



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202246334 A

(43) 公開日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 01 日

(21) 申請案號：111104212 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 28 日

(51) Int. Cl. : *C07K16/28 (2006.01)* *C07K14/765 (2006.01)*
 A61K39/395 (2006.01) *A61K47/68 (2017.01)*
 A61P37/02 (2006.01)

(30) 優先權：2021/02/02 美國 63/144,732
 2022/01/10 美國 63/297,968

(71) 申請人：美商美國禮來大藥廠 (美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)
 美國

(72) 發明人：凱恩 保羅 法蘭西斯 CAIN, PAUL FRANCIS (US)；拉塞特 梅琳達 安
 LACERTE, MELINDA ANN (US)；李 斯泰西 玲 LEE, STACEY LYNN (US)；
 瓦迪若 佩卓 VERDINO, PETRA (AT)；沃丁格 馬克 安德魯 WORTINGER,
 MARK ANDREW (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 61 頁

(54) 名稱

GITR 拮抗劑及其使用方法

(57) 摘要

本發明係關於結合至人類 GITR 之化合物、包含此類化合物之醫藥組合物及使用此類化合物之方法。

The present disclosure relates to compounds that bind to human GITR, pharmaceutical compositions comprising such compounds, and methods of using such compounds.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

GITR拮抗劑及其使用方法

【英文發明名稱】

GITR ANTAGONISTS AND METHODS OF USING THE SAME

【中文】

本發明係關於結合至人類GITR之化合物、包含此類化合物之醫藥組合物及使用此類化合物之方法。

【英文】

The present disclosure relates to compounds that bind to human GITR, pharmaceutical compositions comprising such compounds, and methods of using such compounds.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

GITR拮抗劑及其使用方法

【英文發明名稱】

GITR ANTAGONISTS AND METHODS OF USING THE SAME

【技術領域】

【0001】本發明大體上係關於生物學及醫學，且更尤其，其係關於糖皮質激素誘導之TNFR相關蛋白(GITR)，亦稱為腫瘤壞死因子受體超家族成員18 (TNFRSF18)的拮抗劑，尤其缺乏Fc- γ 受體(Fc γ R)結合且不能刺激GITR促效作用之單價拮抗劑形式。本發明進一步係關於包括其之組合物及其在治療自體免疫疾病或病症中之用途。

【先前技術】

【0002】GITR為TNFR超家族之成員且已知表現於包括調節T細胞(Treg)及經活化T細胞之各種免疫細胞上。參見例如Tian, J.等人, (2020) *Front. Immunol.*, 11:1-7。GITR為單程I型跨膜蛋白且其細胞外域(ECD)由三個富含半胱胺酸之域組成，此為TNFR超家族典型特徵。

【0003】GITR在與其三聚配位體GITRL (TNFSF18)相互作用後多聚合化及活化，引起經由TRAF2/TRAF5誘導NF κ B活化。參見例如Pedros, C., Altman, A.,及Kong, K. (2018) *Front. Immunol.* 9:2412；及Snell, L.M.,等人, (2010) *J. Immunol.*, 185(12):7223-7234。GITRL誘導之GITR信號傳導之結果包括共刺激T細胞增殖及細胞介素釋放以及消除Treg抑制作用。亦展示GITR可經由抗體結合促效且此GITR活化可藉由促效抗體或GITRL-Fc結合至Fc γ R進一步增強；此增強被認為係藉由提高的親合力或

受體多聚合介導。因此，若GITR拮抗劑可能經由結合細胞表面上之Fc γ R而結合於表面上，從而引起GITR之多聚合及隨後活化，則其可能展現促效活性。因此，需要在無實質上接合Fc γ R之能力的情況下有效阻斷GITRL結合至其受體且防止受體活化的單價抗GITR抗體片段。確保不可能Fc γ R接合之最直接的方式為產生完全不含Fc域之抗體片段。然而，已知完全不含Fc域之抗體片段，諸如Fab具有短半衰期($t_{1/2}$)，這將在用作治療劑時存在挑戰。

【0004】 存在若干策略來延長生物治療劑之 $t_{1/2}$ ，其可改良其藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)概況。此類策略通常使用膨化部分或新生Fc受體(FcRn)介導之再循環。以此方式，抗體(Ab)或其片段(例如Fab、Fc等)；聚合物，諸如聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸(PSA)、玻尿酸(HA)及羥乙澱粉(HES)；脂肪酸及其他脂質；N-或O-醯基化；及血清白蛋白或其他血漿蛋白(諸如轉鐵蛋白)可共價及/或非共價結合至給定生物治療劑以延長其半衰期。

【0005】 根據專利合作條約(Patent Cooperation Treaty, PCT)公開之國際專利申請案WO 2017/096189 (Agenus)尤其揭示抗人類GITR拮抗抗體(包括但不限於雙特異性抗體，例如包含結合於人類GITR之第一抗原結合域，及不特異性結合於由人類免疫細胞所表現之抗原的第二抗原結合域的抗體)，以及使用其之方法。在一些實施例及某些活體外分析中，WO 2017/096189中所揭示之某些抗人類GITR抗體作為拮抗劑起作用。然而，申請人Agenus後來所公開之報導將INCAGN1876 (亦稱為拉非利單抗(ragifilimab))描述為GITR之促效抗體。參見例如Gonzalez, Ana M.,等人, AACR Annual Meeting 2017; 2017年4月1-5日; Washington, DC, 摘要

3643。

【0006】因此，仍需要抗人類GITR抗體，其1)以對於最佳拮抗活性合乎需要的締合及解離速率結合人類GITR；2)阻斷GITRL與GITR之結合且防止GITR活化；3)缺乏對人類GITR之可偵測的刺激；4)作為用於治療及/或預防自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、異位性皮膚炎(AtD)、關節發炎、關節炎、類風濕性關節炎(RA)或其他發炎性病徵，諸如發炎性腸病(IBD)、克羅恩氏病(Crohn's disease, CD)及/或潰瘍性結腸炎(UC)的單藥療法，具有足夠的藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)概況及明顯的活體內功效；5)不引起細胞介素釋放之顯著誘導；6)具有低免疫原性(亦即，食蟹獼猴及/或人類中具有足夠非免疫原性)；及7)展現活體外及活體內物理及化學穩定性，其包括但不限於熱穩定性、溶解度、低自締合，及對於自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、AtD、關節發炎、關節炎、RA或其他發炎性病徵(諸如IBD、CD及/或UC)治療中的研發及/或使用可接受之藥物動力學特徵。

【發明內容】

【0007】因此，本發明提供新穎的人類GITR拮抗劑化合物，其1)以對於最佳拮抗活性合乎需要的締合及解離速率結合人類GITR；2)阻斷GITRL與GITR之結合且防止GITR活化；3)缺乏對人類GITR之可偵測的刺激；4)作為用於治療及/或預防自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、異位性皮膚炎、關節發炎、關節炎、類風濕性關節炎或其他發炎性病徵，諸如IBD、CD及/或UC的單藥療法，具有足夠的藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)概況及明顯的活體內功效；5)不引起細胞介素釋放之顯著誘導；6)具有低免疫原性(亦即，食蟹獼猴及/或人類中具有足夠非免疫原

性)；及7)展現活體外及活體內物理及化學穩定性，其包括但不限於熱穩定性、溶解度、低自締合，及對於自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、AtD、關節發炎、關節炎、RA或其他發炎性病症(諸如IBD、CD及/或UC)治療中的研發及/或使用可接受之藥物動力學特徵。

【0008】 本發明提供包含抗人類GITR抗原結合片段之化合物，該抗原結合片段包含：1)重鏈可變區(HCVR)，其包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 1之HCDR1、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 7之HCDR2、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；及2)輕鏈可變區(LCVR)，其包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之LCDR1、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之LCDR2及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 6之LCDR3。

【0009】 在一些情況下，本文中之化合物具有下式(自胺基端(N端)至羧基端(C端))：X-L-M (其中L之N端融合至X之HC的C端且L之C端融合至M之N端)；或X-L-M (其中L之N端融合至X之LC的C端且L之C端融合至M之N端)；或M-L-X (其中L之N端融合至M之C端且L之C端融合至X之HC的N端)；或M-L-X (其中L之N端融合至M之C端且L之C端融合至X之LC的N端)；其中M為充當 $t_{1/2}$ 延長部分之化合物，L (若存在)為連接子，且X為與人類GITR結合之抗體Fab片段。在一些情況下，M為白蛋白結合VHH，且L可具有包含(GGGGQ)_n之胺基酸序列，其中n可為1至15，尤其約4至約8。在其他情況下，M包含如SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列，且L可具有選自SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。在另外其他情況下，L可具有一或多個添加、缺失、插入或取代，從而使得L具有與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12中之任一者具有至少約90%至約99%序列相似性的胺基酸序列。

【0010】本發明亦描述包括至少一種本文中之化合物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

【0011】另外，本發明描述使用該等化合物及醫藥組合物用於藥劑之方法。

【0012】此外，本發明描述本文中之化合物在藥劑製造中之用途。

【實施方式】

本申請案主張根據35 U.S.C. §119(e)之於2021年2月2日申請的美國臨時申請案序列號63/144,732及於2022年1月10日申請的序列號63/297,968的權利；其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0013】除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語具有與一般熟習本發明所屬技術者通常所理解相同的含義。儘管類似於或等效於本文中所描述之彼等方法及材料的任何方法及材料可用於實踐或測試類似物、醫藥組合物及方法，但本文中描述較佳的方法及材料。

【0014】此外，除非上下文清楚地需要存在一個要素且僅存在一個要素，否則藉由不定冠詞「一(a/an)」提及之要素不排除存在多於一個要素的可能性。因此，不定冠詞「一(a/an)」通常意謂「至少一個」。

【0015】定義

【0016】如本文所使用，「約」意謂在一或多個值之統計上有意義的範圍內，該一或多個值諸如所敘述之濃度、長度、分子量、pH、序列相似性、時間範圍、溫度、體積等。此類值或範圍可在給定值或範圍之一定數量級內，通常在20%內，更通常在10%內，且甚至更通常在5%內。由「約」涵蓋之容許差異將視所研究之特定系統而定，且可由熟習此項技術者容易地理解。

【0017】如本文所使用，且對於受體中之一或多者，「活性」、「使活化(activate)」、「活化(activating)」及其類似術語意謂如使用此項技術中已知之分析(諸如下文所描述之活體外分析)所量測，化合物，諸如本文中之融合物結合至受體且在受體處誘導反應之能力。

【0018】如本文所使用，「胺基酸」意謂自化學角度，其特徵為存在一或多個胺基及一或多個羧酸基且可含有其他官能基的分子。如此項技術中已知，存在一組二十種胺基酸，其指定為標準胺基酸且可用作由任何生物產生之大部分肽/蛋白的構建塊。本發明中之胺基酸序列含有用於二十種天然存在之胺基酸的標準單字母或三字母編碼。

