

# (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30日 (30.03.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/046131 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 31/4725* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/121184

(22) 国际申请日: 2022年9月26日 (26.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202111127584.5 2021年9月26日 (26.09.2021) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(72) 发明人: 沈忱 (SHEN, Chen); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 吕鹏 (LV, Peng); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 田心 (TIAN, Xin); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 杨玲 (YANG, Ling); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (CN)。 张喜全 (ZHANG, Xiquan); 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号 (江宁高新园), Jiangsu 211100 (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。

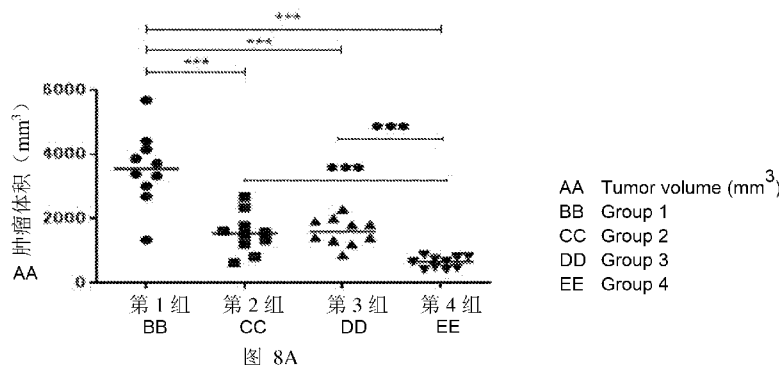
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),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

(54) Title: USE OF ANTI-CD40 ANTIBODY

(54) 发明名称: 抗CD40抗体的应用



(57) Abstract: Provided is the use of an anti-CD40 antibody. Specifically, provided is a combined drug for treating cancer. The combined drug comprises an anti-CD40 antibody or an antigen-binding portion thereof and a tyrosine kinase inhibitor, and has a good anti-tumor activity and safety.

(57) 摘要: 提供抗CD40抗体的应用, 具体而言, 提供用于治疗癌症的联用药物, 所述联用药物包含抗CD40抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂, 具有良好的抗肿瘤活性和安全性。



WO 2023/046131 A1

## 抗 CD40 抗体的应用

### 发明领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及治疗癌症的联用药物。

### 发明背景

CD40 属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族成员，存在于 B 细胞、树突状细胞 (DC) 和巨噬细胞等抗原递呈细胞 (APC) 上，在其他造血细胞 (如 T 细胞) 活化后也有表达。此外，CD40 在广泛的肿瘤细胞上表达，例如 B 细胞肿瘤 (非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓瘤等) 细胞和上皮肿瘤 (前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌等) 细胞等。

CD40 的天然配体 (称为 CD154 或 CD40L) 主要表达在活化的 T 淋巴细胞和肥大细胞上。CD40/CD40L 信号通路参与机体的体液免疫和细胞免疫反应，在 B 细胞的活化、增殖与分化，抗体的产生、抗体类别转换等 T 细胞依赖的抗体免疫反应及炎症反应中起关键调节作用。因此，通过 CD40 激动剂 (例如激动性抗 CD40 抗体) 进行治疗可以增强机体的抗肿瘤免疫应答。

酪氨酸激酶是一组催化蛋白质酪氨酸残基磷酸化的酶，在细胞内的信号转导中起着重要的作用，它参与正常细胞的调节、信号传递和发育，也与肿瘤细胞的增殖、分化、迁移和凋亡密切相关。许多受体酪氨酸激酶都与肿瘤的形成相关，根据其细胞外区域结构的不同可分为表皮生长因子受体 (EGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 等。

安罗替尼 (Anlotinib) 是一种喹啉衍生物类酪氨酸激酶抑制剂，其作为多靶点酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 在影响肿瘤血管生成和增殖信号转导方面发挥作用，主要靶点包括：受体酪氨酸激酶血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 1 至 3，表皮生长因子受体 (EGFR)，成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 1 至 4，血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)  $\alpha$  和  $\beta$ ，以及干细胞因子受体 (SCFR) 7、8 和 9。

尽管任何一种现有治疗对患者可能有益，但还需要更多降低毒性和改善治疗结果的方法供临床使用。

### 发明内容

第一方面，本申请提供一种药物组合，其包括 (a) 抗 CD40 抗体或其抗原结合部分，和 (b) 第二治疗剂。在一些实施方案中，所述第二治疗剂具有癌症治疗功效。在一些实施方案中，所述第二治疗剂包括酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中，所述第二治疗剂包括 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂。在一些具体的实施方案中，所述第二治疗剂包括安罗替尼或其药学上可接受的盐。

酪氨酸激酶抑制剂是指任何能够抑制 (例如，阻断、破坏或使其失活) 酪氨酸激酶或来自酪氨酸激酶的下游信号转导的物质或试剂，包括小分子酪氨酸激酶抑制剂和抗体。酪氨酸激酶抑制剂包括受体酪氨酸激酶抑制剂和非受体酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中，所述受体酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂、FGFR 酪氨酸激酶抑制剂、SCFR 酪氨酸激酶抑制剂和 PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂等。

VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂是指任何抑制 (例如，阻断、破坏或使其失活) VEGF 受体酪氨酸激酶或来自 VEGF 受体酪氨酸激酶的下游信号转导的物质或试剂，包括小分子 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和抗体。VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂的实例包括但不限于安罗替尼 (Anlotinib)、凡德他尼 (Vandetanib)、索拉非尼 (Sorafenib)、西地尼布 (Cediranib)、伐他拉尼 (Vatalanib)、帕唑帕尼 (Pazopanib)、莫替沙尼 (Motesanib)、仑伐替尼 (Lenvatinib)、舒尼替尼 (Sunitinib)、贝伐珠单抗 (Bevacizumab)、雷莫芦

单抗 (Ramucirumab)、或其药学上可接受的盐、或前述任意组合。

任选地,所述药物组合还包括具有癌症治疗功效的第三治疗剂。在一些实施方案中,所述第三治疗剂可以是本领域已知的癌症治疗剂,例如化疗药物、放疗药物、手术或其组合。

在一些实施方案中,所述药物组合包括(a)抗CD40抗体或其抗原结合部分,和(b)酪氨酸激酶抑制剂;任选地,还包括(c)化疗药物。在一些实施方案中,所述药物组合包括(a)抗CD40抗体或其抗原结合部分,和(b)VEGFR酪氨酸激酶抑制剂;任选地,还包括(c)化疗药物。在一些具体的实施方案中,所述药物组合包括(a)抗CD40抗体或其抗原结合部分,和(b)安罗替尼或其药学上可接受的盐;任选地,还包括(c)化疗药物。

在一些实施方案中,所述药物组合包括(a)抗CD40抗体或其抗原结合部分的药物组合物,和(b)酪氨酸激酶抑制剂的药物组合物;任选地,还包括(c)化疗药物。在一些实施方案中,所述药物组合包括(a)抗CD40抗体或其抗原结合部分的药物组合物,和(b)VEGFR酪氨酸激酶抑制剂的药物组合物;任选地,还包括(c)化疗药物。在一些具体的实施方案中,所述药物组合包括(a)抗CD40抗体或其抗原结合部分的药物组合物,和(b)安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物;任选地,还包括(c)化疗药物。

在一些实施方案中,所述药物组合包装于同一试剂盒中,所述试剂盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂联合使用以治疗癌症的说明。在一些实施方案中,所述药物组合中的抗CD40抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂分开包装于各自的药盒中,所述药盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂联合使用以治疗癌症的说明。

在一些实施方案中,所述药物组合包装于同一试剂盒中,所述试剂盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物联合使用以治疗癌症的说明。在一些实施方案中,所述药物组合中的抗CD40抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分开包装于各自的药盒中,所述药盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物联合使用以治疗癌症的说明。

在一些实施方案中,所述药物组合包装于同一试剂盒中,所述试剂盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分和VEGFR酪氨酸激酶抑制剂联合使用以治疗癌症的说明。在一些实施方案中,所述药物组合中的抗CD40抗体或其抗原结合部分和VEGFR酪氨酸激酶抑制剂分开包装于各自的药盒中,所述药盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分和VEGFR酪氨酸激酶抑制剂联合使用以治疗癌症的说明。

在一些实施方案中,所述药物组合包装于同一试剂盒中,所述试剂盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物联合使用以治疗癌症的说明。在一些实施方案中,所述药物组合中的抗CD40抗体或其抗原结合部分、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分开包装于各自的药盒中,所述药盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物联合使用以治疗癌症的说明。

在一些实施方案中,所述药物组合包装于同一试剂盒中,所述试剂盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐联合使用以治疗癌症的说明。在一些实施方案中,所述药物组合中的抗CD40抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐分开包装于各自的药盒中,所述药盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐联合使用以治疗癌症的说明。

在一些实施方案中,所述药物组合包装于同一试剂盒中,所述试剂盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物联合使用以治疗癌症的说明。在一些实施方案中,所述药物组合中的抗CD40抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物分开包装于各自的药盒中,所述药盒还包括抗CD40抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐

和化疗药物联合使用以治疗癌症的说明。

在一些实施方案中，所述药物组合是固定组合。在一些实施方案中，所述固定组合呈固体药物组合物的形式或液体药物组合物的形式。

在一些实施方案中，所述药物组合是非固定组合。

在一些实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂各自呈药物组合物的形式。在一些实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物各自呈药物组合物的形式。

在一些实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂各自呈药物组合物的形式。在一些实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物各自呈药物组合物的形式。

在一些实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐各自呈药物组合物的形式。在一些具体的实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分呈液体药物组合物的形式，所述非固定组合中的安罗替尼或其药学上可接受的盐呈固体药物组合物的形式。在一些具体的实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分呈注射液的形式，所述非固定组合中的安罗替尼或其药学上可接受的盐呈固体口服制剂的形式。在一些具体的实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分呈注射液的形式，所述非固定组合中的安罗替尼或其药学上可接受的盐呈胶囊的形式。在一些实施方案中，所述非固定组合中的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物各自呈药物组合物的形式。

第二方面，本申请还提供了第一方面的药物组合在制备用于治疗癌症的药物中的用途。另外，本申请还提供了抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂在制备用于治疗癌症的药物中的用途。另外，本申请还提供了抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。另外，本申请还提供了抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂在制备用于治疗癌症的药物中的用途。另外，本申请还提供了抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。另外，本申请还提供了抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐在制备用于治疗癌症的药物中的用途。另外，本申请还提供了抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

第三方面，本申请还提供在受试者中治疗癌症的方法，其包括向受试者给予有效量的第一方面的药物组合。在一些实施方案中，本申请提供在受试者中治疗癌症的方法，其包括向受试者给予有效量的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和有效量的酪氨酸激酶抑制剂；任选地，还包括有效量的化疗药物。在一些实施方案中，本申请提供在受试者中治疗癌症的方法，其包括向受试者给予有效量的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和有效量的 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂；任选地，还包括有效量的化疗药物。在一些实施方案中，本申请提供在受试者中治疗癌症的方法，其包括向受试者给予有效量的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和有效量的安罗替尼或其药学上可接受的盐；任选地，还包括有效量的化疗药物。

第四方面，本申请提供一种试剂盒，其包括第一方面的药物组合。在一些实施方案中，所述含有 (a) 第一药物组合物，其中抗 CD40 抗体或其抗原结合部分作为活性成份；和 (b) 第二药物组合物，其中酪氨酸激酶抑制剂作为活性成份；任选地，还包括 (c) 化疗药物。在一些实施方案中，本所述含有 (a) 第一药物组合物，其中抗 CD40 抗体或其抗原结合部分作为活性成份；和 (b) 第二药物组合物，其中 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂作为活性成份；任选地，还包括 (c) 化疗药物。在一些实施方案中，所述含有 (a) 第一药物组合物，其中抗 CD40 抗体或其抗原结合部分作为活性成份；和 (b) 第二药物组合物，其中安罗替尼或其药学上可接受的盐作为活性成份；任选地，还包括 (c) 化疗药物。在一些实施方案

中，所述试剂盒用于治疗癌症。

第五方面，本申请还提供治疗癌症的方法，其包括向受试者给予有效量的本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分。本申请还提供本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分用于治疗癌症的用途。本申请还提供本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

#### 药物组合的给药/治疗方案

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂各自呈药物组合物的形式，可同时、先后和/或交替给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物各自呈药物组合物的形式，可同时、先后和/或交替给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂各自呈药物组合物的形式，可同时、先后和/或交替给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物各自呈药物组合物的形式，可同时、先后和/或交替给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐各自呈药物组合物的形式，可同时、先后和/或交替给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物各自呈药物组合物的形式，可同时、先后和/或交替给药。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂各自呈药物组合物的形式，且各自以间隔给药的方式给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物各自呈药物组合物的形式，且各自以间隔给药的方式给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂各自呈药物组合物的形式，且各自以间隔给药的方式给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物各自呈药物组合物的形式，且各自以间隔给药的方式给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐各自呈药物组合物的形式，且各自以间隔给药的方式给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物各自呈药物组合物的形式，且各自以间隔给药的方式给药。所述的间隔给药包括给药期和停药期，在给药期内可以每天一次或多次给予。例如在给药期内每天给药，然后停药期内停止给药一段时间，接着给药期，然后停药期，如此可以反复进行多次。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂分别以相同或者不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂分别以不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分别以相同或者不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分别以不同的给药方案进行给药。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂分别以相同或者不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂分别以不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分别以相同或者不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分别以不同的给药方案进行给药。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐分别以相同或者不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗

CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐分别以不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物分别以相同或者不同的给药方案进行给药。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物分别以不同的给药方案进行给药。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分可以每周 (q1w)、每 2 周 (q2w)、每 3 周 (q3w)、或者每 4 周 (q4w) 施用一次。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分可以每周 ( $\pm 3$  天)、每 2 周 ( $\pm 3$  天)、每 3 周 ( $\pm 3$  天)、或者每 4 周 ( $\pm 3$  天) 施用一次。在一个具体的实施方案中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分可以每 3 周 ( $\pm 3$  天) 施用一次。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分以 0.001 至 100 mg/kg 体重的剂量施用。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分以能够有效治疗所述癌症的统一剂量施用。在一些具体实施方式中，所述统一剂量在大约 1 mg 至大约 1000 mg 抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的范围内。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，安罗替尼或其药学上可接受的盐以每 1 周、每 2 周、每 3 周、或者每 4 周为一个治疗周期。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，安罗替尼或其药学上可接受的盐以每 1 周 ( $\pm 3$  天)、每 2 周 ( $\pm 3$  天)、每 3 周 ( $\pm 3$  天) 或者每 4 周 ( $\pm 3$  天) 为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐以每 3 周 ( $\pm 3$  天) 为一个治疗周期。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，所述安罗替尼或其药学上可接受的盐可以采用间隔给药方式，例如连续给药 2 周停药 2 周、连续给药 2 周停药 1 周、或连续给药 5 天停药 2 天；所述间隔给药方式可以反复进行多次。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 3 mg 至 30 mg。在一些实施方案中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 5 mg 至 20 mg。在一些实施方案中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 8 mg 至 16 mg。在一些实施方案中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、10 mg、11 mg、12 mg、13 mg、14 mg、15 mg 和 16 mg。在一个特定的实施方案中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 8 mg。在一个特定的实施方案中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 10 mg。在一个特定的实施方案中，给予安罗替尼或其药学上可接受的盐的日剂量为 12 mg。在一些实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐可以每日施用一次或多次。在一些实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐可以每天施用一次。在一些实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐以口服固体制剂每天施用一次。

在一些具体的实施方案中，上述用途或者方法中，安罗替尼或其药学上可接受的盐可以每日一次 6mg、8mg、10mg 或者 12mg 的剂量，连续用药 2 周停 1 周的给药方案给药。在一些具体的实施方案中，上述用途或者方法中，安罗替尼或其药学上可接受的盐可以每日一次 6mg、8mg、10mg 或者 12mg 的剂量，连续用药 2 周停 2 周的给药方案给药。

在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂分别具有相同或者不同的治疗周期。在一些实施方案中，上述用途或者方法中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂具有相同的治疗周期，例如每 1 周 ( $\pm 3$  天)、每 2 周 ( $\pm 3$  天)、每 3 周 ( $\pm 3$  天) 或者每 4 周 ( $\pm 3$  天) 为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和酪氨酸激酶抑制剂以每 3 周 ( $\pm 3$  天) 为一个治疗周期。在一些实施方案中，上述用途或者方法

中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分别具有相同或者不同的治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物具有相同的治疗周期,例如每 1 周(±3 天)、每 2 周(±3 天)、每 3 周(±3 天)或者每 4 周(±3 天)为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物以每 3 周(±3 天)为一个治疗周期。

