(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 3 月 2 日 (02.03.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/025194 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/114522

(22) 国际申请日: 2022 年 8 月 24 日 (24.08.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110973560.5 2021年8月24日 (24.08.2021) CN

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

(72) 发明人: **林源(LIN, Yuan)**; 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。
陈思萌(CHEN, Simeng); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。
吴婷婷(WU, Tingting); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。
胡榕婷(HU, Rongting); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。
廖成(LIAO, Cheng); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。

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

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

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

WO 2023/025194 A1

(54) **Title:** FAP/CD40 BINDING MOLECULE AND MEDICINAL USE THEREOF

(54) 发明名称: FAP/CD40结合分子及其医药用途

(57) **Abstract:** An FAP/CD40 binding molecule and the medicinal use thereof. Specifically, provided are an FAP binding molecule, a CD40 binding molecule and an FAP/CD40 binding molecule, a method for preventing and treating diseases (such as tumors or cancers) using same, and the medicinal use thereof.

(57) 摘要: FAP/CD40结合分子及其医药用途；具体地，提供FAP结合分子、CD40结合分子及FAP/CD40结合分子，以及其治疗、预防疾病(例如肿瘤或癌症)的方法和医药用途。

FAP/CD40 结合分子及其医药用途

本公开要求 2021 年 08 月 24 日提交的中国专利申请（申请号 CN202110973560.5)的优先权。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，特别是治疗或干预与 CD40/CD40L 信号通路相关疾病的领域。具体而言，本公开涉及 FAP/CD40 结合分子、其药物组合物，及用于治疗疾病，特别是肿瘤或癌症的方法和相关制药用途。

背景技术

CD40(TNFRSF5)是一种跨膜磷酸化糖蛋白，属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRS)成员。CD40 在多种细胞类型中表达，包括 B 细胞、滤泡树突细胞(DC)、上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞和肿瘤细胞。其配体 CD40L 主要表达在激活的 T 细胞、激活的 B 细胞、血小板和平滑肌细胞等。CD40L 结合使 CD40 多聚化，产生下游激活、生长和分化信号。CD40 信号转导激活多种下游信号通路，如 NF-κB、MAPK 和 STAT3 (Pype S , et al . J Biol Chem . 2000 Jun . 16 ; 275 (24) : 1858693)，这些途径通过调节激活蛋白 c-Jun、ATF2 和 Rel 转录因子来调节基因表达。CD40 与 CD40L 结合诱导静息 B 细胞增殖，免疫球蛋白转换，抗体分泌，并在组织生发中心发育和 B 细胞存活发挥重要作用，所有这些对于体液免疫反应是必不可少的(Kehry M R . J Immunol 1996 ; 156 : 2345 - 2348)。CD40L 与 DC 上的 CD40 结合，诱导 DC 成熟，表现为共刺激因子 B7 家族(CD80，CD86)的表达上调和促炎细胞因子如白细胞介素 12(IL-12)的分泌增加。CD40 和 CD40L 相互作用为 T 细胞激活提供共刺激信号，并促进 DC 细胞递呈抗原给 T 细胞。

随着以 CD40、CTLA-4 和 PD-L1 为靶点的免疫检查点抑制(ICI)疗法在肿瘤治疗中取得的临床胜利，免疫治疗已成为第三代肿瘤治疗中最令人期待的研究领域。其中通过激活 CD40 从而增加 DC 细胞对 T 细胞的抗原递呈及激活为机制的抗肿瘤免疫疗法已展示出临床有效性。但是，CD40 存在系统性激活，这会导致一些靶点特异的毒性, 如细胞因子风暴、肝毒性、血液毒性以及外周 CD40 激活导致的静脉血栓。这些毒性限制了 CD40 激动型抗体的治疗窗口。Pfizer 公司的 CD40 激动剂 CP-870、893 和 Medimmune 公司的 CD40L-Fc 融合蛋白 MEDI5083(AstraZeneca 公司的可激活 CD40 信号通路的新型融合蛋白，由 3 个串联的 CD40L 与 IgG4-Fc 的融合蛋白)先后终止了临床研究。因此。在第二代 CD40 激动剂抗体的研发中，研究者期望通过肿瘤抗原(Tumor-associated antigen，TAA)介导 CD40 激活，使得 CD40 在肿瘤内部特异性激活，同时降低外周 CD40 的激活，从而提高 CD40 激动型抗体的治疗窗。

成纤维细胞活化蛋白 FAP(fibroblast activation protein)α 是肿瘤相关抗原，FAP 在健康成年人的正常组织中表达量较低，选择性地表达在 93%的肿瘤组织中，其中 30%为高表达，例如结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、膀胱癌和口腔鳞癌。本公开提供了抗 FAP 抗体、抗 CD40 抗体及两者的双特异性抗体，所述双特异性抗体能通过 FAP 介导针对肿瘤特异性的 CD40 激活，对 APC(例如树突细胞 DC)具有促成熟、激活作用，能去除肝毒性、外周血液毒性及其它外周毒性，具有优良的给药窗口和成药性，为临床应用提供了解决方案。

发明内容

本公开提供了具有新结构的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子(例如，抗 FAP/CD40 双特异性抗体)，其编码核酸、载体、宿主细胞、药物组合物，及其用于治疗、缓解或预防细胞增殖性疾病(例如肿瘤或癌症)的方法和相关制药用途。

CD40 结合分子

本公开提供了一种 CD40 结合分子，其包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3，其中：

1) 所述免疫球蛋白单一可变结构域中的 CDR1 包含或为 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列，和/或 CDR2 包含或为 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列，和/或 CDR3 包含或为 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列；

2) 所述免疫球蛋白单一可变结构域中的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:39、40、41 所示；

3) 所述免疫球蛋白单一可变结构域中的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:24、25、26 所示，或如 SEQ ID NO:27、28、29 所示；

4) 所述免疫球蛋白单一可变结构域中的氨基酸序列包含或如 SEQ ID NO:22、23、32 至 38 任一所示，或与 SEQ ID NO:22、23、32 至 38 任一具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%的序列同一性；和/或

5) 所述免疫球蛋白单一可变结构域中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO:22 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:23 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:32 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:33 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:34 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:35 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:36 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:37 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示，或如 SEQ ID NO:38 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 所示；所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；一些具体实施方案中，所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，提供CD40结合分子，其包含前述任意一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个)免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同的或不同的。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域为纳米抗体或VHH。

一些实施方案中，前述CD40结合分子中还包含人免疫球蛋白Fc区。一些具体实施方案中，所述Fc区是人IgG1、IgG2、IgG4的Fc区。一些具体实施方案中，所述人IgG1的Fc区具有能够增加与FcγRIIb亲和力、减弱ADCC效应的突变，例如S267E/L328F。减弱ADCC效应的示例性突变是IgG1上的L234A/L235A，IgG2上的V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S，IgG4上的F234A/L235A，IgG4上的S228P/F234A/L235A，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4上的N297A，IgG2上的V234A/G237A，IgG1上的K214T/E233P/L234V/L235A/G236缺失/A327G/P331A/D365E/L358M，IgG2上的H268Q/V309L/A330S/P331S，IgG1上的S267E/L328F，IgG1上的L234F/L235E/D265A，IgG1上的L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S，IgG4上的S228P/F234A/L235A/G237A/P238S，以及IgG4上的S228P/F234A/L235A/G236缺失/G237A/P238S。还可使用杂合IgG2/4Fc域，例如具有来自IgG2的残基117-260和来自IgG4的残基261-447的Fc。增加与FcγRIIb亲和力的示例性突变还包括IgG1上的E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R。

一些实施方案中，前述Fc区可以使所述抗CD40抗体或其抗原结合片段形成二聚体或多聚体分子。

一些实施方案中，前述CD40结合分子中的免疫球蛋白单一可变结构域与Fc区直接或通过接头相连接。所述接头可以是长度为1-20个或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如，所述接头是柔性接头，例如G_4S、GS、GAP、$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$、$(G_4S)_4$、$(G_4S)_5$、ASGS等。

一些实施方案中，提供CD40结合分子，其包含如SEQ ID NO：57至63中任一所示或与之具有至少80%同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述CD40结合分子与至少一个结合其它抗原的抗体直接或间接相连接，例如，形成异二聚体。

一些实施方案中，前述CD40结合分子，具有选自以下至少一项的活性：

(a) 以≤10^{-7}M K_D值与人CD40或其表位结合；

(b) 增加或促进APC(例如树突细胞DC)的活化和/或增殖；和

(c) 抑制肿瘤生长和/或转移。

一些实施方案中，前述CD40结合分子抑制CD40与CD40L的结合，或与CD40L竞争性结合CD40。

一些实施方案中，前述CD40结合分子能够抑制肿瘤生长和/或转移至少约10%，例如至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%。

一些实施方案中，前述 CD40 结合分子使 CD40L 与 CD40 的结合降低至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 75%、至少 80%、至少 90%或至少 95%。

一些实施方案中，前述 CD40 结合分子以 10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M 或更低的 K_D 结合人 CD40。

一些实施方案中，前述 CD40 结合分子为抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，前述 CD40 结合分子为激动剂型抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体。一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体为纳米抗体或 VHH。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包括但不限于：线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体(peptibody)、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)。

一些实施方案中，前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段涵盖变体，例如与 SEQ ID NO:22、23、32 至 38 中任一相比，包含一或多个氨基酸取代，例如，保守氨基酸取代；例如，所述变体包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代。

一些实施方案中，本公开提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其是 SEQ ID NO:22、23 经过亲合力成熟获得的，所述经亲合力成熟的抗 CD40 抗体可以在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致对 CD40 的亲合力相比于亲本抗 CD40 抗体有所增加。

一些实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其与前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其阻断前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段与 CD40(例如人 CD40)的结合。

一些实施方案中，提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其与 CD40(例如人 CD40)的结合被前述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段阻断。

一些实施方案中，提供缀合物，包含前述本公开的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。

本公开中，“至少 90%(序列)同一性”涵盖至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性；“至少 80%(序列)同一性”涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性。

FAP 结合分子

本公开提供了一种 FAP 结合分子，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重

链可变区包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其中：

1) 所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，和/或所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示，和/或所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；和/或所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示，和/或所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示，和/或所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示；

2) 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、18 所示；和/或所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、19 所示；

3) 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、11 所示，所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、14 所示；

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、15 所示，所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、14 所示；

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、15 所示；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、16 所示；或

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、11 所示；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、17 所示；

4) 重链可变区包含如 SEQ ID NO：1 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

重链可变区包含如 SEQ ID NO：3 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：4 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

重链可变区包含如 SEQ ID NO：5 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：6 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；或

重链可变区包含如 SEQ ID NO：7 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：8 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

5) 重链可变区中包含 SEQ ID NO：1 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链可变区中包含 SEQ ID NO：2 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

重链可变区中包含 SEQ ID NO：3 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链可变区中包含 SEQ ID NO：4 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

重链可变区中包含 SEQ ID NO：5 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链可变区中包含 SEQ ID NO：6 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

重链可变区中包含 SEQ ID NO：7 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链可变区中包含 SEQ ID NO：8 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如为 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，提供 FAP 结合分子(例如，抗 FAP 抗体或其抗原结合片段)，包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一个或几个的组合。

一些实施方案中，前述 FAP 结合分子还包含人免疫球蛋白 Fc 区。一些具体实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG4 的 Fc 区。一些实施方案中，所述人 IgG1 的 Fc 具有去除或降低 Fc 效应器功能的突变，例如 IgG1 上具有 N297A 或 D265A/N297A。其它去除或降低 Fc 效应器功能的示例性突变包括 IgG1 上的 L234A/L235A 、 L234A/L235A/P329G 、 L234E 、 L234F 、 L234E/L235F 、 L234E/L235F/P329G ， IgG2 上的 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S ， IgG4 上的 F234A/L235A ， IgG4 上的 S228P/F234A/L235A ， IgG2 或 IgG4 上的 N297A ， IgG2 上的 V234A/G237A ， IgG1 上的 K214T/E233P/L234V/L235A/G236 缺失/A327G/P331A/D365E/L358M，IgG2 上的 H268Q/V309L/A330S/P331S，IgG1 上的 S267E/L328F ， IgG1 上的 L234F/L235E/D265A ， IgG1 上的 L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S ， IgG4 上的 S228P/F234A/L235A/G237A/P238S。

一些实施方案中，提供 FAP 结合分子(例如，抗 FAP 抗体或其抗原结合片段)，其包含重链(HC)和轻链(LC)，其中：

重链为 SEQ ID NO：49 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：50 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

重链为 SEQ ID NO：51 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：52 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

重链为 SEQ ID NO：53 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；或

重链为 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：56 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 FAP 结合分子的重链可变区有 0 至 10 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸变化；轻链可变区有 0 至 10 个(1、2、3、4、5、6、

7、8、9、10 个)氨基酸变化。在一些具体实施方案中，所述氨基酸变化为保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加。

一些实施方案中，前述 FAP 结合分子，具有选自以下至少一项的活性：

(a) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 FAP 或其表位结合；

(b) 增加或促进 APC(例如树突细胞 DC)的活化和/或增殖；

(c) 抑制肿瘤生长和/或转移。

一些实施方案中，前述 FAP 结合分子以 10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M 或更低的 K_D 结合 FAP(例如人 FAP)或其片段。

一些实施方案中，前述 FAP 结合分子为抗 FAP 抗体或其抗原结合片段；一些具体实施方案中，为嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，前述抗 FAP 抗体的抗原结合片段包括但不限于：Fab、Fv、sFv、Fab'、$F(ab')_2$、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)，例如为 scFv、Fv、Fab 或 Fab'片段。

一些实施方案中，提供抗 FAP 抗体或其抗原结合片段，其与前述抗 FAP 抗体或其抗原结合片段结合或竞争结合相同的 FAP(例如人 FAP)表位。

一些实施方案中，提供抗 FAP 抗体或其抗原结合片段，其阻断前述抗 FAP 抗体或其抗原结合片段与 FAP(例如人 FAP)的结合。

一些实施方案中，提供抗 FAP 抗体或其抗原结合片段，其与 FAP(例如人 FAP)的结合被前述抗 FAP 抗体或其抗原结合片段阻断。

一些实施方案中，提供缀合物，其包含前述抗 FAP 抗体或其抗原结合片段。

FAP/CD40 结合分子

本公开提供一种 FAP/CD40 结合分子，其包含特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域和特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域，所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域包含(至少一个)免疫球蛋白单一可变结构域。

一些实施方案中，所述FAP/CD40结合分子包含一个特异性结合CD40的免疫球蛋白单一可变结构域。在另一些实施方案中，所述FAP/CD40结合分子包含2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个特异性结合 CD40 的免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同的或不同的。

一些实施方案中，所述 FAP/CD40 结合分子包含至少一个(例如 2、3、4 个)特异性结合 FAP 的抗原结合结构域。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子中，特异性结合 CD40 的免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:39、40、41 所示。一些具体实施方案中，所述 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:24、25、26 所示；或所述 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:27、28、29 所示。

一些实施方案中，提供一种 FAP/CD40 结合分子，其包含特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域和特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域，所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其中：

HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、18 所示；LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、19 所示。

一些具体实施方案中，前述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域中：

HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、11 所示；LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、14 所示；

HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、15 所示；LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、14 所示；

HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、15 所示；LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、16 所示；或

HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:9、10、11 所示；LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:12、13、17 所示。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子中，所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的重链可变区包含如 SEQ ID NO：1 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

重链可变区包含如 SEQ ID NO：3 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：4 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

重链可变区包含如 SEQ ID NO：5 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：6 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；或

重链可变区包含如 SEQ ID NO：7 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO：8 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子中，所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域包含重链(HC)和轻链(LC)；

例如，重链为 IgG1 或 IgG4 同种型，轻链为 Kappa 同种型；

一些具体实施方案中，重链为 SEQ ID NO：49 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：50 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

重链为 SEQ ID NO：51 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链

为 SEQ ID NO：52 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

重链为 SEQ ID NO：53 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列；或

重链为 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，轻链为 SEQ ID NO：56 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子中，所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的重链可变区的 N 端；

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的重链可变区的 C 端；

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的轻链可变区的 N 端；和/或

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的轻链可变区的 C 端。

一些实施方案中，前述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域与特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域直接或通过连接子相连接；例如，所述连接子为具有如$(G_4S)_x$所示的氨基酸序列，其中，x 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)；例如，所述连接子为$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$、$(G_4S)_4$所示的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子中，特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域为多价(例如，一个前述 FAP/CD40 结合分子中含有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域)。一些具体实施方案中，特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域为二价、四价或六价。一些具体实施方案中，特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域包含 2、3、4、5 或 6 个所述免疫球蛋白单一可变结构域。

一些实施方案中，提供 FAP/CD40 结合分子，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中，第一多肽链包含如 SEQ ID NO：42、44-48 中任一所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列，第二多肽链包含如 SEQ ID NO：43 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。一些具体实施方案中，一个 FAP/CD40 结合分子中包含两条第一多肽链和两条第二多肽链；一些具体实施方案中，所述两条第一多肽链是相同的，所述两条第二多肽链是相同的。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子能够抑制肿瘤生长(例如体积增大、瘤重增加)和/或转移(例如多器官或多组织转移、远端转移)至少约 10%，例如至少约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%。

一些实施方案中，前述 FAP/CD40 结合分子为抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其

抗原结合片段，所述抗原结合片段包括但不限于：Fab、Fv、sFv、Fab'、$F(ab')_2$、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体(peptibody)、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)，例如为 scFv、Fv、Fab 或 Fab'片段。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体含有前述本公开提供的特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域，和前述本公开提供的特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域中的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体中：

特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域为第一抗体，其包括重链(HC)和轻链(LC)；和

特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域为第二抗体，其是 VHH，具有前述本公开提供的 CD40 结合分子中的 CDR1、CDR2、CDR3。

一些具体实施方案中，所述 VHH 作为第二抗体位于第一抗体的重链或轻链的 N 端和/或 C 端。

一些具体实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体包含 1 个第一抗体和 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个(例如 2 个、4 个、6 个)VHH 的第二抗体；所述第一抗体包括两条 HC 和两条 LC，第一抗体的一条 HC 的 VH 与一条 LC 的 VL 形成抗原结合部位，另一条 HC 的 VH 与另一条 LC 的 VL 形成抗原结合部位。

一些具体实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段的第一抗体可以连接有 1、2、3、4、5、6、7、8 个 VHH 的第二抗体，所述 VHH 的第二抗体可以是相同的或不同的，可以均连接在第一抗体的重链 N 端，或均连接在第一抗体的重链 C 端，或均连接在第一抗体的轻链 N 端，或均连接在第一抗体的轻链 C 端，或重链 N 端、重链 C 端、轻链 N 端、轻链 C 端的任意组合。一些具体实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链：

(i) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：[第一抗体的重链]-接头 1-[第二抗体]；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(ii) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：[第一抗体的重链]-接头 1-$[第二抗体]_1$-接头 2-$[第二抗体]_2$；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(iii) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：[第一抗体的重链]-接头 1-$[第二抗体]_1$-接头 2-$[第二抗体]_2$-接头 3-$[第二抗体]_3$；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(iv) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：[第二抗体]-接头 1-[第一抗体的重链]；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(v) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：$[第二抗体]_2$-接头 2-$[第二抗体]_1$-接头 1-[第一抗体的重链]；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(vi) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：$[第二抗体]_3$-接头 3-$[第二抗体]_2$-接头 2-[第

二抗体]$_1$-接头 1-[第一抗体的重链]；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(vii) 第一多肽链从 N 端至 C 端为：[第二抗体]$_1$-接头 1-[第一抗体的重链]-接头 2- [第二抗体]$_2$；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(viii) 第一多肽链从N端至C端为:[第二抗体]$_1$-接头 1- [第二抗体]$_2$-接头 2-[第一抗体的重链]-接头 3- [第二抗体]$_3$；第二多肽链为第一抗体的轻链；

(ix) 第一多肽链从 N 端至 C 端为:[第二抗体]$_1$-接头 1-[第一抗体的重链]-接头 2- [第二抗体]$_2$-接头 3-[第二抗体]$_3$；第二多肽链为第一抗体的轻链；

其中，[第二抗体]$_1$、[第二抗体]$_2$、[第二抗体]$_3$ 可以相同或不同。

一些实施方案中，前述抗 FAP/CD40 双特异性抗体中的 VHH 的第二抗体直接或通过连接子与第一抗体连接。所述连接子(接头)选自：如$(G_mS_n)_x$ 或$(GGNGT)_x$或$(YGNGT)_x$ 所示的氨基酸序列，其中 m、n 各自独立地选自 1-8 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8)，x 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)。例如，连接子为 G_4S、$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$、$(G_4S)_4$、$(G_4S)_5$、$(G_4S)_6$ 所示的氨基酸序列。一些实施方案中，接头 1、接头 2、接头 3 可以相同或不同。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体的第一抗体的重链包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)，轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。第一抗体可以为全长抗体。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体第一抗体的重链为 IgG 同种型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，例如为 IgG1 同种型；和/或，所述第一抗体的轻链为 Kappa 同种型。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体的两条 HC 包含相同的 CDR 和/或两条 LC 包含相同的 CDR。一些具体实施方案中，第一抗体的两条 HC 包含相同的 VH 和/或两条 LC 包含相同的 VL。一些具体实施方案中，第一抗体的两条 HC 具有相同的氨基酸序列和/或两条 LC 具有相同的氨基酸序列。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体两个 VHH 的第二抗体具有相同或不相同的氨基酸序列。例如，两个所述 VHH 的第二抗体具有相同的氨基酸序列。

一些实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体包含两条第一多肽链和两条第二多肽链，其中对于每条多肽链：a)第一多肽链各自独立地包含 VHH 的第二抗体和第一抗体的重链(HC)；和 b)第二多肽链各自独立地包含第一抗体的轻链(LC)；其中，VHH 通过接头与第二抗体的 HC 的 N 端和/或 C 端相连；

