、至少为 93%、至少为 94%、至少为 95%、至少为 96%、至少为 97%、至少为 98%，或者至少为 99%。

在本发明优选的实施方式中，所述融合蛋白的氨基酸序列中，从 N 端到 C 端依次
5 为：如 SEQ ID NO: 1-40 中任一所示的序列和如 SEQ ID NO: 167 所示的序列；

其中，上述氨基酸序列中任何一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代 1-8 个(较佳地 1-5 个，更佳地 1-3 个)氨基酸残基，并能够保留 4-1BB 结合亲和力的衍生序列。

本发明的融合蛋白具有双靶标结合亲和力高、特异性强的优势，从而进一步增强
10 抗肿瘤免疫功能。

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
15 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 4-1BB 蛋白分子，因而可用于治疗肿瘤。此
20 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%)的本发明上述的纳米抗体(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
25 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
30 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内的。

标记的纳米抗体

5 在本发明的一个优选例中，所述纳米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 4-1BB 的纳米抗体用胶体金标记，得到胶体金标记的纳米抗体。

本发明的抗 4-1BB 纳米抗体具有很好的特异性，很高的效价。

10

检测方法

本发明还涉及检测 4-1BB 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 4-1BB 蛋白的水平。

15 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)或融合蛋白或检测板的试剂盒，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。

20 本发明还提供了用于检测 4-1BB 水平的检测试剂盒，该试剂盒包括识别 4-1BB 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

25 如上所述，本发明的纳米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 4-1BB 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 4-1BB 的临床诊断和靶向治疗。

发明的有益效果

30 本发明取得了如下技术效果中的任意一项或任意多项：

1) 本发明的纳米抗体分子量小。

2) 本发明的纳米抗体能够高度特异结合人 **4-1BB** 蛋白，同时交叉结合食蟹猴蛋白。

3) 本发明纳米抗体需要借助外部交联发挥激活作用，具有优异的活性和安全性。

5 4) 本发明的纳米抗体不阻断天然状态下 **4-1BB** 配体与 **4-1BB** 的结合。

5) 作为抗 **4-1BB** 的激动型分子，**Urelumab** 因为激活活性太强导致临床肝毒性。本发明的抗体一个重要优势是与 **Urelumab** 和 **Utomilumab** 的结合 **4-1BB** 的位点有差异，且激活活性处于 **Urelumab** 和 **Utomilumab** 之间。

10 附图说明

图 1A: 本发明第一批的 **4-1BB** 抗体结合稳定表达人 **4-1BB** 的 **CHO** 细胞的检测结果。

图 1B: 本发明第二批的 **4-1BB** 抗体结合稳定表达人 **4-1BB** 的 **CHO** 细胞的检测结果。

15 图 2A: 本发明第一批的 **4-1BB** 抗体结合食蟹猴 **4-1BB** 蛋白的检测结果。

图 2B: 本发明第二批的 **4-1BB** 抗体结合食蟹猴 **4-1BB** 蛋白的检测结果。

图 3A: 本发明第一批的 **4-1BB** 抗体激活原代 **T** 细胞产生 **IFN- γ** 的检测结果。

图 3B: 本发明第二批 **4-1BB** 抗体激活原代 **T** 细胞产生 **IFN- γ** 的检测结果。

20 图 4A: 本发明 **L-Yr-13&14-16** 分子经基因工程改造的子代分子结合稳定表达人 **4-1BB** 的 **CHO** 细胞的检测结果。

图 4B: 本发明 **A-Na-19** 分子经基因工程改造的子代分子结合稳定表达人 **4-1BB** 的 **CHO** 细胞的检测结果。

图 5A: 本发明 **L-Yr-13&14-16** 分子经基因工程改造的子代分子结合稳定表达食蟹猴 **4-1BB** 的 **CHO** 细胞的检测结果。

25 图 5B: 本发明 **A-Na-19** 分子经基因工程改造的子代分子结合稳定表达食蟹猴 **4-1BB** 的 **CHO** 细胞的检测结果。

图 6A: 本发明 **L-Yr-13&14-16** 分子经基因工程改造的子代分子激活原代 **T** 细胞产生 **IFN- γ** 的检测结果。

30 图 6B: 本发明 **A-Na-19** 分子经基因工程改造的子代分子激活原代 **T** 细胞产生 **IFN- γ** 的检测结果。

图 7A: 本发明 L-Yr-13&14-16 分子经基因工程改造的子代分子阻断 4-1BB 配体与 4-1BB 结合的检测结果。

图 7B: 本发明 L-Yr-13&14-16-1 分子与 TNFRSF 成员结合的检测结果。

图 8: 本发明 4-1BB-VHH 复合物的晶体示意图。

5 图 9: 本发明 4-1BB-VHH 复合物晶体结构。其中, 绿色为 4-1BB 蛋白; 蓝色为抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链。

图 10: 本发明 4-1BB-VHH 复合物晶体结构中的氢键相互作用界面。其中, 绿色为 4-1BB 蛋白; 蓝色为抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链。

10 图 11: 本发明 4-1BB-VHH 复合物晶体结构中的疏水性相互作用界面。其中, 绿色为 4-1BB 蛋白; 蓝色为抗 4-1BB 纳米抗体的 VHH 链。

在本发明中, 涉及到的抗 4-1BB 纳米抗体及其 CDR 的序列编号如下面的表 B 所示。

表 B: 本发明的纳米抗体所对应的序列编号 (SEQ ID NO:)

抗体名称	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
A-Na-16	1	41	81	121
A-Na-18	2	42	82	122
A-Na-19	3	43	83	123
A-Ye-02	4	44	84	124
A-Ye-03	5	45	85	125
A-Ye-04	6	46	86	126
A-Ye-05	7	47	87	127
A-Ye-10	8	48	88	128
A-Ye-13	9	49	89	129
A-Ye-14	10	50	90	130
A-Ye-15	11	51	91	131
A-Ye-18	12	52	92	132
A-Ye-19	13	53	93	133
A-Ye-21	14	54	94	134
A-Ye-22	15	55	95	135

A-Ye-23	16	56	96	136
A-Ye-25	17	57	97	137
A-Ye-27	18	58	98	138
A-Ye-30	19	59	99	139
A-Ye-33	20	60	100	140
A-Ye-20	21	61	101	141
A-Ye-35	22	62	102	142
L-Yr-13&14-01	23	63	103	143
L-Yr-13&14-02	24	64	104	144
L-Yr-13&14-03	25	65	105	145
L-Yr-13&14-05	26	66	106	146
L-Yr-13&14-06	27	67	107	147
L-Yr-13&14-07	28	68	108	148
L-Yr-13&14-08	29	69	109	149
L-Yr-13&14-09	30	70	110	150
L-Yr-13&14-10	31	71	111	151
L-Yr-13&14-11	32	72	112	152
L-Yr-13&14-12	33	73	113	153
L-Yr-13&14-13	34	74	114	154
L-Yr-13&14-16	35	75	115	155
L-Yr-13&14-17	36	76	116	156
Hu-A-NA-19-1	37	77	117	157
Hu-A-NA-19-2	38	78	118	158
HZ-L-Yr-13&14-16-1	39	79	119	159
HZ-L-Yr-13&14-16-2	40	80	120	160

其中，各纳米抗体的 CDR 均是由 IMGT 编号系统定义。

表 C：本发明涉及的部分序列

SEQ ID NO:	氨基酸序列
------------	-------

1	<p>QVQLVESGGGLVPPGESLRLSCAASGAIFRINTGAWYRQAP GKQRELVASLT TYGKTTYAD FVKGRFTISRDDARNTVSLQ MNSLKPEDTAIYYCHIGPEPRYGYWGQGTQVTVSS</p>
2	<p>QVQLVESGGGLVPPGESLRLSCAASGAIFRINTGAWYRQAP GKQRELVASLT TYGKTTYAD FVKGRFTISRDDAENTVSLQ MNSLKPEDTAIYYCHIGPEPRYGYWGQGTQVTVSS</p>
3	<p>QVQLVESGGGLVPPGESLRLSCAASGAIFRINTGAWYRQAP GKQRELVASLT TYGKTTYAD FVKGRFTISRDDAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCHIGPEPRYGYWGQGTQVTVSS</p>
4	<p>QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGLVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSLYTGDDYWGQGTQVTVS S</p>
5	<p>QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQA PGKEREGLVLCISSSGGETTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCGAELLGSGEGCYVWSRDGSYWGQGT QVTVSS</p>
6	<p>QVQLQESGGGLVPPGESLRLSCAASGAIFRINTGAWYRQAP GKQRELVASLT TYGKTTYAD FVKGRFTISRDDAKNTVSLQ MNSLKPEDTAIYYCHIGPEPRYGYWGQGTQVTVSS</p>
7	<p>QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGLVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGQGTQVTVSS</p>
8	<p>QVQLQESGGGLVEPPGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAP GKEREGLVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGPGTQVTVSS</p>
9	<p>EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGLVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSYTGDYWGQGTQVTVS S</p>

10	<p>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLGLYAIGWFRQA PGKEREWVSCIMSSDSSAYYADSVKGRFTVSRDNAKNTVYL QMNRLKPEDTAVYYCAAPQSDCFHYSENDYWGQGTQVTV SS</p>
11	<p>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGQGTQVTVSS</p>
12	<p>QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGQGTQVTVSS</p>
13	<p>QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSLGLYAIGWFRQA PGKEREWVSCIMSSDSSAYYADSVKGRFTVSRDNAKNTVYL QMNRLKPEDTAVYYCAAPQSDCFHYSENDYWGQGTQVTV SS</p>
14	<p>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLDYYAIGWFRQA PGKEREWVSCIMSSDSSAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL RMNSLKPEDTAVYYCTAPRSDCFHYGENDYWGQGTQVTVS S</p>
15	<p>QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSLDYYAIGWFRQA PGKEREWVSCITASDSSAYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL RMNSLKPEDTAVYYCAAPRSDCFHYGENDYWGQGTQVTV SS</p>
16	<p>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLGLYAIAWFRQAP GKEREWVSCIEKSDSSAYYADSVKGRFTVSRDNAKNTVDLQ MNRLSPEDTAVYYCAAPQSDCFHYKENDYWGQGTQVTVSS</p>
17	<p>QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSLKGRFTISRDNAKNTVYLQ MTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSLYTGDDYWGQGTQVTVSS</p>
18	<p>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLGLYAIGWFRQA PGKEREWVSCIMSSDSSAYYADSVKGRFTVSRDNAKNTVYL</p>

	QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGQGTQVTVSS
19	QVQLQESGGALVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGQGTQVTVSS
20	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSLYTGDDYWGPGTQVTVSS
21	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSYYSDDYWGQGTQVTVSS
22	QVQLQESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQA PGKEREGVLCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMTNLKPEDTAVYLCGAPRDCSRYSSDDYWGQGTQVTVSS
23	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSFNAMGWWRQAPG KQREFVAIITRDGSTNLADSVKGRFTISSDNKNTWFLQMN SLKPEDTAVYYCSASDYGSSLYYWGQGTQVTVSS
24	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSITAMGWYRQA PGQQRELVAAIASGDGATNYADFVKGRFTISRDNKNTMFL QMNSLKPEDSAVYYCYARTGYGSSWPMGHEYDYWGQGTQ VTVSS
25	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCDSGRIFSYNFMGWYRQAP GKQRELVASITWGGTIKYADSVKGRFTISRHDAENTVYLQ MNSLKSEDVAVYYCHAATDTGVIYWGQGTQVTVSS
26	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLSGYVMGWFRQ ASGKERELVAAISSGGSTYYEDSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCAADPRRLTGLYDYWGQGTQVTVSS
27	QVQLQESGGGLVEAGGSLRLSCAASGSIFSINVMGWYRQAP GKQRELVAVITSDYSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLKPEDTAVYHCAATGYGSSPWYWGQGTQVTVSS

28	<p>QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFGITAMGWYRQP PGKQRELVAAIIMSDGDTNYQDSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKLEDTAVYYCYARTGYGSGRLMGHEYDYWGQGT QVTVSS</p>
29	<p>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSISAMGWYRQPP GKQRELVALIIMSDGDTNYQDSVKGRFTISRDNANNTMYLQ MNSLKLEDTAVYYCYARTGYGSGRLMGHEYDYWGQGTQ VTVSS</p>
30	<p>QVQLQESGGGLVQAGGSLKLSAASGSTFSISAMGWYRQA PGKQRELVAAIIVIGDGTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGT QVTVSS</p>
31	<p>QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSITAMGWYRQA PGQQRELVAAIASGDGATNYADSVKGRFTISRDNKNTMFL QMNSLKPEDSAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGTQ VTVSS</p>
32	<p>QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFSITAMGWYRQP PGKQRELVAAIIMSDGDTNYQDSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKLEDTAVYYCYARTGYGSGRLMGHEYDYWGQGT QVTVSS</p>
33	<p>QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFSITAMGWYRQP PGKQRELVAAIIMSDGDTNYQDSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSGWLEGHEYDYWGQGT QVTVSS</p>
34	<p>QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFSITAMGWYRQP PGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGT QVTVSS</p>
35	<p>QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQA PGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYL</p>

	QMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGT QVTVSS
36	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIFSSYVMAWYRQA PGKERELVALIRYGGSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLILQ MNSLKPEDTAMYYCAASKSAYIFDDR DYWGQGTQVTVSS
37	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGAIFRINTGAWYRQAP GKQRELVASLT TYGKTTYAD FVKGRFTISRDD SKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCHIGPEPRYGYWGQGT LVTVSS
38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGAIFRINTGAWYRQAP GKGLELVASLT TYGKTTYAD FVKGRFTISRDD SKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCHIGPEPRYGYWGQGT LVTVSS
39	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQA PGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGT QVTVSS
40	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQA PGKGLELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYL QMNSLRAEDTAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGT QVTVSS
41	AASGAIFRINTGA
42	AASGAIFRINTGA
43	AASGAIFRINTGA
44	AASGFTFDDYAIG
45	AASGFTLDYYAIG
46	AASGAIFRINTGA
47	AASGFTFDDYAIG
48	AASGFTFDDYAIG
49	AASGFTFDDYAIG
50	AASGFSLGLYAIG

51	AASGFTFDDYAIG
52	AASGFTFDDYAIG
53	AASGFSLGLYAIG
54	AASGFSLDYYAIG
55	AASGFSLDYYAIG
56	AASGFSLGLYAIA
57	AASGFTFDDYAIG
58	AASGFSLGLYAIG
59	AASGFTFDDYAIG
60	AASGFTFDDYAIG
61	AASGFTFDDYAIG
62	AASGFTFDDYAIG
63	AASGSEFNAMG
64	AASGGTFSITAMG
65	DSGRIFSYNFMG
66	AASGRTLSGYVMG
67	AASGSIFSINVMG
68	AASGSTFGITAMG
69	AASGSTFISISAMG
70	AASGSTFISISAMG
71	AASGSTFISISAMG
72	AASGSTFISISAMG
73	AASGSTFISISAMG
74	AASGSTFISISAMG
75	AASGSTFISIVAMG
76	AASRSIFSSYVMA
77	AASGAIFRINTGA
78	AASGAIFRINTGA
79	AASGSTFISIVAMG

80	AASGSTFSIVAMG
81	SLTTYGKTTYADFVKG
82	SLTTYGKTTYADFVKG
83	SLTTYGKTTYADFVKG
84	CISSGGSTYYADSVKG
85	CISSGETTYYSDSVKG
86	SLTTYGKTTYADFVKG
87	CISSGGSTYYADSVKG
88	CISSGGSTYYADSVKG
89	CISSGGSTYYADSVKG
90	CIMSSDSSAYYADSVKG
91	CISSGGSTYYADSVKG
92	CISSGGSTYYADSVKG
93	CIMSSDSSAYYADSVKG
94	CIMSSDSSAYYADSVKG
95	CITASDSSAYYADSVKG
96	CIEKSDSSAYYADSVKG
97	CISSGGSTYYADSLKG
98	CIMSSDSSAYYADSVKG
99	CISSGGSTYYADSVKG
100	CISSGGSTYYADSVKG
101	CISSGGSTYYADSVKG
102	CISSGGSTYYADSVKG
103	IITRDGSTNLADSVKG
104	AIASGDGATNYADFVKG
105	SITWGGTIKYADSVKG
106	AISSGGSTYYEDSVKG
107	VITSDYSTNYADSVKG
108	AIIMSDGDTNYQDSVKG

109	LIIMSDGDTNYQDSVKG
110	AIVIGDGDNTYADSVKG
111	AIASGDGATNYADSVKG
112	AIIMSDGDTNYQDSVKG
113	AIIMSDGDTNYQDSVKG
114	SIITGDGDNTYADSVKG
115	SIITGDGDNTYADSVKG
116	LIRYGGSTDYADSVKG
117	SLTTYGKTTYADSVKG
118	SLTTYGKTTYADSVKG
119	SIITGDGDNTYADSVKG
120	SIITGDGDNTYADSVKG
121	HIGPEPRYGY
122	HIGPEPRYGY
123	HIGPEPRYGY
124	GAPRDCSLYTGDDY
125	GAELLSGEGCYVWSRDGSY
126	HIGPEPRYGY
127	GAPRDCSRYSSDDY
128	GAPRDCSRYSSDDY
129	GAPRDCSYTGTDDY
130	AAPQSDCFHYSENDY
131	GAPRDCSRYSSDDY
132	GAPRDCSRYSSDDY
133	AAPQSDCFHYSENDY
134	TAPRSDCFHYGENDY
135	AAPRSDCFHYGENDY
136	AAPQSDCFHYKENDY
137	GAPRDCSLYTGDDY

138	GAPRDCSRYSSDDY
139	GAPRDCSRYSSDDY
140	GAPRDCSLYTGDDY
141	GAPRDCSYYTSDDY
142	GAPRDCSRYSSDDY
143	SASDYGSSLYY
144	YARTGYGSSWPMGHEYDY
145	HAATDTGVIY
146	AADPRRLTGLYDY
147	AATGYGSSPWY
148	YARTGYGSGRLMGHEYDY
149	YARTGYGSGRLMGHEYDY
150	YARTGYGSSWLMGHEYDY
151	YARTGYGSSWLMGHEYDY
152	YARTGYGSGRLMGHEYDY
153	YARTGYGSGWLEGHEYDY
154	YARTGYGSSWLMGHEYDY
155	YARTGYGSSWLMGHEYDY
156	AASKSAYIFDDRDY
157	HIGPEPRYGY
158	HIGPEPRYGY
159	YARTGYGSSWLMGHEYDY
160	YARTGYGSSWLMGHEYDY
161	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
162	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
163	CTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT
164	CGCGGATCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
165	ATTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAG CTAAAAGAGAGGCTGAAGCACAGGTGCAGCTGCAGGAG

	TCTGGRGGAGG
166	AGTTGTCAGTTCCTGTGCCCCCCTCCTCCCGCGCCACC TCCGCCCCGCACCTCCGCCACCAcTGGAGACGGTGACCTG GGT
167 (人 IgG1 的 Fc 段)	THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTQVHLQDGLWNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
168 (人源 4-1BB 蛋白)	QDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDC KQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPLG
169 (结晶复合 物中的抗 4-1BB 抗体的 氨基酸序列)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQA PGKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSWLMGHEYDYWGQGT QVTVSSLG
170 (框架区 1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC
171 (框架区 2)	WYRQAPGKQRELVA
172 (框架区 2)	WYRQAPGKGLELVA

173 (框架区 3)	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
174 (框架区 4)	WGQGTLVTVSS

备注：表 C 中，SEQ ID NO: 41-160 为 CDR 序列，其中部分序列可能相同，为了便于表述，采用了不同的编号。

具体实施方式

5 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)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，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

10

实施例 1：纳米抗体文库的构建

1.1 动物免疫

15 将 1 mg 人 4-1BB 抗原(购自 AcroBiosystems)与弗氏佐剂等体积混合，免疫 2 只羊驼(Llama)，每周一次，共免疫 4 次，刺激 B 细胞表达抗原特异性的纳米抗体。4 次免疫结束后，提取 50 ml 有羊驼外周血，采用淋巴细胞分离液分离得到淋巴细胞。采用 RNA 提取试剂 Trizol(购自 Invitrogen)提取总 RNA。使用 cDNA 合成试剂盒(购自 Invitrogen)反转录获得羊驼总 cDNA。

1.2 纳米抗体基因的扩增

第一轮 PCR，从 cDNA 中扩增出 IgG2、IgG3 序列：

20

表 1：第一轮 PCR 引物

名称	序列(5' 到 3')	SEQ ID NO:
上游引物	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG	161
下游引物	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC	162

将第一轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，切胶回收 750 bp 处的片段用于第二轮

VHH 序列的扩增。第二轮 PCR 扩增引物如下：

表 2：第二轮 PCR 引物

名称	序列(5' 到 3')	SEQ ID NO:
上游引物	CTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTG GGT	163
下游引物	CGCGGATCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCT GGRGGAGG	164

以第二轮 PCR 产物为模板，进行第三轮 PCR，为 VHH 基因加上同源臂，第三轮 PCR 扩增引物如下：

5

表 3：第三轮 PCR 引物

名称	序列(5' 到 3')	SEQ ID NO:
上游引物	ATTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTC CGCATTAGCTAAAAGAGAGGCTGAAGCACA GGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG	165
下游引物	AGTTGTCAGTTCCTGTGCCCCCCTCCTCCC GCGCCACCTCCGCCCGCACCTCCGCCACCAc TGGAGACGGTGACCTGGGT	166

利用 PCR 纯化试剂盒(购自 QIAGEN)回收目的片段。

1.3 文库构建

将线性化的酵母展示载体和第三轮的 PCR 产物混合后电转化入酿酒酵母 (ATCC® 20828)中，分别构建来自 2 只羊驼的抗 4-1BB 纳米抗体文库。

10

实施例 2：4-1BB 纳米抗体的筛选

2.1 人 4-1BB 蛋白的生物素化标记

取适量体积的双蒸水溶解人 4-1BB 蛋白(购自 AcroBiosystems)，按照生物素标记试剂盒(购自 Thermo)产品说明书，将生物素溶解后与蛋白溶液混合，于 4℃ 孵育 2 小时。用脱盐柱(购自 Thermo)去除多余的生物素，脱盐柱预处理及样品收集操作均参考产品说明书步骤进行。

2.2 MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) 富集能与 4-1BB 特异性结合的酵母

将实施例 1 中构建的 VHH 文库接种于 SD-CAA 扩增培养基(1L SD-CAA 扩增培

培养基中含 6.7g YNB、5g 酪蛋白氨基酸、13.62g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、7.44g NaH_2PO_4 和 2%葡萄糖)中, 30°C, 225 rpm 培养过夜。取适量的酵母细胞, 3000 rpm×5 min 离心去除培养基, 用 SD-CAA 诱导培养基重悬酵母细胞, 诱导过夜。测定诱导后的文库浓度, 取适量的酵母细胞, 离心去除培养基。用 50 ml 洗涤缓冲液(PBS+0.5% BSA+2mM EDTA)重悬酵母细胞, 离心去除上清。用 10 ml 洗涤缓冲液重悬酵母细胞。

加入生物素标记的 4-1BB 蛋白(终浓度 100 mM), 室温孵育 30 min, 离心收集酵母细胞, 并用 50 ml 洗涤缓冲液洗涤酵母 3 遍。用 5 ml 洗涤缓冲液重悬酵母细胞, 并加入 200 μl SA 磁珠(购自美天旎), 颠倒孵育 10 min。用洗涤缓冲液洗涤酵母和磁珠混合物 3 遍, 将混合物加入 LS 柱(购自美天旎)中。将 LS 柱放在磁力架上, 用洗涤缓冲液洗涤去除非特异性结合的酵母细胞。将柱子从磁力架上取出, 加入洗涤缓冲液洗脱酵母。洗脱下来的酵母离心后转入 200 ml SD-CAA 扩增培养基中进行扩增。

2.3 流式细胞分选获得高亲和力酵母细胞

将经过 MACS 富集的酵母细胞接种于 SD-CAA 扩增培养基中, 30°C, 225 rpm 摇瓶培养过夜。用 SD-CAA 诱导培养基(1L SD-CAA 诱导培养基中含 6.7g YNB, 5g 酪蛋白氨基酸, 13.62g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7.44g NaH_2PO_4 及 2% 半乳糖, 2% 棉子糖和 0.1%葡萄糖)重悬酵母细胞, 诱导过夜。加入 1:200 稀释的 anti-c-Myc 鼠源抗体(购自 Thermo)和 100 nM 生物素标记的 4-1BB 抗原, 室温孵育 10 min。加入 PBS 清洗酵母 3 遍, 加入 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 488 (购自 Invitrogen)和链霉亲和素 APC 偶联荧光抗体(购自 Invitrogen), 4°C 避光孵育 15 min。加入 2 ml PBS 重悬细胞, 使用 BD FACS AriaII 仪器进行分选获得可与 4-1BB 抗原有较高结合能力的酵母。

2.4 4-1BB 纳米抗体候选分子抗体基因的获取

通过 MACS 和 FACS 富集得到的能与 4-1BB 抗原有较高结合能力的酵母菌液, 在 SD-CAA 扩增培养基中 30°C, 225 rpm 培养过夜, 按照酵母质粒抽提试剂盒(购自天根)操作抽提酵母质粒。质粒通过电转化入 Top10 感受态细胞(购自天根), 涂布氨苄抗性平板, 于 37°C 培养过夜。挑取单克隆测序获得 VHH 基因序列。

实施例 3: 重链抗体融合蛋白的构建及表达纯化

3.1 抗体基因构建入 pCDNA3.1 表达载体

将实施例 2 获得的 VHH 基因序列和人 IgG1(LALA 突变)Fc 段相连, 利用同源重

组酶(购自 Vazyme)和 *EcoR I/Not I* 双酶切线性化的 pCDNA3.1 载体中, 流程按照商品说明书。同源重组产物转入 Top10 感受态细胞, 涂布氨苄抗性平板, 37°C 培养过夜, 挑取单克隆测序。