在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂分别具有相同或者不同的治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂具有相同的治疗周期,例如每 1 周(±3 天)、每 2 周(±3 天)、每 3 周(±3 天)或者每 4 周(±3 天)为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂以每 3 周(±3 天)为一个治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物分别具有相同或者不同的治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物具有相同的治疗周期,例如每 1 周(±3 天)、每 2 周(±3 天)、每 3 周(±3 天)或者每 4 周(±3 天)为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂和化疗药物以每 3 周(±3 天)为一个治疗周期。

在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐分别具有相同或者不同的治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐具有相同的治疗周期,例如每 1 周(±3 天)、每 2 周(±3 天)、每 3 周(±3 天)或者每 4 周(±3 天)为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和安罗替尼或其药学上可接受的盐以每 3 周(±3 天)为一个治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物分别具有相同或者不同的治疗周期。在一些实施方案中,上述用途或者方法中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物具有相同的治疗周期,例如每 1 周(±3 天)、每 2 周(±3 天)、每 3 周(±3 天)或者每 4 周(±3 天)为一个治疗周期。在一个具体的实施方案中,抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、安罗替尼或其药学上可接受的盐和化疗药物以每 3 周(±3 天)为一个治疗周期。

#### 抗 CD40 抗体或其抗原结合部分

如本申请所用,所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含:

i) 重链可变区,所述重链可变区包含  $V_H$  CDR1、 $V_H$  CDR2 和  $V_H$  CDR3,其中,(1)  $V_H$  CDR1、 $V_H$  CDR2 和  $V_H$  CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 1、4 和 7 所示的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列;(2)  $V_H$  CDR1、 $V_H$  CDR2 和  $V_H$  CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 2、5 和 8 所示的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列;或 (3)  $V_H$  CDR1、 $V_H$  CDR2 和  $V_H$  CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 3、6 和 9 所示的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列;和/或

ii) 轻链可变区,所述轻链可变区包含  $V_L$  CDR1、 $V_L$  CDR2 和  $V_L$  CDR3,其中,(1)  $V_L$  CDR1、 $V_L$  CDR2 和  $V_L$  CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 10、13 和 16 所示的氨基酸序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的氨基酸序列;(2)  $V_L$  CDR1、 $V_L$  CDR2 和  $V_L$  CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 11、14 和 17 所示的氨基酸序列具有至少 85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；或(3) V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2和V<sub>L</sub> CDR3分别包含与SEQ ID NOs: 12、15和18所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗CD40抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2和V<sub>H</sub> CDR3，所述轻链可变区包含V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2和V<sub>L</sub> CDR3，其中，(1) V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、V<sub>H</sub> CDR3、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2和V<sub>L</sub> CDR3分别包含与SEQ ID NOs: 1、4、7、10、13和16所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；(2) V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、V<sub>H</sub> CDR3、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2和V<sub>L</sub> CDR3分别包含与SEQ ID NOs: 2、5、8、11、14和17所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；或(3) V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、V<sub>H</sub> CDR3、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2和V<sub>L</sub> CDR3分别包含与SEQ ID NOs: 3、6、9、12、15和18所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗CD40抗体或其抗原结合部分包含重链可变区，所述重链可变区包含与SEQ ID NOs: 19、20、21或22所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；其中，SEQ ID NO: 20中的X1=A或S。

在一些实施方案中，所述抗CD40抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区，所述轻链可变区包含与SEQ ID NOs: 23、24、25或26所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；其中，SEQ ID NO: 24中的X1=K和X2=F，或X1=Y和X2=Y。

在一些实施方案中，所述抗CD40抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含：(1) 分别与SEQ ID NOs: 19和23所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；(2) 分别与SEQ ID NOs: 20和24所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO: 20中的X1=A，且SEQ ID NO: 24中的X1=K和X2=F；(3) 分别与SEQ ID NOs: 20和24所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO: 20中的X1=S，且SEQ ID NO: 24中的X1=K和X2=F；(4) 分别与SEQ ID NOs: 20和24所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO: 20中的X1=A，且SEQ ID NO: 24中的X1=Y和X2=Y；(5) 分别与SEQ ID NOs: 20和24所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO: 20中的X1=S，且SEQ ID NO: 24中的X1=Y和X2=Y；(6) 分别与SEQ ID NOs: 21和25所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；或(7) 分别与SEQ ID NOs: 22和26所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗CD40抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链，所述重链包含重链可变

区和重链恒定区，所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，其中重链可变区的 C 末端连接至重链恒定区的 N 末端，轻链可变区的 C 末端连接至轻链恒定区的 N 末端，其中重链可变区和轻链可变区包含上述的氨基酸序列，重链恒定区可以是具有如 SEQ ID NO: 28 所示氨基酸序列的人 IgG2 恒定区，或具有如 SEQ ID NO: 27 所示氨基酸序列的人 IgG1 恒定区，轻链恒定区可以是具有如 SEQ ID NO: 29 所示氨基酸序列的人  $\kappa$  恒定区。可以对重链恒定区如 Fc 片段进行改造，以使其具有降低的或增强的 FcR 结合亲和力。

在一些具体的实施方案中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链，其中，(1) 重链包含 SEQ ID NOs: 19 和 27 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 23 和 29 所示的氨基酸序列；(2) 重链包含 SEQ ID NOs: 20 和 28 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 24 和 29 所示的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=A，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=K 和 X2=F；(3) 重链包含 SEQ ID NOs: 20 和 28 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 24 和 29 所示的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=S，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=K 和 X2=F；(4) 重链包含 SEQ ID NOs: 20 和 28 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 24 和 29 所示的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=A，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=Y 和 X2=Y；(5) 重链包含 SEQ ID NOs: 20 和 28 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 24 和 29 所示的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=S，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=Y 和 X2=Y；(6) 重链包含 SEQ ID NOs: 21 和 27 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 25 和 29 所示的氨基酸序列；或(7) 重链包含 SEQ ID NOs: 22 和 27 所示的氨基酸序列，和轻链包含 SEQ ID NOs: 26 和 29 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 CD40 抗体包含两条重链和两条轻链，或由两条重链和两条轻链组成，其中每条重链包含上述的重链恒定区、重链可变区或 CDR 序列，并且每条轻链包含上述的轻链恒定区、轻链可变区或 CDR 序列。本申请的抗 CD40 抗体可以是全长抗体，例如 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型全长抗体。在其他实施方案中，本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分可以是单链可变区 (scFv) 抗体，或抗体片段，例如 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

在一些实施方案中，本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分结合 CD40 (例如，人 CD40 和猴 CD40)。在一些实施方案中，本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分阻断 CD40 与 CD40L 的结合。在一些实施方式中，本申请的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分激活 CD40 信号转导。

优选地，本申请的抗 CD40 抗体是人源化单克隆抗体。此外，或者，本申请的抗 CD40 抗体可以是例如，嵌合单克隆抗体。

本申请示例性的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的重/轻链可变区的氨基酸序列 ID 汇总于下表 1 中，一些抗体具有相同的 V<sub>H</sub> 或 V<sub>L</sub>。抗体的重链恒定区可以是人 IgG1 或 IgG2 重链恒定区，其分别具有如 SEQ ID NO: 27 和 28 所示的氨基酸序列，且抗体的轻链恒定区可以是人  $\kappa$  恒定区，其具有如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。这些抗体也可以包含小鼠 IgG1 或 IgG2 重链恒定区，和/或小鼠  $\kappa$  恒定区。

表 1. 重/轻链可变区的氨基酸序列 ID

抗体	V <sub>H</sub> CDR1	V <sub>H</sub> CDR2	V <sub>H</sub> CDR3	V <sub>H</sub>	V <sub>L</sub> CDR1	V <sub>L</sub> CDR2	V <sub>L</sub> CDR3	V <sub>L</sub>
C1H1	1	4	7	19	10	13	16	23
huC1H1-V1	1	4	7	20, X1=A	10	13	16	24, X1=K, X2=F
huC1H1-V2	1	4	7	20, X1=S	10	13	16	24, X1=K, X2=F
huC1H1-V3	1	4	7	20, X1=A	10	13	16	24, X1=Y, X2=Y
huC1H1-V4	1	4	7	20, X1=S	10	13	16	24, X1=Y, X2=Y
1A3	2	5	8	21	11	14	17	25
1D1	3	6	9	22	12	15	18	26

表 1 中的重链可变区 CDR 和轻链可变区 CDR 已由 Kabat 编号系统定义。然而,如本领域所熟知的,CDR 区也可以基于重/轻链可变区序列由其他编号系统例如 Chothia、IMGT、AbM 或 Contact 编号系统/方法确定。本领域技术人员应当理解的是,除非另有规定,否则术语给定抗体或其区(例如可变区)的“CDR”及“互补决定区”应了解为涵盖通过任何一种已知方案界定的互补决定区。虽然本公开中请求保护的范围是基于表 1 示出的序列,但是根据其它 CDR 编号系统所定义的氨基酸序列也应当落在本公开的保护范围内。

与人 CD40 结合的其他抗 CD40 抗体的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 序列(或 CDR 序列)可以与本申请的抗 CD40 抗体的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 序列(或 CDR 序列)“混合并配对”。优选地,当 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 链(或这些链中的 CDR)混合并配对时,来自特定 V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> 对中的 V<sub>H</sub> 序列被结构相似的 V<sub>H</sub> 序列取代。同样地,优选将来自特定 V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> 对中的 V<sub>L</sub> 序列替换为结构相似的 V<sub>L</sub> 序列。

因此,在一个实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合部分包含:

- (a) 重链可变区,其包含列于表 1 中的氨基酸序列;和
- (b) 轻链可变区,其包含列于表 1 中的氨基酸序列,或另一种抗 CD40 抗体的 V<sub>L</sub>,其中所述抗体特异性结合人 CD40。

在另一个实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合部分包含:

- (a) 列于表 1 中的重链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3;和
- (b) 列于表 1 中的轻链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3,或另一种抗 CD40 抗体的 CDR,其中所述抗体特异性结合人 CD40。

在另一个实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合部分包括本申请的抗 CD40 抗体的重链可变区 CDR2 以及其他结合人 CD40 的抗体的 CDR,例如来自另一种抗 CD40 抗体的重链可变区 CDR1 和/或 CDR3,和/或轻链可变区 CDR1、CDR2 和/或 CDR3。

此外,本领域所熟知的是,不依赖于 CDR1 和/或 CDR2 结构域,单独的 CDR3 结构域可以确定抗体对同源抗原的结合特异性,并且基于共同的 CDR3 序列可以预测性地产生具有相同结合特异性的多种抗体。

因此,在另一个实施方案中,本申请的抗体包含本申请的抗 CD40 抗体的重链可变区 CDR2 以及至少本申请的抗 CD40 抗体的重链可变区和/或轻链可变区 CDR3,或另一种抗 CD40 抗体的重链可变区和/或轻链可变区 CDR3,其中该抗体特异性结合人 CD40。这些抗体优选与本申请的抗 CD40 抗体 (a) 竞争结合 CD40; (b) 保留功能特性; (c) 结合相同表位; 和/或 (d) 具有相似的结合亲和力。在另一个实施方案中,本申请的抗体还可以包含本申请的抗 CD40 抗体的轻链可变区 CDR2,或者另一种抗 CD40 抗体的轻链可变区 CDR2,其中该抗体特异性结合人 CD40。在另一个实施方案中,本申请的抗体还可以包括本申请的抗 CD40 抗体的重链可变区和/或轻链可变区 CDR1,或另一种抗 CD40 抗体的重链可变区和/或轻链可变区 CDR1,其中该抗体特异性结合人 CD40。

在另一个实施方案中,本申请的抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中,这些 CDR 序列不同于本申请的抗 CD40 抗体的 CDR 序列,所述不同是源于一个或多个保守修饰。本领域中应理解,某些保守的序列修饰不会使抗原结合性消失。

因此,在一个实施方案中,本申请的抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,其中:

- (a) 重链可变区 CDR1 序列包含表 1 中列出的序列,和/或其保守修饰;和/或
- (b) 重链可变区 CDR2 序列包含表 1 中列出的序列,和/或其保守修饰;和/或
- (c) 重链可变区 CDR3 序列包含表 1 中列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

(d) 轻链可变区 CDR1、和/或 CDR2、和/或 CDR3 序列包含表 1 中列出的序列，和/或其保守修饰；和 (e) 该抗体特异性结合人 CD40。

术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变抗体结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本申请的抗体中，例如点突变和 PCR 介导的突变。保守氨基酸替换是指将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基组在本领域中已知。这些氨基酸残基组包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 $\beta$ -支链侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，本申请的抗体的 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链组的其他氨基酸残基替换，且得到的抗体可以使用本申请所述的功能检测对其进行保留功能测试。

在另一些实施方案中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分选自：Dacetuzumab、Lucatumumab、APX005M、CDX-1140 (Celldex)、GEN-1042 (BioNTech; Genmab)、Selicrelumab、SEA-CD40 (Seagen)、2141-v11 (AbbVie)、ChiLob7/4 (BioNTech)、Mitazalimab、Vanalimab、Gilorlimab、LVGN-7409 (礼进生物)、LVGN-7408 (礼进生物)、YH003 (祐和医药)、SHR-1704 (恒瑞医药)、MIL97 (天广实生物)、Iscalimab、Bleselumab、Ravagalimab，或以上抗体的抗原结合部分。

#### 抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物

在一些实施方案中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物的单剂量包括 2 mg 至 20 mg，例如 2 mg、4 mg、6 mg、8 mg、10 mg、12 mg、14 mg、16 mg、18 mg 或 20 mg 的抗 CD40 抗体或其抗原结合部分。

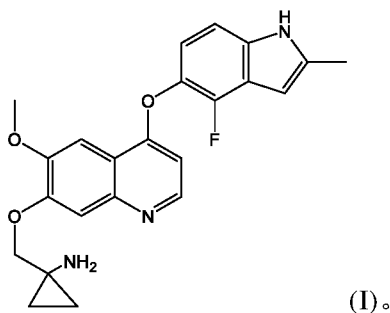
在一些实施方案中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物包含抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和任何数量的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠或乳化剂、固体粘合剂、分散或混悬剂、增溶剂、着色剂、矫味剂、包衣、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂及其组合。合适的赋形剂的选择和使用在 Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003) 中教导，其公开的内容通过引用的方式并入本文。

抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠道外、脊柱或表皮施用（例如通过注射或输注）。基于给药途径，可以将活性成分包被在材料中，以保护其不受酸和可能使其失活的其他自然条件的影响。本文所用的短语“肠道外施用”是指除肠内和局部施用以外的施用方式，通常采用注射，并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者，抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物可以通过非肠道外途径施用，例如局部、表皮或粘膜途径施用，如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。还可以执行施用，例如，一次、多次，和/或在—个或多个延长的时间段中。

在一个具体实施方案中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物为水溶性注射液，所述水溶性注射液包括但不限于未经冻干的水溶性制剂或冻干粉重构的水溶性制剂。在另一些实施方案中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的药物组合物为冻干制剂。所述冻干制剂是指水溶液经历冻干过程制备的制剂，在该过程中物质首先被冷冻，然后先通过升华降低溶剂数量（初级干燥过程），然后通过脱附作用降低溶剂数量（二级干燥过程），直到溶剂数量为不再支持生物学活性或化学反应的值。本申请的冻干制剂还可以通过本领域已知的其它方法干燥，如喷雾干燥和鼓泡干燥 (bubble drying)。

安罗替尼或其药学上可接受的盐

如本申请所用，所述安罗替尼（即，式 (I) 的化合物）的化学名为 1-[[[4-(4-氟-2-甲基-1H-吡咯-5-基)氧基-6-甲氧基喹啉-7-基]氧基]甲基]环丙胺，其具有如下的结构式：



本申请中，凡是涉及安罗替尼，均是指式(I)化合物。

安罗替尼可以以其游离碱的形式给药，也可以以其盐、水合物和前药的形式给药，该前药在体内转换成安罗替尼的游离碱形式。例如，安罗替尼的药学上可接受的盐也在本发明的范围内，可按照本领域公知的方法由不同的有机酸和无机酸产生所述盐。

进一步的，安罗替尼的药学上可接受的盐为式(I)化合物与任意如下酸所形成的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、己酸、庚酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、对氯苯磺酸、对甲苯磺酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、十二烷基硫酸、葡糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸；优选为盐酸盐或马来酸盐的形式，更优选为二盐酸盐。

