

权利要求

1. 一种双特异性抗体，其包含靶向 B7-H4 的抗原结合结构域和靶向 4-1BB 的抗原结合结构域。

2. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述的 HCDR1 含有如 SEQ ID NO. 16 或者 23 所示的氨基酸序列，所述的 HCDR2 含有如 SEQ ID NO. 46、59 或者 60 所示的氨基酸序列，所述的 HCDR3 含有如 SEQ ID NO. 98 或者 84 所示的氨基酸序列；

较佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 46 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3；序列如 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 59 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR3；或者，序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 60 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3；优选包含序列如 SEQ ID NO: 142 所示、如 SEQ ID NO: 159 所示或者如 SEQ ID NO: 160 所示的 VH；更优选包含序列如 SEQ ID NO: 174 所示、如 SEQ ID NO: 191 所示或者如 SEQ ID NO: 192 所示的重链；

更佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域还含有 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 或者 113 所示，所述的 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 118 所示，所述的 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 131~133 中任一个所示；

进一步更佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域还含有序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 131 所示的 LCDR3；序列如 SEQ ID NO: 113 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 LCDR3；或者序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR3；优选还含有序列如 SEQ ID NO: 166~169 任一个所示的 VL；更优选还含有序列如 SEQ ID NO: 198~201 任一个所示的轻链。

3. 如权利要求 2 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 46 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3，序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 131 所示的 LCDR3；序列

如 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 59 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR3，序列如 SEQ ID NO: 113 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 LCDR3；或者，序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 60 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3，序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR3；

较佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 166 所示的 VL；序列如 SEQ ID NO: 159 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 167 所示的 VL；序列如 SEQ ID NO: 160 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 168 所示的 VL；或者序列如 SEQ ID NO: 159 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 169 所示的 VL；

更佳地，所述靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 174 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 198 所示的轻链；序列如 SEQ ID NO: 191 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 199 所示的轻链；序列如 SEQ ID NO: 192 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 200 所示的轻链；或者，序列如 SEQ ID NO: 191 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 201 所示的轻链。

4. 如权利要求 2 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域为单个 VH、串联 VH、ScFv、Fab 或者 IgG 的形式；所述的串联 VH 较佳地为 2 个以上 VH 串联，如 2 个、3 个或者 4 个；当为 IgG 形式时，其含有的恒定区较佳地来自含有突变 L234A、L235A 和 P329G 的人 IgG1 或者含有突变 L234A 和 L235A 的人 IgG1。

5. 如权利要求 1~4 任一项所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域含有 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述的 HCDR1 的序列如 SEQ ID NO: 19 或其变体 1、或者 SEQ ID NO: 14 所示，所述的 HCDR2 的序列如 SEQ ID NO: 49 或其变体 2、SEQ ID NO: 51 或者 SEQ ID NO: 43 所示，所述的 HCDR3 的序列如 SEQ ID NO: 86 或其变体 3、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 89 或者 SEQ ID NO: 81 所示；其中：

所述的变体 1 的突变包括 T3I、S6N/R 以及 Y7F 中的一个或多个；较佳地，所述变体 1 的序列优选如序列表中 SEQ ID NO: 17~18 以及 SEQ ID NO: 20~22 中任一个所示；

所述变体 2 的突变包括 S1N/D、G2S/A、S3D/G、G5D/F/S/V 以及 S6T/N/D 中的一个或多个；所述变体 2 的序列优选如序列表中 SEQ ID NO: 47~48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52~58 以及 SEQ ID NO: 61 中的任一个所示；

所述的变体 3 的突变包括 G2R/D/A/K、S3A/T、S4G/N/A/T/H、E5T/V/M/G、T6A、

D7G/S、H9Y/S、Y10H、Y11F、N12G/D 以及 V13I/M/T 中的一个或多个；所述变体 3 的氨基酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87~88 以及 SEQ ID NO: 90~95 中的任一个所示；