3.2 细胞转染

5 采用 ExpiCHO™ 表达系统试剂盒(购自 Thermo), 将质粒转入 Expi-CHO 细胞中, 转染方法按照商品说明书, 细胞培养 5 天后收集上清利用蛋白 A 磁珠(购自南京金斯瑞生物科技有限公司)分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液 (PBS+0.1%吐温 20, pH 7.4)重悬(1-4 倍磁珠体积)后加入至待纯化样品中, 室温孵育 1 小时, 期间温柔振荡。样品置于磁力架上(购自苏州海狸生物医学工程有限公司), 弃去上清, 磁珠用结合缓冲液清洗 3 遍。按照磁珠体积的 3-5 倍体积加入洗脱缓冲液(0.1M sodium citrate, pH 3.2)室温振荡 5-10 min, 置回磁力架上, 收集洗脱缓冲液, 转移至已加入中和缓冲液(1M Tris, pH 8.54)的收集管中混匀。纯化后得到的 4-1BB 抗体融合蛋白样品用于下面的实施例 4 至实施例 7。

15 实施例 4: 4-1BB 抗体融合蛋白亲和力测定

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法(Estep, P 等人, 基于溶液的高通量抗体-抗原亲和力和表位分级的测量, MAbs, 2013.5(2):p.270-8)进行。简言之, 传感器在分析缓冲液中线下平衡 30min, 然后线上检测 60s 建立基线, 在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至 AHQ 传感器上。再将传感器放入 100nM 的 4-1BB 抗原中作用 5min, 之后将传感器转移至 PBS 中解离 5min。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

实验结果如下面的表 4 所示。

表 4: 候选分子亲和力

编号	K _D (M)	K _{on}	K _{off}	SEQ ID NO: (VHH 链)
A-Na-16	2.08E-08	2.12E+05	4.40E-03	1
A-Na-18	1.75E-08	2.38E+05	4.18E-03	2
A-Na-19	1.51E-08	2.47E+05	3.72E-03	3
A-Ye-02	4.66E-08	7.53E+04	3.51E-03	4
A-Ye-03	2.83E-08	4.95E+04	1.40E-03	5
A-Ye-04	2.22E-07	7.00E+04	1.56E-02	6

A-Ye-05	1.56E-08	2.11E+05	3.29E-03	7
A-Ye-10	1.85E-08	2.06E+05	3.82E-03	8
A-Ye-13	1.19E-08	3.10E+05	3.68E-03	9
A-Ye-14	1.45E-08	2.76E+05	4.01E-03	10
A-Ye-15	1.82E-08	1.92E+05	3.50E-03	11
A-Ye-18	1.66E-08	2.11E+05	3.49E-03	12
A-Ye-19	1.30E-08	3.02E+05	3.93E-03	13
A-Ye-21	2.30E-08	2.40E+05	5.51E-03	14
A-Ye-22	2.26E-08	2.45E+05	5.52E-03	15
A-Ye-23	2.34E-08	2.09E+05	4.88E-03	16
A-Ye-25	1.35E-08	2.07E+05	2.78E-03	17
A-Ye-27	7.55E-09	1.58E+05	1.19E-03	18
A-Ye-30	1.73E-08	2.03E+05	3.51E-03	19
A-Ye-33	1.49E-08	2.07E+05	3.08E-03	20
A-Ye-20	2.68E-08	2.05E+05	5.48E-03	21
A-Ye-35	1.84E-08	1.85E+05	3.40E-03	22
L-Yr-13&14-01	1.95E-08	1.38E+05	4.44E-03	23
L-Yr-13&14-02	4.47E-08	7.14E+04	3.09E-03	24
L-Yr-13&14-03	1.91E-08	6.48E+04	2.67E-03	25
L-Yr-13&14-05	3.35E-08	1.21E+05	4.12E-03	26
L-Yr-13&14-06	2.06E-08	1.34E+05	1.92E-03	27
L-Yr-13&14-07	1.43E-08	1.34E+05	1.92E-03	28
L-Yr-13&14-08	2.05E-08	1.06E+05	2.16E-03	29
L-Yr-13&14-09	2.10E-08	1.17E+05	2.46E-03	30
L-Yr-13&14-10	4.60E-08	1.07E+05	4.93E-03	31
L-Yr-13&14-11	2.16E-08	1.31E+05	2.83E-03	32
L-Yr-13&14-12	3.08E-08	8.04E+05	2.47E-02	33
L-Yr-13&14-13	2.32E-08	1.14E+05	2.64E-03	34
L-Yr-13&14-16	1.96E-08	1.14E+05	2.24E-03	35

L-Yr-13&14-17	2.51E-08	1.46E+05	3.65E-03	36
---------------	----------	----------	----------	----

结果显示，本发明的抗 4-1BB 分子单价亲和力在 1E-08 水平，符合激动型分子的开发要求。

实施例 5: 4-1BB 抗体融合蛋白与人 4-1BB CHO-S 细胞结合

5 通过转染克隆到 MCS (多克隆位点) 的编码人 4-1BB cDNA 的 pCHO1.0 载体(购自 Invitrogen)产生过表达人 4-1BB 的 CHO 细胞(CHO-h4-1BB 细胞)。将扩大培养的 CHO-h4-1BB 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。将纯化的 4-1BB 抗体用 PBS 稀释, 400 nM 开始 3 倍稀释共 12 个点, 将上述稀释好的样品 100 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 清洗两次。
10 次。100 μ l/孔加入用 PBS 稀释 100 倍的羊 F(ab')₂ 抗人 IgG - Fc (PE)(购自 Abcam), 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 清洗两次。100 μ l/孔加入 PBS 重悬细胞, 在 CytoFlex (Bechman) 流式细胞仪上进行检测并计算对应的 MFI。

实验结果如图 1A、图 1B 所示。

结果显示，本发明的所有纯化样品均具有与 CHO-h4-1BB 细胞结合的活性，且部
15 分纯化样品的活性与对照抗体 Urelumab (US20090068192)相似。

实施例 6: 4-1BB 抗体融合蛋白与食蟹猴 4-1BB 蛋白结合

食蟹猴 4-1BB -his 蛋白(购自 ACRO)按照说明书溶解, 用 ELISA 包被液(购自上海生工)稀释至 1 μ g/ml, 100 μ l/孔包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 清洗 3 次, 5% BSA(购
20 自上海生工)室温封闭 1 小时。弃去包被液, 100 μ l/孔加入 1%BSA 梯度稀释的 4-1BB 抗体, 200nM 3 倍稀释共 12 个点, 室温孵育 2 小时。PBST 清洗 3 次, 100 μ l/孔加入 1%BSA 稀释的羊抗人 IgG-Fc-HRP(购自 abcam), 室温孵育 1 小时。PBST 清洗 3 次, 100 μ l/孔加入 ELISA 显色液(购自索莱宝)室温反应 3 分钟, 50 μ l/孔加入 ELISA 终止液(购自索莱宝), 读取 450 nm 处吸光度数值。

25 实验结果如图 2A、图 2B 所示, 本发明的部分纯化样品(例如 L-Yr-13&14-16 和 A-Na-19) 和对照抗体 Utomilumab 与食蟹猴 4-1BB 蛋白有较好的结合活性, 对照抗体 Urelumab(US20090068192)与食蟹猴 4-1BB 蛋白结合活性较弱。

实施例 7: 4-1BB 抗体融合蛋白激活原代 T 细胞的测定

OKT-3 抗体(购自 Biologend)用无菌 PBS(购自 Hyclone)稀释至 1 μ g/ml, 50 μ l/孔包被 96 孔细胞培养平底板(购自 Thermo), 同时 50 μ l/孔加入 PBS 梯度稀释的抗 4-1BB 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育两小时。复苏冻存的人 PBMC(购自上海赛笠), 用人 T 细胞分离纯化试剂盒(购自 Stemcell)分离出 T 细胞, 用 X-VIVO15 培养基(购自 LONZA)重悬 T 细胞, 调整细胞密度为 0.5 \times 10⁶ 细胞/ml, 备用。待抗体包被完成, 弃去包被液, PBS 清洗两次, 弃去 PBS, 200 μ l/孔加入上述 T 细胞悬液。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 5 天, 收集上清检测 IFN- γ 含量。

实验结果如图 3A、图 3B 所示, 本发明的部分纯化样品可以激活人原代 T 细胞分泌 IFN- γ , 且部分样品(例如 A-Na-16、A-Na-18、A-Na-19)的活性和对照抗体 Urelumab(US20090068192)相当, 部分样品(例如 L-Yr-13&14-16、L-Yr-13&14-17)的活性处于 Urelumab 和 Utomiumab 之间。

实施例 8: 4-1BB 抗体的人源化改造和表达

为了减少单克隆抗体在人体内产生免疫原性, 将 L-Yr-13&14-16 和 A-Na-19 抗体进行人源化。人源化方法采用 VHH 人源化通用框架移植法, 同时根据文献(Vincke, C., 等人, 人源化骆驼单域抗体和鉴定通用的人源化纳米抗体支架的一般策略. *J Biol Chem* 284(5): 3273-3284)报道的方法对抗体框架 2(framework 2)的部分氨基酸进行突变完成。分别得到序列 SEQ ID NOs: 39-40, 以及 SEQ ID NOs: 37-38。

本研究利用 IMGT(<http://www.imgt.org>)对 L-Yr-13&14-16 和 A-Na-19 抗体人源化序列进行了人源化水平评估, 结果如表 5 所示。

表 5: L-Yr-13&14-16 和 A-Na-19 人源化序列和人的同源性(比较 VHH 的序列)

编号	种系	同源性	SEQ ID NO:
L-Yr-13&14-16	IGHV3-30*01	76.3%	35
HZ-L-Yr-13&14-16-1	IGHV3-30*01	80.4%	39
HZ-L-Yr-13&14-16-2	IGHV3-30*01	84.5%	40
A-Na-19	IGHV3-30*01	69.4%	3
Hu-A-NA-19-1	IGHV3-15*06	76.5%	37
Hu-A-NA-19-2	IGHV3-15*06	78.6%	38

蛋白构建及表达纯化方法同实施例 3。对纯化的基因工程改造的抗体进行人 4-1BB

CHO-S 细胞结合检测，检测方法同实施例 4。结果如图 4A、图 4B 所示，基因工程改造后的抗体保持与人 4-1BB CHO-S 细胞结合活性。

对纯化的基因工程改造的抗体进行食蟹猴 4-1BB CHO-S 细胞结合检测。结果如图 5A、图 5B 所示。结果显示，基因工程改造后的 HZ-L-Yr-13&14-16 抗体保持与食蟹猴 4-1BB CHO-S 细胞结合活性，而基因工程改造后的 A-Na-19 抗体 HZ-A-Na-19-1、HZ-A-Na-19-2 与食蟹猴 4-1BB CHO-S 细胞结合活性下降明显。

对纯化的基因工程改造的抗体进行原代 T 细胞激活测定，检测方法同实施例 7。结果如图 6A、图 6B 所示。结果显示，基因工程改造后的 HZ-L-Yr-13&14-16-1、HZ-A-Na-19-1 保持原代 T 细胞激活活性。

10

实施例 9：4-1BB 配体阻断试验

将扩大培养的 CHO-h4-1BB 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。将纯化的 4-1BB 抗体用 PBS 稀释至 400nM，将上述稀释好的样品 50 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中，4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。50 μ l/孔加入 PBS 稀释至 1 μ g/ml 的 Biotin-4-1BB ligand 蛋白(购自 ACRO)，4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBS 清洗两次，100 μ l/孔加入用 PBS 稀释 200 倍的 SAPE(购自 Thermo)，4 $^{\circ}$ C 孵育 30min，PBS 清洗两次。100 μ l/孔加入 PBS 重悬细胞，在 CytoFlex (Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的 MFI。

结果如图 7A 所示。结果显示，基因工程改造的 4-1BB 抗体 HZ-L-Yr-13&14-16-1 无配体阻断活性，对照抗体 Utomilumab(US20120237498)有配体阻断活性，而 Urelumab 有部分阻断活性。

20

实施例 10：抗体和 TNFRSF 成员结合检测

人 4-1BB-his、GITR-his、OX40-his、CD40-his 蛋白(购自 ACRO)按照说明书溶解，用 ELISA 包被液(购自上海生工)稀释至 1 μ g/ml，100 μ l/孔包被 ELISA 板，4 $^{\circ}$ C 过夜，PBST 清洗 3 次，200 μ l/孔加入 5% BSA(购自上海生工)室温封闭 1 小时。弃去包被液，100 μ l/孔加入 1% BSA 稀释的 4-1BB 抗体，200nM 3 个复孔，室温孵育 2 小时。PBST 清洗 3 次，100 μ l/孔加入 1% BSA 稀释的羊抗人 IgG-Fc-HRP(购自 abcam)，室温孵育 1 小时。PBST 清洗 3 次，100 μ l/孔加入 ELISA 显色液(购自索莱宝)室温反应 3 分钟，50 μ l/孔加入 ELISA 终止液(购自索莱宝)，读取 450nm 处吸光度数值。