在一些实施方案中，以安罗替尼盐酸盐的形式给药。在一些实施方案中，以安罗替尼一盐酸盐的形式给药。在一些实施方案中，以安罗替尼二盐酸盐的形式给药。在一些实施方案中，以安罗替尼盐酸盐的晶体形式给药。在特定的实施方案中，以安罗替尼二盐酸盐的晶体形式给药。

本申请中涉及的安罗替尼或其盐的剂量，除非另有说明，均基于安罗替尼游离碱计算。

#### 安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物

在一些实施方案中，所述安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物的单剂量包括 6mg、8mg、10mg、或 12mg 的安罗替尼。

在一些实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物包括但不限于适合口服、肠道外、局部给药的制剂。在一些实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物优选为适于口服的制剂，包括片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、滴丸、糊剂、散剂等，优选片剂和胶囊剂。其中片剂可以是普通片剂、分散片、泡腾片、缓释片、控释片或肠溶片，胶囊剂可以是普通胶囊、缓释胶囊、控释胶囊或肠溶胶囊。所述的口服的制剂可使用本领域公知的药学上可接受的载体通过常规方法制得。药学上可接受的载体包括填充剂、吸收剂、润湿剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等。填充剂包括淀粉、乳糖、甘露醇、微晶纤维素等；吸收剂包括硫酸钙、磷酸氢钙、碳酸钙等；润湿剂包括水、乙醇等；粘合剂包括羟丙甲纤维素、聚维酮、微晶纤维素等；崩解剂包括交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、表面活性剂、低取代羟丙基纤维素等；润滑剂包括硬脂酸镁、滑石粉、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、微粉硅胶、滑石粉等。药用辅料还包括着色剂、甜味剂等。

在一个实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物是适于口服的固体制剂。在一个实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物可以是片剂或胶囊的形式。在一个特定实施方案中，安罗替尼或其药学上可接受的盐的药物组合物是胶囊的形式。在一个特定实施方案中，口服固体制剂的药学上可接受的载体包括甘露醇、微晶纤维素、羟丙纤维素、硬脂酸镁。

#### 化疗药物

如本申请所用，所述第三治疗剂可以是本领域已知的癌症治疗剂，例如化疗药物。

在一个实施方式中，所述化疗药物为烷化剂、鬼臼类药物、铂类药物、氟嘧啶衍生物、胞嘧啶衍生物、紫杉烷类药物、喜树碱类药物、葱环类药物、长春碱类药物中的一种或多种。本申请所述的化疗药物还包括培美曲塞、丝裂霉素、甲氨蝶呤、米托蒽醌、苯达莫司汀、替莫唑胺、Sapacitabine、替吉奥和 encequidar 中的一种或多种。在一个实施方案中，所述烷化剂为环磷酰胺、异环磷酰胺、卡氮芥、美法仑中的一种或多种。在一个实施方案中，所述鬼臼类药物为依托泊苷、替尼铂苷、表鬼臼毒吡喃葡萄糖甙中的一种或多种。在一个实施方案中，所述胞嘧啶衍生物为阿糖胞苷、吉西他滨、阿扎胞苷中的一种或多种。在一个实施方案中，所述铂类药物为奥沙利铂、顺铂、卡铂、奈达铂和双环铂中的一种或多种。在一个实施方案中，所述氟嘧啶衍生物为吉西他滨、卡培他滨、氟尿嘧啶、双呋氟尿嘧啶、去氧氟尿苷、替加氟、卡莫氟和三氟尿苷中的一种或多种。在一个实施方案中，所述紫杉烷类为紫杉醇、白蛋白结合的紫杉醇以及多烯紫杉醇中的一种或多种。在一个实施方案中，所述喜树碱类为喜树碱、羟基喜树碱、伊立替康和拓扑替康中的一种或多种。在一个实施方案中，所述葱环类为阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、吡柔比星、氨柔比星和阿克拉霉素中的一种或多种。在一个实施方案中，所述的长春碱类为长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春地和长春富宁中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述化疗药物按照已知的给药方式（包括给药剂量、给药途径和给药方案）给药。

### 癌症

本申请所述“癌症”是指由异常细胞生长引起的任何恶性和/或侵袭性生长或肿瘤，包括以形成它们的细胞类型命名的实体瘤、血癌、骨髓癌或淋巴系统癌。术语“癌症”包括但不限于源于体内特定部位的原发癌、已从其起始位置扩散到身体其它部位的转移癌、原始原发癌在缓解后的复发、和第二原发癌（之前有不同类型的癌症史的人的新发原发癌）。

在某些方面中，本申请所述癌症为实体瘤。在一些实施方案中，所述实体瘤包括但不限于：皮肤癌如黑色素瘤和肉瘤、胰腺癌、结直肠癌如结直肠腺癌、食管癌、胃肠道癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫癌如子宫颈癌和子宫内膜癌、乳腺癌如三阴性乳腺癌、肺癌如小细胞肺癌和非小细胞肺癌、甲状腺癌、鼻咽癌和肝癌。

在某些方面中，本申请所述癌症为 B 细胞恶性肿瘤。术语“B 细胞恶性肿瘤”包括从 B 细胞谱系的细胞衍生的任何恶性肿瘤。在一些实施方案中，所述 B 细胞恶性肿瘤包括白血病和淋巴瘤，其中包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、B 细胞淋巴瘤、高级 B 细胞淋巴瘤、中级 B 细胞淋巴瘤、低级 B 级淋巴瘤、B 细胞急性淋巴细胞白血病、霍奇金氏淋巴瘤、浆细胞瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡性小裂性淋巴瘤、滤泡性大细胞淋巴瘤、滤泡混合性小裂性淋巴瘤、弥漫性小裂性细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤、单核细胞样 B 细胞淋巴瘤、脾脏淋巴瘤、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、纵隔大 B 细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、血管内淋巴瘤、混合性淋巴瘤、免疫母细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和套细胞淋巴瘤。

在某些方面中，本申请所述癌症为非 B 细胞血液恶性肿瘤。在一些实施方案中，所述非 B 细胞血液恶性肿瘤包括但不限于慢性髓性白血病和急性髓性白血病。

### 施用方式

下述内容并非限制本申请药物组合的施用方式。

本申请的药物组合中的组分可以各自独立地、或者其中的部分或全部共同以适合的各种途径施用，包括但不限于，口服或肠胃外（通过静脉内、肌内、局部或皮下途径）施用。在一些实施方案中，本申请的药物组合的组分可以各自独立地、或者其中的部分或全部共同口服施用或注射施用，例如肌肉注射、

静脉注射、皮下注射、瘤内注射或腹腔注射。

本申请的药物组合中的组分可以各自独立地、或者其中的部分或全部共同制备为适合的剂型，包括但不限于，片剂、含片、丸剂、胶囊剂（例如硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂）、酞剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂（例如肌肉内、静脉内、皮下、瘤内或腹腔内）、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液、分散剂和用于口服或非口服给药的缓释制剂的剂型。

本申请的药物组合中的组分可以各自独立地、或者其中的部分或全部共同含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

#### 技术效果

通常，使用上述的本申请的药物组合将有助于：

- (1) 与单独给予该药物组合中的任一药物相比，在减少肿瘤的生长或甚至消除肿瘤方面产生更好的疗效；
- (2) 与该药物组合中的任一药物单独给药相比，提供更少量的给药；
- (3) 提供在患者中具有良好耐受的治疗，与单一给予该组合中的任一药物相比，其不良反应和/或并发症更少；
- (4) 提供在所治疗患者之中的更好的疾病控制率；
- (5) 提供在所治疗的患者具有更长的生存期（例如中位生存期、无进展生存期或总生存期）；
- (6) 相比于标准的化疗而言，所治疗患者具有更长的生存期（例如中位生存期、无进展生存期或总生存期）；
- (7) 提供更长时间的疾病缓解持续时间（DOR）；和/或
- (8) 与单独给予该药物组合中的任一药物相比，具有良好的抗癌活性，表现出更优异的抗癌协同作用。

#### 定义和说明

为了更好地理解本发明，首先定义一些术语。其他定义则贯穿详述部分而列出。除非另有说明，本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照本领域普通的含义去理解。当本申请中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

术语“CD40”是指肿瘤坏死因子受体超家族成员 5（TNFR5）。术语“CD40”包括变体、亚型、同系物、直系同源物和旁系同源物。例如，在某些情况下，对人 CD40 蛋白具有特异性的抗体可与人以外的物种（例如猴）的 CD40 蛋白发生交叉反应。在其他实施方案中，对人 CD40 蛋白具有特异性的抗体可以对人 CD40 蛋白完全特异，并且不与其他物种或其他类型的蛋白发生交叉反应，或者可以与来源于某些其他物种但并非所有其他物种的 CD40 发生交叉反应。

术语“人 CD40”是指具有人的氨基酸序列的 CD40 蛋白，例如 Genbank 登录号为 NP\_001241.1 的人 CD40 的氨基酸序列（Amini M *et al.*, (2020) *Life Sci* 254: 117774）。术语“猴或恒河猴 CD40”和“小鼠 CD40”分别是指猴 CD40 序列和小鼠 CD40 序列，例如，其分别具有 Genbank 登录号为 Nos. NP\_001252791.1 和 NP\_035741.2 的氨基酸序列。

术语“免疫应答”是指如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子（包括抗体、细胞因子和补体）在人体中选择性损害、破坏或清除侵入病原体、感染了病原体的细胞或组织、癌细胞、或者自体免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织的作用。

术语“抗体”是指通过至少一个抗原结合位点识别并特异性结合靶标（如 CD40）的免疫球蛋白分子，其中所述抗原结合位点通常位于免疫球蛋白分子的可变区内。如本文所用，术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、单链 Fv（scFv）抗体、重链抗体（HCAs）、轻链抗体（LCAs）、多特异性抗体、双特异性抗体、单特异性抗体、单价抗体、包含抗体的抗原结合位点的融合蛋白、以及任

何其他包含抗原结合位点的经修饰的免疫球蛋白分子（例如，双可变结构域免疫球蛋白分子），只要该抗体展现出所需的生物学活性即可。抗体还包括但不限于小鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体。根据抗体重链恒定区（分别被称为  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ ）的特征，抗体可以是免疫球蛋白五种主要类别中的任何一种：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，或其亚类（同种型）（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）。不同种类的免疫球蛋白具有不同且本领域熟知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸抗体或与其他分子缀合的，包括但不限于毒素和放射性同位素。除非另有明确说明，否则本文所用的术语“抗体”包括完整抗体的“抗原结合部分”。IgG 是包含两条重（H）链和两条轻（L）链的糖蛋白，其中重链和轻链通过二硫键连接。每条重链由重链可变区（简称  $V_H$ ）和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成，即  $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  和  $C_{H3}$ 。每条轻链由轻链可变区（简称  $V_L$ ）和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域  $C_L$  构成。 $V_H$  和  $V_L$  区还可以进一步划分为称作互补决定区（CDR）的高变区，其由较为保守的骨架区（FR）区分隔。每个  $V_H$  和  $V_L$  由三个 CDR 以及四个 FR 构成，从氨基端到羧基端以 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述宿主组织或因子包括多种免疫系统细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q）。

抗体的“抗原结合部分”（或简称“抗体部分”），是指抗体中保留特异性结合抗原（例如，CD40 蛋白）能力的一个或多个片段。已证实，抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实现。涵盖在抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括：(i) Fab 片段，由  $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  和  $C_{H1}$  结构域构成的单价片段；(ii)  $F(ab')_2$  片段，包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由  $V_H$  和  $C_{H1}$  结构域构成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂  $V_L$  和  $V_H$  结构域构成的 Fv 片段；(v) 由  $V_H$  结构域构成的 dAb 片段（Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546）；(vi) 分离的互补决定区（CDR）；以及 (vii) 纳米抗体，即一种包含单个可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外，尽管 Fv 片段的两个结构域  $V_L$  和  $V_H$  由不同的基因编码，可以利用重组的方法通过合成接头将  $V_H$  和  $V_L$  连接成单蛋白链，其中  $V_L$  和  $V_H$  区配对形成单价分子（称为单链 Fv（scFv）；参见例如 Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426；和 Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883）。这样的单链抗体也涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段可以通过本领域技术人员已知的常用技术获得，且可以通过与完整抗体相同的方式进行功能筛选。

术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如，特异性结合 CD40 蛋白的分离抗体基本上不含特异性结合 CD40 蛋白以外抗原的抗体）。但是，特异性结合人 CD40 蛋白的分离抗体可能对其他抗原例如其他物种的 CD40 蛋白具有交叉反应性。此外，分离的抗体基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

术语“小鼠抗体”是指可变区中骨架区和 CDR 区均来自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外，如果抗体包含恒定区，则恒定区也来自小鼠种系免疫球蛋白序列。本发明的小鼠抗体可以包含不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机突变或点突变、或通过体内体细胞突变而引入的突变）。但本文所用的术语“小鼠抗体”不包括在小鼠骨架区序列中插入来自其他哺乳动物物种的 CDR 序列的抗体。

术语“嵌合抗体”是指通过组合非人来源的遗传物质与人来源的遗传物质而得来的抗体。或者更笼统地说，嵌合抗体是指组合某一物种的遗传物质与另一物种遗传物质的抗体。

术语“人源化抗体”是指来源于非人物种但其蛋白序列已经被修改以增加其与人天然抗体的相似度的抗体。

“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体/对抗原具有特异性的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

“特异性结合人 CD40”的抗体或其抗原结合部分是指与人 CD40 蛋白（可能还包括一个或多个非人物种的 CD40 蛋白）结合但基本不与非 CD40 蛋白结合的抗体。优选地，抗体以“高亲和力”结合人 CD40 蛋白，即以  $5.0 \times 10^{-8}$  M 或更小，优选为  $1.0 \times 10^{-8}$  M 或更小的  $K_D$  结合人 CD40 蛋白。

术语“基本不结合”蛋白或细胞是指不与蛋白或细胞结合，或者不以高亲和力与其结合，即以  $1.0 \times 10^{-6}$  M 或更大，优选为  $1.0 \times 10^{-5}$  M 或更大，更优选为  $1.0 \times 10^{-4}$  M 或更大，更优选为  $1.0 \times 10^{-3}$  M 或更大，甚至更优选为  $1.0 \times 10^{-2}$  M 或更大的  $K_D$  结合蛋白或细胞。

术语“高亲和力”对于 IgG 抗体而言，是指对于目标抗原，抗体具有  $1.0 \times 10^{-6}$  M 或更小，优选为  $9.0 \times 10^{-9}$  M 或更小，更优选为  $5.0 \times 10^{-9}$  M 或更小，甚至更优选为  $1.0 \times 10^{-9}$  M 或更小，甚至更优选为  $5.0 \times 10^{-10}$  M 或更小的  $K_D$ 。但是对于其他抗体同种型，“高亲和力”结合可能有所不同。例如，对于 IgM 同种型，“高亲和力”是指抗体具有  $10^{-6}$  M 或更小，优选为  $10^{-7}$  M 或更小，更优选为  $10^{-8}$  M 或更小的  $K_D$ 。

术语“ $K_{assoc}$ ”或“ $K_a$ ”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，而本文所用的术语“ $K_{dis}$ ”或“ $K_d$ ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文所用的术语“ $K_D$ ”是指解离常数，其为  $K_d$  与  $K_a$  之比（即  $K_d/K_a$ ）并用摩尔浓度（M）表示。抗体的  $K_D$  值可以使用本领域熟知的方法测定。测定抗体  $K_D$  值的优选方法是使用表面等离子体共振技术，优选使用生物传感器系统，例如 Biacore™ 系统进行测定。

术语“EC50”，又叫半数最大效应浓度，是指在特定暴露时间后，诱导反应达到基线和最大值之间的一半的抗体浓度。术语“IC50”，又叫半数最大抑制浓度，是指相对于不存在抗体时，将特异性生物学或生化功能抑制 50% 的抗体浓度。

术语“激动性 CD40 抗体”或“激动性抗 CD40 抗体”是指与 CD40 结合并激活或诱导 CD40 信号转导（从而例如促进免疫细胞活化和增殖以及细胞因子和趋化因子产生）的抗 CD40 抗体。而术语“拮抗性 CD40 抗体/拮抗性抗 CD40 抗体”是指阻断或抑制可能由 CD40L 参与诱导的 CD40 信号转导的抗 CD40 抗体。激动性 CD40 抗体通过提高 APC 的抗原递呈能力、活化肿瘤特异性 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞、刺激淋巴细胞和单核细胞分泌细胞因子和趋化因子、增强细胞毒性淋巴细胞和 NK 细胞的肿瘤细胞杀伤作用等，促进肿瘤受试者对肿瘤的先天和适应性免疫应答。

