



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111328286 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 23

- (21) 申请号 201880065727.4

(22) 申请日 2018.08.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111328286 A

(43) 申请公布日 2020.06.23

(30) 优先权数据  
62/542,921 2017.08.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.04.09

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2018/045743 2018.08.08

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/032663 EN 2019.02.14
- (73) 专利权人 奥里尼斯生物科学有限公司  
地址 美国马萨诸塞州  
专利权人 奥里尼斯生物科学私人有限公司

(72) 发明人 N·克雷 J·塔威尼尔  
L·扎比奥 E·德普拉

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司  
72003  
专利代理师 付文川 吴小瑛

(51) Int.Cl.  
C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 110114368 A, 2019.08.09  
审查员 杨莽嘉

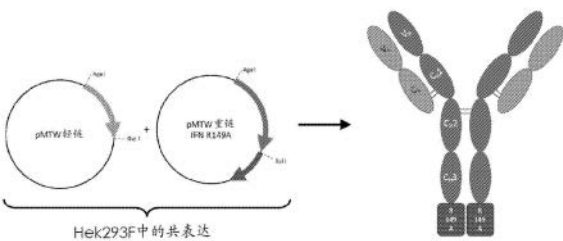
权利要求书2页 说明书113页 附图16页

(54) 发明名称

PD-1和PD-L1结合剂

(57) 摘要

本发明部分地涉及结合PD-1或PD-L1的剂以及所述剂作为诊断剂和治疗剂的用途。本发明进一步涉及包含所述PD-1或PD-L1结合剂的药物组合物以及所述药物组合物在治疗各种疾病中的用途。



1. 一种PD-L1结合剂,所述PD-L1结合剂是单结构域抗体并包含与SEQ ID NO:301、287、290、300、305、306和309中的一者具有至少95%同一性且没有AAA接头、HA标签和SEQ ID NO:86的末端组氨酸标签序列的氨基酸序列,并且

其中包含与SEQ ID NO:301具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个互补性决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1由SEQ ID NO:199的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:259的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:268的氨基酸序列组成;

其中包含与SEQ ID NO:287具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个CDR,其中CDR1由SEQ ID NO:196的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:241的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:268的氨基酸序列组成;

其中包含与SEQ ID NO:290具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个CDR,其中CDR1由SEQ ID NO:199的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:245的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:268的氨基酸序列组成;

其中包含与SEQ ID NO:300具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个CDR,其中CDR1由SEQ ID NO:199的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:245的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:268的氨基酸序列组成;

其中包含与SEQ ID NO:305具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个CDR,其中CDR1由SEQ ID NO:206的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:263的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:277的氨基酸序列组成;

其中包含与SEQ ID NO:306具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个CDR,其中CDR1由SEQ ID NO:201的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:249的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:272的氨基酸序列组成;或

其中包含与SEQ ID NO:309具有至少95%同一性的氨基酸序列的PD-L1结合剂进一步包含三个CDR,其中CDR1由SEQ ID NO:199的氨基酸序列组成;CDR2由SEQ ID NO:245的氨基酸序列组成;并且CDR3由SEQ ID NO:268的氨基酸序列组成。

2. 如权利要求1所述的PD-L1结合剂,其中所述PD-L1结合剂包含一种或多种信号传导剂。

3. 如权利要求2所述的PD-L1结合剂,其中所述信号传导剂选自干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的一者或多者,所述干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的任一者任选地被修饰。

4. 如权利要求1所述的PD-L1结合剂,其中所述PD-L1结合剂包含一个或多个另外的靶向部分。

5. 如权利要求4所述的PD-L1结合剂,其中所述一个或多个另外的靶向部分识别并任选地在功能上调节肿瘤抗原。

6. 如权利要求5所述的PD-L1结合剂,其中所述一个或多个另外的靶向部分识别并任选地在功能上调节免疫细胞上的抗原。

7. 如权利要求6所述的PD-L1结合剂,其中所述免疫细胞选自T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和NK细胞。

8. 一种重组核酸组合物,所述重组核酸组合物编码如权利要求1-7中任一项所述的PD-L1结合剂。

9. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求8所述的重组核酸组合物。

10. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含:

(a) 如权利要求1-7中任一项所述的PD-L1结合剂;和

(b) 经修饰的人IFN- $\alpha$ 2,所述经修饰的人IFN- $\alpha$ 2与野生型IFN- $\alpha$ 2相比具有赋予提高的安全性的选自R149A、R120E、M148A和L153A的一个或多个突变;并且

其中所述PD-L1结合剂和所述经修饰的人IFN- $\alpha$ 2任选地用一个或多个接头连接。

11. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含:

(a) 如权利要求1-7中任一项所述的PD-L1结合剂;和

(b) 经修饰的人IFN- $\beta$ ,所述经修饰的人IFN- $\beta$ 与野生型IFN- $\beta$ 相比具有赋予提高的安全性的选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152G和Y155G的一个或多个突变;并且

其中所述PD-L1结合剂和所述经修饰的人IFN- $\beta$ 任选地用一个或多个接头连接。

## PD-1和PD-L1结合剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年8月9日提交的美国临时专利申请号62/542,921的权益和优先权,所述申请的内容特此以引用方式整体并入。

### 技术领域

[0003] 本发明部分地涉及结合PD-1或PD-L1的结合剂及其作为治疗剂和诊断剂的用途。

[0004] 以电子方式提交的文本文件的说明

[0005] 与本文一起以电子方式提交的文本文件的内容以引用方式整体并入本文:序列表的计算机可读格式副本(文件名:ORN-034PC\_ST25;创建日期:2018年8月8日;文件大小:827KB)。

### 背景技术

[0006] 已经开发出免疫疗法来重新引导人体的免疫系统抵抗癌症。免疫疗法提供其他治疗形式诸如化学疗法和放射所缺乏的细胞特异性优势。因此,用于增强基于免疫的疗法的功效的方法可能具有临床益处。举例来说,提供共刺激或共抑制信号的免疫检查点分子在调控针对肿瘤细胞的T细胞免疫应答中起着核心作用。

[0007] 然而,尽管有患者对靶向检查点分子的剂产生了令人印象深刻的反应,包括例如使得YERVOY、KEYTRUDA和OPDIVO获得批准的临床试验,但在绝大多数患者中免疫疗法诸如检查点抑制疗法仍然失败。更进一步说,许多免疫疗法因副作用而复杂化,这些副作用极大地缩小了患者的治疗窗口,并且使患者更容易感染其他疾病。

[0008] 因此,仍然需要可以提供针对癌症的靶向疗法同时使副作用最小化的改善的免疫治疗剂。

### 发明内容

[0009] 在各个方面,本发明涉及具有至少一个特异性地结合至PD-1或PD-L1的靶向部分的结合剂。在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-1或PD-L1,并且在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1。在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-1或PD-L1,但不在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1。因此,在各个实施方案中,本发明的结合剂用于例如将表达PD-1的细胞或表达PD-L1的细胞直接或间接地募集至目标位点,同时仍允许所述细胞经由PD-1或PD-L1进行信号传导(即,所述PD-1或PD-L1结合剂的结合不会降低或消除所述目标位点处的PD-1或PD-L1信号传导)。在一个实施方案中,所述靶向部分是单结构域抗体(VHH)。

[0010] 在各个实施方案中,本发明的结合剂还包含信号传导剂,例如但不限于干扰素、白介素和肿瘤坏死因子,所述信号传导剂可以经过修饰以减弱活性。在各个实施方案中,所述结合剂包含结合至其他目标靶标(例如抗原、受体)的另外的靶向部分。在一个实施方案中,所述其他目标靶标(例如抗原、受体)存在于肿瘤细胞上。在另一个实施方案中,所述其他目

标靶标(例如抗原、受体)存在于免疫细胞上。在一些实施方案中,本发明的结合剂可以将免疫细胞(例如树突状细胞)直接或间接地募集至作用位点(作为非限制性实例,诸如肿瘤微环境)。在一些实施方案中,本发明的结合剂促进树突状细胞对抗原(例如肿瘤抗原)的呈递。

[0011] 在各个实施方案中,本发明的结合剂可用于治疗各种疾病或病症,诸如癌症、感染、免疫病症以及其他疾病和病症,并且本发明涵盖各种治疗方法。

## 附图说明

[0012] 图1提供了实施例1中描述的PD-1或PD-L1 Actaferon克隆策略的示意图。

[0013] 图2示出了PD-L1(上图)或PD-1(下图)Actaferon与转染的Hek293T细胞的结合。

[0014] 图3示出了如通过外周血单核细胞(PBMC)中的pSTAT1状态评定的PD-1靶向。将数据绘制为未刺激的pSTAT1平均荧光强度(MFI)的百分比。

[0015] 图4示出了如通过转染的Hek293T细胞中的pSTAT1状态评定的PD-1靶向。绘制了pSTAT1细胞的百分比。

[0016] 图5示出了如通过MDA-MB-231细胞中的pSTAT1状态评定的PD-L1靶向。将数据绘制为平均荧光强度(MFI)。

[0017] 图6示出了PD-L1 VHH与转染的Hek293T细胞的结合。将数据绘制为平均荧光强度(MFI)。

[0018] 图7A-图7G是示出PD-L1 VHH Actaferon (AFN)的生物活性的图。在亲本HL116细胞(用p6-16荧光素酶报告子稳定转染的IFN应答细胞系)上测量了生物活性。在存在或不存在过量(20 $\mu$ g/ml)相应PD-L1 VHH的情况下,通过连续稀释PD-L1 VHH AFN来诱导荧光素酶活性。所测试的PD-L1 VHH是2LIG3(图7A)、2LIG27(图7B)、2LIG97(图7C)、2LIG99(图7D)、2LIG176(图7E)、2LIG189(图7F)和3LIG8(图7G)。

[0019] 图8是示出阿特殊单抗-Actaferon (ate-AFN;即Ate-IFNa2mut)对亲本HL116细胞(用p6-16荧光素酶报道子稳定转染的IFN应答细胞系)的生物活性的图。通过在存在或不存在过量(50 $\mu$ g/ml)阿特殊单抗(ate)的情况下经由连续稀释ate-AFN所诱导的荧光素酶活性来度量生物活性。

[0020] 图9是示出在具有人源化免疫系统的小鼠的RL肿瘤模型中基于2LIG99的AFN的体内抗肿瘤活性的图。

[0021] 图10A-图10C是示出用连续稀释的102C3 AFN(图10A)、102C12 AFN(图10B)或野生型IFNa2(图10C)刺激的经人PD-1或空载体转染的Hek293T细胞中的pSTAT1的图。在这些图中绘制了pSTAT1阳性细胞的百分比。

## 具体实施方式

[0022] 本发明部分地基于识别并结合至PD-1或PD-L1的结合剂(例如抗体,作为非限制性实例,诸如VHH)的发现。在一些实施方案中,本发明的结合剂是具有一个或多个靶向部分和/或一种或多种信号传导剂的嵌合或融合蛋白的一部分。在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-1或PD-L1,并且在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1。在一些实施方案中,这些结合剂结合至PD-1或PD-L1,但不在功能上调节PD-1或PD-L1。

[0023] 本发明进一步提供了包含所述结合剂的药物组合物以及所述药物组合物在治疗各种疾病,包括癌症、自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病中的用途。

[0024] PD-1或PD-L1结合剂

[0025] 在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂是能够特异性地结合至PD-1或PD-L1的基于蛋白质的剂。在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂是能够特异性地结合至PD-1或PD-L1而不在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1的基于蛋白质的剂。

[0026] 程序性细胞死亡蛋白1,也称为PD-1和分化簇279(CD279),是一种主要在激活的T细胞、B细胞和巨噬细胞上表达的细胞表面受体。已经显示PD-1在配接其配体(即PD-L1和/或PD-L2)时负调控抗原受体信号传导。PD-1在下调免疫系统以及通过阻抑T细胞炎症活动来促进自我耐受中起重要作用。PD-1是含有负责配体结合的Ig可变类型(V型)结构域和负责信号传导分子结合的胞质尾区的I型跨膜糖蛋白。PD-1的胞质尾区含有两个基于酪氨酸的信号传导基序,即ITIM(基于免疫受体酪氨酸的抑制基序)和ITSM(基于免疫受体酪氨酸的转换基序)。

[0027] 在各个实施方案中,本发明的PD-1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,所述抗原识别结构域识别PD-1上存在的表位。在一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别PD-1上存在的一个或多个线性表位。如本文所使用,线性表位是指PD-1上存在的任何连续氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别PD-1上存在的一个或多个构象表位。如本文所使用,构象表位是指形成具有能够被抗原识别结构域识别的特征和/或形状和/或三级结构的三维表面的一个或多个氨基酸区段(可能是不连续的)。

[0028] 在各个实施方案中,本发明的PD-1结合剂可以结合至人PD-1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体。在各个实施方案中,本发明的PD-1结合剂可以结合至人PD-1的任何形式。在一个实施方案中,所述PD-1结合剂结合至PD-1的磷酸化形式。

[0029] 在一个实施方案中,本发明的PD-1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,所述抗原识别结构域识别人PD-1上存在的一个或多个表位。在一个实施方案中,所述人PD-1包含氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0030] 在另一个实施方案中,所述人PD-1包含无氨基端信号肽的氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0031] 在各个实施方案中,本发明的PD-1结合剂包含能够特异性结合的靶向部分。在各个实施方案中,所述PD-1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,诸如抗体或其衍生物。在一个实施方案中,所述PD-1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是抗体。在各个实施方案中,所述抗体是包括两条重链和两条轻链的全长多聚体蛋白。每条重链包括一个可变区(例如V<sub>H</sub>)和至少三个恒定区(例如CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>),并且每条轻链包括一个可变区(V<sub>L</sub>)和一个恒定区(C<sub>L</sub>)。可变区决定了抗体的特异性。每个可变区包括由四个相对保守的框架区(FR)侧接的三个高变区,也称为互补性决定区(CDR)。所述三个CDR(称为CDR1、CDR2和CDR3)有助于抗体结合特异性。在一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,所述抗体是人源化抗体。

[0032] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是抗体衍生物

或抗体形式。在一些实施方案中,本发明的PD-1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体(scFv)、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白(半胱氨酸结蛋白、打结素(knottin))、DARPin;四连接素(Tetranectin);Affibody;反式体(Transbody);抗运载蛋白(Anticalin);AdNectin;Affilin;Affimer;微型体(Microbody);适体;奥特瑞斯(alterase);塑性抗体;费洛体(phylomer);斯塔都体(stradobody);巨型体(maxibody);伊维体(evibody);菲诺体(fynomer)、狢狢重复蛋白、库尼茨型结构域(Kunitz domain)、高亲合性多聚体(avimer)、阿特里体(atrimer)、普罗体(probody)、免疫体(immunobody)、曲奥单抗(triomab)、特洛伊体(troybody);佩普体(pepbody);疫苗体(vaccibody)、单特异性体(UniBody);双特异性体(DuoBody)、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、肽模拟分子或合成分子,如以下美国专利号或专利公布号中所描述:US 7,417,130、US 2004/132094、US 5,831,012、US 2004/023334、US 7,250,297、US 6,818,418、US 2004/209243、US 7,838,629、US 7,186,524、US 6,004,746、US 5,475,096、US 2004/146938、US 2004/157209、US 6,994,982、US 6,794,144、US 2010/239633、US 7,803,907、US 2010/119446和/或US 7,166,697,所述专利的内容特此以引用方式整体并入。还参见 Storz MAb.2011年5月-6月;3(3):310-317。

[0033] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是单结构域抗体,诸如VHH。所述VHH可以来源于例如产生VHH抗体的生物体,诸如骆驼、鲨鱼,或者所述VHH可以是设计的VHH。VHH是抗体来源的治疗性蛋白质,它们含有天然存在的重链抗体的独特结构和功能性质。VHH技术是基于来自骆驼的缺乏轻链的完全功能抗体。这些重链抗体含有单个可变结构域(V<sub>H</sub>)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。

[0034] 在一个实施方案中,所述PD-1结合剂包含VHH。在一些实施方案中,所述VHH是人源化VHH或骆驼化VHH。

[0035] 在一些实施方案中,所述VHH包含完全人V<sub>H</sub>结构域,例如HU MABODY (Crescendo Biologics, Cambridge, UK)。在一些实施方案中,完全人V<sub>H</sub>结构域(例如HUMABODY)是单价、二价或三价的。在一些实施方案中,所述完全人V<sub>H</sub>结构域(例如HUMABODY)是单特异性或多特异性的,诸如单特异性、双特异性或三特异性的。说明性的完全人V<sub>H</sub>结构域(例如HUMABODY)描述于例如W02016/113555和W02016/113557中,所述文献的全部内容以引用方式并入。

[0036] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是包含具有四个“框架区”或FR和三个“互补决定区”或CDR的单个氨基酸链的VHH。如本文所使用,“框架区”或“FR”是指可变结构域中位于CDR之间的区域。如本文所使用,“互补决定区”或“CDR”是指VHH中含有能够特异性地结合至抗原性靶标的氨基酸序列的可变区。

[0037] 在各个实施方案中,所述PD-1结合剂包含具有包含至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列的可变结构域的VHH。在各个实施方案中,所述PD-1结合剂包含具有包含至少一个FR1、FR2、FR3和FR4序列的可变区的VHH。

[0038] 在一些实施方案中,所述PD-1CDR1序列选自:GFSMDYYAIA (SEQ ID NO:2); GFSVDYYAIA (SEQ ID NO:3); GGFNRVSYMG (SEQ ID NO:4); GIIKSINFMG (SEQ ID NO:5); GFILDYYGIG (SEQ ID NO:6); GLSLDYDGVG (SEQ ID NO:7); GRTFSSLGMG (SEQ ID NO:8); GFAFGSYDMG (SEQ ID NO:9); GFSFGNNDMS (SEQ ID NO:10); IHAMG (SEQ ID NO:11); INAMA

(SEQ ID NO:12);SGTMG(SEQ ID NO:13);GSIASIHAM(SEQ ID NO:14);GSIASIHAMG(SEQ ID NO:15);FYGMG(SEQ ID NO:16);GGTFSFYGMG(SEQ ID NO:17);YYAIA(SEQ ID NO:18);VSYMG(SEQ ID NO:19);INFMG(SEQ ID NO:20);SLGMG(SEQ ID NO:21);SYDMG(SEQ ID NO:22);和NNDMS(SEQ ID NO:23)。

[0039] 在一些实施方案中,所述PD-1CDR2序列选自:CITGSDFMV DT(SEQ ID NO:24);SVTSGGEI(SEQ ID NO:25);STTSDGRT(SEQ ID NO:26);CISSSDGST(SEQ ID NO:27);AIAWNGAST(SEQ ID NO:28);GINSNGRIT(SEQ ID NO:29);AINSGGGST(SEQ ID NO:30);AITWSGGITYYEDSVKG(SEQ ID NO:31);VITWSGGITYYADSVKG(SEQ ID NO:32);VITVSGGITYYADSV KG(SEQ ID NO:33);AITWSGGITYYADSLKG(SEQ ID NO:34);LISWSGGSTYYEDSVKG(SEQ ID NO:35);SIPWSGGRIYYA DSVKG(SEQ ID NO:36);VITWSGGITYY(SEQ ID NO:37);VIT VSGGITYY(SEQ ID NO:38);DIRTSAGRTYYADSVKG(SEQ ID NO:39);DIRTSAGRTY(SEQ ID NO:40);CITGSDFMVDITYY(SE Q ID NO:41);CITGSDFMVDITYYVASVKG(SEQ ID NO:42);SVTSGGEIT(SEQ ID NO:43);SVTSGGEITIADSVKG(SEQ ID N O:44);SVTSGGEITVADSVKG(SEQ ID NO:45);STTSDGRTT(S EQ ID NO:46);STTSDGRTTVADSVKG(SEQ ID NO:47);CISS SDGSTY(SEQ ID NO:48);AIAWNGASTY(SEQ ID NO:49);AIAWNGASTYYTESVKG(SEQ ID NO:50);GINSNGRITD(SEQ ID NO:51);GINSNGRITDYADSVTG(SEQ ID NO:52);AINSGGGSTY(SEQ ID NO:53);和AINSGGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:54)。

[0040] 在一些实施方案中,所述PD-1CDR3序列选自:AVRSTANTL CPSHYSVMDY(SEQ ID NO:55);AVRSTANTLCPSHYSIMDY(SEQ ID NO:56);NADIWVSDARMYNY(SEQ ID NO:57);NADIWLPSDRMYNY(SEQ ID NO:58);ATATLCDGGIWGY(SEQ ID NO:59);AASGLGSVVVTANEYDY(SEQ ID NO:60);AQGDRS SWHYGYMDY(SEQ ID NO:61);ATKSDPMTNEYDL(SEQ ID NO:62);DRAESSWYDY(SEQ ID NO:63);DKHQSSWYDY(SEQ ID NO:64);DKHQSSFYDY(SEQ ID NO:65);DRAQSSWYDY(SEQ ID NO:66);DRVDSNWYDY(SEQ ID NO:67);KERST GWDFAS(SEQ ID NO:68);和EMSGISGWYDY(SEQ ID NO:69)。

[0041] 在各个示例性实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自以下序列的氨基酸序列:

[0042] 2PD23

[0043] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSMDYYAIAWFRQAPGKEREEISCITGSDFMVDITYYVASVKGRFTISRDN AENTAYLQMNNLKPEDTG VYFCAVRSTANTLCPSHYSVMDYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHH HHH(SEQ ID NO:70);

[0044] 2PD26

[0045] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSMDYYAIAWFRQAPGKEREEISCITGSDFMVDITYYVASVKGRFTISRDN AENTAYLQMNNLKPEDTG VYFCAVRSTANTLCPSHYSVMDYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHH HHH(SEQ ID NO:71);

[0046] 2PD90

[0047] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSVDYYAIAWFRQAPGKEREEISCITGSDFMVDITYYVASVKGRFTISRDN AKNTAYLQMNSLKPEDTG VYFCAVRSTANTLCPSHYSIMDYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHH HHH(SEQ ID NO:72);

[0048] 2PD-106

[0049] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSMDYYAIAWFRQAPGKEREEISCITGSDFMVDITYYVASVKG

RFTISRDNAKNTAHLQMNSLKPEDTGVYFCAVRSTANTLCPSHYSVMDYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHH  
HHH (SEQ ID NO:73) ;

[0050] 2PD-16

[0051] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGFNRSYMGWYRQAPGTKRELVASVTSGGEITIADSVKGRFT  
VSRDNSKNTLYLQMNGLKPEDGATYWCNADIWVSDARMYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:74) ;

[0052] 2PD71

[0053] QVQLQESGGGLVQTGESLRLSCAASGGFNRSYMGWYRQAPGSKRELVASVTSGGEITVADSVKGRFT  
VSRDNNKNTLYLQMNGLKPEDGATYWCNADIWVSDARMYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:75) ;

[0054] 2PD-152

[0055] QVQLQESGGGLVQTGESLRLSCAASGIIKSINFMGWYRQPPGTKRELVASTTSDGRITVADSVKGRFT  
ISRDNANKNTIYLEMSSLKPEDTATYWCNADIWLPSDRMYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:76) ;

[0056] 2PD-12

[0057] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGFILDYYGIGWFRQAPGKEREAVSCISSSDGSTYYADSVKGRF  
TISRDNALNTLYLQMNSLKPEDTAVYHCATATLCDGGIWGYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:77) ;

[0058] 3PD55

[0059] QVQLQESGGGLAQAGGSLRLSCEGSLSLDYDGVGWFRQAPGKEREAVSCISSSDGSTYYADSVKGRF  
TISRGNALNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATATLCDGGIWGYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:78) ;

[0060] 3PD82

[0061] QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCAVSGFILDYYGIGWFRQAPGKEREAVSCISSSDGSTYYADSVKGRF  
TISRDNALNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATATLCDGGIWGYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:79) ;

[0062] 2PD8

[0063] QVQLQESGGGSVQAGDSLRLSCTASGRFTSSLGMGWFRQAPGKEREFVSAIAWNGASTYYTESVKGRF  
TISRDDAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCAASGLGSVVVTANEYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:80) ;

[0064] 2PD27

[0065] QVQLQESGGGSVQPGKSLRLSCAASGRFTSSLGMGWFRQAPGKEREFVSAIAWNGASTYYTESVKGRF  
TISRDDAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYFCAASGLGSVVVTANEYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:81) ;

[0066] 2PD82

[0067] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGFAFGSYDMGWVRQAPGKGPEWVSGINSGGRITDYADSVTGRF  
TISRDNANKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAQGDRSSWHYYGMDYWGKGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:82) ;或

[0068] 3PD36

[0069] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGNNDMSWVRQAPGKGPEWVSAINSGGGSTYYADSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATKSDPMTNEYDLWGXTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:83)。

[0070] 在各个示例性实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自SEQ ID NO:70至SEQ ID NO:83而没有末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即,HHHHHH;SEQ ID NO:84)。

[0071] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自SEQ ID No:70-83(以上提供)而没有HA标签的氨基酸序列(即,YPYDVPDYGS;SEQ ID NO:85)。

[0072] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自SEQ ID No:70-83(以上提供)而没有AAA接头的氨基酸序列。

[0073] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自SEQ ID No:70-83(以上提供)而没有AAA接头、HA标签和末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即,AAAYPYDVPDYGSHHHHHH;SEQ ID NO:86)。

[0074] 在各个示例性实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自以下序列的氨基酸序列:

[0075] 102C3:

[0076] QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSIFSIIHAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSSGITYYEDSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAADRAESSWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:1246);或

[0077] 102C12:

[0078] QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSIIASIIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:1247)。

[0079] 在各个实施方案中,所述PD-1结合剂包含美国公布号2017/0137517中描述的氨基酸序列,所述公布的全部内容以引用方式并入。举例来说,在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含美国公布号2017/0137517中的以下序列中的一者:

[0080] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIIASIIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:87);

[0081] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIIASIIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:88);

[0082] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIIASIIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:89);

[0083] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:90);

[0084] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKS (SEQ ID NO:91);

[0085] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQS (SEQ ID NO:92);

[0086] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIIASIIHAMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:93);

[0087] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:94);

[0088] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF

TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVKS (SEQ ID NO:95) ;  
[0089] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVQS (SEQ ID NO:96) ;  
[0090] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:97) ;  
[0091] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:98) ;  
[0092] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:99) ;  
[0093] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVKS (SEQ ID NO:100) ;  
[0094] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVQS (SEQ ID NO:101) ;  
[0095] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:102) ;  
[0096] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:103) ;  
[0097] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:104) ;  
[0098] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTATYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:105) ;  
[0099] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:106) ;  
[0100] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVKS (SEQ ID NO:107) ;  
[0101] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVQSA (SEQ ID NO:108) ;  
[0102] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:109) ;  
[0103] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:110) ;  
[0104] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVKS (SEQ ID NO:111) ;  
[0105] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVQSA (SEQ ID NO:112) ;  
[0106] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:113) ;  
[0107] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:114) ;

[0108] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQSSA (SEQ ID NO:115);

[0109] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVKSA (SEQ ID NO:116);

[0110] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQSA (SEQ ID NO:117);

[0111] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:118);

[0112] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTFSFYGMGWFRRQAPGKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:119);

[0113] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:120);

[0114] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKEREEVAVITWSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:121);

[0115] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKEREEVAVITWSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:122);

[0116] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKEREEVAVITWSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG  
GGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK  
RFTISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:123);

[0117] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKEREEVAVITWSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG  
GGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVK  
RFTISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG  
GSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV  
KGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:124);

[0118] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKEREEVAVITVSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:125);

[0119] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:126);

[0120] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:127);

[0121] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:128);

[0122] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:129);

[0123] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:130);

[0124] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWERQAPGKEREEVAVITWSSGITYYADSVKGRF

[0125] MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWR  
RMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESLRAELRV  
TERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVGVGGLLGLSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFV  
DYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID  
NO:132)。

[0127] 在各个实施方案中,所述PD-1结合剂包含PCT公布号W02017/087587中描述的氨基酸序列,所述公布的全部内容以引用方式并入。举例来说,在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含PCT公布号W0 2017/087587中的以下序列中的一者:

[0136] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYVLQMSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTVKS (SEQ ID NO:141):

[0137] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVQS (SEQ ID NO:142) ;

[0138] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:143) ;

[0139] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVKVSS (SEQ ID NO:144) ;

[0140] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVQVSS (SEQ ID NO:145) ;

[0141] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVKS (SEQ ID NO:146) ;

[0142] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVQS (SEQ ID NO:147) ;

[0143] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:148) ;

[0144] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNKNTVYLLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:149) ;

[0145] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTATYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:150) ;

[0146] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVKVSSA (SEQ ID NO:151) ;

[0147] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVQVSSA (SEQ ID NO:152) ;

[0148] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVKSA (SEQ ID NO:153) ;

[0149] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMCWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVQSA (SEQ ID NO:154) ;

[0150] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMCWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVKVSSA (SEQ ID NO:155) ;

[0151] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVQVSSA (SEQ ID NO:156) ;

[0152] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVKSA (SEQ ID NO:157) ;

[0153] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVQSA (SEQ ID NO:158) ;

[0154] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:159) ;

[0155] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVKVSSA (SEQ ID NO:160) ;

[0156] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVQVSSA (SEQ ID NO:161);

[0157] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVKSA (SEQ ID NO:162);

[0158] EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVQSA (SEQ ID NO:163);

[0159] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:164);

[0160] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:165);

[0161] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAIITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:166);

[0162] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:167);

[0163] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:168);

[0164] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYQLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:169);

[0165] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYQLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:170);

[0166] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:171);

[0167] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:172);和

[0168] DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGITYYADSVKGRF

TISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:173)。

[0169] 在一些实施方案中,所述PD-1结合剂包含选自在位置1、11、14、52a、73、74、83、89、100a、110和112(根据Kabat编号)处具有一个或多个取代的SEQ ID NO:133-173的氨基酸序列。在一些实施方案中,位置1处的氨基酸是E或D。在一些实施方案中,位置11处的氨基酸是L或V。在一些实施方案中,位置14处的氨基酸是A或P。在一些实施方案中,位置52a处的氨基酸是W或V。在一些实施方案中,位置73处的氨基酸是N、S、P或Q。在一些实施方案中,位置74处的氨基酸是A或S。在一些实施方案中,位置83处的氨基酸是K或R。在一些实施方案中,位置89处的氨基酸是T、V、I或L。在一些实施方案中,位置100a处的氨基酸是W或F。在一些实施方案中,位置110处的氨基酸是T、K或Q。在一些实施方案中,位置112处的氨基酸是S、K或Q。

[0170] 在各个实施方案中,本发明设想了如本文所描述的本发明的PD-1结合剂的任何天然或合成类似物、突变体、变体、等位基因、同系物和直系同源物(本文中统称为“类似物”)的用途。在各个实施方案中,所述PD-1结合剂的氨基酸序列还包括氨基酸类似物、氨基酸衍生物或其他非经典氨基酸。

[0171] 在各个实施方案中,本发明还提供PD-L1结合剂。程序性死亡配体1(PD-L1),也称为分化簇274(CD274)或B7同系物1(B7-H1),是一种据推测在阻抑免疫系统中起主要作用的1型跨膜蛋白。PD-L1响应于LPS和GM-CSF处理在巨噬细胞和树突状细胞(DC)中上调,并且在TCR和B细胞受体进行信号转导时在T细胞和B细胞中上调。

[0172] 在各个实施方案中,本发明的PD-L1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,所述抗原识别结构域识别PD-L1上存在的表位。在一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别PD-L1上存在的一个或多个线性表位。如本文所使用,线性表位是指PD-L1上存在的任何连续氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别PD-L1上存在的一个或多个构象表位。如本文所使用,构象表位是指形成具有能够被抗原识别结构域识别的特征和/或形状和/或三级结构的三维表面的一个或多个氨基酸区段(可能是不连续的)。

[0173] 在各个实施方案中,本发明的PD-L1结合剂可以结合至人PD-L1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体。在各个实施方案中,本发明的PD-L1结合剂可以结合至人PD-L1的任何形式。在一个实施方案中,所述PD-L1结合剂结合至PD-L1的磷酸化形式。在一个实施方案中,所述PD-L1结合剂结合至PD-L1的乙酰化形式。

[0174] 在一个实施方案中,本发明的PD-L1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,所述抗原识别结构域识别人PD-L1上存在的一个或多个表位。在一个实施方案中,所述人PD-L1包含以下氨基酸序列(信号肽加下划线):

[0175] 同种型1:

[0176] MRIFAVFIFMTYWHLLN~~NAFTV~~TPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQ~~RARLL~~KDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD~~PVTSE~~HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIP~~ELPLA~~HPPNER~~THL~~VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:174);

[0177] 同种型2:

[0178] MRIFAVFIFMTYWHLLNAPYNKINQRILVVD~~PVTSE~~HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIP~~ELPLA~~HPPNER~~THL~~VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:175);或

[0179] 同种型3:

[0180] MRIFAVFIFMTYWHLLN~~NAFTV~~TPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQ~~RARLL~~KDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD~~PVTSE~~HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGD (SEQ ID NO:176)。

[0181] 在各个实施方案中,本发明的PD-L1结合剂包含能够特异性结合的靶向部分。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,诸如抗体或其衍生物。在一个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是抗体。在各个实施

方案中,所述抗体是包括两条重链和两条轻链的全长多聚体蛋白。每条重链包括一个可变区(例如 $V_H$ )和至少三个恒定区(例如 $CH_1$ 、 $CH_2$ 和 $CH_3$ ),并且每条轻链包括一个可变区( $V_L$ )和一个恒定区( $C_L$ )。可变区决定了抗体的特异性。每个可变区包括由四个相对保守的框架区(FR)侧接的三个高变区,也称为互补性决定区(CDR)。所述三个CDR(称为CDR1、CDR2和CDR3)有助于抗体结合特异性。在一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,所述抗体是人源化抗体。

[0182] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是抗体衍生物或抗体形式。在一些实施方案中,本发明的PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体(scFv)、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白(半胱氨酸结蛋白、打结素(knottin))、DARPin;四连接素(Tetranectin);Affibody;反式体(Transbody);抗运载蛋白(Anticalin);AdNectin;Affilin;Affimer;微型体(Microbody);适体;奥特瑞斯(alterase);塑性抗体;费洛体(phylomer);斯塔都体(stradobody);巨型体(maxibody);伊维体(evibody);菲诺体(fynomer)、狢狢重复蛋白、库尼茨型结构域(Kunitz domain)、高亲合性多聚体(avimer)、阿特里体(atrimer)、普罗体(proboby)、免疫体(immunobody)、曲奥单抗(triomab)、特洛伊体(troybody);佩普体(pepbody);疫苗体(vaccibody)、单特异性体(UniBody);双特异性体(DuoBody)、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、肽模拟分子或合成分子,如以下美国专利号或专利公布号中所描述:US 7,417,130、US 2004/132094、US 5,831,012、US 2004/023334、US 7,250,297、US 6,818,418、US 2004/209243、US 7,838,629、US 7,186,524、US 6,004,746、US 5,475,096、US 2004/146938、US 2004/157209、US 6,994,982、US 6,794,144、US 2010/239633、US 7,803,907、US 2010/119446和/或US 7,166,697,所述专利的内容特此以引用方式整体并入。还参见Storz MAbs.2011年5月-6月;3(3):310-317。