30

结果如图 7B 所示。结果显示，HZ-L-Yr-13&14-16-1 抗体仅和 4-1BB 蛋白结合，和其它肿瘤坏死因子受体超家族成员不结合。说明本发明抗体的特异性好，不会再体内激活其它肿瘤坏死因子受体超家族成员，避免了潜在的副作用。

5 实施例 11：4-1BB 与 VHH 段复合物晶体结构鉴定

为进一步探究本发明的 4-1BB 纳米抗体与其抗原蛋白的结合模式，在本实施例中，选取 L-Yr-13&14-16-1，进行了抗原复合物的结晶实验。

其中，为促进晶体的形成，经优化，最终结晶复合物中的抗 4-1BB 抗体的氨基酸序列是在 L-Yr-13&14-16-1 的 VHH 链序列（即 SEQ ID NO: 39）的 C 端增加了 Leu 和 Gly 所形成的序列（SEQ ID NO: 169）。需要特别说明的是，该 C 端所添加的 Leu 和 Gly 残基仅为促进结晶所进行的常规技术操作，而并不会影响纳米抗体 L-Yr-13&14-16-1 与人源 4-1BB 蛋白的结合模式。

本实验采用 X 光衍射法鉴定 4-1BB 与 VHH 段复合物晶体结构。人源 4-1BB 蛋白（SEQ ID NO: 168）与抗 4-1BB VHH 蛋白（SEQ ID NO: 169）均由 HEK293 体系表达。4-1BB 与 VHH 以摩尔比 1:1 比例混合制备用于结晶的复合物样品。复合物（8.5 mg/mL）与结晶试剂以 1:1 比例混合并在 18℃ 下进行晶体培养。四天后在 JBK 试剂盒培养条件中观察到晶体，晶体形貌如图 8 所示。

挑选单晶在上海光源进行 X 光衍射实验并收获分辨率为 3.14Å 的衍射数据。数据处理使用 XDS 软件。利用分子置换法分别以 4-1BB（PDB ID: 6mgp）和 VHH（PDB ID: 4xt1）结构为模型进行晶相鉴定。利用 Refmac5 进行晶体结构精修。利用 COOT 进行模型检测、手动重建和结构校验。该复合物晶体归属于 P41212 空间群，其晶胞参数分别为：a=106.85Å，b=106.85Å，c=146.41Å， $\alpha=90.00^\circ$ ， $\beta=90.00^\circ$ ， $\gamma=90.00^\circ$ 。具体晶体数据统计见表 6。

表 6 4-1BB-VHH 复合物晶体数据统计

分辨率 (Å)	47.79 - 3.14 (3.36 - 3.14)
空间群	P41212
晶胞	
a (Å)	106.85

b (Å)	106.85
c (Å)	146.41
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
R_{merge} (总/外层)	0.156 (1.195)
R_{working}, R_{free}	0.204/0.242
CC_{1/2} (总/外层)	0.998 (0.894)
I/σ(I) (总/外层)	16.1 (2.6)
完整度 (总/最外层) (%)	99.9 (98.8)
冗余度	12.9 (12.8)
R_{pim} (总/外层) (%)	0.047 (0.359)
RMSD 键长 (Ang.)	0.012
RMSD 键角 (deg.)	2.466

结构解析后所得 4-1BB-VHH 复合物晶体结构如图 9 所示。表位分析可知，4-1BB 与 VHH 间主要氢键作用集中于 4-1BB 上的 Asp118、Leu123、Arg130、Val132、Cys134、Gly135 和 Ser137 等氨基酸（图 10）。此外，4-1BB 上 Leu123、Val124、Val133 和 Pro136 与 VHH 上 Val32、Ala33、Tyr37、Leu47、Ile52、Tyr97、Tyr102 和 Trp115 5 构成了疏水性作用界面（图 11）。

Urelumab 与 4-1BB 结合位点位于 4-1BB 的 N 端，4-1BB 主要参与结合的氨基酸包括 Pro27、Asn40、Asn42 和 Gln43 等；Utomilumab 主要结合在 4-1BB 的 CRD3（Cysteine rich domain）和 CRD4，4-1BB 主要参与结合的氨基酸包括 Arg66、Gly96、Ser100、Cys102、Lys114、Arg130 和 Arg134（Chin SM, Kimberlin CR, Roe-Zurz Z, 10 et al. Structure of the 4-1BB/4-1BBL complex and distinct binding and functional properties of utomilumab and urelumab. Nat Commun 2018;9:4679.）。另外，从理论上，Utomilumab 结合表位与 4-1BB 配体在空间上存在竞争关系，故会对 4-1BB 与其配体的结合具有一定阻断作用。

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。

5

权 利 要 求

1. 抗 4-1BB 单域抗体, 包含一个重链可变区, 所述重链可变区包含 CDR1-CDR3, 其中, CDR1 的氨基酸序列选自 SEQ ID NOs: 41-80, CDR2 的氨基酸序列选自 SEQ ID NOs: 81-120, CDR3 的氨基酸序列选自 SEQ ID NOs: 121-160;

优选地, 所述 CDR1-CDR3 的氨基酸序列分别如下面的 1-40 项中的任一项所示:

项目编号	CDR1 的 SEQ ID NO:	CDR2 的 SEQ ID NO:	CDR3 的 SEQ ID NO:
1	41	81	121
2	42	82	122
3	43	83	123
4	44	84	124
5	45	85	125
6	46	86	126
7	47	87	127
8	48	88	128
9	49	89	129
10	50	90	130
11	51	91	131
12	52	92	132
13	53	93	133
14	54	94	134
15	55	95	135
16	56	96	136
17	57	97	137
18	58	98	138
19	59	99	139
20	60	100	140
21	61	101	141
22	62	102	142

23	63	103	143
24	64	104	144
25	65	105	145
26	66	106	146
27	67	107	147
28	68	108	148
29	69	109	149
30	70	110	150
31	71	111	151
32	72	112	152
33	73	113	153
34	74	114	154
35	75	115	155
36	76	116	156
37	77	117	157
38	78	118	158
39	79	119	159
40	80	120	160

。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 4-1BB 单域抗体, 其 4 个框架区中的任意一个、两个、三个或全部 4 个进行人源化改造;

优选地, 对第二个框架区进行人源化改造; 可选地, 还对第一个、第三个或第四个框架区进行改造;

优选地, 所述抗 4-1BB 单域抗体与人的同源性大于或等于 75%、大于或等于 76%、大于或等于 77%、大于或等于 78%、大于或等于 79%、或者大于或等于 80%;

优选地, 所述抗 4-1BB 单域抗体的框架区 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示, 框架区 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 或 SEQ ID NO: 172 所示, 框架区 3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示, 并且框架区 4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体, 其与 4-1BB 抗原的 K_D 为小于 $E-07$ 、小于 $5E-08$ 、小于 $4E-08$ 、小于 $3E-08$ 、或者小于 $2E-08$; 优选地, 所述 K_D 通过 ForteBio 测得。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体, 其与 4-1BB 抗原的结合位点不同于 Urelumbab 和 Utomilumab。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体, 其特异结合人 4-1BB, 同时交叉结合食蟹猴 4-1BB。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体, 其不阻断天然状态下 4-1BB 配体与 4-1BB 的结合。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体, 其氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 1-40 中的任一序列所示。

8. 一种融合蛋白, 其包含权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体, 以及人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的恒定区。

9. 根据权利要求 8 所述的融合蛋白, 其中, 按照 EU 编号系统, 所述人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的重链恒定区包含 L234A 突变和 L235A 突变; 可选地, 所述 IgG 的 Fc 段还包含 G237A 突变。

10. 根据权利要求 8 至 9 中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中,
所述人 IgG 的 Fc 段为人 IgG1 的 Fc 段;
所述人 IgG 的重链恒定区为人 IgG1 的重链恒定区。

11. 根据权利要求 8 至 10 中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中,
所述人 IgG 的 Fc 段为包含 L234A 突变和 L235A 突变的人 IgG1 的 Fc 段; 可选地,

所述人 IgG1 的 Fc 段还包含 G237A 突变；

优选地，人 IgG1 的 Fc 段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 167 所示。

12. 根据权利要求 8 至 11 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，

所述人 IgG 的 Fc 段或人 IgG 的恒定区与所述抗 4-1BB 单域抗体的 C 末端直接连接或通过连接片段连接。

13. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白。

14. 一种载体，其包含权利要求 13 所述的分离的核酸分子。

15. 一种宿主细胞，其包含权利要求 13 所述的分离的核酸分子，或者权利要求 14 所述的载体。

16. 制备权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白的方法，其包括在合适的条件下培养权利要求 15 的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述抗 4-1BB 单域抗体或融合蛋白的步骤。

17. 偶联物，其包括抗体部分以及偶联部分，其中，所述抗体部分为权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

18. 试剂盒，其包含权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白，或者包含权利要求 17 所述的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包含第二抗体，其能够特异性结合所述单域抗体或融合蛋白；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

19. 权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测 4-1BB 在样品中的存在或其水平。

20. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白或者包含权利要求 17 所述的偶联物;可选地,其还包括药学上可接受的辅料。

21. 权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 17 所述的偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤或自身免疫性疾病的药物中的用途;

优选地,所述恶性肿瘤选自直肠癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌和头颈癌;

优选地,所述自身免疫性疾病选自自身免疫性脑脊髓炎、狼疮样综合征和胶原诱导性关节炎。

22. 一种治疗和/或预防恶性肿瘤或自身免疫性疾病的方法,包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 17 所述的偶联物的步骤;

优选地,所述恶性肿瘤选自直肠癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌和头颈癌;

优选地,所述自身免疫性疾病选自自身免疫性脑脊髓炎、狼疮样综合征和胶原诱导性关节炎。

23. 根据权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗 4-1BB 单域抗体或者权利要求 8 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 17 所述的偶联物,其用于治疗或/或预防恶性肿瘤或自身免疫性疾病;

优选地,所述恶性肿瘤选自直肠癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、食道癌和头颈癌;

优选地，所述自身免疫性疾病选自自身免疫性脑脊髓炎、狼疮样综合征和胶原诱导型关节炎。

24. 一种抗4-1BB纳米抗体，其特征在于，所述抗4-1BB纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NOs: 1-40中任一所示的氨基酸序列；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代1-8个(较佳地1-5个，更佳地1-3个)氨基酸残基，并能够保留4-1BB纳米抗体的4-1BB结合亲和力的衍生序列。

25. 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白从N端到C端具有如式I所示的结构：

Z1-L-Z2 (式I)

式中，

Z1为一个或多个(较佳地1-2个，更佳地1个)如权利要求24所述的抗4-1BB纳米抗体的VHH链；

Z2为免疫球蛋白的Fc段；

L为任选的接头序列。

26. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码如权利要求24所述的抗4-1BB纳米抗体或如权利要求25所述的融合蛋白。

27. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有如权利要求26所述的多核苷酸。

28. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有如权利要求27所述的表达载体，或其基因组中整合有如权利要求26所述的多核苷酸。

29. 一种产生抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白的方法，其特征在于，包括步骤：

(a) 在适合产生抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白的条件下，培养如权利要求28所述的宿主细胞，从而获得含所述抗4-1BB纳米抗体或融合蛋白的培养物；和

(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗**4-1BB**纳米抗体或融合蛋白。

30. 一种免疫偶联物，其特征在于，所述免疫偶联物含有：

(a) 如权利要求24所述的抗**4-1BB**纳米抗体，或如权利要求25所述的融合蛋白；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。

31. 如权利要求24所述的抗**4-1BB**纳米抗体或如权利要求25所述的融合蛋白的用途，用于制备(a)用于检测**4-1BB**分子的试剂；(b)用于治疗肿瘤的药物。

32. 一种药物组合物，其特征在于，包括：

(i) 如权利要求24所述的抗**4-1BB**纳米抗体、如权利要求25所述的融合蛋白，或如权利要求30所述的免疫偶联物；和

(ii) 药学上可接受的载体。

33. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白具有：

(i) 如权利要求24所述的抗**4-1BB**纳米抗体，或如权利要求25所述的融合蛋白的序列；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

34. 一种蛋白复合物，其特征在于，所述的复合物由**4-1BB**蛋白和抗**4-1BB**抗体或其抗原结合片段通过氢键和/或疏水相互作用而形成；

其中，所述的氢键作用位点包括4个以上（较佳地5个以上，更佳地6个以上，最佳地为7个）位于**4-1BB**蛋白中选自下组的位点：第118位Asp、第123位Leu、第130位Arg、第132位Val、第134位Cys、第135位Gly，和第137位Ser；

并且，所述的疏水性相互作用界面的构成位点包括2个以上（较佳地3个以上，更佳地4个以上）位于**4-1BB**蛋白中选自下组的位点：第123位Leu、第124位Val、第133位Val，和第136位Pro；