如本文在两个或多个核酸或多肽的背景中所用的百分比“同一性”是指，当以最高对应性进行比较和比对（如果需要的话，引入空位）时，在将或不将保守氨基酸替换作为序列统一性的一部分的情况下，两个或多个具有相同的或具有特定百分比相同的核苷酸或氨基酸残基的序列或子序列。百分比同一性可以使用序列比对软件或算法或通过目测来测量。可用于氨基酸或核苷酸序列比对的各种软件和算法是本领域熟知的，包括但不限于 BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package 及其变换形式。在一些实施方案中，本发明所述的两种核酸或多肽基本上是相同的，是指当以最高对应性进行比较和比对时，使用序列比对算法或目测进行测量，两种核酸或多肽具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%，并且在一些实施方案中具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 的核苷酸或氨基酸残基同一性。

如文本所用，术语“药物组合”是指同时或先后施用的两种或两种以上的活性成分（以各自的活性成分本身的形式施用，或者以其各自的药学上可接受的盐或酯等衍生物、前药或组合物的形式施用）的组合。在本文中，术语“联用药物”和“药物组合”可互换使用。所述活性成分可以各自作为单一制剂同时地、或各自作为单一制剂以任何顺序依次地施用于患者。

术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应的操作。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：（a）抑制疾病的症状，即阻止其发展；或（b）缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

术语“有效量”意指 (i) 治疗特定疾病、病况或障碍, (ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状, 或 (iii) 预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请的化合物的用量。在癌症的情况下, 药物的有效量可减少癌细胞数、缩小肿瘤体积、抑制 (即一定程度的减缓, 优选停止) 癌细胞浸润到周围器官中、抑制 (即一定程度的减缓, 优选停止) 肿瘤转移、一定程度的抑制肿瘤生长、和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。就药物可抑制癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度而言, 它可以是抑制细胞的和/或毒害细胞的。构成“有效量”的活性物质 (例如本申请的化合物) 的量可根据一些因素而变化, 诸如个体的疾病状态、年龄、性别和重量, 以及治疗剂或治疗剂组合在个体中引发所需应答的能力。有效量也可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

术语“施用”表示使用本领域技术人员已知的多种方法和递送系统中的任一种, 向主体物理引入包含治疗剂的组合物。

术语“统一剂量 (flat dose)”的应用是指, 不考虑患者的重量或体表面积 (BSA) 施用给患者的剂量。因此将统一剂量规定为药剂 (例如, 抗 CD40 抗体) 的绝对量, 而不是规定为 mg/kg 剂量。例如, 60 kg 人和 100 kg 人将接受相同剂量的抗体。

术语“固定组合”指活性组分 (例如抗 CD40 抗体或式(I)化合物) 以固定总剂量或剂量比例, 或以单一实体、药物组合物或制剂的形式同时给予受试者。

术语“非固定组合”指两种或以上活性组分作为独立的实体 (例如药物组合物、制剂) 同时、并行或依序且无具体时间限制地给予受试者, 其中所述给予受试者的活性成份达到治疗有效量水平。非固定组合可列举的例子是鸡尾酒疗法, 例如给予 3 种或以上之活性组分。在非固定组合中, 所述各个活性组分可以作为完全独立的药物组合物进行包装、销售或给药。所述“非固定组合”也包括“固定组合”之间、或“固定组合”与任一或多种活性组分的独立实体的联合使用。

术语“药学上可接受的”是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言, 它们在可靠的医学判断的范围之内, 适用于与人类和动物的组织接触使用, 而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症, 与合理的利益/风险比相称。

术语“药学上可接受的盐”包括碱根离子与自由酸形成的盐或酸根离子与自由碱形成的盐, 例如包括盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、富马酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐或对甲基苯磺酸盐, 优选盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、富马酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、对甲基苯磺酸盐、钠盐、钾盐、铵盐、氨基酸盐等。

在本文中, 术语“受试者”或“患者”可互换使用。在一些实施方案中, 术语“受试者”或“患者”是哺乳动物。在部分实施方案中, 所述受试者或患者是小鼠。在部分实施方案中, 所述受试者或患者是人。

如本文所用, “联用”或“联合使用”意指两种或更多种活性物质可以各自作为单一制剂同时地、或各自作为单一制剂以任何顺序依次地施用于受试者。

术语“单剂量”是指含有一定量药品的最小包装单元, 例如一盒药有七粒胶囊, 则每个胶囊为单剂量; 或者每瓶注射液为单剂量。术语“多剂量”由多个单剂量组成。

术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的活性成分或其药物组合与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对受试者给予本申请的化合物或其药物组合。在本文中, 术语“药物组合物”和“制剂”具有相同的含义, 并可互换使用。

如本文中所述的, 任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应当理解为包括在列举的范围内的任意整数的值, 且当适当时, 包括其分数 (诸如整数的十分之一和百分之一), 除非另外指出。

如本文所用, 大约”或“约”表示在本领域普通技术人员判定的对特定值可以接受的误差范围内,

其部分取决于如何测量或测定该值，即测量系统的限制。例如，大约”或“约”按照本领域实践可表示1倍或超过1倍标准偏差以内。或者，大约”或“约”可以表示多至±5%的范围，例如在所给定的具体数值范围±2%范围内、±1%范围内或±0.5%范围内波动。当本申请或权利要求中给出特定值时，除非另有说明，大约”或“约”的含义应认为是在该特定值的可接受的误差范围内。在本文中，除非另有说明，步骤参数或条件的值默认均由“约”修饰。

## 附图说明

图 1A-1C 示出在捕获 ELISA 中，嵌合抗体 1A3 (A)、1D1 (B) 和 C1H1 (C) 与人 CD40 的结合能力。图 2A-2C 示出在基于细胞的报告基因检测中，嵌合抗体 1A3 (A)、1D1 (B) 和 C1H1 (C) 激活 CD40 信号转导的活性。

图 3 示出在捕获 ELISA 中，人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 与人 CD40 的结合能力。

图 4 示出在基于细胞的结合 FACS 中，人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 与表达人 CD40 的 293T 细胞的结合能力。

图 5 示出在竞争 ELISA 中，人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 阻断人 CD40 与 CD40L 结合的能力。

图 6 示出在竞争 ELISA 中，人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 阻断参照品与人 CD40 结合的能力。

图 7 示出在基于细胞的报告基因检测中，人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 激活 CD40 信号转导的活性。

图 8A-B 示出实验结束时(D14)各组小鼠的个体肿瘤体积(A)和个体肿瘤重量(B)。其中，\*\*P<0.01 和 \*\*\*P<0.001 是通过 Mann-Whitney 检验与 IgG2 组比较；\*\*P<0.01 和 \*\*\*P<0.001 是通过双尾 Student's t 检验与 huC1H1-V2+安罗替尼的二盐酸盐组比较；P<0.05 定义为有统计学显著性差异。

## 实施例

为清楚起见，进一步用实施例来阐述本申请，但是实施例并非限制本申请的范围。

本申请中抗 CD40 抗体或其抗原结合部分的制备、纯化方法已在公开号为 PCT/CN2021084013 的专利申请文件中记载，PCT/CN2021084013 专利申请文件的全部内容均引入本申请。

实施例中的小鼠抗 CD40 抗体或小鼠抗 CD40 单克隆抗体是按照 PCT/CN2021084013 专利文件中记载方法，通过杂交瘤技术产生并经体外功能筛选后获得。本申请中的抗 CD40 抗体 huC1H1-V2 即 PCT/CN2021084013 中的抗 CD40 抗体 huC1H1-V2。

### 实施例1 使用BIACORE表面等离子共振技术对抗CD40抗体进行亲和力测定

通过 Biacore T200 系统 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) 对本申请的抗 CD40 抗体的亲和力和结合动力学进行表征。

简而言之，使用 Biacore (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) 提供的标准胺偶联试剂盒，通过伯胺基团将山羊抗人 IgG (GE healthcare, 产品目录 BR100839, 人抗体捕获试剂盒) 共价连接至 CM5 芯片 (来自 GE healthcare 产品目录为 BR100530 的羧甲基化葡聚糖涂层芯片) 上。用乙醇胺封闭生物传感器表面未反应的部分。然后，将浓度为 66.67 nM 的本申请的抗 CD40 抗体和两个参照品抗体 (BM1 (Dacetuzumab, Genentech Inc., 也称为 CD40-BM1, 内部制备, 重链和轻链的氨基酸序列分别如本申请的 SEQ ID NOs: 40 和 41 所示) 和 BM2 (Selicrelumab, Abgenix Inc., 也称为 CD40-BM2, 内部制备, 重链和轻链的氨基酸序列分别如本申请的 SEQ ID NOs: 42 和 43 所示)) 以 10 μL/分钟 的流速流过芯片。然后，将梯度稀释的重组人 CD40-his (Acro biosystems, 产品目录 CD0-H5228, 以 80 nM 为起始浓度, 在 HBS-EP<sup>+</sup>缓冲液 (由 Biacore 提供) 中 2 倍梯度稀释) 或食蟹猴 CD40-his 蛋白 (Acro biosystems, 产品目录 CD0-C52H6, 以 80 nM 为起始浓度, 在 HBS-EP<sup>+</sup>缓冲液 (由 Biacore 提供) 中 2 倍梯度稀释)

以 30  $\mu\text{L}$ /分钟的流速流过芯片。追踪抗原-抗体结合动力学 2 分钟，并追踪解离动力学 10 分钟。使用 BIAcore evaluation 软件将结合和解离曲线拟合至 1:1 Langmuir 结合模型。测定  $K_D$ 、 $K_a$  和  $K_d$  值。

## 实施例 2 抗 CD40 抗体的结合活性

通过捕获 ELISA 和流式细胞术 (FACS) 测定抗 CD40 抗体的结合活性。

对于捕获 ELISA, 溶于 PBS 的浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的亲和纯化山羊抗人 IgG(F(ab')<sub>2</sub>) 片段特异性, Jackson Immuno Research, 产品目录 109-005-097) 以 100  $\mu\text{L}$ /孔包被在 96 孔板中, 于 4°C 孵育过夜。用洗涤缓冲液 (PBS + 0.05% v/v Tween-20, PBST) 洗涤板 1 次, 然后加入 200  $\mu\text{L}$ /孔的封闭缓冲液 (含 5% w/v 脱脂牛奶的 PBST), 于 37°C 封闭 2 小时。洗涤板 4 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  梯度稀释 (以 66.7 nM 为起始浓度, 在含 2.5% w/v 脱脂牛奶的 PBST 中 5 倍梯度稀释) 的本申请的抗 CD40 抗体、BM1、BM2 和阴性对照品 hIgG (用于静脉注射的人免疫球蛋白 (pH 4), Hualan Biological Engineering Inc.), 于 37°C 孵育 40 分钟, 然后再次洗涤板 4 次。在捕获有抗 CD40 抗体的 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$ /孔的生物素标记的人 CD40-Fc 蛋白 (SEQ ID NO: 30 的第 21-193 位氨基酸残基连接至 SEQ ID NO: 28 的第 99-330 位氨基酸残基的 N 末端, 溶于含 2.5% w/v 脱脂牛奶的 PBST 中, 浓度为 1.15 nM), 于 37°C 孵育 40 分钟, 洗涤板 4 次, 然后加入 100  $\mu\text{L}$ /孔的 HRP 标记链霉亲和素 (在 PBST 中以 1:10000 的比例稀释, Jackson Immuno Research, 产品目录 016-030-084), 于 37°C 孵育 40 分钟。最后一次洗涤后, 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔的 ELISA 底物 TMB (Innorenagents, 产品目录 TMB-S-002) 于室温进行孵育。3-10 分钟后, 加入 50  $\mu\text{L}$ /孔的 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 并在酶标仪上用双波长模式 (TMB 检测波长 450 nm, 参比波长 630 nm) 读取每个孔的吸光度值, 然后用 OD (450-630) 值与抗体浓度作图。使用 Graphpad Prism 软件分析数据, 并得到 EC50 值。

通过流式细胞术 (FACS) 检测抗 CD40 抗体与 293T-CD40 细胞的结合, 其中 293T-CD40 细胞由 Biosion 内部制备, 其细胞膜稳定表达全长人 CD40 (uniprot#P25942-1, SEQ ID NO: 30)。按照 lipofectamine 3000 转染试剂 (Thermo Fisher) 的说明, 将 *EcoRI* 和 *XbaI* 位点之间插入了 CD40 编码序列的 pCMV-T-P 质粒转染至 293T 细胞, 来制备 293T-CD40 细胞。具体而言, 从细胞培养瓶中收获 293T-CD40 细胞, 洗涤两次后重悬于 FACS 缓冲液 (含有 2% v/v 胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (PBS)) 中。在含有  $2 \times 10^5$  个细胞/孔的 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 FACS 缓冲液梯度稀释 (以 80 nM 为起始浓度, 4 倍梯度稀释) 的本申请的抗 CD40 抗体或对照品, 冰浴 40 分钟。将细胞用 FACS 缓冲液洗涤两次后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  R-藻红蛋白标记的亲和纯化山羊抗人 IgG (Fc $\gamma$  片段特异性, Jackson Immuno Research, 产品目录 109-115-098, 在 FACS 缓冲液中以 1:1000 的比例稀释)。于 4°C 避光孵育 40 分钟后, 将细胞洗涤 3 次后重悬于 FACS 缓冲液中。使用 Becton Dickinson FACS Canto II-HTS 测量荧光值, 并用荧光值与抗体浓度作图。使用 Graphpad Prism 软件分析数据, 并得到 EC50 值。

## 实施例 3 抗 CD40 抗体对 CD40-CD40L 结合或 CD40-参照品结合的阻断活性

### 3.1 配体阻断 ELISA

通过竞争 ELISA 测定抗 CD40 抗体阻断 CD40 与 CD40L 结合的能力。简而言之, 溶于包被缓冲液 (碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液) 的浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人 CD40-Fc 蛋白 (SEQ ID NO: 30 的第 21-193 位氨基酸残基连接至 SEQ ID NO: 28 的第 99-330 位氨基酸残基的 N 末端) 以 100  $\mu\text{L}$ /孔包被于 96 孔板中, 于 4°C 孵育过夜。第二天, 用洗涤缓冲液 (PBS + 0.05% v/v Tween-20, PBST) 洗涤板 1 次, 并加入含 5% w/v 脱脂牛奶的 PBST, 于 37°C 中封闭 2 小时。然后, 用洗涤缓冲液洗涤板 4 次。

用含 2.5% w/v 脱脂牛奶的 PBST 梯度稀释 (以 200 nM 为起始浓度, 5 倍梯度稀释) 本申请的抗 CD40 抗体或对照品, 并将梯度稀释的抗 CD40 抗体或对照品以 100  $\mu\text{L}$ /孔添加到包被有 CD40-Fc 蛋白的板中,

于 37°C 孵育 40 分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板 4 次，然后每孔加入 100  $\mu$ L 浓度为 95 ng/mL 的生物素标记的人 CD40L-his 蛋白 (Sino biological Inc., 产品目录 10239-H08E)，于 37°C 孵育 40 分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板。接着，将 100  $\mu$ L/孔的 HRP 标记链霉亲和素 (Jackson Immunoresearch, 产品目录 016-030-084, 在 PBST 缓冲液中以 1:10000 的比例稀释) 加到板中，于 37°C 孵育 40 分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板。最后，加入 TMB，并用 1 M  $H_2SO_4$  终止反应，并在酶标仪上用双波长模式 (TMB 检测波长 450 nm, 参比波长 630 nm) 读取每个孔的吸光度值，然后用 OD (450-630) 值与抗体浓度作图。使用 Graphpad Prism 软件分析数据，并得到 IC50 值。