[0183] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是单结构域抗体,诸如VHH。所述VHH可以来源于例如产生VHH抗体的生物体,诸如骆驼、鲨鱼,或者所述VHH可以是设计的VHH。VHH是抗体来源的治疗性蛋白质,它们含有天然存在的重链抗体的独特结构和功能性质。VHH技术是基于来自骆驼的缺乏轻链的完全功能抗体。这些重链抗体含有单个可变结构域( $V_H$ )和两个恒定结构域( $CH_2$ 和 $CH_3$ )。

[0184] 在一个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含VHH。在一些实施方案中,所述VHH是人源化VHH或骆驼化VHH。

[0185] 在一些实施方案中,所述VHH包含完全人 $V_H$ 结构域,例如HUMABODY (Crescendo Biologics, Cambridge, UK)。在一些实施方案中,完全人 $V_H$ 结构域(例如HUMABODY)是单价、二价或三价的。在一些实施方案中,所述完全人 $V_H$ 结构域(例如HUMABODY)是单特异性或多特异性的,诸如单特异性、双特异性或三特异性的。说明性的完全人 $V_H$ 结构域(例如HUMABODY)描述于例如W02016/113555和W02016/113557中,所述文献的全部内容以引用方式并入。

[0186] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是包含具有四个“框架区”或FR和三个“互补决定区”或CDR的单个氨基酸链的VHH。如本文所使用,“框架区”或“FR”是指可变结构域中位于CDR之间的区域。如本文所使用,“互补决定区”或“CDR”是指VHH中含有能够特异性地结合至抗原性靶标的氨基酸序列的可变区。

[0187] 在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含具有包含至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列的可变结构域的VHH。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含具有包含至少一个FR1、FR2、FR3和FR4序列的可变区的VHH。

[0188] 在一些实施方案中,所述PD-L1 CDR1序列选自:GFTLDYYAIG (SEQ ID NO:177); GTIFSINHMD (SEQ ID NO:178); GFTFDDYGMS (SEQ ID NO:179); GFTLDYYAIN (SEQ ID NO:180); GTIFSINRMD (SEQ ID NO:181); GFTFSSYGMS (SEQ ID NO:182); GKIFSGNDMG (SEQ ID NO:183); GFTFNDYAMS (SEQ ID NO:184); GFNLDPYAIA (SEQ ID NO:185); GFTFTAYAMS (SEQ ID NO:186); GFTFDYYAIG (SEQ ID NO:187); GFNLDPYAIG (SEQ ID NO:188); ESIFSIEAMG (SEQ ID NO:189); GRTFSISAMG (SEQ ID NO:190); YYAIG (SEQ ID NO:191); YYAKC (SEQ ID NO:192); QYDVG (SEQ ID NO:193); NSAMG (SEQ ID NO:194); DSIVS (SEQ ID NO:195); INHMD (SEQ ID NO:196); DYGMS (SEQ ID NO:197); YYAIN (SEQ ID NO:198); INRMD (SEQ ID NO:199); SYGMS (SEQ ID NO:200); GNDMG (SEQ ID NO:201); DYAMS (SEQ ID NO:202); PYAIA (SEQ ID NO:203); AYAMS (SEQ ID NO:204); PYAIG (SEQ ID NO:205); IEAMG (SEQ ID NO:206); 和ISAMG (SEQ ID NO:207)。

[0189] 在一些实施方案中,所述PD-L1 CDR2序列选自:ISSSDGSTY (SEQ ID NO:208); ITSDGFPT (SEQ ID NO:209); IRWNGGSTN (SEQ ID NO:210); ITSDGTPT (SEQ ID NO:211); IDSGGGSTS (SEQ ID NO:212); ITSGGITD (SEQ ID NO:213); ITSDGTPT (SEQ ID NO:214); IDSGGGSTS (SEQ ID NO:215); IRSNGGYTN (SEQ ID NO:216); ISSSDVGTY (SEQ ID NO:217); INSSDGSTY (SEQ ID NO:218); ISGSDSSTY (SEQ ID NO:219); ISSSDVGTY (SEQ ID NO:220); ITSDGTPT (SEQ ID NO:221); ITSDGTPA (SEQ ID NO:222); IDSGGGSTS (SEQ ID NO:223); ISSGDGSKY (SEQ ID NO:224); ISSSDVGTY (SEQ ID NO:225); IFGGGFTN (SEQ ID NO:226); ITSGGITD (SEQ ID NO:227); IDSGGGSTS (SEQ ID NO:228); ITSDGTPT (SEQ ID NO:229); IDSGGGSTS (SEQ ID NO:230); ISSSDVGTY (SEQ ID NO:231); ITWSGGSTS (SEQ ID NO:232); IDSGGGSTS (SEQ ID NO:233); IRSNGGYTN (SEQ ID NO:234); SISSSDGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:235); CISSSDGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:236); CISGGDNSTYYADSVKG (SEQ ID NO:237); FSSSGGRTIYPDSVKG (SEQ ID NO:238); RITGGGLIAYTDSVKG (SEQ ID NO:239); GISNGGTIKYAESVLG (SEQ ID NO:240); LITSDGFPT (SEQ ID NO:241); LITSDGFPTYADSAKG (SEQ ID NO:242); AIRWNGGSTN (SEQ ID NO:243); AIRWNGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:244); LITSDGTPT (SEQ ID NO:245); LITSDGTPTYADSAKG (SEQ ID NO:246); AIDSGGGSTS (SEQ ID NO:247); AIDSGGGSTSYADSVKG (SEQ ID NO:248); IITSGGITD (SEQ ID NO:249); IITSGGITDYADAVKG (SEQ ID NO:250); GIRSNGGYTN (SEQ ID NO:251); GIRSNGGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:252); CISSSDVGTY (SEQ ID NO:253); CISSSDVGTYADSVKG (SEQ ID NO:254); CINSSDGSTY (SEQ ID NO:255); CINSSDGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:256); CISGSDSSTY (SEQ ID NO:257); CISGSDSSTYYADSVKG (SEQ ID NO:258); LITSDGTPA (SEQ ID NO:259); LITSDGTPAYADSAKG (SEQ ID NO:260); CISSGDGSKY (SEQ ID NO:261); CISSGDGSKYYADSVKG (SEQ ID NO:262); AIFGGGFTN (SEQ ID NO:263); AIFGGGFTNYADSVKG (SEQ ID NO:264); AITWSGGSTS (SEQ ID NO:265); 和AITWSGGSTSYTDSVKG (SEQ ID NO:266)。

[0190] 在一些实施方案中,所述CDR3序列选自:DGWSSCRHGINEYLYW (SEQ ID NO:267); SSGVYNYW (SEQ ID NO:268); QGYICSGYGCP (SEQ ID NO:269); SGWRLCRPTDEYDYSYW (SEQ ID

NO:270);QGYICSGYGCSDYW(SEQ ID NO:271);RDRTIWW(SEQ ID NO:272);QGYICSGYGCYP(SEQ ID NO:273);DGYIYCS DYPHPLYW(SEQ ID NO:274);DGWRDCTWSNEYAYW(SEQ ID NO:275);TGWRTCRGLNEYDYW(SEQ ID NO:276);DLVSGSSRLYDYW(SEQ ID NO:277);MGRTNYGVIYDPNMYNYW(SEQ ID NO:278);SGWRLCRPTDEYDYLYW(SEQ ID NO:279);SQAPITITATMMKPFYDY(SEQ ID NO:280);RHGGPLTVEYFFDY(SEQ ID NO:281);GGWKYCSGYDPEYIY(SEQ ID NO:282);DWYLSY(SEQ ID NO:283);INSRDG(SEQ ID NO:284);和RQY(SEQ ID NO:285)。

[0191] 在各个示例性实施方案中,所述PD-L1结合剂包含选自以下序列的氨基酸序列:

[0192] 2LIG2

[0193] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREEVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCATDGWSSCRHGIN-EYLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH(SEQ ID NO:286);

[0194] 或

[0195] 2LIG3

[0196] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSINHMDWFRQAPGKQRELVALITSDGFPTYADSAKGRFTISRDNKTKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH(SEQ ID NO:287);

[0197] 或

[0198] 2LIG16

[0199] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSAIRWNGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKS EDTAVYYCA-QGYI-CSGYGCPRGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH(SEQ ID NO:288);

[0200] 或

[0201] 2LIG22

[0202] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYA INWFRQAPGKEREEVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATSGWRLCRPTDEYDYSYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH(SEQ ID NO:289);

[0203] 或

[0204] 2LIG27

[0205] QVQLQESGGGVVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPTYADSAKGRFTISRDNKTKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH(SEQ ID NO:290);

[0206] 或

[0207] 2LIG29

[0208] QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQTPGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCA-QGYI-CSGYGCSDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH(SEQ ID NO:291);

[0209] 或

[0210] 2LIG30

- [0211] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKIFSGNDMGWYRQAPGKQRELVGIIITSGGITDYADAVKGRFT  
ISRDNAKNMMYLQMNSLKPEDTAVYYCNMRDRTIWWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:  
292) ;
- [0212] 或
- [0213] 2LIG34
- [0214] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPTYADSAKGRFT  
ISRDNNTKKTIVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:  
293) ;
- [0215] 或
- [0216] 2LIG35
- [0217] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCA-QGYI-CSGYGCSQYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:294) ;
- [0218] 或
- [0219] 2LIG48
- [0220] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRSNNGGYTNYADSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKSSEDVAVYYCA-QGYI-CSGYGCPYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:295) ;
- [0221] 或
- [0222] 2LIG65
- [0223] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFNLDPIAIAWFRQAPGKEREEVSCISSSDVGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKKTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDGYIYCSQYHPYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:296) ;
- [0224] 或
- [0225] 2LIG85
- [0226] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTAYAMSWFRQAPGKEREEVSCINSSDGSTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYHCATDGWRDCTWSNEYAYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:297) ;
- [0227] 或
- [0228] 2LIG86
- [0229] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYYAIGWFRQAPGKEREEVSCISGSDSSTYYADSVKGRF  
TIVRDNAQNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAVTGWRTCRGLNEYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:298) ;
- [0230] 或
- [0231] 2LIG89
- [0232] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLDPIAIAWFRQAPGKEREEVSCISSSDVGITYYADSVKGRF  
TISRDNNTKKTIVYLMNSLKPEDTAVYYCATDGYIYCSQYHPYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:299) ;
- [0233] 或

[0234] 2LIG97

[0235] QVQLQESGGGLVQAGESLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPTYADSAKGRFT  
ISRDN TKKT VSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:  
300) ;

[0236] 或

[0237] 2LIG99

[0238] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFT  
ISRDN TKKT VSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:  
301) ;

[0239] 或

[0240] 2LIG109

[0241] QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCKTSGFTFSSYGMSWVRQTPGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRF  
TISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAQGY - CSGYGCSDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:302) ;

[0242] 或

[0243] 2LIG127

[0244] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNLD PYAIGWFRQAPGKEREEVSCISSGDGSKYYADSVKGRF  
TMSRDN AKKT VYLQMNSLKPEDTAVYYCATDGYYYCSDYPHPLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:303) ;

[0245] 或

[0246] 2LIG139

[0247] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFNLD PYAIAWFRQAPGKEREEVSCISSDVGTYADSVKGRF  
TISRDN AKKT VYLQMNSLKPEDTAVYYCATDGYYYCSDYPHPLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:304) ;

[0248] 或

[0249] 2LIG176

[0250] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASESIFSIEAMGWYRQAPGKQRELVA AIFGGGFTNYADSVKGRFT  
ISRDN ANRT VYLQMNSLKPEDTAVYYCNADLVSGSSRLYDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:305) ;

[0251] 或

[0252] 2LIG189

[0253] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGKIFSGNDMGWYRQAPGKQREL VGIITSGGITDYADAVKGRFT  
ISRDN AKNMMYLQMNSLKPEDTAVYYCNMRDRTIWWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:  
306) ;

[0254] 或

[0255] 3LIG3

[0256] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREEVSCISSDGSTYYADSVKGRF  
TISRDN AKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCATDGWSSCRHG INEYLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:307) ;

[0257] 或

[0258] 3LIG7

[0259] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAQGYI-CSGYGCSQDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:308) ;

[0260] 或

[0261] 3LIG8

[0262] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPTYADSAKGRFT  
ISRDNNTKKTIVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID NO:  
309) ;

[0263] 或

[0264] 3LIG9

[0265] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAQGYI-CSGYGCSQDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:310) ;

[0266] 或

[0267] 3LIG18

[0268] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLDPIAIAWFRQAPGKEREEVSCISSSDVGTYADSVKGRF  
TISRDNAKKTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDGYIYCSQDYPHPLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:311) ;

[0269] 或

[0270] 3LIG20

[0271] QVQLQESGGGLVXAGGSLRLSCAASGRFTFSISAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSSGGSTSYTDSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAIYYCAAMGRNTYGVIIYDPNMYNYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:312) ;

[0272] 或

[0273] 3LIG28

[0274] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAINWFRQAPGKEREEVSCISSSDGSTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCATSGWRLCRPTDEYDLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:313) ;

[0275] 或

[0276] 3LIG29

[0277] QVQLQESGGGLVQAGGSMRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPGKGPEWVSAIDSGGGSTSYADSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAQGYI-CSGYGCSQDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ  
ID NO:314) ;

[0278] 或

[0279] 3LIG30

[0280] QVQLQESGGGTQVQAGGSLRLSCAASGFTFNDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIRSNNGGYTNYADSVKGRF  
TISRDNAKNTLYLQMNSLKSED TAVYYCAQGYI-CSGYGCYPGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH (SEQ ID

NO:315) ;

[0281] 或

[0282] 3LIG33

[0283] QVQLQESGGGLVQPGTSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREEVSCISSSDGSTYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCATDGWSSCRHGINEYLYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH  
(SEQ ID NO:316)。

[0284] 在各个示例性实施方案中,所述PD-L1结合剂包含选自以上序列中的任一者而没有末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即,HHHHHH;SEQ ID NO:84)。

[0285] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含选自SEQ ID No:286-316(以上提供)而没有HA标签的氨基酸序列(即,YPYDVPDYGS;SEQ ID NO:85)。

[0286] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含选自SEQ ID No:286-316(以上提供)而没有AAA接头的氨基酸序列。

[0287] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含选自SEQ ID No:286-316(以上提供)而没有AAA接头、HA标签和末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即,AAAYPYDVPDYGSHHHHHH;SEQ ID NO:86)。

[0288] 在各个实施方案中,本发明设想了如本文所描述的本发明的PD-L1结合剂的任何天然或合成类似物、突变体、变体、等位基因、同系物和直系同源物(本文中统称为“类似物”)的用途。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂的氨基酸序列还包括氨基酸类似物、氨基酸衍生物或其他非经典氨基酸。

[0289] 在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分包含与本文公开的序列中的任一者具有至少60%同一性的序列。举例来说,所述PD-1或PD-L1结合剂可以包含靶向部分,所述靶向部分包含与本文公开的序列中的任一者具有至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的序列(例如,与本文公开的序列)中的任一者具有约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%或约100%序列同一性)。

[0290] 在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分包含相对于本文公开的序列中的任一者具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分包含相对于本文公开的序列中的任一者具有一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个、或七个、或八个、或九个、或十个、或十五个、或二十个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨

氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0291] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0292] 可以例如基于在所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲特性方面的相似性进行“保守取代”。20种天然存在的氨基酸可以分组至以下六个标准氨基酸组中:(1)疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;以及(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0293] 如本文所使用,“保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组中的同一组内所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。举例来说,Asp交换为Glu使得经如此修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,基于甘氨酸和脯氨酸能够破坏 $\alpha$ 螺旋,它们可以彼此取代。

[0294] 如本文所使用,“非保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组(1)至(6)中的不同组中所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。

[0295] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸。示例性非经典氨基酸总体上包括但不限于硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸 $\beta$ -丙氨酸、GABA和 $\delta$ -氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 $\gamma$ -Abu、 $\epsilon$ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如 $\beta$ 甲基氨基酸、C $\alpha$ -甲基氨基酸、N $\alpha$ -甲基氨基酸和氨基酸类似物。

[0296] 在各个实施方案中,氨基酸突变可以在靶向部分的CDR(例如,CDR1区、CDR2区或CDR3区)中。在另一个实施方案中,氨基酸变化可以在靶向部分的框架区(FR)(例如,FR1区、FR2区、FR3区或FR4区)中。

[0297] 可以使用本领域中的任何已知技术,例如定点诱变或基于PCR的诱变来实现对氨基酸序列的修饰。此类技术描述于例如以下文献中:Sambrook等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989和Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989。

[0298] 在各个实施方案中,所述突变基本上不降低本发明的PD-1或PD-L1结合剂特异性地结合至PD-1或PD-L1的能力。在各个实施方案中,所述突变基本上不降低本发明的PD-1或PD-L1结合剂特异性地结合至PD-1或PD-L1并且不在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1的能力。

[0299] 在各个实施方案中,可以用平衡解离常数( $K_D$ )来描述本发明的PD-1或PD-L1结合剂对人PD-1或PD-L1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或单体和/或二聚体形式和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体(包括单体和/或二聚体形式)的结合亲和力。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分结合至人PD-1或PD-L1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体(包括单体和/或二聚体形式),其中 $K_D$ 低于约1 $\mu$ M、约900nM、约800nM、约700nM、约600nM、约500nM、约400nM、约300nM、约200nM、约100nM、约90nM、约80nM、约70nM、约60nM、约50nM、约40nM、约30nM、约

20nM、约10nM、或约5nM、或约1nM。

[0300] 在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分结合目标抗原但不在功能上调节(例如,部分或完全中和)目标抗原,即PD-1或PD-L1。举例来说,在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂的靶向部分仅仅靶向所述抗原但基本上不在功能上调节(例如,部分或完全抑制、降低或中和)所述抗原具有的生物效应。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂的靶向部分结合在物理上与对抗原的生物活性重要的抗原位点(例如,抗原的活性位点)隔开的表位。

[0301] 在各个实施方案中,这些结合剂结合至并且在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1。

[0302] 包含本发明的PD-1或PD-L1结合剂的治疗剂

[0303] 具有信号传导剂的嵌合体和融合物

[0304] 在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂是具有一种或多种信号传导剂的嵌合体或融合物的一部分。因此,本发明提供了包括例如针对PD-1或PD-L1的靶向部分和一种或多种信号传导剂的嵌合或融合蛋白。

[0305] 在各个实施方案中,所述信号传导剂经过修饰以便对其受体中的一种或多种具有降低的亲和力或活性,从而允许减弱活性(包括激动或拮抗)和/或预防非特异性信号传导或者嵌合或融合蛋白的不理想整合。在各个实施方案中,所述信号传导剂在其野生型形式下具有拮抗性,并且携带一个或多个减弱其拮抗活性的突变。在各个实施方案中,所述信号传导剂由于一个或多个突变而具有拮抗性,例如激动性信号传导剂被转化成拮抗性信号传导剂,并且任选地,这种经过转化的信号传导剂还携带一个或多个减弱其拮抗活性的突变(例如,如WO 2015/007520中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。

[0306] 因此,在各个实施方案中,所述信号传导剂是具有一个或多个突变(例如多个突变)的信号传导剂的修饰(例如突变)形式。在各个实施方案中,所述突变允许经修饰的信号传导剂相对于信号传导剂的未突变,即野生型形式具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者(例如,比较同一种信号传导剂的野生型形式对比修饰(例如突变)形式)。在一些实施方案中,减弱或降低结合或亲和力的突变包括基本上降低或消除结合或活性的那些突变。在一些实施方案中,减弱或降低结合或亲和力的突变不同于基本上降低或消除结合或活性的那些突变。结果,在各个实施方案中,所述突变允许信号传导剂相对于未突变,即野生型信号传导剂具有提高的安全性,例如,降低的全身性毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应(例如,比较同一种信号传导剂的野生型形式对比修饰(例如突变体)形式)。

[0307] 如本文所描述,该剂由于一个或多个修饰(例如突变)而可以具有提高的安全性。在各个实施方案中,提高的安全性意指本发明的嵌合蛋白提供了较低的毒性(例如全身毒性和/或组织/器官相关性);和/或减轻或基本上消除的副作用;和/或增加的耐受性、减轻或基本上消除的不良事件;和/或减少或基本上消除的脱靶效应;和/或增加的治疗窗。

[0308] 在各个实施方案中,所述信号传导剂经过修饰以具有一个或多个降低其对其受体中的一种或多种的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中,所述信号传导剂经过修饰以具有一个或多个基本上降低或消除对所述受体的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中,所述野生型信号传导剂提供的活性是在所述受体处的激动作用(例如,激活治疗

部位的细胞效应)。举例来说,所述野生型信号传导剂可以激活其受体。在此类实施方案中,所述突变使得经修饰的信号传导剂在所述受体处的激活活性被降低或消除。举例来说,所述突变可以使得所述经修饰的信号传导剂向靶细胞递送减弱的激活信号,或者可以消除所述激活信号。在一些实施方案中,所述野生型信号传导剂提供的活性是在所述受体处的拮抗作用(例如阻断或阻遏治疗部位的细胞效应)。举例来说,所述野生型信号传导剂可以拮抗或抑制所述受体。在这些实施方案中,所述突变使得所述经修饰的信号传导剂在所述受体处的拮抗活性被降低或消除。举例来说,所述突变可以使得所述经修饰的信号传导剂向靶细胞递送减弱的抑制信号,或者可以消除所述抑制信号。在各个实施方案中,所述信号传导剂由于一个或多个突变而具有拮抗性,例如将激动性信号传导剂转化成拮抗性信号传导剂(例如,如W0 2015/007520中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入),并且任选地,这种经转化的信号传导剂还携带一个或多个降低其对其受体中的一种或多种的结合亲和力或活性,或者基本上降低或消除对其受体中的一种或多种的结合亲和力或活性的突变。

[0309] 在一些实施方案中,与一个或多个如本文所描述的靶向部分(例如,针对PD-1或PD-L1的靶向部分)连接能恢复所述受体处被降低的亲和力或活性。在其他实施方案中,一个或多个所述靶向部分的活性基本上不能恢复所述受体处被降低的亲和力或活性。

[0310] 在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白减少了脱靶效应,因为它们的信号传导剂具有削弱或消除在受体处的结合亲和力或活性的突变。在各个实施方案中,观察到副作用相对于例如野生型信号传导剂存在这种减少。在各个实施方案中,所述信号传导剂对靶细胞具有活性,因为所述一个或多个靶向部分补偿了实质性激活所需的结合(例如但不限于和/或亲合力)的缺失/不足。在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对治疗活性位点的途径基本上无活性,并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型,从而大大减少了不希望的副作用。

[0311] 在一些实施方案中,所述信号传导剂可以包括一个或多个减弱或减少对一个受体(即,治疗受体)的结合或亲和力的突变以及一个或多个基本上降低或消除第二受体处的结合或活性的突变。在此类实施方案中,这些突变可以处在相同或不同的位置上(即,相同突变或多个突变)。在一些实施方案中,减少一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变不同。在一些实施方案中,减少一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变相同。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白具有经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂兼具减弱治疗受体处的结合和/或活性且因此允许更受控制的中靶治疗效果(例如相对于野生型信号传导剂)的突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性且因此减少副作用(例如相对于野生型信号传导剂)的突变。

[0312] 在一些实施方案中,利用靶向部分(例如,针对PD-1或PD-L1的靶向部分或本文中所描述的任何其他靶向部分)基本上不能恢复结合或活性的实质性降低或消除。在一些实施方案中,利用靶向部分能恢复结合或活性的实质性降低或消除。在各个实施方案中,基本上降低或消除第二受体处的结合或活性还可以防止另一个受体介导的不利效应。可选地或另外地,基本上降低或消除另一个受体处的结合或活性改善了治疗效果,因为治疗性嵌合

蛋白的降低或消除的螯合远离治疗作用位点。举例来说,在一些实施方案中,这就回避了对高剂量的能补偿另一个受体处的损失的本发明嵌合蛋白的需要。这种降低剂量的能力还提供了较低的副作用可能性。

[0313] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对其受体中的一种或多种具有降低、基本上降低或消除的亲合力,例如结合(例如 $K_D$ )和/或激活(例如,当所述经修饰的信号传导剂是其受体的激动剂时,可测量为例如 $K_A$ 和/或 $EC_{50}$ )和/或抑制(例如,当所述经修饰的信号传导剂是其受体的拮抗剂时,可测量为例如 $K_I$ 和/或 $IC_{50}$ )。在各个实施方案中,免疫调节剂受体处降低的亲合力允许减弱活性(包括激动或拮抗)。在此类实施方案中,相对于野生型信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂对受体具有约1%、或约3%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%,或约10%-20%、约20%-40%、约50%、约40%-60%、约60%-80%、约80%-100%的亲合力。在一些实施方案中,相对于所述野生型信号传导剂,所述结合亲合力至少低约2倍、低约3倍、低约4倍、低约5倍、低约6倍、低约7倍、低约8倍、低约9倍、低至少约10倍、低至少约15倍、低至少约20倍、低至少约25倍、低至少约30倍、低至少约35倍、低至少约40倍、低至少约45倍、低至少约50倍、低至少约100倍、低至少约150倍,或低约10-50倍、低约50-100倍、低约100-150倍、低约150-200倍或低超过200倍。

[0314] 在所述经修饰的信号传导剂具有降低一个受体处的结合且基本上降低或消除第二受体处的结合的突变的实施方案中,经修饰的信号传导剂对一个受体的结合亲和力的减弱或降低程度低于对另一个受体的亲和力的实质性降低或消除。在一些实施方案中,经修饰的信号传导剂对一个受体的结合亲和力的减弱或降低比对另一个受体的亲和力的实质性降低或消除低约1%、或约3%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在各个实施方案中,实质性降低或消除是指在结合亲和力和/或活性方面存在比减弱或降低更大程度的降低。

[0315] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变使所述信号传导剂的内源活性例如相对于所述野生型信号传导剂降至约75%、或约70%、或约60%、或约50%、或约40%、或约30%、或约25%、或约20%、或约10%、或约5%、或约3%、或约1%。

[0316] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对其受体具有降低的亲合力,比所述一个或多个靶向部分对其一个或多个受体的结合亲合力更低。在一些实施方案中,这种结合亲合力差异存在于相同细胞上的信号传导剂/受体与靶向部分/受体之间。在一些实施方案中,这种结合亲合力差异允许所述信号传导剂(例如突变的信号传导剂)具有局部化中靶效应并且使构成在野生型信号传导剂情况下观察到的副作用的基础的脱靶效应最小化。在一些实施方案中,这种结合亲合力低至少约2倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或低至少约25倍、或至少约50倍、或至少约100倍、或至少约150倍。

[0317] 可以使用本领域中已知的方法来测量受体结合活性。举例来说,可以通过对结合数据进行斯卡查德图分析和计算机拟合(例如Scatchard, 1949)或通过如Brecht等人

(1993)所描述在流经条件下进行反射干涉光谱法来评定亲和力和/或结合活性,所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0318] 在各个实施方案中,所述信号传导剂是免疫调节剂,例如白介素、干扰素和肿瘤坏死因子中的一者或多者。

[0319] 在一些实施方案中,所述信号传导剂是白介素或经修饰的白介素,包括例如IL-1; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15; IL-16; IL-17; IL-18; IL-19; IL-20; IL-21; IL-22; IL-23; IL-24; IL-25; IL-26; IL-27; IL-28; IL-29; IL-30; IL-31; IL-32; IL-33; IL-35; IL-36或者它们的片段、变体、类似物或家族成员。白介素是由淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞合成的一组多功能细胞因子。已知的功能包括刺激免疫细胞(例如T辅助细胞、B细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞)的增殖、嗜中性粒细胞和T淋巴细胞的趋化性和/或干扰素的抑制。可以使用本领域中已知的测定法来测定白介素活性:Matthews等人,Lymphokines and Interferens:A Practical Approach,Clemens等人编辑,IRL Press,Washington,D.C.1987,第221-225页;以及Orencole和Dinarello (1989)Cytokine 1,14-20。

[0320] 在一些实施方案中,所述信号传导剂是干扰素或干扰素诸如I型干扰素、II型干扰素和III型干扰素的修饰形式。说明性干扰素包括例如干扰素- $\alpha$ -1、干扰素- $\alpha$ -2、干扰素- $\alpha$ -4、干扰素- $\alpha$ -5、干扰素- $\alpha$ -6、干扰素- $\alpha$ -7、干扰素- $\alpha$ -8、干扰素- $\alpha$ -10、干扰素- $\alpha$ -13、干扰素- $\alpha$ -14、干扰素- $\alpha$ -16、干扰素- $\alpha$ -17和干扰素- $\alpha$ -21、干扰素- $\beta$ 以及干扰素- $\gamma$ 、干扰素 $\kappa$ 、干扰素 $\epsilon$ 、干扰素 $\tau$ 和干扰素 $\omega$ 。

[0321] 在一些实施方案中,所述信号传导剂是肿瘤坏死因子(TNF)或者肿瘤坏死因子(TNF)或TNF家族中的蛋白质,包括但不限于TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、LT- $\beta$ 、CD40L、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L和TRAIL的修饰形式。

[0322] 本文所描述的野生型信号传导剂的氨基酸序列在本领域中是众所周知的。因此,在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含与本文所描述的信号传导剂的已知野生型氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%序列同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0323] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含与本文所描述的信号传导剂的任何氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约

64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%序列同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0324] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括如本文其他部分所描述的保守和/或非保守取代。在各个实施方案中,所述取代还可以包括如本文其他部分所描述的非经典氨基酸。

[0325] 如本文所描述,所述经修饰的信号传导剂携带影响一个或多个受体处的亲和力和/或活性的突变。在各个实施方案中,存在对治疗受体,例如通过其介导期望的治疗效果(激动或拮抗)的受体的降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂携带基本上降低或消除在受体,例如通过其不介导期望的治疗效果(例如,由于结合的混杂性的结果)的受体处的亲和力和/或活性的突变。如本文所描述的任何经修饰的信号传导剂的受体,例如细胞因子、生长因子和激素之一都是本领域中已知的。

[0326] 提供在受体处降低的亲和力和/或活性(例如激动性)的说明性突变见于WO 2013/107791和PCT/EP2017/061544(例如,关于干扰素)、WO 2015/007542(例如,关于白介素)和WO 2015/007903(例如,关于TNF)中,各文献的全部内容特此以引用方式并入。提供在受体处降低的亲和力和/或活性(例如拮抗性)的说明性突变见于WO 2015/007520中,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0327] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对I型细胞因子受体、II型细胞因子受体、趋化因子受体、肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族中的受体中、TGF- $\beta$ 受体、免疫球蛋白(Ig)超家族中的受体和/或酪氨酸激酶超家族中的受体具有降低的亲和力和/或活性。

[0328] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是I型细胞因子受体。I型细胞因子受体在本领域中是已知的,并且包括但不限于IL2( $\beta$ 亚单位)、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL9、IL11、IL12、GM-CSF、G-CSF、LIF、CNTF的受体,以及促血小板生成素(TPO)、催乳素和生长激素的受体。说明性I型细胞因子受体包括但不限于GM-CSF受体、G-CSF受体、LIF受体、CNTF受体、TPO受体和I型IL受体。

[0329] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是II型细胞因子受体。II型细胞因子受体是由异源亚单位构成的多聚体受体,并且是主要用于干扰素的受体。此受体家族包括

但不限于干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 和干扰素- $\gamma$ 、IL10、IL22和组织因子的受体。说明性II型细胞因子受体包括但不限于IFN- $\alpha$ 受体(例如IFNAR1和IFNAR2)、IFN- $\beta$ 受体、IFN- $\gamma$ 受体(例如IFNGR1和IFNGR2)和II型IL受体。

[0330] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是G蛋白偶联受体。趋化因子受体是具有七个跨膜结构并与G蛋白偶联以进行信号转导的G蛋白偶联受体。趋化因子受体包括但不限于CC趋化因子受体、CXC趋化因子受体、CX3C趋化因子受体和XC趋化因子受体(XCR1)。示例性趋化因子受体包括但不限于CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR3B、CXCR4、CXCR5、CSCR6、CXCR7、XCR1和CX3CR1。

[0331] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是TNFR家族成员。肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族成员共享由围绕CXXCXXC核心基序的三个二硫键形成的富半胱氨酸结构域(CRD),从而形成细长分子。示例性肿瘤坏死因子受体家族成员包括:CD120a(TNFRSF1A)、CD120b(TNFRSF1B)、淋巴毒素 $\beta$ 受体(LTBR、TNFRSF3)、CD134(TNFRSF4)、CD40(CD40、TNFRSF5)、FAS(FAS、TNFRSF6)、TNFRSF6B(TNFRSF6B)、CD27(CD27、TNFRSF7)、CD30(TNFRSF8)、CD137(TNFRSF9)、TNFRSF10A(TNFRSF10A)、TNFRSF10B、(TNFRSF10B)、TNFRSF10C(TNFRSF10C)、TNFRSF10D(TNFRSF10D)、RANK(TNFRSFI1A)、骨保护素(TNFRSF11B)、TNFRSF12A(TNFRSF12A)、TNFRSF13B(TNFRSF13B)、TNFRSF13C(TNFRSF13C)、TNFRSF14(TNFRSF14)、神经生长因子受体(NGFR、TNFRSF16)、TNFRSF17(TNFRSF17)、TNFRSF18(TNFRSF18)、TNFRSF19(TNFRSF19)、TNFRSF21(TNFRSF21)和TNFRSF25(TNFRSF25)。在一个实施方案中,所述TNFR家族成员是CD120a(TNFRSF1A)或TNF-R1。在另一个实施方案中,所述TNFR家族成员是CD120b(TNFRSF1B)或TNF-R2。

[0332] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是TGF- $\beta$ 受体。TGF- $\beta$ 受体是单程丝氨酸/苏氨酸激酶受体。TGF- $\beta$ 受体包括但不限于TGFBRI、TGFBRII和TGFBRIII。

[0333] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是Ig超家族受体。免疫球蛋白(Ig)超家族中的受体与免疫球蛋白享有结构同源性。Ig超家族中的受体包括但不限于白介素-1受体、CSF-1R、PDGFR(例如PDGFRA和PDGFRB)和SCFR。

[0334] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是酪氨酸激酶超家族受体。所述酪氨酸激酶超家族中的受体在本领域中是众所周知的。大约有58种已知的受体酪氨酸激酶(RTK),分为20个亚家族。所述酪氨酸激酶超家族中的受体包括但不限于FGF受体及其各种同种型,诸如FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4和FGFR5。

[0335] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是干扰素 $\alpha$ 。在此类实施方案中,所述经修饰的IFN- $\alpha$ 剂对IFN- $\alpha$ / $\beta$ 受体(IFNAR),即IFNAR1和/或IFNAR2链具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\alpha$ 剂对IFN- $\alpha$ / $\beta$ 受体(IFNAR),即IFNAR1和/或IFNAR2链具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0336] 干扰素 $\alpha$ 的突变形式对本领域技术人员是已知的。在一个说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是具有氨基酸序列SEQ ID NO:317的等位基因形式IFN- $\alpha$ 2a。

[0337] 在一个说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是具有氨基酸序列SEQ ID NO:318的等位基因形式IFN- $\alpha$ 2b(它在氨基酸位置23处与IFN- $\alpha$ 2a不同)。