或者，i) 第一多肽链各自独立地包含第一抗体的重链(HC)；和 ii) 第二多肽链各自独立地包含 VHH 的第二抗体和第一抗体的轻链(LC)；其中，VHH 直接或通过连接子与第一抗体的 LC 的 N 端和/或 C 端相连。

一些具体实施方案中，抗 FAP/CD40 双特异性抗体包含两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。一些实施方案中，提供与本公开的抗 FAP/CD40 双特异

性抗体竞争性结合相同表位的抗体。

一些实施方案中，在本公开的 FAP/CD40 结合分子或抗 FAP/CD40 双特异性抗体的 Fc 区引入突变。所述突变例如是使得 IgG 的 Fc 效应器功能去除或降低的突变，包括但不限于：IgG1 的 N297A 或 D265A/N297A，或 IgG1 上的 L234A/L235A、L234A/L235A/P329G、L234E、L234F、L234E/L235F、L234E/L235F/P329G，IgG2 上的 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S，IgG4 上的 F234A/L235A，IgG4 上的 S228P/F234A/L235A，IgG2 或 IgG4 上的 N297A，IgG2 上的 V234A/G237A，IgG1 上的 K214T/E233P/L234V/L235A/G236 缺失/A327G/P331A/D365E/L358M，IgG2 上的 H268Q/V309L/A330S/P331S，IgG1 上的 S267E/L328F，IgG1 上的 L234F/L235E/D265A，IgG1 上的 L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S，IgG4 上的 S228P/F234A/L235A/G237A/P238S。

在本文中 Fc 区所包含的突变的上下文中，“/”表示“和”，例如，“D265A/N297A”表示“D265A 和 N297A”，即，Fc 中包含 D265A 和 N297A 突变；突变的氨基酸位置是根据 EU 编号系统编号的。

一些实施方案中，前述本公开提供的 FAP/CD40 结合分子或抗 FAP/CD40 双特异性抗体具有如下的一项或多项特征：

(a) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 FAP 或其表位结合；

(b) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 CD40 或其表位结合；

(c) 诱导 CD40 表达性抗原呈递细胞(APC)的免疫刺激；

(d) 增加 APC(例如树突细胞)的活化，和/或促进 APC(例如树突细胞)的增殖；

(e) 刺激肿瘤特异性 T 细胞应答；

(f) 引起或促进肿瘤细胞的凋亡；和/或

(g) 抑制肿瘤生长和/或转移。

此外，本公开的抗 CD40 抗体、抗 FAP 抗体、FAP/CD40 结合分子对热处理均具有抗性或具有较高的稳定性。例如，在 40℃下处理 30 天未见明显聚集或降解，至少在 60℃下稳定。

多核苷酸

本公开提供编码本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。本公开的核酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。一些实施方案中，本公开的核酸是基本上分离的核酸。

本公开的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供 CD40 结合分子体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主

中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段的表达有用或必需的调控元件及其它元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的核酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段，和/或含有本公开的核酸或载体的重组宿主细胞。

一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其它细胞。

本公开的细胞不能发育成完成的植株或动物个体。

生产或制备方法

本公开提供制备本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法通常包含以下步骤：

- 在允许表达本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养本公开的宿主细胞；及
- 从培养物回收由所述宿主细胞表达的目的蛋白；及
- 任选的，包括进一步纯化和/或修饰本公开的目的蛋白。

本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40

双特异性抗体或其抗原结合片段可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生，接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化；或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

用于重组产生多肽的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的结合分子或抗体等得目的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南(5-8 章和 15 章)。本公开工程化的抗体也可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

然而，本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

组合物

本公开提供组合物(例如药物组合物)，其含有预防或治疗有效量的如上所述的本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段、或编码多核苷酸，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

一些具体实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的 CD40 结合分子、FAP/CD40 结合分子或抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段。另一些具体实施方案中，药物组合物单位剂量中含 CD40 结合分子、FAP/CD40 结合分子或抗 FAP/CD40 双特异性抗体的量为 0.1-2000mg；一些具体实施方案中为 1-1000mg。

试剂盒

本公开提供试剂盒，包含本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段、和/或编码多核苷酸。一些实施方案中，还提供包含上述多核苷酸的诊断试剂，以及提供相关诊断用途。

治疗疾病的方法和制药用途

本公开提供了本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段、编码多核苷酸或药物组合物在预防

和/或治疗疾病中用途和方法，所述疾病可以是与 CD40 信号通路相关或不相关的。一些实施方案中，本公开提供一种预防和/或治疗与 CD40 相关的疾病的方法，所述方法包括向受试者施用预防和/或治疗有效量的本公开的 CD40 结合分子，或包含本公开 CD40 结合分子的药物组合物。以及，还提供在制备本公开的 CD40 结合分子在预防和/或治疗与 CD40 或 CD40L 相关疾病、CD40 或 CD40L 相关障碍的药物中的用途。

本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段、编码多核苷酸或药物组合物可以单独使用，或者与其它抗癌症或肿瘤治疗手段联合使用(例如与其它免疫原性剂、标准癌症疗法或其它抗体分子联合使用)，以抑制癌症或肿瘤的生长。

一些实施方案中，本公开提供一种预防和/或治疗癌症或肿瘤的方法，包括给患者或受试者施用预防和/或治疗有效量的本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段、编码多核苷酸、药物组合物，抑制患者或受试者中的肿瘤细胞生长。一些具体实施方案中，所述癌症优选但不限于对免疫治疗有应答的癌症。

以上方法或用途中，癌症或肿瘤的非限制性的例子包括肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤(例如转移的恶性黑色素瘤)、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本公开的方法治疗的其它癌症的例子包括：骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病，包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。一些实施方案中，上述肿瘤或癌症是转移性的和/或晚期的。

此外，本公开还提供一种预防和/或治疗受试者或患者中的感染性疾病的方法，包括给该受试者或患者施用本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子、FAP/CD40 结合分子、抗 FAP/CD40 双特异性抗体或其抗原结合片段、编码多核苷酸或药物组合物，使得所述对象的感染性疾病得到预防和/或治疗。类似于对于如上所述的癌症或肿瘤的应用，CD40 结合分子可以单独使用，或者与疫苗组合使用来刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。特别可以应用该治疗方法的病原体的示例包括当前没有有效疫苗的病原体，或常规疫苗不完全有效的病原体。其中包括但不

限于 HIV、肝炎病毒(甲、乙、丙)、流感病毒、疱疹病毒、贾第虫、疟疾、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌。

检测

本公开提供检测 CD40 或 FAP 的组合物，所述组合物包含根据本公开的 CD40 结合分子或 FAP 结合分子。本公开还提供用于体内或体外检测 CD40 或 FAP 的方法、系统或装置，其包括用本公开的 CD40 结合分子或 FAP 结合分子处理样品。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括：

(1) 使样品与结合 CD40 或 FAP 的抗体接触；

(2) 检测在结合 CD40 或 FAP 的抗体和样品之间形成的复合物；和/或

(3) 使参比样品(例如，对照样品)与抗体接触；和

(4) 通过与参比样品比较，确定复合物形成的程度。如与对照样品或受试者中相比，样品或受试者中复合物形成的变化(例如，统计学上的显著变化)表示样品中存在 CD40 或 FAP。

另一些实施方案中，体内检测方法、系统或装置可以包括：

(1) 向受试者施用结合 CD40 结合分子或 FAP 结合分子；和

(2) 检测 CD40 结合分子或 FAP 结合分子和受试者之间复合物的形成。

检测可以包括确定形成复合物的位置或时间。用可检测物质对 CD40 结合分子或 FAP 结合分子标记，通过对所述标记检测以实现检测。合适的可检测物质包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。可以通过测量与 CD40 或 FAP 结合或不结合的抗体或使其可视化，检测 CD40 结合分子和和 CD40，或 FAP 结合分子和 FAP 之间的复合物形成。可以使用常规检测测定法，例如，酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或组织免疫组织化学。出于检测目的，本公开的 CD40 结合分子或 FAP 结合分子可以用荧光团发色团标记。

一些实施方案中，还提供试剂盒，所述试剂盒包含 CD40 结合分子或 FAP 结合分子，还可以包含诊断使用说明。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，CD40 结合分子或 FAP 结合分子可以配制为药物组合物。

定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不仅限于”的意义。“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem，243，p3558(1968)

中所述。

“CD40”和“CD40 抗原”是指在正常和赘生性 B 细胞表面上表达的约 48kD 糖蛋白，其充当参与细胞增殖和分化的信号的受体(Ledbetter 等人,1987,J.Immunol.138:788-785)。内源性表达 CD40 的细胞是特征在于 CD40 的表面表达的任何细胞，包括但不限于正常和赘生性 B 细胞、交错突细胞、基底上皮细胞、癌细胞、巨噬细胞、内皮细胞、滤泡树突细胞、扁桃体细胞和骨髓来源的浆细胞。本公开“CD40”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物例如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然 CD40,除非另有说明。已从由伯基特氏淋巴瘤细胞系 Raji 制备的文库中分离出编码 CD40 的 cDNA 分子(Stamenkovic 等人,1989,EMBO J.8:1403)。序列信息可参见本公开表 8。本公开“CD40”涵盖全长未加工的 CD40 以及源自细胞中的加工的任何形式的 CD40，还涵盖 CD40 的天然发生变体，例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中，本公开的 CD40 结合分子能够特异性结合人，小鼠和/或食蟹猴 CD40。

“成纤维细胞激活蛋白(FAP)”和“FAP 抗原”，也称作脯氨酰内肽酶 FAP 或分离酶(Seprase)(EC 3.4.21)，指来自任何脊椎动物来源的任何天然 FAP，包括哺乳动物，例如灵长类(例如人)，非人灵长类(例如食蟹猴)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)，除非另外指明。本公开“FAP”涵盖全长未加工的 FAP 以及源自细胞中的加工的任何形式的 FAP，还涵盖 FAP 的天然发生变体，例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中，本公开的 FAP 结合分子能够特异性结合人，小鼠和/或食蟹猴 FAP。人 FAP 的氨基酸序列在 UniProt(www.uniprot.org)登录号 Q12884(版本 149，SEQ ID NO:2)，或 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_004451.2、GeneBank Accession NO. AAC51668 中显示。人 FAP 的细胞外结构域(ECD)自氨基酸位置 26 延伸至 760。带 His 标签的人 FAP ECD 等氨基酸序列在本公开表 2 中显示。小鼠 FAP 的氨基酸序列在 UniProt 登录号 P97321(版本 126，SEQ ID NO:143)，或 NCBI RefSeq NP_032012.1 中显示。小鼠 FAP 的细胞外结构域(ECD)自氨基酸位置 26 延伸至 761。一些实施方案中，本公开的 FAP 结合分子结合 FAP 的细胞外结构域。

“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、δ 链、γ 链、α 链和 ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠

近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区(V 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(CDR)和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

“双特异性抗体”涵盖对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗体(包括抗体或其抗原结合片段，如单链抗体)。典型的双特异性抗体结构模型如 KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、Fc Δ Adp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2：1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP- DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)2- CrossMAb、IgG-(scFv)2、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、(scFv)4-Fc、CODV-Ig、mAb2、F(ab)4- CrossMAb 等双特异性抗体(参见 Aran F. Labrijn 等，Nature Reviews Drug Discovery volume 18，pages585 – 608(2019)；Chen S1 等，J Immunol Res. 2019 Feb 11；2019:4516041)。

对于 CDR 的确定或定义，能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种，例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR，包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu，2000，Nucleic Acids Res.，28：214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似，但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等，1986，J.Mol.Biol.，196：901-17；Chothia 等人，1989，Nature，342：877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等，1989，ProcNatl Acad Sci(USA)，86：9268-9272；“AbMTM，A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies，”Oxford，UK；Oxford Molecular，Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合，从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等，1999，在 PROTEINS，Structure，Function and Genetics Suppl.，3：194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等，1996，J.Mol.Biol.，5：732-45)。构象定义中，CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基(参见例如 Makabe 等，2008，Journal ofBiological Chemistry，283：1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一，但仍然与

Kabat CDR 的至少一部分重叠，尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果，它们可缩短或延长。如本公开使用的，CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的，示例性的，如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

本公开的抗体的 VL 区和 VH 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号系统。

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，且在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规四肽链结构抗体的链或重链抗体的链)的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征，其由排列在两个 β 折叠中任选由保守二硫键稳定的约 7 个反平行 β 折叠股的 2 层夹层组成。

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

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

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

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

“VHH 结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗体片段、VHH 抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C，Atarhouch T，Muyldermans S，Robinson G，Hamers C，Songa EB，Bendahman N，Hamers R.:“Naturally occurring antibodies devoid of light chains”；Nature363，446-448(1993))。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域(其在本公开中称为“VH 结构域”)以及轻链可变结构域(其在本公开中称为“VL 结构域”)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域相反，在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_HH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody®”以及““Nanobody®结构域””(“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司，Ghent，Belgium 的商标)可互换使用。“VHH 结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体，也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的，也可以是经噬菌体体展示技术筛选获得的。VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内，常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法，先前已公开于以下文献中：R.van der Linden et al.，Journal of Immunological Methods，240(2000)185-195；Li et al.，J Biol Chem.，287(2012)13713-13721；Deffar et al.，African Journal of Biotechnology Vol.8(12)，pp.2645-2652，17June，2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的，各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同，且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数(即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据，或实际序列可能含有

多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言，根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分，从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降，可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的VHH结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而 “人源化”(本公开中亦称为“序列优化”，除人源化外，“序列优化”也可涵盖通过提供VHH改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰，例如移除潜在的翻译后修饰位点)。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列。此外，为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。

“全人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本公开的全人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。“全人抗体”不包括“人源化抗体”。

通常，本公开的 CD40 结合分子、FAP 结合分子将以如于 Biacore 或 KinExA 或 Fortibio 测定中测量的优选 10^{-7} 至 10^{-10} 摩尔/升(M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-10} 摩尔/升、甚至更优选 10^{-9} 至 10^{-10} 或更低的解离常数(K_D)，和/或以至少 10^{-7}M、优选至少 10^{-8}M、更优选至少 10^{-9}M，更优选至少 10^{-10}M 的缔合常数(KA)结合所要结合的抗原(即 CD40 或 FAP)。任何大于 10^{-4}M 的 K_D 值一般都视为指示非特异性结合。抗原结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本公开所述的表面等离子体共振术(SPR)测定、Scatchard 测定和/或竞争性结合测定(例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)及夹心式竞争性测定)。

当“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 CD40 或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等，1983，Methodsin Enzymology 9：242-253)；固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等，1986，J.Immunol.137：3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane，

1988，Antibodies，A Laboratory Manual(抗体，实验室手册)，Cold Spring Harbor Press)；用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等，1988，Molec.Immunol.25：7-15)；固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Cheung，等，1990，Virology176 ： 546-552) ； 和 直 接 标 记 的 RIA(Moldenhauer 等 ， 1990 ，Scand.J.Immunol.32：77-82)。通常所述测定法涉及使用能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合的纯化抗原(所述抗原在固态表面或细胞表面上)。在待测抗原结合蛋白存在下，测量结合于固态表面或细胞的标记的量，来测量竞争性抑制。通常，待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括：与参考抗原结合蛋白相同的表位发生结合的抗原结合蛋白；以及，与充分接近参考抗原结合蛋白结合的表位所邻近的表位发生结合的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍结合的发生。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将抑制(例如降低)至少 40-45％、45-50％、50-55％、55-60％、60-65％、65-70％、70-75％或 75％或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下，结合被抑制至少 80-85％、85-90％、90-95％、95-97％或 97％或更多。

可使用本领域技术人员已知的常规技术，就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如，可进行竞争和交叉竞争研究，以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利公开 WO03/48731 中。因此，可使用本领域技术人员已知的常规技术，获得与本公开的抗体分子竞争结合 CD40 或 FAP 上的相同表位的抗体。

“CD40 结合分子”意指任何能够特异性结合 CD40 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子。CD40 结合分子可以包括针对 CD40 的如本公开定义的抗体或其缀合物。CD40 结合分子还涵盖免疫球蛋白超家族抗体(IgSF)或 CDR 移植分子。本公开的“CD40 结合分子”可以包含至少一个结合 CD40 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。在一些实施方案中，“CD40 结合分子”可以包含 2、3、4 或更多个结合 CD40 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。本公开的 CD40 结合分子除结合包含 CD40 的免疫球蛋白单一可变结构域外，也可包含接头和/或具有效应器功能的部分，例如半衰期延长部分(如结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域)、和/或融合配偶体(如血清白蛋白)和/或缀合的聚合物(如 PEG)和/或 Fc 区。在一些实施方案中，本公开的“CD40 结合分子”还涵盖双/多特异性抗体，其含有结合不同抗原的免疫球蛋白(如结合第一抗原(如 CD40)的第一抗体和结合第二抗原(如 FAP)的第二抗体，可选的，包括结合第三抗原的第三抗体，进一步可选的，包括结合第四抗原的第四抗体。

“FAP 结合分子”意指任何能够特异性结合 FAP 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子。FAP 结合分子可以包括针对 FAP 的如本公开定义的抗体或其缀合物。

“FAP/CD40 结合分子”意指任何能够特异性结合 CD40 和 FAP 的蛋白或包含

所述蛋白的任何分子。FAP/CD40 结合分子可以包括针对 CD40 和 FAP 的如本公开定义的抗体或其缀合物。

“与 CD40 结合”或“结合 CD40”，指能与 CD40 或其表位相互作用，所述 CD40 或其表位可以是人源的。“与 FAP 结合”或“结合 FAP”，指能与 FAP 或其表位相互作用，所述 FAP 或其表位可以是人源的。本公开的“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本公开抗体识别的三维空间位点。

“抗原”指用于免疫接种免疫活性的脊椎动物的分子，以产生识别抗原的抗体，或筛选表达文库(例如尤其是噬菌体、酵母或核糖体展示文库)。在本公开中，抗原被更广义地定义，包括由抗体特异性识别的靶分子，以及包括用于产生抗体的免疫接种过程或用于选择抗体的文库筛选中使用的分子的一部分或模拟物。例如，对于本公开的与人 CD40 结合的抗体，人 CD40 的单体和多聚体(例如二聚体、三聚体等)，以及人 CD40 的截短变体和其它变体均被称为抗原。

“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括至少 3-15 个氨基酸。确定什么表位由给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本公开所述的技术，例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。例如，当使用人 CD40 或其表位作为分析物并使用抗体作为配体，在仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时，抗体以大约低于 10^{-7}M 或甚至更小的平衡解离常数(K_D)与预定的抗原或其表位结合，并且其与预定抗原或其表位结合的亲和力是其与预定抗原(或其表位)或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(如 BSA 等)结合的亲和力的至少两倍。“识别抗原的抗体”在本公开中可以与“特异性结合的抗体”互换使用。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(KD)来量化。可通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 KD。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 ka(或 kon)和解离速率常数 kd(或 koff)。K_D 通过方程 K_D ＝kd/ka 与 ka 和 kd 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且可通过方法例如 Caceci 等人(1984，Byte 9：340-362)中所述的那些甚至对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman(1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432)中公开的那种来确定 K_D。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如

ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振(SPR)，例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 K_D 值与非目的相互作用(例如已知不结合 CD40 的对照抗体)的 K_D 值进行评价。

“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。“抑制生长”(例如涉及细胞)旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“激动活性”、“激动剂活性”或“激动性”指作为激动剂的物质功能。激动剂与细胞受体的结合引起了与该受体的天然配体所引起的相类似或相同的反应或活性。例如，CD40 激动剂或 CD40 激动型抗体可诱导任何或全部的下列应答：细胞增殖和/或分化；通过例如 ICAM-1、E-选凝素、VCAM 等分子上调细胞之间的

粘附；分泌促炎性细胞因子，例如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF 等；经 CD40 受体通过以下途径转导信号，例如 TRAF(例如，TRAF2 和/或 TRAF3)、MAP 激酶，如 NIK(NF-κB 诱导激酶)、1-κB 激酶(IKKα/β)、转录因子 NF-κB、Ras 和 MEK/ERK 途径、PI3K/Akt 途径、P38 MAPK 途径等；通过 XIAP、Mcl-1、BCLx 等分子转导抗-凋亡信号；B 和/或 T 细胞记忆的产生；B 细胞抗体产生；B 细胞同种型转换；上调 II 类 MHC 和 CD80/86 的细胞表面表达等。

“CD40 相关疾病”或“CD40 相关病症”指示表达 CD40 的细胞的被修饰或消除的病症。这些细胞包括表现出异常增殖的表达 CD40 的细胞或与癌性或恶性生长相关联的表达 CD40 的细胞。表现出 CD40 抗原的异常表达的癌症的更具体例子包括 B 淋巴母细胞、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T 细胞淋巴瘤、卡波西氏肉瘤、骨肉瘤、表皮和内皮肿瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、头颈癌、皮肤癌(黑色素瘤)、膀胱癌和肾癌。此类障碍包括但不限于白血病、淋巴瘤(包括 B 细胞淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特罗姆巨球蛋白血症；实体瘤，包括肉瘤，例如骨肉瘤、尤因氏肉瘤、恶性黑色素瘤、腺癌(包括卵巢腺癌)、卡波西氏肉瘤/卡波西氏肿瘤和鳞状细胞癌。

“增殖性疾病”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中，增殖性病症指癌症。

“癌症”、“癌性”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本公开中提到时并不互相排斥。

“预防癌症”是指在受试者中延迟、抑制或防止癌症发作，所述受试者中癌症发生或肿瘤发生的起始尚未得到证实，但是通过例如遗传筛查或其它方法确定，已鉴定了癌症易感性。该还包括治疗具有癌变前病症的受试者以终止所述癌变前病症向恶性肿瘤的进展或导致其消退。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触，例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，例如包含本公开的任一种抗体或其药物组合物作为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种增殖性疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化，