### 3.2 参照品阻断 ELISA

通过竞争 ELISA 测定本申请的抗 CD40 抗体阻断参照品与人 CD40 结合的能力。简而言之，溶于 PBS 的浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 BM2 以 100  $\mu$ L/孔包被于 96 孔板中，于 4°C 孵育过夜。第二天，用洗涤缓冲液洗涤板 1 次，并加入封闭缓冲液 (含 5% w/v 脱脂牛奶的 PBST)，于 37°C 封闭 2 小时。在封闭 96 孔板期间，用生物素标记的人 CD40-Fc 蛋白 (SEQ ID NO: 30 的第 21-193 位氨基酸残基连接至 SEQ ID NO: 28 的第 99-330 位氨基酸残基的 N 末端，溶于含 2.5% w/v 脱脂牛奶的 PBST 中，浓度为 0.23 nM) 稀释本申请的抗 CD40 抗体或对照品，以 66.7 nM 为起始浓度，5 倍梯度稀释，然后于室温孵育 40 分钟。洗涤板 4 次后，将 100  $\mu$ L/孔的抗体/生物素标记的人 CD40-Fc 混合物加到包被有 BM2 的板中。于 37°C 孵育 40 分钟后，再次用洗涤缓冲液洗涤板 4 次。然后将 100  $\mu$ L/孔的 HRP 标记链霉亲和素加到板中，于 37°C 孵育 40 分钟，以检测结合到板上的生物素标记的人 CD40-Fc。再次用洗涤缓冲液洗涤板 4 次。最后，加入 TMB，并用 1 M  $H_2SO_4$  终止反应，并在酶标仪上用双波长模式 (TMB 检测波长 450 nm, 参比波长 630 nm) 读取吸光度值，然后用 OD (450-630) 值与抗体浓度作图。使用 Graphpad Prism 软件分析数据，并得到 IC50 值。

### 实施例 4 抗 CD40 抗体基于细胞的报告基因检测

使用稳定表达全长人 CD40 (uniprot No. P25942-1, SEQ ID NO: 30) 的 CD40 表达报告基因细胞系 293T-NF- $\kappa$ B-Luc-CD40 进一步测定本申请的抗 CD40 抗体的激动活性。按照 lipofectamine 3000 转染试剂 (Thermo Fisher) 的说明，先后将 pGL4.32[luc2P NF- $\kappa$ B-RE Hygro]载体 (Promega, GenBank® 登录号: EU581860) 和 pCMV-T-P 质粒 (*EcoRI* 和 *XbaI* 位点之间插入了 CD40 编码序列) 转染至 293T 细胞，制备 293T-NF- $\kappa$ B-Luc-CD40 细胞。当 CD40 激动剂与细胞接触后，其中 CD40 信号转导被激活，荧光素酶的表达上调，并且能够用发光检测测定出来。

简而言之，将对数期的 293T-NF- $\kappa$ B-Luc-CD40 细胞重悬于含 10% FBS (Gibco, 产品目录 10099-141) 的 DMEM 培养基 (Gibco Inc., 产品目录 10566-016) 中，并以 20  $\mu$ L/孔 (含  $5 \times 10^3$  个细胞) 接种至 384 孔细胞培养板 (Corning, 产品目录 3707)。然后，每孔加入 20  $\mu$ L 梯度稀释 (以 200 nM 为起始浓度，在培养基中 3 倍梯度稀释) 的本申请的抗 CD40 抗体或对照品 (包括内部制备的阴性对照品抗 CD22 抗体)，于 37°C 孵育 6 小时。然后，每孔加入 30  $\mu$ L ONE-Glo™ 荧光素酶检测系统 (Promega, 产品目录 E6120) 的试剂，并于室温孵育 5 分钟。使用 Tecan Infinit® 200 Pro 测量化学发光值。使用 Graphpad Prism 软件分析数据，并得到 EC50 值。

### 实施例 5 嵌合抗体的产生和表征

将小鼠抗 CD40 单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区进行了测序并汇总于表 1 中。

将小鼠抗 CD40 单克隆抗体 CIH1、1D1 和 1A3 的重链可变区和轻链可变区分别克隆至含人 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 27) 的片段中和含人  $\kappa$  轻链恒定区 (SEQ ID NO: 29) 的片段中，其中可变区的 C 末端与相应恒定区的 N 末端相连。

包含编码连接至人 IgG1 重链恒定区的重链可变区的核苷酸的载体，和包含编码连接至人  $\kappa$  轻链恒定区的轻链可变区的核苷酸的载体，按 1.1:1 的轻链构建体：重链构建体的比例，用 1 mg/mL PEI 瞬时转染至 50 mL 293F 悬浮细胞中。

在摇瓶中培养六天后收获细胞上清液，通过离心沉淀上清液中的细胞，然后通过蛋白 A 琼脂糖柱从细胞上清液中纯化嵌合抗体。按照前述实施例中的方案，通过捕获 ELISA、Biacore 亲和力测定和基于细胞的报告基因检测纯化的嵌合抗体。结果如表 2、图 1A-1C 和图 2A-2C 所示。

结果显示，嵌合抗体与其亲本抗体具有相似的结合能力和激动活性。特别地，与 BM1 相比，嵌合抗体 C1H1 对人 CD40 具有更高的结合亲和力和能力，且对食蟹猴 CD40 具有更高的结合亲和力。

表 2. 嵌合抗体的结合亲和力

克隆 ID#	Biacore 动力学					
	人 CD40-his			食蟹猴 CD40-his		
	$K_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$K_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)
小鼠 C1H1	1.79E+06	0.001227	6.84E-10	1.39E+06	0.001184	8.52E-10
嵌合 C1H1	1.82E+06	0.001567	8.61E-10	1.39E+06	0.001478	1.06E-09
BM1	7.39E+05	0.006556	8.87E-09	6.23E+05	0.006164	9.89E-09

### 实施例 6 小鼠抗 CD40 单克隆抗体 C1H1 的人源化

选择小鼠抗 CD40 抗体 C1H1 进行人源化和进一步的研究。该抗体的人源化是采用业已成熟的 CDR 移植方法进行的，如下所述。

为了选择用于小鼠抗 CD40 抗体 C1H1 人源化的接收体骨架，将小鼠抗 CD40 抗体 C1H1 轻链可变区和重链可变区的序列与人免疫球蛋白基因数据库进行 BLAST 比对。选择与小鼠抗 CD40 抗体 C1H1 具有最高同源性的人种系抗体作为人源化的接收体骨架。将小鼠抗体的重/轻链可变区 CDR 插入到选出的骨架中，并进一步突变骨架中的残基以获得更多候选的重/轻链可变区。总共获得 4 个人源化 C1H1 抗体，即 huC1H1-V1 至 huC1H1-V4，其重/轻链可变区序列如表 1 中所示。

包含编码连接至人 IgG2 重链恒定区 (SEQ ID NO: 28) 的重链可变区的核苷酸的载体，和包含编码连接至人  $\kappa$  轻链恒定区 (SEQ ID NO: 29) 的人源化轻链可变区的核苷酸的载体，按 60%:40% 的轻链构建体：重链构建体的比例，用 1 mg/mL PEI 瞬时转染至 50 mL 293F 悬浮细胞中。

### 实施例 7 人源化抗体的表征

在摇瓶中培养六天后，收获分别含有人源化抗体 huC1H1-V1 至 huC1H1-V4 的细胞上清液，并使用 Octet 系统 (ForteBio, Octet RED 96)，按照下述方案通过 Octet 测定抗体与人 CD40 的结合亲和力。简而言之，将抗人 IgG Fc 捕获 (AHC) 的生物传感器 (来自 ForteBio) 用 10 mM 甘氨酸 (pH 1.5) 预浸泡 3 秒，再浸入运行缓冲液 (含 0.5% w/v BSA 的 PBST) 中 3 秒，浸泡和浸入的步骤重复 3 次。然后，将传感器浸入含有人源化抗 CD40 抗体的细胞上清液、溶于 HBS-EP<sup>+</sup> 缓冲液的浓度为 5  $\mu$ g/mL 的嵌合抗体 C1H1、或溶于 HBS-EP<sup>+</sup> 缓冲液的浓度为 5  $\mu$ g/mL 的参照品中 120 秒，之后浸入运行缓冲液中 5 分钟。新基线在运行缓冲液中运行 180 秒。然后将传感器浸入以运行缓冲液梯度稀释的人 CD40-his 蛋白 (Acro biosystems, 产品目录 CD0-H5228, 以 40 nM 为起始浓度, 2 倍梯度稀释) 中 120 秒，然后浸入运行缓冲液中 10 分钟以建立基线。最后，将传感器用 10 mM 甘氨酸 (pH 1.5) 预浸泡 3 秒，再浸入运行缓冲液中 3 秒，浸泡和浸入的步骤重复 3 次。使用 ForteBio Data Analysis 8.1 将结合和解离曲线拟合至 1:1 Langmuir 结合模型。测定  $K_a$ 、 $K_d$  和  $K_D$  值，并汇总于下表 3 中。

结果显示，huC1H1-V1、huC1H1-V2 与嵌合抗体 C1H1 具有相似的人 CD40 结合亲和力，并且其结合亲和力要优于 BM2。

表 3. 人源化 C1H1 单克隆抗体的亲和力  
人源化 C1H1 单克隆抗体与人 CD40 结合的 Octet 动力学

克隆 ID#	Octet 动力学		
	人 CD40-his		
	$K_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)
嵌合 C1H1	1.47E+06	9.29E-04	6.33E-10
huC1H1-V1	1.41E+06	1.28E-03	9.04E-10
huC1H1-V2	1.65E+06	9.81E-04	5.96E-10
huC1H1-V3	5.23E+05	2.83E-03	5.41E-09
huC1H1-V4	4.24E+05	3.67E-03	8.66E-09
BM2	8.74E+05	9.79E-04	1.12E-09

通过蛋白 A 琼脂糖柱纯化人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2, 并按照前述实施例中的方案和下述方案, 通过 Biacore、捕获 ELISA、基于细胞的结合 FACS、竞争 ELISA、基于细胞的报告基因检测和蛋白热位移测定法对 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 进行表征。

还对人源化抗体 huC1H1-V2 进行了热稳定性测定。使用 GloMelt™ 热位移蛋白稳定性试剂盒 (Biotium, 产品目录 33022-T), 通过蛋白热位移分析法测定  $T_m$  (熔解温度)。简而言之, GloMelt™ 染料解冻至室温。将含有染料的小瓶涡旋并离心。然后, 将 5  $\mu$ L 200  $\times$  染料添加到 95  $\mu$ L PBS 中制备 10 $\times$  染料。反应体系中加入 2  $\mu$ L 10 $\times$  染料和 10  $\mu$ g 人源化抗体, 并添加 PBS 至总反应体积为 20  $\mu$ L。将含有染料和抗体的离心管短暂离心, 并置于实时 PCR 热循环仪 (Roche, LightCycler 480 II) 中, 该热循环仪中 Melt Curve 程序的参数如表 4 所示。

表 4. Melt Curve 程序的参数

Profile 步骤	温度	升温速率	持续时间
Initial hold	25 $^{\circ}$ C	NA	30 s
Melt curve	25-99 $^{\circ}$ C	0.1 $^{\circ}$ C/s	NA

测定结果如表 5 和图 3-7 所示。

如表 5 所示, 人源化抗体 huC1H1-V1、huC1H1-V2 与嵌合抗体 C1H1 与人 CD40 和食蟹猴 CD40 具有相当的结合亲和力。换言之, huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 与人 CD40 和食蟹猴 CD40 的结合亲和力, 并且比 BM1 和 BM2 与人 CD40 和食蟹猴 CD40 的结合亲和力更高。

图 5 显示本申请的人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 能够阻断 CD40 与 CD40L 的结合, 其阻断活性与 BM1 和 BM2 相当或略低。

根据图 6 所示, 本申请的人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 能够阻断人 CD40 与 BM2 的结合, 表明本申请的抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 可能与 BM2 结合相似的表位。

如图 7 所示, 在基于细胞的报告基因检测中, 本申请的人源化抗体 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 的激动活性高于 BM1 和 BM2。

表 5. 人源化 C1H1 抗体的结合和功能活性

克隆 ID#	Biacore 动力学						T <sub>m</sub> (熔解温度) °C
	人 CD40-his			食蟹猴 CD40-his			
	K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)	K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)	
小鼠 C1H1	2.10E+06	8.97E-04	4.28E-10	2.29E+06	8.63E-04	3.77E-10	*
嵌合 C1H1	2.51E+06	0.002221	8.84E-10	2.54E+06	0.002147	8.46E-10	*
huC1H1-V1	2.25E+06	2.48E-03	1.10E-09	2.14E+06	0.002371	1.11E-09	*
huC1H1-V2	2.31E+06	0.002704	1.17E-09	2.56E+06	0.002735	1.07E-09	70
BM1	8.03E+05	0.007562	9.42E-09	7.64E+05	0.007397	9.68E-09	*
BM2	2.06E+05	0.001616	7.84E-09	1.73E+05	0.001508	8.73E-09	*

\*未检测。

**实施例 8 人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 异种移植模型中 huC1H1-V2 抗体的体内抗肿瘤疗效**

采用 NOD-SCID 小鼠测定 huC1H1-V2 抗体的体内抗肿瘤活性。简而言之，在 NOD-SCID 小鼠的右侧腋下皮下注射  $3 \times 10^7$  个人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 细胞（中国科学院）。使用电子游标卡尺测量肿瘤体积，计算公式为(长度×宽度<sup>2</sup>)/2。当肿瘤平均体积达到约 100-150 mm<sup>3</sup>时，选出 40 只荷瘤小鼠并随机分成 4 组（每组 10 只小鼠），将动物分组的日期指定为第 0 天。根据表 6 所示的给药方案，从第 0 天起，对小鼠尾静脉注射同种型对照抗体（anti-HEL-Human IgG2 Isotype-control，也称为 IgG2，Biointron Inc）或 huC1H1-V2 抗体。

表 6. 人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 异种移植模型的实验设计

组别	N	药物	给药剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
1	10	同种型对照抗体 (IgG2)	15	i.v.	10	Q2D × 8 次
2	10	huC1H1-V2	1.5	i.v.	10	Q2D × 8 次
3	10	huC1H1-V2	5	i.v.	10	Q2D × 8 次
4	10	huC1H1-V2	15	i.v.	10	Q2D × 8 次

注：N：每组动物数量；Q2D：每 2 天一次；iv：静脉注射。

结果汇总于表 7 中。荷瘤动物对所有治疗均具有良好的耐受，没有出现明显的体重减轻或其他症状。huC1H1-V2 抗体（5 mg/kg）治疗显示出最强的抗肿瘤活性，在第 14 天，该组（第 3 组）小鼠的平均肿瘤体积为 230.2 mm<sup>3</sup>，在统计学上小于同种型对照组，抑瘤率（TGI）为 96%。但是，huC1H1-V2 抗体（15 mg/kg）治疗并未显示出进一步增强的疗效，即第 4 组小鼠的肿瘤体积与第 3 组小鼠的肿瘤体积无明显差异。

表 7. huC1H1-V2 抗体在人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 异种移植模型中的抗肿瘤疗效

治疗	治疗第 0 天的 肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	治疗第 14 天的肿瘤 体积 (mm <sup>3</sup> ) <sup>a, b</sup>	T/C (%) <sup>c</sup>	TGI (%) <sup>d</sup>	P 值
IgG2, 15 mg/kg, Q2D	114.7±1.4	2830.4±235.7	-	-	-
huC1H1-V2, 1.5 mg/kg, Q2D	111.1±2.0	431.9±58.0***	12	88	<0.001
huC1H1-V2, 5 mg/kg, Q2D	114.5±1.5	230.2±36.3***	4	96	<0.001
huC1H1-V2, 15 mg/kg, Q2D	114.3±1.3	242.5±22.1***	5	95	<0.001

注：a. 平均值±标准误；b. 第 14 天的肿瘤体积，其通过 student's t 检验与同种型对照组进行比较，\*表

示  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ ; c.  $T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$ , 其中 T 和 C 分别指第 14 天治疗组和同种型对照组的平均肿瘤体积,  $T_0$  和  $C_0$  分别指第 0 天治疗组和同种型对照组的平均肿瘤体积; d.  $TGI(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$ 。

### 实施例 9 小鼠结肠癌 MC38 异种移植模型中 huC1H1-V2 抗体的体内抗肿瘤疗效

采用 CD40 人源化转基因小鼠 (也称为 hCD40 小鼠) 进一步测定 huC1H1-V2 抗体的体内抗肿瘤活性。简而言之, 在 hCD40 小鼠右侧背部皮下注射  $1 \times 10^6$  个小鼠结肠癌 MC38 细胞 (上海兰立生物科技有限公司)。使用电子游标卡尺测量肿瘤体积, 计算公式为  $(\text{长度} \times \text{宽度}^2)/2$ 。当肿瘤平均体积达到约  $100 \text{ mm}^3$  时, 选出 18 只荷瘤小鼠并随机分成 3 组, 每组 6 只小鼠, 将动物分组的日期指定为第 0 天。根据表 8 所示的给药方案, 从第 1 天起, 对小鼠尾静脉注射溶剂 (磷酸盐缓冲液, 也称为 PBS) 或 huC1H1-V2 抗体。