[0338] 在一些实施方案中,所述IFN- $\alpha$ 2突变体(IFN- $\alpha$ 2a或IFN- $\alpha$ 2b)在144-154位的一个或多个氨基酸,诸如氨基酸位置148、149和/或153处发生突变。在一些实施方案中,所述

IFN- $\alpha$ 2突变体包含选自L153A、R149A和M148A的一个或多个突变。此类突变体描述于例如W02013/107791和Piehler等人, (2000) J. Biol. Chem, 275: 40425-33中, 所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0339] 在一些实施方案中, 所述IFN- $\alpha$ 2突变体对IFNAR1具有降低的亲力和/或活性。在一些实施方案中, 所述IFN- $\alpha$ 2突变体包含选自如W02010/030671中所描述的F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A和Y89A的一个或多个突变, 所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0340] 在一些实施方案中, 所述IFN- $\alpha$ 2突变体包含选自如W02008/124086中所描述的K133A、R144A、R149A和L153A的一个或多个突变, 所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0341] 在一些实施方案中, 所述IFN- $\alpha$ 2突变体包含选自如W02015/007520和W02010/030671中所描述的R120E和R120E/K121E的一个或多个突变, 所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中, 所述IFN- $\alpha$ 2突变体拮抗野生型IFN- $\alpha$ 2活性。在此类实施方案中, 所述突变IFN- $\alpha$ 2对IFNAR1具有降低的亲力和/或活性, 而保留对IFNAR2的亲力和/或活性。

[0342] 在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含 (1) 选自R120E和R120E/K121E的一个或多个突变, 不希望受理论束缚, 所述突变能产生拮抗效应; 和 (2) 选自K133A、R144A、R149A和L153A的一个或多个突变, 不希望受理论束缚, 所述突变允许减弱例如IFNAR2处的效应。在一个实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含R120E和L153A。

[0343] 在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含一个或多个突变, 所述一个或多个突变选自如W0 2013/059885中所公开的L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、D35A、Q40A、D114R、L117A、R120A、R125A、K134A、R144A、A145G、A145M、M148A、R149A、S152A、L153A和N156A, 所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含如W0 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或L30A。在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含如W0 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或R33A。在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含如W0 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或M148A。在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含如W0 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或L153A。在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含如W0 2013/059885中所公开的突变N65A、L80A、Y85A和/或Y89A。在一些实施方案中, 所述人IFN- $\alpha$ 2突变体包含如W0 2013/059885中所公开的突变N65A、L80A、Y85A、Y89A和/或D114A。

[0344] 在一个实施方案中, 所述经修饰的信号传导剂是干扰素 $\beta$ 。在此类实施方案中, 所述经修饰的干扰素 $\beta$ 剂对IFN- $\alpha$ / $\beta$ 受体 (IFNAR), 即IFNAR1和/或IFNAR2链具有降低的亲力和/或活性。在一些实施方案中, 所述经修饰的干扰素 $\beta$ 剂对IFN- $\alpha$ / $\beta$ 受体 (IFNAR), 即IFNAR1和/或IFNAR2链具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。

[0345] 在说明性实施方案中, 所述经修饰的信号传导剂是IFN- $\beta$ 。在各个实施方案中, 所述IFN- $\beta$ 涵盖IFN- $\beta$ 的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。在各个实施方案中, 所述IFN- $\beta$ 涵盖来源于任何物种的IFN- $\beta$ 。在一个实施方案中, 嵌合蛋白包含小鼠IFN- $\beta$ 的修饰形式。在另一个实施方案中, 嵌合蛋白包含人IFN- $\beta$ 的修饰形式。人IFN- $\beta$ 是包含166个氨基酸残基的分子量为约22kDa的多肽。人IFN- $\beta$ 的氨基酸序列是SEQ ID NO: 319。

[0346] 在一些实施方案中,所述人IFN- $\beta$ 是呈人IFN- $\beta$ 的糖基化形式的IFN- $\beta$ -1a。在一些实施方案中,所述人IFN- $\beta$ 是呈人IFN- $\beta$ 的非糖基化形式的IFN- $\beta$ -1b,它具有Met-1缺失和Cys-17至Ser突变。

[0347] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\beta$ 对IFNAR的IFNAR1亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 在IFNAR1处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是人IFN- $\beta$ ,并且在位置F67、R71、L88、Y92、I95、N96、K123和R124处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述一个或多个突变是选自F67G、F67S、R71A、L88G、L88S、Y92G、Y92S、I95A、N96G、K123G和R124G的取代。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含F67G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含K123G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含F67G和R71A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含L88G和Y92G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含Y92G、I95A和N96G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含K123G和R124G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含F67G、L88G和Y92G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含F67S、L88S和Y92S突变。

[0348] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\beta$ 对IFNAR的IFNAR2亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 在IFNAR2处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是人IFN- $\beta$ ,并且在位置W22、R27、L32、R35、V148、L151、R152和Y155处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述一个或多个突变是选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152G和Y155G的取代。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含W22G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含L32A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含L32G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含R35A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含R35G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含V148G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含R152A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含R152G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含Y155G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含W22G和R27G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含L32A和R35A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含L151G和R152A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 包含V148G和R152A突变。

[0349] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 具有以下突变中的一者或多者:R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 具有以下突变中的一者或多者:R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H,结合C17S或C17A。

[0350] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 具有以下突变中的一者或多者:R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H,结合本文所描述的任何其他IFN- $\beta$ 突变。

[0351] 人IFN- $\beta$ 的晶体结构是已知的,并且描述于Karpusas等人,(1998)PNAS,94(22):11813-11818中。具体而言,已显示人IFN- $\beta$ 的结构包括五个 $\alpha$ 螺旋(即A、B、C、D和E)和四个连接这些螺旋的环区(即AB、BC、CD和DE环)。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 在A、B、C、

D、E螺旋和/或AB、BC、CD和DE环中具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\beta$ 在治疗受体诸如IFNAR处的结合亲和力或活性。示例性突变描述于W02000/023114和US20150011732中,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置15、16、18、19、22和/或23处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置28-30、32和33处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置36、37、39和42处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是人IFN- $\beta$ ,所述人IFN- $\beta$ 在氨基酸位置64和67处包含丙氨酸取代并且在位置68处包含丝氨酸取代。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置71-73处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置92、96、99和100处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置128、130、131和134处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一个示例性实施方案中,所述经修饰的IFN- $\beta$ 是在氨基酸位置149、153、156和159处包含丙氨酸取代的人IFN- $\beta$ 。在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在W22处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0352] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在R27处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0353] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在W22处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R27处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0354] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在L32处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0355] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在R35处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0356] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在L32处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R35处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0357] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在F67处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0358] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在R71处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0359] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在F67处的突变,该突变

是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R71处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0360] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在L88处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0361] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在Y92处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0362] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在F67处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在L88处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0363] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在L88处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0364] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在I95处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0365] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在N96处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0366] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在Y92处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在I95处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在N96处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0367] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在K123处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0368] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在R124处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0369] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:188和在K123处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R124处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异

亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0370] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在L151处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0371] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在R152处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0372] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在L151处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R152处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0373] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在V148处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和甲硫氨酸(M)的脂族疏水性残基。

[0374] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在V148处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R152处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0375] 在一些实施方案中,所述突变IFN- $\beta$ 包含SEQ ID NO:319和在Y155处的突变,该突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0376] 在一些实施方案中,本发明涉及一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含:(a)经修饰的IFN- $\beta$ ,所述经修饰的IFN- $\beta$ 具有氨基酸序列SEQ ID NO:319和在位置W22处的突变,其中该突变是脂族疏水性残基;和(b)一个或多个靶向部分,所述一个或多个靶向部分包含特异性地结合至目标抗原或受体(例如PD-1或PD-L1)的识别结构域,所述经修饰的IFN- $\beta$ 和所述一个或多个靶向部分任选地与一个或多个接头连接。在各个实施方案中,在位置W22处的突变是选自G、A、L、I、M和V的脂族疏水性残基。在各个实施方案中,在位置W22处的突变是G。

[0377] 其他示例性IFN- $\beta$ 突变体提供在PCT/EP2017/061544中,所述文献的全部公开内容以引用方式并入本文。

[0378] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是干扰素 $\gamma$ 。在此类实施方案中,所述经修饰的干扰素 $\gamma$ 剂对干扰素 $\gamma$ 受体(IFNGR),即IFNGR1和IFNGR2链具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的干扰素 $\gamma$ 剂对干扰素 $\gamma$ 受体(IFNGR),即IFNGR1和IFNGR2链具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0379] IFN- $\gamma$ 是II型类干扰素的唯一成员。作为先天免疫应答的一部分,IFN- $\gamma$ 主要由天然杀伤(NK)和天然杀伤T(NKT)细胞产生。CD4<sup>+</sup> Th1和CD8细胞毒性T淋巴细胞(CTL)效应T细胞、巨噬细胞、树突状细胞和B细胞也产生IFN- $\gamma$ 。激活的IFN- $\gamma$ 形成二聚体,所述二聚体通过由IFN- $\gamma$ 受体1和IFN- $\gamma$ 受体2亚单位构成的异二聚体受体(即,IFN- $\gamma$ 受体或IFN- $\gamma$  R)起作用。IFN- $\gamma$ 受体1是主要的配体结合亚单位,而IFN- $\gamma$ 受体2是信号转导所必需的,并且还增加了IFN- $\gamma$ 受体1对它的配体的亲合力。IFN- $\gamma$ 二聚体与受体的结合激活了JAK-

STAT信号传导途径,从而引发各种生物效应。

[0380] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含IFN- $\gamma$ 的修饰形式作为信号传导剂。在各个实施方案中,所述IFN- $\gamma$ 涵盖IFN- $\gamma$ 的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。在各个实施方案中,所述IFN- $\gamma$ 涵盖来源于任何物种的IFN- $\gamma$ 。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含小鼠IFN- $\gamma$ 的修饰形式。在另一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含人IFN- $\gamma$ 的修饰形式。

[0381] 人IFN- $\gamma$ 是包含166个氨基酸残基的多肽。在一个实施方案中,所述人IFN- $\gamma$ 具有氨基酸序列SEQ ID NO:320。

[0382] 如本文所使用,人IFN- $\gamma$ 还可以指没有N端信号肽的成熟人IFN- $\gamma$ 。在该实施方案中,所述成熟的人IFN- $\gamma$ 包含143个氨基酸并具有氨基酸序列SEQ ID NO:321。

[0383] 在一些实施方案中,所述人IFN- $\gamma$ 是人IFN- $\gamma$ 的糖基化形式。在一些实施方案中,所述人IFN- $\gamma$ 是人IFN- $\gamma$ 的非糖基化形式。

[0384] IFN- $\gamma$ 的序列在本领域中是已知的。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含与IFN- $\gamma$ 的已知野生型氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0385] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含与具有氨基酸序列SEQ ID NO:320的人IFN- $\gamma$ 具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨

基酸序列。

[0386] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含与具有氨基酸序列SEQ ID NO:321的人IFN- $\gamma$ 具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0387] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0388] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0389] 可以例如基于在所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲特性方面的相似性进行“保守取代”。20种天然存在的氨基酸可以分组至以下六个标准氨基酸组中:(1)疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;以及(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0390] 如本文所使用,“保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组中的同一组内所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。举例来说,Asp交换为Glu使得经如此修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,基于甘氨酸和脯氨酸能够破坏 $\alpha$ 螺旋,它们可以彼此取代。

[0391] 如本文所使用,“非保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组(1)至(6)中的不同组中所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。

[0392] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸(总体上例如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸 $\beta$ -丙氨酸、GABA和 $\delta$ -氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 $\gamma$ -Abu、 $\epsilon$ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如 $\beta$ 甲基氨基酸、C $\alpha$ -甲基氨基酸、N $\alpha$ -甲基氨基酸和氨基酸类似物)。

[0393] 在各个实施方案中,所述IFN- $\gamma$ 经过修饰以具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述突变允许所述经修饰的IFN- $\gamma$ 相对于IFN- $\gamma$ 的未突变(例如野生型)形式具有一

种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者。例如,相对于IFN- $\gamma$ 的未突变(例如野生型)形式,所述一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性可以处在治疗受体诸如IFN- $\gamma$ 受体处。结果,在各个实施方案中,所述突变允许所述经修饰的可溶性剂相对于IFN- $\gamma$ 的未突变(例如野生型)形式具有降低的全身性毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应。

[0394] 在各个实施方案中,所述IFN- $\gamma$ 经过修饰以具有降低其在治疗受体诸如包括IFN- $\gamma$ 受体1和IFN- $\gamma$ 受体2亚单位在内的IFN- $\gamma$ 受体处的结合亲和力和/或活性的突变。在一些实施方案中,所述野生型IFN- $\gamma$ 提供的活性是在所述治疗受体处的激动作用(例如,激活治疗部位的细胞效应)。例如,所述野生型IFN- $\gamma$ 可以激活治疗受体。在此类实施方案中,所述突变使得所述经修饰的IFN- $\gamma$ 在所述治疗受体处的激活活性被降低。

[0395] 在一些实施方案中,与靶向部分连接能恢复所述治疗受体(例如,IFN- $\gamma$ 受体)处被降低的亲和力和/或活性。在其他实施方案中,与靶向部分连接基本上不能恢复所述治疗受体处被降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,本发明的治疗性嵌合蛋白减少了脱靶效应,因为所述IFN- $\gamma$ 具有削弱在治疗受体处的结合亲和力和/或活性的突变。在各个实施方案中,观察到副作用相对于例如野生型IFN- $\gamma$ 存在这种减少。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 对治疗活性位点的途径基本上无活性,并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型,从而大大减少了不希望的副作用。

[0396] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述IFN- $\gamma$ 对一种或多种治疗受体(例如,IFN- $\gamma$ 受体)具有减弱或降低的亲和力和/或活性,例如,结合(例如KD)和/或激活(可测量为例如KA和/或EC50)。在各个实施方案中,治疗受体处降低的亲和力和/或活性允许减弱来自治疗受体的活性和/或信号传导。

[0397] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\gamma$ 对IFN- $\gamma$ 受体1亚单位的结合或亲和力和/或生物活性。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 在IFN- $\gamma$ 受体1亚单位处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是人IFN- $\gamma$ ,所述人IFN- $\gamma$ 在涉及与IFN- $\gamma$ 受体1亚单位结合的氨基酸残基处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是人IFN- $\gamma$ ,所述人IFN- $\gamma$ 在位于与IFN- $\gamma$ 受体1亚单位的界面处的氨基酸处具有一个或多个突变。在各个实施方案中,所述一个或多个突变处在选自但不限于以下的氨基酸处:Q1、V5、E9、K12、H19、S20、V22、A23、D24、N25、G26、T27、L30、K108、H111、E112、I114、Q115、A118、E119和K125(各自相对于SEQ ID NO:321,它是野生型人IFN- $\gamma$ ,并且缺少其N端信号序列)。在一些实施方案中,所述一个或多个突变是选自V5E、S20E、V22A、A23G、A23F、D24G、G26Q、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G(各自相对于SEQ ID NO:321)的取代。在实施方案中,所述一个或多个突变是选自V22A、A23G、D24G、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G的取代。

[0398] 在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含突变A23G和D24G。在另一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含突变I114A和A118G。在另一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含突变V5E、S20E、A23F和G26Q。

[0399] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有以下突变中的一者或多者:残基A23

的缺失、残基D24的缺失、S20I取代、A23V取代、D21K取代和D24A取代。

[0400] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\gamma$ 对IFN- $\gamma$ 受体2亚单位的结合或亲和力和/或生物活性。

[0401] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\gamma$ 对IFN- $\gamma$ 受体1和IFN- $\gamma$ 受体2亚单位的结合或亲和力和/或生物活性。

[0402] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有一个或多个降低其对IFN- $\gamma$ 受体1的结合或亲和力和/或生物活性的突变和一个或多个基本上降低或消除其对IFN- $\gamma$ 受体2的结合或亲和力和/或生物活性的突变。在一些实施方案中,具有这种经修饰的IFN- $\gamma$ 的嵌合蛋白可以提供靶标选择性IFN- $\gamma$ 受体1活性(例如,经由通过靶向部分进行的靶向能恢复IFN- $\gamma$ 受体1活性)。

[0403] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 具有一个或多个降低其对IFN- $\gamma$ 受体1的结合或亲和力和/或生物活性的突变和一个或多个降低其对IFN- $\gamma$ 受体1的结合或亲和力和/或生物活性的突变。在一些实施方案中,具有这种经修饰的IFN- $\gamma$ 的嵌合蛋白可以提供靶标选择性IFN- $\gamma$ 受体1和/或IFN- $\gamma$ 受体1活性(例如,经由通过靶向部分进行的靶向能恢复IFN- $\gamma$ 受体1和IFN- $\gamma$ 受体2活性)。

[0404] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 在C端被截短。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是成熟IFN- $\gamma$ ,所述成熟IFN- $\gamma$ 包含具有C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:321。在此类实施方案中,所述成熟IFN- $\gamma$ 可以包含至少约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24、或约25个氨基酸残基的C端截短。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是成熟IFN- $\gamma$ ,所述成熟IFN- $\gamma$ 包含具有5个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:321。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是成熟IFN- $\gamma$ ,所述成熟IFN- $\gamma$ 包含具有7个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:321。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是成熟IFN- $\gamma$ ,所述成熟IFN- $\gamma$ 包含具有14个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:321。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是成熟IFN- $\gamma$ ,所述成熟IFN- $\gamma$ 包含具有15个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:321。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是成熟IFN- $\gamma$ ,所述成熟IFN- $\gamma$ 包含具有16个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:321。可用于本发明的具有C端截短的另外的经修饰的IFN- $\gamma$ 描述于Haelewyn等人,Biochem.J. (1997), 324:591-595和Lundell等人,Protein Eng. (1991) 4:335-341,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0405] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 是例如在Randal等人(2001)Structure 9:155-163和Randal等人(1998)Protein Sci.7:1057-1060中所述的单链IFN- $\gamma$ ,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述单链IFN- $\gamma$ 包含第一IFN- $\gamma$ 链,所述第一IFN- $\gamma$ 链在其C末端连接至第二IFN- $\gamma$ 链的N端。在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和第二IFN- $\gamma$ 链通过如本文其他部分所描述的接头连接。

[0406] 在一些实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链包含至少约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24、或约25个氨基酸残基的C端

截短。在一个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链包含约24个氨基酸残基的C端截短。在一些实施方案中,所述第二IFN- $\gamma$ 链包含至少约1个、约2个、约3个、约4个或约5个氨基酸残基的N端截短。在一个实施方案中,所述第二IFN- $\gamma$ 链包含约3个氨基酸残基的N端截短。在一些实施方案中,所述第二IFN- $\gamma$ 链包含至少约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24、或约25个氨基酸残基的C端截短。在各个实施方案中,如本文其他部分所描述,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链在Q1、V5、E9、K12、H19、S20、V22、A23、D24、N25、G26、T27、L30、K108、H111、E112、I114、Q115、A118、E119和K125处包含一个或多个氨基酸突变。在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含一个或多个选自以下的取代:V5E、S20E、V22A、A23G、A23F、D24G、G26Q、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G。在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含一个或多个选自以下的取代:V22A、A23G、D24G、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G。在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含A23G和D24G取代。在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含I114A和A118G取代。在另一个实施方案中,所述突变是V5E、S20E、A23F和G26Q。

[0407] 在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含一个或多个如本文所公开的取代,并且所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含如本文所公开的C端截短。

[0408] 在各个实施方案中,所述第一IFN- $\gamma$ 链和/或所述第二IFN- $\gamma$ 链包含如本文所公开的一个或多个取代和如本文所公开的C端截短。

[0409] 人IFN- $\gamma$ 的晶体结构是已知的,并且描述于例如Ealick等人,(1991) Science, 252:698-702中。具体而言,已显示人IFN- $\gamma$ 的结构包括六个 $\alpha$ 螺旋的核心和在C端区域的延伸的未折叠序列。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 在所述一个或多个螺旋中具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN- $\gamma$ 在治疗受体(例如IFN- $\gamma$ 受体)处的结合亲和力和/或生物活性。

[0410] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 相对于野生型IFN- $\gamma$ 对治疗受体(例如IFN- $\gamma$ 受体或其IFN- $\gamma$ 受体1和IFN- $\gamma$ 受体2亚单位中的任一者)具有约约1%、或约3%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%,或约10%-20%、约20%-40%、约50%、约40%-60%、约60%-80%、约80%-100%的亲合力和/或生物活性。在一些实施方案中,相对于所述野生型IFN- $\gamma$ ,所述结合亲和力和/或生物活性至少低约2倍、低约3倍、低约4倍、低约5倍、低约6倍、低约7倍、低约8倍、低约9倍、低至少约10倍、低至少约15倍、低至少约20倍、低至少约25倍、低至少约30倍、低至少约35倍、低至少约40倍、低至少约45倍、低至少约50倍、低至少约100倍、低至少约150倍,或低约10-50倍、低约50-100倍、低约100-150倍、低约150-200倍或低超过200倍。

[0411] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$ 包含一个或多个突变,所述一个或多个突变使所述IFN- $\gamma$ 的内源活性例如相对于所述野生型IFN- $\gamma$ 降至约75%、或约70%、或约60%、或约50%、或约40%、或约30%、或约25%、或约20%、或约10%、或约5%、或约3%、或约1%。

[0412] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$  包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述经修饰的IFN- $\gamma$  对受体具有降低的亲合力和/或生物活性。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN- $\gamma$  对受体的结合亲合力和/或生物活性低于靶向部分对其受体的结合亲合力和/或生物活性。在一些实施方案中,这种结合亲合力和/或生物活性差异存在于相同细胞上的经修饰的IFN- $\gamma$  /受体与靶向部分/受体之间。在一些实施方案中,这种结合亲合力和/或生物活性差异允许所述经修饰的IFN- $\gamma$  具有局部化中靶效应并且使构成在野生型IFN- $\gamma$  情况下观察到的副作用的基础的脱靶效应最小化。在一些实施方案中,所述结合亲合力和/或生物活性低至少约2倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或低至少约25倍、或至少约50倍、或至少约100倍、或至少约150倍。

[0413] 可以使用本领域中已知的方法来测量受体结合活性。举例来说,可以通过对结合数据进行斯卡查德图分析和计算机拟合(例如Scatchard, 1949)或通过如Brecht等人(1993)所描述在流经条件下进行反射干涉光谱法来评定亲合力和/或结合活性,所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0414] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是共有干扰素。通过扫描几种人非等位基因IFN- $\alpha$ 亚型的序列并且在每个相应位置分配最常观察到的氨基酸,可以生成共有干扰素。所述共有干扰素在166个氨基酸中有20个氨基酸与IFN- $\alpha$ 2b不同(88%同源性),并且与IFN- $\beta$ 比较显示在30%以上的氨基酸位置具有同一性。在各个实施方案中,所述共有干扰素包含氨基酸序列SEQ ID NO:322。

[0415] 在一些实施方案中,所述共有干扰素包含氨基酸序列SEQ ID NO:323,该氨基酸序列与氨基酸序列SEQ ID NO:322相差一个氨基酸,即,SEQ ID NO:323缺少SEQ ID NO:322的起始甲硫氨酸残基。

[0416] 在各个实施方案中,所述共有干扰素包括所述共有干扰素的修饰形式,即共有干扰素变体,作为信号传导剂。在各个实施方案中,所述共有干扰素涵盖所述共有干扰素的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。

[0417] 在一个实施方案中,所述共有干扰素变体选自美国专利号4,695,623、4,897,471、5,541,293和8,496,921中公开的共有干扰素变体,所有这些文献的全部内容特此以引用方式并入。例如,所述共有干扰素变体可以包含如美国专利号4,695,623、4,897,471和5,541,293中所公开的IFN-CON2或IFN-CON3的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述共有干扰素变体包含IFN-CON<sub>2</sub>的氨基酸序列,SEQ ID NO:324。

[0418] 在一个实施方案中,所述共有干扰素变体包含IFN-CON<sub>3</sub>的氨基酸序列,SEQ ID NO:325。

[0419] 在一个实施方案中,所述共有干扰素变体包含美国专利号8,496,921中公开的任一变体的氨基酸序列。例如,所述共有变体可以包含氨基酸序列SEQ ID NO:326。

[0420] 在另一个实施方案中,所述共有干扰素变体可以包含氨基酸序列SEQ ID NO:327。

[0421] 在一些实施方案中,所述共有干扰素变体可以是PEG化的,即包含PEG部分。在一个实施方案中,所述共有干扰素变体可以包含连接在SEQ ID NO:327的S156C位置处的PEG部分。

[0422] 在一些实施方案中,工程化干扰素是人IFN- $\alpha$ 2a的变体,在序列SEQ ID NO:328的约41位插入Asp产生了SEQ ID NO:329(这导致相对于IFN- $\alpha$ 2a序列,序列的重新编号)和以

下突变:Arg23Lys、Leu26Pro、Glu53Gln、Thr54Ala、Pro56Ser、Asp86Glu、Ile104Thr、Gly106Glu、Thr110Glu、Lys117Asn、Arg125Lys和Lys136Thr。本文中描述共有干扰素的所有实施方案均等地应用于该工程化干扰素。

[0423] 在各个实施方案中,所述共有干扰素变体包含具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0424] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0425] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸(总体上例如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸 $\beta$ -丙氨酸、GABA和 $\delta$ -氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 $\gamma$ -Abu、 $\epsilon$ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羧基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如 $\beta$ 甲基氨基酸、 $\alpha$ -甲基氨基酸、 $N\alpha$ -甲基氨基酸和氨基酸类似物)。

[0426] 在各个实施方案中,所述共有干扰素经过修饰以具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述突变允许所述共有干扰素变体相对于所述共有干扰素(例如,具有氨基酸序列SEQ ID NO:325或326的共有干扰素)的未突变(例如野生型)形式具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者。例如,相对于所述共有干扰素的未突变(例如野生型)形式,所述一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性可以处在治疗受体诸如IFNAR处。结果,在各个实施方案中,所述突变允许所述共有干扰素变体相对于所述共有干扰素的未突变(例如野生型)形式具有降低的全身性毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应。

[0427] 在各个实施方案中,所述共有干扰素经过修饰以具有降低其对治疗受体诸如IFNAR的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中,所述共有干扰素提供的活性是在所述治疗受体处的激动作用(例如,激活治疗部位的细胞效应)。例如,所述共有干扰素可以激活治疗受体。在此类实施方案中,所述突变使得所述共有干扰素变体在所述治疗受体处的激活活性被降低。

[0428] 在一些实施方案中,与靶向部分连接能恢复所述治疗受体处被降低的亲和力或活性。在其他实施方案中,与靶向部分连接基本上不能恢复所述治疗受体处被降低的亲和力或活性。在各个实施方案中,本发明的基于Fc的治疗性嵌合蛋白减少了脱靶效应,因为所述共有干扰素变体具有削弱在治疗受体处的结合亲和力或活性的突变。在各个实施方案中,观察到副作用相对于例如野生型共有干扰素存在这种减少。在各个实施方案中,所述共有干扰素变体对治疗活性位点的途径基本上无活性,并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型,从而大大减少了不希望的副作用。

[0429] 在各个实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述共有干扰素变体对一种或多种治疗受体具有减弱或降低的亲和力,例如,结合(例如KD)和/或激活(可测量为例如KA和/或EC50)。在各个实施方案中,治疗受体处降低

的亲合力允许减弱来自治疗受体的活性和/或信号传导。

[0430] 在各个实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述共有干扰素变体对IFNAR的IFNAR1亚单位的结合或亲合力。在一个实施方案中,所述共有干扰素变体在IFNAR1处具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述共有干扰素变体对IFNAR的IFNAR2亚单位的结合或亲合力。在一些实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述共有干扰素变体对IFNAR1和IFNAR2亚单位的结合或亲合力。

[0431] 在一些实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个降低其对IFNAR1的结合或亲和力的突变和一个或多个基本上降低或消除其对IFNAR2的结合或亲和力的突变。在一些实施方案中,具有这种共有干扰素变体的基于Fc的嵌合蛋白可以提供靶标选择性IFNAR1活性(例如,经由通过靶向部分(例如SIRP $\alpha$ )进行的靶向能恢复IFNAR1活性)。

[0432] 在一些实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个降低其对IFNAR2的结合或亲和力的突变和一个或多个基本上降低或消除其对IFNAR1的结合或亲和力的突变。在一些实施方案中,具有这种共有干扰素变体的基于Fc的嵌合蛋白可以提供靶标选择性IFNAR2活性(例如,经由通过靶向部分(例如SIRP $\alpha$ )进行的靶向能恢复IFNAR2活性)。

[0433] 在一些实施方案中,所述共有干扰素变体具有一个或多个降低其对IFNAR1的结合或亲和力的突变和一个或多个基本上降低其对IFNAR2的结合或亲和力的突变。在一些实施方案中,具有这种共有干扰素变体的基于Fc的嵌合蛋白可以提供靶标选择性IFNAR1和/或IFNAR2活性(例如,经由通过靶向部分(例如SIRP $\alpha$ )进行的靶向能恢复IFNAR1和/或IFNAR2活性)。

[0434] 在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:326,所述共有干扰素经过修饰以在145-155位的一个或多个氨基酸(诸如氨基酸位置149、150和/或154)处具有突变。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:326,所述共有干扰素经过修饰以在145-155位的一个或多个氨基酸(诸如氨基酸位置149、150和/或154)处具有突变,所述取代任选地是疏水性的并且选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。在一些实施方案中,所述共有干扰素突变体包含一个或多个选自M149A、R150A和L154A且相对于SEQ ID NO:323的突变。

[0435] 在一个实施方案中,相对于SEQ ID NO:323,所述共有干扰素经过修饰以在氨基酸位置121(即,K121)处具有突变。在一个实施方案中,相对于SEQ ID NO:323,所述共有干扰素包含K121E突变。

[0436] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是血管内皮生长因子(VEGF)。VEGF是强有力的生长因子,它在生理性和病理性血管生成中起主要作用,调控血管通透性,并且可以充当表达VEGF受体的细胞上的生长因子。除其他功能外,另外的功能还包括刺激巨噬细胞谱系和内皮细胞中的细胞迁移。VEGF生长因子家族中存在若干成员,以及至少三个受体(VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3)。VEGF家族的成员可以结合并激活不止一种VEGFR类型。例如,VEGF-A结合VEGFR-1和VEGFR-2,而VEGF-C结合VEGFR-2和VEGFR-3。VEGFR-1和VEGFR-2激活能调控血管生成,而VEGFR-3激活与淋巴管生成相关联。主要的促血管生成信号是由VEGFR-2激活产生的。据报道,VEGFR-1激活可能与血管生成中的负作用相关联。还已经报道,VEGFR-1信号传导对于经由骨髓来源的VEGFR-1阳性细胞(有助于在骨中形成转移前龛)

的体内肿瘤进展是重要的。已经开发了若干种基于VEGF-A指导的/中和的治疗性抗体的疗法,这些疗法主要用于依赖血管生成的各种人类肿瘤的治疗。但这些疗法并非没有副作用。考虑到这些疗法作为一般的非细胞/组织特异性VEGF/VEGFR相互作用抑制剂来起作用,这可能不足为奇。因此,将VEGF(例如,VEGF-A)/VEGFR-2抑制限制于特定的靶细胞(例如肿瘤血管内皮细胞)是合乎需要的。

[0437] 在一些实施方案中,所述VEGF是VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D或VEGF-E以及它们的同种型,包括VEGF-A的各种同种型,诸如VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>121</sub>b、VEGF<sub>145</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>165</sub>b、VEGF<sub>189</sub>和VEGF<sub>206</sub>。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-1(F1t-1)和/或VEGFR-2(KDR/F1k-1)具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-1(F1t-1)和/或VEGFR-2(KDR/F1k-1)具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-2(KDR/F1k-1)具有降低的亲合力和/或活性,并且/或者对VEGFR-1(F1t-1)具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。这样的实施方案可用于例如伤口愈合方法或与缺血相关的疾病(不希望受理论束缚,这些疾病受VEGFR-2对内皮细胞功能和血管生成的影响介导)的治疗中。在各个实施方案中,避免了结合至与癌症和促炎活性相关的VEGFR-1(F1t-1)。在各个实施方案中,VEGFR-1(F1t-1)充当诱饵受体,因此大幅降低或消除了在该受体处的亲合力,从而避免了治疗剂的螯合。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-1(F1t-1)具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性,并且/或者对VEGFR-2(KDR/F1k-1)具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述VEGF是VEGF-C或VEGF-D。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-3具有降低的亲合力和/或活性。或者,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-3具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0438] 促血管生成疗法在各种疾病(例如缺血性心脏病、出血等)中也很重要,并且包括基于VEGF的疗法。VEGFR-2的激活具有促血管生成作用(作用于内皮细胞)。VEGFR-1的激活能刺激炎性细胞(包括例如巨噬细胞)迁移并导致炎症相关的高血管通透性。VEGFR-1的激活还可以促进骨髓相关的肿瘤微生境形成。因此,在这种情况下,选择用于VEGFR-2激活的基于VEGF的治疗剂将是合乎需要的。另外,期望细胞特异性靶向例如内皮细胞。

[0439] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-2具有降低的亲合力和/或活性(例如拮抗性),并且/或者对VEGFR-1具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。举例来说,当经由与肿瘤内皮细胞标记物(例如PSMA等)结合的靶向部分靶向肿瘤血管内皮细胞时,这种构建体会特异性地抑制此类标记物阳性细胞上的VEGFR-2激活,而不会激活在途中和靶细胞上的VEGFR-1(如果活性被消除),由此消除了对炎症反应的诱导。相较于VEGF-A中和疗法,这将为许多肿瘤类型提供更具选择性且更安全的抗血管生成疗法。

[0440] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-2具有降低的亲合力和/或活性(例如激动性),并且/或者对VEGFR-1具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,通过靶向血管内皮细胞,这样的构建体促进血管生成而不引起VEGFR-1相关的炎症反应诱导。因此,这样的构建体将具有靶向的促血管生成效应,并且基本上降低了由VEGFR-2以及VEGFR-1的全身性激活所引起的副作用的风险。

[0441] 在一个说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是VEGF<sub>165</sub>,所述VEGF<sub>165</sub>具有氨基酸序列SEQ ID NO:330。

[0442] 在另一个说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是VEGF<sub>165b</sub>,所述VEGF<sub>165b</sub>具有氨基酸序列SEQ ID NO:331。

[0443] 在这些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂在氨基酸I83处具有突变(例如,在I83处的取代突变,例如I83K、I83R或I83H)。不希望受理论束缚,据信此类突变可导致降低的受体结合亲和力。参见,例如,美国专利号9,078,860,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。

[0444] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TNF- $\alpha$ 。TNF是一种多效性细胞因子,它有许多种不同的功能,包括调控细胞生长、分化、细胞凋亡、肿瘤发生、病毒复制、自身免疫性、免疫细胞功能和迁移、炎症以及败血性休克。它结合至靶细胞上的两种独特的膜受体:TNFR1(p55)和TNFR2(p75)。TNFR1表现出非常广泛的表达模式,而TNFR2优先表达在淋巴细胞、Treg、内皮细胞、某些神经元、小胶质细胞、心肌细胞和间质干细胞的某些群体上。响应于受体激活而激活非常独特的生物学途径,但也存在一定的重叠。通常,不希望受理论束缚,TNFR1信号传导与细胞凋亡(细胞死亡)的诱导相关,而TNFR2信号传导与细胞存活信号的激活(例如,NF $\kappa$ B途径的激活)相关。TNF的施用具有全身性毒性,并且这主要是由于TNFR1配接。然而,应当注意,TNFR2的激活还与多种活性相关,同TNFR1一样,在开发基于TNF的治疗剂的情形下,对TNF靶向和活性的控制非常重要。