【0019】如本文所使用，「類似物」意謂活化目標受體且引發至少一種彼受體之原生促效劑所引發之活體內或活體外作用的化合物，諸如合成肽或多肽。

【0020】如本文所使用之術語「抗體」係指結合抗原之免疫球蛋白分子。抗體之實施例包括單株抗體、多株抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體或共軛抗體。抗體可為任何類別(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA)及任何子類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。例示性抗體為免疫球蛋白G (IgG)型抗體，其包含以下四條多肽鏈：經由鏈間二硫鍵交聯之兩條重鏈(HC)及兩條輕鏈(LC)。四條多肽鏈中之每一者的胺基端部分包括約100至125個或更多個胺基酸之主要負責抗原識別的可變區。四條多肽鏈中之每一者的羧基端部分含有主要負責效應功能的恆定區。各重鏈由重鏈可變區(VH)及重鏈恆定區構成。各輕鏈由輕鏈可變區(VL)及輕鏈恆定區構成。IgG同型可進一步分成子類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3及IgG4)。

【0021】VH及VL區可進一步細分為超可變性區，稱為互補決定區(CDR)，其穿插有更保守之區，稱為構架區(FR)。CDR暴露於蛋白之表面上且為對於抗原結合特異性重要之抗體區域。各VH及VL由自胺基端至羧基端按以下次序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本文中，重鏈之三個CDR稱為「HCDR1、HCDR2及HCDR3」，且輕鏈之三個CDR稱為「LCDR1、LCDR2及LCDR3」。CDR含有與抗原形成特異性相互作用的大部分殘基。胺基酸殘基分配至CDR可根據熟知流程進行，包括以下中所描述之彼等流程：Kabat (Kabat等人，「Sequences of Proteins of Immunological Interest,」National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))；Chothia (Chothia等人，「Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins」, Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987)；Al-Lazikani等人，「Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins」, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))；North (North等人，「A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations」, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))；或 IMGT (國際 ImMunoGeneTics 資料庫，可獲自 www.imgt.org；參見Lefranc等人，Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212)。North CDR定義用於本文所描述之抗人類GITR抗體。

【0022】術語「抗原結合片段」係指仍能夠與抗原之抗原決定基特異性相互作用的抗體之部分。抗原結合片段之實例包括但不限於Fab或Fab'。「Fab」片段由包含輕鏈可變區(VL)及輕鏈恆定區(CL)的整個抗體輕鏈以及重鏈可變區(VH)及重鏈第一恆定域(CH1)組成。各Fab片段就抗

原結合而言為單價的，亦即其具有單一抗原結合位點。Fab'片段與Fab片段的相同之處在於在CH1域之羧基端處具有幾個額外的殘基，包括來自抗體鉸鏈區之一或多個殘基。本文所描述之Fab或Fab'可為人類Fab或Fab'，或包含人類CL及CH1之嵌合Fab或Fab'。

【0023】除非另外指示，否則如本文所使用之術語「結合(bind/binds)」意欲意指如藉由此項技術中已知之常用方法所測定，蛋白或分子能夠與另一蛋白或分子形成化學鍵或吸引互動作用，其使得兩個蛋白或分子接近。

【0024】如本文所使用，「生物治療劑」及其類似術語意謂具有至少一種治療活性/可應用性之基於胺基酸或基於核酸之化合物，諸如抗體、凝血因子(coagulation factor)、血凝因子(clotting factor)、細胞介素、酶、生長因子、激素及其片段，以及治療性DNA及/或RNA分子。

【0025】如本文所使用，「保守取代」意指參考肽或多肽的變異體，其除了在其胺基酸序列中具有一或多個保守胺基酸取代外與參考分子一致。一般而言，經保守修飾之變異體包括與參考胺基酸序列至少約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。更尤其，保守取代係指藉由具有類似特徵(例如，電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構形及剛性等)之胺基酸取代胺基酸，且對所得經取代之肽或多肽的生物活性具有極小影響。功能上類似之胺基酸的保守取代為此項技術中所熟知且因此不必詳盡描述於本文中。

【0026】如本文所使用，「有效量」意謂本文中之化合物中之一或多者或其醫藥學上可接受之鹽的量或劑量，其在向有需要之個體單次或多

次給藥時，向在診斷或治療下的此類個體提供所要作用(亦即，可在個體之病狀中產生臨床上可量測之差異，例如降低一或多種臨床疾病活動性量測值，諸如美國風濕病學會(American College of Rheumatology, ACR) 20、ACR50、ACR70；疾病活動性評分(Disease Activity Score, DAS)；牛皮癬面積及嚴重程度指數(Psoriasis Area and Severity Index, PASI) 50、PASI75、PASI90、PASI100；全身性紅斑性狼瘡症疾病活動性指數(Systemic Lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)；梅奧評分疾病活動性指數(Mayo Score Disease activity index, DAI)；克羅恩氏病活動性指數(Crohn's disease activity index, CDAI)；吉博斯評分(Geboes score, GS)；羅巴茨組織病理學指數(Robarts Histopathology index, RHI)；異位性皮膚炎嚴重程度指數(Atopic dermatitis Severity Index, ADSI)；及EULAR休格連氏症候群疾病活動性指數(EULAR Sjogren's syndrome disease activity index, ESSDAI))。有效量可容易地由熟習此項技術者藉由使用已知技術及藉由觀測在類似情況下獲得的結果來確定。在確定個體之有效量時，考慮多種因素，包括但不限於哺乳動物之物種、其體型、年齡及一般健康狀況、所涉及之特定疾病或病症、疾病或病症之患病程度或嚴重程度、個體之反應、所投與之特定化合物、投與模式、所投與製劑之生物可用性特徵、所選擇之給藥方案、伴隨藥品之使用及其他相關情況。

【0027】如本文所使用，「延長之作用持續時間」意謂包括至少一種本文中之化合物及本文中之生物治療劑的融合物的結合親和力及活性持續一段大於原生生物治療劑之時段，允許較不頻繁地給藥，如至少每天一次或甚至每週三次、每週兩次或每週一次。時間作用概況可使用已知藥物

動力學測試方法，諸如以下實例中所用之彼等方法來量測。

【0028】如本文所使用，術語「Fc區」係指抗體區，其包含抗體重鏈之CH₂及CH₃域。視情況，Fc區可包括抗體重鏈之鉸鏈區的部分或整個鉸鏈區。

【0029】如本文所使用，「糖皮質激素誘導之TNFR相關蛋白」或「GITR」，亦稱為腫瘤壞死因子受體超家族成員18 (TNFRSF18)，意謂獲自或來源於任何物種(諸如哺乳動物物種，尤其人類)的GITR蛋白。GITR包括原生GITR (亦即全長)及其變異體(亦即原生GITR之添加、缺失、插入及/或取代)。全長人類GITR (但無信號肽)的一個序列示於SEQ ID NO: 20中(亦參見UniProt/SwissProt資料庫寄存編號Q9Y5U5)。人類GITR ECD (但無信號肽)的一個序列示於SEQ ID NO: 21中。

【0030】如本文所使用，「半衰期」或「t_{1/2}」意味一定數量化合物(諸如本文中所描述之融合蛋白)的二分之一藉由生物過程自流體或其他生理空間，諸如個體之血清或血漿移除所花費的時間。替代地，t_{1/2}亦可意謂一定數量的此類融合蛋白失去二分之一其藥理、生理或放射活性所花費的時間。

【0031】如本文所使用，「半數最大有效濃度」或「EC₅₀」意謂產生分析終點，諸如劑量-反應曲線之50%活化/刺激的化合物濃度。

【0032】如本文所使用，「與.....組合」意謂與一或多種額外治療劑同時、依序或以單一組合調配物形式投與本文中之融合蛋白中的至少一者。

【0033】如本文所使用，「有需要之個體」意謂哺乳動物，諸如人類，其患有需要治療或療法之病狀、疾病、病症或症狀，包括例如本文所

列之彼等病狀、疾病、病症或症狀。尤其，待治療之個體較佳為人類。

【0034】如本文所使用，「長效」意謂本文中之組合物的結合親和力及活性持續之時段大於原生肽或蛋白，允許較不頻繁地給藥，如至少每天一次或甚至每週三次、每週兩次、每週一次或每月一次。本文中之化合物時間作用概況可使用已知藥物動力學測試方法，諸如以下實例中所描述之彼等方法來量測。

【0035】如本文中可互換地使用，術語「核酸」或「聚核苷酸」係指核苷酸之聚合物，包括單股及/或雙股含核苷酸分子，諸如DNA、cDNA及RNA分子，併入有原生核苷酸、經修飾核苷酸及/或核苷酸類似物。本發明之聚核苷酸亦可包括例如藉由DNA或RNA聚合酶或合成反應併入其中之受質。

【0036】如本文所使用，「非標準胺基酸」意謂可天然存在於細胞中但不參與肽合成的胺基酸。非標準胺基酸可為肽之成分且時常藉由肽中之標準胺基酸之修飾(亦即經由轉譯後修飾)產生。非標準胺基酸可包括D-胺基酸，其具有上文標準胺基酸之相反的絕對對掌性。

【0037】如本文所使用，「寡聚物」意謂具有幾個類似或相同重複單元的分子，該等重複單元可來源於較小分子(其單體)的拷貝。此等單體可藉由強或弱、共價或非共價(例如分子內)之鍵而連接。

【0038】如本文所使用，「患者」、「受試者」及「個體」在本文中可互換使用，且意謂哺乳動物，尤其人類。在某些情況下，個體進一步以將得益於投與本文中之化合物或組合物的病狀、疾病、病症或症狀表徵。

【0039】如本文所使用，「醫藥學上可接受之緩衝液」意謂熟習此

項技術者已知之標準醫藥緩衝液中的任一者。

【0040】如本文所使用，「序列相似性」意謂生物化合物之兩個或更多個核酸序列或胺基酸序列的定量性質，例如兩個或更多個序列之全長或比較窗內的對應性。序列相似性可藉由(1)一致性百分比或(2)相似性百分比量測。一致性百分比量測兩種生物化合物之間一致之殘基除以最短序列之長度的百分比，而相似性百分比量測一致性且評估中另外包括序列空位及殘基相似性。用於確定序列相似性之方法及演算法為此項技術中所熟知且因此不必詳盡描述於本文中。一致核苷酸或胺基酸位置之指定百分比至少為約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。

【0041】如本文所使用，「治療(treating)」或「以治療(to treat)」意謂出於緩解、限制、逆轉、減緩或阻止病狀、疾病、病症或症狀之進展或嚴重程度的目的來管理及護理患有經指示投與本文中之化合物之病狀、疾病、病症或症狀的個體。治療包括向個體投與本文中之化合物或含有本文中之化合物之組合物以預防症狀或併發症之發作，緩解症狀或併發症，或消除病狀、疾病、病症或症狀。治療包括向個體投與本文中之化合物或含有本文中之化合物之組合物以使得例如減少(或預防)自體免疫性及/或減少(或預防)過敏性疾病、哮喘、異位性皮膚炎、關節發炎、關節炎、類風濕性關節炎或其他發炎性病症，諸如IBD、CD及/或UC。待治療之個體為哺乳動物，尤其人類。

【0042】如本文所使用之術語「治療有效量」係指將引發受試者之生物學或醫學反應的蛋白或核酸或載體或組合物的量，該反應例如為減少或抑制酶或蛋白活性，或改善症狀、緩解病狀、減緩或延遲疾病進展或預