其中，所述的**4-1BB**蛋白的氨基酸编号是基于SEQ ID NO: 168的编号。

人4-1BB CHO-S 细胞结合试验

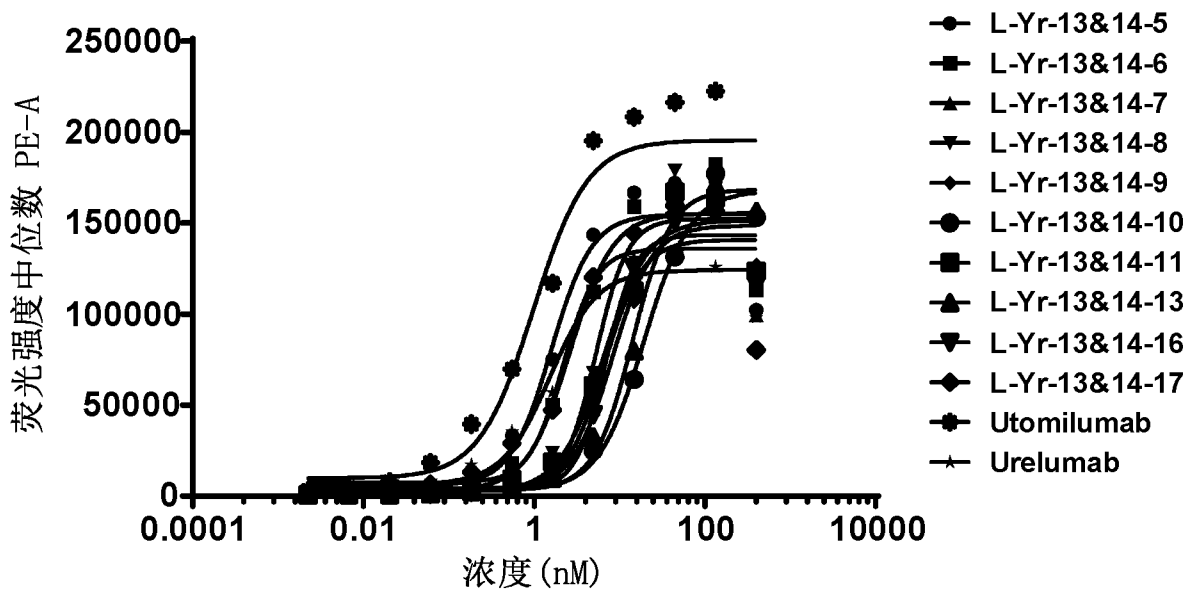


图 1A

人 4-1BB CHO-S细胞结合试验

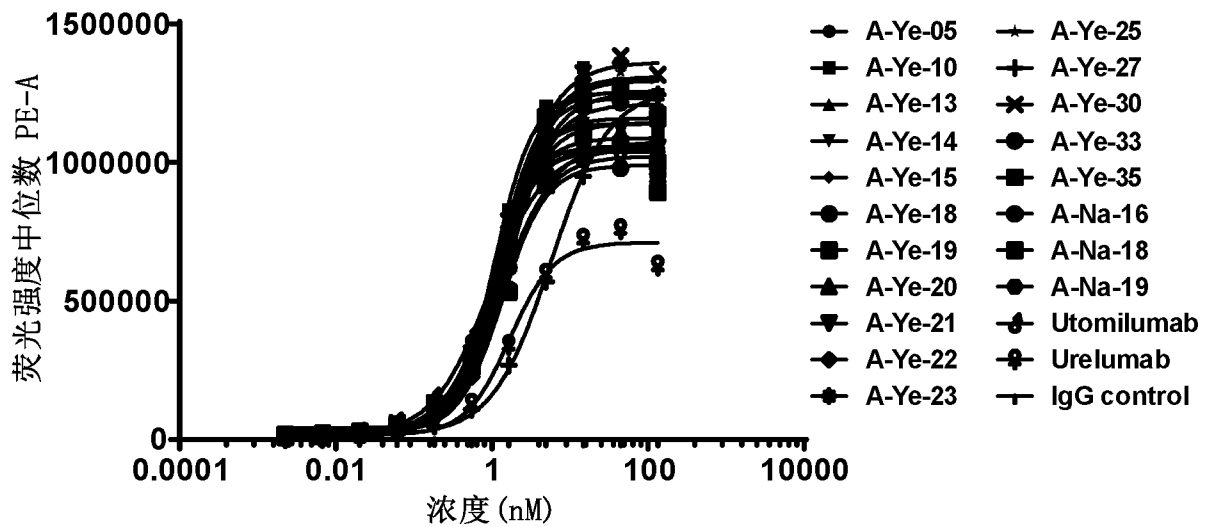


图 1B

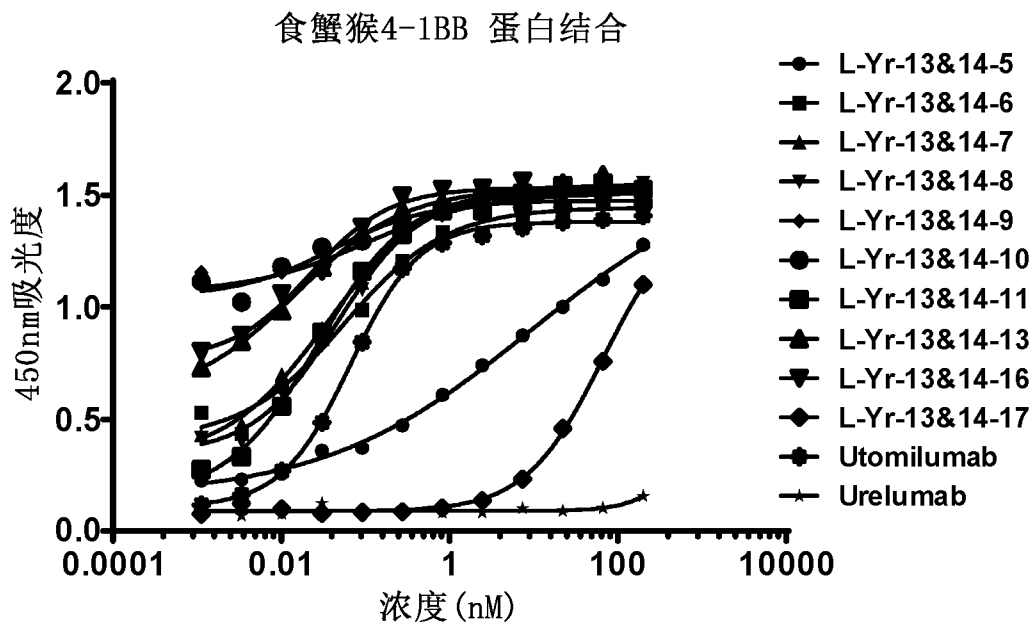


图 2A

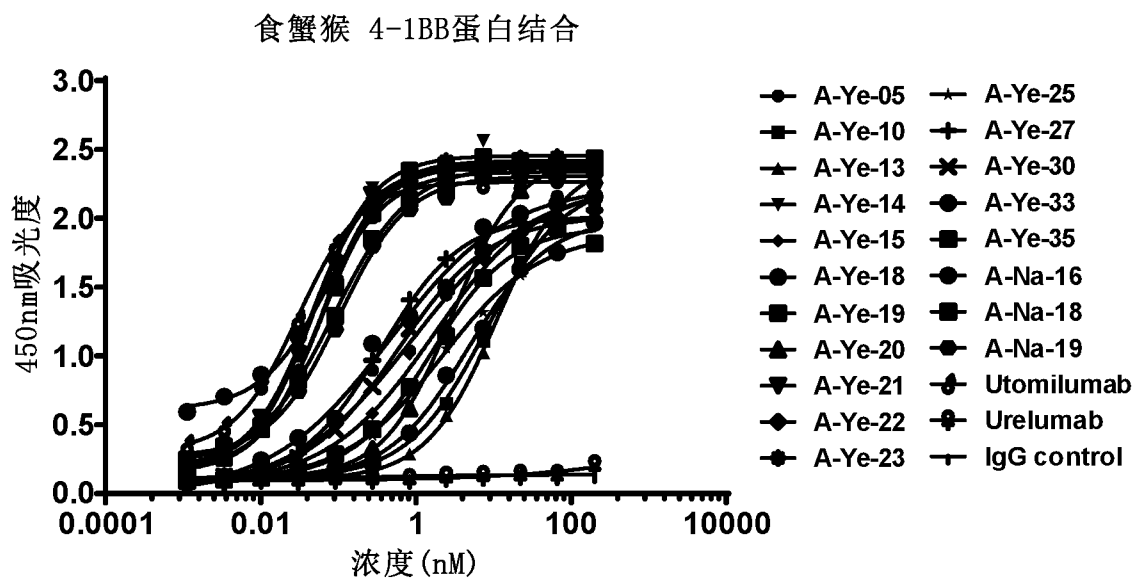


图 2B

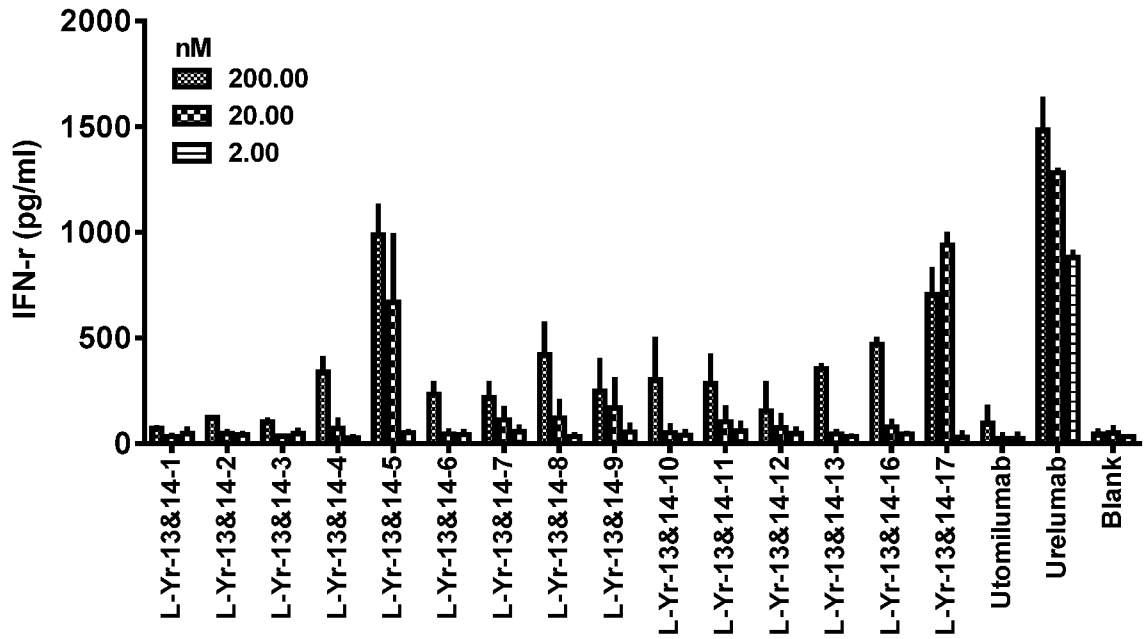


图 3A

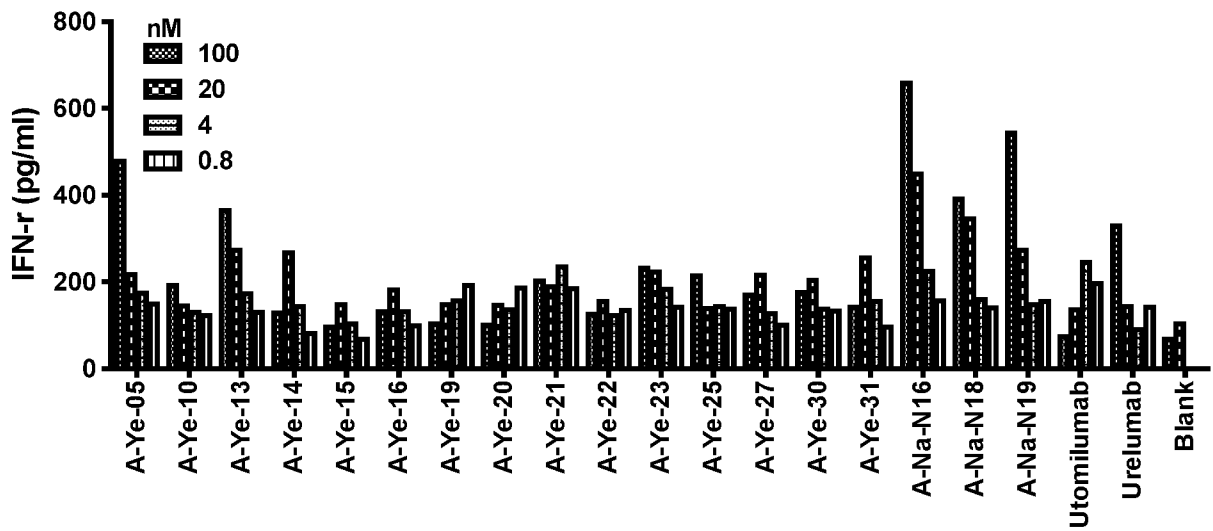


图 3B

人4-1BB CHO-S 细胞结合试验

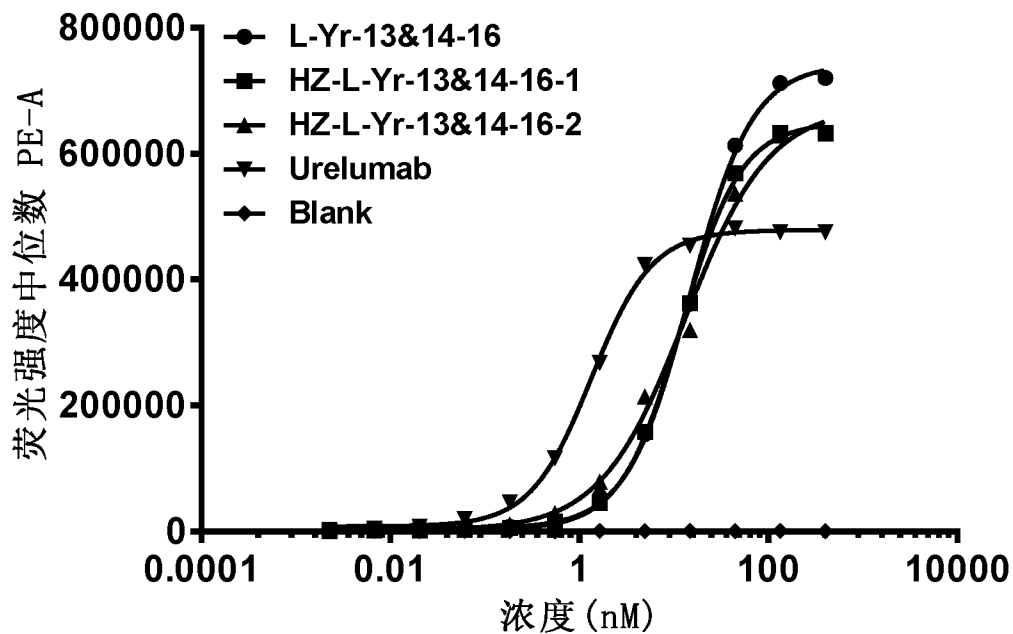


图 4A

人 4-1BB CHO-S细胞结合试验

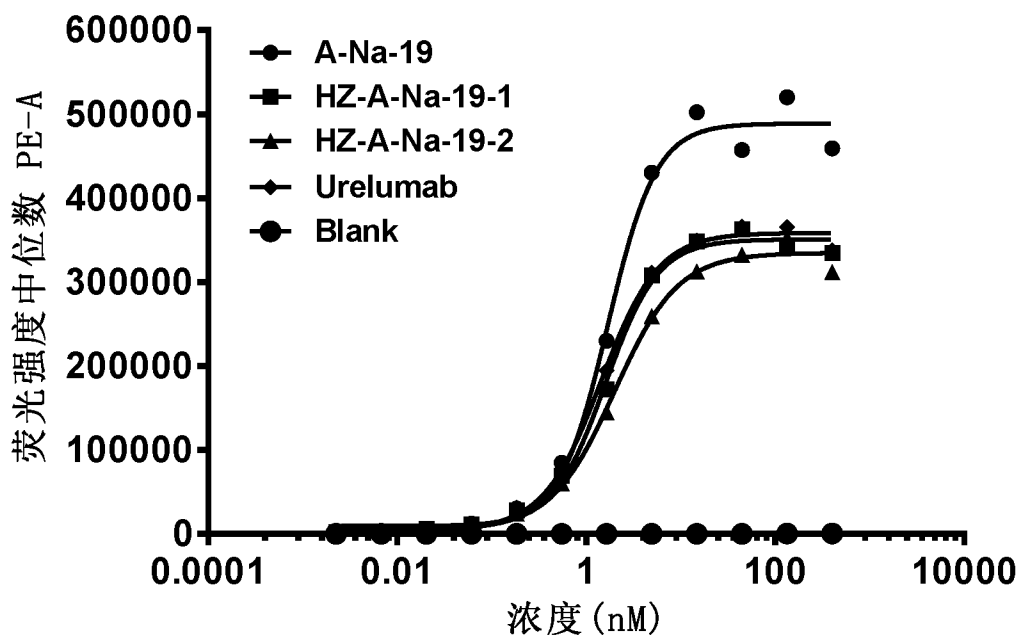


图 4B

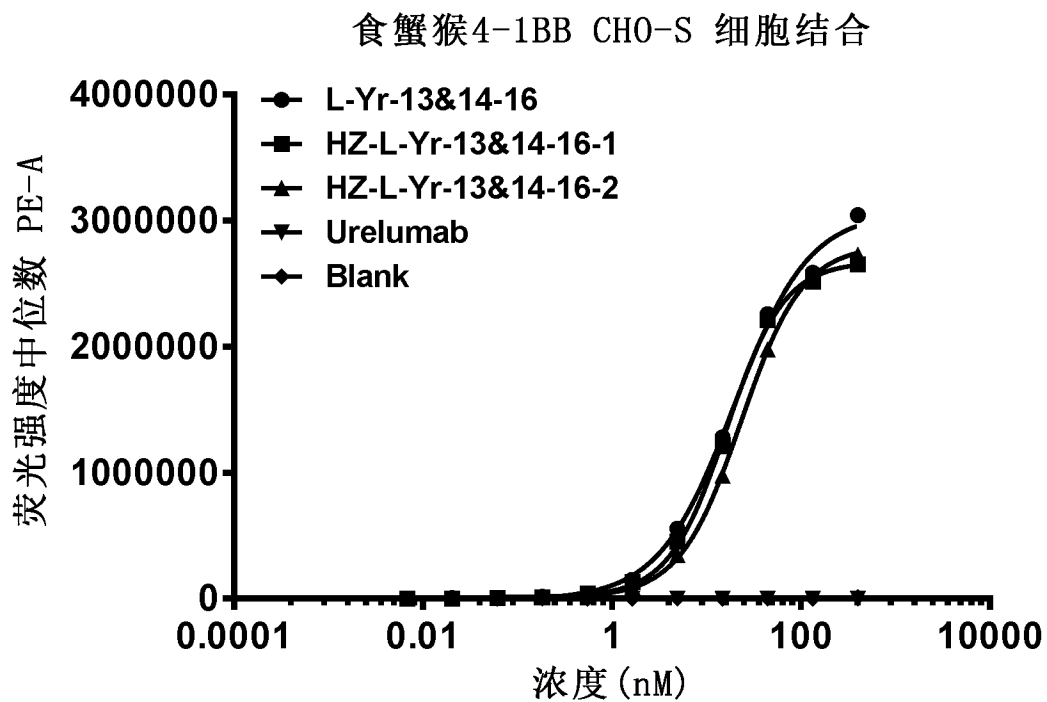


图 5A

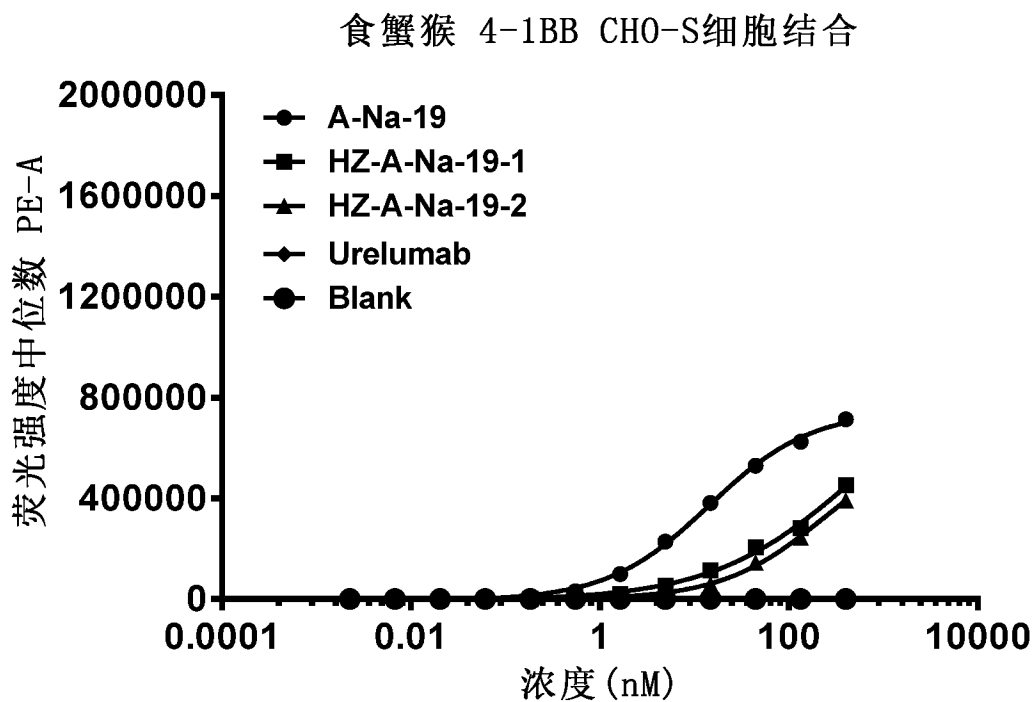


图 5B

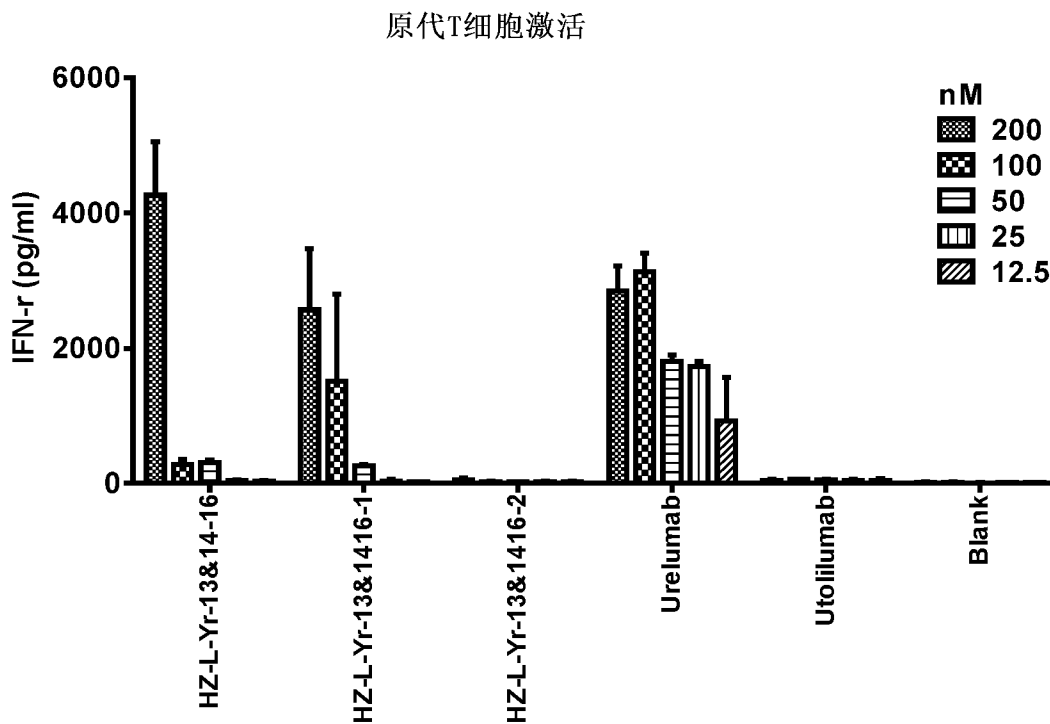


图 6A

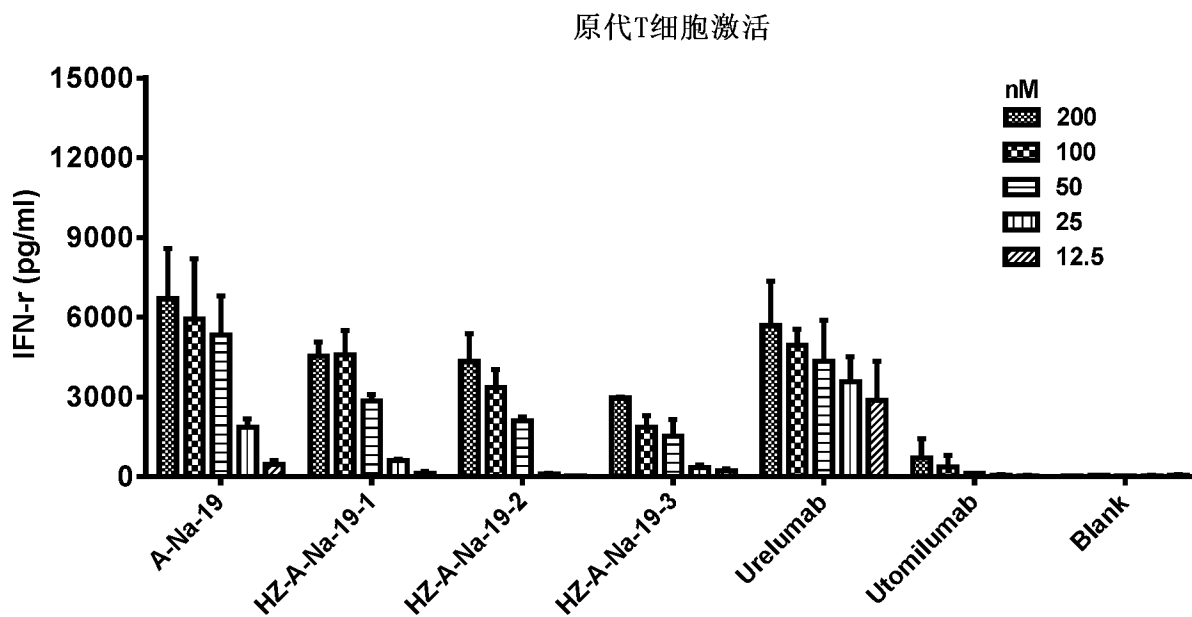


图 6B

4-1BB配体阻断试验

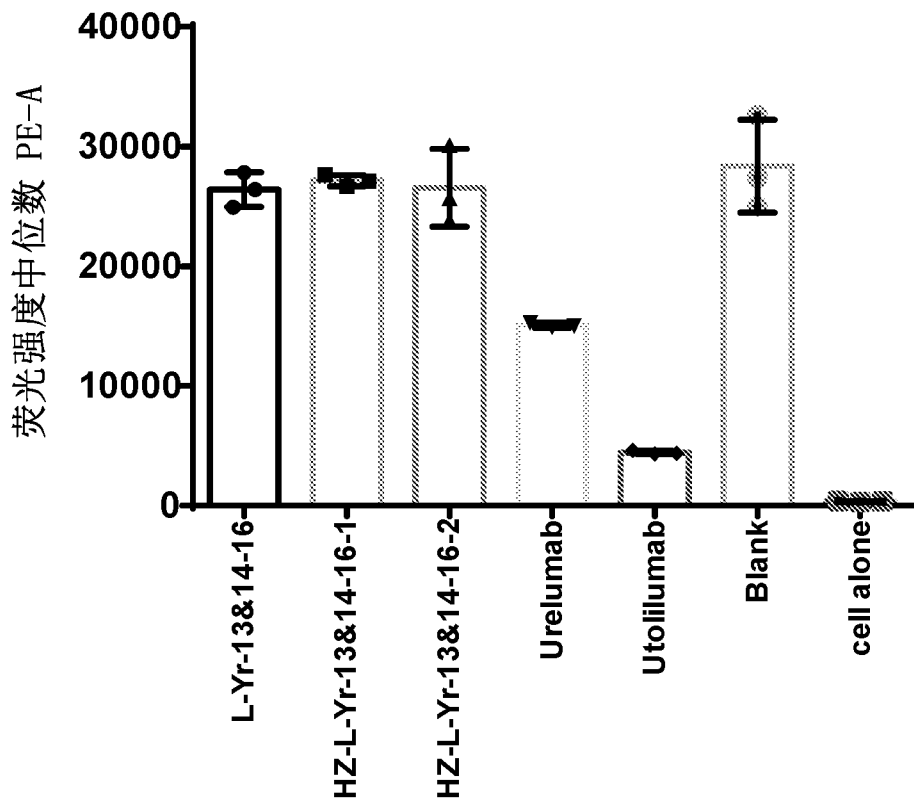


图 7A

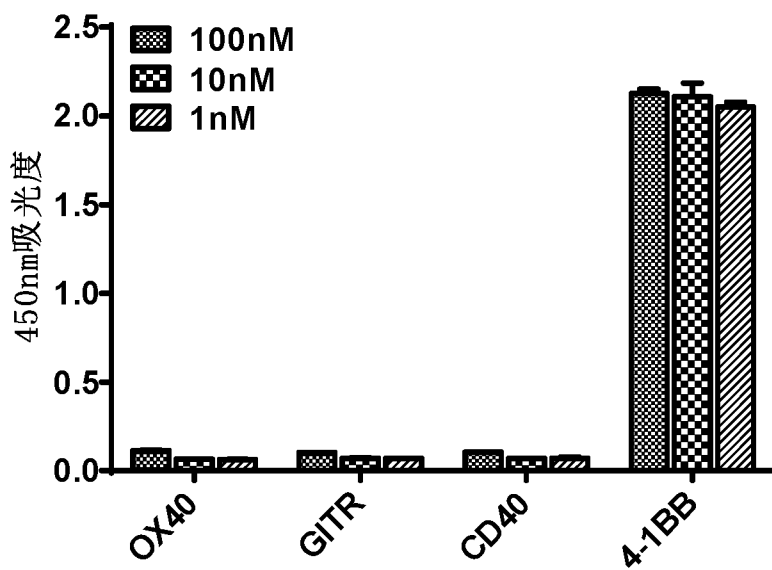


图 7B

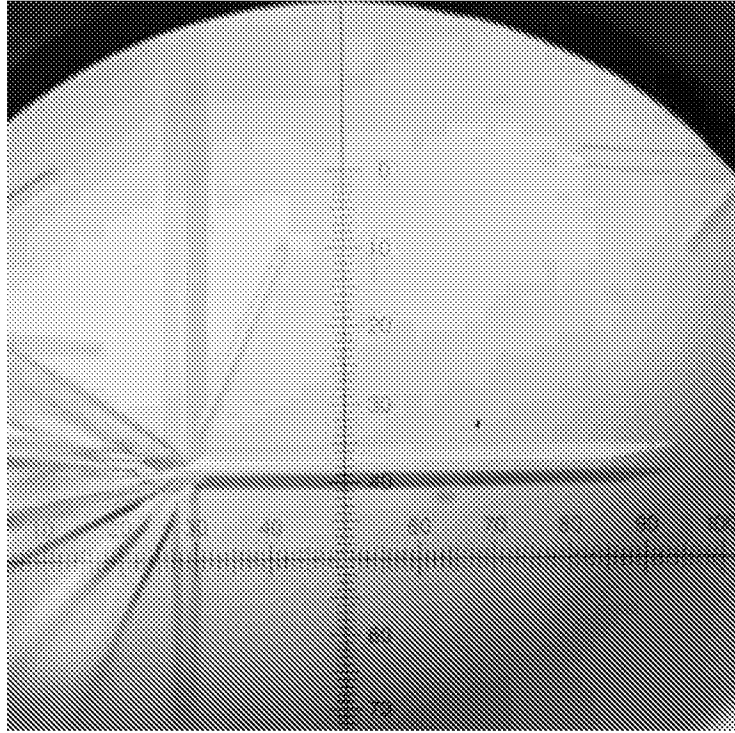


图 8

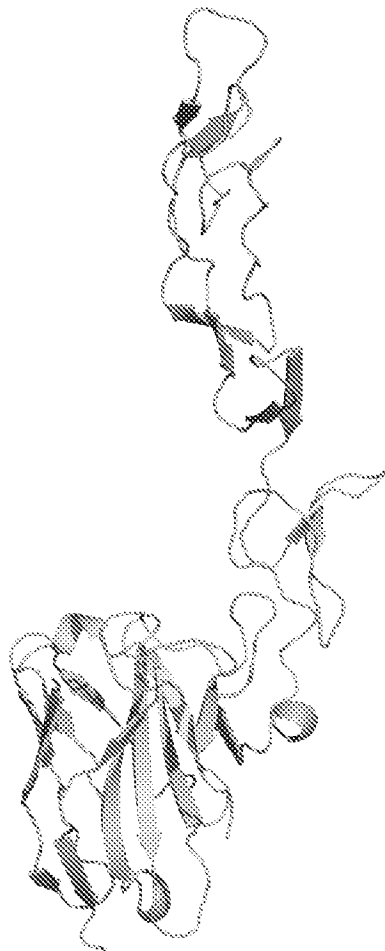


图 9

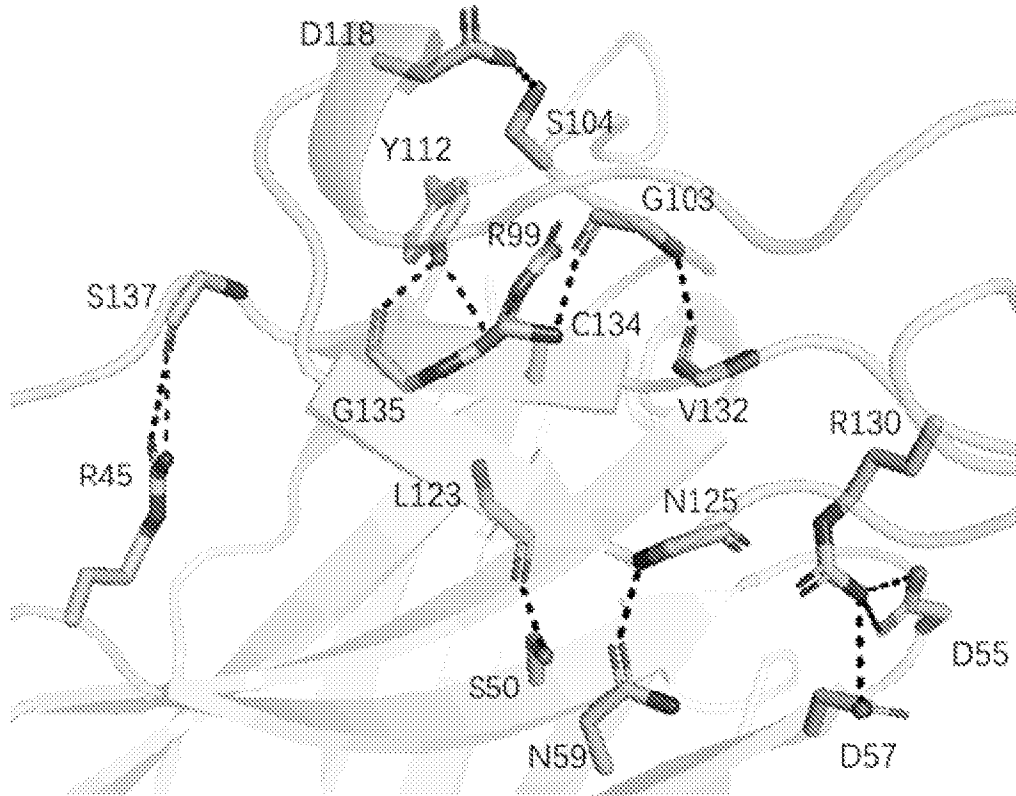


图 10

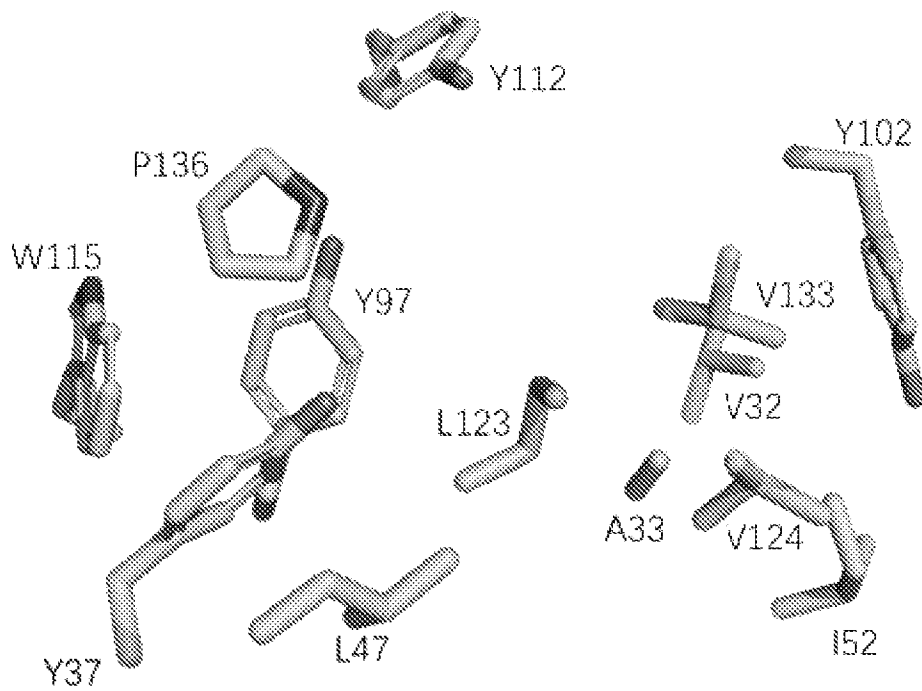