[0445] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1和/或TNFR2具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1和/或TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。TNFR1表达于大部分组织中,并且参与细胞死亡信号传导,而相形之下,TNFR2参与细胞存活信号传导。因此,在针对癌症治疗方法的实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在这些实施方案中,可以使所述嵌合蛋白靶向需要细胞凋亡的细胞,例如肿瘤细胞或肿瘤血管内皮细胞。在针对促进细胞存活的方法的实施方案中,举例来说,在用于治疗神经退行性病症的神经发生中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR2具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。换句话说,在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含允许有利于死亡或存活信号的经修饰的TNF- $\alpha$ 剂。

[0446] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白具有经修饰的TNF,所述经修饰的TNF对TNFR1具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,与野生型TNF和/或仅携带促使对TNFR1具有降低的亲和力和/或活性的一个或多个突变的嵌合体相比,这种嵌合体是更有效的细胞凋亡诱导剂。在一些实施方案中,这种嵌合体可用于诱导肿瘤细胞死亡或肿瘤血管内皮细胞死亡(例如,用于治疗癌症)。此外,在一些实施方案中,举例来说,这些嵌合体避免或减少经由TNFR2激活T<sub>reg</sub>细胞,因此进一步支持TNFR1介导的体内抗肿瘤活性。

[0447] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白具有经修饰的TNF,所述经修饰的TNF对TNFR2具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,这种嵌合体在可能是各种疾病设定,包括但不限于刺激神经发生下的特定治疗目标的一些细胞类型中是更有效的细胞存活激活剂。另外,此类有利于TNFR2的嵌合体还可用于治疗自身免疫性疾病(例如克罗恩氏病、糖尿病、MS、结肠炎等和本文所描述

的众多其他自身免疫性疾病)。在一些实施方案中,所述嵌合体靶向自身反应性T细胞。在一些实施方案中,所述嵌合体促进了 $T_{reg}$ 细胞激活和对细胞毒性T细胞的间接阻抑。

[0448] 在一些实施方案中,所述嵌合体例如通过激活TNFR2和/或避免TNFR1而引起自身反应性T细胞的死亡(例如,对TNFR2具有降低的亲合力和/或活性并且/或者对TNFR1具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性的经修饰的TNF)。不希望受理论束缚,这些自身反应性T细胞让其细胞凋亡/存活信号例如被NFkB途径活性/信号传导变化改变。在一些实施方案中,所述嵌合体引起具有NFkB途径损伤或修饰的自身反应性T细胞的死亡,所述损伤或修饰构成所述自身反应性T细胞的细胞死亡(细胞凋亡)/存活信号性质不平衡的基础,并且任选地改变了对某些诱导死亡的信号(例如,TNFR2激活)的易感性。

[0449] 在一些实施方案中,基于TNFR-2的嵌合体在诸多疾病中具有额外的治疗应用,所述疾病包括各种自身免疫性疾病、心脏病、脱髓鞘和神经退行性病症,以及感染性疾病等等。

[0450] 在一个实施方案中,所述野生型TNF- $\alpha$ 具有氨基酸序列SEQ ID NO:332。

[0451] 在此类实施方案中,所述经修饰的TNF- $\alpha$ 剂在一个或多个氨基酸位置29、31、32、84、85、86、87、88、89、145、146和147处具有突变,从而产生了具有降低的受体结合亲和力的经修饰的TNF- $\alpha$ 。参见例如美国专利号7,993,636,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。

[0452] 在一些实施方案中,所述经修饰的人TNF- $\alpha$ 部分在如例如W0/2015/007903中所描述的一个或多个氨基酸位置R32、N34、Q67、H73、L75、T77、S86、Y87、V91、I97、T105、P106、A109、P113、Y115、E127、N137、D143、A145和E146处具有突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号根据人TNF序列,Genbank登记号BAG70306,版本BAG70306.1,G1:197692685)。在一些实施方案中,所述经修饰的人TNF- $\alpha$ 部分具有选自L29S、R32G、R32W、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、S86T、Y87Q、Y87L、Y87A、Y87F、Y87H、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145R、A145T、E146D、E146K和S147D的取代突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有选自Y87Q、Y87L、Y87A、Y87F和Y87H的突变。在另一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有选自I97A、I97Q和I97S的突变。在另一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有选自Y115A和Y115G的突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有E146K突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有Y87H和E146K突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有Y87H和A145R突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有R32W和S86T突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有R32W和E146K突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有L29S和R32W突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有D143N和A145R突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有D143N和A145R突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有A145T、E146D和S147D突变。在一个实施方案中,所述人TNF- $\alpha$ 部分具有A145T和S147D突变。

[0453] 在一些实施方案中,所述经修饰的TNF- $\alpha$ 剂具有选自如W02008/124086中所描述的N39Y、S147Y和Y87H的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0454] 在一些实施方案中,所述经修饰的人TNF- $\alpha$ 部分具有如PCT/IB2016/001668中所描述的提供受体选择性的突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案

中,TNF突变是TNF-R1选择性的。在一些实施方案中,TNF-R1选择性的TNF突变处在位置R32、S86和E146中的一个或多个处。在一些实施方案中,TNF-R1选择性的TNF突变是R32W、S86T和E146K中的一者或多者。在一些实施方案中,TNF-R1选择性的TNF突变是R32W、R32W/S86T、R32W/E146K和E146K中的一者或多者。在一些实施方案中,TNF突变是TNF-R2选择性的。在一些实施方案中,TNF-R2选择性的TNF突变处在位置A145、E146和S147中的一个或多个处。在一些实施方案中,TNF-R2选择性的TNF突变是A145T、A145R、E146D和S147D中的一者或多者。在一些实施方案中,TNF-R2选择性的TNF突变在A145R、A145T/S147D和A145T/E146D/S147D中的一者或多者。

[0455] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TNF- $\beta$ 。TNF- $\beta$ 可以与LT- $\beta$  (LT- $\alpha$ 1 $\beta$  2) 形成同源三聚体或异源三聚体。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1和/或TNFR2和/或疱疹病毒进入介体 (HEVM) 和/或LT- $\beta$ R具有基本上降低或消除的亲力和和/或活性。

[0456] 在一个实施方案中,所述野生型TNF- $\beta$ 具有氨基酸序列SEQ ID NO:333。

[0457] 在此类实施方案中,所述经修饰的可溶性剂可以在106-113位的一个或多个氨基酸处包含突变,从而产生对TNFR2具有降低的受体结合亲和力的经修饰的TNF- $\beta$ 。在一个实施方案中,所述经修饰的可溶性剂在氨基酸位置106-113处具有一个或多个取代突变。在说明性实施方案中,所述取代突变选自Q107E、Q107D、S106E、S106D、Q107R、Q107N、Q107E/S106E、Q107E/S106D、Q107D/S106E和Q107D/S106D。在另一个实施方案中,所述经修饰的可溶性剂在位置106-113处具有约1至约3个氨基酸的插入。

[0458] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员 (例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) ,它可以是如W0 2015/007903中所描述的单链三聚体形式,所述文献的全部内容以引用的方式并入。

[0459] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员 (例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) ,它在TNFR1处具有降低的亲力和和/或活性,即拮抗活性 (例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如W0 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员 (例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) ,它还任选地对TNFR2具有基本上降低或消除的亲力和和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员 (例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) ,它在TNFR2处具有降低的亲力和和/或活性,即拮抗活性 (例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如W0 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员 (例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) ,它还任选地对TNFR1具有基本上降低或消除的亲力和和/或活性。此类实施方案的构建体可用于例如以细胞特异性方式阻遏TNF应答的方法中。在一些实施方案中,所述拮抗性TNF家族成员 (例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) 是如W0 2015/007903中所描述的单链三聚体形式。

[0460] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TRAIL。在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂对DR4 (TRAIL-RI) 和/或DR5 (TRAIL-RII) 和/或DcR1和/或DcR2具有降低的亲力和和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂对DR4 (TRAIL-RI) 和/或DR5 (TRAIL-RII) 和/或DcR1和/或DcR2具有基本上降低或消除的亲力和和/或活性。

[0461] 在一个实施方案中,所述野生型TRAIL具有氨基酸序列SEQ ID NO:334。

[0462] 在此类实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以在氨基酸位置T127-R132、E144-R149、E155-H161、Y189-Y209、T214-1220、K224-A226、W231、E236-L239、E249-K251、T261-H264和H270-E271处包含突变(编号根据人序列,Genbank登记号NP\_003801,版本10NP\_003801.1,G1:4507593;参见上文)。

[0463] 在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以包含一个或多个突变,所述一个或多个突变基本上降低了所述经修饰的TRAIL剂对TRAIL-R1的亲合力和/或活性。在此类实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以特异性地结合TRIL-R2。示例性突变包括在一个或多个氨基酸位置Y189、R191、Q193、H264、I266和D267处的突变。举例来说,所述突变可以是Y189Q、R191K、Q193R、H264R、I266L和D267Q中的一者或多者。在一个实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂包含突变Y189Q、R191K、Q193R、H264R、I266L和D267Q。

[0464] 在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以包含一个或多个突变,所述一个或多个突变基本上降低了所述经修饰的TRAIL剂对TRAIL-R2的亲合力和/或活性。在此类实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以特异性地结合TRIL-R1。示例性突变包括在一个或多个氨基酸位置G131、R149、S159、N199、K201和S215处的突变。举例来说,所述突变可以是G131R、R149I、S159R、N199R、K201H和S215D中的一者或多者。在一个实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂包含突变G131R、R149I、S159R、N199R、K201H和S215D。另外的TRAIL突变描述于例如Trebing等人,(2014)Cell Death and Disease,5:e1035,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。

[0465] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TGF $\alpha$ 。在此类实施方案中,所述经修饰的TGF $\alpha$ 剂对表皮生长因子受体(EGFR)具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的TGF $\alpha$ 剂对表皮生长因子受体(EGFR)具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0466] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TGF $\beta$ 。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TGFBR1和/或TGFBR2具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TGFBR1和/或TGFBR2具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂任选地对TGFBR3具有降低或基本上降低或消除的亲合力和/或活性,不希望受理论束缚,所述TGFBR3可以充当TGF- $\beta$ 受体的配体的储库。在一些实施方案中,相对于TGFBR2,TGF $\beta$ 可能更倾向于TGFBR1,或者相对于TGFBR1,TGF $\beta$ 可能更倾向于TGFBR2。相似地,不希望受理论束缚,LAP可以充当TGF- $\beta$ 受体的配体的储库。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TGFBR1和/或TGFBR2具有降低的亲合力和/或活性,并且/或者对潜在型相关肽(LAP)具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,此类嵌合体可用于卡-恩二氏病(Camurati-Engelmann disease)或与不适当的TGF $\beta$ 信号转导相关的其他疾病。

[0467] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGF $\alpha$ 、TGF $\beta$ ),它在TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3中的一者或多者处具有降低的亲合力和/或活性,即拮抗活性(例如天然拮抗活性或者由一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入本文)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGF $\alpha$ 、TGF $\beta$ ),它还任选地在TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3中的一者或多者处具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0468] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGF $\alpha$ 、TGF $\beta$ ),它在TGFB1和/或TGFB2处具有降低的亲力和/或活性,即拮抗活性(例如天然拮抗活性或者由一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入本文)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGF $\alpha$ 、TGF $\beta$ ),它还任选地在TGFB3处具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。

[0469] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是白介素。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-1。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-1 $\alpha$ 或IL-1 $\beta$ 。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-1R1和/或IL-1RAcP具有降低的亲力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-1R1和/或IL-1RAcP具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-1R2具有降低的亲力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。举例来说,在一些实施方案中,本发明的经修饰的IL-1剂避免IL-1R2处的相互作用,并且因此基本上降低其作为治疗剂的引诱剂和/或接收剂的功能。

[0470] 在一个实施方案中,所述野生型IL-1 $\beta$ 具有氨基酸序列SEQ ID NO:335。

[0471] IL1是促炎性细胞因子和重要的免疫系统调控剂。它是CD4T细胞应答的有效激活剂,能增加Th17细胞的比例以及产生IFN  $\gamma$  和IL-4的细胞的扩增。IL-1还是CD8<sup>+</sup>T细胞的有效调控剂,从而增强抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞扩增、分化、移行至外围和记忆。IL-1受体包含IL-1R1和IL-1R2。结合至IL-1R1和经由IL-1R1进行信号传导构成了IL-1借以介导许多种其生物学(和病理学)活性的机制。IL1-R2可以起诱饵受体的作用,从而降低IL-1用于相互作用和经由IL-1R1进行信号传导的可用性。

[0472] 在一些实施方案中,所述经修饰的IL-1对IL-1R1具有降低的亲力和/或活性(例如激动活性)。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-1对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。在此类实施方案中,存在可恢复的IL-1/IL-1R1信号传导,并且防止了IL-1R2处治疗性嵌合体的损失,并且因此减少了所需IL-1的剂量(例如,相对于野生型或仅携带针对IL-1R1的减毒突变的嵌合体)。此类构建体可用于例如治疗癌症,包括例如刺激免疫系统以建立抗癌应答的方法中。

[0473] 在一些实施方案中,所述经修饰的IL-1对IL-1R1具有降低的亲力和/或活性(例如拮抗活性,例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-1对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。在此类实施方案中,存在不可恢复的IL-1/IL-1R1信号传导,并且防止了IL-1R2处治疗性嵌合体的损失,并且因此减少了所需IL-1的剂量(例如,相对于野生型或仅携带针对IL-1R1的减毒突变的嵌合体)。此类构建体可用于例如治疗自身免疫性疾病,包括例如阻抑免疫系统的方法中。

[0474] 在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂具有氨基酸52-54缺失,这就产生了对I型IL-1R具有降低的结合亲和力并且具有降低的生物活性的经修饰的人IL-1 $\beta$ 。参见例如WO 1994/000491,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 具有选自A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、

M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209X、K209A/K210A、K219X、E221X、E221 S/N224A、N224S/K225S、E244K、N245Q的一个或多个取代突变(其中X可以是任何氨基酸变化,例如非保守变化),从而表现出降低的与IL-1R的结合,如例如W02015/007542和W0/2015/007536中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人IL-1 $\beta$ 序列,Genbank登记号NP\_000567,版本NP-000567.1,G1:10835145)。在一些实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 可以具有选自R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221S和E221K的一个或多个突变。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变Q131G和Q148G。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变Q148G和K208E。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和Q131G。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和H146A。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和H146N。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和H146R。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和H146E。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和H146G。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G和K208E。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1 $\beta$ 包含突变R120G、F162A和Q164E。

[0475] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-2。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-2R $\alpha$ 和/或IL-2R $\beta$ 和/或IL-2R  $\gamma$  具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-2R $\beta$ 和/或IL-2R  $\gamma$  具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-2R $\alpha$ 具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。此类实施方案可能有关于癌症的治疗,例如当所述经修饰的IL-2在IL-2R $\beta$ 和/或IL-2R  $\gamma$  处具有激动性时。举例来说,本发明的构建体可能有利于减弱具有IL2受体 $\beta$ 和  $\gamma$  的CD8<sup>+</sup>T细胞的激活(这可以提供抗肿瘤效应),而不利具有IL2受体 $\alpha$ 、 $\beta$ 和  $\gamma$  的T<sub>reg</sub>(这可以提供免疫阻抑、促肿瘤效应)。此外,在一些实施方案中,偏好IL-2R $\beta$ 和/或IL-2R  $\gamma$  超过IL-2R $\alpha$ 避免了诸多IL-2副作用,诸如肺水肿。而且,基于IL-2的嵌合体可用于治疗自身免疫性疾病,例如当所述经修饰的IL-2在IL-2R $\beta$ 和/或IL-2R  $\gamma$  处具有拮抗性(例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如W0 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)时。举例来说,本发明的构建体可能有利于减弱对具有IL2受体 $\beta$ 和  $\gamma$  的CD8<sup>+</sup>T细胞的抑制(并且因此阻遏免疫应答),而不利具有IL2受体 $\alpha$ 、 $\beta$ 和  $\gamma$  的T<sub>reg</sub>。或者,在一些实施方案中,携带IL-2的嵌合体有利于T<sub>reg</sub>的激活,并且因此有利于免疫阻抑,而不利CD8<sup>+</sup>T细胞的激活。举例来说,这些构建体可用于治疗疾病或将受益于免疫阻抑的疾病,例如自身免疫性疾病。

[0476] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白具有如本文所描述的针对CD8<sup>+</sup>T细胞的靶向部分以及对IL-2R $\beta$ 和/或IL-2R  $\gamma$  具有降低的亲合力和/或活性并且/或者对IL-2R $\alpha$ 具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性的经修饰的IL-2剂。在一些实施方案中,这些构建体提供靶向性CD8<sup>+</sup>T细胞活性,并且一般对T<sub>reg</sub>细胞无活性(或具有基本上降低的活性)。在一些实施方案中,此类构建体与野生型IL-2相比具有增强的免疫刺激效应(例如,不希望受理论束缚,通过不刺激Treg),同时消除或降低了与IL-2相关的全身毒性。

[0477] 在一个实施方案中,所述野生型IL-2具有氨基酸序列SEQ ID NO:336。

[0478] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-2剂在氨基酸L72(L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R或L72K)、F42(F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R或F42K)和Y45(Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R或Y45K)处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚,认为与所述野生型IL-2相比,这些经修饰的IL-2剂对高亲和力IL-2受体具有降低的亲和力并且保留对中亲和力IL-2受体的亲和力。参见例如美国专利公布号2012/0244112,所述美国专利公布的全部内容特此以引用方式并入。

[0479] 在一些实施方案中,所述经修饰的IL-2剂在氨基酸R38、F42、Y45和E62处具有一个或多个突变。举例来说,所述经修饰的IL-2剂可以包含R38A、F42A、Y45A和E62A中的一者或多者。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以在C125处包含突变。举例来说,所述突变可以是C125S。在此类实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以对IL-2R $\alpha$ 具有基本上降低的亲和力和/或活性,如例如在Carmenate等人(2013) *The Journal of Immunology*, 190: 6230-6238中所描述,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,在R38、F42、Y45和/或E62处具有突变的所述经修饰的IL-2剂能够诱导效应细胞的扩增,所述效应细胞包括CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞而不是Treg细胞。在一些实施方案中,在R38、F42、Y45和/或E62处具有突变的所述经修饰的IL-2剂相比野生型IL-2剂毒性更低。包含对IL-2R $\alpha$ 具有基本上降低的亲和力和/或活性的所述经修饰的IL-2剂的嵌合蛋白可以用于例如肿瘤学中。

[0480] 在其他实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以对IL-2R $\beta$ 具有基本上降低的亲和力和/或活性,如在例如W02016/025385中所描述,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以诱导Treg细胞而不是效应细胞(诸如CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞)的扩增。包含对IL-2R $\beta$ 具有基本上降低的亲和力和/或活性的所述经修饰的IL-2剂的嵌合蛋白可以例如用于治疗自身免疫性疾病中。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以在氨基酸N88、D20和/或A126处包含一个或多个突变。举例来说,所述经修饰的IL-2剂可以包含N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F中的一者或多者。

[0481] 在各个实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以在D109或C125处包含突变。举例来说,所述突变可以是D109C或C125S。在一些实施方案中,可以将在D109或C125处具有突变的经修饰的IL-2用于附接至PEG部分。

[0482] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-3。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-3受体具有降低的亲和力和/或活性,所述IL-3受体是与跟普通 $\beta$ ( $\beta$ c或CD131)亚单位配对的独特 $\alpha$ 链的异源二聚体。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-3受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性,所述IL-3受体是与跟普通 $\beta$ ( $\beta$ c或CD131)亚单位配对的独特 $\alpha$ 链的异源二聚体。

[0483] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-4。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对1型和/或2型IL-4受体具有降低的亲和力和/或活性。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对1型和/或2型IL-4受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。1型IL-4受体由具有普通 $\gamma$ 链的IL-4R $\alpha$ 亚单位构成并且特异性地结合IL-4。2型IL-4受体包括与被成为IL-13R $\alpha$ 1的不同亚单位结合的IL-4R $\alpha$ 亚单位。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对2型IL-4受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0484] 在一个实施方案中,所述野生型IL-4具有氨基酸序列SEQ ID NO:337。

[0485] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-4剂在氨基酸R121(R121A、R121D、R121E、R121F、R121H、R121I、R121K、R121N、R121P、R121T、R121W)、E122(E122F)、Y124(Y124A、Y124Q、Y124R、Y124S、Y124T)和S125(S125A)处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚,认为这些经修饰的IL-4剂维持I型受体介导的活性,但是显著降低了其他受体介导的生物活性。参见例如美国专利号6,433,157,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。

[0486] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-6。IL-6通过细胞表面I型细胞因子受体复合物进行信号传导,所述复合物包括配体结合IL-6R链(CD126)和信号转导组分gp130。IL-6还可以结合至IL-6R的可溶形式(sIL-6R),后者是IL-6R的细胞外部分。sIL-6R/IL-6复合物可能参与神经突长出和神经元存活,并且因此可能在通过髓鞘再生进行的神经再生中非常重要。因此,在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-6R/gp130和/或sIL-6R具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-6R/gp130和/或sIL-6R具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0487] 在一个实施方案中,所述野生型IL-6具有IL-6(成熟形式,野生型)的氨基酸序列(SEQ ID NO:338)。

[0488] 在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂在氨基酸58、160、163、171或177处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚,认为这些经修饰的IL-6剂表现出降低的对IL-6R $\alpha$ 的结合亲合力和降低的生物活性。参见例如WO 97/10338,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0489] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-10。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-10受体1和IL-10受体2具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-10受体1和IL-10受体2具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0490] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-11。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-11R $\alpha$ 和/或IL-11R $\beta$ 和/或gp130具有降低的亲合力和/或活性。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-11R $\alpha$ 和/或IL-11R $\beta$ 和/或gp130具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0491] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-12。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-12R $\beta$ 1和/或IL-12R $\beta$ 2具有降低的亲合力和/或活性。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-12R $\beta$ 1和/或IL-12R $\beta$ 2具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0492] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-13。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-4受体(IL-4R $\alpha$ )和IL-13R $\alpha$ 1具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-4受体(IL-4R $\alpha$ )或IL-13R $\alpha$ 1具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。

[0493] 在一个实施方案中,所述野生型IL-13具有IL-13(成熟形式,野生型)的氨基酸序列(SEQ ID NO:339)。

[0494] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-13剂在氨基酸13、16、17、66、69、99、102、104、105、106、107、108、109、112、113和114处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚,认为这些经修饰的IL-13剂表现出降低的生物活性。参见例如WO 2002/018422,所述文献的全

部内容特此以引用方式并入。

[0495] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-18。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-18R $\alpha$ 和/或IL-18R $\beta$ 具有降低的亲力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-18R $\alpha$ 和/或IL-18R $\beta$ 具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对II型IL-18R $\alpha$ ,即缺乏信号传导所需的TIR结构域的IL-18R $\alpha$ 同种型具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。

[0496] 在一个实施方案中,所述野生型IL-18具有IL-18(野生型)的氨基酸序列(SEQ ID NO:340)。

[0497] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-18剂可以在选自如W0/2015/007542中所描述的Y37-K44、R49-Q54、D59-R63、E67-C74、R80-M87-A97、N 127-K129、Q139-M149、K165-K171、R183和Q190-N191的氨基酸或氨基酸区域处包含一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人IL-18序列,Genbank登记号AAV38697,版本AAV38697.1,G1:54696650)。

[0498] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-33。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ST-2受体和IL-1RAcP具有降低的亲力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ST-2受体和IL-1RAcP具有基本上降低或消除的亲力和/或活性。

[0499] 在一个实施方案中,所述野生型IL-33具有氨基酸序列SEQ ID NO:341。

[0500] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-33剂可以在选自如W0/2015/007542中所描述的I113-Y122、S127-E139、E144-D157、Y163-M183、E200-Q215、L220-C227和T260-E269的氨基酸或氨基酸区域处包含一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人序列,Genbank登记号NP\_254274,版本NP\_254274.1,G1:15559209)。

[0501] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是表皮生长因子(EGF)。EGF是有效生长因子家族的成员。成员包括EGF、HB-EGF,以及其他成员,诸如TGF $\alpha$ 、双调蛋白、神经调节蛋白、上皮调节蛋白、 $\beta$ 细胞蛋白。EGF家族受体包括EGFR(ErbB1)、ErbB2、ErbB3和ErbB4。这些受体可以充当同源二聚体和/或异源二聚体受体亚型。不同的EGF家族成员对各种受体亚型表现出不同的选择性。举例来说,EGF与ErbB1/ErbB1、ErbB1/ErbB2、ErbB4/ErbB2和其他一些异源二聚体亚型相关。HB-EGF具有相似的模式,但它也与ErbB4/4相关。积极或消极地调节EGF(EGF样)生长因子信号传导具有相当大的治疗意义。举例来说,在EGFR信号构成主要的促进生长信号的各种癌症的治疗中,抑制EGFR信号是有意义的。或者,在例如促进伤口愈合(急性和慢性)、口腔粘膜炎(各种癌症疗法,包括但不限于放射疗法的主要副作用)中,刺激EGFR信号传导具有治疗意义。

[0502] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1、ErbB2、ErbB3和/或ErbB4具有降低的亲力和/或活性。此类实施方案可用于例如治疗伤口的方法中。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂结合至一个或多个ErbB1、ErbB2、ErbB3和ErbB4并拮抗这些受体的活性。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1、ErbB2、ErbB3和/或ErbB4具有降低的亲力和/或活性,这允许以减弱的方式拮抗这些受体的活性。此类实施方案可用于例如癌症的治疗中。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1具有降低的亲力和/或活性。ErbB1是激酶抑制剂的治疗靶标-这些激酶抑制剂大多数具有副

作用,因为它们的选择性不高(例如,吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)、布加替尼(brigatinib)和艾克替尼(icotinib))。在一些实施方案中,与靶向EGF受体的其他药剂相比,减弱的拮抗性ErbB1信号传导更具中靶性并且具有更少的副作用。

[0503] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1具有降低的亲合力和/或活性(例如拮抗性,例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如W0 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)并且/或者对ErbB4或可能与其相互作用的其他亚型具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。通过经由靶向部分进行特异性靶向,将实现对ErbB1/ErbB1受体激活的细胞选择性阻抑(拮抗作用,例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如W0 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入),而不牵涉可能与抑制相关副作用有关的其他受体亚型。因此,与在体内抑制所有细胞类型中的EGFR活性的EGFR激酶抑制剂相比,这种构建体将提供细胞选择性(例如,由于受体扩增、过度表达等原因而具有激活的EGFR信号传导的肿瘤细胞)抗EGFR(ErbB1)药物作用,且副作用减少。

[0504] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB4和/或可能与其相互作用的其他亚型具有降低的亲合力和/或活性(例如激动性)。通过经由靶向部分靶向特定靶细胞,实现了ErbB1信号传导的选择性激活(例如上皮细胞)。在一些实施方案中,这种构建体可用于治疗伤口(促进愈合)且副作用减少,尤其可用于治疗慢性疾患和治疗剂局部施用以外的应用(例如全身性伤口愈合)。

[0505] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是胰岛素或胰岛素类似物。在一些实施方案中,所述经修饰的胰岛素或胰岛素类似物对胰岛素受体和/或IGF1或IGF2受体具有降低的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的胰岛素或胰岛素类似物对胰岛素受体和/或IGF1或IGF2受体具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。胰岛素受体处减弱的应答允许控制糖尿病、肥胖症、代谢紊乱等,而直接远离IGF1或IGF2受体则避免了前癌的影响。

[0506] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是胰岛素样生长因子I或胰岛素样生长因子II(IGF-1或IGF-2)。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IGF-1。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对胰岛素受体和/或IGF1受体具有降低的亲合力和/或活性。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂可以结合至IGF1受体并且拮抗该受体的活性。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IGF1受体具有降低的亲合力和/或活性,这允许以减弱的方式拮抗该受体的活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对胰岛素受体和/或IGF1受体具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IGF2受体具有降低的亲合力和/或活性,这允许以减弱的方式拮抗该受体的活性。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对胰岛素受体具有基本上降低或消除的亲合力和/或活性,并且因此不干扰胰岛素信号传导。在各个实施方案中,这适用于癌症治疗。在各个实施方案中,本发明的剂可以防止IR同种型A引起对癌症治疗的抗性。

[0507] 在一个实施方案中,本发明的嵌合蛋白具有(i)针对PD-1或PD-L1的靶向部分和(ii)针对肿瘤细胞的靶向部分,以及本文所描述的修饰或突变的信号传导剂中的任一种。

[0508] 在一个实施方案中,本发明的嵌合蛋白具有(i)针对PD-1或PD-L1的靶向部分和(ii)针对检查点抑制剂标记物的靶向部分,以及本文所描述的修饰或突变的干扰素中的任一种。

[0509] 在各个实施方案中,所述信号传导剂是毒素或有毒的酶。在一些实施方案中,所述毒素或有毒的酶来源于植物和细菌。说明性的毒素或有毒的酶包括但不限于白喉毒素、假单胞菌毒素、炭疽毒素、核糖体灭活蛋白(RIP)诸如蓖麻毒素和肥皂草素、葫莲根毒素、相思子毒素、白树毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。另外的毒素包括Mathew等人,(2009)Cancer Sci 100(8):1359-65中所公开的那些,全部公开内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以用于以细胞类型特异性方式诱导细胞死亡。在此类实施方案中,所述毒素可以经过修饰,例如突变以降低所述毒素的亲合力和/或活性以便减弱效应,如针对本文的其他信号传导剂所描述。

[0510] 具有信号传导剂的多特异性嵌合体和融合物

[0511] 在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂是具有一种或多种如本文所描述的信号传导剂和/或一个或多个额外靶向部分的嵌合体或融合物的一部分。因此,本发明提供了包括一种或多种信号传导剂和针对PD-1或PD-L1的靶向部分和/或一个或多个额外靶向部分的嵌合或融合蛋白。

[0512] 在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂是多特异性的,即所述PD-1或PD-L1结合剂包含两个或更多个靶向部分,所述靶向部分具有识别并结合两个或更多个靶标(例如抗原或受体或表位)的识别结构域。在此类实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以包含两个或更多个靶向部分,所述靶向部分具有识别并结合相同抗原上或不同抗原上的两个或更多个表位的识别结构域。在各个实施方案中,此类多特异性PD-1或PD-L1结合剂表现出诸多有利性质,诸如增加的亲合力和/或提高的选择性。在一个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂包含两个靶向部分并且是双特异性的,即结合并识别相同抗原上或不同抗原上的两个表位。

[0513] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含两个或更多个靶向部分,各靶向部分是如本文所描述的抗体或抗体衍生物。在一个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含至少一个包含针对PD-1或PD-L1的抗原识别结构域的VHH和一个包含针对肿瘤抗原的抗原识别结构域的抗体或抗体衍生物。

[0514] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂具有靶向不同抗原或受体的两个或更多个靶向部分,并且一个靶向部分可以减弱其抗原或受体,例如所述靶向部分以低亲和力或亲合力结合其抗原或受体(包括例如以比其他靶向部分对其抗原或受体具有的亲和力或亲合力低的亲和力或亲合力,举例来说,结合亲和力之间的差异可以是约10倍、或25倍、或50倍、或100倍、或300倍、或500倍、或1000倍、或5000倍;举例来说,较低亲和力或亲合力靶向部分能以中至高nM或低至中μM范围内的 $K_D$ 结合其抗原或受体,而较高亲和力或亲合力靶向部分能以中至高pM或低至中nM范围内的 $K_D$ 结合其抗原或受体)。举例来说,在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含减毒的靶向部分,所述减毒的靶向部分针对混杂抗原或受体,从而可以改善对目标细胞的靶向(例如经由其他靶向部分)并且防止多个类型的细胞,包括疗法未靶向的那些细胞的效应(例如通过以比这些实施方案中提供的亲和力更高的亲和力结合混杂抗原或受体)。

[0515] 可以使用本领域中已知的方法来构建本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂,参见例如美国专利号9,067,991、美国专利公布号20110262348和WO 2004/041862,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一个说明性实施方案中,可以通过化学交联,例如通过如Blattler等人,Biochemistry 24,1517-1524和EP294703所描述使氨基酸残基与有机衍生化剂反应来构建本发明的包含两个或更多个靶向部分的多特异性PD-1或PD-L1结合剂,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在另一个说明性实施方案中,通过基因融合,即构建包括个别靶向部分的多肽的单多肽来构建包含两个或更多个靶向部分的多特异性PD-1或PD-L1结合剂。举例来说,可以形成单多肽构建体,所述构建体编码具有针对PD-1或PD-L1的抗原识别结构域的第一VHH和具有针对肿瘤抗原的抗原识别结构域的第二抗体或抗体衍生物。PCT专利申请WO 96/34103中公开了一种用于产生二价或多价VHH多肽构建体的方法,所述专利申请的全部内容特此以引用方式并入。在另一个说明性实施方案中,可以通过使用接头来构建本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂。举例来说,具有针对PD-1或PD-L1的抗原识别结构域的第一VHH的羧基端可以连接至具有针对肿瘤抗原的抗原识别结构域的第二抗体或抗体衍生物的氨基端(或反之亦然)。本文描述了可以使用的示例性接头。在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂的组分没有使用接头而直接与彼此连接。

[0516] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂识别并结合至PD-1或PD-L1和在一个或多个免疫细胞上发现的一个或多个抗原,所述免疫细胞可以包括但不限于巨核细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞、T淋巴细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、天然杀伤T细胞)、B淋巴细胞、浆细胞、树突状细胞或它们的子集。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂特异性地结合至目标抗原并且有效地直接或间接地募集一个或多个免疫细胞。

[0517] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂识别并结合至PD-1或PD-L1和在肿瘤细胞上发现的一个或多个抗原。在这些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以将免疫细胞直接或间接地募集至肿瘤细胞或肿瘤微环境。在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以将免疫细胞,例如可以杀死和/或阻抑肿瘤细胞的免疫细胞(例如CTL)直接或间接地募集至作用位点(作为非限制性实例,诸如肿瘤微环境)。

[0518] 在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂能够或可用于涉及改变有利于肿瘤的免疫攻击的免疫细胞平衡的方法中。举例来说,本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以改变临床重要部位处的免疫细胞比率,从而有利于可以杀死和/或阻抑肿瘤细胞(例如T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、天然杀伤(NK)细胞、天然杀伤T(NKT)细胞、抗肿瘤巨噬细胞(例如M1巨噬细胞)、嗜中性粒细胞、B细胞、树突状细胞或它们的子集,并且对抗保护肿瘤细胞(例如骨髓来源的阻抑细胞(MDSC)、调控T细胞(Treg)、肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或它们的子集)。在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂能够增加效应T细胞与调控T细胞的比率。