防疾病等。在非限制性實施例中，術語「治療有效量」係指蛋白或核酸或載體或組合物的量，其在向受試者投與時對至少部分減輕、抑制、預防及/或改善病狀或病症或疾病係有效的。

【0043】如本文所使用，「可變重均二聚體」、「VHH」或「VHH部分」意謂一種形式的單域抗體，尤其僅重鏈抗體(HcAb)之單一單體可變區之抗體片段，其具有約15 kDa之極小尺寸。本文已發現，經工程改造/經修飾之基於VHH的化合物可用作藥物動力學增強劑以延長生物治療劑之作用持續時間及/或改良生物治療劑之 $t_{1/2}$ 。基於VHH之化合物結合血清白蛋白；然而，基於VHH之化合物可用於結合IgG (包括Fc域)、新生Fc受體(FcRn)或其他持久的血清蛋白。因此，基於VHH之化合物可用於改良化合物(諸如肽或蛋白)或甚至其他分子(諸如小分子)之 $t_{1/2}$ 。

【0044】某些縮寫定義如下：「ACR」係指尿白蛋白/尿肌酐比率；「AUC」係指曲線下面積；「AUC_{0-inf}」係指時間0小時至無窮之曲線下面積；「cAMP」係指環單磷酸腺苷；「C₀」係指在時間零時所估計之血漿濃度；「CL」係指IV投與之後的清除率；「CL/F」係指SQ投與之後的表觀清除率；「C_{最大值}」係指最大觀測血漿濃度；「CMV」係指巨細胞病毒；「DNA」係指去氧核糖核酸；「ECD」係指細胞外域；「EDC」係指1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽；「ETA」係指乙醇胺；「GS」係指麩醯胺酸合成酶；「HC」係指重鏈；「HIC」係指疏水性相互作用層析；「hr」係指一小時或多個小時；「IV」係指靜脈內；「kDa」係指千道爾頓(kilodalton)；「LC」係指輕鏈；「LC-MS」係指液相層析-質譜分析；「min」係指一分鐘或多分鐘；「MS」係指質譜分析；「MSX」係指甲硫胺酸亞砷亞胺；「NHS」係指N-羥基丁二醯亞

胺；「OtBu」係指O-三級丁基；「PEI」係指聚乙烯亞胺；「RP-HPLC」係指逆相高效液相層析；「sec」係指一秒或多秒；「NaOAc」係指乙酸钠；「rcf」意謂相對離心力；「RT」意謂室溫；「RU」意謂共振單位；「SQ」係指皮下；「SEC」係指尺寸排阻層析；「SEM」係指平均值標準誤差；「SPR」意謂表面電漿子共振；「 $t_{1/2}$ 」係指半衰期；「TFA」係指三氟乙酸；「 $T_{\text{最大值}}$ 」係指觀測到最大濃度的時間；及「Trt」係指三苯甲基。

【0045】 抗人類GITR抗原結合片段化合物

【0046】 本發明提供抗人類GITR抗原結合片段化合物，其包含：1) 重鏈可變區(HCVR)，其包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 1之HCDR1、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 7之HCDR2、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；及2) 輕鏈可變區(LCVR)，其包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之LCDR1、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之LCDR2及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 6之LCDR3。在一些情況下，抗人類GITR抗原結合片段化合物包含含有人類 κ CL及人類IgG1 CH1的Fab。

【0047】 具有基於VHH之半衰期延長劑的化合物

【0048】 簡言之，本文中之某些化合物具有式(自N端至C端)：X-L-M，其中M為充當 $t_{1/2}$ 延長部分之化合物，L(若存在)為連接子，且X為結合人類GITR之抗體Fab片段。在一些情況下，L可具有包含(GGGGQ)_n、(GGGQ)_n、(GGGGS)_n、(PGPQ)_n、(PGPA)_n、GGGG(AP)_nGGGG、(GGE)_n、(GGGGE)_n、(GGK)_n、(GGGGK)_n、GGGG(EP)_nGGGG、GGGG(KP)_nGGGG、(PGPE)_n或(PGPK)_n之胺基酸序列，其中n可為1至15，尤其約5至約10。在一些情況下，M為白蛋白結合VHH，且L為包含

(GGGGQ)_n之胺基酸序列的肽，其中n可為1至15，尤其約4至約8。在其他情況下，M包含如SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列，且L可具有選自SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。在另外其他情況下，L可具有一或多個添加、缺失、插入或取代，從而使得L具有與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12中之任一者具有至少約90%至約99%序列相似性的胺基酸序列。在另外其他情況下，L可為聚合物，諸如聚乙二醇(PEG)，尤其(PEG)_n，其中n可為1至20。

【0049】 在一些情況下，本文所揭示之化合物具有式(自N端至C端)：X-L-M，其中M包含如SEQ ID NO: 13中所示之胺基酸序列或與其具有至少約90%至約99%序列相似性的胺基酸序列，其中L (若存在)為連接子，且其中X為結合人類GITR之Fab。在一些情況下，L可具有包含(GGGGQ)_n之胺基酸序列，其中n可為1至15，尤其約4至約8。在其他情況下，L可具有選自SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。在另外其他情況下，L可具有一或多個添加、缺失、插入或取代，從而使得L具有與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12中之任一者具有至少約90%至約99%序列相似性的胺基酸序列。在另外其他情況下，L可為聚合物，諸如聚乙二醇(PEG)，尤其(PEG)_n，其中n可為1至20。較佳地，化合物為人類GITR拮抗劑。

【0050】 醫藥組合物及套組

【0051】 在一些情況下，本文所揭示之抗人類GITR抗原結合片段化合物，諸如抗人類GITR Fab，該抗人類GITR Fab融合或共軛至其白蛋白結合性VHH (諸如本文所揭示之抗體I及抗體II)，可調配為醫藥組合物，其可藉由非經腸途徑(例如，靜脈內、腹膜內、肌肉內、皮下或經皮)投

與。此類醫藥組合物及其製備技術為此項技術中所熟知。參見例如 Remington, 「The Science and Practice of Pharmacy」(D.B. Troy編, 第21版, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)。在特定情況下, 組合物經SQ或IV投與。然而, 替代地, 組合物可以調配成供其他醫藥學上可接受之途徑的形式, 諸如供經口投與之錠劑或其他固體; 延時釋放膠囊、及目前使用之任何其他形式, 包括乳膏、乳劑、吸入劑及其類似物。

【0052】如上文所指出, 且為了改良其活體內相容性及有效性, 本文中之基於VHH之融合物或基於VHH之結合物可與任何數目的無機及有機酸/鹼反應, 以形成醫藥學上可接受之酸/鹼加成鹽。醫藥學上可接受之鹽及製備其之常見技術為此項技術中所熟知(參見例如Stahl等人, 「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use」(第2次修訂版Wiley-VCH, 2011))。用於本文中之醫藥學上可接受之鹽包括鈉鹽、三氟乙酸鹽、鹽酸鹽及乙酸鹽。

【0053】本文中之化合物可使用注射器由醫師投與或自投與。應理解, 熟習此項技術者可容易地確定注射體積之規格大小及量。然而, 注射體積之量可為 \leq 約2 mL或甚至 \leq 約1 mL, 且針頭規格可為 \geq 約27 G或甚至 \geq 約29 G。

【0054】本發明亦提供且因此涵蓋可用於合成本文中之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的新穎中間物及方法。中間物及化合物可藉由此項技術中熟知之多種技術製備。例如, 使用重組合成之方法說明於以下實例中。所描述技術中之每一者的特定步驟可以不同方式組合以製備化合物。試劑及起始材料為熟習此項技術者容易獲得的。

【0055】本文中之化合物在廣泛的劑量範圍內一般有效。化合物或

包括其之醫藥組合物的例示性劑量可為每公斤(kg)個體某毫克(mg)或微克(μg)之量。以此方式，日劑量可為約1 μg 至約1000 mg。

【0056】此處，醫藥組合物中化合物的有效量可為約2.5 mg至約1000 mg的劑量。然而，熟習此項技術者應理解，在一些情況下，有效量(亦即，劑量(dose/dosage))可低於前述範圍之下限且綽綽有餘，而在其他情況下，有效量可為較大劑量且可在具有可接受副作用之情況下採用。

【0057】除本文中之化合物以外，醫藥組合物亦可包括至少一種額外治療劑，諸如通常用作特定病狀、疾病及病症(例如，心血管、神經、免疫、代謝、腫瘤、心理、肺部及/或腎方面的病狀、疾病或病症)之標準護理的治療劑。

【0058】以此方式，醫藥組合物可包括有效量的一或多種本文中之化合物、醫藥學上可接受之載劑及視情況選用之至少一種額外治療劑。

【0059】替代地，本文中之化合物可作為套組之部分提供。在一些情況下，套組包括用於向個體投與至少一種化合物(及視情況，至少一種額外治療劑)的裝置。在某些情況下，套組包括用於投與至少一種化合物(及視情況至少一種額外治療劑)的針筒及針頭。在特定情況下，將化合物(及視情況至少一種額外治療劑)預調配於針筒內之水性溶液中。

【0060】*製造及使用充當半衰期延長劑之基於VHH的化合物或其融合物及結合物的方法*

【0061】本文中之化合物可經由任何數目之此項技術中已知之標準重組DNA方法或標準化學肽合成方法製備。關於重組DNA方法，可使用標準重組技術來構築具有編碼化合物(亦即，融合肽或融合蛋白或融合結合物)之胺基酸序列之核酸序列的聚核苷酸，將該聚核苷酸併入至重組表

現載體中，且將載體引入至諸如細菌、酵母及哺乳動物細胞之宿主細胞中以產生化合物。(參見例如Green & Sambrook, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第4版2012))。

【0062】關於重組DNA方法，本文中之化合物可藉由使用重組DNA技術產生蛋白或前驅蛋白分子來製備。包括cDNA及合成DNA之DNA可為雙股或單股的，且其中編碼本文中之化合物的編碼序列可根據遺傳密碼之冗餘或簡併而變化。簡言之，將編碼本文中之化合物的DNA序列引入至宿主細胞中以產生化合物或其前驅體。宿主細胞可為細菌細胞，諸如大腸桿菌之K12或B菌株；真菌細胞，諸如酵母細胞；或哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

【0063】用諸如表現載體之表現系統短暫或穩定地轉染或轉化合適的宿主細胞，以產生本文中之化合物或其前驅體。表現載體通常可以游離基因體或宿主染色體DNA之整體部分的形式在宿主生物體中複製。通常，表現載體將含有選擇標記，諸如四環素、新黴素、G418及二氫葉酸還原酶，以准許選擇經所要DNA序列轉化的細胞。

【0064】本文所描述之步驟中之每一者的特定生物合成或合成步驟可以不同方式使用、不使用或組合來製備本文中之化合物。

【0065】關於化學肽合成方法，可使用標準手動或自動固相合成程序。例如，自動化肽合成器可購自例如Applied Biosystems (Foster City, CA)及Protein Technologies公司(Tucson, AZ)。用於固相合成之試劑易於獲自商業來源。可根據製造商說明書使用固相合成器以阻斷干擾基團，在反應期間保護胺基酸，偶合、去保護及封端未反應之胺基酸。