例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

本公开的“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

附图说明

图 1 为抗 FAP 抗体 Ab9、Ab10、Ab14、Ab15 与细胞表面人 FAP 的结合，使用 28H1 作为阳性对照，IgG1 同种型(作为阴性对照。

图 2 为抗 FAP 抗体 Ab9、Ab10、Ab14、Ab15 与细胞表面小鼠 FAP 的结合，使用 28H1 作为阳性对照，IgG1 同种型作为阴性对照。

图 3 为抗 CD40 抗体 A12、A297 与 Raji 细胞表面人 CD40 的结合，使用 9E5-SELFNS 作为阳性对照，IgG1 作为阴性对照。

图 4 为抗 CD40 抗体 A12、A297 与 HEK293 细胞表面人 CD40 的结合，使用 9E5-SELFNS 作为阳性对照，IgG1 作为阴性对照，纵坐标为相对于 200 nM 9E5-SELFNS 的激动活性百分比。

图 5A 为人源化抗 CD40 抗体 A12_V1、A12_V2、A12_V3 与过表达人 CD40 的 HEK293 细胞的亲和力流式检测结果，图 5B 为人源化抗 CD40 抗体 A297_V1、A297_V2、A297_V3、A297_V4 与过表达人 CD40 的 HEK293 细胞的亲和力流式检测结果，均使用 9E5-SELFNS 作为阳性对照，hIgG 作为阴性对照。

图 6A 为人源化抗 CD40 抗体 A12_V1、A12_V2、A12_V3 通过 FcγRIIb 介导的 HEK-Blue^{TM}CD40L 细胞的活化作用，图 6B 为人源化抗 CD40 抗体 A297_V1、A297_V2、A297_V3、A297_V4 通过 FcγRIIb 介导的 HEK-Blue^{TM}CD40L 细胞的活化作用，均使用 9E5-SELFNS 作为阳性对照，hIgG 作为阴性对照。

图 7 为抗 FAP/CD40 双特异性抗体结构示意图。

图 8A 为抗 FAP/CD40 双特异性抗体 Ab10-A12V2-2、Ab10-A12V2-4、Ab10-A297V3-2、Ab10-A297V3-4 与高表达人 FAP 抗原的 CHOK1/FAP 稳转株的亲和力流式检测结果；图 8B、图 8C 分别为前述抗 FAP/CD40 双特异性抗体与高

表达鼠 FAP 抗原、食蟹猴 FAP 抗原的 CHOK1/FAP 稳转株的亲和力流式检测结果。

图 9A 为抗 FAP/CD40 双特异性抗体 Ab10-A12V2-2、Ab10-A12V2-4、Ab10-A297V3-2、Ab10-A297V3-4 与高表达人 CD40 抗原的 HEK-BlueTMCD40L 稳转株的亲和力流式检测结果；图 9B 为前述抗 FAP/CD40 双特异性抗体与高表达食蟹猴 CD40 抗原的 HEK293 细胞的亲和力流式检测结果。

图 10 为抗 FAP/CD40 双特异性抗体 Ab10-A297V3-2、Ab10-A297V3-4 与人未成熟 DC 上 CD40 亲和力流式检测结果。

图 11 为浓度梯度的抗 FAP/CD40 双特异性抗体 Ab10-A12V2-2、Ab10-A12V2-4、Ab10-A297V3-2、Ab10-A297V3-4 在没有 CHOK1/FAP 稳转细胞交联情况下促 DC 成熟作用，使用 LPC、hIgG1、载剂作为对照。

图 12 为浓度梯度的抗 FAP/CD40 双特异性抗体 Ab10-A12V2-2、Ab10-A12V2-4、Ab10-A297V3-2、Ab10-A297V3-4 在 CHOK1/FAP 稳转细胞交联情况下促 DC 成熟作用，使用 LPC、hIgG1、载剂作为对照。

图 13A 为向 mFAP-MC38 荷瘤 hCD40 人源化小鼠注射单剂量抗体 Ab10-A297V3-2 或 Ab10-A297V3-4 后小鼠肿瘤生长曲线；图 13B 为小鼠相应外周血 B 细胞的激活；图 13C 为小鼠相应体重变化曲线；图 13D 为小鼠相应血小板计数的变化；图 13E 为小鼠相应肝功能的影响。

图 14A 为向 mFAP-MC38 荷瘤 hCD40 人源化小鼠注射多剂量抗体 Ab10-A297V3-2 或 Ab10-A297V3-4 后小鼠肿瘤生长曲线；图 14B 为小鼠相应外周血 B 细胞的激活；图 14C 为小鼠相应体重变化曲线；图 14D 为小鼠相应血小板计数的变化；图 14E 为小鼠相应肝功能的影响。

图 15A 为向 mFAP-MC38 荷瘤 hCD40 人源化小鼠注射多剂量抗体 Ab10-A12V2-2 后小鼠肿瘤生长曲线；图 15B 为小鼠相应体重变化曲线；图 15C 为小鼠相应肝功能的影响；图 15D 为小鼠相应血小板计数变化。

图 16A 为向 mFAP-MC38 荷瘤 hCD40 人源化小鼠注射单剂量 Ab10-A12V2-4 后小鼠肿瘤生长曲线；图 16B 为小鼠相应体重变化曲线；图 16C 为小鼠相应肝功能的影响；图 16D 为小鼠相应血小板计数的影响。

图 17 为双特异性抗体 Ab10-A12V2-2 和 Ab10-A297V3-2 的药代动力学比较结果。

其中，图 13A 至图 17 中，除图中另有标识外，P 值均是相对于对照 hIgG1 计算。使用统计学方法 Student’ t-test，其中，ns 是指不具有显著性差异，* 为 $p< 0.05$，** 为 $p< 0.01$，*** 为 $p< 0.001$，****为 $p< 0.0001$。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

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

实施例 1. 抗 FAP 单克隆抗体的筛选和制备

1.1 筛选抗原、检测抗原的序列和制备

人成纤维细胞激活蛋白(FAP; GeneBank 登录号 AAC51668)是一种分子量约为 170 kDa 的丝氨酸寡肽酶，是同源二聚体。本公开使用的重组 FAP 蛋白序列、来源和用途如表 2。

表 2. 重组蛋白氨基酸序列来源

名称	氨基酸序列起止	义翘神州公司货号	用途
h-FAP-biotin	Leu26-Asp760 (GeneBank 登录号 AAC51668)	10464-H07H-B	噬菌体展示液相磁珠筛选
h-FAP-His		10464-H07H	ELISA 筛选阳性克隆
h-FAP-FITC		10464-H07H-F	CHO 细胞表面抗体展示筛选

1.2 从人天然 Fab 噬菌体展示库中筛选 h-FAP 特异性结合抗体片段

以 h-FAP-biotin 抗原为靶分子，采用表面带有亲和素的磁珠捕获抗原特异性噬菌体，并用磁力架进行噬菌体的富集。用 pH2.2 的甘氨酸溶液洗脱抗原特异性噬菌体。

经二轮筛选，随机挑选 284 个克隆，采用噬菌体 ELISA 筛选阳性克隆，包括如下具体步骤：计数铺皿生长菌落，共计 284 个，接种 96 孔板，每孔含有 400 μL 培养液(2YT+Amp+0.2%葡萄糖)，37 ℃下 250 rpm 振摇培养 6h。用抗原 h-FAP-His 包板，100 ng/100 μL/孔，4℃过夜。第二天，洗涤封闭 96 孔板后，每孔加 100 μL 过夜培养的菌液，37 ℃下孵育 1 h，洗涤，加二抗(HRP 标记的抗人 IgG-Fab 的抗体)，37 ℃下孵育 40 min，洗涤，加显色液，避光保存 30 min，酶标仪读取 OD600 数值。测序经两次筛选得到的共计 122 个阳性克隆，得到 74 个独特的 VH(构成了 VH 富集库)、48 个独特的 κ 轻链(构成了 KLC 富集库)和 10 个独特的 λ 轻链(构成了 LLC 富集库)。

1.3 构建 CHO 细胞表面全长抗体展示库

1)构建全长抗体 CHO 细胞展示基因库，包括：用三套引物分别 PCR 扩增 VH 富集库、KLC 富集库和 LLC 富集库。将三个富集库经酶切后插入相应的组件载体，构建相应的组件库。酶切 KLC、LLC、VH 组件库，电泳分析纯化酶切后的 KLC 片段库、LLC 片段库和 VH 片段库。酶切全长抗体细胞展示载体，纯化载体片段。将酶切纯化的载体片段、KLC 片段库、LLC 片段库、VH 片段库混合并连接。纯化连接产物，电转进入大肠杆菌，铺皿，37 ℃培养过夜，计数菌落。经检测，库容达到 3.6×10E6，是理论多样性(74×58 = 4292)的 800 倍以上。收集全部菌落，提取载体 DNA，得到全长抗体细胞展示基因库。

2)构建 h-FAP 抗原特异性全长抗体细胞展示库，包括：用全长抗体细胞展示基因库载体 DNA 转化，构建全长抗体 CHO 细胞展示库。用潮霉素加压筛选细胞库。得到稳定转化细胞库，用 PE 标记的鼠抗人 κ(或者 λ)轻链抗体和 FITC 标记的 h-FAP 抗原双染细胞库，FACS 分选 PE 和 FITC 双阳性细胞，每孔一个细胞，κ 轻链库分选 2 块 96 孔板，λ 轻链库分选 1 块 96 孔板，潮霉素加压培养。

3)FACS 分析鉴定展示 h-FAP 抗原特异性抗体单细胞克隆，包括：潮霉素加压培养 14 天，得到稳定转化 κ 链单细胞克隆 153 个，λ 链单细胞克隆 50 个。用 0.5 mM EDTA-PBS 缓冲液消化细胞，用 PE 标记的鼠抗人 κ(或者 λ)轻链抗体和 FITC 标记的 h-FAP 抗原双染单细胞克隆，经 FACS 分析，得到 PE 和 FITC 荧光双阳性单细胞克隆 138 个。

4)克隆抗体基因，包括：通过 FACS 检测分析阳性克隆的亲和力，决定对 45 个克隆进行抗体基因 PCR 扩增。离心收集阳性克隆，弃上清，提取细胞基因组 DNA，PCR 扩增 VH 和 LC，电泳分离扩增片段，测序分析，确定 6 个独特 VH 和 6 个独特 κ，组合可得到 12 个有独特序列的克隆，其中的 4 个克隆的 VH 和 VL 的序列参见表 3。

表 3. h-FAP 抗体 VH 及 VL(KLC 的 κ)氨基酸序列

编号	氨基酸序列	
Ab9	VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDESLTARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)
	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
Ab10	VH	QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)
	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:4)
Ab14	VH	QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTARPYYFYGFDVWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:5)
	VL	EIVLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)
Ab15	VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDESLTARPYYFYGFDVWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:7)
	VL	EIVLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTK

		VEIK (SEQ ID NO:8)

注：下划线为 Kabat 编号规则的 CDR。

本公开还提供 Ab9、Ab10、Ab14、Ab15 的重链全长和轻链全长序列。

> Ab9 重链全长

QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWI
NPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDESLT
ARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：49)

> Ab9 轻链全长

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(S
EQ ID NO：50)

> Ab10 重链全长

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWI
NPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASL
TARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：51)

> Ab10 轻链全长

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(S
EQ ID NO：52)

> Ab14 重链全长

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWI
NPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASL
TARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：53)

> Ab14 轻链全长

EIVLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ
ID NO：54)

> Ab15 重链全长

QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWI
NPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDESLT
ARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：55)

> Ab15 轻链全长

EIVLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKSLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ
ID NO：56)

表 4. 抗 FAP 抗体的 CDR

编号	VH 的 CDR		VL 的 CDR	
Ab9	HCDR1	DHFIH (SEQ ID NO:9)	LCDR1	RASQGISSWLA (SEQ ID NO:12)
	HCDR2	WINPNRGVTHHAQDFQG (SEQ ID NO:10)	LCDR2	AASSLQ (SEQ ID NO:13)
	HCDR3	DESLTARPYYFYGFDV (SEQ ID NO:11)	LCDR3	QQANSFPPA (SEQ ID NO:14)
Ab10	HCDR1	SEQ ID NO:9	LCDR1	SEQ ID NO:12
	HCDR2	SEQ ID NO:10	LCDR2	SEQ ID NO:13
	HCDR3	DASLTARPYYFYGFDV (SEQ ID NO:15)	LCDR3	SEQ ID NO:14

Ab14	HCDR1	SEQ ID NO:9	LCDR1	SEQ ID NO:12
	HCDR2	SEQ ID NO:10	LCDR2	SEQ ID NO:13
	HCDR3	SEQ ID NO:15	LCDR3	QQANSFPLT (SEQ ID NO:16)
Ab15	HCDR1	SEQ ID NO:9	LCDR1	SEQ ID NO:12
	HCDR2	SEQ ID NO:10	LCDR2	SEQ ID NO:13
	HCDR3	SEQ ID NO:11	LCDR3	QQANSFPPT (SEQ ID NO:17)

也即，上述抗 FAP 抗体有如下通式结构：

HCDR1 均为 SEQ ID NO:9；

HCDR2 均为 SEQ ID NO:10；

HCDR3 均为 $DX_1SLTARPYYFYGFDV$ (SEQ ID NO:18)，其中，X_1 为 E 或 A；

LCDR1 均为 SEQ ID NO:12；

LCDR2 均为 SEQ ID NO:13；

LCDR3 均为 $QQANSFPX_2X_3$ (SEQ ID NO:19)，其中，X_2 为 P 或 L，X_3 为 A 或 T。

1.4 构建 CHO 细胞表面全长抗体展示库

1)构建可溶性抗体表达载体，包括：分别酶切纯化具有独特序列阳性 VH 片段和 LC 片段。将 VH 片段插入可溶性重链表达载体(IgG1)，将 LC 片段插入可溶性轻链表达载体，送菌落测序确定并提取 DNA。

2)表达纯化可溶性抗体，包括：悬浮培养扩增 Expi293 细胞。按上述确定的轻重链配对，轻链表达载体 18 μg，重链表达载体 12 μg 的比例混合。将载体 DNA 与 PEI 以重量比 1：2.5 的比例混合，转化 Expi293 细胞，第六天收集培养液上清，Protein-A 法纯化抗体。SDS-PAGE 变性凝胶电泳分析，抗体纯度均达到 90%以上，-80 ℃保存。

1.5 ELISA 结合测试

直接包被带 His 标签的 FAP 重组蛋白，加入抗体后，通过加入二抗(HRP 偶联的抗人 IgG 的抗体)和 HRP 底物 TMB 检测抗体与抗原结合的活性。包括：用人 FAP-His 蛋白包被 96 孔酶标板，按 0.5 μg/mL 浓度每孔 100 μL，4℃孵育过夜。充分洗涤，加入 200 μL/孔封闭液室温孵育 2h。充分洗涤，每孔加入 100 μL用稀释液稀释好的抗 FAP 待测抗体。室温孵育 1h，充分洗涤，每孔加入 100 μL用稀释液按 1：20000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG 二抗。室温孵育 1h，充分洗涤，每孔加入 100 μL TMB，避光反应 15min。加入 50 μL/孔的 0.16 M 硫酸。Thermo MultiSkanFc 酶标仪读取 450 nm OD 值，计算抗 FAP 抗体的结合 EC_{50} 值，结果见表 5。

表 5. 抗 FAP 抗体与人 FAP 抗原结合的亲和力 EC_{50} 值

编号	EC_{50} (mg/ mL)

Ab9	0.1014
Ab10	0.0920
Ab14	0.4168
Ab15	0.3206

1.6 表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)结合测试

选用 CM5 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。抗人 IgG (Fc) 抗体用 10 mM 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)配制成 30 μg/mL 溶液，进行氨基偶联固定。用 HBS-EP+缓冲溶液配制各待测抗体，通过芯片通道上的抗人 IgG (Fc) 抗体进行捕获。用 HBS-EP+缓冲溶液配制 h-FAP-His 作为分析物，2 倍梯度稀释。将稀释好的抗体在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合 1min，解离 15min。用 10 mM Glycine pH1.5 作为再生缓冲液，10 μL/min 的流速下运行 30 秒。分析数据，表 6 结果显示，与对照抗 FAP 抗体 28H1(专利 US9266938B2 的序列 219 和序列 233)相比较，Ab9、Ab10、Ab14、Ab15 与抗原 FAP 的亲和力要高 3-6 倍，最高的 Ab15 亲和力 K_D 达到 $2.15x10^{-10}$。而本公开同步筛选获得的其它抗 FAP 抗体，例如 Ab2、Ab4、Ab5(序列未出示)与抗原结合亲和力则低于 28H1。

表 6. 抗 FAP 抗体的 SPR 亲和力 Ka、Kd 及 K_D 值

编号	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	28H1 的 K_D 与待测抗体的 K_D 的比值	28H1 的 K_d 与待测抗体的 K_d 的比值
28H1	1.95E+05	2.55E-04	1.31E-09	1	1
Ab2	1.62E+06	1.62E-02	9.98E-09	0.1	0.02
Ab4	1.51E+06	6.17E-03	4.09E-09	0.3	0.04
Ab5	1.08E+06	3.57E-03	3.32E-09	0.4	0.07
Ab9	2.35E+05	7.19E-05	3.06E-10	4.3	3.54
Ab10	2.97E+05	7.28E-05	2.45E-10	5.3	3.50
Ab14	3.32E+05	1.21E-04	3.65E-10	3.6	2.10
Ab15	4.88E+05	1.05E-04	2.15E-10	6.1	2.43

其中，对照抗体 28H1 的重链轻链可变区序列如下：

>28H1 的 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIW ASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFD YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO：20)

> 28H1 的 VL

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO：21)

1.7 FACS 结合测试

用 FACS 实验检测抗 FAP 抗体在细胞上的结合特性。包括：构建过表达人 FAP

的 CHO 细胞系，铺板(1E5/孔)。加入待测抗体，100 μL/孔，最高浓度为 100 nM，5 倍稀释，共 8 个浓度，4℃孵育 1h。加入抗 hIgG Alexa Fluor-647 作为二抗，按 1:500 比例 4℃孵育 30min，利用 FACS 进行检测。能结合 FAP 的抗体可以标记细胞。被标记的过表达人 FAP 的细胞的数量占所有细胞的百分比与抗体浓度之间的关系如图 1 所示，人 FAP 与抗体的结合 EC_{50} 值参见表 7；被标记的过表达小鼠 FAP 的细胞的数量占所有细胞百分比与抗体浓度之间的关系如图 2 所示。

表 7. 抗 FAP 抗体与人 FAP 抗原结合的亲和力 EC_{50} 值

抗体编号	EC_{50} (μg/ mL)
28H1	0.0007839
Ab9	0.0003684
Ab10	0.0004320
Ab14	0.0004738
Ab15	0.0004858
同种型 (NC)	-

实施例 2. 抗 CD40 纳米抗体(VHH)的筛选和制备

2.1 免疫抗原，筛选抗原的序列和制备

选择带 His 标签的人 CD40 重组蛋白(h-CD40-His)，C 端生物素标签的人 CD40 重组蛋白(h-CD40-biotin)，C 端带 His 标签的猴 CD40 重组蛋白(cyno-CD40-His)。序列和来源见表 8。所述蛋白试剂可用于下述各实施例实验中。

表 8. 重组蛋白氨基酸序列及来源

名称	氨基酸序列起止	Acrobiosystems 公司货号
h-CD40-His	Glu21-Arg193	CD0-H5228
h-CD40-biotin		CD0-H82E8
cyno-CD40-His		CD0-C52H6

2.2 羊驼免疫流程及效价检测

用 h-CD40-his 免疫羊驼，每两周免疫一次，共免疫四次。首次免疫时，将 0.5 mg 抗原与弗氏完全佐剂(CFA)1 mL 混匀皮下注射，后三次免疫将 0.25mg 抗原与弗氏不完全佐剂(IFA)1 mL 混匀皮下注射。免疫前采集空白血清，第 3 次免疫后一周和第 4 次免疫后一周分别采 50 mL 外周血分离淋巴细胞，检测血清效价。

2.3 效价检测及噬菌体文库构建

羊驼经四次免疫后检测血清效价。效价合格后，分离 PBMC，提取总 RNA，检测纯度，反转录为 DNA，两轮巢式 PCR 后将纯化载体与 VHH 目的片段酶切连接。电转，挑选克隆，获得噬菌体文库 A 库和 B 库。

2.4 噬菌体文库亲和淘选及 ELISA 鉴定

以 h-CD40 抗原为靶分子，采用 Gly-HCL 酸洗脱方法进行筛选，洗脱特异噬菌体。经二轮筛选，从第一、二轮滴度测定平板随机挑选 384 个克隆，采用噬菌

体 ELISA 筛选阳性克隆，检测 450 nm 下光密度。根据测序结果，对序列进行序列比对和进化树分析，筛选出 16 条序列，其中两个功能较好的抗 CD40 抗体的氨基酸序列见表 9 和表 10。

表 9. 抗 CD40 单域抗体序列

编号	氨基酸序列
A12	EVQVVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGPEWVS TILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCLRVD WSDYSPRGQGTQVTVSA (SEQ ID NO:22)
A297	QVQLVESGGGMVEPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGPEWVST INSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAQNTVYLQMNSLKPEDTALYYCLRIDYS DYSSRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:23)

注:下划线为 Kabat 编号规则下的 CDR。

表 10. 抗 CD40 抗体的 CDR

编号	CDR 序列	
Ab12	CDR1	NYGMK (SEQ ID NO:24)
	CDR2	TILSQGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:25)
	CDR3	VDWSDYSP (SEQ ID NO:26)
Ab297	CDR1	RYGMK (SEQ ID NO:27)
	CDR2	TINSHGDTTYYADSVKG (SEQ ID NO:28)
	CDR3	IDYSDYSS (SEQ ID NO:29)