[0519] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与肿瘤细胞相关的抗原的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集肿瘤细胞。举例来说,在一些实施方案中,将肿瘤细胞募集至可以杀死

和/或阻抑肿瘤细胞的一个或多个效应细胞(例如本文所描述的免疫细胞)。在一些实施方案中,所述靶向部分例如通过与它们各自的在肿瘤和CD8阳性免疫细胞(例如T细胞)上的抗原相互作用的两个靶向部分直接或间接地将T细胞募集至肿瘤细胞。

[0520] 肿瘤细胞或癌细胞是指细胞或组织的不受控制的生长和/或细胞存活时间的异常增加和/或对干扰身体器官和系统的正常功能的细胞凋亡的抑制。举例来说,肿瘤细胞包括良性和恶性癌症、息肉、增生以及休眠肿瘤或微转移。说明性肿瘤细胞包括但不限于以下细胞:基底细胞癌、胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌症;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠和直肠癌;结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌(包括胃肠癌);成胶质细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内赘瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝脏癌;肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌);黑素瘤;骨髓瘤;成神经细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;外阴癌;淋巴瘤,包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)性NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级成免疫细胞性NHL;高级成淋巴细胞性NHL;高级小未分裂细胞性NHL;巨大肿块性NHL(bulky disease NHL);套细胞性淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞性白血病;慢性成髓细胞性白血病;以及其他癌瘤和肉瘤;和移植后淋巴组织增生性病症(PTLD),以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生、水肿(例如,与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征(Meigs' syndrome)。

[0521] 肿瘤细胞或癌细胞还包括但不限于癌瘤,例如各种亚型,包括例如腺癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌和移行细胞癌)、肉瘤(包括例如骨和软组织)、白血病(包括例如急性骨髓性、急性成淋巴细胞性、慢性骨髓性、慢性淋巴细胞性和毛细胞)、淋巴瘤和骨髓瘤(包括例如霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、轻链、非分泌性、MGUS和浆细胞瘤)和中枢神经系统癌症(包括例如脑(例如神经胶质瘤(例如星形细胞瘤、寡枝神经胶质瘤和室管膜瘤)、脑膜瘤、垂体腺瘤和神经瘤和脊髓肿瘤(例如脑膜瘤和纤维神经瘤)。

[0522] 说明性肿瘤抗原包括但不限于MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环蛋白b、结肠直肠相关抗原(CRC)-0017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3- $\zeta$ 链、MAGE家族肿瘤抗原(例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族肿瘤抗原(例如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 $\alpha$ -胎儿球蛋白、E-钙粘蛋白、 $\alpha$ -连锁蛋白、 $\beta$ -连锁蛋白和 $\gamma$ -连锁蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物诸如人乳头状瘤病毒蛋白、Smad家族肿瘤抗原、lmp-1、NA、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-

1、SSX-4、SSX-5、SCP-1CT-7、c-erbB-2、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、PD-L2、PMSA和BCMA (TNFRSF17)。。在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些肿瘤抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0523] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂识别并结合至PD-1或PD-L1以及在肿瘤细胞上的抗原。

[0524] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂具有靶向两种不同的细胞(例如,以形成突触)或相同的细胞(例如,以得到更浓的信号传导剂效果)的靶向部分。

[0525] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与T细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集T细胞。在一个实施方案中,所述抗原识别结构域特异性地结合至效应T细胞。在一些实施方案中,所述抗原识别结构域直接或间接地募集效应T细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性效应T细胞包括细胞毒性T细胞(例如 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD45RO^+$ ) ;  $CD4^+$ 效应T细胞(例如 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L$ 高、 $IL-7R/CD127^-$ ) ;  $CD8^+$ 效应T细胞(例如 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CCR7^+$ 、 $CD62L$ 高、 $IL-7R/CD127^+$ ) ; 效应记忆T细胞(例如 $CD62L$ 低、 $CD44^+$ 、TCR、 $CD3^+$ 、 $IL-7R/CD127^+$ 、 $IL-15R^+$ 、 $CCR7$ 低) ; 中枢记忆T细胞(例如 $CCR7^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD27^+$  ; 或 $CCR7$ 高、 $CD44^+$ 、 $CD62L$ 高、TCR、 $CD3^+$ 、 $IL-7R/CD127^+$ 、 $IL-15R^+$ ) ;  $CD62L^+$ 效应T细胞 ;  $CD8^+$ 效应记忆T细胞(TEM),包括早期效应记忆T细胞( $CD27^+CD62L^-$ )和晚期效应记忆T细胞( $CD27^-CD62L^-$ ) (分别是TemE和TemL) ;  $CD127^+$   $CD25$  (低/-) 效应T细胞 ;  $CD127^-$   $CD25^-$  效应T细胞 ;  $CD8^+$ 干细胞记忆效应细胞(TSCM) (例如 $CD44$  (低)  $CD62L$  (高)  $CD122$  (高) sca $^+$ ) ; TH1效应T细胞(例如 $CXCR3^+$ 、 $CXCR6^+$ 和 $CCR5^+$  ; 或 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $IL-12R^+$ 、 $IFN\gamma R^+$ 、 $CXCR3^+$ ) ; TH2效应T细胞(例如 $CCR3^+$ 、 $CCR4^+$ 和 $CCR8^+$  ; 或 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $IL-4R^+$ 、 $IL-33R^+$ 、 $CCR4^+$ 、 $IL-17RB^+$ 、 $CRTH2^+$ ) ; TH9效应T细胞(例如 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ ) ; TH17效应T细胞(例如 $\alpha\beta$ TCR、 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $IL-23R^+$ 、 $CCR6^+$ 、 $IL-1R^+$ ) ;  $CD4^+CD45RO^+CCR7^+$ 效应T细胞、 $ICOS^+$ 效应T细胞 ;  $CD4^+CD45RO^+CCR7^-$ 效应T细胞 ; 和分泌IL-2、IL-4和/或IFN- $\gamma$ 的效应T细胞。

[0526] 说明性目标T细胞抗原包括例如(并且在适当时包括细胞外结构域) :  $CD8$ 、 $CD3$ 、 $SLAMF4$ 、 $IL-2R\alpha$ 、 $4-1BB$ /TNFRSF9、 $IL-2R\beta$ 、 $ALCAM$ 、 $B7-1$ 、 $IL-4R$ 、 $B7-H3$ 、 $BLAME$ /SLAMFS、 $CEACAM1$ 、 $IL-6R$ 、 $CCR3$ 、 $IL-7R\alpha$ 、 $CCR4$ 、 $CXCR1$ /IL-S RA、 $CCR5$ 、 $CCR6$ 、 $IL-10R\alpha$ 、 $CCR7$ 、 $IL-10R\beta$ 、 $CCRS$ 、 $IL-12R\beta1$ 、 $CCR9$ 、 $IL-12R\beta2$ 、 $CD2$ 、 $IL-13R\alpha1$ 、 $IL-13$ 、 $CD3$ 、 $CD4$ 、 $ILT2$ /CDS5j、 $ILT3$ /CDS5k、 $ILT4$ /CDS5d、 $ILT5$ /CDS5a、鲁特格林(lutegrin)  $\alpha4$ /CD49d、CDS、整合素 $\alpha E$ /CD103、 $CD6$ 、整合素 $\alpha M$ /CD11b、CDS、整合素 $\alpha X$ /CD11c、整合素 $\beta2$ /CD15、 $KIR$ /CD15S、 $CD27$ /TNFRSF7、 $KIR2DL1$ 、 $CD2S$ 、 $KIR2DL3$ 、 $CD30$ /TNFRSF5、 $KIR2DL4$ /CD15Sd、 $CD31$ /PECAM-1、 $KIR2DS4$ 、 $CD40$ 配体/TNFSF5、LAG-3、 $CD43$ 、 $LAIR1$ 、 $CD45$ 、 $LAIR2$ 、CDS3、白三烯B4-R1、CDS4/SLAMF5、 $NCAM-L1$ 、 $CD94$ 、 $NKG2A$ 、 $CD97$ 、 $NKG2C$ 、 $CD229$ /SLAMF3、 $NKG2D$ 、 $CD2F-10$ /SLAMF9、NT-4、 $CD69$ 、NTB-A/SLAMF6、普通 $\gamma$ 链/ $IL-2R\gamma$ 、骨调素、CRACC/SLAMF7、PD-1、CRTAM、PSGL-1、CTLA-4、RANK/TNFRSF11A、 $CX3CR1$ 、 $CX3CL1$ 、L-选择素、 $CXCR3$ 、 $SIRP\beta1$ 、 $CXCR4$ 、SLAM、 $CXCR6$ 、TCCR/WSX-1、 $DNAM-1$ 、促胸腺生成素、EMMPRIN/CD147、TIM-1、EphB6、TIM-2、Fas/TNFRSF6、TIM-3、Fas配体/TNFSF6、TIM-4、Fc $\gamma$ RIII/CD16、TIM-6、TNFR1/TNFRSF1A、粒溶素、TNFRIII/TNFRSF1B、

TRAILR1/TNFRSF10A、ICAM-1/CD54、TRAIL R2/TNFRSF10B、ICAM-2/CD102、TRAILR3/TNFRSF10C、IFN- $\gamma$  R1、TRAILR4/TNFRSF10D、IFN- $\gamma$  R2、TSLP、IL-1R1和TSLP R。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性T细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0527] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含针对CD8的靶向部分,所述靶向部分是包含具有四个“框架区”或FR和三个“互补决定区”或CDR的单个氨基酸链的VHH。如本文所使用,“框架区”或“FR”是指可变结构域中位于CDR之间的区域。如本文所使用,“互补决定区”或“CDR”是指VHH中含有能够特异性地结合至抗原靶标的氨基酸序列的可变区。

[0528] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含针对CD8的VHH,所述VHH具有包含至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列的可变结构域。

[0529] 在一些实施方案中,所述CDR1序列选自SEQ ID NO:342或SEQ ID NO:343。

[0530] 在一些实施方案中,所述CDR2序列选自SEQ ID NO:344或SEQ ID NO:345。

[0531] 在一些实施方案中,所述CDR3序列选自SEQ ID NO:346或SEQ ID NO:347或SEQ ID NO:348。

[0532] 在各个实施方案中,所述CD8靶向部分包含选自以下序列的氨基酸序列:R3HCD27 (SEQ ID NO:349)或R3HCD129 (SEQ ID NO:350)或R2HCD26 (SEQ ID NO:351)。

[0533] 在各个实施方案中,所述CD8靶向部分包含具有可变结构域的VHH,所述可变结构域包含如下文所描述的至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列。

[0534] 在一些实施方案中,所述CDR1序列选自SEQ ID NO:352至SEQ ID NO:420。

[0535] 在一些实施方案中,所述CDR2序列选自SEQ ID NO:421至SEQ ID NO:489。

[0536] 在一些实施方案中,所述CDR3序列选自SEQ ID NO:490至SEQ ID NO:558。

[0537] 在各个实施方案中,所述CD8靶向部分包含选自以下序列的氨基酸序列:1CDA 7 (SEQ ID NO:559)或1CDA 12 (SEQ ID NO:560)或1CDA 14 (SEQ ID NO:561)或1CDA 15 (SEQ ID NO:562)或1CDA 17 (SEQ ID NO:563)或1CDA 18 (SEQ ID NO:564)或1CDA 19 (SEQ ID NO:565)或1CDA 24 (SEQ ID NO:566)或1CDA 26 (SEQ ID NO:567)或1CDA 28 (SEQ ID NO:568)或1CDA 37 (SEQ ID NO:569)或1CDA 43 (SEQ ID NO:570)或1CDA 45 (SEQ ID NO:571)或1CDA 47 (SEQ ID NO:572)或1CDA 48 (SEQ ID NO:573)或1CDA 58 (SEQ ID NO:574)或1CDA 65 (SEQ ID NO:575)或1CDA 68 (SEQ ID NO:576)或1CDA 73 (SEQ ID NO:577)或1CDA 75 (SEQ ID NO:578)或1CDA 86 (SEQ ID NO:579)或1CDA 87 (SEQ ID NO:580)或1CDA 88 (SEQ ID NO:581)或1CDA 89 (SEQ ID NO:582)或1CDA 92 (SEQ ID NO:583)或1CDA 93 (SEQ ID NO:584)或2CDA 1 (SEQ ID NO:585)或2CDA 5 (SEQ ID NO:586)或2CDA 22 (SEQ ID NO:587)或2CDA 28 (SEQ ID NO:588)或2CDA 62 (SEQ ID NO:589)或2CDA 68 (SEQ ID NO:590)或2CDA 73 (SEQ ID NO:591)或2CDA 74 (SEQ ID NO:592)或2CDA 75 (SEQ ID NO:593)或2CDA 77 (SEQ ID NO:594)或2CDA 81 (SEQ ID NO:595)或2CDA 87 (SEQ ID NO:596)或2CDA 88 (SEQ ID NO:597)或2CDA 89 (SEQ ID NO:598)或2CDA 91 (SEQ ID NO:599)或2CDA 92 (SEQ ID NO:600)或2CDA 93 (SEQ ID NO:601)或2CDA 94 (SEQ ID NO:602)或2CDA 95 (SEQ ID NO:603)或3CDA 3 (SEQ ID NO:604)或3CDA 8 (SEQ ID NO:605)或3CDA 11 (SEQ ID NO:606)或3CDA 18 (SEQ ID NO:607)或3CDA 19 (SEQ ID NO:608)或3CDA21 (SEQ ID NO:609)或

3CDA 24(SEQ ID NO:610)或3CDA 28(SEQ ID NO:611)或3CDA 29(SEQ ID NO:612)或3CDA 31(SEQ ID NO:613)或3CDA 32(SEQ ID NO:614)或3CDA33(SEQ ID NO:615)或3CDA 37(SEQ ID NO:616)或3CDA 40(SEQ ID NO:617)或3CDA 41(SEQ ID NO:618)或3CDA 48(SEQ ID NO:619)或3CDA 57(SEQ ID NO:620)或3CDA 65(SEQ ID NO:621)或3CDA 70(SEQ ID NO:622)或3CDA 73(SEQ ID NO:623)或3CDA 83(SEQ ID NO:624)或3CDA 86(SEQ ID NO:625)或3CDA 88(SEQ ID NO:626)或3CDA 90(SEQ ID NO:627)。

[0538] 在各个示例性实施方案中,所述CD8靶向部分包含选自以上序列中的任一者而没有末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即,HHHHHH;SEQ ID NO:84)。

[0539] 在一些实施方案中,所述CD8靶向部分包含选自SEQ ID No:559-627(以上提供)而没有HA标签的氨基酸序列(即,YPYDVPDYGS;SEQ ID NO:85)。

[0540] 在一些实施方案中,所述CD8靶向部分包含选自SEQ ID No:559-627(以上提供)而没有AAA接头的氨基酸序列。

[0541] 在一些实施方案中,所述CD8靶向部分包含选自SEQ ID No:559-627(以上提供)而没有AAA接头、HA标签和末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即AAAYPYDVPDYGSHHHHHH;SEQ ID NO:86)。在各个实施方案中,所述CD8靶向部分包含在美国专利公布号2014/0271462中所描述的氨基酸序列,所述专利公布的全部内容以引用方式并入。在各个实施方案中,所述CD8靶向部分包含在美国专利公布号2014/0271462的表0.1、表0.2、表0.3和/或图1A-图12I中所描述的氨基酸序列,所述专利公布的全部内容以引用方式并入。在各个实施方案中,所述CD8靶向部分包含SEQ ID NO:22或23的HCDR1的HCDR1、和/或SEQ ID NO:22或23的HCDR1的HCDR2、和/或SEQ ID NO:22或23的HCDR1的HCDR3、和/或SEQ ID NO:24的LCDR1的LCDR1、和/或SEQ ID NO:24的LCDR1的LCDR2、和/或SEQ ID NO:24的LCDR1的LCDR3,如在SEQ ID NO:628、SEQ ID NO:629或SEQ ID NO:630中所提供。

[0542] 在各个实施方案中,本发明设想使用如本文所描述的针对CD8的靶向部分的任何天然或合成的类似物、突变体、变体、等位基因、同系物和直系同源物(本文中统称为“类似物”)。在各个实施方案中,所述针对CD8的靶向部分的氨基酸序列还包括氨基酸类似物、氨基酸衍生物或其他非经典氨基酸。

[0543] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与B细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集B细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性目标B细胞抗原包括例如CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD70、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a/b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138、CDw150和B细胞成熟抗原(BCMA)。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性B细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0544] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与天然杀伤细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集天然杀伤细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。

置)。说明性目标天然杀伤细胞抗原包括例如TIGIT、2B4/SLAMF4、KIR2DS4、CD155/PVR、KIR3DL1、CD94、LMIR1/CD300A、CD69、LMIR2/CD300c、CRACC/SLAMF7、LMIR3/CD300LF、KIR1α、DNAM-1、LMIR5/CD300LB、Fc-εRII、LMIR6/CD300LE、Fc-γRI/CD64、MICA、Fc-γRIIB/CD32b、MICB、Fc-γRIIC/CD32c、MULT-1、Fc-γRIIA/CD32a、结合素-2/CD112、Fc-γRIII/CD16、NKG2A、FcRH1/IRTA5、NKG2C、FcRH2/IRTA4、NKG2D、FcRH4/IRTA1、NKp30、FcRH5/IRTA2、NKp44、Fc受体样蛋白3/CD16-2、NKp46/NCR1、NKp80/KLRP1、NTB-A/SLAMF6、Rae-1、Rae-1α、Rae-1β、Rae-1δ、H60、Rae-1ε、ILT2/CD85j、Rae-1γ、ILT3/CD85k、TREM-1、ILT4/CD85d、TREM-2、ILT5/CD85a、TREM-3、KIR/CD158、TREML1/TLT-1、KIR2DL1、ULBP-1、KIR2DL3、ULBP-2、KIR2DL4/CD158d和ULBP-3。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性NK细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0545] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与巨噬细胞/单核细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集巨噬细胞/单核细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性目标巨噬细胞/单核细胞抗原包括例如SIRP1a、B7-1/CD80、ILT4/CD85d、B7-H1、ILT5/CD85a、普通β链、整合素α4/CD49d、BLAME/SLAMF8、整合素αX/CD11c、CCL6/C10、整合素β2/CD18、CD155/PVR、整合素β3/CD61、CD31/PECAM-1、胶乳素、CD36/SR-B3、白三烯B4 R1、CD40/TNFRSF5、LIMPIIISR-B2、CD43、LMIR1/CD300A、CD45、LMIR2/CD300c、CD68、LMIR3/CD300LF、CD84/SLAMF5、LMIR5/CD300LB、CD97、LMIR6/CD300LE、CD163、LRP-1、CD2F-10/SLAMF9、MARCO、CRACC/SLAMF7、MD-1、ECF-L、MD-2、EMMPRIN/CD147、MGL2、内皮素/CD105、骨激活素/GPNMB、Fc-γRI/CD64、骨调素、Fc-γRIIB/CD32b、PD-L2、Fc-γRIIC/CD32c、Siglec-3/CD33、Fc-γRIIA/CD32a、SIGNR1/CD209、Fc-γRIII/CD16、SLAM、GM-CSF Rα、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN-γRI、TLR4、IFN-γR2、TREM-1、IL-1RII、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREML1/TLT-1、2B4/SLAMF4、IL-10Rα、ALCAM、IL-10Rβ、氨基肽酶N/ANPEP、ILT2/CD85j、普通β链、ILT3/CD85k、C1q R1/CD93、ILT4/CD85d、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、CD206、整合素α4/CD49d、CCR5、整合素αM/CD11b、CCR8、整合素αX/CD11c、CD155/PVR、整合素β2/CD18、CD14、整合素β3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、白三烯B4-R1、CD68、LIMPIIISR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、CD163、LMIR3/CD300LF、凝血因子III/组织因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、CXCR6、M-CSF R、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、内皮素/CD105、NCAM-L1、Fc-γRI/CD64、PSGL-1、Fc-γRIIIICD16、RP105、G-CSF R、L-选择素、GM-CSF Rα、Siglec-3/CD33、HVEM/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL-6R、TREM-2、CXCR1/IL-8RA、TREM-3和TREML1/TLT-1。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性巨噬细胞/单核细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0546] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与树突状细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集树突状细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。

说明性目标树突状细胞抗原包括例如Clec9A、XCR1、RANK、CD36/SRB3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-A1/MSR、CD5L、SREC-1、CL-P1/COLEC12、SREC-II、LIMPIIISRB2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-IBB配体/TNFSF9、IL-12/IL-23p40、4-氨基-1,8-萘二甲酰胺、ILT2/CD85j、CCL21/6CKine、ILT3/CD85k、8-氧代-dG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、鲁特格林 $\alpha$ 4/CD49d、Aag、整合素 $\beta$ 2/CD18、AMICA、朗格汉斯蛋白(Langerin)、B7-2/CD86、白三烯B4 R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、Clq R1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LB CCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4-a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAML1、CD2F-10/SLAMF9、骨激活素GPNMB、Chern 23、PD-L2、CLEC-1、RP105、CLEC-2、CLEC-8、Siglec-2/CD22、CRACC/SLAMF7、Siglec-3/CD33、DC-SIGN、DEC-205、Siglec-5、DC-SIGNR/CD299、Siglec-6、DCAR、Siglec-7、DCIR/CLEC4A、Siglec-9、DEC-205、Siglec-10、Dectin-1/CLEC7A、Siglec-F、Dectin-2/CLEC6A、SIGNR1/CD209、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/CD147、TCCR/WSX-1、Fc- $\gamma$  R1/CD64、TLR3、Fc- $\gamma$  RIIB/CD32b、TREM-1、Fc- $\gamma$  RIIC/CD32c、TREM-2、Fc- $\gamma$  RIIA/CD32a、TREM-3、Fc- $\gamma$  RIII/CD16、TREML1/TLT-1、ICAM-2/CD102、DEC205和辣椒素R1。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性DC抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0547] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含针对Clec9A的靶向部分,所述靶向部分是包含具有四个“框架区”或FR和三个“互补决定区”或CDR的单个氨基酸链的VHH。如本文所使用,“框架区”或“FR”是指可变结构域中位于CDR之间的区域。如本文所使用,“互补决定区”或“CDR”是指VHH中含有能够特异性地结合至抗原靶标的氨基酸序列的可变区。

[0548] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含针对Clec9A的VHH,所述VHH具有包含至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列的可变结构域。

[0549] 在示例性实施方案中,所述CDR1序列选自SEQ ID NO:631至SEQ ID NO:650。

[0550] 在示例性实施方案中,所述CDR2序列选自SEQ ID NO:651至SEQ ID NO:672。

[0551] 在示例性实施方案中,所述CDR3序列选自SEQ ID NO:673至SEQ ID NO:687;或LGR;或VIK。

[0552] 在各个实施方案中,所述Clec9A靶向部分包含选自以下序列的氨基酸序列: R2CHCL8 (SEQ ID NO:688); R1CHCL50 (SEQ ID NO:689); R1CHCL21 (SEQ ID NO:690); R2CHCL87 (SEQ ID NO:691); R2CHCL24 (SEQ ID NO:692); R2CHCL38 (SEQ ID NO:693); R1CHCL16 (SEQ ID NO:694); R2CHCL10 (SEQ ID NO:695); R1CHCL34 (SEQ ID NO:696); R1CHCL82 (SEQ ID NO:697); R2CHCL3 (SEQ ID NO:698); R2CHCL69 (SEQ ID NO:699); R1CHCL56 (SEQ ID NO:700); R2CHCL32 (SEQ ID NO:701); R2CHCL49 (SEQ ID NO:702); R2CHCL53 (SEQ ID NO:703); R2CHCL22 (SEQ ID NO:704); R2CHCL25 (SEQ ID NO:705); R2CHCL18 (SEQ ID NO:706); R1CHCL23 (SEQ ID NO:707); R1CHCL27 (SEQ ID NO:708); R2CHCL13 (SEQ ID NO:709); R2CHCL14 (SEQ ID NO:710); R2CHCL42 (SEQ ID NO:711); R2CHCL41 (SEQ ID NO:712); R2CHCL94 (SEQ ID NO:713); 或R2CHCL27 (SEQ ID NO:714)。

[0553] 在各个实施方案中,所述Clec9A靶向部分包含具有可变结构域的VHH,所述可变结构域包含如下文所描述的至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列。

- [0554] 在一些实施方案中,所述CDR1序列选自SEQ ID NO:715至SEQ ID NO:780。
- [0555] 在一些实施方案中,所述CDR2序列选自SEQ ID NO:781至SEQ ID NO:846。
- [0556] 在一些实施方案中,所述CDR3序列选自SEQ ID NO:847至SEQ ID NO:912。
- [0557] 在各个示例性实施方案中,所述C1ec9A靶向部分包含选自以下序列的氨基酸序列:1LEC 7 (SEQ ID NO:913)。
- [0558] 在各个示例性实施方案中,所述C1ec9A靶向部分包含选自以上序列中的任一者而没有末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即,HHHHHH;SEQ ID NO:84)。
- [0559] 在一些实施方案中,所述C1ec9A靶向部分包含选自SEQ ID No:913-978 (以上提供) 而没有HA标签的氨基酸序列(即,YPYDVDPYGS;SEQ ID NO:85)。
- [0560] 在一些实施方案中,所述C1ec9A靶向部分包含选自SEQ ID No:913-978 (以上提供) 而没有AAA接头的氨基酸序列。
- [0561] 在一些实施方案中,所述C1ec9A靶向部分包含选自SEQ ID No:913-978 (以上提供) 而没有AAA接头、HA标签和末端组氨酸标签序列的氨基酸序列(即AAAYPYDVDPYGSHHHHHH;SEQ ID NO:86)。
- [0562] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如在Tullett等人,JCI Insight.2016;1 (7):e87102中公开的抗C1ec9A抗体,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。
- [0563] 在各个实施方案中,本发明设想了如本文所描述的针对C1ec9A的靶向部分的任何天然或合成类似物、突变体、变体、等位基因、同系物和直系同源物(本文中统称为“类似物”)的用途。在各个实施方案中,所述针对C1ec9A的靶向部分的氨基酸序列还包括氨基酸类似物、氨基酸衍生物或其他非经典氨基酸。
- [0564] 在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含靶向部分,所述靶向部分包含与本文公开的序列中的任一者具有至少60%同一性的氨基酸序列。举例来说,所述嵌合蛋白可以包含靶向部分,所述靶向部分包含与本文公开的序列中的任一者具有至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%同一性(例如,与本文公开的序列中的任一者具有约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%或约100%序列同一性)的氨基酸序列。
- [0565] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至选自但不限于巨核细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的免疫细胞上的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述抗原识别结构域直接或间接地募集巨核细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、

嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。

[0566] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与巨核细胞和/或血小板相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。说明性目标巨核细胞和/或血小板抗原包括例如GP IIb/IIIa、GPIb、vWF、PF4和TSP。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性巨核细胞和/或血小板抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0567] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与红细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。说明性目标红细胞抗原包括例如CD34、CD36、CD38、CD41a(血小板糖蛋白IIb/IIIa)、CD41b(GPIIb)、CD71(转铁蛋白受体)、CD105、血型糖蛋白A、血型糖蛋白C、c-kit、HLA-DR、H2(MHC-II)和恒河猴抗原。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性红细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0568] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与肥大细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。说明性目标肥大细胞抗原包括例如SCFR/CD117、Fc<sub>ε</sub>RI、CD2、CD25、CD35、CD88、CD203c、C5R1、CMA1、FCER1A、FCER2、TPSAB1。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性肥大细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0569] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与嗜碱性粒细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。说明性目标嗜碱性粒细胞抗原包括例如Fc<sub>ε</sub>RI、CD203c、CD123、CD13、CD107a、CD107b和CD164。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性嗜碱性粒细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0570] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与嗜中性粒细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。说明性目标嗜中性粒细胞抗原包括例如7D5、CD10/CALLA、CD13、CD16(FcRIII)、CD18蛋白(LFA-1、CR3和p150、95)、CD45、CD67和CD177。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性嗜中性粒细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0571] 在一些实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至与嗜酸性粒细胞相关的靶标(例如抗原、受体)的抗原识别结构域的靶向部分。说明性目标嗜酸性粒细胞抗原包括例如CD35、CD44和CD69。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性嗜酸性粒细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0572] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至本领域技术人员已知的任何适当抗原或受体或细胞表面标记物的抗原识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述抗原或细胞表面标记物是组织特异性标记物。说明性组织特异性标记物包括但不限于内皮细胞表面标记物,诸如ACE、CD14、CD34、CDH5、ENG、ICAM2、MCAM、NOS3、PECAM1、PROCR、SELE、SELP、TEK、THBD、VCAM1、VWF;平滑肌细胞表面标记物,诸如ACTA2、MYH10、MYH11、MYH9、MYOCD;成纤维细胞(基质)细胞表面标记物,诸如ALCAM、CD34、COL1A1、COL1A2、COL3A1、FAP、PH-4;上皮细胞表面标记物,诸如CD1D、K6IRS2、

KRT10、KRT13、KRT17、KRT18、KRT19、KRT4、KRT5、KRT8、MUC1、TACSTD1；新生血管标记物，诸如CD13、TFNA、 $\alpha$ -v $\beta$ -3 ( $\alpha_v\beta_3$ )、E-选择素；和脂肪细胞表面标记物，诸如ADIPOQ、FABP4和RETN。在各个实施方案中，所述PD-1或PD-L1结合剂包含结合这些说明性抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0573] 在各个实施方案中，本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至T细胞上表达的检查点标记物的抗原识别结构域的靶向部分，所述检查点标记物是例如PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、CD27、CD40L、TIM3和A2aR中的一者或多者。

[0574] 在各个实施方案中，本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至检查点标记物的抗原识别结构域的靶向部分，所述检查点标记物是例如PD-1/PD-L1或PD-L2、CD28/CD80或CD86、CTLA4/CD80或CD86、ICOS/ICOSL或B7RP1、BTLA/HVEM、KIR、LAG3、CD137/CD137L、OX40/OX40L、CD27、CD40L、TIM3/Ga19和A2aR中的一者或多者。

[0575] 作为非限制性实例，在各个实施方案中，本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含(i)针对CD8的靶向部分；(ii)针对T细胞上表达的检查点标记物的靶向部分，所述检查点标记物是例如PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、Cd27、CD40L、TIM3和A2aR中的一者或多者；和/或(iii)针对肿瘤细胞的靶向部分，以及本文所描述的经修饰的(例如突变的)信号传导剂中的任一种。

[0576] 在各个实施方案中，本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含一个或多个针对PD-1的靶向部分以及如本文其他部分所公开的PD-1结合VHH。在一些实施方案中，所述PD-1或PD-L1结合剂具有一个或多个选择性地结合PD-1多肽的靶向部分。在一些实施方案中，所述PD-1或PD-L1结合剂包含一个或多个选择性地结合PD-1多肽的抗体、抗体衍生物或形式、肽或多肽或融合蛋白。在一些实施方案中，所述PD-1结合剂包含下文所公开的一种或多种PD-1结合剂连同本文所公开的一种或多种信号传导剂。

[0577] 在一个实施方案中，所述靶向部分包含抗PD-1抗体喷罗珠单抗(pembrolizumab)(又名MK-3475、KEYTRUDA)或其片段。喷罗珠单抗和其他人源化抗PD-1抗体公开于Hamid等人(2013)New England Journal of Medicine 369(2):134-44、US 8,354,509和WO 2009/114335中，所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中，用于本文提供的方法中的喷罗珠单抗或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:979的重链和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:980的轻链。

[0578] 在一个实施方案中，所述靶向部分包含抗PD-1抗体纳武单抗(Nivolumab)(又名BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVO)或其片段。纳武单抗(克隆5C4)和其他特异性地结合至PD-1的人单克隆抗体公开于US 8,008,449和WO 2006/121168中，所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中，纳武单抗或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:981的重链和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:982的轻链。

[0579] 在一个实施方案中，所述靶向部分包含抗PD-1抗体皮地利珠单抗(pidilizumab)(又名CT-011、hBAT或hBAT-1)或其片段。皮地利珠单抗和其他人源化抗PD-1单克隆抗体公开于US 2008/0025980和WO 2009/101611中，所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中，用于本文提供的方法中的抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含选自US 2008/0025980的SEQ ID No:15-18的氨基酸序列：

US 2008/0025980的SEQ ID No:15 (SEQ ID NO:983);US 2008/0025980的SEQ ID No:16 (SEQ ID NO:984);US 2008/0025980的SEQ ID No:17 (SEQ ID NO:985);US 2008/0025980的SEQ ID No:18 (SEQ ID NO:986);和/或重链,所述重链包含选自US 2008/0025980的SEQ ID No:20-24的氨基酸序列:US 2008/0025980的SEQ ID No:20 (SEQ ID NO:987);US 2008/0025980的SEQ ID No:21 (SEQ ID NO:988);US 2008/0025980的SEQ ID No:22 (SEQ ID NO:989);US 2008/0025980的SEQ ID No:23 (SEQ ID NO:990);US 2008/0025980的SEQ ID No:24 (SEQ ID NO:991)。

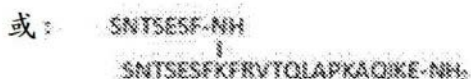
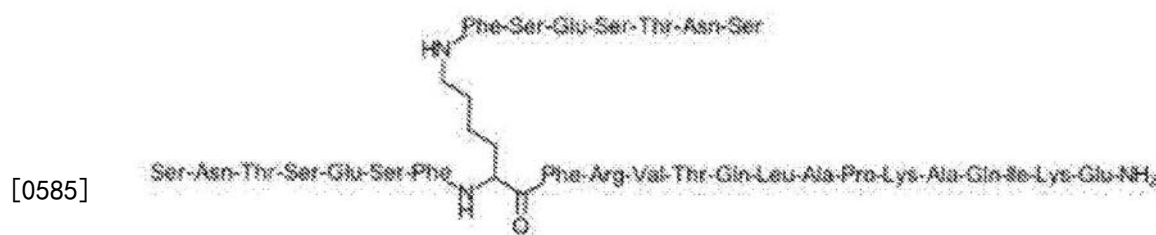
[0580] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含含有US 2008/0025980的SEQ ID NO:18的轻链和含有US 2008/0025980的SEQ ID NO:22的重链。

[0581] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含AMP-514 (又名MEDI-0680)。

[0582] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含W02010/027827和W0 2011/066342中公开的PD-L2-Fc融合蛋白AMP-224,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在这种实施方案中,所述靶向部分可以包括包含W02010/027827的SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO:992)的靶向结构域和/或包含W02010/027827的SEQ ID NO:83 (SEQ ID NO:993)的B7-DC融合蛋白。

[0583] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含肽AUNP 12或US 2011/0318373或8,907,053中公开的任何其他肽。举例来说,所述靶向部分可以包含具有SEQ ID NO:994的序列的AUNP 12 (即,US 2011/0318373的化合物8或SEQ ID NO:49):

[0584] SNTSESFK (SNTSESF) FRVTQLAPKAQIKE-NH<sub>2</sub>



[0586] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-1抗体1E3或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的1E3或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:995的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:996的轻链可变区。

[0587] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-1抗体1E8或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的1E8或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:997的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:998的轻链可变区。

[0588] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-1抗体1H3或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的1H3或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:999的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1000的轻链可变区。

[0589] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如例如US 8,907,065和W0 2008/071447中