【0066】方法可包括本文中所描述之步驟，且此等步驟可(但未必)按如所描述之順序進行。然而，亦可設想其他順序。此外，個別的或多個步驟可在時間上並行及/或重疊及/或個別地或在多次重複步驟中進行。此外，方法可包括額外未指定步驟。

【0067】因此，此類方法可包括選擇患有例如自體免疫病狀、疾病或病症或易患其之個體。

【0068】方法亦可包括向個體投與有效量的至少一種本文中之化合物，其可呈如本文亦描述之醫藥組合物的形式。在一些情況下，化合物/醫藥組合物可包括額外治療劑。

【0069】化合物及視情況選用之額外治療劑的濃度/劑量(dose/dosage)在本文別處論述。

【0070】關於投與途徑，化合物或包括其之醫藥組合物可根據已知方法投與，諸如經口；藉由注射(亦即動脈內、靜脈內、腹膜內、大腦內、腦室內、肌內、眼內、門靜脈內或病灶內)；藉由持續釋放系統或藉由植入裝置。在某些情況下，化合物或包括其之醫藥組合物可藉由推注注射或連續地SQ投與。

【0071】關於給藥頻率，化合物或包括其之醫藥組合物可每天、每隔一天、一週三次、一週兩次、一週一次(亦即每週一次)、兩週一次(亦即每隔一週)或每月一次投與。在某些情況下，化合物或包括其之醫藥組合物每隔一天SQ、一週三次SQ、一週兩次SQ、一週一次SQ、每隔一週SQ或每月一次SQ投與。在特定情況下，化合物或包括其之醫藥組合物一週一次SQ投與(QW)。

【0072】替代地，且若IV投與，則化合物或包括其之醫藥組合物每

隔一天IV、一週三次IV、一週兩次IV、一週一次IV、每隔一週IV或每月一次IV投與。在特定情況下，化合物或包括其之醫藥組合物一週一次IV投與(IW)。

【0073】關於其中化合物或包括其之醫藥組合物與有效量之至少一種額外治療劑組合投與的彼等情況，額外治療劑可與化合物或包括其之醫藥組合物同時、分開或依序投與。

【0074】此外，額外治療劑可以與化合物或包括其之醫藥組合物相同的頻率(亦即，每隔一天、一週兩次或甚至每週一次)投與。替代地，額外治療劑可以不同於化合物或包括其之醫藥組合物的頻率投與。在其他情況下，額外治療劑可以SQ投與。在其他情況下，額外治療劑可以IV投與。在另外其他情況下，額外治療劑可經口投與。

【0075】經進一步考慮，方法可與除上文所描述之治療劑以外的額外治療劑組合。

實例

【0076】以下非限制性實例出於說明而非限制之目的提供。

【0077】多肽表現

【0078】實例1：抗體I之重組表現

【0079】抗體I為抗人類GITR Fab-白蛋白結合VHH融合物，其具有以下重鏈胺基酸序列：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFSSYVMHWVRQAPG
KGLEWVAVTSYDGTHEY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARENWAPDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

度維持在懸浮培養物中。經轉染細胞之選擇藉由在25 μM 之含MSX無血清培養基中生長而實現且在約35°C至37°C及約5%至7% CO_2 下培育。隨後，藉由低速離心移除細胞且自條件培養基純化抗體。

【0083】 抗體自CHO細胞分泌於培養基中，其藉由蛋白A親和層析、接著陽離子交換層析加以純化。尤其，將來自收穫培養基之抗體捕捉至MabSelect Prisma蛋白A樹脂(Cytiva)上。隨後，用洗滌緩衝液，諸如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS；pH 7.4)或含有Tris之緩衝液簡單洗滌樹脂以移除非特異性結合材料。用低pH溶液，諸如10 mM之pH為3的檸檬酸自樹脂溶離蛋白。將含有抗體之溶離份彙集且可保持在低pH下以使潛在病毒不活化。可藉由添加鹼，諸如0.1 M之pH為8.0的Tris來中和pH。抗體可藉由離子交換層析使用諸如POROS 50 HS (ThermoFisher)之樹脂進一步純化。可使用20 mM乙酸鈉pH 5.0中之0至1 M NaCl梯度在20管柱體積中自管柱溶離抗體。

【0084】 純化抗體可緩衝交換入磷酸鹽緩衝鹽水，或其替代地穿過病毒滯留過濾器，諸如Planova 20N (Asahi Kasei Medical)，接著在再生纖維素膜(Millipore)上使用切向流超過濾而濃縮/透濾入磷酸鹽緩衝鹽水。

【0085】 因此，抗體以此方式或以熟習此項技術者容易確定之類似方式製備。

(0086) 表1：抗體II之SEQ ID NO

抗體II	
以下之胺基酸序列：	SEQ ID NO:
HCDR1	1
HCDR2	2
HCDR3	3
LCDR1	4
LCDR2	5
LCDR3	6
HCVR	8
LCVR	10
鏈接子	11
白蛋白結合VH001	13
HC抗GIFR Fab-VH001融合物	14
LC	16
以下之DNA序列：	SEQ ID NO:
HC抗GIFR Fab-VH001融合物	17
LC	19

(0087) 實例2：抗體II之重組表現

(0088) 抗體II為抗人類GIFR Fab-白蛋白結合VH001融合物，其具有以下重鏈胺基酸序列：

QVQLVYDSGGGYYQPGRSLIPIISCAASQYITSSYVMITWYRQAPGKGIIDWYAAVTSY
 DGIHIEYADSVKGRITISRDNISKNTIYIQMNSLRPHDTAVYYCAIRNNWAPDY
 WGQGIIAVYSSASTKGPSVITHLAPSSKSIISGGTAALGCLVKIDYTPITPVIYSWNSG
 AITSGVTHITPAVILQSSGLYSISVYIVPSSSLGITQTYIQNWNIIKPSNITKVIDKRV
 PKSCDKITITGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQIAVQIITSGGGIVQPGGSI
 RLSCAASGRYIDITAVAWIRQAPGKGRITVAAGTGGGVIDITVAADSVKGRITISR
 DNSKNTIYIQMNSLRPHDTAVYYCAIRPGRITITSCVADIDYPPYWGQGIIAVYSSP
 I (SEQ ID NO:15)

及以下輕鏈胺基酸序列：

DIQMVTQSPSSI.SASVGDREVITICRASQDISNSLAWYQQKPGKAPKRIIYAAI'SI'QS
 GVPSRI'SGSGSGITF'IT'ISSI'QP'ID'F'A'ITYYCYQYYNYPSAI'GQG'IK'IKR'IVAA
 PSVIT'PPSDI'QI'KSGTASVVCILNNI'YPRE'AKVQWKVIDNAI'QSGNSQI'SVIT'QD
 SKD'SI'YSI'SS'IT'IT'SKADYI'KIKVYACI'V'IT'IQGI'SSPV'IKSI'NRGI'C (SEQ ID
 NO:16)。

【0089】具有SEQ ID NO: 15之重鏈及SEQ ID NO: 16之輕鏈的抗體基本上如針對實例1所描述而產生，但編碼SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 16之cDNA序列於表現質體中使用。

【0090】表2：抗體II之SEQ ID NO

抗體II	
以下之胺基酸序列：	SEQ ID NO:
HCDR1	1
HCDR2	7
HCDR3	3
LCDR1	4
LCDR2	5
LCDR3	6
HCVR	9
LCVR	10
連接子	11
白蛋白結合VHH	13
HC抗GITR Fab-VHH融合物	15
LC	16
以下之DNA序列：	SEQ ID NO:
HC抗GITR Fab-VHH融合物	18
LC	19

【0091】實例3：藉由SPR的抗體與白蛋白直系同源物之結合

【0092】在25°C下藉由SPR測定抗體(亦即，抗人類GITR Fab-白蛋白結合VHH融合物)與人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠、豬、犬、牛及兔血清白蛋白之活體外結合。尤其，抗體I及II對此等物種之血清白蛋白的親和力分別概述於下表3及表4中。

【0093】在Biacore 8K儀器上進行抗體I及抗體II與各種血清白蛋白之結合。血清白蛋白固定至系列S感測器晶片CM5 (Cytiva 29149603)表面係根據製造商說明書(胺偶合套組BR-1000-50)進行。簡言之，感測器晶片表面(流量槽1及2)上之羧基藉由以10 µl/min注射含有75 mg/ml 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)及11.5 mg/ml N-羥基丁二醯亞胺

(NHS)之70 μL 的混合物來活化。人類、食蟹獼猴、大鼠、小鼠、犬、豬、牛及兔血清白蛋白以0.8、0.8、0.8、2.5、0.8、1、1及1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀釋於10 mM之pH為4.0的乙酸鈉(BR-1003-49)中，隨後以10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射於經活化之晶片表面(流量槽2，通道1至8)上持續100秒。人類血清白蛋白係獲自Sigma Aldrich (St. Louis, MO) (目錄號A8763)。食蟹獼猴血清白蛋白係獲自Athens R&T (Athens, GA) (目錄號16-16-011202-CM)。大鼠血清白蛋白係獲自Sigma Aldrich (St. Louis, MO) (目錄號A4538)。小鼠血清白蛋白係獲自Sigma Aldrich (St. Louis, MO) (目錄號A3139)。犬血清白蛋白係獲自Molecular Innovations (Novi, MI) (目錄號DSA-1213 NC0739153)。豬血清白蛋白係獲自Sigma Aldrich (St. Louis, MO) (目錄號A4414)。牛血清白蛋白係獲自Sigma Aldrich (St. Louis, MO) (目錄號A7030)。兔血清白蛋白係獲自Fitzgerald Industries International (Acton, MA) (目錄號30R-3303)。

【0094】對於人類、食蟹獼猴、大鼠、小鼠、犬、豬及牛血清白蛋白以29至52共振單位(RU)，且對於兔血清白蛋白以118共振單位(RU)的表面密度，將血清白蛋白經由游離胺共價固定於塗覆有羧甲基聚葡萄糖之感測器晶片CM5上。表面(流量槽1及2)上之過量的反應基藉由注入70 μl 之1 M乙醇胺鹽酸鹽-NaOH pH 8.5去活化。

【0095】實例1及2之抗體(亦即分別抗體I及II)在1000、333.3、111.1、37.04、12.35、4.12、1.37、0.457、0.152、0.051及0.017 nM之濃度下，在HBS-EP+緩衝液(10 mM HEPES pH 7.6、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05%聚山梨醇酯20)中稀釋。180 μl 樣品個別地依序注射在晶片表面上固定之血清白蛋白上，且在25 $^{\circ}\text{C}$ 下以60 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流動速率使其

解離600 sec。藉由以60 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射10 mM之pH為1.5的甘胺酸-HCl (BR-1003-54)持續100 sec使表面再生。使用Biacore 8K Insight評價軟體(版本3.0.11.15423) 1:1結合動力學模型擬合來分析所得感測器圖譜，以計算結合動力學參數：締合速率(k_a)、解離速率(k_d)及平衡解離常數(K_D)。對於人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠、豬、犬及牛血清白蛋白分別與抗體I的結合， K_D 測定為0.25、4.4、53、44、100、20及460 nM (表3)。對於人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠、豬、犬及牛血清白蛋白分別與抗體II的結合， K_D 測定為0.4、5.9、42、51、99、20及430 nM (表4)。