2.5 抗 CD40 单域抗体-Fc 融合蛋白的表达纯化

将以上 2 条 VHH 分别与含有 N297A 突变的人 IgG1-Fc 进行连接，连接后的 VHH-Fc 融合蛋白序列见表 11。下划线为人 IgG1-Fc，加粗为 N297A 突变。

采用 9E5-SELFNS 作为 CD40 激动剂阳性对照(参见 WO2020108611A1 的序列 58 和序列 59)。

表 11. 抗 CD40 单域抗体与人 IgG1-Fc 的融合蛋白序列

编号	氨基酸序列
A12-Fc	EVQVVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGPEW VSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCL RVDWSDYSPRGQGTQVTVSAEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK(SEQ ID NO：30)
A297-Fc	QVQLVESGGGMVEPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGPEW VSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAQNTVYLQMNSLKPEDTALYYC LRIDYSDYSSRGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

	EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK(SEQ ID NO：31)

构建质粒，瞬时转染细胞，表达抗体，并纯化。经检测，获得目的抗体。

2.6 FACS 结合测试

用 FACS 实验检测抗 CD40 抗体在细胞上的结合特性。包括：获得 Raji 单细胞，铺板。加入待测抗体，100 μL/孔，最高浓度点为 100 nM，5 倍稀释，获得共 8 个梯度点，4℃孵育 1h。加入抗 hIgG Alexa Fluor-647 作为二抗，按 1:500 比例 4℃孵育 30min。FACS 检测。使用 CD40 激动剂为阳性对照，各抗体 EC_{50} 见图 3 及表 12。

表 12. 抗 CD40 抗体与人 CD40 抗原结合的亲和力 EC_{50} 值

编号	EC_{50}(nM)
A12	0.3657
A297	0.5293
9E5-SELFNS	0.1961

对于用做 FAP/CD40 双特异性抗体中的 CD40 激动性抗体而言，其对 CD40 的亲和力 EC_{50} 不宜太高，否则会导致双特异性抗体优先结合 CD40，更期望的是，双特异性抗体优先结合 FAP，进而发挥作用。因此，A12 和 A297 具有更符合以上特性的优势，这在表 13 中也有所体现。

2.7 抗 CD40 纳米抗体的活性检测

检测抗 CD40 抗体对 CD40 报告基因细胞的活化作用，根据 EC_{50} 评价 CD40 抗体的激动剂活性。包括：制备 HEK-Blue™CD40L 细胞(购自 Invivogen Cat# hkb-cd40，该细胞稳定转染了人 CD40 基因和 NF-κB 介导的 SEAP 基因组，可以通过 SEAP 底物 QUANTI-Blue 检测上清中分泌的 SEAP 含量来表征 CD40 信号通路的活化水平)，培养基为含 10% FBS、100 μg/mL Normocin、100 μg/mL Zeocin 和 30 pg/mL Blasticidin 的 DMEM。将细胞以 5E4/孔铺入 96 孔板，培养基为含 10% FBS 和 100 μg/mL Normocin 的 DMEM，培养过夜，细胞贴壁后，每孔加入 100 μL 梯度稀释的待测抗体，37℃过夜培养。将细胞离心，转移细胞上清到一个新 96 孔板中，加入 180 μL QUANTI-Blue 底物溶液，避光孵育 15 分钟，用 Envision 酶标仪测定在 620 nm 处的吸光度，计算 EC_{50} 值。使用 CD40 激动剂(9E5-SELFNS)为阳性对照，相对激动活性百分比(与 200 nM 9E5-SELFNS 相比)与抗体浓度之间的关系 EC_{50} 见图 4 和表 13。

表 13. 抗 CD40 抗体的激动活性 EC_{50} 值及其与阳性对照的相对激活活性百分比%

编号	EC_{50}(nM)	最大响应(相对 200 nM 9E5-SELFNS 的百分比)
A12	0.231	51.76
A297	0.556	84.15

9E5-SELFNS	0.466	102.55
IgG1	不激活	不激活

2.8 抗 CD40 纳米抗体的人源化

根据以上结果，将 A12、A297 进行人源化。在所获得的纳米抗体 A12 和 A297 的 VHH 典型结构的基础上，将 VHH 可变区序列与抗体种系数据库比较，获得同源性高的人种系模板。本公开抗体 A12 和 A297 优选人种系模板均为 IGHV3-48*03。再把 CDR 移植到人 FR 中，对影响抗体结构和功能的关键氨基酸进行回复突变，以恢复结合力和活性。各人源化序列如表 14 所示。

表 14. 抗 CD40 人源化抗体序列

名称		氨基酸序列
A12	V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARVDWSDYSPRGQGTMVTVSS(SEQ ID NO：32)
	V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSS(SEQ ID NO：33)
	V3:	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSS(SEQ ID NO：34)
A297	V1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARIDYSDYSSRGQGTMVTVSS(SEQ ID NO：35)
	V2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRIDYSDYSSRGQGTMVTVSS(SEQ ID NO：36)
	V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTLVTVSS(SEQ ID NO：37)
	V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCLKIDYSDYSSRGQGTLVTVSS(SEQ ID NO：38)

也即，本公开的抗 CD40 纳米抗体有如下通式结构：

CDR1 为 X_4YGMK (SEQ ID NO:39)，其中，X_4 为 N 或 R；

CDR2 为 TIX_5SX_6GX_7X_8TYYADSVKG (SEQ ID NO:40)，其中，X_5 为 N 或 L，X_6 为 Q 或 H，X_7 为 G 或 D，X_8 为 S 或 T；

CDR3 为 X_9D X_{10}SDYSX_{11} (SEQ ID NO:41)，其中，X_9 为 V 或 I，X_{10} 为 W 或 Y，X_{11} 为 P 或 S。

将以上7条VHH分别连入含有S267E/L328F突变(根据EU编号)的人IgG1-Fc。连接后的VHH-Fc融合蛋白序列见表15。下划线为人IgG1-Fc，加粗为S267E/L328F突变。

表15. 人源化抗CD40单域抗体与人IgG1-Fc(S267E/L328F)的融合蛋白序列

编号	氨基酸序列
A12V1-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLE WVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALY YCARVDWSDYSPRGQGTMVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：57)
A12V2-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLE WVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALY YCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：58)
A12V3-Fc	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLE WVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：59)
A297V1-Fc	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLE WVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCARIDYSDYSSRGQGTMVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：60)
A297V2-Fc	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLE WVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCLRIDYSDYSSRGQGTMVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIE

	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：61)
A297V3-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLE WVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCLRIDYSDYSSRGQGTLVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：62)
A297V4-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLE WVSTINSHGDSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCLKIDYSDYSSRGQGTLVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO：63)

将以上 7 条 VHH-Fc 瞬时转染细胞并表达，纯化抗体。经检测，获得目标抗体蛋白。

2.9 人源化 CD40 抗体对 CD40 高表达细胞株的亲和力

采用 FACS 检测人源化抗体与高表达人抗原蛋白 CD40 的细胞的结合能力。用 CD40 质粒(CD40 cDNA ORF Clone, Human, C-DYKDDDDK(Flag®)Tag；Sino Biological；HG10774-CF)瞬时转染 HEK293 细胞，获得高表达 CD40 的 HEK293 细胞，用流式染色液(PBS+2% FBS)重悬，加入梯度稀释后的不同浓度的待检测抗体。冰上孵育 1h 后，PBS 洗涤，400 g 离心 5min。加入带有荧光基团 Alexa Fluor 647 标记的羊抗人 Fc 抗体作为二抗，冰浴染色 1h，PBS 清洗两遍后用 FACS 检测细胞表面的荧光信号。结果如图 5A 和 5B 所示，EC_{50} 值见表 16。本公开人源化抗体对 CD40 高表达细胞株均有较高的亲和力。

表16. 各人源化抗CD40抗体与人CD40高表达细胞株的亲和力EC_{50}值

抗体	EC_{50}(nM)	Emax MFI
A12	1.09	17256
A12_V1	2.13	16608
A12_V2	0.42	16609
A12_V3	1.74	16909
A297	1.12	16728
A297_V1	1.11	7300
A297_V2	1.07	12764
A297_V3	1.25	12827

A297_V4	2.70	8255
9E5-SELFNS	1.12	12120

2.10 人源化 CD40 抗体对 HEK-Blue™ CD40L 细胞的活化作用

通过检测 CD40 抗体在被 FcγRIIb 交联的情况下对 HEK-Blue™CD40L 细胞的活化作用来评价 CD40 抗体的体外激动活性。人源化 CD40 抗体的 Fc 中带有的 S267E/L328F 突变，增强了 IgG1 Fc 与 FcγRIIb 的亲合力，因此也增强了 FcγRIIb 对抗体的交联。通过 FcγRIIb 介导的 CD40 抗体对 HEK-Blue™ CD40L 细胞的活化作用模拟了 CD40 抗体在被完全交联的情况下的激动剂活性。用 FcγRIIb 质粒 (CD32B/Fcgr2b cDNA ORF Clone, Human, N-His tag; Sino Biological; HG10259-NH) 瞬时转染 HEK293 细胞，获得高表达 FcγRIIb 的 HEK293 细胞。将 HEK-Blue™CD40L 细胞以 5E4/孔铺入 96 孔细胞培养板(培养基为 DMEM，10% FBS，100μg/mL Normocin)，加入 5E4/孔表达 FcγRIIb 的 HEK293 细胞, 每孔加入 100 μL 梯度稀释的待测抗体，37℃过夜培养。将细胞离心，转移 20 μL 细胞上清到一个新 96 孔板中，加入 180 μL QUANTI-Blue 底物溶液，避光孵育 30min，用 Envision 酶标仪测定在 620 nm 处的吸光度，计算 EC_{50} 值以及 Emax 值(相对无抗体组荧光强度)，以 EC_{50} 值来评价 CD40 抗体的体外细胞激动剂活性。

CD40 抗体通过 FcγRIIb 介导的 HEK-Blue™CD40L 细胞的活化作用如图 6A、6B 所示, EC_{50} 值及 Emax 值(相对荧光强度) 见表 17。

结果显示，在上述报告基因细胞体系下，人源化 CD40 抗体在被 FcγRIIb 交联的情况下，人源化 CD40 抗体的激动剂活性均较强。

表 17. 各人源化抗 CD40 抗体对 HEK-Blue™CD40L 细胞的活化作用

抗体	FcγRIIb 介导的 HEK-Blue™CD40L 细胞的激活	
	EC_{50}(nM)	Emax(相对荧光强度)
A12	0.231	9.68
A12_V1	0.009	21.61
A12_V2	0.002	18.57
A12_V3	0.011	19.08
A297	0.243	17.34
A297-V1	0.021	18.37
A297-V2	0.005	19.99
A297_V3	0.006	12.84
A297_V4	0.038	13.31
9E5-SELFNS	0.009	16.05

实施例 3. 抗 FAP/CD40 双特异性抗体的设计和制备

3.1 抗 FAP/CD40 双特异性抗体的设计及表达纯化

根据人源化后的抗 CD40 抗体筛选结果，选择 A12V2 和 A297V3；根据抗 FAP

抗体的筛选结果，选择 Ab10，进行抗 FAP/CD40 双特异性抗体的构建。双特异性抗体采用 Ab10 为 IgG 骨架，在 Ab10 的两条重链的 C 端各串联 1 个或 2 个或 3 个抗 CD40 纳米抗体。CD40 纳米抗体之间以及与 Ab10 重链 C 端的连接子采用“GGGGSGGGGS”。每个双特异性抗体分别含有 2 价、4 价和 6 价的 CD40 纳米抗体，如图 7 所示。对于抗体名称，例如，对于 Ab10-A12V2-2，Ab10 代表采用的抗 FAP 抗体，A12V2 代表采用的人源化抗 CD40 抗体，最后的 2 代表 CD40 的价数为 2 价。其它抗体均采用该命名规则。瞬时转染与表达、纯化抗体采用实施例 2 的 2.5 中方法。经检测，获得目的双特异性抗体分子。各双特异性抗体分子氨基酸序列如下。

> Ab10-A12V2-2 的重链

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWI
NPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASL
TARPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGG
LVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADS
VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTV
SS (SEQ ID NO：42)

> Ab10-A12V2-2 的轻链

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO：43)

> Ab10-A12V2-4 的重链

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTA
RPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFT

ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSS*GGGGS*
*GGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEW
VSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDW
SDYSPRGQGTQVTVSS(SEQ ID NO：44)

> Ab10-A12V2-6 的重链

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTA
RPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSS*GGGGS*
*GGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEW
VSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDW
SDYSPRGQGTQVTVSS*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL
QMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSS(SEQ ID NO：45)

> Ab10-A297V3-2 的重链

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTA
RPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTLVTVSS(SEQ ID
NO：46)

> Ab10-A297V3-4 的重链

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTA
RPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTLVTVSS*GGGGSG*
*GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWV
STINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYS
DYSSRGQGTLVTVSS(SEQ ID NO：47)

> Ab10-A297V3-6 的重链

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTA
RPYYFYGFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTLVTVSS*GGGGSG*
*GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWV
STINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYS
DYSSRGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF
SRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTLVTVSS(SEQ ID NO：48)

Ab10-A12V2-4 、 Ab10-A12V2-6 、 Ab10-A297V3-2 、 Ab10-A297V3-4 、Ab10-A297V3-6 的轻链均为 SEQ ID NO：43 所示。

注：重链的下划线为 CH1 和 Fc 区，轻链的下划线为 CL 区，斜体为连接子，加粗为 LALA(L234A 和 L235A 突变)。

3.2 抗 FAP/CD40 双特异性抗体的抗原结合亲和力检测

采用 SPR(GE Healthcare；Biacore 8K)检测抗 FAP/CD40 双特异性抗体与其抗原人 FAP 蛋白(Acro 公司，FAP-H5244)、人 CD40 蛋白(Acro 公司，CD0-H5228)之间的亲和力。选用 CM5 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。将抗人 IgG (Fc) 抗体通过氨基偶联固定。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，通过芯片通道上的抗人 IgG (Fc) 抗体进行捕获。不同种属的抗原蛋白作为分析物。结果见表 18、表 19，显示制备成双特异性抗体后，不影响抗体与 FAP 的结合，且双特异性抗体对 CD40 的亲和力更低，将优先结合 FAP，进而发挥作用。

表 18. 抗 FAP/CD40 双特异性抗体与人 FAP 的亲和力

抗体	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Ab10	2.17E+05	7.39E-05	3.40E-10
Ab10-A12V2-4	1.75E+05	5.14E-05	2.94E-10
Ab10-A297V3-2	2.03E+05	8.22E-05	4.05E-10
Ab10-A297V3-4	1.84E+05	6.96E-05	3.78E-10

表 19. 抗 FAP/CD40 双特异性抗体与人 CD40 的亲和力

抗体	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
9E5-SELFNS	6.04E+06	6.70E-03	1.11E-09
Ab10-A12V2-4	6.90E+04	2.00E-03	2.90E-08
Ab10-A297V3-2	2.09E+05	2.94E-02	1.41E-07
Ab10-A297V3-4	5.24E+05	1.37E-01	2.62E-07

3.3 抗 FAP/CD40 双特异性抗体对高表达 FAP 细胞株的亲和力检测

本实验通过 FACS 检测抗 FAP/CD40 双特异性抗体对高表达人 FAP、食蟹猴 FAP 和小鼠 FAP 的 CHOK1 细胞稳转株的结合情况。显示双特异性抗体能结合人、小鼠、食蟹猴的细胞表面 FAP 抗原，且结合能力与单抗相类似，参见图 8A-8C，EC_{50} 值见表 20。

表 20. 抗 FAP/CD40 双特异性抗体与人、鼠细胞表面 FAP 抗原结合的 EC_{50} **值**

抗体	人 FAP		小鼠 FAP		食蟹猴 FAP	
	EC_{50}(nM)	Emax(MFI)	EC_{50}(nM)	Emax(MFI)	EC_{50}(nM)	Emax(MFI)
Ab10-A12V2-2	2.72	74010	4.32	19541	5.65	44985
Ab10-A12V2-4	2.57	64905	4.43	18967	2.26	43150
Ab10-A297V3-2	2.51	65204	0.79	12633	1.09	28178
Ab10-A297V3-4	1.57	53835	1.65	12747	1.35	32480
Ab10	1.41	71968	10.41	26381	7.34	64618

3.4 抗 FAP/CD40 双特异性抗体对高表达 CD40 细胞株的亲和力检测

利用 FACS 检测双特异性抗体对于细胞表面 CD40 的结合情况，包括高表达人 CD40 的 HEK-BlueTMCD40L 细胞(Invivogen, Cat#hkb-cd40)，瞬转食蟹猴 CD40 质粒(Sino Biological, cat# CG90970-UT)使其高表达食蟹猴 CD40 的 HEK293 细胞。结果显示，双特异性抗体能够结合人和食蟹猴的细胞膜表面 CD40。详见图 9A、9B，图 11 和表 21。

表 21. 双特异性抗体与人细胞表面 CD40 抗原结合的 EC_{50} **值**

抗体	人 CD40		食蟹猴 CD40	
	EC_{50}(nM)	Emax(MFI)	EC_{50}(nM)	Emax(MFI)
Ab10-A12V2-2	2.40	7570	2.76	6614
Ab10-A12V2-4	0.79	4635	3.24	6545
Ab10-A297V3-2	1.66	6254	1.31	4927
Ab10-A297V3-4	0.94	5085	0.88	5124

3.5 人源化抗 FAP/CD40 双特异性抗体 FAP 依赖性促 DC 成熟活性检测

为了验证抗 FAP/CD40 双特异性抗体对树突状细胞成熟的影响，利用 CD14 阳性磁珠从新鲜 PBMC 中分离单核细胞，用含 50 ng/mL 的 GM-CSF 和 50 ng/mL 的 hIL-4 的 1640 培养基培养 5 天。每 2-3 天半数换液，第 5 天将诱导成的树突状细胞以 1E5/孔的密度加入 96 孔板中，再分别加入处于对期生长的 CHOK1 和过表达人 FAP 的 CHOK1 细胞。同时加入梯度稀释好的待测抗体，1 μg/mL LPS 作为阳性对照，100 nM hIgG1 和无抗体组作为阴性对照。培养 48h 后，用 FACS 检测树突状细胞表面分子 CD83 的表达。

如图 11(无 CHOK1/FAP)和图 12(有 CHOK1/FAP)，结果显示，2 价分子 Ab10-A12V2-2 和 Ab10-A297V3-2 在没有 CHOK1/FAP 情况下不能活化 DC，其 CD40 激动剂活性完全依赖于 FAP 介导的交联(crosslink)。而 4 价分子 Ab10-A12V2-4 和 Ab10-A297V3-4 在没有 CHOK1/FAP 细胞存在情况下能进够诱导 DC 细胞的成熟，在有 CHOK1/FAP 存在的情况下，DC 细胞的激活能进一步增强。因此，无论对于 2 价分子和 4 价分子而言，树突细胞表面表达的 FAP 均能提供双特异性抗体的激活窗口。

实施例 4. 抗 FAP/CD40 双特异性抗体 Ab10-A297V3-2/4 的小鼠体内药效

B-hCD40 人源化小鼠来自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司(种属 Mus musc μLus，品系 C57BL/6，雌性)。在小鼠肠癌 MC38 细胞中转染小鼠全长 FAP 质粒，构建稳转株，接种细胞 5×10^5/0.1mL/只于小鼠右腋皮下，当平均肿瘤体积长至 80-100 mm^3 时，挑选个体肿瘤体积合适的小鼠，随机分组，每组 6 只。小鼠腹腔注射给药，每周两次，首次给药 48h 后抽取外周血检测 B 细胞数目及细胞表面 CD86 表达，分组后第 8 天检测血液中的谷丙转氨酶 ALT (Alanine Aminotransferase) 和谷草转氨酶 AST(Aspartate aminotransferase)浓度。给药 4 次后停止给药，直至 hIgG1 对照组有小鼠肿瘤体积超过 2000mm^3 给药最后一次，最后一次给药 24h 后检测血常规。

4.1 Ab10-A297V3-2 或 Ab10-A297V3-4 单剂量小鼠体内药效及毒性

在单一剂量的情况下比较了 Ab10-A297V3-2 或 Ab10-A297V3-4 与 CD40 激动剂单抗 9E5-mIgG1 的抗肿瘤活性。9E5-mIgG1 与 9E5-SELFNS 具有相同的可变区，只是重、轻链恒定区采用小鼠 mIgG1 重链的恒定区以及小鼠 kappa 链的恒定区。由于 CD40 激动剂单抗的活性依赖于 FcγRIIb 对其 Fc 的交联，因此采用了小鼠 IgG1 重链恒定区的 9E5-mIgG1 可以更好地在小鼠体内展示 CD40 的激动剂活性。在小鼠体内药效实验中，9E5-mIgG1 是比 9E5-SELFNS 更好的对照抗体。

Ab10-A297V3-4 抗肿瘤活性无论是从 TGI(Tumor growth inhibition，肿瘤生长抑制)还是 CR(Complete Response，完全响应)的角度上，均强于同摩尔剂量的 CD40 单抗 9E5-mIgG1，序列如下：

>9E5-mIgG1 重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYILTTYWITWVRQAPGQGLEWMGDIH
PGSGSTKYNEKFKSRVTLTVDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCARRDYWGQGT
TVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS
GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG
CKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV
EVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS
KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN
YKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSH
SPGK (SEQ ID NO：64)

>9E5-mIgG1 轻链

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VTNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASLVPWTFGGGTKV
EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGV
LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
(SEQ ID NO：65)