所公开的针对PD-1的VHH,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,所述针对PD-1的VHH包含US 8,907,065的SEQ ID NO:347-351;US 8,907,065的SEQ ID No:347 (SEQ ID NO:1001);US 8,907,065的SEQ ID No:348 (SEQ ID NO:1002);US 8,907,065的SEQ ID No:349 (SEQ ID NO:1003);US 8,907,065的SEQ ID No:350 (SEQ ID NO:1004);或US 8,907,065的SEQ ID No:351 (SEQ ID NO:1005)。

[0590] 在一些实施方案中,所述PD-1靶向部分包含选自在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108(根据Kabat编号)处具有一个或多个取代的SEQ ID NO:1001-1005的氨基酸序列。在一些实施方案中,位置11处的氨基酸是L、M、S、V或W。在一些实施方案中,位置37处的氨基酸是F、Y、H、I、L或V。在一些实施方案中,位置44处的氨基酸是G、E、A、D、Q、R、S或L。在一些实施方案中,位置45处的氨基酸是L、R、C、I、L、P、Q或V。在一些实施方案中,位置47处的氨基酸是W、L、F、A、G、I、M、R、S、V或Y。在一些实施方案中,位置83处的氨基酸是R、K、N、E、G、I、M、Q或T。在一些实施方案中,位置84处的氨基酸是P、A、L、R、S、T、D或V。在一些实施方案中,氨基酸位置103是W、P、R或S;104是G或D。在一些实施方案中,位置108处的氨基酸是Q、L或R。

[0591] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US2011/0271358和W02010/036959中所公开的抗PD-1抗体或其片段中的任一者,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含选自US2011/0271358的SEQ ID No:25-29的氨基酸序列:US2011/0271358的SEQ ID No:25 (SEQ ID NO:1006);US2011/0271358的SEQ ID No:26 (SEQ ID NO:1007);US2011/0271358的SEQ ID No:27 (SEQ ID NO:1008);US2011/0271358的SEQ ID No:28 (SEQ ID NO:1009);US2011/0271358的SEQ ID No:29 (SEQ ID NO:1010);和/或轻链,所述轻链包含选自US2011/0271358的SEQ ID No:30-33的氨基酸序列:US2011/0271358的SEQ ID No:30 (SEQ ID NO:1011);US2011/0271358的SEQ ID No:31 (SEQ ID NO:1012);US2011/0271358的SEQ ID No:32 (SEQ ID NO:1013);或US2011/0271358的SEQ ID No:33 (SEQ ID NO:1014)。

[0592] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含一个或多个选自TSR-042 (Tesaro, Inc.)、REGN2810 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)、PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) 和BGB-A317 (BeiGene Ltd.) 的针对PD-1的抗体或其抗体片段。

[0593] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂具有一个或多个针对PD-L1的靶向部分。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂具有一个或多个选择性结合PD-L1多肽的靶向部分。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含一个或多个选择性地结合PD-L1多肽的抗体、抗体衍生物或形式、肽或多肽或者融合蛋白。在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含下文所公开的一种或多种PD-1结合剂连同本文所公开的一种或多种信号传导剂。

[0594] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含抗PD-L1抗体MEDI4736 (又名度伐鲁单抗 (durvalumab)) 或其片段。MEDI4736对PD-L1具有选择性,并且阻断PD-L1与PD-1和CD80受体的结合。用于本文提供的方法中的MEDI4736及其抗原结合片段包含重链和轻链或重链可变区和轻链可变区。MEDI4736的序列公开于W0/2016/06272中,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的MEDI4736或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1015的重链和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1016的轻

链。

[0595] 在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的MEDI4736或其抗原结合片段包含含有的氨基酸序列即W0/2016/06272的SEQ ID NO:4(SEQ ID NO:1017)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0/2016/06272的SEQ ID NO:3(SEQ ID NO:1018)的轻链可变区。

[0596] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含抗PD-L1抗体阿特朱单抗(atezolizumab)(又名MPDL3280A、RG7446)或其片段。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的阿特朱单抗或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1019的重链和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1020的轻链。

[0597] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含抗PD-L1抗体阿维鲁单抗(avelumab)(又名MSB0010718C)或其片段。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的阿维鲁单抗或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1021的重链和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1022的轻链。

[0598] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体BMS-936559(又名12A4、MDX-1105)或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的BMS-936559或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1023的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1024的轻链可变区。

[0599] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体3G10或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的3G10或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1025的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1026的轻链可变区。

[0600] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体10A5或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的10A5或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1027的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1028的轻链可变区。

[0601] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体5F8或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的5F8或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1029的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1030的轻链可变区。

[0602] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体10H10或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的10H10或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1031的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1032的轻链可变区。

[0603] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体1B12或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的1B12或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1033的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1034的轻链可变区。

[0604] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体7H1或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明

性实施方案中,用于本文提供的方法中的7H1或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1035的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1036的轻链可变区。

[0605] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体11E6或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的11E6或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1037的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1038的轻链可变区。

[0606] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体12B7或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的12B7或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1039的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1040的轻链可变区。

[0607] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2013/0309250和W02007/005874中所公开的抗PD-L1抗体13G4或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的13G4或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1041的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1042的轻链可变区。

[0608] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-L1抗体1E12或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的1E12或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1043的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1044的轻链可变区。

[0609] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-L1抗体1F4或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的1F4或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1045的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1046的轻链可变区。

[0610] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-L1抗体2G11或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2G11或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1047的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1048的轻链可变区。

[0611] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738中所公开的抗PD-L1抗体3B6或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的3B6或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1049的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1050的轻链可变区。

[0612] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US 2014/0044738和W02012/145493中所公开的抗PD-L1抗体3D10或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的3D10或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1051的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1052的轻链可变区。

[0613] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US2011/0271358和W02010/036959中所公开的抗PD-L1抗体中的任一者,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含选自US2011/0271358的SEQ ID No:34-38的氨基酸序列;US2011/0271358的SEQ ID No:34(SEQ ID NO:1053);US2011/0271358的SEQ ID No:35(SEQ ID NO:1054);US2011/0271358的SEQ

ID No:36 (SEQ ID NO:1055);US2011/0271358的SEQ ID No:37 (SEQ ID NO:1056);US2011/0271358的SEQ ID No:38 (SEQ ID NO:1057);和/或轻链,所述轻链包含选自US2011/0271358的SEQ ID No:39-42的氨基酸序列;US2011/0271358的SEQ ID No:39 (SEQ ID NO:1058);US2011/0271358的SEQ ID No:40 (SEQ ID NO:1059);US2011/0271358的SEQ ID No:41 (SEQ ID NO:1060);或US2011/0271358的SEQ ID No:42 (SEQ ID NO:1061)。

[0614] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体2.7A4或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2.7A4或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:2 (SEQ ID NO:1062)的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID No:1063的轻链可变区。

[0615] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体2.9D10或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2.9D10或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:12 (SEQ ID NO:1064)的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID No:1065的轻链可变区。

[0616] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体2.14H9或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2.14H9或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:22 (SEQ ID NO:1066)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:27 (SEQ ID NO:1067)的轻链可变区。

[0617] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体2.20A8或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2.20A8或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:32 (SEQ ID NO:1068)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:37 (SEQ ID NO:1069)的轻链可变区。

[0618] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体3.15G8或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的3.15G8或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:42 (SEQ ID NO:1070)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:47 (SEQ ID NO:1071)的轻链可变区。

[0619] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体3.18G1或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的3.18G1或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:52 (SEQ ID NO:1072)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:57 (SEQ ID NO:1073)的轻链可变区。

[0620] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353以及US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体2.7A40PT或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2.7A40PT或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:62(SEQ ID NO:1074)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:67(SEQ ID NO:1075)的轻链可变区。

[0621] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如W0 2011/066389、US8,779,108和US2014/0356353中所公开的抗PD-L1抗体2.14H90PT或其片段,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的2.14H90PT或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:72(SEQ ID NO:1076)的重链可变区和/或含有氨基酸序列即W0 2011/066389的SEQ ID No:77(SEQ ID NO:1077)的轻链可变区。

[0622] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含W02016/061142中公开的抗PD-L1抗体中的任一者,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含选自W02016/061142的SEQ ID No:18、30、38、46、50、54、62、70和78的氨基酸序列:W02016/061142的SEQ ID No:18(SEQ ID NO:1078);W02016/061142的SEQ ID No:30(SEQ ID NO:1079);W02016/061142的SEQ ID No:38(SEQ ID NO:1080);W02016/061142的SEQ ID No:46(SEQ ID NO:1081);W02016/061142的SEQ ID No:50(SEQ ID NO:1082);W02016/061142的SEQ ID No:54(SEQ ID NO:1083);W02016/061142的SEQ ID No:62(SEQ ID NO:1084);W02016/061142的SEQ ID No:70(SEQ ID NO:1085);W02016/061142的SEQ ID No:78(SEQ ID NO:1086);和/或轻链,所述轻链包含选自W02016/061142的SEQ ID No:22、26、34、42、58、66、74、82和86的氨基酸序列:W02016/061142的SEQ ID No:22(SEQ ID NO:1087);W02016/061142的SEQ ID No:26(SEQ ID NO:1088);W02016/061142的SEQ ID No:34(SEQ ID NO:1089);W02016/061142的SEQ ID No:42(SEQ ID NO:1090);W02016/061142的SEQ ID No:58(SEQ ID NO:1091);W02016/061142的SEQ ID No:66(SEQ ID NO:1092);W02016/061142的SEQ ID No:74(SEQ ID NO:1093);W02016/061142的SEQ ID No:82(SEQ ID NO:1094);或W02016/061142的SEQ ID No:86(SEQ ID NO:1095)。

[0623] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含W02016/022630中公开的抗PD-L1抗体中的任一者,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含选自W02016/022630的SEQ ID No:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42和46的氨基酸序列:W02016/022630的SEQ ID No:2(SEQ ID NO:1096);W02016/022630的SEQ ID No:6(SEQ ID NO:1097);W02016/022630的SEQ ID No:10(SEQ ID NO:1098);W02016/022630的SEQ ID No:14(SEQ ID NO:1099);W02016/022630的SEQ ID No:18(SEQ ID NO:1100);W02016/022630的SEQ ID No:22(SEQ ID NO:1101);W02016/022630的SEQ ID No:26(SEQ ID NO:1102);W02016/022630的SEQ ID No:30(SEQ ID NO:1103);W02016/022630的SEQ ID No:34(SEQ ID NO:1104);W02016/022630的SEQ ID No:38(SEQ ID NO:1105);W02016/022630的SEQ ID No:42(SEQ ID NO:1106);W02016/022630的SEQ ID No:46(SEQ ID NO:1107);和/或轻链,所述轻链包含选自

W02016/022630的SEQ ID No:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44和48的氨基酸序列:W02016/022630的SEQ ID No:4(SEQ ID NO:1108);W02016/022630的SEQ ID No:8(SEQ ID NO:1109);W02016/022630的SEQ ID No:12(SEQ ID NO:1110);W02016/022630的SEQ ID No:16(SEQ ID NO:1111);W02016/022630的SEQ ID No:20(SEQ ID NO:1112);W02016/022630的SEQ ID No:24(SEQ ID NO:1113);W02016/022630的SEQ ID No:28(SEQ ID NO:1114);W02016/022630的SEQ ID No:32(SEQ ID NO:1115);W02016/022630的SEQ ID No:36(SEQ ID NO:1116);W02016/022630的SEQ ID No:40(SEQ ID NO:1117);W02016/022630的SEQ ID No:44(SEQ ID NO:1118);或W02016/022630的SEQ ID No:48(SEQ ID NO:1119)。

[0624] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含W02015/112900中公开的抗PD-L1抗体中的任一者,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含选自W0 2015/112900的SEQ ID No:38、50、82和86的氨基酸序列:W0 2015/112900的SEQ ID No:38(SEQ ID NO:1120);W0 2015/112900的SEQ ID No:50(SEQ ID NO:1121);W0 2015/112900的SEQ ID No:82(SEQ ID NO:1122);W0 2015/112900的SEQ ID No:86(SEQ ID NO:1123);和/或轻链,所述轻链包含选自W0 2015/112900的SEQ ID No:42、46、54、58、62、66、70、74和78的氨基酸序列:W0 2015/112900的SEQ ID No:42(SEQ ID NO:1124);W0 2015/112900的SEQ ID No:46(SEQ ID NO:1125);W0 2015/112900的SEQ ID No:54(SEQ ID NO:1126);W0 2015/112900的SEQ ID No:58(SEQ ID NO:1127);W02015/112900的SEQ ID No:62(SEQ ID NO:1128);W0 2015/112900的SEQ ID No:66(SEQ ID NO:1129);W0 2015/112900的SEQ ID No:70(SEQ ID NO:1130);W0 2015/112900的SEQ ID No:74(SEQ ID NO:1131);或W0 2015/112900的SEQ ID No:78(SEQ ID NO:1132)。

[0625] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含W0 2010/077634和US 8,217,149中公开的抗PD-L1抗体中的任一者,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列即W0 2010/077634的SEQ ID No:20(SEQ ID NO:1133)的重链区和/或含有氨基酸序列即W0 2010/077634的SEQ ID No:21(SEQ ID NO:1134)的轻链可变区。

[0626] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含可获自如US 20120039906中所公开的可在CNCM寄存编号CNCM I-4122、CNCM I-4080和CNCM I-4081下获取的杂交瘤的抗PD-L1抗体中的任一者,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。

[0627] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如例如US 8,907,065和W0 2008/071447中所公开的针对PD-L1的VHH,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,所述针对PD-L1的VHH包含US 8,907,065的SEQ ID No:394-399;US 8,907,065的SEQ ID No:394(SEQ ID NO:1135);US 8,907,065的SEQ ID No:395(SEQ ID NO:1136);US 8,907,065的SEQ ID No:396(SEQ ID NO:1137);US 8,907,065的SEQ ID No:397(SEQ ID NO:1138);US 8,907,065的SEQ ID No:398(SEQ ID NO:1139);或US 8,907,065的SEQ ID No:399(SEQ ID NO:1140)。

[0628] 在一些实施方案中,所述PD-L1靶向部分包含选自在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108(根据Kabat编号)处具有一个或多个取代的SEQ ID NO:1135-1140的氨基酸序列。在一些实施方案中,位置11处的氨基酸是L、M、S、V或W。在一些实施方案中,位置37处

的氨基酸是F、Y、H、I、L或V。在一些实施方案中,位置44处的氨基酸是G、E、A、D、Q、R、S或L。在一些实施方案中,位置45处的氨基酸是L、R、C、I、L、P、Q或V。在一些实施方案中,位置47处的氨基酸是W、L、F、A、G、I、M、R、S、V或Y。在一些实施方案中,位置83处的氨基酸是R、K、N、E、G、I、M、Q或T。在一些实施方案中,位置84处的氨基酸是P、A、L、R、S、T、D或V。在一些实施方案中,氨基酸位置103是W、P、R或S;104是G或D。在一些实施方案中,位置108处的氨基酸是Q、L或R。

[0629] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂具有一个或多个针对PD-L2的靶向部分。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂具有一个或多个选择性结合PD-L2多肽的靶向部分。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含一个或多个选择性地结合PD-L2多肽的抗体、抗体衍生物或形式、肽或多肽或者融合蛋白。

[0630] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如例如US 8,907,065和WO 2008/071447中所公开的针对PD-L2的VHH,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,所述针对PD-1的VHH包含US 8,907,065的SEQ ID No:449-455;US 8,907,065的SEQ ID No:449 (SEQ ID NO:1141);US 8,907,065的SEQ ID No:450 (SEQ ID NO:1142);US 8,907,065的SEQ ID No:451 (SEQ ID NO:1143);US 8,907,065的SEQ ID No:452 (SEQ ID NO:1144);US 8,907,065的SEQ ID No:453 (SEQ ID NO:1145);US 8,907,065的SEQ ID No:454 (SEQ ID NO:1146);或US 8,907,065的SEQ ID No:455 (SEQ ID NO:1147)。

[0631] 在一些实施方案中,所述PD-L2靶向部分包含选自在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108(根据Kabat编号)处具有一个或多个取代的SEQ ID NO:1141-1147的氨基酸序列。在一些实施方案中,位置11处的氨基酸是L、M、S、V或W。在一些实施方案中,位置37处的氨基酸是F、Y、H、I、L或V。在一些实施方案中,位置44处的氨基酸是G、E、A、D、Q、R、S或L。在一些实施方案中,位置45处的氨基酸是L、R、C、I、L、P、Q或V。在一些实施方案中,位置47处的氨基酸是W、L、F、A、G、I、M、R、S、V或Y。在一些实施方案中,位置83处的氨基酸是R、K、N、E、G、I、M、Q或T。在一些实施方案中,位置84处的氨基酸是P、A、L、R、S、T、D或V。在一些实施方案中,氨基酸位置103是W、P、R或S;104是G或D。在一些实施方案中,位置108处的氨基酸是Q、L或R。

[0632] 在各个实施方案中,所述PD-L2靶向部分包含具有包含至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列的可变结构域的VHH。在各个实施方案中,所述PD-L2结合剂包含具有包含至少一个FR1、FR2、FR3和FR4序列的可变区的VHH。

[0633] 在一些实施方案中,所述PD-L2 CDR1序列选自SEQ ID NO:1148至SEQ ID NO:1154。

[0634] 在一些实施方案中,所述PD-L2 CDR2序列选自SEQ ID NO:1155至SEQ ID NO:1161。

[0635] 在一些实施方案中,所述PD-L2 CDR3序列选自SEQ ID NO:1162至SEQ ID NO:1168。

[0636] 在一个实施方案中,所述靶向部分包含如US2011/0271358和WO2010/036959中所公开的抗PD-L2抗体中的任一者,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在说明性实施方案中,用于本文提供的方法中的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含选自US2011/0271358的SEQ ID No:43-47的氨基酸序列;US2011/0271358的SEQ ID No:43 (SEQ

ID NO:1169);US2011/0271358的SEQ ID No:44(SEQ ID NO:1170);US2011/0271358的SEQ ID No:45(SEQ ID NO:1171);US2011/0271358的SEQ ID No:46(SEQ ID NO:1172);US2011/0271358的SEQ ID No:47(SEQ ID NO:1173);和/或轻链,所述轻链包含选自US2011/0271358的SEQ ID No:48-51的氨基酸序列:US2011/0271358的SEQ ID No:48(SEQ ID NO:1174);US2011/0271358的SEQ ID No:49(SEQ ID NO:1175);US2011/0271358的SEQ ID No:50(SEQ ID NO:1176);或US2011/0271358的SEQ ID No:51(SEQ ID NO:1177)。

[0637] 在各个实施方案中,本发明的靶向部分可以包含与本文公开的序列中的任一者具有至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%同一性(例如,与本文公开的序列中的任一者具有约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%或约100%序列同一性)的靶向PD-1、PD-L1和/或PD-L2的序列。

[0638] 在各个实施方案中,本发明的靶向部分可以包含如本文所公开的靶向PD-1、PD-L1和/或PD-L2的重链、轻链、重链可变区、轻链可变区、互补性决定区(CDR)和框架区序列的任何组合。

[0639] 选择性地结合或靶向PD-1、PD-L1和/或PD-L2的其他抗体、抗体衍生物或形式、肽或多肽或者融合蛋白公开于以下文献中:WO 2011/066389、US 2008/0025980、US 2013/0034559、US 8,779,108、US 2014/0356353、US 8,609,089、US 2010/028330、US 2012/0114649、WO 2010/027827、WO 2011/066342、US 8,907,065、WO 2016/062722、WO 2009/101611、WO2010/027827、WO 2011/066342、WO 2007/005874、WO 2001/014556、US2011/0271358、WO 2010/036959、WO 2010/077634、US 8,217,149、US 2012/0039906、WO 2012/145493、US 2011/0318373、美国专利号8,779,108、US 20140044738、WO 2009/089149、WO 2007/00587、WO 2016061142、WO 2016,02263、WO 2010/077634和WO 2015/112900,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。

[0640] 在各个实施方案中,本发明技术的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含针对信号调控蛋白 $\alpha$ -1(SIRP1 $\alpha$ )的靶向部分。SIRP1 $\alpha$ (也称为SIRP $\alpha$ )属于细胞免疫受体家族,该家族包括抑制性(SIRP $\alpha$ )成员、激活性(SIRP $\beta$ )成员、非信号传导性(SIRP $\gamma$ )成员和可溶性(SIRP $\delta$ )成员。SIRP1 $\alpha$ 主要在髓样细胞上表达,髓样细胞包括巨噬细胞、粒细胞、髓样树突状细胞(DC)、肥大细胞以及它们的前体,包括造血干细胞。SIRP1 $\alpha$ 充当抑制受体,与广泛表达的跨膜糖蛋白CD47相互作用以调控吞噬作用。具体而言,在靶细胞上表达的CD47结合巨噬细胞上的SIRP1 $\alpha$ 可产生负调控所述靶细胞的吞噬作用的抑制信号。

[0641] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分是特异性地识别并结合巨噬细胞上的

SIRP1 $\alpha$ 的靶向部分。

[0642] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分是特异性地识别并结合单核细胞上的SIRP1 $\alpha$ 的靶向部分。

[0643] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分是特异性地识别并结合TAM(肿瘤相关巨噬细胞)上的SIRP1 $\alpha$ 的靶向部分。

[0644] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分是特异性地识别并结合树突状细胞(包括但不限于cDC2和pDC)上的SIRP1 $\alpha$ 的靶向部分。

[0645] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含具有识别SIRP1 $\alpha$ 的识别结构域的靶向部分。在一个实施方案中,所述识别结构域识别SIRP1 $\alpha$ 上存在的一个或多个线性表位。如本文所使用,线性表位是指SIRP1 $\alpha$ 上存在的任何连续氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述识别结构域识别SIRP1 $\alpha$ 上存在的一个或多个构象表位。如本文所使用,构象表位是指形成具有能够被抗原识别结构域识别的特征和/或形状和/或三级结构的三维表面的一个或多个氨基酸区段(可能是不连续的)。

[0646] 在一些实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分可以结合至SIRP1 $\alpha$ 的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体。在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 是人SIRP1 $\alpha$ 。在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分可以结合至人SIRP1 $\alpha$ 的任何形式,包括单体形式、二聚体形式、异二聚体形式、多聚体形式和相关形式。在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分结合至SIRP1 $\alpha$ 的单体形式。在另一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分结合至SIRP1 $\alpha$ 的二聚体形式。

[0647] 在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含识别人SIRP1 $\alpha$ 上存在的一个或多个表位的识别结构域。在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含识别具有信号肽序列的人SIRP1 $\alpha$ 的识别结构域。示例性的具有信号肽序列的人SIRP1 $\alpha$ 多肽是SEQ ID NO:1178。

[0648] 在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含识别没有信号肽序列的人SIRP1 $\alpha$ 的识别结构域。没有信号肽序列的示例性人SIRP1 $\alpha$ 多肽是SEQ ID NO:1179。

[0649] 在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含识别编码人SIRP1 $\alpha$ 同种型2的多肽(SEQ ID NO:1180)的识别结构域。

[0650] 在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含识别编码人SIRP1 $\alpha$ 同种型4的多肽(SEQ ID NO:1181)的识别结构域。

[0651] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分可以是能够特异性结合的任何基于蛋白质的剂,诸如抗体或其衍生物。在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含抗体。在各个实施方案中,抗体是包括两条重链和两条轻链的全长多聚体蛋白。每条重链包括一个可变区(例如V<sub>H</sub>)和至少三个恒定区(例如CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>),并且每条轻链包括一个可变区(V<sub>L</sub>)和一个恒定区(C<sub>L</sub>)。可变区决定了抗体的特异性。每个可变区包括由四个相对保守的框架区(FR)侧接的三个高变区,也称为互补性决定区(CDR)。所述三个CDR(称为CDR1、CDR2和CDR3)有助于抗体结合特异性。在一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,所述抗体是人源化抗体。

[0652] 在一些实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含抗体衍生物或抗体形式。在一些实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分是单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体(scFv)、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白(半胱氨酸结蛋白、打结素(knottin))、

DARPin;四连接素(Tetranectin);Affibody;反式体(Transbody);抗运载蛋白;AdNectin;Affilin;微型体(Microbody);肽适体;奥特瑞斯(alterase);塑性抗体;费洛体(phylomer);斯塔都体(stradobody);巨型体(maxibody);伊维体(evibody);菲诺体(fynomer)、狢狢重复蛋白、库尼茨型结构域(Kunitz domain)、高亲合性多聚体(avimer)、阿特里体(atrimer)、普罗体(probody)、免疫体(immunobody)、曲奥单抗(triomab)、特洛伊体(troybody);佩普体(pepbody);疫苗体(vaccibody)、单特异性体(UniBody);Affimer、双特异性体(DuoBody)、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、肽模拟分子或合成分子,如以下美国专利号或专利公布号中所描述:US 7,417,130、US 2004/132094、US 5,831,012、US 2004/023334、US 7,250,297、US 6,818,418、US 2004/209243、US 7,838,629、US 7,186,524、US 6,004,746、US 5,475,096、US 2004/146938、US 2004/157209、US 6,994,982、US 6,794,144、US 2010/239633、US 7,803,907、US 2010/119446和/或US 7,166,697,所述专利的内容特此以引用方式整体并入。还参见Storz MAbs.2011年5月-6月;3(3):310-317。

[0653] 在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含单结构域抗体,诸如来自例如产生VHH抗体的生物体(诸如骆驼、鲨鱼)的VHH,或者设计的VHH。VHH是抗体来源的治疗性蛋白质,它们含有天然存在的重链抗体的独特结构和功能性质。VHH技术是基于来自骆驼的缺乏轻链的完全功能抗体。这些重链抗体含有单个可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。

[0654] 在一个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含VHH。在一些实施方案中,所述VHH是人源化VHH或骆驼化VHH。

[0655] 在一些实施方案中,所述VHH包含完全人V<sub>H</sub>结构域,例如HUMABODY (Crescendo Biologics, Cambridge, UK)。在一些实施方案中,完全人V<sub>H</sub>结构域(例如HUMABODY)是单价、二价或三价的。在一些实施方案中,所述完全人V<sub>H</sub>结构域(例如HUMABODY)是单特异性或多特异性的,诸如单特异性、双特异性或三特异性的。说明性的完全人V<sub>H</sub>结构域(例如HUMABODY)描述于例如W02016/113555和W02016/113557中,所述文献的全部内容以引用方式并入。

[0656] 举例来说,在一些实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含一个或多个选择性地结合SIRP1 $\alpha$ 的抗体、抗体衍生物或形式、肽或多肽、VHH或融合蛋白。在一些实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含特异性地结合至SIRP1 $\alpha$ 的抗体或其衍生物。在一些实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分是特异性地结合至SIRP1 $\alpha$ 的骆驼重链抗体(VHH)。

[0657] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分可以包含已知识别并结合至SIRP1 $\alpha$ 的重链、轻链、重链可变区、轻链可变区、互补性决定区(CDR)和框架区序列的任何组合。

[0658] 在各个实施方案中,本发明技术设想使用本文所描述的SIRP1 $\alpha$ 靶向部分的任何天然或合成的类似物、突变体、变体、等位基因、同系物和直系同源物(本文中统称为“类似物”)。在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分的氨基酸序列还包括氨基酸类似物、氨基酸衍生物或其他非经典氨基酸。

[0659] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含相对于已知识别并结合至SIRP1 $\alpha$ 的任何靶向部分序列具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分包含相对于已知识别并结合至SIRP1 $\alpha$ 的任何靶向部分序列具有一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个、或七个、或八个、或九个、或十个、或十五个、二十个、三

十个、四十个或五十个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0660] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0661] 可以例如基于在所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲特性方面的相似性进行“保守取代”。20种天然存在的氨基酸可以分组至以下六个标准氨基酸组中:(1) 疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3) 酸性:Asp、Glu;(4) 碱性:His、Lys、Arg;(5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;以及(6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0662] 如本文所使用,“保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组中的同一组内所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。举例来说,Asp交换为Glu使得经如此修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,基于甘氨酸和脯氨酸能够破坏 $\alpha$ 螺旋,它们可以彼此取代。

[0663] 如本文所使用,“非保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组(1)至(6)中的不同组中所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。

[0664] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸。示例性的非经典氨基酸大体上包括但不限于硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸 $\beta$ -丙氨酸、GABA和 $\delta$ -氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 $\gamma$ -Abu、 $\epsilon$ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如 $\beta$ 甲基氨基酸、C $\alpha$ -甲基氨基酸、N $\alpha$ -甲基氨基酸和氨基酸类似物。

[0665] 在各个实施方案中,氨基酸突变可以在靶向部分的CDR(例如,CDR1区、CDR2区或CDR3区)中。在另一个实施方案中,氨基酸变化可以在靶向部分的框架区(FR)(例如,FR1区、FR2区、FR3区或FR4区)中。

[0666] 可以使用本领域中的任何已知技术,例如定点诱变或基于PCR的诱变来实现对氨基酸序列的修饰。此类技术描述于例如以下文献中:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Plainview,N.Y.,1989和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y.,1989。

[0667] 在各个实施方案中,所述突变基本上不降低所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分特异性地识别并结合至SIRP1 $\alpha$ 的能力。在各个实施方案中,所述突变基本上不降低所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分特异性地结合至SIRP1 $\alpha$ 并且不在功能上调节(例如,部分或完全中和)SIRP1 $\alpha$ 的能力。

[0668] 在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分结合目标抗原但不在功能性上调节目标抗原,即SIRP1 $\alpha$ 。举例来说,在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分仅仅靶向所述抗原但基本上不在功能上调节(例如,基本上抑制、降低或中和)所述抗原具有的生物效应。在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分结合在物理上与对抗原的生物活性重要的抗原位点(例如,抗原的活性位点)隔开的表位。

[0669] 在其他实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分结合目标抗原并在功能性上调节目标抗原,即SIRP1 $\alpha$ 。举例来说,在各个实施方案中,所述SIRP1 $\alpha$ 靶向部分靶向所述抗原(即SIRP1 $\alpha$ )但不在功能上调节(例如,抑制、降低或中和)所述抗原具有的生物效应。此类伴有功能调

节的结合可用于本发明的各个实施方案中,包括使用本发明的嵌合蛋白经由效应抗原将活性免疫细胞直接或间接地募集至所需位点的方法。

[0670] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有特异性地结合至例如DC上的XCR1的抗原识别结构域的靶向部分。在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂包含具有包含XCL1的全部或部分的抗原识别结构域的靶向部分。

[0671] 在各个实施方案中,本发明的多特异性PD-1或PD-L1结合剂存在具有特异性地结合至作为非细胞结构的一部分的靶标(例如抗原、受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述抗原或受体不是完整细胞或细胞结构的组成组分。在一些实施方案中,所述抗原或受体是细胞外抗原或受体。在一些实施方案中,所述靶标是非蛋白质非细胞标记物,包括但不限于核酸,包括DNA或RNA,诸如例如从坏死的肿瘤细胞或细胞外沉积物诸如胆固醇释放的DNA。

[0672] 在一些实施方案中,目标靶标(例如抗原、受体)是基质或细胞外基质(ECM)的非细胞组分的一部分或与所述非细胞组分相关的标记物。如本文所使用,基质是指组织或器官的连接和支撑构架。基质可以包括细胞诸如成纤维细胞/成肌纤维细胞、神经胶质、上皮、脂肪、免疫、血管、平滑肌和免疫细胞以及细胞外基质(ECM)和细胞外分子的汇集。在各个实施方案中,目标靶标(例如抗原、受体)是基质诸如细胞外基质和细胞外分子的非细胞组分的一部分。如本文所使用,ECM是指所有组织和器官内存在的非细胞组分。ECM是由生物化学上独特的组分,包括但不限于蛋白质、糖蛋白、蛋白聚糖和多糖的大集合构成。ECM的这些组分通常由相邻的细胞产生并且经由胞吐作用分泌至ECM中。一旦分泌后,ECM组分便往往聚集而形成复杂的巨分子网状结构。在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含识别位于ECM的任何组分上的靶标(例如抗原或受体或非蛋白质分子)的靶向部分。ECM的说明性组分包括但不限于蛋白聚糖、非蛋白聚糖多糖、纤维和其他ECM蛋白质或ECM非蛋白质,例如多糖和/或脂质,或ECM相关分子(例如蛋白质或非蛋白质,例如多糖、核酸和/或脂质)。

[0673] 在一些实施方案中,所述靶向部分识别ECM蛋白聚糖上的靶标(例如抗原、受体)。蛋白聚糖是糖基化的蛋白质。碱性蛋白聚糖单元包括具有一个或多个共价附接的糖胺聚糖(GAG)链的核心蛋白质。蛋白聚糖具有净负电荷,由此吸引带正电的钠离子(Na<sup>+</sup>),后者经由渗透作用吸引水分子,从而保持ECM和驻留细胞含水。蛋白聚糖还可能有助于捕获和存储ECM内的生长因子。本发明的嵌合蛋白可以靶向的说明性蛋白聚糖包括但不限于硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素和硫酸角质素。在一个实施方案中,所述靶向部分识别非蛋白聚糖多糖诸如透明质酸上的靶标(例如抗原、受体)。

[0674] 在一些实施方案中,所述靶向部分识别ECM纤维上的靶标(例如抗原、受体)。ECM纤维包括胶原蛋白纤维和弹性蛋白纤维。在一些实施方案中,所述靶向部分识别胶原蛋白或胶原蛋白纤维上的一个或多个表位。胶原蛋白是ECM中最丰富的蛋白质。胶原蛋白呈纤维状蛋白形式存在于ECM中并且提供结构支撑以驻留细胞。在一个或多个实施方案中,所述靶向部分识别并且结合至ECM内存在的各种类型的胶原蛋白,包括但不限于纤维状胶原蛋白(I型、II型、III型、V型、XI型)、间杂有三螺旋的原纤维相关的胶原蛋白(facit collagen)(IX型、XII型、XIV型)、短链胶原蛋白(VIII型、X型)、基底膜胶原蛋白(IV型)和/或VI型、VII型或XIII型胶原蛋白。弹性蛋白纤维给组织提供弹性,允许它们在需要时拉伸然后回到它们的原始状态。在一些实施方案中,所述靶向部分识别弹性蛋白或弹性蛋白纤维上的一个或

多个表位。

[0675] 在一些实施方案中,所述靶向部分识别一种或多种ECM蛋白质,包括但不限于肌腱蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、层粘连蛋白(laminin)或巢蛋白(nidogen)/内联蛋白(entactin)。

[0676] 在一个实施方案中,所述靶向部分识别并结合至肌腱蛋白。肌腱蛋白(TN)家族的糖蛋白包括至少四个成员,即肌腱蛋白C、肌腱蛋白R、肌腱蛋白X和肌腱蛋白W。肌腱蛋白的一级结构包括若干个普通基序,所述基序按顺序处于同一连续序列中:氨基端七价重复序列、表皮生长因子(EGF)样重复序列、纤连蛋白III型结构域重复序列和羧基端纤维蛋白原样球形结构域。每一个蛋白质成员与EGF样重复序列和纤连蛋白III型重复序列的数目和特性的典型变异相关。同种型变体还特别相对于肌腱蛋白C存在。已知肌腱蛋白C的超过27种剪接变体和/或同种型。在一个特定实施方案中,所述靶向部分识别并结合至肌腱蛋白CA1。类似地,肌腱蛋白R还具有不同的剪接变体和同种型。肌腱蛋白R通常呈二聚体或三聚体形式存在。肌腱蛋白X是肌腱蛋白家族中最大的成员,并且已知呈三聚体形式存在。肌腱蛋白W呈三聚体形式存在。在一些实施方案中,所述靶向部分识别肌腱蛋白上的一个或多个表位。在一些实施方案中,所述靶向部分识别肌腱蛋白的单体和/或二聚体和/或三聚体和/或六聚体形式。