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/118955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C07K 16/30(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 A61K		
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, SIPOABS, DWPI, CNKI, BAIDU, PATENTICS, NCBI: 普米斯生物技术(珠海)有限公司, 翟天航, 缪小牛, 徐祚凤, 王超, 曾竣玮, 肿瘤坏死因子受体, 单链抗体, 单域抗体, 构建, 4-1BB, CD137, TNFRF9, NP_001552, urelumab, utomilumab, antibody, single domain, single chain, SEQ ID NO: 1-160, 168.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAGHERI, S. et al. "Selection of single chain antibody fragments binding to the extracellular domain of 4-1BB receptor by phage display technology." <i>Tumor Biology.</i> , Vol. 39, No. 3, 31 March 2017 (2017-03-31), pp. 1-13	1-34
A	CN 109970865 A (SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE et al.) 05 July 2019 (2019-07-05) claim 2, and description, SEQ ID NO: 2	1-34
A	US 2019062445 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 28 February 2019 (2019-02-28) entire document	1-34
A	CN 105481983 A (PFIZER INC.) 13 April 2016 (2016-04-13) entire document	1-34
A	CN 111542342 A (LIJIN BIOMEDICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 14 August 2020 (2020-08-14) entire document	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 20 October 2021		Date of mailing of the international search report 14 December 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer 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	陈哲浩等 (CHEN, Zhehao et al.). "单域抗体的特性及其临床开发进展 (Characteristics and Clinical Development Status of Therapeutic Single Domain Antibody (sdAb))" <i>中国新药杂志 (Chinese Journal of New Drugs)</i> , Vol. 28, No. 21, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 2581-2587	1-34
A	SEGAL, N. H. et al. "Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody." <i>Clin Cancer Res.</i> , Vol. 23, No. 8, 18 October 2016 (2016-10-18), pp. 1929-1936	
A	BAGHERI, S. et al. "Targeting the 4-1BB costimulatory molecule through single chain antibodies promotes the human T-cell response." <i>Cellular & Molecular Biology Letters.</i> , Vol. 25, 22 April 2020 (2020-04-22), vol. 28, pp. 1-13	1-34