两倍摩尔浓度下的 Ab10-A297V3-2 的抗肿瘤活性依然弱于 Ab10-A297V3-4，与 9E5-mIgG1 相当。

通过检测小鼠外周血 B 淋巴细胞的激活来检测双特异性抗体分子对于外周 CD40 的激活，结果与体外实验一致。Ab10-A297V3-4 由于具有部分不依赖于 FAP 的 CD40 激活活性，所以能部分激活外周 B 淋巴细胞，而 Ab10-A297V3-2 由于对 CD40 的激活完全依赖于 FAP，所以未检测到显著的外周 B 细胞的激活(One-Way ANOVA)。所测抗体信息如表 22，体内药效结果如图 13A(各组抗体相对 hIgG1 对照组均 $P<0.0001$)和图 13B。

表 22. 所测试抗体信息

药物	浓度	分子量(kDa)	给药剂量
hIgG1	14.17 mg/ mL	150	3 mg/kg
Ab10-A297V3-2	2.95 mg/ mL	174	6.96 mg/kg
Ab10-A297V3-4	3 mg/ mL	200.03	4 mg/kg
9E5-mIgG1	4.4 mg/ mL	150	3 mg/kg

从小鼠毒性上来看，Ab10-A297V3-2 和 Ab10-A297V3-4 都未产生小鼠体重上的变化，参见图 13C。

从血常规的检测来看，与同摩尔剂量 hIgG1 对照组相比，9E5-mIgG1 能引发一定程度的血小板下降，与肝毒性相类似；Ab10-A297V3-2 没有引发血小板下降；Ab10-A297V3-4 能引发与 9E5-mIgG1 同等程度的血小板下降，参见图 13D。Ab10-A297V3-2/4 的小鼠体内给药剂量和肿瘤生长抑制率统计详见表 23。

其中，TGI 的计算公式为：

TGI=(空白组当天肿瘤体积-给药当天组肿瘤体积)/(空白组当天肿瘤体

积)*100%

表 23. Ab10-A297V3-2 或 4 的小鼠体内给药剂量和肿瘤生长抑制率

抗体编号	给药量 (mpk)	TGI
hIgG1	3	-
Ab10-A297V3-2	6.96 (二倍摩尔剂量)	54.6%
Ab10-A297V3-4	4 (等摩尔剂量)	96.4%
9E5-mIgG1	3	59.2%

从 ALT 和 AST 的检测中可以看出，9E5-mIgG1 通过 CD32B(即 FcγRIIB)介导的交联，在给药后第 8 天显示出一定的肝毒性。Ab10-A297V3-4 由于具有一定的本底激活，所以也具有一定的肝毒性，但是由于其激活不依赖于 CD32B，所以肝毒性低于 9E5-mIgG1；Ab10-A297V3-2 由于依赖 FAP 才能激活 CD40，因此完全没有肝毒性，参见图 13E。

4.2 Ab10-A297V3-2 或 Ab10-A297V3-4 多剂量小鼠体内药效和毒性

为了摸索 Ab10-A297V3-2 或 4 的治疗窗，进一步提高了 Ab10-A297V3-2 的剂量，并降低了 Ab10-A297V3-4 分子的剂量，详见表 24。当继续升高 2 价 Ab10-A297V3-2 分子的给药剂量时，其抗肿瘤活性并能没有得到进一步的提高，也没有观测到外周 B 淋巴细胞的激活。降低 Ab10-A297V3-4 的给药剂量至 1.3 mg/kg (即 9E5-mIgG1 的 1/3 摩尔剂量)时，其仍有 92.6%的 TGI，远远好于 9E5-mIgG1。

为了在体内实验中评估 4 价 CD40 双特异性抗体中 FAP 抗体的作用，比较了 Ab10-A297V3-4 和另一个没有 FAP 结合功能的 4 价 CD40 双特异性抗体(同种型-A297V3-4)的抗肿瘤活性。同种型-A297V3-4 与 Ab10-A297V3-4 的构造完全一致，除了将抗 FAP 部分的 Ab10 替换为另一个不结合任何鼠源蛋白的同种型抗体。

图 14A-14E 的结果显示，4 价 CD40 双特异性抗体即使不结合 FAP 就有较好的抗肿瘤活性，而结合 FAP 则抗肿瘤活性更强。从毒性上来看，Ab10-A297V3-2 提高剂量后仍未见体重、ALT/AST 以及血小板数目的异常，而对于 Ab10-A297V3-4，在降低剂量后，之前在高剂量下观测到的 ALT/AST 以及血小板数目上的异常消失了，而仍保留了很强的抗肿瘤效果($P<0.0001$)，说明对比 CD40 单抗 9E5-mIgG1,无论是 Ab10-A297V3-2 和 Ab10-A297V3-4 都具有更宽的治疗窗。抗体信息见表 24， Ab10-A297V3-2 或 Ab10-A297V3-4 多剂量体内药效统计数据见表 25。

表 24. 所测试抗体信息

药物	浓度	分子量(kDa)	给药量
hIgG1	14.17 mg/ mL	150	3 mg/kg

Ab10-A297V3-2	2 mg/ mL	174	6.96 mg/kg
Ab10-A297V3-2			13.92 mg/kg
Ab10-A297V3-4	2 mg/ mL	200.03	4 mg/kg
Ab10-A297V3-4			1.3 mg/kg
同种型-A297V3-4	3.44 mg/ mL	200.03	1.3 mg/kg
9E5-mIgG1	4.79 mg/ mL	150	3 mg/kg

表 25. Ab10-A297V3-2/4 多剂量体内药效统计

药物	给药量 (mg/kg)	TGI	CR 比率(<100mm^3)
hIgG1	3	-	0%
Ab10-A297V3-2	6.96 (二倍摩尔剂量)	32.8%	0%
Ab10-A297V3-2	13.92 (四倍摩尔剂量)	46.9%	0%
Ab10-A297V3-4	4 (等摩尔剂量)	101.6%	100%
Ab10-A297V3-4	1.3 (1/3 摩尔剂量)	92.6%	33%
同种型-A297V3-4	1.3 (1/3 摩尔剂量)	79.3%	0%
9E5-mIgG1	3	59.2%	0%

4.3 Ab10-A12V2-2 多剂量小鼠体内药效和毒性

参见图 15A-15D 和表 26，Ab10-A12V2-2 与 Ab10-A297V3-2 具有相似的小鼠体内药理学特征(两个剂量与 hIgG1 对照组相比，均为 P<0.0001)，从抗肿瘤活性上优于 9E5-mIgG1。升高剂量不能进一步提高其抗肿瘤活性，但是没有 ALT/AST 的升高及血小板的下降，显示其更宽的治疗窗和更低的副作用。

表 26. 所测试抗体信息及 TGI

药物	浓度	分子量(kDa)	给药量	TGI
hIgG1	14.17 mg/ mL	150	3 mg/kg	-
Ab10-A12V2-2	2 mg/ mL	174	6.96 mg/kg	81.8%
Ab10-A12V2-2			13.92 mg/kg	70.9%
9E5-mIgG1	4.79 mg/ mL	150	3 mg/kg	59.2%

4.4 Ab10-A12V2-4 单剂量小鼠体内药效和毒性

与前类似地，本实施例探索 Ab10-A12V2-4 单剂量小鼠药效及毒性。Ab10-A12V2-4 与 hIgG1 对照组相比，Ab10-A12V2-4 组 P<0.0001，从抗肿瘤活性上优于 9E5-mIgG1，且没有 ALT/AST 的升高及血小板的下降，参见表 27 和图 16A-16D。

表 27. 所测试抗体信息及 TGI

药物	浓度	分子量(kDa)	给药量	TGI
hIgG1	14.17 mg/	150	3 mg/kg	-

	mL			
Ab10-A12V2-4	3 mg/ mL	200.03	4 mg/kg	88.3%
9E5-mIgG1	4.4 mg/ mL	150	3 mg/kg	59.2%

4.5 抗 FAP/CD40 双特异性抗体药代动力学检测

本公开在 mFAP-MC38 荷瘤 hCD40 人源化小鼠中，从三个不同方向比较了抗 FAP/CD40 双特异性抗体的药代动力学特征。分别通过静脉注射的方式给予不同浓度的抗体，然后在不同时间点取血，通过检测小鼠血液中人 Fc 的含量来分析每个抗体分子的血药浓度/时间曲线。

用 PBS 稀释抗人 IgG-Fc 抗体至 1.5 μg/ mL, 用此抗体包板，每孔 100 μL, 4°C 过夜。去除溶液，每孔加入 200 μL PBST 洗三次，弃去 PBST 后每孔加 100 μL 1%BSA，37℃封闭 2h。去除溶液，每孔加入 200 μL PBST 洗三次后每孔加入 50 μL 稀释后的抗体或者血清样品(均用 1%BSA PBS 稀释，血清分别 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍稀释)，37℃孵育 1h。去除溶液，每孔加入 200 μL PBST 洗三次后每孔加入 50 μL HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc 二抗 (1%BSA PBS 稀释，1:20000)，37℃孵育 20min。去除溶液，每孔加入 200 μL PBST 洗五次后每孔加入 50μL TMB 显色，观察到抗体有梯度颜色反应后，每孔加入 50 μL ELISA 终止液。Envision 上机读值 OD450，取血清 OD450 读值在抗体标准曲线线性范围内的数值换算浓度后作图分析 PK 曲线。

结果见图 17，比较了 Ab10-A297V3-2 和 Ab10-A12V2-2 分子在 13.92mg/kg 给药剂量下的药代动力学特征。结果发现两个分子的药代动力学特征类似，因此，本公开双特异性抗体的药代动力学特征不因 CD40 抗体的序列不同而变化。

权利要求书：

1. FAP/CD40 结合分子，其包含特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域和特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域，所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其中：

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、18 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、19 所示的氨基酸序列；

优选地，

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、15 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、14 所示的氨基酸序列；

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、14 所示的氨基酸序列；

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、15 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、16 所示的氨基酸序列；或

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、17 所示的氨基酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的 FAP/CD40 结合分子，其中所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的氨基酸序列；

优选地，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:24、25、26 所示的氨基酸序列；或所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:27、28、29 所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 FAP/CD40 结合分子，其中所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域中：

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：3 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：4 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：1 所示或与之具有至少 90%同一性的氨

基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：5 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：6 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：7 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：8 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的 FAP/CD40 结合分子，其中所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：22、23、32 至 38 任一所示或与 SEQ ID NO：22、23、32 至 38 任一具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求 2 至 4 任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，其中，特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域包含 2、3、4、5 或 6 个所述免疫球蛋白单一可变结构域。

6. 如权利要求 2 至 5 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，其中所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区，其中，

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的重链可变区的 N 端；

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的重链可变区的 C 端；

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的轻链可变区的 N 端；和/或

所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域的轻链可变区的 C 端。

7. 如权利要求 2 至 6 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，其中，特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域与特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域直接或通过连接子相连接；

优选地，所述连接子为具有如$(G_4S)_x$所示的氨基酸序列，其中，x 独立地选自 1-20 的整数；

更优选地，所述连接子为$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$或$(G_4S)_4$所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，其还包含人免疫

球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述人 IgG1 具有去除或降低 Fc 效应器功能的突变；

最优选地，所述人 IgG1 具有选自 N297A、D265A/N297A、L234A/L235A、L234A/L235A/P329G、L234E、L234F、L234E/L235F 和 L234E/L235F/P329G 的突变。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，所述特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域包含重链和轻链：

优选地，所述重链为 IgG1 或 IgG4 同种型，所述轻链为 Kappa 同种型；

更优选地，所述重链为 SEQ ID NO：51 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：52 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链为 SEQ ID NO：49 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：50 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链为 SEQ ID NO：53 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；或

所述重链为 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：56 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO：42、44-48 中任一所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，第二多肽链包含如 SEQ ID NO：43 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

优选地，所述 FAP/CD40 结合分子中含有两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。

11. FAP 结合分子，包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其中：

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、18 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、19 所示的氨基酸序列；

优选地，

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、15 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、14 所

示的氨基酸序列；

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、11 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、14 所示的氨基酸序列；

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、15 所示的氨基酸序列；所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、16 所示的氨基酸序列；或

所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:9、10、11 所示的氨基酸序列； LCDR1、LCDR2、LCDR3 分别包含如 SEQ ID NO:12、13、17 所示的氨基酸序列。

12. 如权利要求 11 所述的 FAP 结合分子，其中，

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：3 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：4 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：1 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：2 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：5 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：6 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：7 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：8 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的 FAP 结合分子，其还包含人免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述人 IgG1 具有去除或降低 Fc 效应器功能的突变；

最优选地，所述人 IgG1 具有选自 N297A、D265A/N297A、L234A/L235A、L234A/L235A/P329G、L234E、L234F、L234E/L235F 和 L234E/L235F/P329G 的突变。

14. 如权利要求 11 至 13 中任一项所述的 FAP 结合分子，其包含重链和轻链，其中：

所述重链为 SEQ ID NO：51 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：52 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链为 SEQ ID NO：49 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：50 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；

所述重链为 SEQ ID NO：53 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列；或

所述重链为 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述轻链为 SEQ ID NO：56 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

15. 如权利要求 11 至 14 中任一项所述的 FAP 结合分子，其为抗 FAP 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述抗 FAP 抗体或其抗原结合片段选自：双或多特异性抗体、scFv、scFv 二聚体、dsFv、(dsFv)2、dsFv-dsFv'、Fv 片段、Fab、Fab'或 F(ab')2；

优选地，所述抗 FAP 抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

16. CD40 结合分子，其包含结合 CD40 的免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的氨基酸序列；

优选地，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:24、25、26 所示的氨基酸序列；或，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:27、28、29 所示的氨基酸序列。

17. 如权利要求 16 所述的 CD40 结合分子，其包含 SEQ ID NO:22、23、32 至 38 中任一所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

18. 如权利要求 16 或 17 所述的 CD40 结合分子，其还包含人免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述人 IgG1 的 Fc 区具有能够增加与 FcγRIIb 亲和力和/或减弱 ADCC 效应的突变；

最优选地，所述人 IgG1 的 Fc 区具有选自 S267E/L328F、L234A/L235A、N297A、L234F、L235E、L234F/L235E/D265A、L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S、和 E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R 中的突变。

19. 如权利要求 16 至 18 中任一项所述的 CD40 结合分子，其包含如 SEQ ID NO：57 至 63 中任一所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

20. 如权利要求 16 至 19 任一项所述的 CD40 结合分子，其为抗 CD40 抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段选自线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体、结构域抗体和多特异性抗体；

优选地，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合片段为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

21. FAP/CD40 结合分子，其包含特异性结合 FAP 的第一抗原结合结构域和特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域，所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的氨基酸序列；

优选地，所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:24、25、26 所示的氨基酸序列；或所述 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO:27、28、29 所示的氨基酸序列。

22. 如权利要求 21 所述的 FAP/CD40 结合分子，其中所述特异性结合 CD40 的第二抗原结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：22、23、32 至 38 任一所示或与 SEQ ID NO：22、23、32 至 38 任一具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

23. 如权利要求 1 至 10 和 21 至 22 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子，其为抗 FAP/CD40 双特异性抗体。

24. 多核苷酸，其编码权利要求 1 至 10 和 21 至 23 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子、权利要求 11 至 15 中任一项所述的 FAP 结合分子、或权利要求 16 至 20 中任一项所述的 CD40 结合分子。

25. 载体，其含有权利要求 24 所述的多核苷酸。

26. 宿主细胞，其含有或表达权利要求 24 所述的多核苷酸或权利要求 25 所述的载体。

27. 药物组合物，其含有权利要求 1 至 10 和 21 至 23 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子、权利要求 11 至 15 中任一项所述的 FAP 结合分子、或权利要求 16 至 20 中任一项所述的 CD40 结合分子，以及至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

28. 权利要求 1 至 10 和 21 至 23 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子、权利要求 11 至 15 中任一项所述的 FAP 结合分子、权利要求 16 至 20 中任一项所述的 CD40 结合分子、权利要求 24 所述的多核苷酸、或权利要求 27 所述的药物组合物在制备治疗或缓解疾病或病症的药物中的用途；

所述疾病或病症优选为肿瘤或癌症；

更优选为肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症。

29. 治疗或缓解肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：

向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 10 和 21 至 23 中任一项所述的 FAP/CD40 结合分子、权利要求 11 至 15 中任一项所述的 FAP 结合分子、权利要求 16 至 20 中任一项所述的 CD40 结合分子、权利要求 24 所述的多核苷酸、或权利要求 27 所述的药物组合物；

所述肿瘤或癌症优选为肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症。

说明书附图：

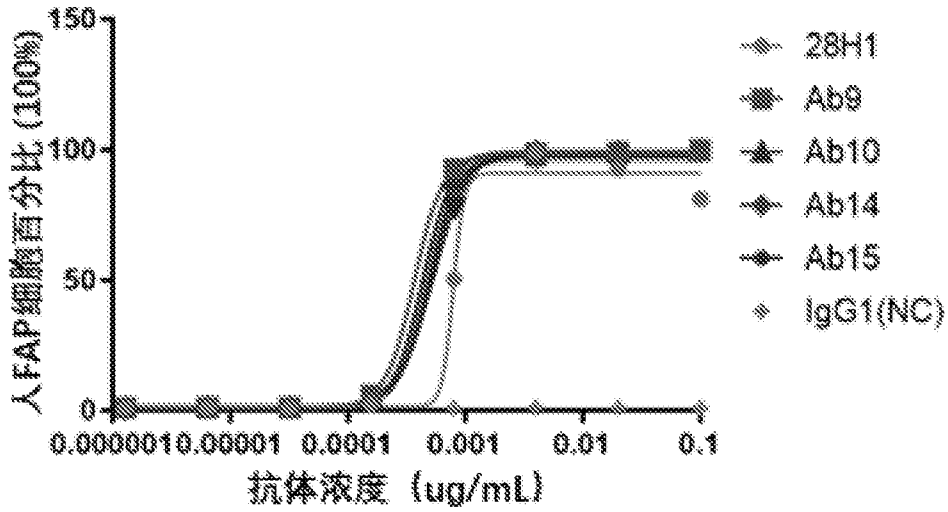

人FAP细胞百分比（100%）
150
100
50
0
0.0000010.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1
抗体浓度（ug/mL）
28H1
Ab9
Ab10
Ab14
Ab15
IgG1(NC)

图 1

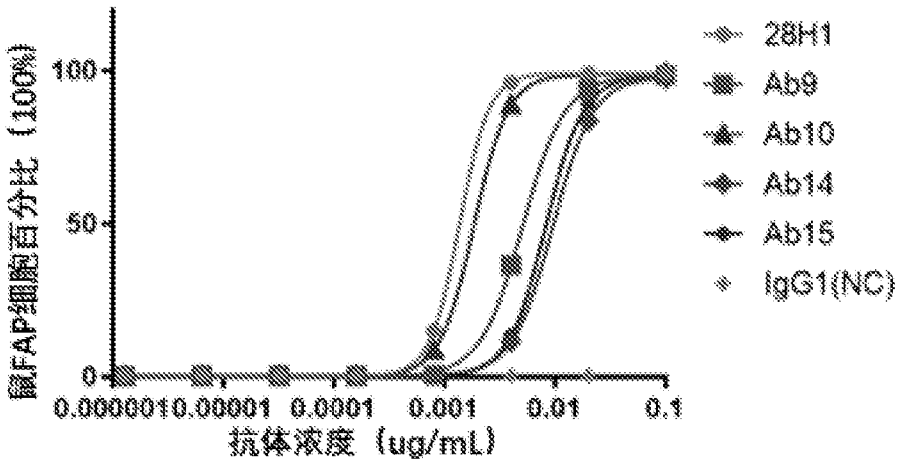

鼠FAP细胞百分比（100%）
100
50
0
0.0000010.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1
抗体浓度（ug/mL）
28H1
Ab9
Ab10
Ab14
Ab15
IgG1(NC)

图 2

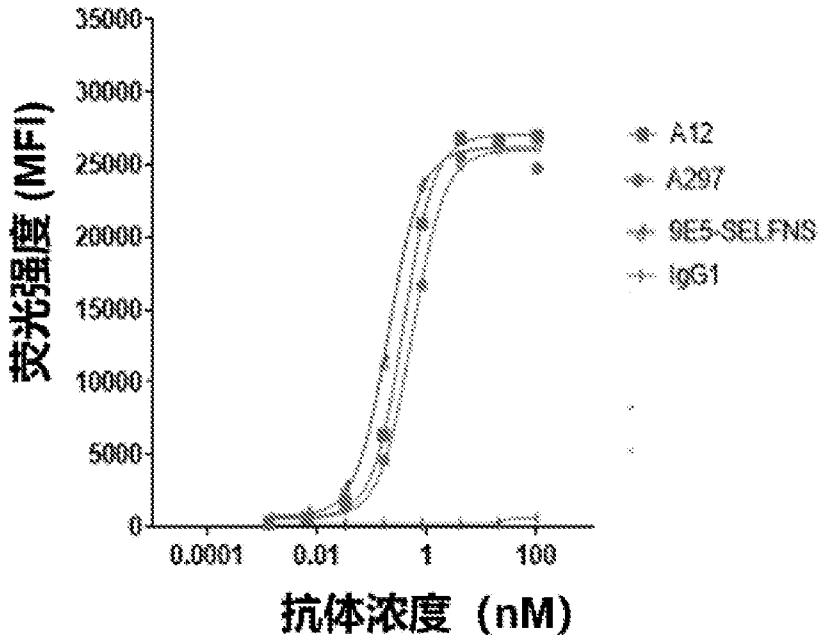

荧光强度 (MFI)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度（nM）
A12
A297
9E5-SELFNS
IgG1