表 8. MC38 异种移植模型的实验设计

组别	N	药物	给药剂量 (mg/kg)	给药途径	给药体积 (mL/kg)	给药方案
1	6	溶剂 (PBS)	-	i.v.	10	Q2D $\times$ 7 次
2	6	huC1H1-V2	3	i.v.	10	Q2D $\times$ 7 次
3	6	huC1H1-V2	10	i.v.	10	Q2D $\times$ 7 次

注: N: 每组动物数量; Q2D: 每 2 天一次; iv: 静脉注射。

结果汇总于表 9 中。荷瘤动物对所有治疗均具有良好的耐受, 没有出现明显的体重减轻或症状。huC1H1-V2 抗体 (3 mg/kg) 治疗显示出明显的抗肿瘤活性, 在第 14 天, 该组 (第 2 组) 小鼠的平均肿瘤体积为  $1169 \text{ mm}^3$ , 在统计学上小于溶剂组, 抑瘤率 (TGI) 为 64%。huC1H1-V2 抗体 (10 mg/kg) 治疗也显示出明显的抗肿瘤活性, 在第 14 天, 该组 (第 3 组) 小鼠的平均肿瘤体积为  $1446 \text{ mm}^3$ , 在统计学上小于溶剂组, 抑瘤率 (TGI) 为 56%。

表 9. huC1H1-V2 抗体在 MC38 异种移植模型中的抗肿瘤疗效

治疗	治疗第 0 天的肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup>	治疗第 14 天的肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) <sup>a, b</sup>	T/C (%) <sup>c</sup>	TGI (%) <sup>d</sup>	P 值
溶剂 (PBS), Q2D	112 $\pm$ 9	3241 $\pm$ 383	-	-	-
huC1H1-V2, 3 mg/kg, Q2D	111 $\pm$ 5	1169 $\pm$ 217**	36	64	<0.01
huC1H1-V2, 10 mg/kg, Q2D	113 $\pm$ 8	1446 $\pm$ 467*	44	56	0.014

注: a. 平均值 $\pm$ 标准误; b. 第 14 天的肿瘤体积, 其通过 student's t 检验与溶剂对照组比较, \*表示  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ ; c.  $T/C(\%) = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ , 其中  $T_{RTV}$  和  $C_{RTV}$  分别指治疗组和对照组的平均 RTV,  $RTV = V_t/V_0$ , 其中  $V_t$  指第 14 天的平均肿瘤体积,  $V_0$  指第 0 天的平均肿瘤体积; d.  $TGI(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$ 。

### 实施 10 抗 CD40 抗体和安罗替尼或其药学上可接受的盐在人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 小鼠皮下移植瘤模型中的疗效

人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 细胞 (购自中国科学院细胞库) 用含有 10% 胎牛血清和青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基进行培养。于  $37^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养至指数生长期, 收集细胞进行接种。

本实验采用的小鼠为 6 周龄左右的 NOD-Scid 小鼠 (购自上海灵畅生物科技有限公司), 饲养于无特定病原体的条件下, 以 12/12 小时光/暗调节。每天监测动物的健康状况。

每只小鼠皮下接种  $1 \times 10^7$  个 Ramos 细胞, 待肿瘤长到  $80 \sim 100 \text{ mm}^3$ , 根据肿瘤体积进行分组, 每组

10 只。给药方案见表 10，给药第一天为 D0，huC1H1-V2 和 IgG2 (Biointron, Cat.No.B107803) 均用生理盐水配制成所需浓度，安罗替尼的二盐酸盐用蒸馏水配制成所需浓度。实验结束时(D14)，CO<sub>2</sub> 麻醉处死动物，随后解剖取瘤并拍照。

每周用游标卡尺测量肿瘤直径 2 次，肿瘤体积(V)=1/2 × a × b<sup>2</sup> 其中 a、b 分别表示长、宽；T/C(%)=(T-T0)/(C-C0)×100，其中 T、C 分别指第 14 天治疗组和 IgG2 对照组的肿瘤体积，T0、C0 分别指第 0 天治疗组和 IgG2 对照组的肿瘤体积；肿瘤生长抑制率%(TGI%)=100-T/C(%)，当肿瘤出现消退时，肿瘤生长抑制率%(TGI%)=100-(T-T0)/T0×100，如果肿瘤比起始体积缩小，即 T<T0 或 C<C0 时，即定义为肿瘤部分消退(PR)，如果肿瘤完全消失，即定义为肿瘤完全消退(CR)。

结果如表 11 和图 8A (肿瘤体积) 和 8B (肿瘤重量) 所示，在第 14 天，抗 CD40 抗体 huC1H1-V2(0.5mg/kg)和安罗替尼的二盐酸盐(1mg/kg)均对人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 小鼠皮下移植瘤的生长有明显抑制作用，肿瘤生长抑制率分别为 58%和 56%；二者联用时，肿瘤生长抑制率提高到 84%；并且第 4 组小鼠的肿瘤体积和肿瘤重量均显著低于第 2 组和第 3 组 (P<0.001)。荷瘤小鼠对以上药物均能够较好耐受，没有明显体重下降等症状发生，说明 huC1H1-V2 和安罗替尼的二盐酸盐的联用具有显著的协同增效作用，且毒性没有增加。

表 10. 给药方案

组别	给药名称和剂量	给药体积	给药途径	给药周期和频次
1	0.5mg/kg IgG2	0.1mL/10g	腹腔注射	每 2 天一次，共 8 次
2	0.5mg/kg huC1H1-V2	0.1mL/10g	腹腔注射	每 2 天一次，共 8 次
3	1mg/kg 安罗替尼的二盐酸盐	0.1mL/10g	灌胃给药	每天一次，共 15 次
4	0.5mg/kg huC1H1-V2 + 1mg/kg 安罗替尼的二盐酸盐	0.1mL/10g	腹腔注射+ 灌胃给药	每 2 天一次，共 8 次+ 每天一次，共 15 次

注：在第 4 组中，0.5mg/kg huC1H1-V2 通过腹腔注射，每 2 天一次，共 8 次；1mg/kg 安罗替尼的二盐酸盐通过灌胃给药，每天一次，共 15 次。

表 11. 在人 B 细胞淋巴瘤 Ramos 小鼠皮下移植瘤模型中的疗效

组别	平均肿瘤体积(mm <sup>3</sup> ) (mean±SD)		T/C (%)	TGI (%)	P 值	实验开始时 每组动物数	实验开始时 每组动物数
	D0	D14					
1	90.4±0.9	3554.3±361.8	-	-	-	10	10
2	89.3±0.8	1546.7±198.5	42	58***	<0.001	10	10
3	85.3±3.8	1602.8±137.1	44	56***	<0.001	10	10
4	89.9±0.6	639.0±54.7	16	84	<0.001	10	10

注：P 值是通过 Mann-Whitney 检验与 IgG2 组肿瘤体积比较；\*\*\*表示 P<0.001，通过双尾 Student's t 检验与 huC1H1-V2+安罗替尼的二盐酸盐组肿瘤体积比较；P<0.05 定义为有统计学显著性差异。

本申请的序列信息总结于下表 12 中。

表 12. 序列信息

描述 序列/SEQ ID NO.
小鼠、嵌合和人源化 C1H1 抗体的 VH-CDR1 NYGIS (SEQ ID NO: 1)

小鼠、嵌合和人源化 C1H1 抗体的 VH-CDR2 SISSGGDNTYYPDNVKG (SEQ ID NO: 4)
小鼠、嵌合和人源化 C1H1 抗体的 VH-CDR3 AGEKAMDY (SEQ ID NO: 7)
小鼠、嵌合和人源化 C1H1 抗体的 VL-CDR1 RASQTINNNLH (SEQ ID NO: 10)
小鼠、嵌合和人源化 C1H1 抗体的 VL-CDR2 YASQSIG (SEQ ID NO: 13)
小鼠、嵌合和人源化 C1H1 抗体的 VL-CDR3 QQFSSWPLT (SEQ ID NO: 16)
小鼠和嵌合 C1H1 抗体的 VH EVKLVESGGGLVKPGASLKLSCAASGFTFSNYGISWVRQTSKRLWVASISSGGDNTYYPDNVK GRFTISRDNKNTLYLQMSLSEDTALYYCARAGEKAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 19) 小鼠 C1H1 抗体的 VH GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACATATGGCATATCTGGGTTCCGACACTTCAGAC AAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTGATAACACCTACTATCCAGACAAT GTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTATACTACAAATGAGT AGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGCTGGGGAGAAGGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 31) 嵌合 C1H1 抗体的 VH GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCCGGCGGGCGGCTGGTGAAGCCTGGAGCTAGCCTGAAGCTGA GCTGCGCCCGCAGCGGCTTACCTTTTCCAACACTACGGCATCAGCTGGGTGAGGCAGACAAGC GATAAGAGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATCAGCAGCGGGCGGATAACATACTACCCTG ACAACGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGGGAGAACGCCAAGAATACCCTGTACCTGCA GATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGTGCCAGGGCCGGCGAGAAG GCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACCGTGAGCTCC (SEQ ID NO:32)
huC1H1-V1 和 huC1H1-V3 的 VH EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCLASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVX1SISSGGDNTYYPDNV KGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARAGEKAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20, X1=A) EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCLASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVASISSGGDNTYYPDNV KGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARAGEKAMDYWGQGLTVTVSS
huC1H1-V2 和 huC1H1-V4 的 VH EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCLASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVX1SISSGGDNTYYPDNV KGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARAGEKAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20, X1=S) EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCLASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVSISSGGDNTYYPDNVK GRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARAGEKAMDYWGQGLTVTVSS GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGACTGGTGAAGCCTGGCGGAAGCCTGAGACTGA GCTGCGCCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAACACTACGGCATCAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCG GAAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAGCGGGCGGACAATACCTACTACCCTGA CAACGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGAGACAATGCCAAGAATCCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGCCGGCGAGAAGGC CATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAACCGTGTCTCTCC (SEQ ID NO: 33)
小鼠和嵌合 C1H1 抗体的 VL DIVLTQSPVTLSTVTPGDSVLSCLASQTINNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGS TDFTLISINSVETEDFGIYFCQQFSSWPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 23) 小鼠 C1H1 抗体的 VL GATATTGTAACACTCAGTCTCCAGTCAACCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTT CCTGCAGGGCCAGCCAACTATTAACAACAACCTACACTGGTATCAACAAAATCACATGAGT CTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGCTTCCAGTCCATCTCTGGGATCCCTCCAGGTTCACTGG CAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAAT ATATTTCTGTCAACAGTTTAGCAGCTGGCCTTACGTTCCGGTGTGGGACTAAGCTGGAGCTG AAA (SEQ ID NO: 34) 嵌合 C1H1 抗体的 VL GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGTGACCCCTGAGCGTGACACCCGGCGACAGCGTGAGCCT

GTCCTGCAGAGCCAGCCAGACCATCAACAACAATCTGCACTGGTATCAACAGAAGAGCCACG AGAGCCCCAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTAGCAGATTC AGCGGCTCCGGCTCCGGCACAGACTTTACCCTGAGCATCAACAGCGTGGAGACCGAGGATTT CGGCATCTACTTTTGCCAGCAGTTTTCTCTGGCCTCTGACATTCGGCGCCGGCACAAAGCT GGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 35)
huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 的 VL EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLIX1YASQSIGIPARFSGSGS G TDFTLTISSELEPEDFAVYX2CQQFSSWPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24, X1=K, X2=F) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLIKYASQSIGIPARFSGSGS G TDFTLTISSELEPEDFAVYFCQQFSSWPLTFGGGTKVEIK GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGAGAGAGGGCCACCCT GTCCTGCAGGGCCTCCAGACAATCAATAATAATCTGCACTGGTATCAACAGAAGCCCCGGCC AGGCCCCCAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCCAGTCCATCAGCGGCATCCCTGCCAGGTT TCCGGCAGCGGCAGCGGAACAGACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAGCCTGAGGACTT TGCCGTGTACTTTTGCCAGCAGTCTCCAGCTGGCCTCTGACCTTTGGCGGGCGGCACCAAGGT GGAGATCAAG (SEQ ID NO:36)
huC1H1-V3 和 huC1H1-V4 的 VL EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLIX1YASQSIGIPARFSGSGS G TDFTLTISSELEPEDFAVYX2CQQFSSWPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24, X1=Y, X2=Y) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLIYYASQSIGIPARFSGSGS G TDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQFSSWPLTFGGGTKVEIK
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VH-CDR1 GYYLH (SEQ ID NO: 2)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VH-CDR2 YISCHDGTIIYNQKFKG (SEQ ID NO: 5)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VH-CDR3 FLNYYGSNYAMDY (SEQ ID NO: 8)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VL-CDR1 KASQDVGPAVA (SEQ ID NO: 11)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VL-CDR2 WASTRHT (SEQ ID NO: 14)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VL-CDR3 QQYFTYPLT (SEQ ID NO: 17)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VH EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSGYLLHWVKQSLGKLEWIGYISCHDGTIIYNQKFK GKATFTLDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYFCARFLNYYGSNYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 21)
小鼠和嵌合 1A3 抗体的 VL DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGPAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTG SGYGTDFLTINNVQSEDLADYFCQQYFTYPLTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VH-CDR1 DYVMH (SEQ ID NO: 3)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VH-CDR2 YINPYNDGTTYNEKFKG (SEQ ID NO: 6)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VH-CDR3 GFLRESWFGY (SEQ ID NO: 9)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VL-CDR1 RSSQNIVHSNGNTYLD (SEQ ID NO: 12)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VL-CDR2 KVSNRFS (SEQ ID NO: 15)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VL-CDR3 FQGSHVPPT (SEQ ID NO: 18)
小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VH EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVMHWVKQKPGQGLECIGYINPYNDGTTYNEK FKGKATLTSKSSNAAYLESSLTSEDSAVYYCARGFLRESWFGYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 22)

小鼠和嵌合 1D1 抗体的 VL

DVLLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVHSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDR FSGSGS GDTFLKISRVEAEDLG VYYCFQGSHPPTFGGGTKLELK (SEQ ID NO:26)

嵌合抗体的重链恒定区

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO.: 27)

GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTG ACAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCT ACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATG A (SEQ ID NO:37)

人源化抗体的重链恒定区

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP PAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLVTVVHQDWLNKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO.:28)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGAGAGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA CTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCA ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTG CAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCGGTGTGGTACAGCTCCTACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCC CAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA CTACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO:38)

嵌合和人源化抗体的轻链恒定区

RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DST YLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 29) CGTACGGTGGCGGCCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG TGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAACAAAGAGCTTCAACAGG

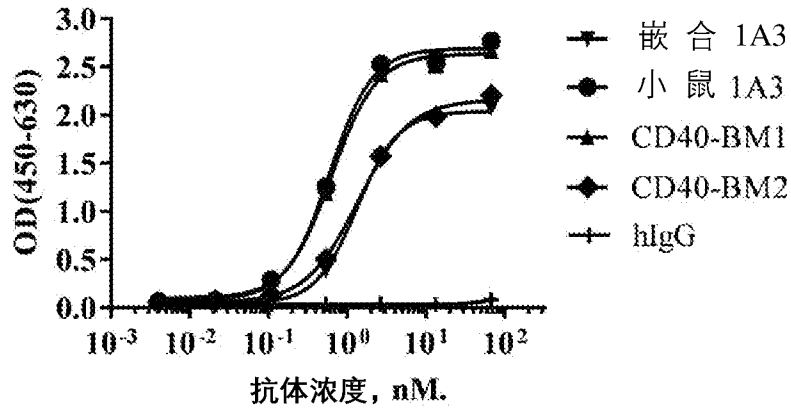
GAGAGTGTTGA (SEQ ID NO:39)
人 CD40, uniprot #P25942-1 MVRRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESE FLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFG VKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCTKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRAL VVIPIIFGILFAILLVLFVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQE DGKESRISVQERQ (SEQ ID NO:30)
Dacetuzumab 的重链 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFGYYIHVWRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKF KGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:40)
Dacetuzumab 的轻链 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)
Selicrelumab 的重链 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)
Selicrelumab 的轻链 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYCYCQANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

尽管本发明已结合一个或多个实施方案进行了描述,应当理解的是,本发明不仅涵盖这些实施方案,还意在涵盖包含在所附权利要求的精神和范围内的所有可替代、修饰和等同物。本文引用的所有文献均通过引用的方式全部并入本文。