[0677] 在一个实施方案中,所述靶向部分识别并结合至纤连蛋白。纤连蛋白是连接细胞与ECM中的胶原蛋白纤维,从而允许细胞移动通过ECM的糖蛋白。在结合至整合素后,纤连蛋白展开从而形成功能二聚体。在一些实施方案中,所述靶向部分识别纤连蛋白的单体和/或二聚体形式。在一些实施方案中,所述靶向部分识别纤连蛋白上的一个或多个表位。在说明性实施方案中,所述靶向部分识别纤连蛋白细胞外结构域A(EDA)或纤连蛋白细胞外结构域B(EDB)。EDA水平升高与各种疾病和病症相关,所述疾病和病症包括牛皮癣、类风湿性关节炎、糖尿病和癌症。在一些实施方案中,所述靶向部分识别含有EDA同种型的纤连蛋白,并且可以用于使所述嵌合蛋白靶向病变细胞,包括癌细胞。在一些实施方案中,所述靶向部分识别含有EDB同种型的纤连蛋白。在各个实施方案中,此类靶向部分可以用于使所述嵌合蛋白靶向肿瘤细胞,包括肿瘤新生血管。

[0678] 在一个实施方案中,所述靶向部分识别并结合至纤维蛋白。纤维蛋白是ECM的基质网状结构中经常发现的另一种蛋白质物质。纤维蛋白是由于纤维蛋白原上引起纤维蛋白聚合的蛋白酶凝血酶的作用而形成。在一些实施方案中,所述靶向部分识别纤维蛋白上的一个或多个表位。在一些实施方案中,所述靶向部分识别纤维蛋白的单体以及聚合形式。

[0679] 在一个实施方案中,所述靶向部分识别并结合至层粘连蛋白。层粘连蛋白是基层的主要组分,所述基层是细胞和器官的蛋白质网状结构的基础。层粘连蛋白是含有 $\alpha$ 链、 $\beta$ 链和 $\gamma$ 链的异源三聚体蛋白。在一些实施方案中,所述靶向部分识别层粘连蛋白上的一个或多个表位。在一些实施方案中,所述靶向部分识别层粘连蛋白的单体、二聚体以及三聚体形式。

[0680] 在一个实施方案中,所述靶向部分识别并结合至巢蛋白或内联蛋白。巢蛋白/内联蛋白是高度保守的硫酸化糖蛋白家族。它们组成了基底膜的主要结构组分,并且功能是连接基底膜中的层粘连蛋白与胶原蛋白IV网状结构。这个家族的成员包括巢蛋白-1和巢蛋白-2。在各个实施方案中,所述靶向部分识别巢蛋白-1和/或巢蛋白-2上的表位。

[0681] 在各个实施方案中,所述靶向部分包含识别本文所描述的靶标(例如ECM蛋白质)中的任一者上存在的表位的抗原识别结构域。在一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别所述蛋白质上存在的一个或多个线性表位。如本文所使用,线性表位是指所述蛋白质上存在的任何连续氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别所述蛋白质上存在的一个或多个构象表位。如本文所使用,构象表位是指形成具有能够被抗原识别结构域识别的特征和/或形状和/或三级结构的三维表面的一个或多个氨基酸区段(可能是不连续的)。

[0682] 在各个实施方案中,所述靶向部分可以结合至本文所描述的靶标(例如ECM蛋白质)中的任一者的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体。在各个实施方案中,所述靶向部分可以结合至本文所描述的蛋白质的任何形式,包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、异源二聚体、多聚体和缔合形式。在各个实施方案中,所述靶向部分可以结合至本文所描述的蛋白质的任何翻译修饰后的形式,诸如糖基化和/或磷酸化形式。

[0683] 在各个实施方案中,所述靶向部分包含识别细胞外分子诸如DNA的抗原识别结构域。在一些实施方案中,所述靶向部分包含识别DNA的抗原识别结构域。在一个实施方案中,所述DNA从坏死或凋亡的肿瘤细胞或其他病变细胞脱落至细胞外间隙中。

[0684] 在各个实施方案中,所述靶向部分包含识别一个或多个与动脉粥样硬化斑块相关的非细胞结构的抗原识别结构域。已知两种类型的动脉粥样硬化斑块。纤维脂质(纤维脂肪)斑块的特征是载满脂质的细胞积聚在动脉内膜下面。内皮下面有覆盖所述斑块的动脉粥样化核心的纤维帽。所述核心包括具有升高的组织胆固醇和胆固醇酯含量的载满脂质的细胞(巨噬细胞和平滑肌细胞)、纤维蛋白、蛋白聚糖、胶原蛋白、弹性蛋白和细胞碎屑。在晚期斑块中,所述斑块的中心核心通常含有细胞外胆固醇沉积物(从死细胞释放),所述细胞外胆固醇沉积物形成具有中空针样裂缝的胆固醇晶体的区域。在所述斑块外围是较年轻的泡沫状细胞和毛细血管。纤维性斑块还局部化在内膜下、在动脉壁内,从而引起壁变厚和膨胀,并且有时引起内腔的多斑局部化变窄与一定程度的肌肉层萎缩。纤维性斑块含有胶原蛋白纤维(嗜酸性),使钙(嗜苏木精性)和载满脂质的细胞沉淀。在一些实施方案中,所述靶向部分识别并结合至这些斑块的一种或多种非细胞组分,诸如纤维蛋白、蛋白聚糖、胶原蛋白、弹性蛋白、细胞碎屑和钙或其他无机沉积物或沉淀物。在一些实施方案中,所述细胞碎屑是从死细胞释放的核酸,例如DNA或RNA。

[0685] 在各个实施方案中,所述靶向部分包含识别与神经退行性疾病相关的脑斑块中发现的一个或多个非细胞结构的抗原识别结构域。在一些实施方案中,所述靶向部分识别并结合至位于阿尔茨海默氏病患者脑中发现的淀粉样斑块中的一个或多个非细胞结构。举例来说,所述靶向部分可以识别并且结合至作为淀粉样斑块的主要组分的肽淀粉样 $\beta$ 。在一些实施方案中,所述靶向部分识别并结合至位于亨廷顿氏病患者中发现的脑斑块中的一个或多个非细胞结构。在各个实施方案中,所述靶向部分识别并结合至与其他神经退行性或肌肉骨骼疾病诸如路易体痴呆和包涵体肌炎相关的斑块中发现的一个或多个非细胞结构。接头和官能团

[0686] 在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂可以包括一个或多个官能团、残基或部分。在各个实施方案中,所述一个或多个官能团、残基或部分连接或基因融合至本文所描

述的信号传导剂或靶向部分中的任一者。在一些实施方案中,此类官能团、残基或部分赋予本发明的PD-1或PD-L1结合剂以一种或多种所期望的性质或功能性。此类官能团和用于将它们引入至PD-1或PD-L1结合剂中的技术的实例在本领域中是已知的,举例来说,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.(1980)。

[0687] 在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂可以通过与另一种剂缀合和/或融合以延长半衰期或以其他方式改善药效学和药物动力学性质。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂可以与PEG、XTEN(例如呈rPEG形式)、聚唾液酸(POLYXEN)、白蛋白(例如,人血清白蛋白或HAS)、弹性蛋白样蛋白(ELP)、PAS、HAP、GLK、CTP、转铁蛋白等等中的一者或者融合或缀合。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂可以与抗体或抗体片段诸如Fc片段融合或缀合。举例来说,所述嵌合蛋白可以融合至人免疫球蛋白(Ig)G的Fc结构域的N端或C端。在各个实施方案中,个别嵌合蛋白中的每一者与BioDrugs(2015)29:215-239中描述的剂中的一者或者融合,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0688] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含合适的药理学上可接受的聚合物,诸如聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(诸如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。在一些实施方案中,PEG部分的连接增加半衰期和/或降低PD-1或PD-L1结合蛋白的免疫原性。一般来说,可以使用聚乙二醇化的任何合适的形式,诸如本领域中用于抗体和抗体片段的聚乙二醇化(包括但不限于单结构域抗体,诸如VHH);参见例如Chapman,Nat.Biotechnol.,54,531-545(2002);Veronese和Harris,Adv.Drug Deliv.Rev.54,453-456(2003);Harris和Chess,Nat.Rev.Drug.Discov.,2,(2003)和W004060965,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。用于蛋白质的聚乙二醇化的各种试剂还可以得自市面,例如,得自美国的Nektar Therapeutics。在一些实施方案中,使用定点聚乙二醇化,具体来说,经由半胱氨酸残基(参见例如Yang等人,Protein Engineering,16,10,761-770(2003),所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。举例来说,出于这个目的,PEG可以连接至本发明的PD-1或PD-L1结合剂中天然存在的半胱氨酸残基。在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂经过修饰以便适当地引入一个或多个供连接PEG用的半胱氨酸残基,或者包含一个或多个供连接PEG用的半胱氨酸残基的氨基酸序列可以使用本领域中已知的技术融合至所述PD-1或PD-L1结合剂的氨基和/或羧基端。

[0689] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含N连接或O连接的糖基化。在一些实施方案中,引入所述N连接或O连接的糖基化作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分。

[0690] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含一个或多个可检测标记或其他信号产生基团或部分。合适的标记和适用于连接、使用和检测它们的技术在本领域中是已知的,并且包括但不限于荧光标记(诸如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红素、藻青素、别藻蓝素、邻苯二甲醛以及荧光胺和荧光金属诸如Eu或其他镧系金属)、磷光标记、化学发光标记或生物发光标记(诸如鲁米那(luminal)、异鲁米诺(isoluminol)、热性吖啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶盐、草酸酯、二氧杂环丁烷或GFP以及它们的类似物)、放射性同位素、金属、金属螯合物或金属阳离子或者特别适用于体内、体外或原位诊断和成像的其他金属或金属阳离子,以及发色团和酶(诸如苹果酸脱氢酶、葡萄糖菌核酸酶、 $\delta$ -V-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、生物素亲和

素过氧化物酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、催化酶、葡萄糖-VI-磷酸脱氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰化胆碱脂酶)。其他合适的标记包括可以使用NMR或ESR光谱加以检测的部分。本发明的此类标记的VHH和多肽可以例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定,诸如ELISA,RIA、EIA和其他“夹心测定”等)以及体内诊断和成像目的,取决于对具体标记的选择。

[0691] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含附接或基因融合至所述PD-1或PD-L1结合剂的标签。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂可以包括单个标签或多个标签。举例来说,所述标签是不抑制或防止PD-1或PD-L1结合剂与PD-1或PD-L1或任何其他目标抗原诸如肿瘤抗原的结合的肽、糖或DNA分子。在各个实施方案中,所述标签是至少约:三个至五个氨基酸长、五个至八个氨基酸长、八个至十二个氨基酸长、十二个至十五个氨基酸长或十五个至二十个氨基酸长。说明性标签描述于诸如美国专利公布号US2013/0058962。在一些实施方案中,所述标签是亲和力标签,诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸(His)标签。在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含His标签。

[0692] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含螯合基团,例如,以螯合金属或金属阳离子之一。合适的螯合基团例如包括但不限于二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0693] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含作为特异性结合对,诸如生物素-(链霉)亲和素结合对的一个部分的官能团。这种官能团可以用来连接本发明的PD-1或PD-L1结合剂与跟所述结合对的另一半结合(即,通过形成结合对)的另一个蛋白质、多肽或化学化合物。举例来说,本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以缀合至生物素,并且连接至与亲和素或链霉亲和素缀合的另一个蛋白质、多肽、化合物或载体。举例来说,这种缀合的PD-1或PD-L1结合剂可以用作例如诊断系统中的报告子,其中可检测信号产生剂缀合至亲和素或链霉亲和素。此类结合对还可以例如用于使PD-1或PD-L1结合剂结合至载体,包括适用于药物目的的载体。一个非限制性实例是Cao和Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000) 描述的脂质体制剂。此类结合对还可以用于连接治疗活性剂与本发明的PD-1或PD-L1结合剂。

[0694] 在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂任选地包含一个或多个接头。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包括连接各结合区和/或靶向部分的接头。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包括连接各信号传导剂和靶向部分(或者在存在超过一个靶向部分时将信号传导剂连接至所述靶向部分之一)的接头。在一些实施方案中,所述接头可以用于连接如本文所描述的各种官能团、残基或部分与PD-1或PD-L1结合剂。在一些实施方案中,所述接头是不影响或降低结合区和结合蛋白的稳定性、取向、结合、中和和/或清除率特征的单个氨基酸或多个氨基酸。在各个实施方案中,所述接头选自肽、蛋白质、糖或核酸。

[0695] 在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂包含连接所述靶向部分和所述信号传导剂的接头。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含处于所述信号传导剂内的接头(例如,在单链TNF的情况下,所述嵌合蛋白可以包含两个接头以产生三聚体)。

[0696] 本发明设想多种接头序列的用途。在各个实施方案中,所述接头可以来源于天然存在的多结构域蛋白或者是如例如以下文献中描述的经验接头:Chichili等人, (2013),

Protein Sci.22(2):153-167;Chen等人,(2013),Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,可以使用接头设计数据库和计算机程序,诸如以下文献中描述的那些来设计所述接头:Chen等人,(2013),Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369和Crasto等人,(2000),Protein Eng.13(5):309-312,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在各个实施方案中,所述接头可以是功能性的。举例来说但不限于,所述接头可以发挥功能以改善本发明的PD-1或PD-L1结合剂的折叠和/或稳定性,改善表达,改善药物动力学,并且/或者改善生物活性。

[0697] 在一些实施方案中,所述接头是多肽。在一些实施方案中,所述接头少于约100个氨基酸长。举例来说,所述接头可以是少于约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸长。在一些实施方案中,所述接头是多肽。在一些实施方案中,所述接头超过约100个氨基酸长。举例来说,所述接头可以是超过约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸长。在一些实施方案中,所述接头是柔性的。在另一个实施方案中,所述接头是刚性的。

[0698] 在一些实施方案中,所述接头长度允许靶向部分和信号传导剂与其受体的有效结合。举例来说,在一些实施方案中,所述接头长度允许所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的有效结合以及另一个靶向部分与另一个细胞的有效结合。本文其他部分提供了说明性细胞对。

[0699] 在一些实施方案中,所述接头长度至少等于所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的结合位点之间的最小距离。在一些实施方案中,所述接头长度是所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的结合位点之间的最小距离的至少两倍、或三倍、或四倍、或五倍、或十倍、或二十倍、或25倍、或50倍、或一百倍、或更多倍。

[0700] 在一些实施方案中,一个接头将两个靶向部分彼此连接并且这种接头具有较短长度,而一个接头连接靶向部分和信号传导剂,这种接头比连接两个靶向部分的接头更长。举例来说,连接两个靶向部分的接头与连接靶向部分和信号传导剂的接头之间的氨基酸长度差异可以是约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头是柔性的。在另一个实施方案中,所述接头是刚性的。

[0701] 在各个实施方案中,所述接头基本上由甘氨酸和丝氨酸残基构成(例如约30%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%、或约95%、或约97%甘氨酸和丝氨酸)。举例来说,在一些实施方案中,所述接头是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ,其中n是约1至约8,例如1、2、3、4、5、6、7或8 (SEQ ID NO:1182-1189)。在一个实施方案中,所述接头序列是GGSGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1190)。其他说明性接头包括但不限于具有序列LE、GGGGS (SEQ ID NO:1182)、 $(\text{GGGGS})_n$  (n=1-4) (SEQ ID NOs:1182-1185)、 $(\text{Gly})_8$  (SEQ ID NO:1191)、 $(\text{Gly})_6$  (SEQ ID NO:1192)、 $(\text{EAAAK})_n$  (n=1-3) (SEQ ID NOs:1193-1195):A(EAAAK)

$_n$ A (n=2-5) (SEQ ID NOs:1196-1199)、AEAAAKEAAAKA (SEQ ID NO:1196)、A(EAAAK) $_4$ ALEA (EAAAK) $_4$ A (SEQ ID NO:1200)、PAPAP (SEQ ID NO:1201)、KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:1202)、EGKSSSGSGSESKST (SEQ ID NO:1203)、GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:1204) 和 (XP) $_n$  的接头, 其中X表示任何氨基酸, 例如Ala、Lys或Glu。在各个实施方案中, 所述接头是 (GGG) $_n$  (n=1-20) (SEQ ID NO:1205-SEQ ID NO:1224)。在一些实施方案中, 所述接头是G。在一些实施方案中, 所述接头是AAA。在一些实施方案中, 所述接头是 (GGGG) $_n$  (n=9-20) (SEQ ID NOs:1225-1236)。

[0702] 在一些实施方案中,所述接头是GGGSE (SEQ ID NO:1237)、GSESG (SEQ ID NO:1238)、GSEGS (SEQ ID NO:1239)、GEGGS GEGSS GEGSSS SEGGG SEGGG SEGGG SEGGG (SEQ ID NO:1240) 和每4个氨基酸间隔随机放置G、S和E的接头中的一者或多者。

[0703] 在一些实施方案中,所述接头是抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE,包括子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及IgA1和IgA2))的铰链区。在各个实施方案中,所述接头是抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE,包括子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及IgA1和IgA2))的铰链区。IgG、IgA、IgD和IgE类抗体中发现的铰链区充当柔性间隔基,从而允许Fab部分在空间中自由移动。与恒定区相反,所述铰链结构域在结构上具有多样性,在序列和长度方面都因免疫球蛋白类别和子类而各异。举例来说,铰链区的长度和柔性因IgG子类而各异。IgG1的铰链区涵盖氨基酸216-231,而且因为它自由灵活,Fab片段可以关于其对称轴旋转并且在以两个重链间二硫桥中的第一个为中心的球体内移动。IgG2具有比IgG1短的铰链,具有12个氨基酸残基和四个二硫桥。IgG2的铰链区缺乏甘氨酸残基,相对较短,并且含有通过额外的重链间二硫桥加以稳定的刚性聚脯氨酸双螺旋。这些性质约束了IgG2分子的柔性。IgG3因其独特的延长铰链区(长达IgG1铰链的约四倍),含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),形成非柔性聚脯氨酸双螺旋而不同于其他子类。在IgG3中,Fab片段相对远离Fc片段,从而赋予所述分子以更大的柔性。IgG3中的细长铰链还负责其与其他子类相比具有较高分子量。IgG4的铰链区比IgG1的短,并且其柔性介于IgG1与IgG2的柔性之间。铰链区的柔性按降序报告为IgG3>IgG1>IgG4>IgG2。

[0704] 根据结晶学研究,免疫球蛋白铰链区可以在功能上进一步细分为三个区域:上铰链区、核心区和下铰链区。参见Shin等人,1992 Immunological Reviews 130:87。上铰链区包括从C<sub>H1</sub>的羧基端至铰链中约束运动的第一个残基,一般是形成介于两个重链之间的链间二硫键的第一个半胱氨酸残基的氨基酸。上铰链区的长度与抗体的区段柔性相关。核心铰链区含有重链间二硫桥,而下铰链区接合C<sub>H2</sub>结构域的氨基端并且包括C<sub>H2</sub>中的残基。同前。野生型人IgG1的核心铰链区含有序列SEQ ID NO:1241,所述序列当通过二硫键形成发生二聚时产生环状八肽,认为所述环状八肽充当枢轴,因此赋予柔性。在各个实施方案中,本发明的接头包含任何抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE,包括子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及IgA1和IgA2))的上铰链区、核心区和下铰链区中的一者或两者或三者。铰链区还可以含有一个或多个糖基化位点,所述糖基化位点包括众多类型的结构独特的位点以供碳水化合物附接用。举例来说,IgA1含有铰链区的17个氨基酸区段内的五个糖基化位点,从而赋予铰链区多肽对肠蛋白酶的抗性,这被视为分泌免疫球蛋白的有利性质。在各个实施方案中,本发明的接头包含一个或多个糖基化位点。在各个实施方案中,所述接头是人IgG4抗体的铰链-CH2-CH3结构域。

[0705] 在需要时,本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以连接至包含C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3结构域中的一者或两者和任选地铰链区的抗体Fc区。举例来说,编码作为单个核苷酸序列连接至Fc区的本发明PD-1或PD-L1结合剂的载体可用于制备此类多肽。

[0706] 在一些实施方案中,所述接头是合成的接头,诸如PEG。

[0707] 在各个实施方案中,所述接头可以是功能性的。举例来说但不限于,所述接头可以发挥功能以改善本发明的PD-1或PD-L1结合剂的折叠和/或稳定性,改善表达,改善药物动力学,并且/或者改善生物活性。在另一个实例中,所述接头可以发挥功能以使所述PD-1或PD-L1结合剂靶向特定的细胞类型或位置。

[0708] PD-1或PD-L1结合剂的修饰和产生

[0709] 在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含作为VHH的靶向部分。在各个实施方案中,所述VHH不局限于特定的生物学来源或特定的制备方法。举例来说,所述VHH一般可以通过以下方式获得:(1)通过分离天然存在的重链抗体的V<sub>H</sub>H结构域;(2)通过表达编码天然存在的V<sub>H</sub>H结构域的核苷酸序列;(3)通过天然存在的V<sub>H</sub>H结构域的“人源化”或通过编码此类人源化V<sub>H</sub>H结构域的核酸的表达;(4)通过来自任何动物物种,诸如来自哺乳动物物种,诸如来自人类的天然存在的VH结构域的“骆驼化”,或通过编码此类骆驼化VH结构域的核酸的表达;(5)通过如本领域中描述的“结构域抗体”或“Dab”的“骆驼化”,或通过编码此类骆驼化VH结构域的核酸的表达;(6)通过使用合成或半合成技术来制备本领域中已知的蛋白质、多肽或其他氨基酸序列;(7)通过使用本领域中已知的核酸合成技术来制备编码VHH的核酸,随后表达如此获得的核酸;和/或(8)通过上述一项或多项的任何组合。

[0710] 在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含对应于针对人PD-1或PD-L1的天然存在的重链抗体的V<sub>H</sub>H结构域的VHH。在一些实施方案中,一般可以通过以下方式产生或获得此类VHH序列:通过用PD-1或PD-L1分子适当地使一种骆驼免疫(即,以便产生免疫应答和/或针对PD-1或PD-L1的重链抗体);通过从所述骆驼获得合适的生物样品(诸如血液样品或任何B细胞样品);以及通过以所述样品为起始物,使用任何合适的已知技术来产生针对PD-1或PD-L1的V<sub>H</sub>H序列。在一些实施方案中,针对PD-1或PD-L1的天然存在的V<sub>H</sub>H结构域可以获自骆驼V<sub>H</sub>H序列的天然文库,举例来说,通过使用本领域中已知的一种或多种筛选技术,使用PD-1或PD-L1或其至少一个部分、片段、抗原决定子或表位对此类文库进行筛选。举例来说,此类文库和技术描述于W09937681, W00190190、W003025020和W003035694中,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,可以使用来源于天然V<sub>H</sub>H文库的经过改善的合成或半合成文库,诸如通过诸如随机诱变和/或CDR改组的技术而获自天然V<sub>H</sub>H文库的V<sub>H</sub>H文库,如例如W00043507中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,用于获得针对PD-1或PD-L1的V<sub>H</sub>H序列的另一种技术包括适当地使能够表达重链抗体的转基因哺乳动物免疫(即,以便产生免疫应答和/或针对PD-1或PD-L1的重链抗体),从所述转基因哺乳动物获得合适的生物样品(诸如血液样品,或任何B细胞样品),然后使用任何合适的已知技术,以所述样品为起始物来产生针对PD-1或PD-L1的V<sub>H</sub>H序列。举例来说,出于这个目的,可以使用W002085945中和W004049794中描述的表达重链抗体的小鼠以及其他方法和技术(所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。

[0711] 在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含已经“人源化”,即通过将天然存在的V<sub>H</sub>H序列的氨基酸序列中(且具体来说是框架序列中)的一个或多个氨基酸残基置换为

来自人的常规4链抗体的VH结构域中对应位置上存在的一个或多个氨基酸残基的VHH。这可以使用本领域中已知的人源化技术来进行。在一些实施方案中,可能的人源化取代或人源化取代的组合可以通过本领域中已知的方法来确定,例如,通过在VHH的序列与天然存在的人VH结构域的序列之间进行比较。在一些实施方案中,对所述人源化取代进行选择,以使所得人源化VHH仍保留有利的功能性质。一般来说,作为人源化的结果,本发明的VHH相较于对应的天然存在的V<sub>H</sub>H结构域可以变得更“像人的”,同时仍保留有利性质,诸如降低的免疫原性。在各个实施方案中,本发明的人源化VHH可以用本领域中已知的任何合适的方式来获得,并且因此不严格限于已经使用包含天然存在的V<sub>H</sub>H结构域作为起始物质的多肽获得的多肽。

[0712] 在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含已经“骆驼化”,即通过将来自常规4链抗体的天然存在的VH结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基置换为骆驼重链抗体的V<sub>H</sub>H结构域中对应位置上存在的一个或多个氨基酸残基的VHH。在一些实施方案中,此类“骆驼化”取代被插入在形成和/或存在于VH-VL界面上的氨基酸位置上和/或在所谓的骆驼科标志残基上(参见例如W09404678,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在一些实施方案中,用作起始物质或起始点以供产生或设计骆驼化VHH用的VH序列是来自哺乳动物的VH序列,例如,人的VH序列,诸如VH3序列。在各个实施方案中,所述骆驼化VHH可以用本领域中已知的任何合适的方式获得(即,如以上第(1)-(8)点所指示),并且因此不严格限于已经使用包含天然存在的VH结构域作为起始物质的多肽而获得的多肽。

[0713] 在各个实施方案中,“人源化”与“骆驼化”可以通过以下方式进行:分别提供编码天然存在的V<sub>H</sub>H结构域或VH结构域的核苷酸序列,然后用本领域中已知的方式改变所述核苷酸序列中的一个或多个密码子,以这种方式使得新的核苷酸序列分别编码“人源化”或“骆驼化”VHH。然后可以用本领域中已知的方式表达这种核酸,以便提供本发明的所期望的VHH。或者,分别基于天然存在的V<sub>H</sub>H结构域或VH结构域的氨基酸序列,分别可以设计本发明的所期望的人源化或骆驼化VHH的氨基酸序列,然后使用本领域中已知的肽合成技术从头合成。而且,分别基于天然存在的V<sub>H</sub>H结构域或VH结构域的氨基酸序列或核苷酸序列,分别可以设计编码所期望的人源化或骆驼化VHH的核苷酸序列,然后使用本领域中已知的核酸合成技术从头合成,此后可以用本领域中已知的方式表达如此获得的核酸,以便提供本发明的所期望的VHH。以天然存在的VH序列或V<sub>H</sub>H序列为起始物获得本发明的VHH和/或编码所述VHH的核酸的其他合适的方法和技术在本领域中是已知的,并且可以例如包括以合适的方式组合一种或多种天然存在的VH序列的一个或多个部分(诸如一个或多个FR序列和/或CDR序列)、一种或多种天然存在的V<sub>H</sub>H序列的一个或多个部分(诸如一个或多个FR序列或CDR序列)和/或一个或多个合成或半合成序列,以便提供本发明的VHH或者编码所述VHH的核苷酸序列或核酸。

[0714] 本文中描述了用于产生本发明的PD-1或PD-L1结合剂的方法。举例来说,编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的DNA序列可以使用本领域中已知的方法化学合成。合成DNA序列可以连接至其他适当的核苷酸序列,包括例如表达控制序列,以产生编码所期望的PD-1或PD-L1结合剂的基因表达构建体。因此,在各个实施方案中,本发明提供了包含编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的核苷酸序列的分离的核酸。

[0715] 编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的核酸可以并入(连接)至表达载体中,所述表

达载体可以通过转染、转化或转导技术而引入宿主细胞中。举例来说,可以通过反转录病毒转导将编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的核酸引入至宿主细胞中。说明性宿主细胞是大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾293(HEK 293)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和骨髓瘤细胞。可以使转化的宿主细胞在允许宿主细胞表达编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的基因的条件下生长。因此,在各个实施方案中,本发明提供了包含编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的核酸的表达载体。在各个实施方案中,本发明额外提供了包含此类表达载体的宿主细胞。

[0716] 具体的表达和纯化条件将取决于所采用的表达系统而变化。举例来说,如果在大肠杆菌中表达基因,那么首先通过将工程化的基因置于合适的细菌启动子例如Trp或Tac和原核信号序列的下游而将它克隆至表达载体中。在另一个实例中,如果将要在真核宿主细胞,例如CHO细胞中表达工程化的基因,那么首先将它插入含有例如合适的真核启动子、分泌信号、增强子和各种内含子的表达载体中。可以使用转染、转化或转导技术将基因构建体引入至宿主细胞中。

[0717] 本发明的PD-1或PD-L1结合剂可以通过使经编码所述PD-1或PD-L1结合剂的表达载体转染的宿主细胞在允许表达所述蛋白质的条件下生长来产生。在表达后,可以使用本领域中众所周知的技术,例如亲和力标签诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸(His)标签或通过色谱法来收集并且纯化所述蛋白质。在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含His标签。在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含His标签和允许切割所述His标签的蛋白水解裂解位点。

[0718] 因此,在各个实施方案中,本发明提供了一种编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的核酸。在各个实施方案中,本发明提供了一种包含编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂的核酸的宿主细胞。

[0719] 在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂或包含其的嵌合蛋白可以在体内例如患者中表达。举例来说,在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂或包含其的嵌合蛋白可以呈编码本发明的PD-1或PD-L1结合剂或包含其的嵌合蛋白的核酸形式施用。在各个实施方案中,所述核酸是DNA或RNA。在一些实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂或包含其的嵌合蛋白是由经修饰的mRNA,即包含一个或多个经修饰的核苷酸的mRNA编码。在一些实施方案中,所述经修饰的mRNA包含一个或多个在美国专利号8,278,036中发现的修饰,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述经修饰的mRNA包含m5C、m5U、m6A、s2U、 $\Psi$ 和2'-O-甲基-U中的一者或多者。在一些实施方案中,本发明涉及施用编码一种或多种本发明的嵌合蛋白的经修饰的mRNA。在一些实施方案中,本发明涉及包含所述经修饰的mRNA的基因治疗载体。在一些实施方案中,本发明涉及包括所述基因治疗载体的基因治疗方法。在各个实施方案中,所述核酸呈溶瘤病毒,例如腺病毒、呼肠孤病毒、麻疹、单纯疱疹、新城疫病毒或牛痘的形式。

[0720] 药学上可接受的盐和赋形剂

[0721] 本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂(和/或任何其他治疗剂)可以具有能与无机或有机酸反应的充分碱性的官能团,或能与无机或有机碱反应的羧基,以形成药学上可接受的盐。如本领域中众所周知,药学上可接受的酸加成盐是由药学上可接受的酸形成。此类盐包括例如以下文献中列出的药学上可接受的盐:Journal of Pharmaceutical Science,

66,2-19(1977)和The Handbook of Pharmaceutical Salts;Properties,Selection,and Use.P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编辑),Verlag,Zurich(Switzerland)2002,所述文献特此以引用方式整体并入。

[0722] 作为非限制性实例,药学上可接受的盐包括硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐、双羟萘酸盐、苯基乙酸盐、三氟乙酸盐、丙烯酸盐、氯代苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、邻乙酰氧基苯甲酸盐、萘-2-苯甲酸盐、异丁酸盐、苯基丁酸盐、 $\alpha$ -羟基丁酸盐、丁炔-1,4-二甲酸盐、己炔-1,4-二甲酸盐、癸酸盐、辛酸盐、肉桂酸盐、乙醇酸盐、庚酸盐、马尿酸盐、苹果酸盐、羟基马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、酞酸盐、对苯二酸盐、丙炔酸盐、丙酸盐、苯基丙酸盐、癸二酸盐、辛二酸盐、对溴代苯磺酸盐、氯代苯磺酸盐、乙基磺酸盐、2-羟基乙基磺酸盐、甲基磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、萘-1,5-磺酸盐、二甲苯磺酸盐和酒石酸盐。

[0723] 术语“药学上可接受的盐”还指具有酸性官能团,诸如羧酸官能团的本发明组合物与碱形成的盐。合适的碱包括但不限于碱金属诸如钠、钾和锂的氢氧化物;碱土金属诸如钙和镁的氢氧化物;其他金属诸如铝和锌的氢氧化物;氨和有机胺,诸如未经取代或经羟基取代的单烷基胺、二烷基胺或三烷基胺、二环己基胺;三丁胺;吡啶;N-甲基,N-乙基胺;二乙基胺;三乙基胺;单(2-OH-低级烷基胺)、双(2-OH-低级烷基胺)或三(2-OH-低级烷基胺)(诸如单(2-羟基乙基)胺、双(2-羟基乙基)胺或三(2-羟基乙基)胺)、2-羟基-叔丁胺或三(羟基甲基)胺、N,N-二-低级烷基-N-(羟基-低级烷基)-胺(诸如N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺)或三(2-羟基乙基)胺;N-甲基-D-葡萄糖胺;和氨基酸,诸如精氨酸、赖氨酸等等。

[0724] 在一些实施方案中,本文所描述的组合物呈药学上可接受的盐的形式。

#### [0725] 药物组合物和调配物

[0726] 在各个实施方案中,本发明有关于包含本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂(和/或任何其他治疗剂)和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,本发明有关于包含本发明的PD-1或PD-L1结合剂的药物组合物。在另一个实施方案中,本发明有关于包含本文所描述的任何其他治疗剂的药物组合物。在另一个实施方案中,本发明有关于包含本发明的PD-1或PD-L1结合剂与本文所描述的任何其他治疗剂的组合的药物组合物。本文所描述的任何药物组合物都可以作为包含药学上可接受的载体或媒介物的组合物的组分施用至受试者。此类组合物可以任选地包含适量的药学上可接受的赋形剂,以便提供用于适当施用的形式。

[0727] 在各个实施方案中,药物赋形剂可以是液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些液体,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等。所述药物赋形剂可以是例如生理盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、脲等等。另外,可以使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中,当施用至受试者时,所述药学上可接受的赋形剂是无菌的。当经静脉内施用本文所描述的任何剂时,水是可用的赋形剂。还可以采用生理盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂,具体来说,用于

可注射溶液。合适的药物赋形剂还包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。本文所描述的任何剂在需要时还可以包含微量润湿剂或乳化剂或pH值缓冲剂。合适的药物赋形剂的其他实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R.Gennaro编辑,第19版1995)中,所述文献以引用方式并入本文。