图 3

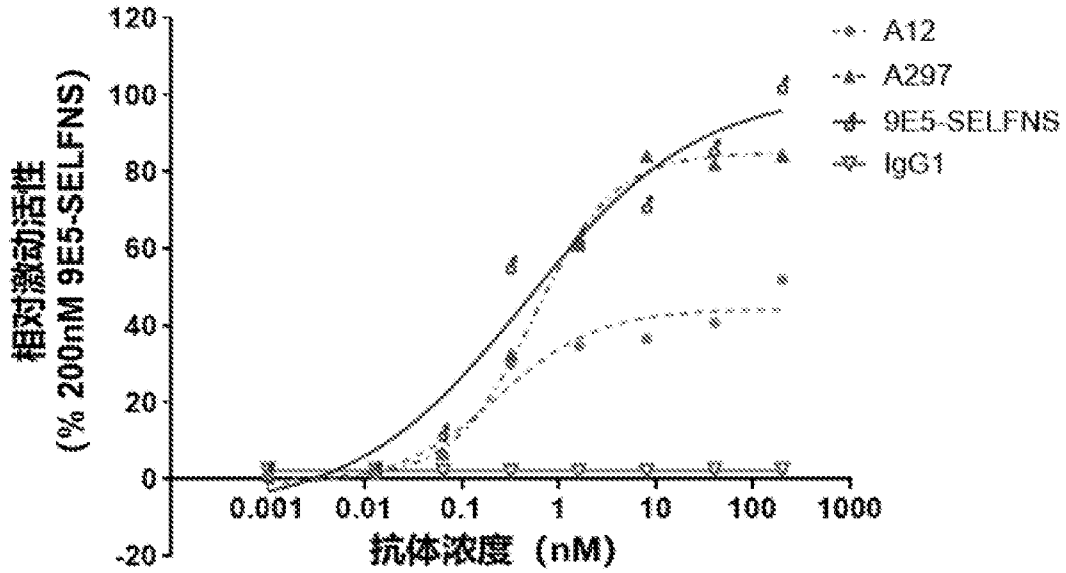

相对激动活性
(% 200nM 9E5-SELFNS)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度（nM）
A12
A297
9E5-SELFNS
IgG1

图 4

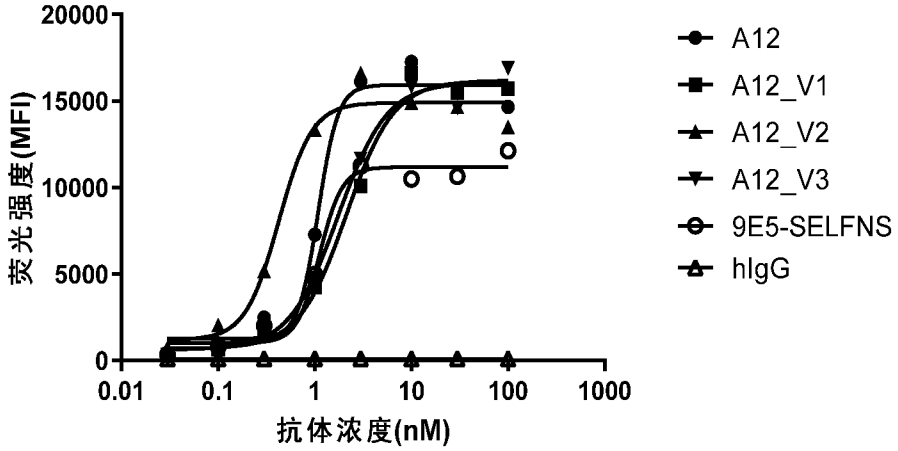

20000
15000
10000
5000
0
荧光强度(MFI)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
A12
A12_V1
A12_V2
A12_V3
9E5-SELFNS
hIgG

图 5A

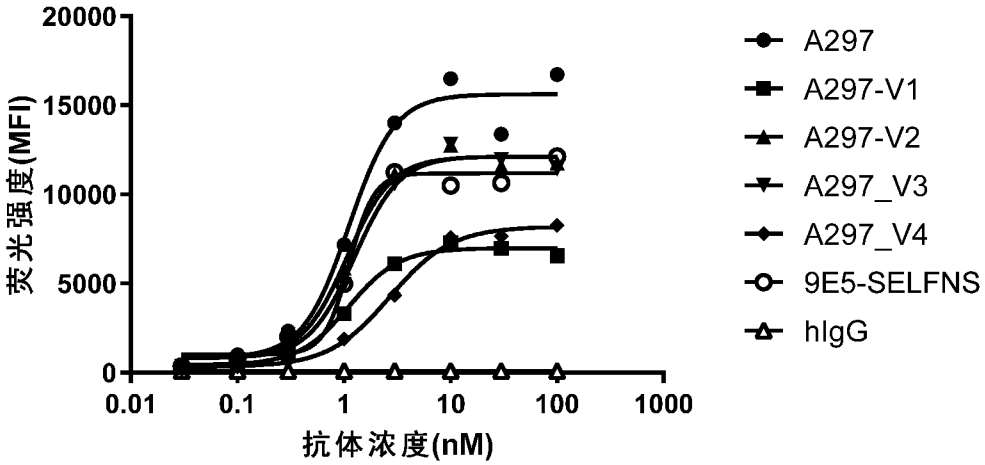

20000
15000
10000
5000
0
荧光强度(MFI)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
A297
A297-V1
A297-V2
A297_V3
A297_V4
9E5-SELFNS
hIgG

图 5B

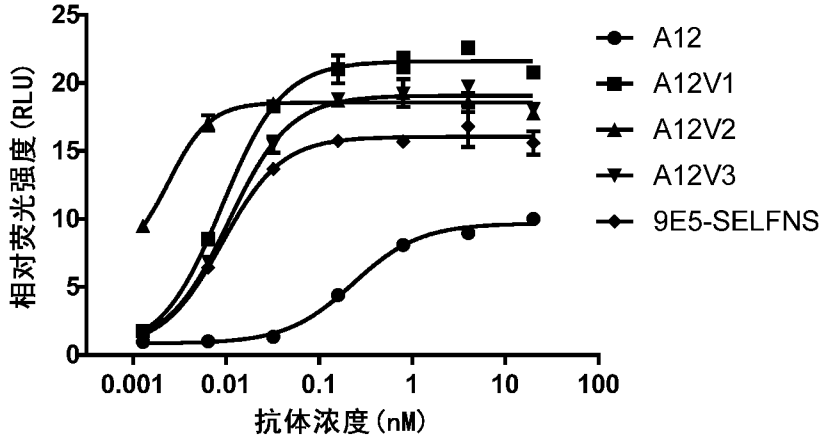

25
20
15
10
5
0
相对荧光强度 (RLU)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度 (nM)
A12
A12V1
A12V2
A12V3
9E5-SELFNS

图 6A

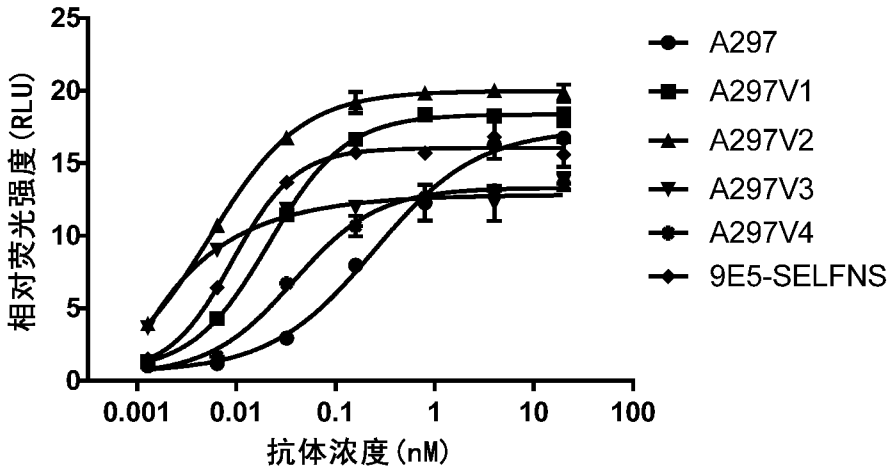

25
20
15
10
5
0
相对荧光强度 (RLU)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度 (nM)
A297
A297V1
A297V2
A297V3
A297V4
9E5-SELFNS

图 6B

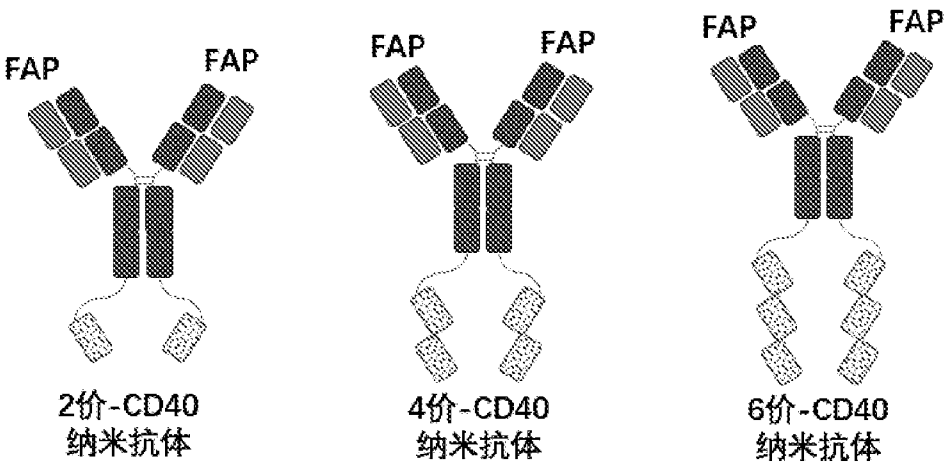

FAP
FAP
2价-CD40
纳米抗体
FAP
FAP
4价-CD40
纳米抗体
FAP
FAP
6价-CD40
纳米抗体

图 7

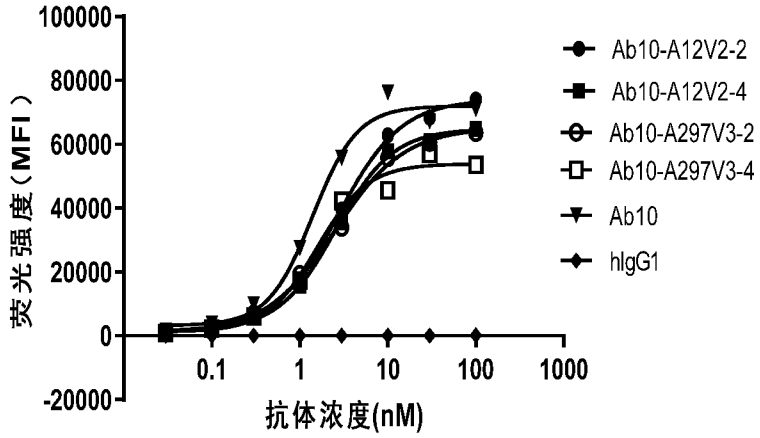

100000
80000
60000
40000
20000
0
-20000
荧光强度（MFI）
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4
Ab10
hIgG1

图 8A

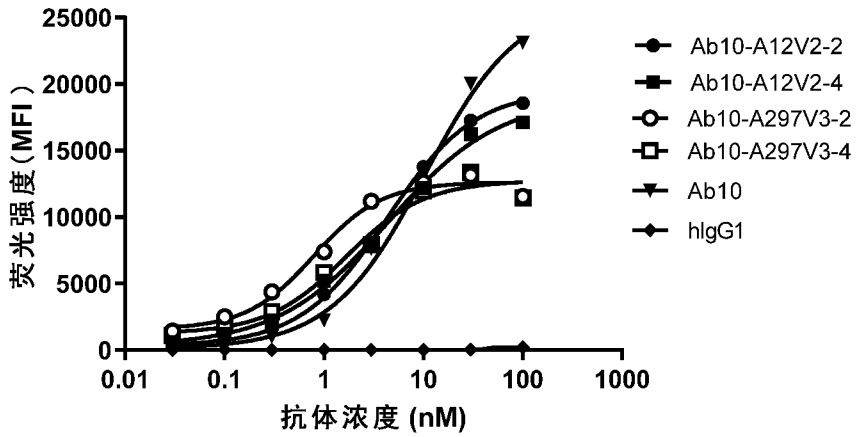

25000
20000
15000
10000
5000
0
荧光强度（MFI）
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (nM)
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4
Ab10
hIgG1

图 8B

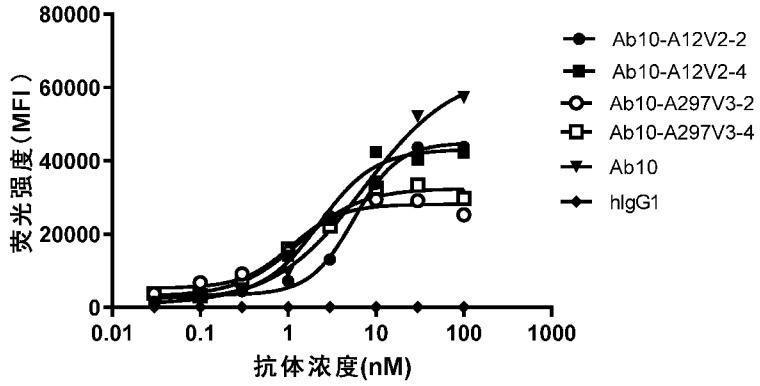

80000
60000
40000
20000
0
荧光强度（MFI）
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4
Ab10
hIgG1

图 8C

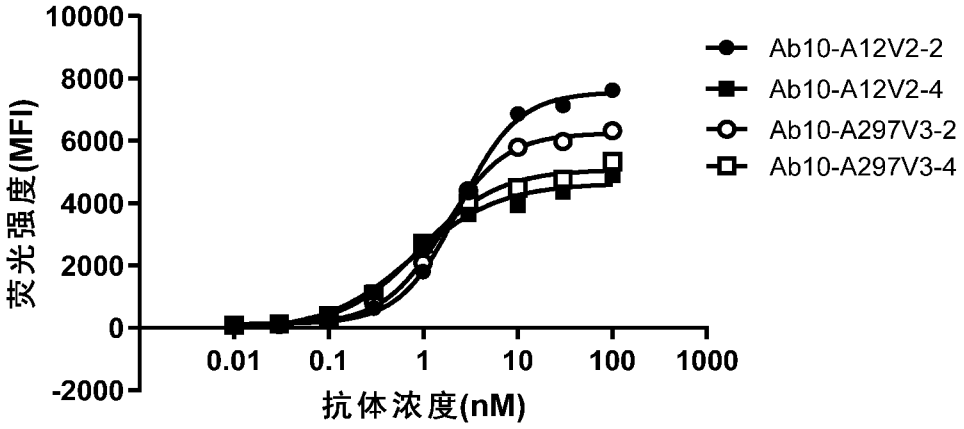

10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
荧光强度(MFI)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4

图 9A

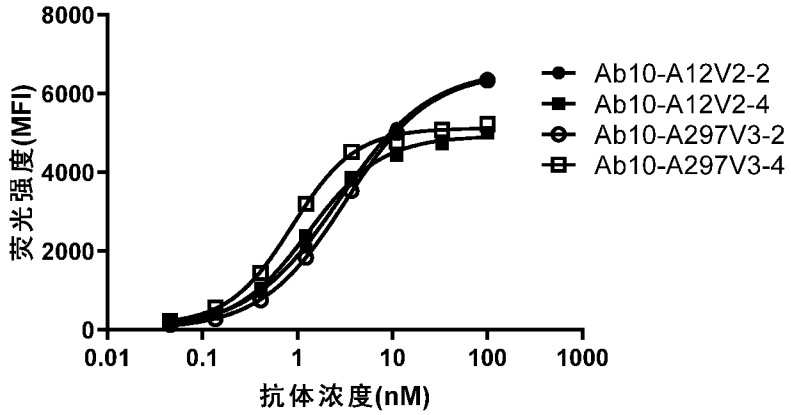

8000
6000
4000
2000
0
荧光强度(MFI)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4

图 9B

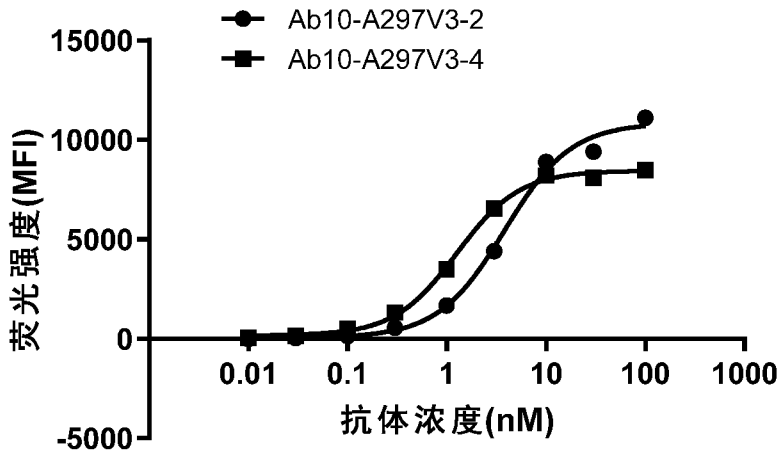

15000
10000
5000
0
-5000
荧光强度(MFI)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4

图 10

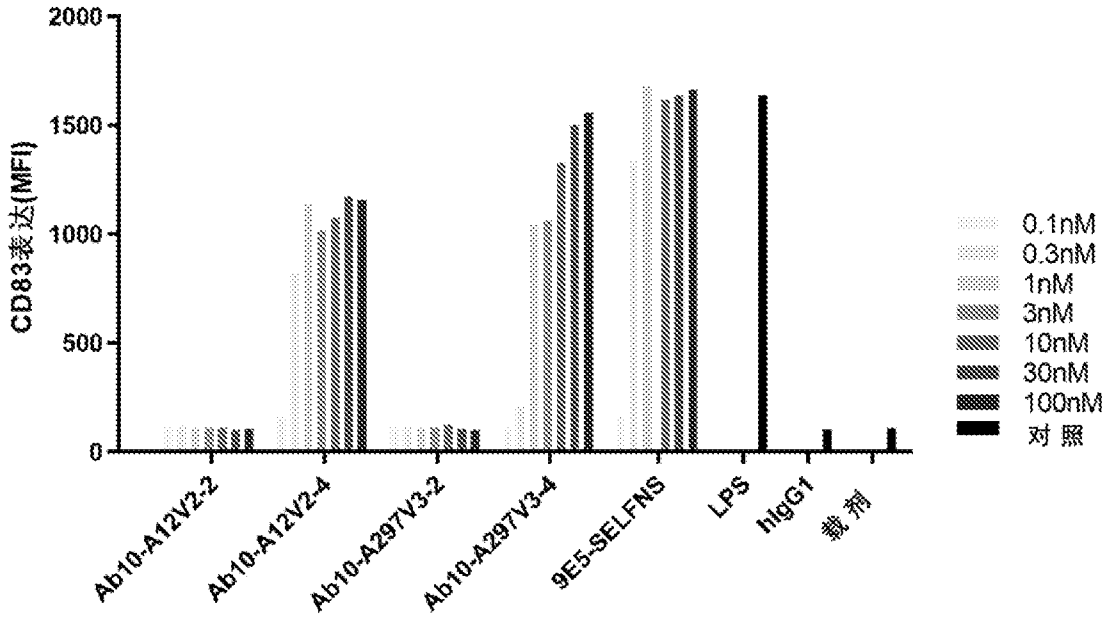

CD83表达(MFI)
2000
1500
1000
500
0
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4
9E5-SELFNS
LPS
hIgG1
载剂
0.1nM
0.3nM
1nM
3nM
10nM
30nM
100nM
对照

图 11

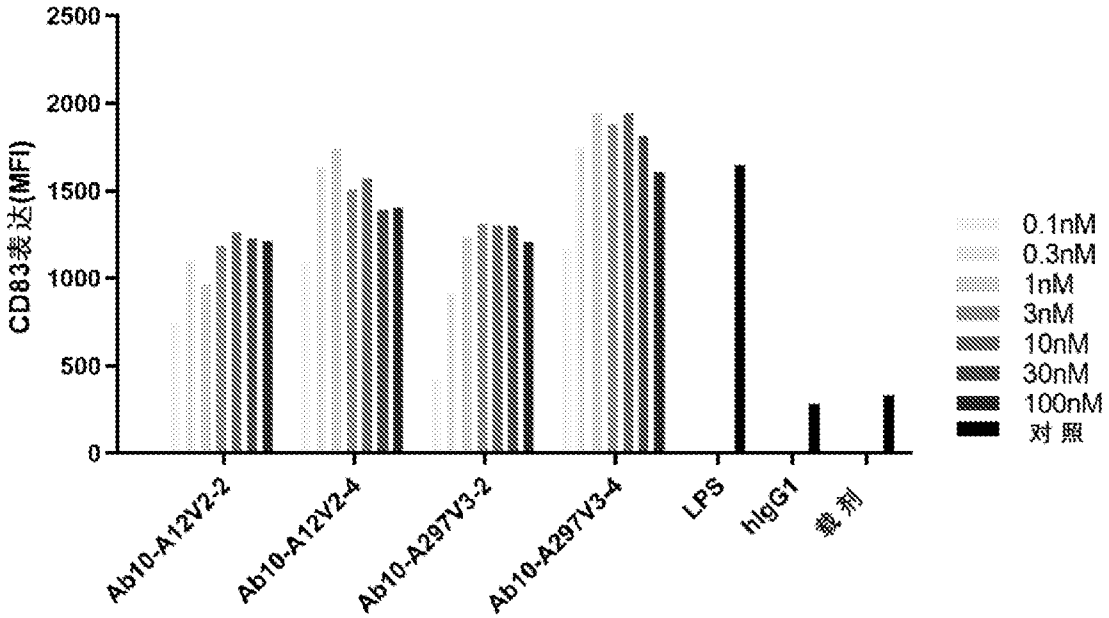

CD83表达(MFI)
2500
2000
1500
1000
500
0
Ab10-A12V2-2
Ab10-A12V2-4
Ab10-A297V3-2
Ab10-A297V3-4
LPS
hIgG1
载剂
0.1nM
0.3nM
1nM
3nM
10nM
30nM
100nM
对照