## 权利要求书

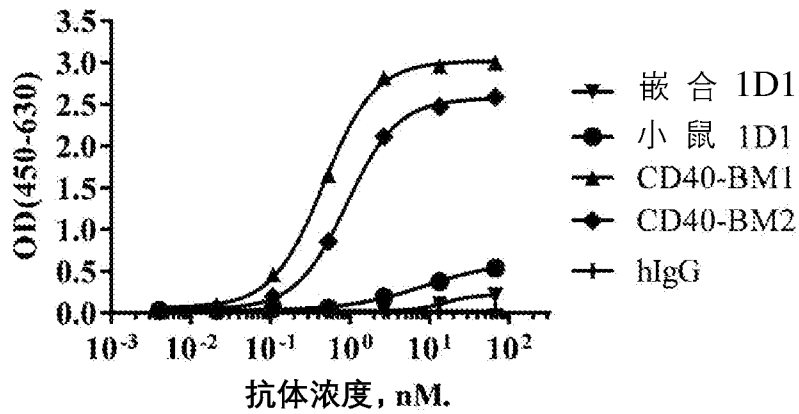
1. 一种药物组合，其包括 (a) 抗 CD40 抗体或其抗原结合部分，和 (b) 第二治疗剂，所述第二治疗剂为酪氨酸激酶抑制剂。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合，其中，所述第二治疗剂为 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂，所述 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂包括安罗替尼、凡德他尼、索拉非尼、西地尼布、伐他拉尼、帕唑帕尼、莫替沙尼、仑伐替尼、舒尼替尼、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、或其药学上可接受的盐。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合，其中，所述第二治疗剂为安罗替尼或其药学上可接受的盐；可选地，所述安罗替尼的药学上可接受的盐为盐酸盐或二盐酸盐。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的药物组合，其中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2 和 V<sub>H</sub> CDR3，所述轻链可变区包含 V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2 和 V<sub>L</sub> CDR3，其中，(1) V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、V<sub>H</sub> CDR3、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2 和 V<sub>L</sub> CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 1、4、7、10、13 和 16 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列；(2) V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、V<sub>H</sub> CDR3、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2 和 V<sub>L</sub> CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 2、5、8、11、14 和 17 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列；或 (3) V<sub>H</sub> CDR1、V<sub>H</sub> CDR2、V<sub>H</sub> CDR3、V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>L</sub> CDR2 和 V<sub>L</sub> CDR3 分别包含与 SEQ ID NOs: 3、6、9、12、15 和 18 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的药物组合，其中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含重链可变区，所述重链可变区包含与 SEQ ID NOs: 19、20、21 或 22 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=A 或 S。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的药物组合，其中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区，所述轻链可变区包含与 SEQ ID NOs: 23、24、25 或 26 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 24 中的 X1=K 和 X2=F，或 X1=Y 和 X2=Y。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的药物组合，其中，所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含：(1) 分别与 SEQ ID NOs: 19 和 23 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列；(2) 分别与 SEQ ID NOs: 20 和 24 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=A，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=K 和 X2=F；(3) 分别与 SEQ ID NOs: 20 和 24 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=S，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=K 和 X2=F；(4) 分别与 SEQ ID NOs: 20 和 24 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=A，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=Y 和 X2=Y；(5) 分别与 SEQ ID NOs: 20 和 24 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列，其中 SEQ ID NO: 20 中的 X1=S，且 SEQ ID NO: 24 中的 X1=Y 和 X2=Y；(6) 分别与 SEQ ID NOs: 21 和 25 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列；或 (7) 分别与 SEQ ID NOs: 22 和 26 所示的氨基酸序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 4-7 中任一项所述的药物组合, 其中, 所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分包含连接至所述重链可变区的重链恒定区, 和连接至所述轻链可变区的轻链恒定区, 所述重链恒定区包含 SEQ ID NOs: 27 或 28 所示的氨基酸序列, 所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的药物组合, 其中, 所述药物组合还包含第三治疗剂。
10. 根据权利要求 9 所述的药物组合, 其中, 所述第三治疗剂包含化疗药物; 可选地, 所述化疗药物包含烷化剂、鬼臼类药物、铂类药物、氟嘧啶衍生物、胞嘧啶衍生物、紫杉烷类药物、喜树碱类药物、葱环类药物、长春碱类药物中的一种或多种。
11. 一种试剂盒, 其包含权利要求 1-10 中任一项所述的药物组合。
12. 权利要求 1-10 中任一所述的药物组合或权利要求 11 所述的试剂盒在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
13. 根据权利要求 12 所述的用途, 其中, 所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分和第二治疗剂各自呈药物组合物的形式, 可同时、先后和/或交替给药; 可选地, 所述抗 CD40 抗体或其抗原结合部分、第二治疗剂和第三治疗剂各自呈药物组合物的形式, 可同时、先后和/或交替给药。
14. 根据权利要求 12 或 13 所述的用途, 其中, 所述癌症为实体瘤; 可选地, 所述实体瘤包括皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、食管癌、胃肠道癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、子宫癌、乳腺癌、肺癌、甲状腺癌、鼻咽癌和肝癌。
15. 根据权利要求 12 或 13 所述的用途, 其中, 所述癌症为 B 细胞恶性肿瘤; 可选地, 所述 B 细胞恶性肿瘤包括非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、B 细胞淋巴瘤、高级 B 细胞淋巴瘤、中级 B 细胞淋巴瘤、低级 B 级淋巴瘤、B 细胞急性淋巴细胞白血病、霍奇金氏淋巴瘤、浆细胞瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡性小裂性淋巴瘤、滤泡性大细胞淋巴瘤、滤泡混合性小裂性淋巴瘤、弥漫性小裂性细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤、单核细胞样 B 细胞淋巴瘤、脾脏淋巴瘤、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、纵隔大 B 细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、血管内淋巴瘤、混合性淋巴瘤、免疫母细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和套细胞淋巴瘤; 可选地, 所述癌症为非 B 细胞血液恶性肿瘤; 可选地, 所述非 B 细胞血液恶性肿瘤包括慢性髓性白血病和急性髓性白血病。



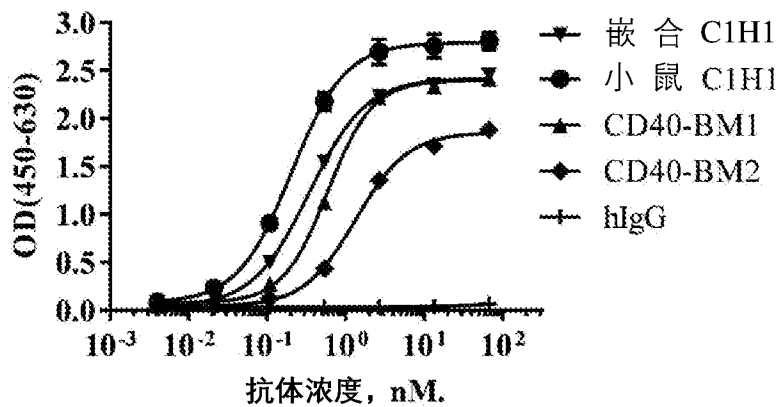
	嵌合 1A3	小鼠 1A3	CD40-BM1	CD40-BM2
EC50	1.332	0.5917	0.6279	1.362

图 1A



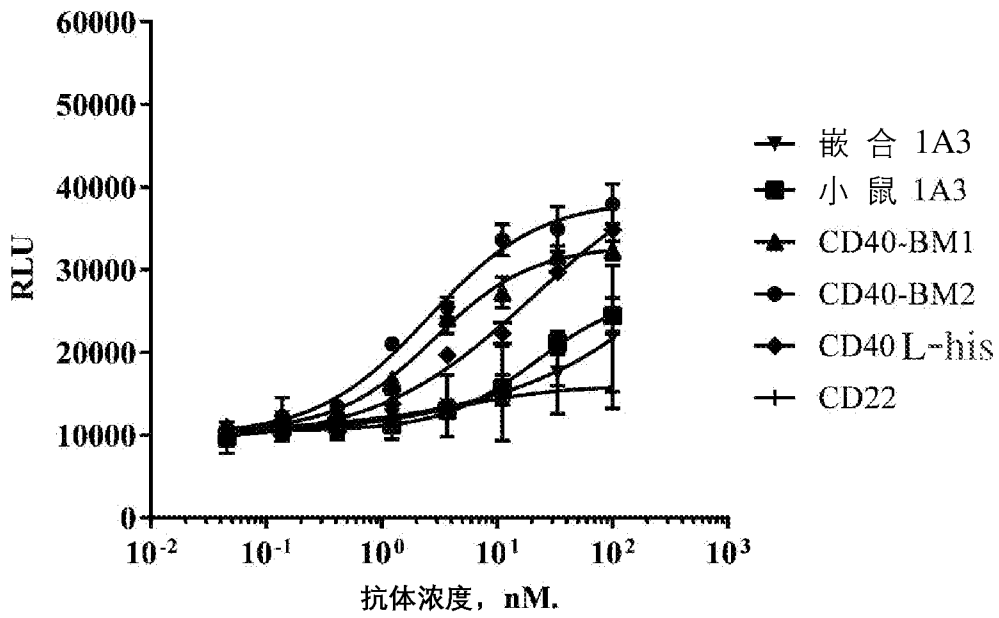
	嵌合 1D1	小鼠 1D1	CD40-BM1	CD40-BM2
EC50	14.97	8.703	0.463	0.9092

图 1B



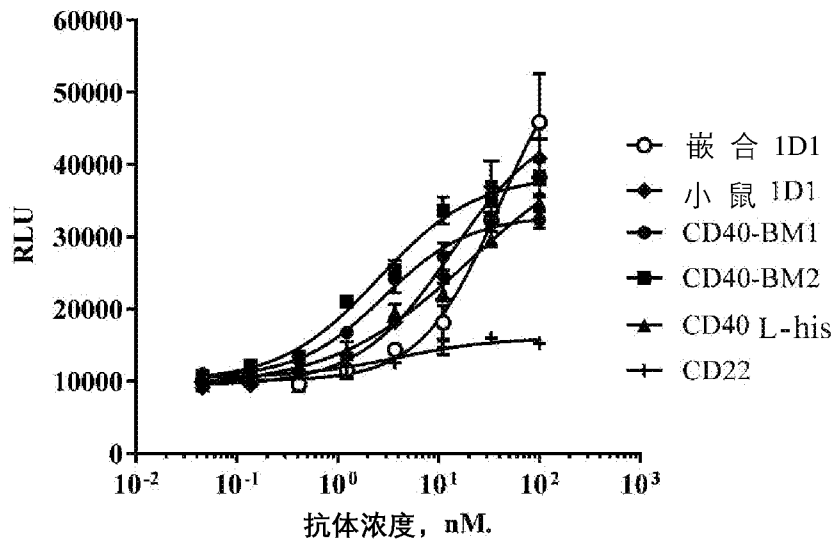
	嵌合 C1H1	小鼠 C1H1	CD40-BM1	CD40-BM2
EC50	0.3426	0.2029	0.59	1.344

图 1C



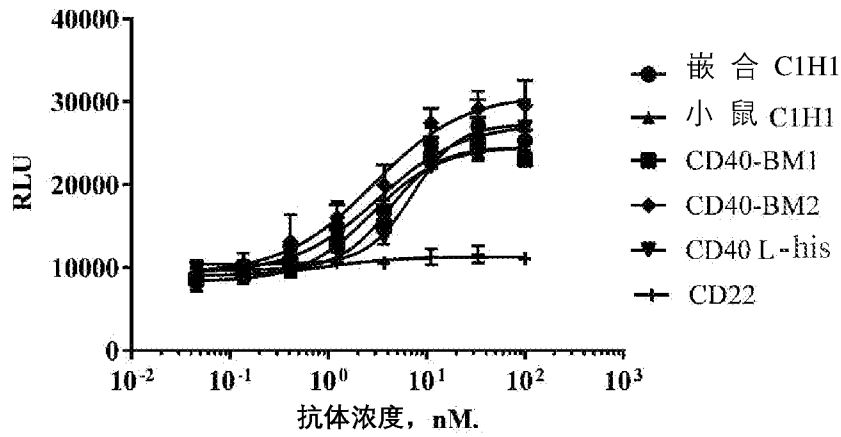
	小鼠 1A3	CD40-BM1	CD40-BM2	CD40 L-his
EC50	21.46	2.868	2.535	20.56

图 2A



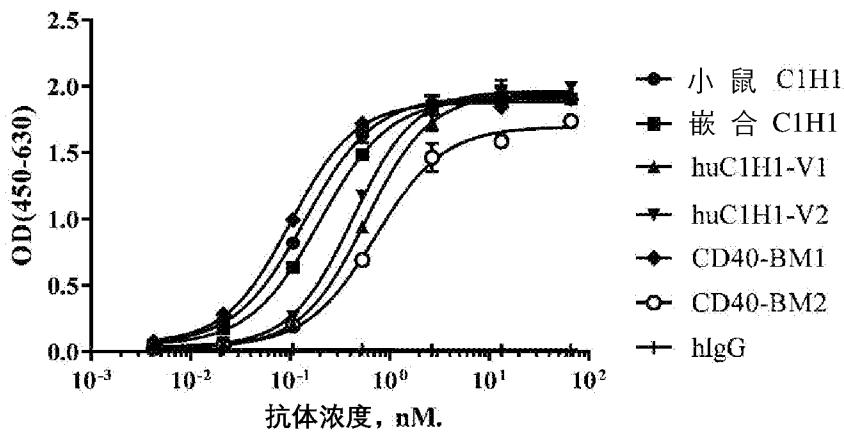
	嵌合 1D1	小鼠 1D1	CD40-BM1	CD40-BM2	CD40 L-his
EC50	40.63	13.65	2.868	2.535	20.56

图 2B



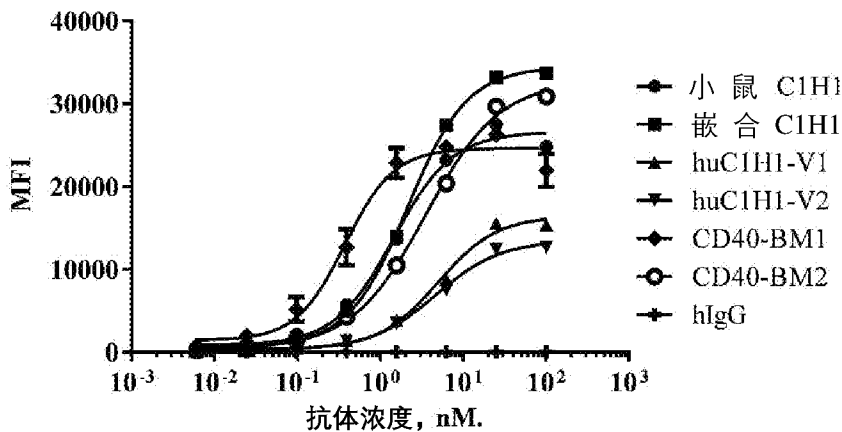
	嵌合 C1H1	小鼠 C1H1	CD40-BM1	CD40-BM2	CD40 L-his
EC50	3.222	2.736	4.162	2.893	7.196

图 2C



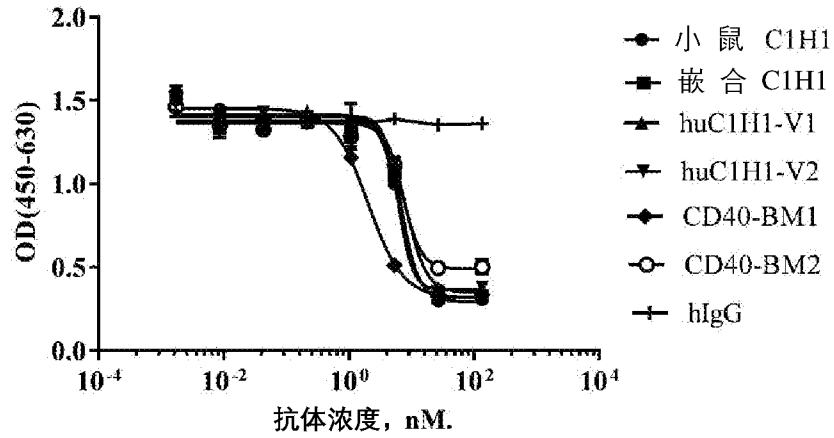
	小鼠 C1H1	嵌合 C1H1	huC1H1-V1	huC1H1-V2	CD40-BM1	CD40-BM2
EC50	0.1407	0.1977	0.5742	0.4245	0.1005	0.7196