【0096】表3：在25°C下抗體I與人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠、豬、犬、牛及兔血清白蛋白的結合動力學。

與固定化血清白蛋白(SA)的結合	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
人類SA	2.6E+05	6.5E-05	2.5E-10
獼猴SA	1.9E+05	8.2E-04	4.4E-09
小鼠SA	1.8E+05	9.4E-03	5.3E-08
大鼠SA	1.6E+05	7.0E-03	4.4E-08
豬SA	1.2E+05	1.3E-02	1.0E-07
犬SA	1.7E+05	3.5E-03	2.0E-08
牛SA	2.0E+05	9.1E-02	4.6E-07
兔SA	無結合		

【0097】表4：在25°C下抗體II與人類、食蟹獼猴、小鼠、大鼠、豬、犬、牛及兔血清白蛋白的結合動力學。

與固定化血清白蛋白(SA)的結合	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
人類SA	1.9E+05	7.8E-05	4.0E-10
獼猴SA	1.5E+05	8.7E-04	5.9E-09
小鼠SA	2.3E+05	9.6E-03	4.2E-08
大鼠SA	1.4E+05	7.3E-03	5.1E-08
豬SA	1.2E+05	1.2E-02	9.9E-08
犬SA	1.7E+05	3.4E-03	2.0E-08
牛SA	2.0E+05	8.7E-02	4.3E-07
兔SA	無結合		

【0098】實例4：抗體與GITR表現細胞之結合

【0099】 Jurkat人類GITR/NFkB-Luc2細胞(CS184004)購自Promega且維持於RPMI1640培養基+ 10% FBS (HyClan SH30070.3) + 400 µg/mL潮黴素B + 600 µg/mL G418中。

【0100】 藉由電穿孔將NFkB報導體pNiFty2-Luc (InvivoGen)引入Jurkat細胞(ATCC)中且藉由400 µg/mL吉歐黴素(zeocin)選拔轉染物2週。所得Jurkat NFkB_{luc}細胞株藉由食蟹獼猴GITR慢病毒轉導且藉由0.5 µg/mL嘌呤黴素選拔1週。Jurkat獼猴GITR/NFkB_{luc}細胞維持於RPMI1640培養基+ 10% FBS (HyClone SH30070.3) + 400 µg/mL吉歐黴素+ 0.5 µg/mL嘌呤黴素(puromycin)中。

【0101】 Jurkat 人類 GITR/NFkB-Luc2 及 Jurkat 食蟹獼猴GITR/NFkB_{luc}細胞以1百萬細胞/毫升再懸浮於FACS緩衝液(PBS + 1% BSA + 0.01%疊氮化鈉)中，且添加5 µl Fc嵌段/毫升(BioLegend)，且在4°C下培育20 min。細胞用FACS緩衝液洗滌且依1e6細胞/毫升再懸浮於FACS緩衝液中，且依100微升/孔添加至聚丙烯96孔盤中，得到100,000個細胞/孔。將稀釋於FACS緩衝液中之100微升/孔之2X抗體劑量調定添加至細胞中且在4°C下培育45分鐘。細胞用200微升/孔FACS緩衝液洗滌兩次且再懸浮於FACS緩衝液中之12.5 µg/mL抗人類Ig輕鏈κ/PE二級抗體(Invitrogen #PA1-74408)中，且在4°C下培育45分鐘。細胞用200微升/孔FACS緩衝液洗滌兩次且再懸浮於200 µl FACS緩衝液中。用Millipore EasyCyte細胞儀讀取樣品，且使用GuavaSoft 3.3 InCyte軟體計算中值螢光強度值。計算3次實驗複本中之每一者的EC₅₀值且根據此等3個結果計算EC₅₀幾何平均值+/-誤差(Delta方法)。表5中所示之細胞結合結果顯示抗體I及抗體II均強力結合於人類GITR及食蟹獼猴GITR (「獼猴GITR」)。另

一方面，用作此研究之陰性對照物的阿達木單抗 (adalimumab) Fab-albVHH 展現可忽略的與人類 GITR 及食蟹獼猴 GITR 之結合 (資料未示出)。

【0102】表5：抗體與Jurkat GITR細胞株之結合的活體外效能.

化合物	人類GITR細胞結合EC ₅₀ nM幾何平均值	誤差(delta方法)	N	獼猴GITR細胞結合EC ₅₀ nM幾何平均值	誤差(delta方法)	N
抗體I	6.80	0.30	3	3.06	0.04	3
抗體II	3.25	0.12	3	2.34	0.06	3

【0103】實例5：抗體對人類及獼猴GITR之活體外GITRL拮抗作用

【0104】 Jurkat人類GITR/NFκB-Luc2或Jurkat獼猴GITR/NFκBluc細胞在37°C、5% CO₂下在分析培養基(RPMI1640 + 1% FBS)中饑餓隔夜且次日以2e6細胞/毫升再懸浮於分析培養基(RPMI1640 + 1% FBS)中。將25微升/孔之細胞懸浮液添加至白色不透明之96孔盤(Corning Costar)中以得到5e5細胞/孔。添加在分析培養基中稀釋之50微升/孔之2X抗體劑量調定，緊接著添加分別在分析培養基中稀釋之25微升/孔之4X (12 nM)人類GITRL或獼猴GITRL。盤在37°C、5% CO₂下培育6小時且隨後置於室溫下15分鐘。每孔添加100微升/孔之BioGlo螢光素酶試劑(Promega)，且在室溫下在震盪下培育5分鐘。用利用Gen5軟體之BioTek SynergyNeo2盤讀取器量測螢光。計算3個實驗複本中之每一者的GITR拮抗抗體處理的GITRL抑制之IC₅₀值，且根據此等3個結果計算IC₅₀幾何平均值+/-誤差(delta方法)。

【0105】表6：GITR拮抗抗體對Jurkat GITR/NFκB螢光素酶細胞之GITRL刺激之抑制的活體外效能.

化合物	人類GITR IC ₅₀ nM幾何平均值	誤差(delta方法)	N	獼猴GITR IC ₅₀ nM幾何平均值	誤差(delta方法)	N
抗體I	4.10	0.98	3	2.27	0.37	3
抗體II	1.68	0.18	3	1.26	0.09	3

【0106】表6中之螢光素酶報導體功能生物分析結果展現，抗體I及抗體II均強力抑制人類GITR之人類GITRL刺激及獼猴GITR之獼猴GITRL刺激。

【0107】實例6：抗體對人類及獼猴GITR之活體外促效作用

【0108】 Jurkat人類GITR/NFkB-Luc2或Jurkat獼猴GITR/NFkBLuc細胞在37°C、5% CO₂下在分析培養基(RPMI1640 + 1% FBS)中饑餓隔夜且次日以2e6細胞/毫升再懸浮於分析培養基(RPMI1640 + 1% FBS)中。將50微升/孔之細胞懸浮液添加至白色不透明之96孔盤(Corning Costar)中以得到5e5細胞/孔。添加在分析培養基中稀釋之50微升/孔之2X抗體劑量調定，且將盤在37°C、5% CO₂下培育6小時且隨後置於室溫下15分鐘。每孔添加100微升/孔之BioGlo螢光素酶試劑(Promega)，且在室溫下在震盪下培育5分鐘。用利用Gen5軟體之BioTek SynergyNeo2盤讀取器量測螢光。由2或3次實驗複本中之每一者計算GITR抗體處理之EC₅₀值且根據此等結果計算EC₅₀幾何誤差(delta方法)。

【0109】表7：Jurkat GITR/NFkB螢光素酶細胞之活體外GITR抗體促效作用。

化合物	人類GITR EC ₅₀ nM幾何平均值	N	獼猴GITR IC ₅₀ nM幾何平均值	N
抗體I	無活性	3	無活性	3
抗體II	無活性	3	無活性	3
抗體III	8.50	2	0.52	2

【0110】表7中之螢光素酶報導體功能生物分析結果展現，在缺乏GITRL的情況下用抗體I或抗體II處理Jurkat人類GITR/NFkB螢光素酶或Jurkat獼猴GITR/NFkB螢光素酶細胞未引起促效刺激。相比之下，用抗體I之二價IgG變異體(亦即，抗體III)處理確實誘導GITR路徑活化。

【0111】實例7：T細胞增殖之GITRL共刺激的抗體活體外拮抗作用。

【0112】GITRL生物學之一個態樣為其能夠共刺激T細胞，引起增殖增加。在此實例中，展現抗體I及抗體II處理強力抑制人類T細胞增殖之盤結合GITRL的共刺激。人類CD3+ T細胞自周邊血液單核細胞(PBMC)分離且以1.5e6細胞/毫升用盤結合之0.2 μg/mL抗CD3抗體刺激4天，以增加在T細胞上的GITR表現。隨後，將T細胞在培養基中靜置2天以製備用於再刺激之細胞。隨後，活化及靜置的T細胞以1.5e6細胞/毫升在抗體I或抗體II劑量調定的存在下，用盤結合之2 μg/mL抗CD3抗體及1 nM人類GITRL共刺激5天。在培育的最後18小時期間藉由H3-胸苷吸收量測T細胞增殖。各抗體用三份劑量調定條件測試且在三個各別實驗之四個不同供體上測試。

【0113】表8：GITR拮抗抗體對於抑制T細胞增殖之GITRL共刺激的活體外效能。

化合物	人類GITR IC ₅₀ nM幾何平均值	誤差(delta方法)	N
抗體I	4.76	1.42	4
抗體II	1.84	0.52	4

【0114】表8中所示之GITRL共刺激分析結果展現抗體I及抗體II強力抑制T細胞增殖之GITRL共刺激。相比之下，用作陰性對照物之albVHH抗體片段展現可忽略的抑制T細胞增殖之GITRL共刺激的能力(資料未示出)。

【0115】實例8：在GITRL存在下效應T細胞增殖之活體外調節T細胞抑制的抗體復原。

GITRL生物學之一個態樣為其經由GITR之結合及活化以抑制效應T細胞增殖之調節T細胞抑制的能力。在此實例中，吾人展現抗體I及抗體II

處理在盤結合之GITRL存在下強力復原調節T細胞之抑制活性。人類T細胞及CD4+CD127低CD25+調節T細胞自周邊血液單核細胞(PBMC)分離且分別經CellTrace CFSE或CellTrace 紫色(Invitrogen)標記。T細胞及CD4+CD127低CD25+調節T細胞在抗體I或抗體II劑量調定存在下以2:1比率組合且藉由2 µg/mL抗CD28及盤結合之1 µg/mL抗CD3及2 nM GITRL刺激。在培育四天之後，藉由流式細胞量測追蹤CFSE標記評估CD4+ T細胞之增殖，不包括經CellTrace 紫色標記之CD4+CD127低CD25+調節T細胞。在四個各別場合利用四個個別供體進行分析。每次處理採集10,000個結果(每個經測試之抗體濃度單個生物複本)且用於計算T效應細胞之增殖百分比。