图 12

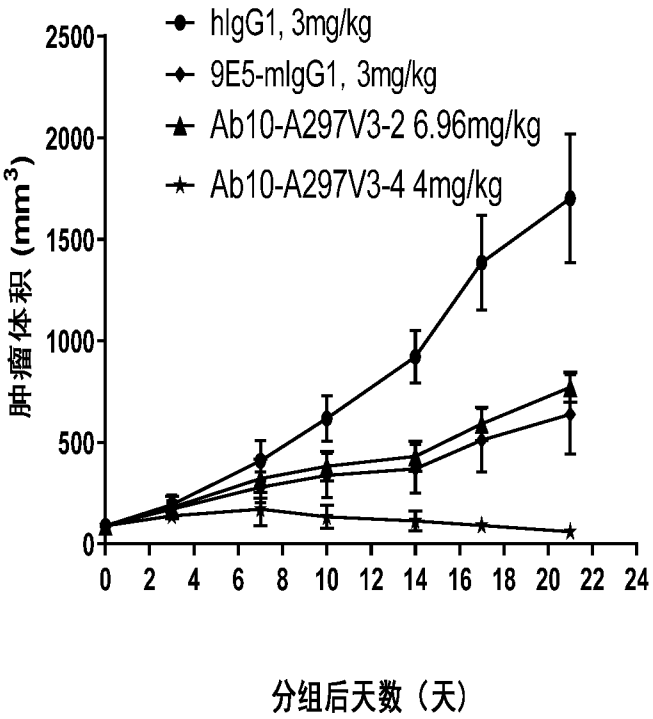

hIgG1, 3mg/kg
9E5-mIgG1, 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
分组后天数（天）

图 13A

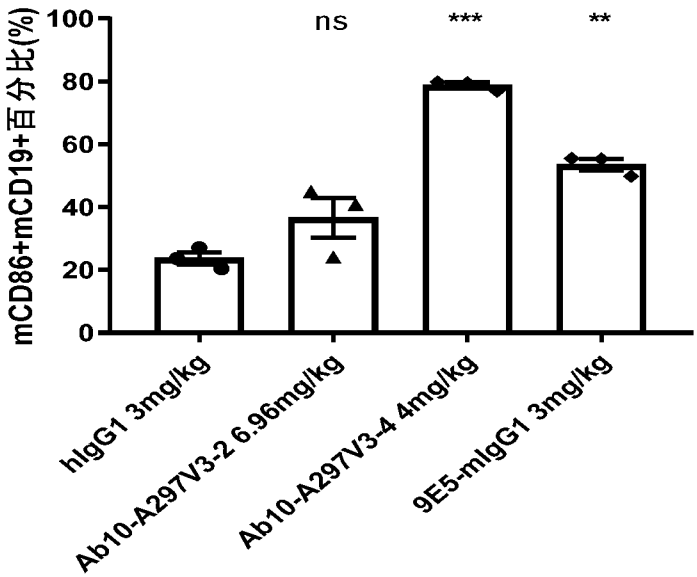

mCD86+mCD19+百分比(%)
100
80
60
40
20
0
ns
***
**
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 13B

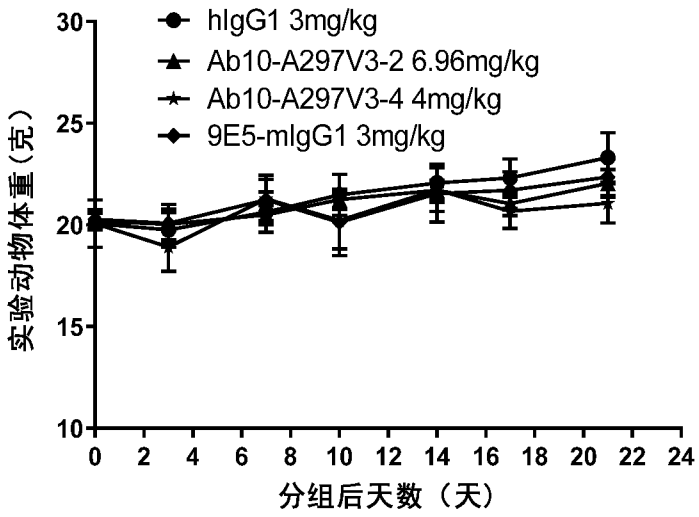

hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg
实验动物体重（克）
分组后天数（天）
30
25
20
15
10
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24

图 13C

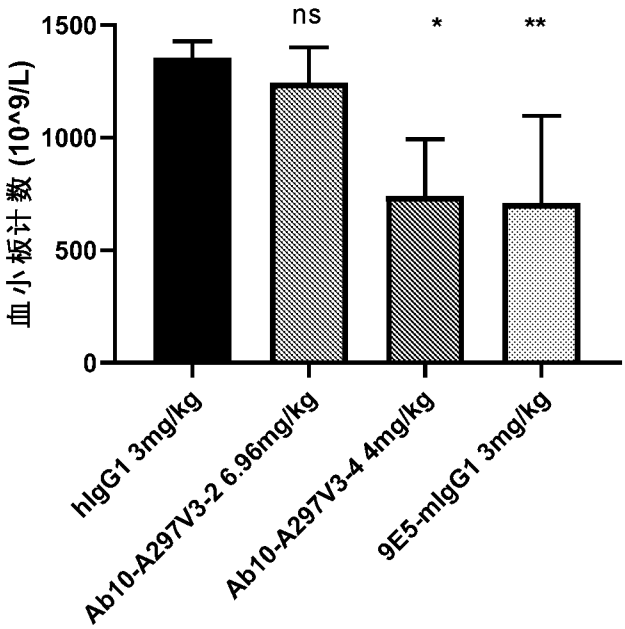

血小板计数 (10^9/L)
1500
1000
500
0
ns
*
**
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 13D

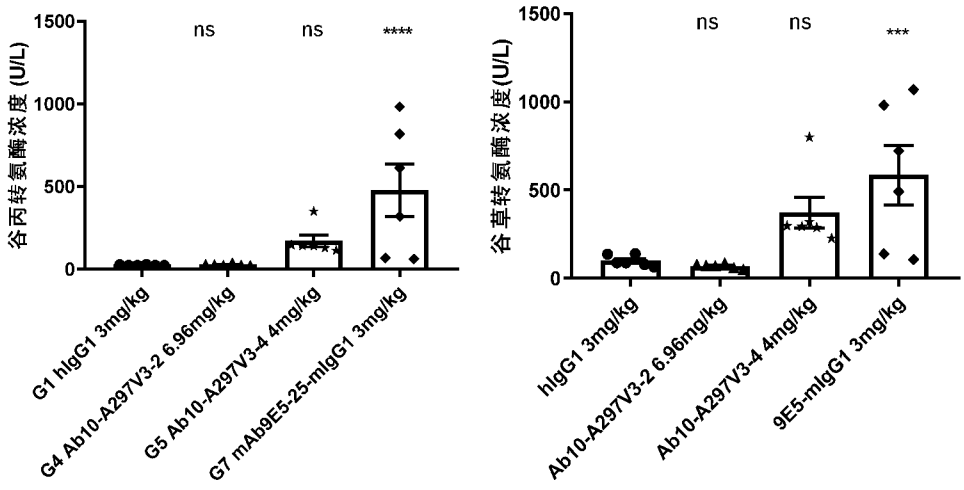

谷丙转氨酶浓度 (U/L)
1500
1000
500
0
ns
ns
****
G1 hIgG1 3mg/kg
G4 Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
G5 Ab10-A297V3-4 4mg/kg
G7 mAb9E5-25-mIgG1 3mg/kg
谷草转氨酶浓度(U/L)
1500
1000
500
0
ns
ns
***
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 13E

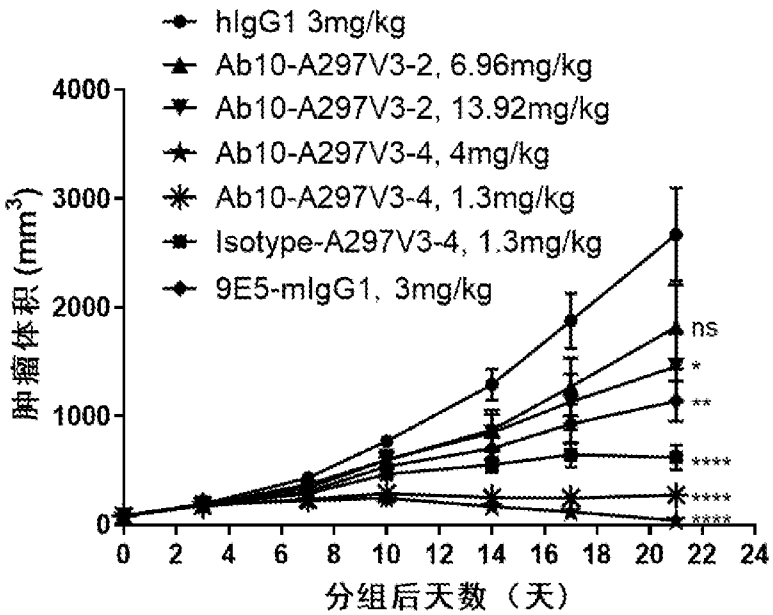

hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2, 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-2, 13.92mg/kg
Ab10-A297V3-4, 4mg/kg
Ab10-A297V3-4, 1.3mg/kg
Isotype-A297V3-4, 1.3mg/kg
9E5-mIgG1, 3mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
ns
*
**
****
****
****
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
分组后天数（天）

图 14A

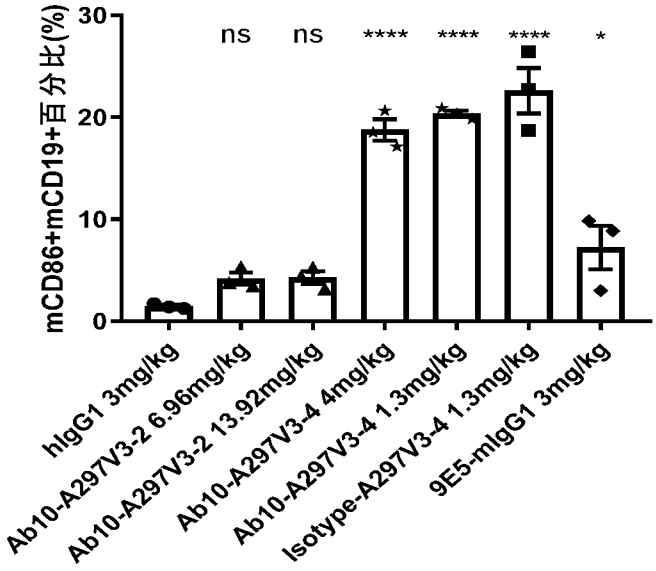

mCD86+mCD19+百分比(%)
30
20
10
0
ns
ns
****
****
****
*
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-2 13.92mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
Ab10-A297V3-4 1.3mg/kg
Isotype-A297V3-4 1.3mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 14B

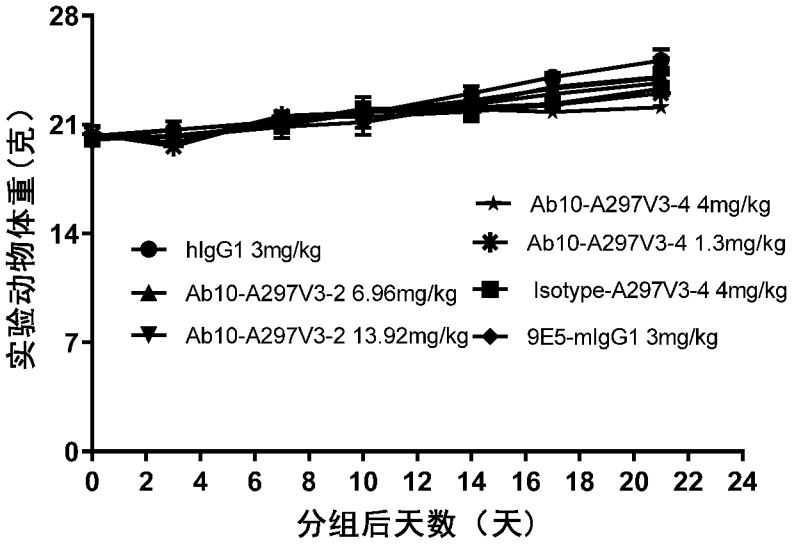

实验动物体重（克）
28
21
14
7
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
分组后天数（天）
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-2 13.92mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
Ab10-A297V3-4 1.3mg/kg
Isotype-A297V3-4 4mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 14C

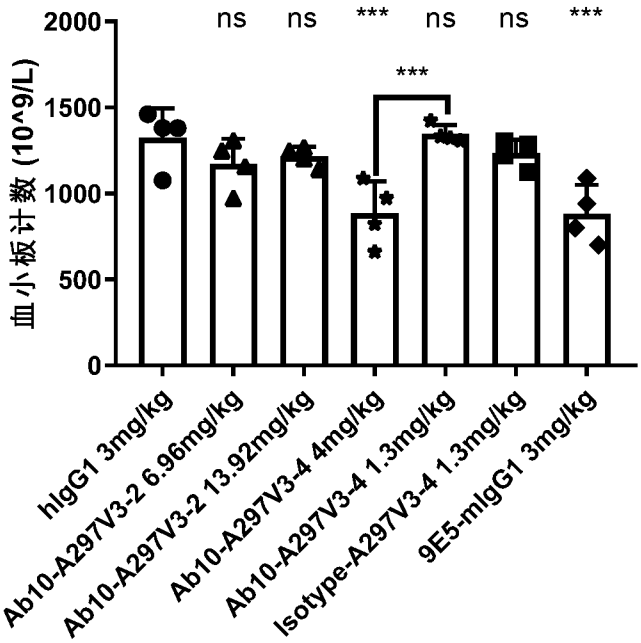

血小板计数 (10^9/L)
2000
1500
1000
500
0
ns ns *** ns ns ***
***
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-2 13.92mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
Ab10-A297V3-4 1.3mg/kg
Isotype-A297V3-4 1.3mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 14D

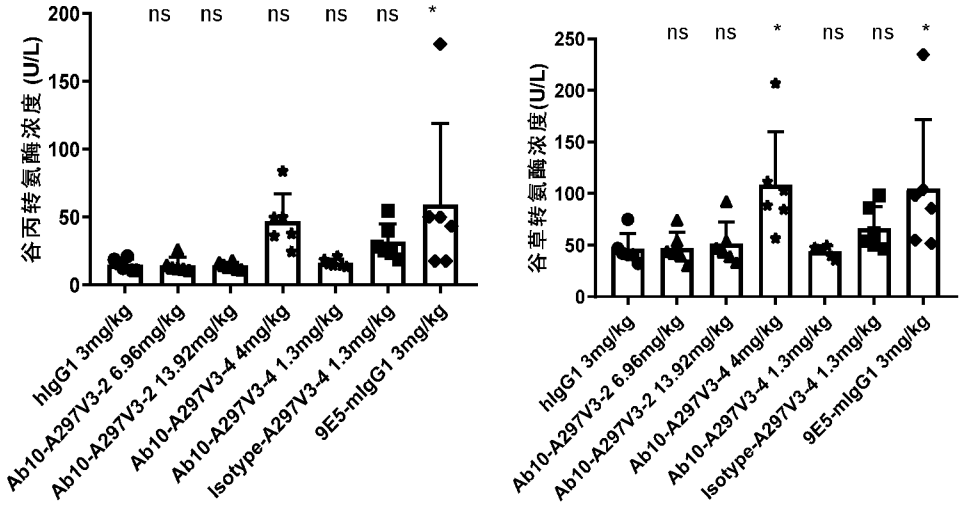

谷丙转氨酶浓度 (U/L)
200
150
100
50
0
ns ns ns ns ns *
谷草转氨酶浓度(U/L)
250
200
150
100
50
0
ns ns * ns ns *
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A297V3-2 6.96mg/kg
Ab10-A297V3-2 13.92mg/kg
Ab10-A297V3-4 4mg/kg
Ab10-A297V3-4 1.3mg/kg
Isotype-A297V3-4 1.3mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 14E

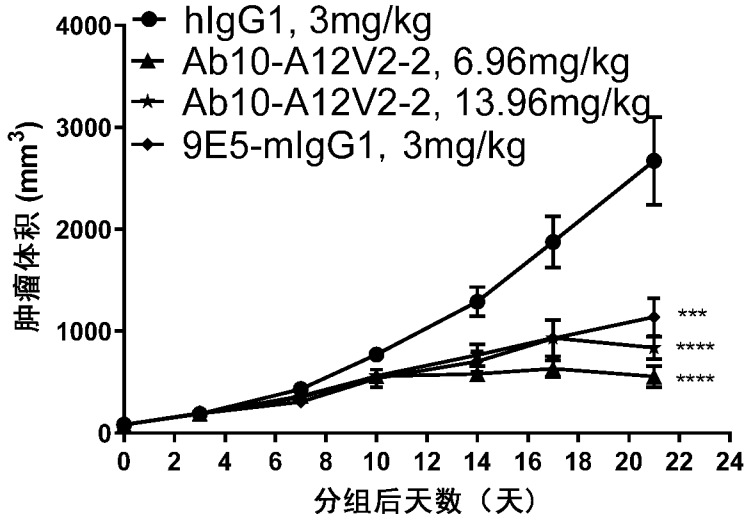

hIgG1, 3mg/kg
Ab10-A12V2-2, 6.96mg/kg
Ab10-A12V2-2, 13.96mg/kg
9E5-mIgG1, 3mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
分组后天数（天）
***
****
****

图 15A

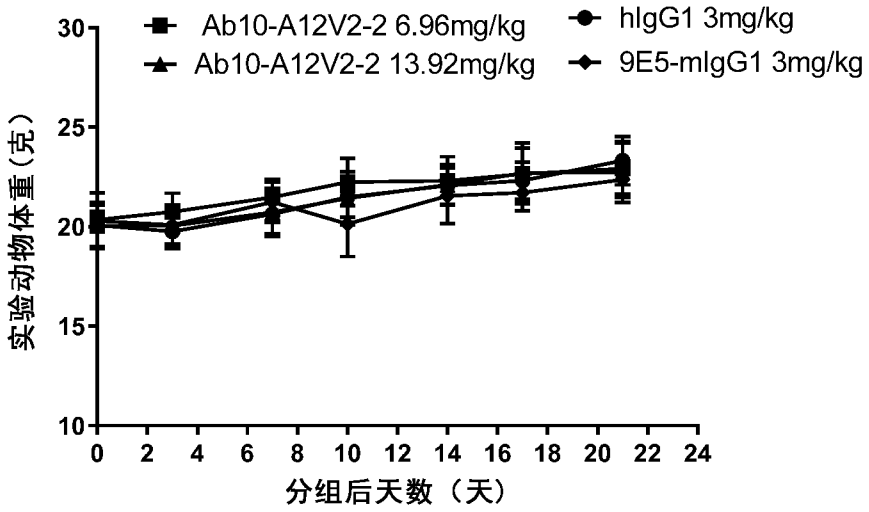

Ab10-A12V2-2 6.96mg/kg
Ab10-A12V2-2 13.92mg/kg
hIgG1 3mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg
实验动物体重（克）
分组后天数（天）

图 15B

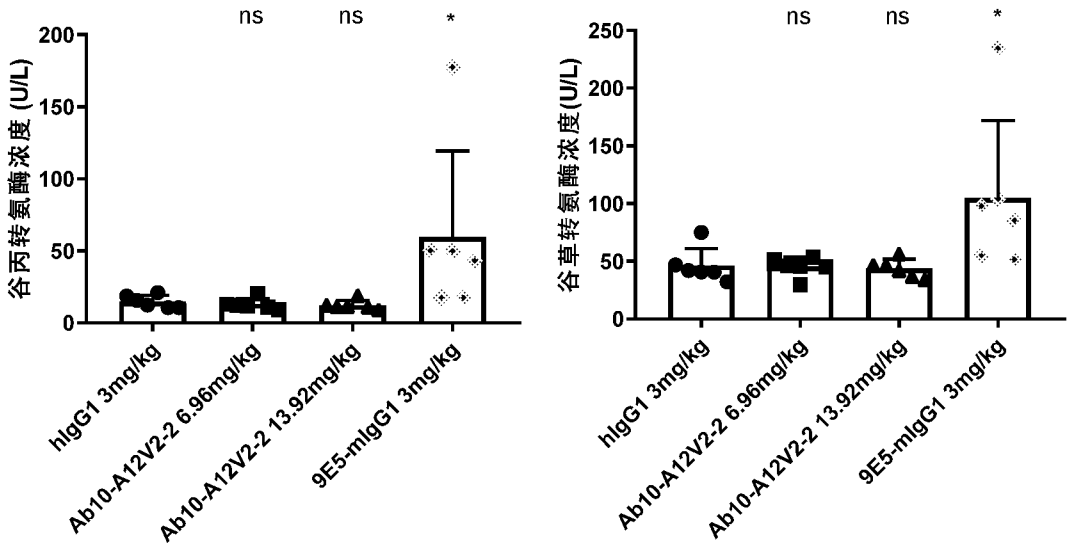

ns
ns
*
谷丙转氨酶浓度 (U/L)
200
150
100
50
0
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A12V2-2 6.96mg/kg
Ab10-A12V2-2 13.92mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg
ns
ns
*
谷草转氨酶浓度(U/L)
250
200
150
100
50
0
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A12V2-2 6.96mg/kg
Ab10-A12V2-2 13.92mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 15C