较佳地，所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域含有：序列分别如 SEQ ID NO: 17、47 和 85 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 87 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 19、50 和 88 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 20、51 和 89 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、52 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 21、53 和 91 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 21、54 和 92 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 19、55 和 93 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 19、49 和 94 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 22、56 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、57 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 19、58 和 96 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 18、61 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，序列分别如 SEQ ID NO: 14、43 和 81 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

更佳地，所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域含有一个或者多个序列如 SEQ ID NO: 143~157、139、284 或者 161 所示的重链可变区；

进一步更佳地，所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列如 SEQ ID NO: 175~189、193、285 或者 171 所示的重链。

6. 如权利要求 5 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域还包含序列分别如 SEQ ID NO: 109、118 和 128 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；较佳地，包含序列如 SEQ ID NO: 163 所示的轻链可变区；更佳地，包含序列如 SEQ ID NO: 195 所示的轻链。

7. 如权利要求 5 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为单个 VH 或者串联 VH 的形式、HCAb 的形式或者 ScFv 的形式；所述的串联 VH

较佳地为 2 个以上 VH 串联，如 2 个、3 个或者 4 个。

8. 如权利要求 1~7 任一项所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 109、118 和 128 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 14、43 和 81 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 109、118 和 128 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 14、43 和 81 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 17、47 和 85 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 87 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、50 和 88 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如

SEQ ID NO: 20、51 和 89 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、52 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、53 和 91 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、54 和 92 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、55 和 93 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、49 和 94 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 22、56 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示

的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、57 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 17、47 和 85 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、49 和 94 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、61 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、58 和 96 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118

和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、57 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

9. 如权利要求 1~8 任一项所述的双特异性抗体，其特征在于，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 IgG 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为单个 VH 的形式；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 IgG 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 ScFv 的形式；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 IgG 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 2 个或者 3 个 VH 串联的形式；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 Fab 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 HCAb 的形式或者为 HCAb 的形式和 VH 的形式（HCAb-VH 形式）；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 Fab 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 VH 的形式，所述 VH 的形式优选单个 VH、2 个或者 3 个 VH 串联的形式；

较佳地，所述的双特异性抗体为如下形式：

（1）IgG 的 C 端连接有 ScFv，所述 ScFv 的 VH 连接于所述 C 端；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VLB7-H4-CL 所示，多肽链 2 如式：VHB7-H4-CH1-铰链-CH2-CH3-接头-VH4-1BB-接头-VL4-1BB 所示；

（2）IgG 的 C 端连接有 VH 或者串联 VH；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VLB7-H4-CL 所示，多肽链 2 如式：VHB7-H4-CH1-铰链-CH2-CH3-接头-（VH4-1BB）_n 所示；

（3）HCAb 的 N 端连接有 Fab；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VHB7-H4-CH1 所示，多肽链 2 如式：VLB7-H4-CL-接头-VH4-1BB-接头-CH2-CH3 所示；

（4）HCAb 的 N 端连接有 Fab，所述 Fab 的 C 端连接有 VH；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VHB7-H4-CH1 所示，多肽链 2 如式：VLB7-H4-CL-接头-VH4-1BB-接头-CH2-CH3-VH4-1BB 所示；

或者（5）Fc 的 2 个 CH2 的 N 端分别连接有 Fab，以及 VH 或者串联 VH；较佳地，该形式的双特异性抗体含三条多肽链：

多肽链 1 如式：VLB7-H4-CL 所示，多肽链 2 如式：VHB7-H4-CH1-铰链-CH2-CH3 所示，多肽链 3 如式：VH4-1BB-接头-CH2-CH3 或者 (VH4-1BB)_n-接头-CH2-CH3 所示。

10. 如权利要求 9 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的接头选自 SEQ ID NO: 241~261、282 以及 288~289 构成的群组；其中：