【0116】表9：GITR拮抗抗體在GITRL存在下復原效應T細胞增殖之調節T細胞抑制的活體外效能

化合物	人類GITR IC ₅₀ nM平均值	誤差(delta方法)	N
抗體I	4.69	0.20	4
抗體II	2.72	0.83	4

【0117】表9中所示之分析結果展現在GITRL存在下抗體I及抗體II強力復原效應T細胞增殖之調節T細胞抑制。

【0118】實例9：小鼠中之抗體藥物動力學

【0119】以每隻動物0.1 mL之體積，向雄性C57BL/6小鼠投與單次IV或SQ劑量之10 mg/kg於PBS (pH 7.4)中的抗體I或抗體II。對於藥物動力學表徵，在IV給藥後1、6、24、48、72、96、120、168、240及336小時或在SQ給藥後3、6、12、24、48、96、120、168、240及336小時自3個動物/組/時間點收集血液且處理成血漿。

【0120】抗體I及II之血漿濃度藉由基於盤之GITR抗原捕捉酶聯免疫

吸附分析 (ELISA) 方法測定。重組人類 GITR Fc 嵌合體 (rh GITR/TNFRSF18 Fc) 以 1 mg/mL 作為捕捉試劑塗覆於 ELISA 盤上。與血漿標準物、對照物及樣品一起培育之後，使用山羊抗人類 Ig Fab 辣根過氧化酶來偵測盤結合之抗體 I 或抗體 II。使用在各時間點 (N=1 至 3 個動物/組/時間點) 測定之平均濃度的非隔室分析 (NCA) 計算藥物動力學參數。使用 Watson Bioanalytical LIMS 進行 NCA。如表 10 中所示，抗體 I 及 II 在 C57BL/6 小鼠中展現擴展之藥物動力學概況。

【0121】表 10：向雄性 C57BL/5 小鼠單次 10 mg/kg IV 或 SQ 給藥之後抗體 I 及 II 之複合血漿藥物動力學參數。

抗體	途徑	C ₀ (µg/mL)	C _{最大值} (µg/mL)	T _{最大值} (hr)	AUC _{0-inf} (hr*µg/mL)	CL或CL/F (mL/hr/kg)	t _½ (hr)	%F
I	IV	86.8	NA	NA	5630	1.78	50.6	NA
I	SQ	NA	42.4	12	3270	3.06	40.7	58.1
II	IV	124	NA	NA	5430	1.84	29.3	NA
II	SQ	NA	69.2	12	3500	2.86	34.6	64.5

【0122】實例 10：大鼠中之抗體藥物動力學

【0123】分別以 2.5 mL/kg 及 1 mL/kg 之體積向雄性史泊格多利大鼠 (Sprague Dawley rat) 投與單次 IV 或 SQ 劑量之 10 mg/kg 於 PBS (pH 7.4) 中的抗體 I 或抗體 II。對於藥物動力學表徵，在 IV 給藥後 1、6、24、48、72、96、120、168、240、336、432 及 504 小時或在 SQ 給藥後 3、6、12、24、48、96、120、168、240、336、432 及 504 小時自 3 個動物/組/時間點收集血液且處理成血漿。

【0124】抗體 I 及 II 之血漿濃度藉由基於盤之 GITR 抗原捕捉酶聯免疫吸附分析 (ELISA) 方法測定。重組人類 GITR Fc 嵌合體 (rh GITR/TNFRSF18 Fc) 以 1 µg/mL 作為捕捉試劑塗覆於 ELISA 盤上。與血漿標準物、對照物及樣品一起培育之後，使用山羊抗人類 Ig Fab 辣根過氧化

酶(經 1:10,000 稀釋)來偵測盤結合之抗體 I 或抗體 II。適當時使用各動物 (N= 2 至 3) 之 NCA 計算藥物動力學參數且藉由平均值及標準差 (SD) 概述參數。N=2 皮下抗體 II 給藥之大鼠的藥物動力學資料可用，且因此報導平均參數。使用 Watson Bioanalytical LIMS 進行 NCA 及概述統計計算。如表 11 及表 12 中所示，抗體 I 及 II 在史泊格多利大鼠中展示擴展之藥物動力學概況。

【0125】表 11：向雄性史泊格多利大鼠單次 10 mg/kg IV (N=3) 或 10 mg/kg SQ (N=3) 給藥之後抗體 I 的血漿藥物動力學參數。

抗體	途徑	C ₀ (µg/mL)	C _{最大值} (µg/mL)	T _{最大值} (hr)	AUC _{0-inf} (hr*µg/mL)	CL或CL/F (mL/hr/kg)	t _{1/2} (hr)	%F
I	IV	289 (24.3)	NA	NA	14600 (1710)	0.69 (0.08)	54.0 (1.36)	NA
I	SQ	NA	48.8 (6.87)	48 (0)	6630 (267)	1.51 (0.06)	55.4 (1.99)	45.4

注意：參數報導為平均值(SD)。

【0126】表 12：向雄性史泊格多利大鼠單次 10 mg/kg IV (N=3) 或 10 mg/kg SQ (N=2) 給藥之後抗體 II 的血漿藥物動力學參數。

抗體	途徑	C ₀ (µg/mL)	C _{最大值} (µg/mL)	T _{最大值} (hr)	AUC _{0-inf} (hr*µg/mL)	CL或CL/F (mL/hr/kg)	t _{1/2} (hr)	%F
II	IV	188 (19.4)	NA	NA	10900 (473)	0.92 (0.04)	53.0 (6.90)	NA
II	SQ	NA	24.2	48	3540	2.86	55.6	32.5

注意：參數報導為平均值(SQ途徑)或平均值(SD) (IV途徑)。

【0127】實例 11：食蟹獼猴中之抗體藥物動力學

【0128】以 1 mL/kg (IV) 或 0.2 mL/kg (SC) 之體積向食蟹獼猴投與單次 0.1、1 或 10 mg/kg IV 劑量或 10 mg/kg SQ 劑量的於 PBS (pH 7.2) 中之抗體 I 或抗體 II。對於藥物動力學表徵，在給藥後 0.5、3、6、24、48、72、96、168、240、336、432、504 及 672 小時自 3 個動物/組/時間點收集血液且處理成血漿。

【0129】抗體 I 及 II 之血漿濃度藉由基於盤之 GITR 抗原捕捉酶聯免疫

吸附分析 (ELISA) 方法測定。重組人類 G1TR Fc 嵌合體 (rh G1TR/TNFRSF18 Fc) 以 1 µg/mL 作為捕捉試劑塗覆於 ELISA 盤上。與血漿標準物、對照物及樣品一起培育之後，使用偵測抗體測定抗體之穩定性。在一種方法中，使用山羊抗人類 Ig Fab 辣根過氧化酶偵測盤結合之抗體 I 或抗體 II 的 Fab-部分。在第二種方法中，添加生物素-SP AffiniPure 山羊抗羊駝 IgG VHH 域作為二級抗體以偵測具有盤結合之抗體 I 或抗體 II 的完整連接子的代謝穩定抗體。在此培育之後，添加作為試劑之過氧化酶結合的鏈黴抗生物素蛋白 (streptavidin) 以偵測盤結合之抗體 I 或抗體 II。適當時使用各動物之 NCA 計算藥物動力學參數且藉由平均值及標準差 (SD) 概述參數。使用 Watson Bioanalytical LIMS 進行 NCA 及概述統計計算。如表 13 及表 14 中所示，抗體 I 及 II 在食蟹獼猴中展現擴展之藥物動力學概況。當比較用兩種 ELISA 方法量測之抗體 I 或 II 的濃度時，觀測到類似的暴露及藥物動力學，其指示此等抗體在 IV 或 SQ 投與後在活體內的代謝穩定性。

【0130】表 13：向食蟹獼猴單次 0.1 (N=1)、1 (N=2) 或 10 (N=2) mg/kg IV 或 10 mg/kg SQ (N=2) 給藥之後抗體 I 的血漿藥物動力學參數。

ELISA 方法	途徑	劑量 (mg/kg)	C ₀ (µg/mL)	C _{最大} (µg/mL)	T _{最大} (hr)	AUC _{0-inf} (hr*µg/mL)	CL或CL/F (mL/hr/kg)	t _½ (hr)	%F
抗Fab偵測	IV	0.1	2.25	NA	NA	250	0.40	78.8	NA
	IV	1	42.2	NA	NA	6090	0.17	236	NA
	IV	10	386	NA	NA	47100	0.21	247	NA
	SC	10	NA	106	72	33900	0.30	254	72
抗VHH偵測	IV	0.1	2.93	NA	NA	286	0.35	96.2	NA
	IV	1	35.1	NA	NA	4870	0.21	180	NA
	IV	10	282	NA	NA	41500	0.24	186	NA
	SQ	10	NA	117	48	34300	0.30	209	83

注意：參數報導為平均值。

(0131) 表14：向食蟹獼猴單次0.1 (N: 2)、1 (N: 2)或10 (N: 2) mg/kg IV或10 mg/kg SQ (N: 3)給藥之後抗體D1的血漿藥物動力學參數。

ELISA 方法	途 徑	劑量 (mg/kg)	C ₀ (µg/mL)	C _{最大} (µg/mL)	T _{最大} (hr)	AUC _{0-inf} (hr*µg/mL)	CL或CL _R ⁱ (mL/hr/kg)	t _{1/2} (hr)	%D ⁱ
抗Fab 偵測	IV	0.1	2.47	NA	NA	189	0.54	82.9	NA
	IV	1	25.9	NA	NA	3280	0.32	194	NA
	IV	10	263	NA	NA	46500	0.22	291	NA
	SC	10	NA	95.9 (12.7)	112 (111)	35600 (1760)	0.28 (0.01)	220 (64.3)	76.6
抗 V1001 偵測	IV	0.1	2.28	NA	NA	190	0.53	77.4	NA
	IV	1	27.6	NA	NA	3620	0.29	224	NA
	IV	10	349	NA	NA	38100	0.26	218	NA
	SQ	10	NA	99.9 (16.8)	64 (14)	34300 (5460)	0.30 (0.04)	194 (23.9)	90.0

注意：參數報導為平均值(IV途徑)或平均值(SD) (SQ途徑)。

序列表

SEQ ID NO: 111CDR1

AASGVYISSYVMQI

SEQ ID NO: 211CDR2.1

VTSYDGINNY

SEQ ID NO: 311CDR3

ARRNNWAPDY

SEQ ID NO: 411CDR1

RAAQDISNSIA

SEQ ID NO: 511CDR2

YAATSLQS

SEQ ID NO: 611CDR3

YOYNYPSA

SEQ ID NO: 711CDR2.2

VTSYDGINNY

SEQ ID NO: 8 11C可變區(V)011

QVQLVISESGGGVVQPGRSIRISCAASGYITSSYVMITWVRQAPGKGLI:WVAVTSY
DGIHIIYYADSVKGRIFISRDNSKNITLYIQMNSIRAIIDTAVVYCARINNWAPIDY
WGQGII.VIVSS

SEQ ID NO: 9 (C:可變區(V)002)

QVQLVISESGGGVVQPGRSIRISCAASGYITSSYVMITWVRQAPGKGLI:WVAVTSY
DGIHIIYYADSVKGRIFISRDNSKNITLYIQMNSIRAIIDTAVVYCARINNWAPIDY
WGQGII.VIVSS