图 3



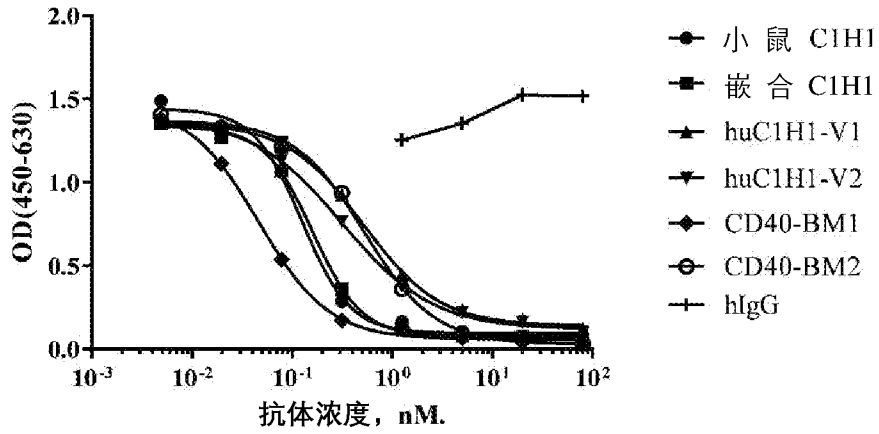
	小鼠 C1H1	嵌合 C1H1	huC1H1-V1	huC1H1-V2	CD40-BM1	CD40-BM2
EC50	1.437	2.131	4.95	4.637	0.3749	3.517

图 4



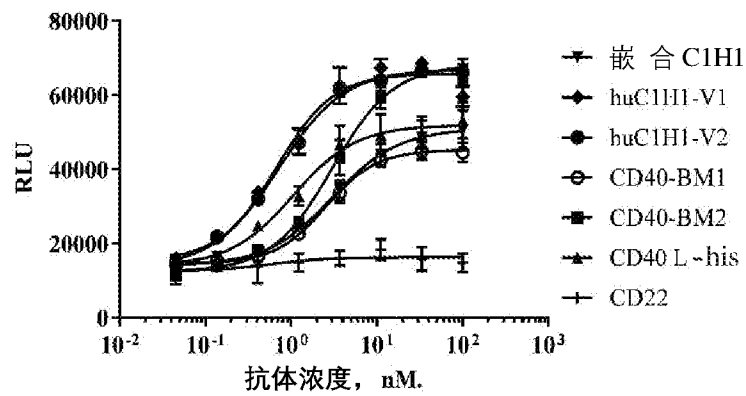
	小鼠 C1H1	嵌合 C1H1	huC1H1-V1	huC1H1-V2	CD40-BM1	CD40-BM2
IC50	6.465	6.968	7.91	6.102	2.009	7.218

图 5



	小鼠 C1H1	嵌合 C1H1	huC1H1-V1	huC1H1-V2	CD40-BM1	CD40-BM2
IC50	0.1252	0.1596	0.5131	0.3177	0.04612	0.5291

图 6



	嵌合 C1H1	huC1H1-V1	huC1H1-V2	CD40-BM1	CD40-BM2	CD40 L-his
EC50	3.044	0.679	0.7168	2.546	3.025	1.054

图 7

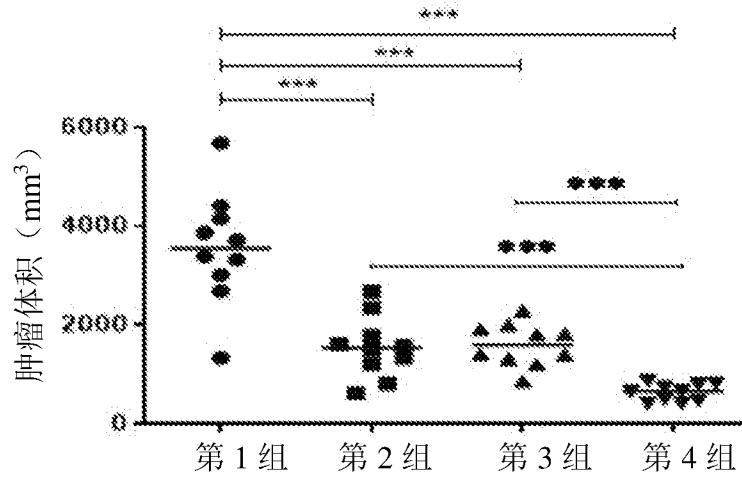


图 8A

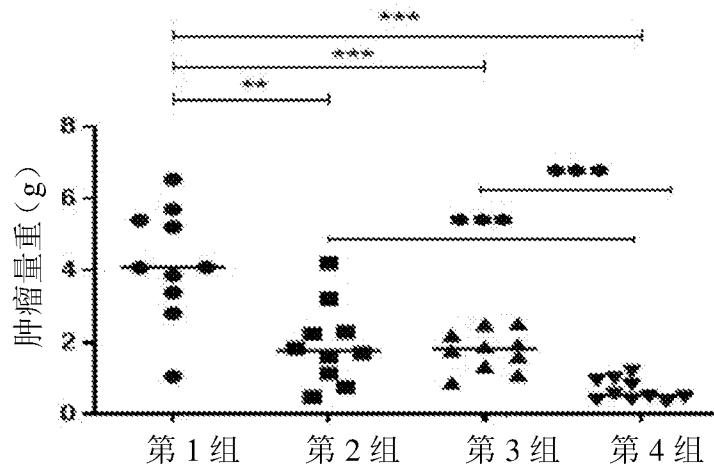


图 8B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/121184

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 31/4725(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, ISI Web of Knowledge, CNKI, NCBI GENBANK: 正大天晴药业集团股份有限公司, CD40, 抗体, 酪氨酸激酶抑制剂, 安罗替尼, 盐酸安罗替尼, 化疗, 癌症, 肿瘤, AI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP, anti-CD40 antibody, VEGFR, Anlotinib, chemotherapy, cancer, tumor, SEQ ID NOs.1-29		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2021197335 A1 (BIOSION INC.) 07 October 2021 (2021-10-07) description, embodiments 6-10	4-8
X	CN 109893654 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 18 June 2019 (2019-06-18) claims 1 and 5; and description, paragraphs 10, 13-14, 16-17, 52, and 102-103	1-3, 9-15
X	CN 107810198 A (ABBVIE INC.) 16 March 2018 (2018-03-16) claims 10 and 70; and description, paragraph 322	1-3, 9-15
X	CN 109265552 A (APEXIGEN INC.) 25 January 2019 (2019-01-25) claims 1 and 14-16; and description, paragraph 160	1-3, 9-15
X	CN 109912717 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 21 June 2019 (2019-06-21) claims 1 and 17-18; and description, paragraph 133	1-3, 11-15
A	CN 113116895 A (TIANJIN MEDICAL UNIV CANCER INSTITUTE & HOSPITAL et al.) 16 July 2021 (2021-07-16) entire document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>05 December 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>15 December 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
  - [1] The actually submitted sequence table is an XML file of the standard ST.26.

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

International application No.

**PCT/CN2022/121184**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021197335	A1	07 October 2021	TW	202144421	A	01 December 2021
CN	109893654	A	18 June 2019	None			
CN	107810198	A	16 March 2018	AU	2022204066	A1	30 June 2022
				AU	2016270640	A1	07 December 2017
				EP	3303395	A1	11 April 2018
				DO	P2017000273	A	29 December 2017
				ES	2774016	T3	16 July 2020
				BR	112017025693	A2	14 August 2018
				US	2019359725	A1	28 November 2019
				CY	1122593	T1	27 January 2021
				KR	20180010265	A	30 January 2018
				HU	E048284	T2	28 July 2020
				CR	20170592	A	13 February 2018
				WO	2016196314	A1	08 December 2016
				UA	125208	C2	02 February 2022
				EP	4047022	A1	24 August 2022
				LT	3303395	T	25 February 2020
				ZA	201707903	B	30 June 2021
				US	2016347850	A1	01 December 2016
				JP	2021090433	A	17 June 2021
				JP	2019150024	A	12 September 2019
				CN	113603782	A	05 November 2021
				AR	104809	A1	16 August 2017
				HK	1248718	A1	19 October 2018
				MX	2017015143	A	28 March 2018
				CA	2987051	A1	08 December 2016
				HR	P20200262	T1	29 May 2020
				UY	36692	A	30 December 2016
				SI	3303395	T1	31 March 2020
				IL	255961	A	31 January 2018
				EP	3626744	A1	25 March 2020
				JP	2018520654	A	02 August 2018
				CL	2017003007	A1	27 April 2018
				CO	2017012286	A2	28 February 2018
				EC	SP17085333	A	28 February 2018
				PL	3303395	T3	18 May 2020
				PT	3303395	T	20 February 2020
				PH	12017502161	A1	04 June 2018
				DK	3303395	T3	27 January 2020
				RU	2017145554	A	02 July 2019
				RS	59935	B1	31 March 2020
				US	2022289858	A1	15 September 2022
				TW	201708259	A	01 March 2017
				PE	20180193	A1	26 January 2018
				TW	202043290	A	01 December 2020
CN	109265552	A	25 January 2019	US	2018273630	A1	27 September 2018
				US	2017246297	A1	31 August 2017
				CN	110066335	A	30 July 2019
				CN	104918957	A	16 September 2015
				US	2022049006	A1	17 February 2022

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

International application No.

**PCT/CN2022/121184**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				AU 2018256638 A1	29 November 2018
				US 2014120103 A1	01 May 2014
				CA 2888763 A1	08 May 2014
				JP 2018166522 A	01 November 2018
				HK 1213581 A1	08 July 2016
				EP 2914627 A1	09 September 2015
				ES 2879552 T3	22 November 2021
				DK 2914627 T3	12 July 2021
				JP 2015533853 A	26 November 2015
				EP 3925977 A1	22 December 2021
				JP 2020195388 A	10 December 2020
				AU 2013337903 A1	07 May 2015
				NZ 707086 A	26 July 2019
				WO 2014070934 A1	08 May 2014
				KR 20150079787 A	08 July 2015
<hr/>					
CN	109912717	A	21 June 2019	CN 111454363 A	28 July 2020
				CN 111454362 A	28 July 2020
				CN 111454361 A	28 July 2020
				CN 111454364 A	28 July 2020
<hr/>					
CN	113116895	A	16 July 2021	None	
<hr/>					

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 31/4725(2006.01)i</p> <p>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</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, ISI Web of Knowledge, CNKI, NCBI GENBANK:正大天晴药业集团股份有限公司, CD40, 抗体, 酪氨酸激酶抑制剂, 安罗替尼, 盐酸安罗替尼, 化疗, 癌症, 肿瘤, AI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP, anti-CD40 antibody, VEGFR, Anlotinib, chemotherapy, cancer, tumor, SEQ ID NOs.1-29</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2021197335 A1 (BIOSION INC.) 2021年10月7日 (2021 - 10 - 07) 说明书实施例6-10</td> <td>4-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 109893654 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2019年6月18日 (2019 - 06 - 18) 权利要求1, 5; 说明书第10, 13-14, 16-17, 52, 102-103段</td> <td>1-3, 9-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 107810198 A (艾伯维公司) 2018年3月16日 (2018 - 03 - 16) 权利要求10, 70; 说明书第322段</td> <td>1-3, 9-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 109265552 A (埃派斯进有限公司) 2019年1月25日 (2019 - 01 - 25) 权利要求1, 14-16; 说明书第160段</td> <td>1-3, 9-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 109912717 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 权利要求1, 17-18; 说明书第133段</td> <td>1-3, 11-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113116895 A (天津医科大学肿瘤医院等) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	WO 2021197335 A1 (BIOSION INC.) 2021年10月7日 (2021 - 10 - 07) 说明书实施例6-10	4-8	X	CN 109893654 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2019年6月18日 (2019 - 06 - 18) 权利要求1, 5; 说明书第10, 13-14, 16-17, 52, 102-103段	1-3, 9-15	X	CN 107810198 A (艾伯维公司) 2018年3月16日 (2018 - 03 - 16) 权利要求10, 70; 说明书第322段	1-3, 9-15	X	CN 109265552 A (埃派斯进有限公司) 2019年1月25日 (2019 - 01 - 25) 权利要求1, 14-16; 说明书第160段	1-3, 9-15	X	CN 109912717 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 权利要求1, 17-18; 说明书第133段	1-3, 11-15	A	CN 113116895 A (天津医科大学肿瘤医院等) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	WO 2021197335 A1 (BIOSION INC.) 2021年10月7日 (2021 - 10 - 07) 说明书实施例6-10	4-8																					
X	CN 109893654 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2019年6月18日 (2019 - 06 - 18) 权利要求1, 5; 说明书第10, 13-14, 16-17, 52, 102-103段	1-3, 9-15																					
X	CN 107810198 A (艾伯维公司) 2018年3月16日 (2018 - 03 - 16) 权利要求10, 70; 说明书第322段	1-3, 9-15																					
X	CN 109265552 A (埃派斯进有限公司) 2019年1月25日 (2019 - 01 - 25) 权利要求1, 14-16; 说明书第160段	1-3, 9-15																					
X	CN 109912717 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 权利要求1, 17-18; 说明书第133段	1-3, 11-15																					
A	CN 113116895 A (天津医科大学肿瘤医院等) 2021年7月16日 (2021 - 07 - 16) 全文	1-15																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年12月5日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年12月15日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>刘俊</p> <p>电话号码 (86-10)010-53961940</p>																					

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:
- [1] 实际提交的序列列表是ST. 26标准的XML文件。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/121184

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021197335	A1	2021年10月7日	TW	202144421	A	2021年12月1日
CN	109893654	A	2019年6月18日	无			
CN	107810198	A	2018年3月16日	AU	2022204066	A1	2022年6月30日
				AU	2016270640	A1	2017年12月7日
				EP	3303395	A1	2018年4月11日
				DO	P2017000273	A	2017年12月29日
				ES	2774016	T3	2020年7月16日
				BR	112017025693	A2	2018年8月14日
				US	2019359725	A1	2019年11月28日
				CY	1122593	T1	2021年1月27日
				KR	20180010265	A	2018年1月30日
				HU	E048284	T2	2020年7月28日
				CR	20170592	A	2018年2月13日
				WO	2016196314	A1	2016年12月8日
				UA	125208	C2	2022年2月2日
				EP	4047022	A1	2022年8月24日
				LT	3303395	T	2020年2月25日
				ZA	201707903	B	2021年6月30日
				US	2016347850	A1	2016年12月1日
				JP	2021090433	A	2021年6月17日
				JP	2019150024	A	2019年9月12日
				CN	113603782	A	2021年11月5日
				AR	104809	A1	2017年8月16日
				HK	1248718	A1	2018年10月19日
				MX	2017015143	A	2018年3月28日
				CA	2987051	A1	2016年12月8日
				HR	P20200262	T1	2020年5月29日
				UY	36692	A	2016年12月30日
				SI	3303395	T1	2020年3月31日
				IL	255961	A	2018年1月31日
				EP	3626744	A1	2020年3月25日
				JP	2018520654	A	2018年8月2日
				CL	2017003007	A1	2018年4月27日
				CO	2017012286	A2	2018年2月28日
				EC	SP17085333	A	2018年2月28日
				PL	3303395	T3	2020年5月18日
				PT	3303395	T	2020年2月20日
				PH	12017502161	A1	2018年6月4日
				DK	3303395	T3	2020年1月27日
				RU	2017145554	A	2019年7月2日
				RS	59935	B1	2020年3月31日
				US	2022289858	A1	2022年9月15日
				TW	201708259	A	2017年3月1日
				PE	20180193	A1	2018年1月26日
				TW	202043290	A	2020年12月1日
CN	109265552	A	2019年1月25日	US	2018273630	A1	2018年9月27日
				US	2017246297	A1	2017年8月31日
				CN	110066335	A	2019年7月30日
				CN	104918957	A	2015年9月16日
				US	2022049006	A1	2022年2月17日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/121184

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	2018256638	A1	2018年11月29日
				US	2014120103	A1	2014年5月1日
				CA	2888763	A1	2014年5月8日
				JP	2018166522	A	2018年11月1日
				HK	1213581	A1	2016年7月8日
				EP	2914627	A1	2015年9月9日
				ES	2879552	T3	2021年11月22日
				DK	2914627	T3	2021年7月12日
				JP	2015533853	A	2015年11月26日
				EP	3925977	A1	2021年12月22日
				JP	2020195388	A	2020年12月10日
				AU	2013337903	A1	2015年5月7日
				NZ	707086	A	2019年7月26日
				WO	2014070934	A1	2014年5月8日
				KR	20150079787	A	2015年7月8日
CN	109912717	A	2019年6月21日	CN	111454363	A	2020年7月28日
				CN	111454362	A	2020年7月28日
				CN	111454361	A	2020年7月28日
				CN	111454364	A	2020年7月28日
CN	113116895	A	2021年7月16日	无			