形式 (1) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 245 所示的序列；

形式 (2) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 243、245~247 以及 SEQ ID NO: 288~289 任一所示的序列；

形式 (3) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 250 所示的序列；

形式 (4) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 282 所示的序列；

形式 (5) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 245 所示的序列。

11. 如权利要求 10 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 198 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 202~215 中任一所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 201 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 217、230、238、240、226、262 或者 239 所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 200 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 218~225、235~237、263~268、274~281、286 以及 287 中任一所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 201 所示，所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 227 所示，且所述多肽链 3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 228、229、231 或者 232 所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 233 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 234、269~273 中的任一所示。

12. 一种分离的核酸，其编码如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体。

13. 一种包含如权利要求 12 所述的分离的核酸的表达载体。

14. 一种宿主细胞，其包含根据权利要求 13 所述的表达载体；优选地，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

15. 一种双特异性抗体的制备方法，其包含培养如权利要求 14 所述的宿主细胞，从培养物中获得所述双特异性抗体。

16. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体。

17. 如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体或者如权利要求 16 所述的药物组合物在制备防治 4-1BB 和/或 B7-H4 相关的疾病的药物中的应用；

所述的疾病优选癌症，所述的癌症优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤或者结直肠癌；更佳地，所述的癌症优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌或胆管癌；更佳地，所述的癌症优选乳腺癌。

18. 一种嵌合抗原受体，其包含如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体。

19. 一种抗体药物偶联物，其包含细胞毒性剂，以及如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体；优选地，所述细胞毒性剂为 MMAF 或 MMAE。

20. 试剂盒，其包括如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体、如权利要求 18 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 19 中所述的抗体药物偶联物和/或如权利要求 16 所述的药物组合物；

优选地，所述试剂盒还包括(i)施用抗体或其抗原结合片段或抗体药物偶联物或药物组合物的装置；和/或(ii)使用说明。

21. 一种套装药盒，其包含药盒 A 和药盒 B，其中：

所述药盒 A 含有如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体、如权利要求 18 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 19 所述的抗体药物偶联物和/或如权利要求 16 所述的药物组合物；

所述药盒 B 含有其他抗肿瘤抗体或者包含所述其他抗肿瘤抗体的药物组合物，和/或由激素制剂、靶向小分子制剂、蛋白酶体抑制剂、成像剂、诊断剂、化疗剂、溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子、共刺激分子的激活剂、抑制性分子的抑制剂以及疫苗组成的群组中的一种或多种。

22. 一种诊断、治疗和/或预防 4-1BB 和/或 B7-H4 介导的疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体、如权利要求 18 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 19 所述的抗体药物偶联物或如权利要求 16 所述的药物组合物，或者使用如权利要求 21 所述的套装药盒治疗有需要的患者。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述的疾病或病症为肿瘤，优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤或者结直肠癌；更佳地，所述的癌症优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌或胆管癌；更佳地，所述的癌症优选乳腺癌。

24. 一种免疫检测或者测定 4-1BB 或 B7H4 的方法，其包括使用如权利要求 1~11 任

一项所述的双特异性抗体、如权利要求 18 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 19 所述的抗体药物偶联物或如权利要求 16 所述的药物组合物；优选地，所述检测为非诊断和/或治疗目的的。

25. 一种联合疗法，其包括分别向有需要的患者施用如权利要求 1~11 任一项所述的双特异性抗体、如权利要求 18 所述的嵌合抗原受体、如权利要求 19 所述的抗体药物偶联物或如权利要求 16 所述的药物组合物，和第二治疗剂；所述第二治疗剂较佳地包含其他抗肿瘤抗体或者包含所述其他抗肿瘤抗体的药物组合物，和/或由激素制剂、靶向小分子制剂、蛋白酶体抑制剂、成像剂、诊断剂、化疗剂、溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子、共刺激分子的激活剂、抑制性分子的抑制剂以及疫苗组成的群组中的一种或多种。