SEQ ID NO: 10 (C:可變區(V)0)

DIQMITQSPSSI.SASVGDIVITTCRASQDINSNIAWYQQKIPGKAPKRIIYAAAF:SI.QS
GVPSRI:SGSGSGITITITSSIQPIIDTAVYCYQYYNYPSAIFGQGITIKIIEK

SEQ ID NO: 11 連接子1

DKITITGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

SEQ ID NO: 12 連接子2

DKITGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

SEQ ID NO: 13 (自體自結合V)0000

I:VQLIISGGGIVQPGGSIIRISCAASGRYIDIE:TAVAWIFRQAPGKGRID:VAGIGGG
VIDITYYADSVKGRIFISRDNSKNITLYIQMNSIRPIIDTAVVYCAARPGRPIITISKV
ADILYPYWGQGII.VIVSSPP

SEQ ID NO: 14 (C:抗Fab-F自體自結合V)0000融合物1

QVQLVISESGGGVVQPGRSIRISCAASGYITSSYVMITWVRQAPGKGLI:WVAVTSY
DGIHIIYYADSVKGRIFISRDNSKNITLYIQMNSIRAIIDTAVVYCARINNWAPIDY
WGQGII.VIVSSASITKGPSVI:PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYIFPIQVITVSWNSG
AII:ISGVITIT:PAVILQSSGIYSISSVVI:VPSSSI:GTQIYICNVNIHKPSNITKVIDKIKVI:
PKSCDKITITGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQI:VQLIISGGGIVQPGGSIIRI
SCAASGRYIDIE:TAVAWIFRQAPGKGRID:VAGIGGGVIDITYYADSVKGRIFISRD
NSKNITLYIQMNSIRPIIDTAVVYCAARPGRPIITISKVADILYPYWGQGII.VIVSSP
P

SEQ ID NO: 15 (C:抗GITR Fab-F自體自結合V)0000融合物2

QVQLVISESGGGVVQPGRSIRISCAASGYITSSYVMITWVRQAPGKGLI:WVAVTSY
DGIHIIYYADSVKGRIFISRDNSKNITLYIQMNSIRAIIDTAVVYCARINNWAPIDY

WGQG'IT.V'IVSSAS'IK.G'PSV'F'PI.AP'SSK'S'ISGG'IAAI.GCJ.VKIDYI'F'P'P'V'IVSWNSG
AII'SGV'II'F'PAVIL.QSSGI.YSI.SSVV'IVPSSSI.G'T'Q'I'Y'ICNV'NI'IK'P'SN'I'K'VD'KK'V'I:
PKSCDK'II'IT'GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQI'VQI'J'J'SGGGI.VQP'GGSI.
RI.SCAASGRYID'F'IAVAW'F'RQAPGKGR'F'VAGIGGGVD'IT'YYADSVKGR'F'ISRI
NSKN'II.YI.QMNSI.RP'F'D'IAVYYCAARPGRPI'IT'SKVAID'Y.PYWGQG'IT.V'IVSSP
P

SEQ ID NO: 16 LC

DIQMI'QSPSSI.SASVGD'RV'IT'ICRASQDISNSI.AWYQQK'P'GK'AP'KR'I'J'Y'AA'F'SI.QS
GVP'SRI'SGSGSG'II'F'II'IT'SSI.QP'F'D'IA'Y'YCYQYYNYPSA'F'GQG'IK'I'J'IK'R'IVAA
PSV'II'F'P'SDI:QI.KSG'IASVVC'J'J'NNI'Y'PRI:AKVQWK'VD'NAI.QSGNSQI:SV'II:QD
SKIDST'YSI.SS'II'II.SKADYI'K'IK'VYA'CI'V'II'QGI.SSP'V'IK'SI'NRG'IC

SEQ ID NO: 17 編碼抗CD137R Fab-自發自結合V000融合物1的

DNA

CAAGTGCAGCTCCGTGGAGTCCGGTGGCGGAGGTGGTGCAGCCCGGAAAGGTCCCT
TCCGGGCTCTCCCTGTGCCCGCTTCCGGCTACCAACCTTCTCCAGGCTACCGTGAATGCAG
TCCGCTCAGACAGGCAACCGGGAAAGGGCTTCGTGGAAATGGGTTGGCCGGTGGACTTCCCT
ACGACGGGCAACCAAGAGTAAITACGGCCGACTCAGCTGAAGGGCCGGCTTCACTAT
CTCCCGGGACAAAGTCAAAAGAAAGACCCCTGTATCTTGGAAATGAACTCAGCTGGGG
GGCGAGGGACACTGCCCTGGTACTTCCCGCCCGCGAAAGCAAGCTGGGCCCCCTG
ACTACTGGGGACAGGGGACTCTGGTCACTGTGTGGTCCGTCGGCTCCAGCCAAAGGG
ACCCCTCCGCTCTTTCCGGTGGCGCCOAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
GCAGCCCTTGGGGGTGCCCTCCGTGAAGGAAATACCTTCCCGGAAAGCAAGCTGAAGGGTGTG
CTGGAAAGCTCTGGGGCCCCCTCAAGCAAGTGGAGTGGACAGCTTCCCTTGGGGTGGTGG
AGTCCCTCCGGACTGTACAGCCCTGTCCAGCCGTGGTCAAGGGTGGCCAGGCTCCCTCA
CTGGGCAACCAAGACCTACATTTTGCATACCTGAAAGCAATAAAGCCGTCCAAATAGCA
AAAGTCCGATTAAGAAAGCTGGAGCCCGAAGTCCCTGGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
GAGGGAGCCCAAGGGTGGAGGTGGAAAGAGCCCGCGGAGGCTCAAGGGCCGAGGAG
GACAGGGTGGCCGAGCCAGCAAGCAAGTGGAGCCCTGGTGGAGCTCCGGCCCGCCGAC
TGGTGGAGCCCTGGCCGATTCATTTGGGGCTGTGGTGGGGGGGCTCCGGAGGGCTAC
ATCCAGCAAGCAAGCAAGTGGCCCTGGCTTCCAGCAAGCCCTCCCGGAAAGGGCAAGCA
GAGTTCCGTGGCCCGGAAATGGCCGGGGGAGTGGACAAATACCCTACCTACGGCCGATTT
CCGTTGAAAGGGTCCCTTTACCAATCTCCCGGGACAAATGGAAAGAAAGCAACCCCTGTAC

CTCCAAAATGAACCTCGCTGAGGCCGGAAAGATACCGCGGTGTATTAACCTGTGCCG
CCCGCCCCGGGACGCCCGCTGATCACGTCCAAAAGTCGCCGACCTGTACCCGTA
CTGGGGACAGGGTACCCCTCGTGAACCGTGTCCAGCCCCTCCC

SEQ ID NO: 18 編碼HC-GMPR及白蛋白結合V000融合物2的DNA

CTAGGCTGCAAGCTCCGTGGAGTCCGCGTCCCGGAGTGGTGCAGCCCGGALAGGTCCT
TGGGGCTCTCCCTGTGCGGCTCCCGGCTACACCCCTCTCGAGGCTACCGTAGTGCAC
TGGGTCAGACAGGCAACCAAGGAAAGGGGTCTGGAAATGGGGTGGCGGTGACCTCCCT
ACGACGGGACCCACGAGGCTGTAGCCCGAAGTCAAGTGAAGGGGCGGCTTCACTAAT
CTCCCGGGACAACTCAAGGAAGACCCCTGTATCTGCAGAAATGAACTGACCTGGG
CCCGAAGGACACTGCCGTTGTACTAGCTGGCGCGCGGAAATAAAGCTGGGGCCCCTG
ACATCTGGGGACAGGGGACCTCTGGTCACTGTGGTCCGTCGGGCTCGACGAAAGGG
ACCCCTCCGTTGTTTCCGCTGGGCGCCAAAGCAGGCAAGAGGCAAGGCAAGGCAAGG
GCAAGGCTGGGGTGGCTCCCTCCGTGGAAAGGATTAAGCTCCCGGAAAGGCAAGGCAAG
CTGGAACTCTGGGGCGCTCAAGGCTGGAGGCTGGGCTCAAGGCTGGGCTGGGCTGGG
AGGTCCTCCGGAGCTGTACAGGCTGTCCAGCGTGGTCAAGGCTGGCGAGGCTCCCTCA
CTGGGGACCGCAGGACCTAAGATTTGGCAAGGCTGAAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCA
AAGGTCGATTAAGGAAAGGTCGAGGCGGAAAGGTCCTGGGACAAAGGCAAGGCAAGG
GAGGCAAGGCAAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAG
GACAGGCTGGCGGAGGCAAGGCAAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGG
TGGTGGAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGG
ATGGAGGCAAGGCAAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
GAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGGAGGCTGG
CCGTTGAAAGGGTCCCTTTAAGCACTCCCGGGACAAATTCGAAAGGAAACACCCCTGTAC
CTCCAAAATGAACTCGCTGAGGCCGGAAAGATACCGCGGTGTATTAACCTGTGCCG
CCCGCCCCGGGACGCCCGCTGATCACGTCCAAAAGTCGCCGACCTGTACCCGTA
CTGGGGACAGGGTACCCCTCGTGAACCGTGTCCAGCCCCTCCC

SEQ ID NO: 19 編碼LC的DNA

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGAGACA
GAGTGAACGATCACCTGTGTCGGGCCAGCCAAAGACATTAAGCAACTCCCTGGCCCTG
GTACCAGCAGAAAGCCCGGCAAAAGCACCCAAAGAGGTTGATCTACGCGGCCCTTT

TCACCTGCAAATCCGGAGTGGCCGAGCCGGTTCCTCCGGAATCCGGTTCAGGGACCG
 AGTTCACCTTGACCAATAGCAGCCTGCAAGCCCGAAGAATTCGCCACTTACTAC
 TGGTACCAGTATTAACAATACCCATCGGCGTTCGGCCAAAGGCACCAAGCTCGA
 GATCAAGCGGACCGTGGCTGCACCAATCTGTCTTCAATCTTCCCGCCATCTGATG
 AGCAGTTGAAAATCTGGAACTGCCCTCTGTGTGTGTGCCGTGCTGAATTAACCTCTAT
 CCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAACGCCCTCCAAATCGGGTA
 ACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTTACAGCCIT
 CAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAAGTCTAC
 GCCTGGGAAAGTACCCCAITCAGGGGCCITGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 20 全長人類GHR (無信號肽)

QRPTGGPGCGPGRILJLGITGDARCCRVHTTRCCRDYPGIACCSEWDCMVCVQPIQ
 HCGDPCCITCRHHPCPPGQGVQSQGIKTSITGTCQIDCASGTTSGGHTGHCCKPWTD
 CTQITGILTVIPGNKTTNANVCVPGSPPAITPLGWLTVVLLAVAAACVILLISAQIGL
 HWQDRSQCMWFRITQITLVVPPSTLDARSCQIHHRGTRSATIKKRIKDIWY

SEQ ID NO: 21 人類GHR ECID (無信號肽)

QRPTGGPGCGPGRILJLGITGDARCCRVHTTRCCRDYPGIACCSEWDCMVCVQPIQ
 HCGDPCCITCRHHPCPPGQGVQSQGIKTSITGTCQIDCASGTTSGGHTGHCCKPWTD
 CTQITGILTVIPGNKTTNANVCVPGSPPAI