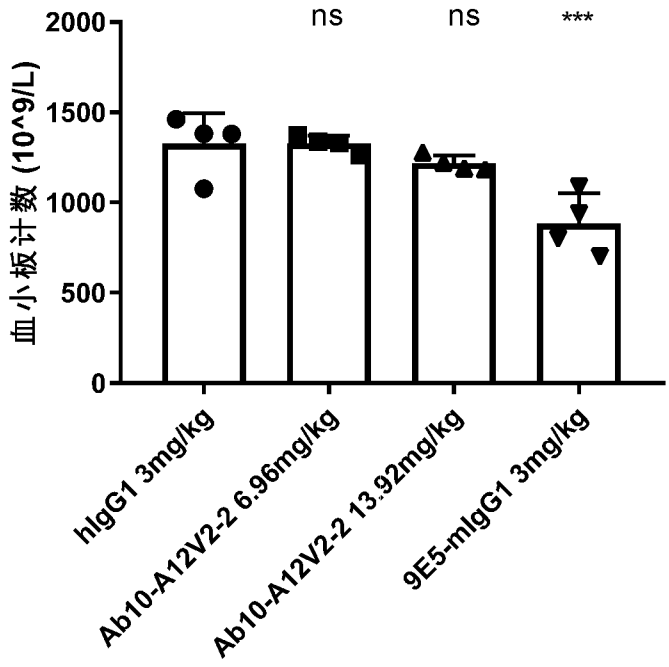

ns
ns
***
血小板计数 (10^9/L)
2000
1500
1000
500
0
hIgG1 3mg/kg
Ab10-A12V2-2 6.96mg/kg
Ab10-A12V2-2 13.92mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg

图 15D

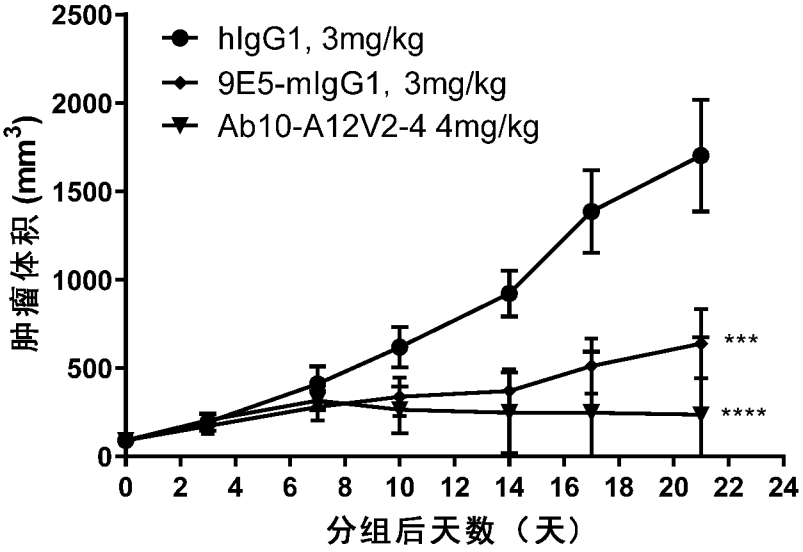

hIgG1, 3mg/kg
9E5-mIgG1, 3mg/kg
Ab10-A12V2-4 4mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
***
****
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
分组后天数（天）

图 16A

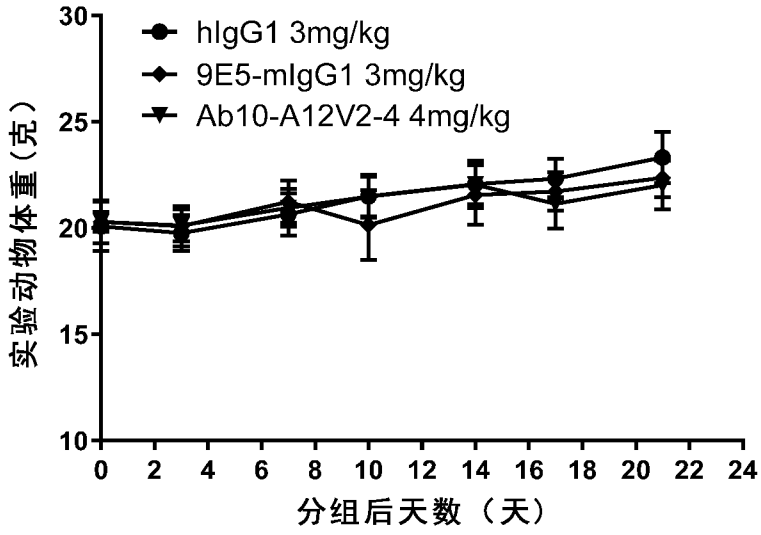

hIgG1 3mg/kg
9E5-mIgG1 3mg/kg
Ab10-A12V2-4 4mg/kg
实验动物体重（克）
30
25
20
15
10
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
分组后天数（天）

图 16B

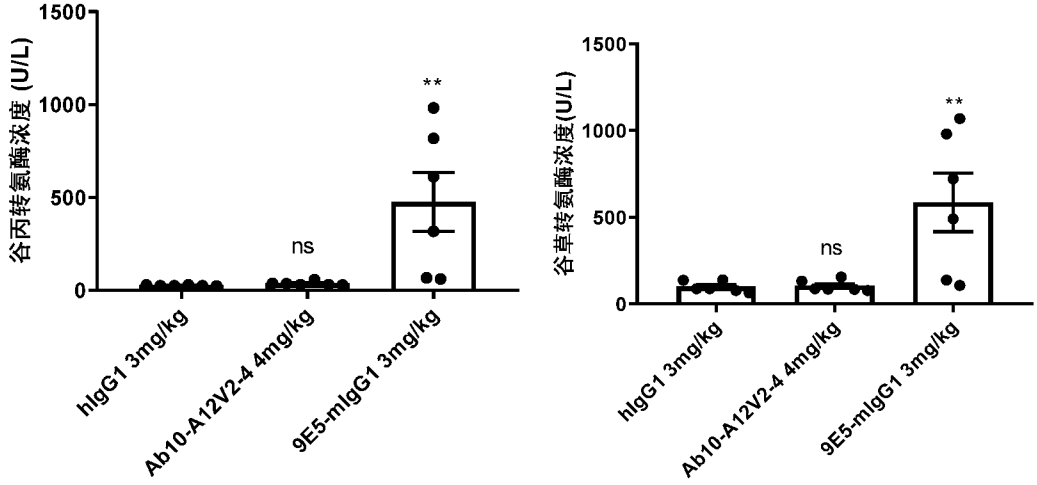


图 16C

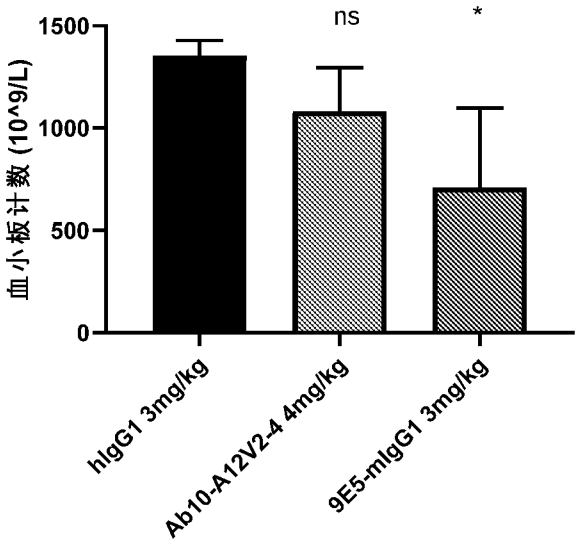


图 16D

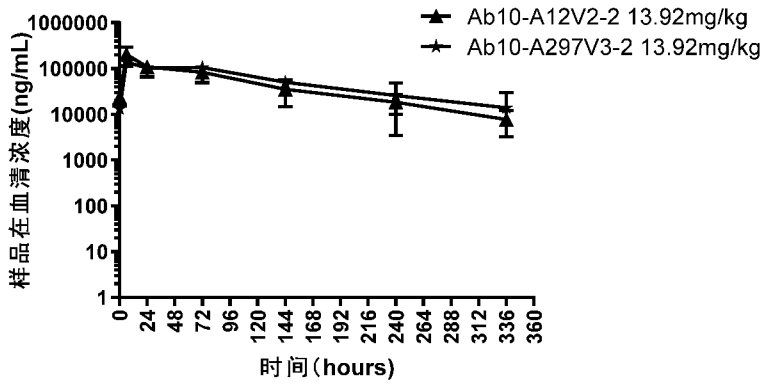


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/114522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, VCN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCE, GENBANK, EMBL-EBI, STNext, 申请人/发明人, 双特异性抗体, 抗成纤维细胞活化蛋白, FAP/CD40, CD40, bispecific antibody, BiAb, 肿瘤, 癌症, tumor, cancer, SEQ ID NOs: 1-56

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112955468 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 11 June 2021 (2021-06-11) entire document	1-29
A	CN 110402255 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 01 November 2019 (2019-11-01) entire document	1-29
A	WO 2020/159368 A1 (LAVA THERAPEUTICS B.V. et al.) 06 August 2020 (2020-08-06) entire document	1-29
A	AU 2015213405 A1 (ROCHE GLYCART AG) 10 September 2015 (2015-09-10) entire document	1-29
A	US 2017/0088624 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 30 March 2017 (2017-03-30) entire document	1-29
A	WO 2018/127473 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 12 July 2018 (2018-07-12) entire document	1-29
A	SUM, E. et al. "Fibroblast Activation Protein a-Targeted CD40 Agonism Abrogates Systemic Toxicity and Enables Administration of High Doses to Induce Effective Antitumor Immunity." *CLINICAL CANCER RESEARCH.*, Vol. 27, No. 14, 15 July 2021 (2021-07-15), pp. 4036-4053	1-29

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 October 2022	**25 November 2022**
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	LABISNO, S. et al. "CD40 Agonist Targeted to Fibroblast Activation Protein a Synergizes with Radiotherapy in Murine HPV-Positive Head and Neck Tumors." *CLINICAL CANCER RESEARCH.*, Vol. 27, No. 14, 15 July 2021 (2021-07-15), pp. 4054-4065	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/114522

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/114522

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.: **29**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 29 relates to a method for the treatment or diagnosis of a living human or animal body, belonging to the cases listed in PCT Rule 39.1(IV) for which no international search is required. The present report relates to conducting a search on the basis of a "use in the preparation of a drug for treating a disease".

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/114522

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112955468	A	11 June 2021	BR	112021005822	A2	27 July 2021
				TW	202028240	A	01 August 2020
				EP	3861026	A1	11 August 2021
				CR	20210154	A	21 April 2021
				US	2020190207	A1	18 June 2020
				AU	2019355252	A1	01 April 2021
				UA	126188	C2	25 August 2022
				WO	2020070041	A1	09 April 2020
				IL	281739	A	31 May 2021
				CL	2021000751	A1	05 November 2021
				CO	2021003900	A2	19 April 2021
				PE	20211863	A1	21 September 2021
				CA	3113548	A1	09 April 2020
				SG	11202102477 Q	A	29 April 2021
				AR	116565	A1	19 May 2021
				US	2022227878	A1	21 July 2022
				MA	53806	A	05 January 2022
				JP	2022511382	A	31 January 2022
				KR	20210069675	A	11 June 2021
CN	110402255	A	01 November 2019	RU	2019134352	A	05 May 2021
				MX	2019011907	A	09 January 2020
				IL	269396	A	28 November 2019
				SG	11201908787 W	A	30 October 2019
				PE	20200006	A1	06 January 2020
				PH	12019502294	A1	06 July 2020
				JP	2022017275	A	25 January 2022
				US	2021188992	A1	24 June 2021
				CR	20190427	A	01 November 2019
				CL	2019002542	A1	31 January 2020
				US	2018340030	A1	29 November 2018
				JP	2020515276	A	28 May 2020
				KR	20190137125	A	10 December 2019
				CA	3053358	A1	11 October 2018
				WO	2018185045	A1	11 October 2018
				BR	112019017753	A2	07 April 2020
				AU	2018247796	A1	29 August 2019
				CO	2019009432	A2	18 September 2019
				TW	201841939	A	01 December 2018
				EP	3606956	A1	12 February 2020
				MA	49039	A	12 February 2020
WO	2020/159368	A1	06 August 2020	EP	3917960	A1	08 December 2021
				US	2022135694	A1	05 May 2022
				BR	112021015238	A2	15 February 2022
				CA	3128148	A1	06 August 2020
				AU	2020216250	A1	26 August 2021
				JP	2022519082	A	18 March 2022
				CN	113993893	A	28 January 2022
				SG	11202108141V	A	30 August 2021
				KR	20210141466	A	23 November 2021
AU	2015213405	A1	10 September 2015	AU	2017251851	A1	16 November 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/114522

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		AU 2020201916 A1	02 April 2020
US 2017/0088624 A1	30 March 2017	JP 2018533360 A	15 November 2018
		CN 109069622 A	21 December 2018
		CO 2018003436 A2	20 June 2018
		US 2019048089 A1	14 February 2019
		JP 2018529351 A	11 October 2018
		MA 43055 A	08 August 2018
		KR 20180053738 A	23 May 2018
		EC SP18033227 A	31 May 2018
		MA 43053 A	08 August 2018
		ES 2906823 T3	20 April 2022
		CR 20180177 A	22 June 2018
		EP 3356532 A2	08 August 2018
		WO 2017059243 A2	06 April 2017
		PE 20181367 A1	27 August 2018
		KR 20180054837 A	24 May 2018
		AU 2016329057 A1	12 April 2018
		CA 3000396 A1	06 April 2017
		CL 2018000833 A1	22 February 2019
		MX 2018003905 A	06 September 2018
		CA 3000400 A1	06 April 2017
		NI 201800044 A	24 August 2018
		CN 108368510 A	03 August 2018
		PH 12018500684 A1	01 October 2018
		EP 3355921 A2	08 August 2018
		EA 201890834 A1	28 December 2018
		BR 112018006251 A2	16 October 2018
		SV 2018005659 A	28 March 2019
		AU 2016331819 A1	12 April 2018
		IL 258268 A	31 May 2018
		BR 112018006360 A2	09 October 2018
		WO 2017059196 A2	06 April 2017
WO 2018/127473 A1	12 July 2018	MX 2019007795 A	16 August 2019
		PH 12019501440 A1	10 February 2020
		JP 2020504622 A	13 February 2020
		KR 20190099527 A	27 August 2019
		MA 47200 A	13 November 2019
		CR 20190309 A	21 August 2019
		BR 112019013189 A2	10 December 2019
		CN 110461873 A	15 November 2019
		CL 2019001828 A1	18 October 2019
		PE 20191546 A1	24 October 2019
		IL 267607 A	29 August 2019
		CO 2019007046 A2	10 July 2019
		TW 201829469 A	16 August 2018
		AU 2018206138 A1	11 July 2019
		RU 2019123613 A	05 February 2021
		US 2020190206 A1	18 June 2020
		EP 3565843 A1	13 November 2019
		CA 3047070 A1	12 July 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/114522

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS, VCN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCE, GENBANK, EMBL-EBI, STNext, 申请人/发明人，双特异性抗体，抗成纤维细胞活化蛋白，FAP/CD40，CD40，bispecific antibody，BiAb，肿瘤，癌症，tumor，cancer， SEQ ID NOs:1-56

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 112955468 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2021年6月11日 (2021-06-11) 全文	1-29
A	CN 110402255 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年11月1日 (2019-11-01) 全文	1-29
A	WO 2020/159368 A1 (LAVA THERAPEUTICS B.V. 等) 2020年8月6日 (2020-08-06) 全文	1-29
A	AU 2015213405 A1 (ROCHE GLYCART AG) 2015年9月10日 (2015-09-10) 全文	1-29
A	US 2017/0088624 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 2017年3月30日 (2017-03-30) 全文	1-29
A	WO 2018/127473 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2018年7月12日 (2018-07-12) 全文	1-29

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年10月12日	2022年11月25日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(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 靳春鹏 电话号码 86-（10）-53961947

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	SUM, E. 等. "Fibroblast Activation Protein a-Targeted CD40 Agonism Abrogates Systemic Toxicity and Enables Administration of High Doses to Induce Effective Antitumor Immunity." CLINICAL CANCER RESEARCH., 第27卷, 第14期, 2021年7月15日 (2021-07-15), 第4036-4053页	1-29
A	LABISNO, S. 等. "CD40 Agonist Targeted to Fibroblast Activation Protein a Synergizes with Radiotherapy in Murine HPV-Positive Head and Neck Tumors." CLINICAL CANCER RESEARCH., 第27卷, 第14期, 2021年7月15日 (2021-07-15), 第4054-4065页	1-29

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/114522

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

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

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

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

3. 补充意见：

[1] 实际提交的序列表是ST.26标准的XML文件。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/114522

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： 29
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求29涉及对有生命的人体或动物体的治疗或诊断方法，属于PCT细则39.1（Ⅳ）中所列的无需进行国际检索的情形。本报告基于“制备治疗疾病的药物中的用途”进行检索。

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

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/114522

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	112955468	A	2021年6月11日	BR	112021005822	A2	2021年7月27日
				TW	202028240	A	2020年8月1日
				EP	3861026	A1	2021年8月11日
				CR	20210154	A	2021年4月21日
				US	2020190207	A1	2020年6月18日
				AU	2019355252	A1	2021年4月1日
				UA	126188	C2	2022年8月25日
				WO	2020070041	A1	2020年4月9日
				IL	281739	A	2021年5月31日
				CL	2021000751	A1	2021年11月5日
				CO	2021003900	A2	2021年4月19日
				PE	20211863	A1	2021年9月21日
				CA	3113548	A1	2020年4月9日
				SG	112021024770	A	2021年4月29日
				AR	116565	A1	2021年5月19日
				US	2022227878	A1	2022年7月21日
				MA	53806	A	2022年1月5日
				JP	2022511382	A	2022年1月31日
				KR	20210069675	A	2021年6月11日
CN	110402255	A	2019年11月1日	RU	2019134352	A	2021年5月5日
				MX	2019011907	A	2020年1月9日
				IL	269396	A	2019年11月28日
				SG	11201908787W	A	2019年10月30日
				PE	20200006	A1	2020年1月6日
				PH	12019502294	A1	2020年7月6日
				JP	2022017275	A	2022年1月25日
				US	2021188992	A1	2021年6月24日
				CR	20190427	A	2019年11月1日
				CL	2019002542	A1	2020年1月31日
				US	2018340030	A1	2018年11月29日
				JP	2020515276	A	2020年5月28日
				KR	20190137125	A	2019年12月10日
				CA	3053358	A1	2018年10月11日
				WO	2018185045	A1	2018年10月11日
				BR	112019017753	A2	2020年4月7日
				AU	2018247796	A1	2019年8月29日
				CO	2019009432	A2	2019年9月18日
				TW	201841939	A	2018年12月1日
				EP	3606956	A1	2020年2月12日
				MA	49039	A	2020年2月12日
WO	2020/159368	A1	2020年8月6日	EP	3917960	A1	2021年12月8日
				US	2022135694	A1	2022年5月5日
				BR	112021015238	A2	2022年2月15日
				CA	3128148	A1	2020年8月6日
				AU	2020216250	A1	2021年8月26日
				JP	2022519082	A	2022年3月18日
				CN	113993893	A	2022年1月28日
				SG	11202108141V	A	2021年8月30日
				KR	20210141466	A	2021年11月23日
AU	2015213405	A1	2015年9月10日	AU	2017251851	A1	2017年11月16日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/114522

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	2020201916	A1	2020年4月2日
US	2017/0088624	A1	2017年3月30日	JP	2018533360	A	2018年11月15日
				CN	109069622	A	2018年12月21日
				CO	2018003436	A2	2018年6月20日
				US	2019048089	A1	2019年2月14日
				JP	2018529351	A	2018年10月11日
				MA	43055	A	2018年8月8日
				KR	20180053738	A	2018年5月23日
				EC	SP18033227	A	2018年5月31日
				MA	43053	A	2018年8月8日
				ES	2906823	T3	2022年4月20日
				CR	20180177	A	2018年6月22日
				EP	3356532	A2	2018年8月8日
				WO	2017059243	A2	2017年4月6日
				PE	20181367	A1	2018年8月27日
				KR	20180054837	A	2018年5月24日
				AU	2016329057	A1	2018年4月12日
				CA	3000396	A1	2017年4月6日
				CL	2018000833	A1	2019年2月22日
				MX	2018003905	A	2018年9月6日
				CA	3000400	A1	2017年4月6日
				NI	201800044	A	2018年8月24日
				CN	108368510	A	2018年8月3日
				PH	12018500684	A1	2018年10月1日
				EP	3355921	A2	2018年8月8日
				EA	201890834	A1	2018年12月28日
				BR	112018006251	A2	2018年10月16日
				SV	2018005659	A	2019年3月28日
				AU	2016331819	A1	2018年4月12日
				IL	258268	A	2018年5月31日
				BR	112018006360	A2	2018年10月9日
				WO	2017059196	A2	2017年4月6日
WO	2018/127473	A1	2018年7月12日	MX	2019007795	A	2019年8月16日
				PH	12019501440	A1	2020年2月10日
				JP	2020504622	A	2020年2月13日
				KR	20190099527	A	2019年8月27日
				MA	47200	A	2019年11月13日
				CR	20190309	A	2019年8月21日
				BR	112019013189	A2	2019年12月10日
				CN	110461873	A	2019年11月15日
				CL	2019001828	A1	2019年10月18日
				PE	20191546	A1	2019年10月24日
				IL	267607	A	2019年8月29日
				CO	2019007046	A2	2019年7月10日
				TW	201829469	A	2018年8月16日
				AU	2018206138	A1	2019年7月11日
				RU	2019123613	A	2021年2月5日
				US	2020190206	A1	2020年6月18日
				EP	3565843	A1	2019年11月13日
				CA	3047070	A1	2018年7月12日