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

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.: **22**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 22 relates to a "disease treatment method" which belongs to the subject matter defined in PCT Rule 39(iv); however, the written opinion is provided on the basis of a "pharmaceutical use".
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/CN2021/118955

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109970865	A	05 July 2019	WO	2019129056	A1	04 July 2019
US	2019062445	A1	28 February 2019	CA	2542044	C	02 July 2013
				IL	174460	A	28 June 2012
				IS	8401	A	06 April 2006
				US	7288638	B2	30 October 2007
				JP	2007532095	A	15 November 2007
				AU	2004279877	A1	21 April 2005
				IL	174460	D0	01 August 2006
				KR	101119266	B1	15 March 2012
				BR	PI0415195	A	28 November 2006
				EP	1670828	B1	28 August 2013
				DK	1670828	T3	02 December 2013
				US	2005095244	A1	05 May 2005
				MX	PA06003788	A	14 June 2006
				SI	1670828	T1	31 March 2014
				KR	20060126455	A	07 December 2006
				NO	20061394	L	09 May 2006
				US	2012141494	A1	07 June 2012
				WO	2005035584	A1	21 April 2005
				US	7659384	B2	09 February 2010
				AU	2004279877	B2	20 May 2010
				PL	1670828	T3	31 December 2013
				RS	51468	B	30 April 2011
				US	2009068192	A1	12 March 2009
				US	9382328	B2	05 July 2016
				CA	2542044	A1	21 April 2005
				NO	20061394	A	09 May 2006
				HR	P20130922	T1	08 November 2013
				US	8137667	B2	20 March 2012
				US	2010183621	A1	22 July 2010
				US	2014193422	A1	10 July 2014
				US	2016368998	A1	22 December 2016
				US	8716452	B2	06 May 2014
				EP	1670828	A1	21 June 2006
				IS	2957	B	15 January 2017
				HK	1085226	A1	18 August 2006
				WO	2005035584	A8	26 January 2006
				RS	20060234	A	29 September 2008
				JP	4616838	B2	19 January 2011
				RU	2376316	C2	20 December 2009
				SI	EP1670828	T1	31 March 2014
				NO	338685	B1	26 September 2016
				PT	1670828	E	04 November 2013
				ES	2432357	T3	02 December 2013
				RU	2006115835	A	20 November 2007
CN	105481983	A	13 April 2016	WO	2012032433	A1	15 March 2012
				KR	20130080866	A	15 July 2013
				AU	2018201703	A1	05 April 2018
				CN	103221428	B	10 February 2016
				NZ	700891	A	26 May 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/118955

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)	
		AU 2011300445 A1	14 March 2013	
		US 2018194851 A1	12 July 2018	
		SG 10201506906 V A	29 October 2015	
		TW 1425005 B	01 February 2014	
		RU 2013110576 A	20 October 2014	
		AU 2014227437 A1	02 October 2014	
		JP 2019065038 A	25 April 2019	
		US 2013078240 A1	28 March 2013	
		US 2016369000 A1	22 December 2016	
		CO 6690759 A2	17 June 2013	
		AR 114031 A2	15 July 2020	
		EP 2614082 A1	17 July 2013	
		CA 2810359 A1	15 March 2012	
		NZ 714128 A	27 October 2017	
		KR 101527297 B1	26 June 2015	
		SG 188313 A1	30 April 2013	
		RU 2015110632 A3	30 November 2018	
		US 9468678 B2	18 October 2016	
		IL 247054 A	30 June 2020	
		TW I652345 B	01 March 2019	
		HK 1222872 A1	14 July 2017	
		IL 247054 D0	29 September 2016	
		PE 20131465 A1	04 January 2014	
		RU 2551963 C2	10 June 2015	
		JP 6105470 B2	29 March 2017	
		ZA 201502914 B	30 August 2017	
		TW 201625694 A	16 July 2016	
		KR 20130079533 A	10 July 2013	
		JP 2017075164 A	20 April 2017	
		TW 201300413 A	01 January 2013	
		SG 10201912092 V A	27 February 2020	
		US 8337850 B2	25 December 2012	
		SI 2614082 T1	31 December 2018	
		AU 2014227437 B2	28 July 2016	
		IL 250386 D0	30 March 2017	
		NZ 729044 A	31 July 2020	
		PT 2614082 T	03 December 2018	
		MY 162737 A	14 July 2017	
		HU E041958 T2	28 June 2019	
		HK 1187627 A1	11 April 2014	
		DK 2614082 T3	26 November 2018	
		ES 2699648 T3	12 February 2019	
		KR 101527300 B1	09 June 2015	
		JP 2013544756 A	19 December 2013	
CN	111542342 A	14 August 2020	JP 2021505206 A	18 February 2021
			WO 2019109238 A1	13 June 2019
			KR 20200092976 A	04 August 2020
			EP 3720491 A1	14 October 2020
			WO 2019113039 A1	13 June 2019
			US 2020385479 A1	10 December 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/118955

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 3101590 A1	13 June 2019
		AU 2018381290 A1	06 August 2020
<hr/>			

A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C07K 16/30(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 A61K 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, SIPOABS, DWPI, CNKI, baidu, patentics, NCBI, 普米斯生物技术(珠海)有限公司, 翟天航, 缪小牛, 徐祎凤, 王超, 曾竣玮, 肿瘤坏死因子受体, 单链抗体, 单域抗体, 构建, 4-1BB, CD137, TNFRF9, NP_001552, urelumab, utomilumab, antibody, single domain, single chain, SEQ ID NO: 1-160, 168.		
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	BAGHERI, S.等. "Selection of single chain antibody fragments binding to the extracellular domain of 4-1BB receptor by phage display technology." Tumor Biology., 第39卷, 第3期, 2017年3月31日(2017-03-31), 第1-13页	1-34
A	CN 109970865 A (上海细胞治疗研究院等) 2019年7月5日(2019-07-05) 权利要求2, 说明书SEQ ID NO:2	1-34
A	US 2019062445 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2019年2月28日(2019-02-28) 全文	1-34
A	CN 105481983 A (辉瑞公司) 2016年4月13日(2016-04-13) 全文	1-34
A	CN 111542342 A (礼进生物医药科技上海有限公司) 2020年8月14日(2020-08-14) 全文	1-34
A	陈哲浩等. "单域抗体的特性及其临床开发进展." 中国新药杂志., 第28卷, 第21期, 2019年12月31日(2019-12-31), 第2581-2587页	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 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	2021年10月20日	国际检索报告邮寄日期
		2021年12月14日
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 朱宁 电话号码 86-(10)-53961956

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	SEGAL, N.H. 等. "Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody." Clin Cancer Res., 第23卷, 第8期, 2016年10月18日 (2016 - 10 - 18), 第1929-1936页	
A	BAGHERI, S. 等. "Targeting the 4-1BB costimulatory molecule through single chain antibodies promotes the human T-cell response." Cellular & Molecular Biology Letters., 第25卷, 2020年4月22日 (2020 - 04 - 22), 第28卷, 第1-13页	1-34

第1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:

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： 22
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 虽然权利要求22涉及“一种疾病的治疗方法”属于细则第39条(iv)规定的主题，但是基于“制备药物的用途”出具书面意见。
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/CN2021/118955

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109970865	A	2019年7月5日	WO	2019129056	A1	2019年7月4日
US	2019062445	A1	2019年2月28日	CA	2542044	C	2013年7月2日
				IL	174460	A	2012年6月28日
				IS	8401	A	2006年4月6日
				US	7288638	B2	2007年10月30日
				JP	2007532095	A	2007年11月15日
				AU	2004279877	A1	2005年4月21日
				IL	174460	D0	2006年8月1日
				KR	101119266	B1	2012年3月15日
				BR	PI0415195	A	2006年11月28日
				EP	1670828	B1	2013年8月28日
				DK	1670828	T3	2013年12月2日
				US	2005095244	A1	2005年5月5日
				MX	PA06003788	A	2006年6月14日
				SI	1670828	T1	2014年3月31日
				KR	20060126455	A	2006年12月7日
				NO	20061394	L	2006年5月9日
				US	2012141494	A1	2012年6月7日
				WO	2005035584	A1	2005年4月21日
				US	7659384	B2	2010年2月9日
				AU	2004279877	B2	2010年5月20日
				PL	1670828	T3	2013年12月31日
				RS	51468	B	2011年4月30日
				US	2009068192	A1	2009年3月12日
				US	9382328	B2	2016年7月5日
				CA	2542044	A1	2005年4月21日
				NO	20061394	A	2006年5月9日
				HR	P20130922	T1	2013年11月8日
				US	8137667	B2	2012年3月20日
				US	2010183621	A1	2010年7月22日
				US	2014193422	A1	2014年7月10日
				US	2016368998	A1	2016年12月22日
				US	8716452	B2	2014年5月6日
				EP	1670828	A1	2006年6月21日
				IS	2957	B	2017年1月15日
				HK	1085226	A1	2006年8月18日
				WO	2005035584	A8	2006年1月26日
				RS	20060234	A	2008年9月29日
				JP	4616838	B2	2011年1月19日
				RU	2376316	C2	2009年12月20日
				SI	EP1670828	T1	2014年3月31日
				NO	338685	B1	2016年9月26日
				PT	1670828	E	2013年11月4日
				ES	2432357	T3	2013年12月2日
				RU	2006115835	A	2007年11月20日
CN	105481983	A	2016年4月13日	WO	2012032433	A1	2012年3月15日
				KR	20130080866	A	2013年7月15日
				AU	2018201703	A1	2018年4月5日
				CN	103221428	B	2016年2月10日
				NZ	700891	A	2017年5月26日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/118955

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)
		AU 2011300445 A1	2013年3月14日
		US 2018194851 A1	2018年7月12日
		SG 10201506906V A	2015年10月29日
		TW 1425005 B	2014年2月1日
		RU 2013110576 A	2014年10月20日
		AU 2014227437 A1	2014年10月2日
		JP 2019065038 A	2019年4月25日
		US 2013078240 A1	2013年3月28日
		US 2016369000 A1	2016年12月22日
		CO 6690759 A2	2013年6月17日
		AR 114031 A2	2020年7月15日
		EP 2614082 A1	2013年7月17日
		CA 2810359 A1	2012年3月15日
		NZ 714128 A	2017年10月27日
		KR 101527297 B1	2015年6月26日
		SG 188313 A1	2013年4月30日
		RU 2015110632 A3	2018年11月30日
		US 9468678 B2	2016年10月18日
		IL 247054 A	2020年6月30日
		TW 1652345 B	2019年3月1日
		HK 1222872 A1	2017年7月14日
		IL 247054 D0	2016年9月29日
		PE 20131465 A1	2014年1月4日
		RU 2551963 C2	2015年6月10日
		JP 6105470 B2	2017年3月29日
		ZA 201502914 B	2017年8月30日
		TW 201625694 A	2016年7月16日
		KR 20130079533 A	2013年7月10日
		JP 2017075164 A	2017年4月20日
		TW 201300413 A	2013年1月1日
		SG 10201912092V A	2020年2月27日
		US 8337850 B2	2012年12月25日
		SI 2614082 T1	2018年12月31日
		AU 2014227437 B2	2016年7月28日
		IL 250386 D0	2017年3月30日
		NZ 729044 A	2020年7月31日
		PT 2614082 T	2018年12月3日
		MY 162737 A	2017年7月14日
		HU E041958 T2	2019年6月28日
		HK 1187627 A1	2014年4月11日
		DK 2614082 T3	2018年11月26日
		ES 2699648 T3	2019年2月12日
		KR 101527300 B1	2015年6月9日
		JP 2013544756 A	2013年12月19日
CN	111542342 A	JP 2021505206 A	2021年2月18日
		WO 2019109238 A1	2019年6月13日
		KR 20200092976 A	2020年8月4日
		EP 3720491 A1	2020年10月14日
		WO 2019113039 A1	2019年6月13日
		US 2020385479 A1	2020年12月10日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/118955

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)
		CA 3101590 A1	2019年6月13日
		AU 2018381290 A1	2020年8月6日
<hr/>			