SEQ ID NO: 22: 信號肽胺基酸序列

MEITDITLLWVILLWVPGSTG

【序列表】

<110> 美商美國禮來大藥廠(Eli Lilly and Company)

<120> GITR拮抗劑及其使用方法

<130> X22844

<140> TW 111104212

<141> 2022-01-28

<150> US 63/144,732

<151> 2021-02-02

<150> US 63/297,968

<151> 2022-01-10

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met His

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 2

Val Thr Ser Tyr Asp Gly Thr His Glu Tyr

1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3

Ala Arg Glu Asn Asn Trp Ala Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5

Tyr Ala Ala Phe Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6

Tyr Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Ser Ala
1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 7

Val Thr Ser Tyr Asp Gly Thr His Glu Leu
1 5 10

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Thr His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asn Asn Trp Ala Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Thr His Glu Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asn Asn Trp Ala Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Phe Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Ser
 85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11

Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln
 20 25 30

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 12

Asp Lys Thr Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln
 20 25

<210> 13

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 13

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Tyr Ile Asp Glu Thr
 20 25 30

Ala Val Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Gly Gly Gly Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Arg Pro Gly Arg Pro Leu Ile Thr Ser Lys Val Ala Asp Leu
100 105 110

Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Pro Pro
115 120 125

<210> 14

<211> 378

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Thr His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn Asn Trp Ala Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Glu Val Gln Leu Leu Glu
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
260 265 270

Ala Ala Ser Gly Arg Tyr Ile Asp Glu Thr Ala Val Ala Trp Phe Arg
275 280 285

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Gly Gly Gly
 290 295 300

Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 305 310 315 320

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 325 330 335

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Pro Gly Arg
 340 345 350

Pro Leu Ile Thr Ser Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Pro Pro
 370 375

<210> 15

<211> 378

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Thr Ser Tyr Asp Gly Thr His Glu Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn Asn Trp Ala Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Gly Gln Glu Val Gln Leu Leu Glu
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 260 265 270

Ala Ala Ser Gly Arg Tyr Ile Asp Glu Thr Ala Val Ala Trp Phe Arg
 275 280 285

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Gly Gly Gly
 290 295 300

Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 305 310 315 320

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 325 330 335

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Pro Gly Arg
 340 345 350

Pro Leu Ile Thr Ser Lys Val Ala Asp Leu Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Pro Pro
 370 375

<210> 16
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Phe Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Ser
 85 90 95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 17

<211> 1134

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 17

caagtgcagc tcgtggagtc ggggtggcggga gtggtgcagc ccggaaggc cttgcggctc 60
 tcctgtgccg cttccggcta caccttctcg agctacgtga tgcactgggt cagacaggca 120
 ccgggaaagg gtctggaatg ggtggccgtg acttcctacg acggcaccca cgagtattac 180
 gccgactcag tgaagggccg cttcactatc tcccgggaca actcaaagaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga actcactgcg ggccgaggac actgccgtgt actactgcgc gcgcgaaaac 300
 aactgggccc ctgactactg gggacagggg actctggtca ctgtgtcgtc cgccctcgacc 360
 aaggggacct ccgtgtttcc gctggcgcca agcagcaaga gcacctcggg gggaaactgca 420
 gccttgggggt gcctcgtgaa ggattacttc cccgaaccag tgaccgtgtc ctggaactct 480
 ggggccctca ccagtggagt gcacacttcc cctgcggtgc tgcagtctc cggactgtac 540
 agcctgtcca gcgtggtcac ggtgcccagc tcctcactgg gcacccagac ctacatttgc 600
 aacgtgaacc ataagccgtc caatacaaaa gtcgataaga aagtcgagcc gaagtcctgc 660
 gacaagacac acaccggtgg aggaggccag ggtggaggtg gacaaggcgg cggaggtcaa 720
 ggccggaggag gacaggggtg cggaggacag gaagtgcagc tgctggagtc cgggggcccga 780
 ctggtgcagc ctggcggatc attgcgctg tcgtgcgcgg cctccggacg ctacatcgac 840
 gagacagcag tggcctggtt cagacaggct cccggaaagg gaagagagtt cgtggccgga 900
 attggcgggg gagtcgacat tacctactac gccgattccg tgaagggtcg ctttaccatc 960
 tcccgggaca attcgaagaa caccctgtac ctccaaatga actcgtgag gccggaagat 1020
 accgcggtgt attactgtgc cgccccccg ggacgccccg tgatcacgtc caaagtcgcc 1080
 gacctgtacc cgtaactgggg acaggttacc ctcgtgaccg tgiccagccc tccc 1134

<210> 18

<211> 1134

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 18

caggatgcagc tcgtggagtc ggggtggcggg gtgggtgcagc ccggaaggtc cttgcggctc 60
tcctgtgccg cttccggcta caccttctcg agctacgtga tgcactgggt cagacaggca 120
ccaggaaagg gtctggaatg ggtggccgtg acctcctacg acggcaccca cgagctgtac 180
gccgactcag tgaaggggcg cttcactatc tcccgggaca actcaaagaa caccctgtat 240
ctgcaaatga actcactgcg ggccgaggac actgcccgtg actactgcgc gcgcgaaaat 300
aactggggccc ctgactactg gggacagggg actctggica ctgtgtcgtc cgccctgacc 360
aagggaccct ccgtgtttcc gctggccca agcagcaaga gcacctcggg gggaactgca 420
gccttgggggt gcctcgtgaa ggattacttc cccgaaccag tgaccgtgtc ctggaactct 480
ggggccctca ccagtggagt gcacacttcc cctgcggtgc tgcagtctc cggactgtac 540
agcctgtcca gcgtggtcac ggtgcccagc tctcactgg gcacccagac ctacatttgc 600
aacgtgaacc ataagccgtc caatacaaaa gtcgataaga aagtcgagcc gaagtcctgc 660
gacaagacac acaccgggtg aggaggccag ggtggaggtg gacaaggcgg cggaggtcaa 720
ggcggaggag gacaggggtg cggaggacag gaagtgcagc tgcctggagt cgggggaggga 780
ctgggtgcagc ctggcggatc attgcggctg tcgtgcgcgg cctccggacg ctacatcgac 840
gagacagcag tggcctgggt cagacaggct cccggaaaagg gaagagagtt cgtggccgga 900
attggcgggg gagtcgacat tacctactac gccgattccg tgaagggtcg ctttaccatc 960
tcccgggaca attcgaagaa caccctgtac ctccaaatga actcgtgag gccggaagat 1020
accgcggtgt attactgtgc cgccccccg ggacgccccg tgatcacgtc caaagtcgcc 1080
gacctgtacc cgtactgggg acagggtacc ctcgtgaccg tgtccagccc tccc 1134

<210> 19

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 19

gatatccaga tgaccagtc cccgagctcg ctgtccgctt ccgtgggaga cagagtgacg 60
atcaacttgtc gggccagcca agacattagc aactccctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaagcac ccaagaggtt gatctacgcg gccttttcac tgcaatccgg agtgccgagc 180
cggttctccg gatccggttc agggaccgag ttcaccttga ccattagcag cctgcagccc 240
gaagatttcg ccacttacta ctgctaccag tattacaatt acccatcggc gttcggccaa 300
ggcaccaagc tcgagatcaa gcggaccgtg gctgcacat ctgtcttcat ctteccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 20

<211> 216

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys
20 25 30

Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met
35 40 45

Cys Val Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys
50 55 60

Arg His His Pro Cys Pro Pro Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys

Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys
 20 25 30

Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met
 35 40 45

Cys Val Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys
 50 55 60

Arg His His Pro Cys Pro Pro Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys
 65 70 75 80

Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser
 85 90 95

Gly Gly His Glu Gly His Cys Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe
 100 105 110

Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys
 115 120 125

Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala Glu
 130 135

- <210> 22
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成構築體

<400> 22

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
 20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種化合物，其包含X，亦即結合人類GITR (SEQ ID NO: 20)且包含重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)之抗原結合片段，其中該VH包含重鏈互補決定區HCDR1、HCDR2及HCDR3，且該VL包含輕鏈互補決定區LCDR1、LCDR2及LCDR3，其中

- i. 該HCDR1包含SEQ ID NO: 1，
- ii. 該HCDR2包含SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 7，
- iii. 該HCDR3包含SEQ ID NO: 3，
- iv. 該LCDR1包含SEQ ID NO: 4，
- v. 該LCDR2包含SEQ ID NO: 5，及
- vi. 該LCDR3包含SEQ ID NO: 6。

【請求項2】

如請求項1之化合物，其具有下式：

X-L-M或M-L-X，

其中M為結合至人類血清白蛋白之VHH部分；及

其中L (若存在)為連接子。

【請求項3】

如請求項2之化合物，其中該VHH部分包含SEQ ID NO: 13，或與其具有至少約90%至約99%序列相似性的胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項2至3中任一項之化合物，其中該VHH部分經由L融合至Fab片段之重鏈第一恆定域(CH1)的C端。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之化合物，其中X包含具有SEQ ID NO: 10之VL。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之化合物，其中X包含具有SEQ ID NO: 8之VH或具有SEQ ID NO: 9之VH。

【請求項7】

如請求項2至6中任一項之化合物，其中L包含選自由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO: 23組成之群的肽連接子。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之化合物，其中X包含如SEQ ID NO: 16中所示之輕鏈(LC)。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之化合物，其中X包含如SEQ ID NO: 14中所示之HC或如SEQ ID NO: 15中所示之HC。

【請求項10】

一種核酸，其包含SEQ ID NO: 17。

【請求項11】

一種核酸，其包含SEQ ID NO: 18。

【請求項12】

一種核酸，其包含SEQ ID NO: 19。

【請求項13】

一種載體，其包含如SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO:

19中所示之核酸。

【請求項14】

一種細胞，其包含如請求項12之載體。

【請求項15】

一種產生化合物之方法，其包含由如請求項13之細胞在可以表現抗體之條件下培養，及自培養基回收所表現之抗體。

【請求項16】

一種化合物，其藉由如請求項14之方法產生。

【請求項17】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之化合物及醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑。

【請求項18】

一種藉由抑制有需要之受試者中的GITR活性來治療GITR相關病症的方法，其包含向該受試者投與治療有效量之如請求項1至9中任一項的化合物或如請求項17之醫藥組合物。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中該GITR相關病症為自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、異位性皮膚炎(AtD)、發炎性病症、關節發炎、關節炎、類風濕性關節炎(RA)、發炎性腸病(IBD)、克羅恩氏病(Crohn's disease, CD)或潰瘍性結腸炎(UC)。

【請求項20】

如請求項1至9中任一項之化合物，其係用於療法中。

【請求項21】

如請求項1至9中任一項之化合物，其係用於治療自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、AtD、發炎性病徵、關節發炎、關節炎、RA、IBD、CD或UC。

【請求項22】

一種如請求項20或21之化合物的用途，其係用於製造用以治療自體免疫病症、過敏性疾病、哮喘、AtD、發炎性病徵、關節發炎、關節炎、類風濕性關節炎、IBD、CD或UC的藥劑。