[0728] 本发明包括所描述的药物组合物(和/或其他治疗剂)的各种调配物形式。本文所描述的任何发明药物组合物(和/或其他治疗剂)可以呈溶液、悬浮液、乳液、滴剂、片剂、丸剂、丹剂、胶囊剂、含有液体的胶囊剂、明胶胶囊、粉剂、持续释放调配物、栓剂、乳液、气雾剂、喷雾剂、悬浮液、冻干粉剂、冷冻悬浮液、干燥粉剂的形式或任何其他合用的形式。在一个实施方案中,所述组合物呈胶囊剂形式。在另一个实施方案中,所述组合物呈片剂形式。在另一个实施方案中,所述药物组合物被配制为呈软凝胶胶囊形式。在另一个实施方案中,所述药物组合物被配制为呈明胶胶囊形式。在另一个实施方案中,所述药物组合物被配制为液体。

[0729] 在必要时,本发明的药物组合物(和/或其他剂)还可以包括增溶剂。所述剂还可以与如本领域中已知的合适的媒介物或递送装置一起递送。本文概述的组合疗法可以在单个递送媒介物或递送装置中共同递送。

[0730] 本发明的包含本发明药物组合物(和/或其他剂)的调配物可能适宜呈单位剂型的形式存在,并且可以通过制药领域中众所周知的任何方法来制备。此类方法一般包括使所述治疗剂与构成一种或多种辅助成分的载体缔合的步骤。典型地,所述调配物是通过使所述治疗剂均匀地并且密切地与液体载体、细粉状固体载体或二者缔合,然后在必要时将产物成形为所期望的制剂的剂型(例如湿式或干式造粒、粉末掺合物等,随后使用本领域中已知的常规方法进行制片)来制备。

[0731] 在各个实施方案中,本文所描述的任何药物组合物(和/或其他剂)根据常规程序配制为适合于本文所描述的施用模式的组合物。

[0732] 施用途径包括例如:口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、舌下、鼻内、脑内、阴道内、经皮、直肠、通过吸入或局部。施用可以是局部的或全身的。在一些实施方案中,所述施用是通过口服实现。在另一个实施方案中,所述施用是通过肠胃外注射。施用模式可以留给医师判断,并且部分取决于医学病状的部位。在大部分情况下,施用使得本文所描述的任何剂释放至血流中。

[0733] 在一个实施方案中,本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂根据常规程序配制为适合于口服施用的组合物。举例来说,用于口服递送的组合物可以呈片剂、糖锭、水性或油性悬浮液、颗粒剂、粉剂、乳液、胶囊剂、糖浆或酏剂形式。口服施用的组合物可以包含一种或多种剂,例如甜味剂,诸如果糖、阿斯巴特(aspartame)或糖精;调味剂,诸如薄荷油、冬青油或樱桃油;着色剂;和防腐剂,以提供药学上可口的制剂。此外,在呈片剂或丸剂形式时,所述组合物可以经过包衣以延迟胃肠道中的崩解和吸收,从而在较长时间段内提供持续作用。在本文所描述的渗透活性驱动的任何PD-1或PD-L1结合剂周围的选择性渗透膜还适用于口服施用的组合物。在后面的这些平台中,来自于所述胶囊剂周围的环境的流体被驱动化合物吸入,所述驱动化合物膨胀从而通过孔口置换所述剂或剂组合物。与立即释放调配物的尖峰分布相反,这些递送平台可以提供本质上零阶的递送分布。时间延迟材料诸如单硬脂

酸甘油酯或硬脂酸甘油酯也是可用的。口服组合物可以包括标准赋形剂,诸如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。在一个实施方案中,所述赋形剂属于药物等级。悬浮液以及活性化合物可以含有悬浮剂,诸如例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、皂土、琼脂、黄芪胶等以及它们的混合物。

[0734] 适用于肠胃外施用(例如静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下和关节内注射和输注)的剂型包括例如溶液、悬浮液、分散液、乳液等等。它们还可以制造为呈无菌固体组合物(例如冻干组合物)形式,所述形式可以在即将使用前溶解或悬浮在无菌可注射介质中。它们可以含有例如本领域中已知的悬浮剂或分散剂。适用于肠胃外施用的调配物组分包括无菌稀释剂诸如注射用水、生理盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如EDTA;缓冲液诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和张力调节剂诸如氯化钠或葡萄糖。

[0735] 对于静脉内施用而言,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、克列莫佛(Cremophor) ELTM(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。所述载体在制造和存储条件下应当是稳定的,并且应当经过防腐以免受微生物影响。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)以及它们的合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0736] 本文提供的组合物可以单独与其他合适的组分组合而制成气雾剂调配物(即,“喷雾”)以便经由吸入施用。气雾剂制剂可以放入加压可接受的推进剂诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等等中。

[0737] 本文所描述的任何发明药物组合物(和/或其他剂)可以通过控制释放或持续释放手段或通过本领域普通技术人员众所周知的递送装置施用。实例包括但不限于美国专利号3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556和5,733,556中所描述的那些,各美国专利以引用的方式整体并入本文。此类剂型可用于使用例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、其他聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统、多层涂层、微粒、脂质体、微球体或它们的组合提供一种或多种活性成分的控制释放或持续释放,从而在变化的比例下提供所期望的释放分布。可以容易地选择本领域技术人员已知的合适的控制释放或持续释放调配物,包括本文所描述的那些,以便与本文所描述的剂的活性成分一起使用。本发明因此提供了适合口服施用的单个单位剂型,诸如但不限于适合于控制释放或持续释放的片剂、胶囊剂、囊形片和胶囊片。

[0738] 可以通过各种条件包括但不限于pH值变化、温度变化来刺激、通过适当的光的波长、酶的浓度或可用性、水的浓度或可用性或者其他生理条件或化合物来刺激活性成分的控制释放或持续释放。

[0739] 在另一个实施方案中,控制释放系统可以放在欲治疗的目标区域的附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 同上,第2卷,第115-138页(1984))。可以使用Langer, 1990, Science 249:1527-1533)的综述中讨论的其他控制释放系统。

[0740] 药物调配物优选地是无菌的。可以例如通过经无菌过滤膜过滤来实现灭菌。在组合物被冻干的情况下,可以在冻干和复水之前或之后进行过滤灭菌。

**[0741] 施用和剂量**

**[0742]** 应当了解,根据本发明施用的PD-1或PD-L1结合剂和/或本文所描述的任何治疗剂的实际剂量将根据具体剂型和施用模式而变化。本领域技术人员可以考虑能调节PD-1或PD-L1结合剂的作用的许多因素(例如体重、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、受试者的状况、药物组合、遗传倾向和反应敏感性)。可以连续地或者以最大耐受剂量内的一个或多个离散剂量进行施用。本领域技术人员可以使用常规剂量施用测试来确定给定条件组的最佳施用速率。

**[0743]** 在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂和/或本文所描述的任何治疗剂的合适的剂量在约0.01mg/kg至约10g/kg受试者体重、约0.01mg/kg至约1g/kg受试者体重、约0.01mg/kg至约100mg/kg受试者体重、约0.01mg/kg至约10mg/kg受试者体重的范围内,例如约0.01mg/kg、约0.02mg/kg、约0.03mg/kg、约0.04mg/kg、约0.05mg/kg、约0.06mg/kg、约0.07mg/kg、约0.08mg/kg、约0.09mg/kg、约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg、约1.8mg/kg、约1.9mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg体重、约100mg/kg体重、约1g/kg of体重、约10g/kg of体重,包括所有值和介于这些值之间的范围。

**[0744]** 所述PD-1或PD-L1结合剂和/或本文所描述的任何治疗剂的个别剂量可以呈含有例如每个单位剂型约0.01mg至约100g、约0.01mg至约75g、约0.01mg至约50g、约0.01mg至约25g、约0.01mg至约10g、约0.01mg至约7.5g、约0.01mg至约5g、约0.01mg至约2.5g、约0.01mg至约1g、约0.01mg至约100mg、约0.1mg至约100mg、约0.1mg至约90mg、约0.1mg至约80mg、约0.1mg至约70mg、约0.1mg至约60mg、约0.1mg至约50mg、约0.1mg至约40mg活性成分、约0.1mg至约30mg、约0.1mg至约20mg、约0.1mg至约10mg、约0.1mg至约5mg、约0.1mg至约3mg、约0.1mg至约1mg或每个单位剂型约5mg至约80mg的单位剂型的形式施用。举例来说,单位剂型可以是约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约200mg、约500mg、约1g、约2.5g、约5g、约10g、约25g、约50g、约75g、约100g,包括所有值和介于这些值之间的范围。

**[0745]** 在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂和/或本文所描述的任何治疗剂是以每天约0.01mg至约100g、每天约0.01mg至约75g、每天约0.01mg至约50g、每天约0.01mg至约25g、每天约0.01mg至约10g、每天约0.01mg至约7.5g、每天约0.01mg至约5g、每天约0.01mg至约2.5g、每天约0.01mg至约1g、每天约0.01mg至约100mg、每天约0.1mg至约100mg、每天约0.1mg至约95mg、每天约0.1mg至约90mg、每天约0.1mg至约85mg、每天约0.1mg至约80mg、每天约0.1mg至约75mg、每天约0.1mg至约70mg、每天约0.1mg至约65mg、每天约0.1mg至约60mg、每天约0.1mg至约55mg、每天约0.1mg至约50mg、每天约0.1mg至约45mg、每天约0.1mg至约40mg、每天约0.1mg至约35mg、每天约0.1mg至约30mg、每天约0.1mg至约25mg、每天约0.1mg至约20mg、每天约0.1mg至约15mg、每天约0.1mg至约10mg、每天约0.1mg至约5mg、每天

约0.1mg至约3mg、每天约0.1mg至约1mg或每天约5mg至约80mg的量施用。在各个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂是以约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约200mg、约500mg、约1g、约2.5g、约5g、约7.5g、约10g、约25g、约50g、约75g、约100g的每日剂量施用,包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0746] 根据本发明的某些实施方案,包含所述PD-1或PD-L1结合剂和/或本文所描述的任何治疗剂的药物组合物可以施用例如每天超过一次(例如每天约两次、约三次、约四次、约五次、约六次、约七次、约八次、约九次或约十次)、约每天一次、约每隔一天一次、约每第三天一次、约一周一次、约每两周一次、约每个月一次、约每两个月一次、约每三个月一次、约每六个月一次或约每年一次。

#### [0747] 组合疗法和其他治疗剂

[0748] 在各个实施方案中,将本发明的药物组合物与其他一种或多种治疗剂联合共同施用。共同施用可以同时或依序进行。

[0749] 在一个实施方案中,将所述其他治疗剂和本发明的PD-1或PD-L1结合剂同时施用给受试者。如本文所使用,术语“同时”意指所述其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂的施用时间间隔不超过约60分钟,诸如不超过约30分钟、不超过约20分钟、不超过约10分钟、不超过约5分钟或不超过约1分钟。所述其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂的施用可以通过同时施用单一制剂(例如包含所述其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂的调配物)或独立的调配物(例如包括所述其他治疗剂的第一调配物和包括PD-1或PD-L1结合剂的第二调配物)来进行。

[0750] 共同施用不需要同时施用各治疗剂,只要其施用时程使得所述其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂的药理学活性在时间上重叠,由此发挥组合治疗作用即可。举例来说,所述其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂可以依序施用。如本文所使用,术语“依序”意指所述其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂的施用时间间隔超过约60分钟。举例来说,依序施用所述其他治疗剂与PD-1或PD-L1结合剂之间的时间可以间隔超过约60分钟、超过约2小时、超过约5小时、超过约10小时、超过约1天、超过约2天、超过约3天、超过约1周或超过约2周或超过约一个月。最佳的施用时间将取决于代谢速率、排泄速率和/或所施用的其他治疗剂和PD-1或PD-L1结合剂的药物动力学活性。可以先施用所述其他治疗剂或PD-1或PD-L1结合剂。

[0751] 共同施用也不需要相同施用途向受试者施用所述治疗剂。实际上,各治疗剂可以通过任何适当的途径,例如经肠胃外或非肠胃外施用。

[0752] 在一些实施方案中,本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂当与另一种治疗剂共同施用协同起作用。在此类实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂和其他治疗剂的施用剂量可以低于当各剂用于单一疗法情形时所采用的剂量。

[0753] 在一些实施方案中,本发明有关于化学治疗剂作为其他治疗剂。举例来说但不限于,本发明的PD-1或PD-L1结合剂与化学治疗剂的这种组合可用于治疗癌症,如本文中其他部分所描述。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,诸如噻替派(thiotepa)和CYTOXAN环

磷酸胺;烷基磺酸酯,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酸胺、三亚乙基硫代磷酸胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(例如布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物拓扑替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);海绵抑素(cally statin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻环肽(cryptophycin)(例如,念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);海兔抑素(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物,KW-2189和CB 1-TM1);伊斯罗宾(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酸胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酸胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氮芥氧化物盐酸盐(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofوسفamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫斯汀(ranimustine);抗生素,诸如烯二炔类抗生素(例如卡利奇霉素(calicheamicin),尤其是卡利奇霉素  $\gamma$  1和卡利奇霉素  $\omega$  1(参见例如Agnew, Chem.Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994)));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双膦酸盐,诸如氯屈膦酸盐(clodronate);埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团(neocarzinostatin chromophore)和相关色素蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、佐柔比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN多柔比星(doxorubicin)(包括吗啉代-多柔比星)、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉芬酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如迪诺特宁(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨

(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素,诸如卡芦睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺药,诸如氨鲁米特(minoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolic acid);醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);贝斯布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依洛尼塞(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);类美登素(maytansinoid),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocins);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他汀(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene, Oreg.);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺旋胺(spirogermanium);替奴佐酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯(trichothecenes)(例如T-2毒素、粘液霉素A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);加西托星(gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”);环磷酰胺;噻替派;类紫杉醇(taxoid),例如TAXOL太平洋紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE太平洋紫杉醇的不含聚氧乙烯化蓖麻油(Cremophor)的经白蛋白工程化的纳米粒子制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumburg,111.)以及TAXOTERE多西他赛(doxetaxel)(Rhone-Poulenc Rorer, Antony,France);苯丁酸氮芥;GEMZAR吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(vincristine);NAVELBINE.长春瑞滨(vinorelbine);诺消灵(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);柔红霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(Camptosar,CPT-11)(包括伊立替康与5-FU的治疗方案)和亚叶酸(leucovorin);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);类视黄素(retinoid),诸如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine);康普瑞汀(combretastatin);亚叶酸(LV);奥沙利铂(oxaliplatin),包括奥沙利铂治疗方案(FOLF0X);拉帕替尼(lapatinib)(Tykerb);减少细胞增殖的PKC- $\alpha$ 、Raf、H-Ras、EGFR的抑制剂(例如埃罗替尼(erlotinib)(Tarceva))和VEGF-A的抑制剂;以及以上任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。另外,治疗方法还可以包括使用辐射。另外,治疗方法还可以包括使用光动力疗法。

[0754] 因此,在一些实施方案中,本发明涉及使用所述PD-1或PD-L1结合剂和化疗剂的组合疗法。在一些实施方案中,本发明涉及对利用化疗剂进行治疗的患者施用所述PD-1或PD-

L1结合剂。在一些实施方案中,所述化疗剂是DNA插入剂,诸如但不限于多柔比星、顺铂、佐柔比星和表柔比星。在一个实施方案中,所述DNA插入剂是多柔比星。

[0755] 在说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与多柔比星共同施用时的协同作用。在一个说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与多柔比星共同施用以用于治疗肿瘤或癌症时协同作用。举例来说,共同施用所述PD-1或PD-L1结合剂和多柔比星可以协同作用,以减轻或消除所述肿瘤或癌症,或者减缓所述肿瘤或癌症的生长和/或进展和/或转移。在说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与多柔比星的组合当与单独用在单一疗法的情形下的所述剂相比时可以表现出提高的安全特性。在说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂和多柔比星可以按比当所述剂用在单一疗法的情形下时所采用的剂量更低的剂量施用。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含突变的干扰素,诸如突变的IFN $\alpha$ 。在说明性实施方案中,所述突变的IFN $\alpha$ 相对于SEQ ID NO:317或SEQ ID NO:318在位置148、149和153处包含一个或多个突变,诸如取代M148A、R149A和L153A。

[0756] 在一些实施方案中,本发明涉及利用一种或多种免疫调节剂,例如但不限于调节免疫检查点的剂的组合疗法。在各个实施方案中,所述免疫调节剂靶向PD-1、PD-L1和PD-L2中的一者或多者。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是PD-1抑制剂。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对PD-1、PD-L1和PD-L2中的一者或多者具有特异性的抗体。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于,纳武单抗(ON0-4538/BMS-936558,MDX1106,OPDIVO,BRISTOL MYERS SQUIBB)、派姆单抗(KEYTRUDA,MERCK)、皮地利珠单抗(CT-011,CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、MPDL3280A(ROCHE)。在一些实施方案中,所述免疫调节剂靶向CD137或CD137L中的一者或多者。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对CD137或CD137L中的一者或多者具有特异性的抗体。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于乌瑞鲁单抗(urelumab)(又称为BMS-663513和抗4-1BB抗体)。在一些实施方案中,将本发明的嵌合蛋白与乌瑞鲁单抗(任选地与纳武单抗、利丽单抗(lirilumab)和乌瑞鲁单抗中的一者或多者)组合以治疗实体肿瘤和/或B细胞非霍奇金氏淋巴瘤和/或头颈癌和/或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述免疫调节剂是靶向以下一者或多者的剂:CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2和PPP2R5A。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对以下一者或多者具有特异性的抗体:CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2和PPP2R5A。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于伊匹单抗(ipilimumab)(MDX-010,MDX-101,Yervoy,BMS)和/或曲美单抗(tremelimumab)(Pfizer)。在一些实施方案中,将本发明的嵌合蛋白与伊匹单抗(任选地与巴维昔单抗(bavituximab))组合以治疗黑素瘤、前列腺癌和肺癌中的一者或多者。在各个实施方案中,所述免疫调节剂靶向CD20。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对CD20具有特异性的抗体。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于,奥法木单抗(GENMAB)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)(GAZYVA)、AME-133v(APPLIED MOLECULAR EVOLUTION)、奥瑞珠单抗(GENENTECH)、TRU-015(TRUBION/EMERGENT)、维妥珠单抗(veltuzumab)(IMMU-106)。

[0757] 在一些实施方案中,本发明涉及使用所述PD-1或PD-L1结合剂和检查点抑制剂的组合疗法。在一些实施方案中,本发明涉及对利用检查点抑制剂进行治疗的患者施用所述PD-1或PD-L1结合剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是靶向PD-1、PD-L1、PD-L2和

CTLA-4中的一者或多者的剂(包括本文所描述的抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2和抗CTLA-4剂中的任一种)。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB)、派姆单抗(KEYTRUDA, MERCK)、皮地利珠单抗(CT-011, CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、MPDL3280A(ROCHE)、伊匹单抗(MDX-010, MDX-101, Yervoy, BMS)和曲美目单抗(Pfizer)。在一个实施方案中,所述检查点抑制剂是针对PD-L1的抗体。

[0758] 在说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与所述抗PD-L1抗体共同施用协同作用。在一个说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与所述抗PD-L1抗体共同施用以用于治疗肿瘤或癌症时协同作用。举例来说,共同施用所述PD-1或PD-L1结合剂和所述抗PD-L1抗体可以协同作用以减轻或消除所述肿瘤或癌症,或者减缓所述肿瘤或癌症的生长和/或进展和/或转移。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与所述抗PD-L1抗体的组合当与单独用在单一疗法的情形下的所述剂相比时可以表现出提高的安全特性。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂和所述抗PD-L1抗体可以按比当所述剂用在单一疗法的情形下时所采用的剂量更低的剂量施用。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含突变的干扰素,诸如突变的IFN $\alpha$ 。在说明性实施方案中,所述突变的IFN $\alpha$ 相对于SEQ ID NO:317或SEQ ID NO:318在位置148、149和153处包含一个或多个突变,诸如取代M148A、R149A和L153A。

[0759] 在一些实施方案中,本发明涉及使用所述PD-1或PD-L1结合剂和免疫抑制剂的组合法。在一些实施方案中,本发明涉及对利用免疫抑制剂进行治疗的患者施用所述PD-1或PD-L1结合剂。在一个实施方案中,所述免疫抑制剂是TNF。

[0760] 在说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与TNF共同施用协同作用。在一个说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与TNF共同施用以用于治疗肿瘤或癌症时协同作用。举例来说,共同施用所述PD-1或PD-L1结合剂和TNF可以协同作用以减轻或消除所述肿瘤或癌症,或者减缓所述肿瘤或癌症的生长和/或进展和/或转移。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与TNF的组合当与单独用在单一疗法的情形下的所述剂相比时可以表现出提高的安全特性。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂和TNF可以按比当所述剂用在单一疗法的情形下时所采用的剂量更低的剂量施用。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂包含突变的干扰素,诸如突变的IFN $\alpha$ 。在说明性实施方案中,所述突变的IFN $\alpha$ 相对于SEQ ID NO:317或SEQ ID NO:318在位置148、149和153处包含一个或多个突变,诸如取代M148A、R149A和L153A。

[0761] 在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法组合使用时协同作用。在一个说明性实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与CAR T细胞疗法组合用于治疗肿瘤或癌症时协同作用。在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与CAR T细胞疗法组合用于治疗基于血液的肿瘤时协同作用。在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂当与CAR T细胞疗法组合用于治疗实体肿瘤时协同作用。举例来说,使用所述PD-1或PD-L1结合剂和CAR T细胞可以协同作用以减轻或消除所述肿瘤或癌症,或者减缓所述肿瘤或癌症的生长和/或进展和/或转移。在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂诱导CAR T细胞分裂。在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂诱导CAR T细胞增殖。在各个实施方案中,本发明的PD-1或PD-L1结合剂预防CAR T细胞无应答。

[0762] 在各个实施方案中,所述CAR T细胞疗法包含靶向诸多抗原(例如肿瘤抗原),诸如但不限于碳酸酐酶IX(CAIX)、5T4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD47、CS1、CD138、Lewis-Y、L1-CAM、MUC16、ROR-1、IL13R $\alpha$ 2、gp100、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、B细胞成熟抗原(BCMA)、第16型人乳头状瘤病毒E6(HPV-16E6)、CD171、叶酸受体 $\alpha$ (FR- $\alpha$ )、GD2、人表皮生长因子受体2(HER2)、间皮素、EGFRvIII、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、癌胚抗原癌胚抗原(CEA)和血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)以及本领域中众所周知的其他肿瘤抗原的CAR T细胞。其他说明性肿瘤抗原包括但不限于MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAAbp)、亲环蛋白b、结肠直肠相关抗原(CRC)-0017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、T细胞受体/CD3- $\zeta$ 链、MAGE家族肿瘤抗原(例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族肿瘤抗原(例如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 $\alpha$ -胎儿球蛋白、E-钙粘蛋白、 $\alpha$ -连锁蛋白、 $\beta$ -连锁蛋白和 $\gamma$ -连锁蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物诸如人乳头状瘤病毒蛋白、Smad家族肿瘤抗原、lmp-1、NA、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1CT-7、c-erbB-2、CD19、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1和PD-L2。

[0763] 示例性CAR T细胞疗法包括但不限于JCAR014(Juno Therapeutics)、JCAR015(Juno Therapeutics)、JCAR017(Juno Therapeutics)、JCAR018(Juno Therapeutics)、JCAR020(Juno Therapeutics)、JCAR023(Juno Therapeutics)、JCAR024(Juno Therapeutics)、CTL019(Novartis)、KTE-C19(Kite Pharma)、BPX-401(Bellicum Pharmaceuticals)、BPX-501(Bellicum Pharmaceuticals)、BPX-601(Bellicum Pharmaceuticals)、bb2121(Bluebird Bio)、CD-19睡美人细胞(Ziopharm Oncology)、UCART19(Cellectis)、UCART123(Cellectis)、UCART38(Cellectis)、UCARTCS1(Cellectis)、0XB-302(Oxford BioMedica)、MB-101(Mustang Bio)和由Innovative Cellular Therapeutics开发的CAR T细胞。

[0764] 在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与一种或多种多发性硬化(MS)治疗剂组合用于治疗MS的方法中,所述MS治疗剂包括但不限于3-干扰素、醋酸格拉替雷、T-干扰素、IFN- $\beta$ -2(美国专利公布号2002/0025304)、螺旋锗(例如N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二甲基-8-锗螺[4:5]癸烷、N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二乙基-8-锗螺[4:5]癸烷、N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二丙基-8-锗螺[4:5]癸烷和N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二丁基-8-锗螺[4:5]癸烷)、维生素D类似物(例如1,25(OH)2D3(参见例如美国专利号5,716,946))、前列腺素(例如拉坦前列素(latanoprost)、溴莫尼定(brimonidine)、PGE1、PGE2和PGE3,参见例如美国专利公布号2002/0004525)、四环素和衍生物(例如米诺环素(minocycline)和多西环素(doxycycline),参见例如美国专利公布号

20020022608)、VLA-4结合抗体(参见例如美国专利公布号2009/0202527)、促肾上腺皮质激素、皮质类固醇、强的松(prednisone)、甲基强的松(methylprednisone)、2-氯脱氧腺苷、米托蒽醌、柳氮磺胺吡啶(sulphasalazine)、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、富马酸盐、抗CD20抗体(例如利妥昔单抗(rituximab))和盐酸泰札尼啶(tizanidine hydrochloride)。

[0765] 在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与治疗MS的一种或多种症状或副作用的一种或多种治疗剂组合使用。此类剂包括但不限于金刚胺、巴氯芬(baclofen)、罂粟碱(papaverine)、美克洛嗪(meclizine)、羟嗪、磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole)、环丙沙星(ciprofloxacin)、多库酯(docusate)、匹莫林(pemoline)、丹曲林(dantrolene)、去氨加压素(desmopressin)、地塞米松(dexamethasone)、托特罗定(tolterodine)、苯妥英(phenytoin)、奥昔布宁(oxybutynin)、比沙可啶(bisacodyl)、文拉法辛(venlafaxine)、阿米替林(amitriptyline)、六亚甲基四胺(methenamine)、氯硝西泮(clonazepam)、异烟肼(isoniazid)、伐地那非(vardenafil)、呋喃妥英(nitrofurantoin)、车前子亲水胶浆(psyllium hydrophilic mucilloid)、前列地尔(alprostadil)、加巴喷丁(gabapentin)、去甲替林(nortriptyline)、帕罗西汀(paroxetine)、溴丙胺太林(propantheline bromide)、莫达非尼(modafinil)、氟西汀(floxetine)、非那吡啶(phenazopyridine)、甲基强的松龙(methylprednisolone)、卡马西平(carbamazepine)、丙咪嗪(imipramine)、地西泮(diazepam)、西地那非(sildenafil)、安非他酮(bupropion)和舍曲林(sertraline)。

[0766] 在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与本文所描述的一种或多种疾病修饰疗法(DMT)(例如,表A的剂)组合用于治疗多发性硬化的方法中。在一些实施方案中,本发明提供了与使用本文所描述的一种或多种DMT(例如,下表中列出的剂)而不使用一种或多种所公开的结合剂相比有所改善的治疗效果。在一个实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂与所述一种或多种DMT的组合产生了协同治疗效果。

[0767] 说明性疾病修饰疗法

[0768]

| 通用名称                      | 商标名称/公司                                            | 频率/递送途径/常用剂量                                                           |
|---------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 特立氟胺                      | AUBAGIO<br>(GENZYME)                               | 每天; 口服丸剂; 7 mg 或 14 mg.                                                |
| 干扰素 $\beta$ -1a           | AVONEX (BIOGEN IDEC)                               | 每周一次; 肌肉内(向肌肉中)注射; 30 mcg                                              |
| 干扰素 $\beta$ -1b           | BETASERON (BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.) | 每隔一天; 皮下(皮肤下)注射; 250 mcg.                                              |
| 醋酸格拉替雷                    | COPAXONE (TEVA NEUROSCIENCE)                       | 每天; 皮下(皮肤下)注射; 20 mg (20,000 mcg)或者每周三次; 皮下(皮肤下)注射; 40 mg (40,000 mcg) |
| 干扰素 $\beta$ -1b           | EXTAVIA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)           | 每隔一天; 皮下(皮肤下)注射; 250 mcg.                                              |
| 芬戈莫德                      | GILENYA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)           | 每天; 口服胶囊; 0.5 mg.                                                      |
| 阿仑单抗(抗 CD52 单克隆抗体)        | LEMTRADA (GENZYME)                                 | 静脉内输液连续五天, 然后在一年后静脉内输液连续三天 (12 mg)                                     |
| 米托蒽醌                      | NOVANTRONE (EMD SERONO)                            | 一年四次在医疗机构中静脉内输液。终生累积剂量界限是 2-3 年内大约 8-12 个剂量(140 mg/m <sup>2</sup> )。   |
| 聚乙二醇化干扰素 $\beta$ -1a      | PLEGRIDY (BIOGEN IDEC)                             | 每 14 天; 皮下(皮肤下)注射; 125 mcg                                             |
| 干扰素 $\beta$ -1a           | REBIF (EMD SERONO, INC.)                           | 每周三次; 皮下(皮肤下)注射; 44 mcg                                                |
| 富马酸二甲酯 (BG-12)            | TECFIDERA (BIOGEN IDEC)                            | 每天两次; 口服胶囊; 120 mg 持续一周, 此后 240 mg                                     |
| 那他珠单抗(人源化单克隆抗体 VLA-4 拮抗剂) | TYSABRI (BIOGEN IDEC)                              | 在注册的输液机构中每四周静脉内输液一次; 30 mg                                             |
| 开发中的 DMT                  |                                                    |                                                                        |
| 阿米洛利(靶向酸敏感离子通道 1 上)       | PAR PHARMACEUTICAL                                 | 口服                                                                     |

[0769]

|                                                                                                                                                           |                                                     |                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 皮钠通道 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交换剂)                                                                                                                 | , PERRIGO<br>COMPANY,<br>SIGMAPHARM<br>LABORATORIES |                                              |
| ATX-MS-1467 (使<br>II 类主要组织相容<br>性复合体 T 细胞<br>应答靶向髓鞘碱性<br>蛋白)                                                                                              | APITOPE / MERCK<br>SERONO                           | 皮内皮下                                         |
| BAF312 (靶向鞘<br>氨醇 1-磷酸盐<br>(S1P)受体亚型<br>S1P1 和 S1P5 B 细<br>胞分布 T 细胞分<br>布)                                                                                | NOVARTIS PHARMA                                     | 口服                                           |
| BGC20-0134 (靶向<br>促炎性和抗炎性细<br>胞因子)                                                                                                                        | BTG PLC                                             | 口服                                           |
| BIIB033 (靶向<br>LINGO-1 (“含有富<br>亮氨酸重复序列和<br>免疫球蛋白样结构<br>域的 Nogo 受体相<br>互作用蛋白”))                                                                           | BIOGEN                                              | 第 I 期和第 II 期试验使用静脉<br>内输液, 第 I 期试验使用皮下<br>注射 |
| 克拉屈滨(靶向<br>CD4 <sup>+</sup> T 细胞 DNA<br>合成和修复 E-选<br>择素细胞内粘附分<br>子 1 促炎性细胞因<br>子白介素 2 和白介<br>素 2R 促炎性细胞<br>因子白介素 8 和<br>RANTES 细胞因<br>子分泌单核细胞和<br>淋巴细胞移动) | MERCK SERONO                                        | 口服                                           |
| 环磷酰胺(靶向 T<br>细胞, 特别是<br>CD4 <sup>+</sup> 辅助 T 细胞<br>B 细胞)                                                                                                 | BAXTER<br>HEALTHCARE<br>CORPORATION                 | 口服, 每个月一次静脉内冲击                               |
| 达克珠单抗(靶向<br>T 细胞的 CD25 免<br>疫调节剂的人源化<br>单克隆抗体)                                                                                                            | BIOGEN<br>IDEC/ABBVIE<br>BIOTHERAPEUTICS            | 计划每个月一次肌肉内注射                                 |
| 达氟吡啶(靶向电                                                                                                                                                  | ACORDA                                              | 每 12 小时一片(延长释放), 每                           |

[0770]

|                                                                                                                                                 |                                   |                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
| 压门控钾通道退化蛋白/含有亚单位 Cav $\beta$ 3 的上皮钠通道 L 型钙通道)                                                                                                   | THERAPEUTICS / BIOGEN IDEC        | 天两次 10 mg                                     |
| 屈大麻酚(靶向大麻素受体 CB1 大麻素受体 CB2)                                                                                                                     | ABBVIE INC.                       | 口服                                            |
| 非拉司特(靶向 $\alpha$ 4 $\beta$ 1 整合素)                                                                                                               | GLAXOSMITHKLINE                   | 口服                                            |
| GNbAC1MSRV-Env (靶向 MS 相关逆转录病毒的包膜蛋白)                                                                                                             | GENEURO SA / SERVIER              | 静脉内输液                                         |
| 艾地苯醌(靶向反应性氧物质)                                                                                                                                  | SANTHERA PHARMACEUTICALS          | PPMS 的临床试验中的口服剂量是每天 2250 mg (750 mg 剂量, 每天三次) |
| Imilecleucel-T (靶向髓磷脂特异性自身反应性 T 细胞)                                                                                                             | OPEXA THERAPEUTICS / MERCK SERONO | 根据得自制造商的信息, 每年皮下给药 5 次                        |
| 拉喹莫德                                                                                                                                            | TEVA                              | 预计每天服用 0.6 mg 或 1.2 mg 口服片剂                   |
| 马赛替尼(靶向 KIT (干细胞因子, 也称为 c-KIT)受体以及选择其他酪氨酸激酶肥大细胞)                                                                                                | AB SCIENCE                        | 口服                                            |
| MEDI-551 (靶向 CD19, 即 B 细胞特异性抗原, 它是 B 细胞受体复合物的一部分并且功能在于决定 B 细胞激活的阈值; B 细胞; 浆母细胞; 表达 CD19 (但不表达 CD20)并且分泌大量抗体的 B 细胞; 浆母细胞的耗竭可用于涉及病原性自身抗体的自身免疫性疾病) | MEDIMMUNE                         | 静脉内皮下                                         |
| 米诺环素(靶向 T 细胞、小胶质细                                                                                                                               | 各不相同                              | 可作为微粒填充胶囊和口服悬浮液口服                             |

[0771]

|                                                                                |                                 |                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|
| 胞、白细胞移动基质金属蛋白酶)                                                                |                                 |                                            |
| MIS416 (靶向先天免疫系统, 先天免疫系统的病原体相关分子模式识别受体、先天免疫系统的骨髓细胞, 可能能够重建 SPMS 中发生的失调的免疫系统活性) | INNATE<br>IMMUNOTHERAPEUTICS    | 静脉内                                        |
| 霉酚酸酯(靶向嘌呤合成)                                                                   | 由 GENENTECH 制造                  | 口服                                         |
| 纳曲酮(靶向阿片受体 Toll 样受体 4)                                                         | 各不相同                            | 以低剂量(每天 3 至 4.5 mg)呈口服形式“低剂量纳曲酮”(或“LDN”)给药 |
| 奥瑞珠单抗和奥法木单抗(靶向 CD20 B 细胞阻抑的人源化单克隆抗体)                                           | ROCHE / GSK                     | 计划静脉内输液                                    |
| ONO-4641 (靶向鞘氨醇 1-磷酸盐受体)                                                       | ONO<br>PHARMACEUTICAL<br>CO.    | 口服                                         |
| 苯妥英(靶向钠通道)                                                                     | PFIZER                          | 静脉内肌肉内(不太受欢迎的选项)口服                         |
| 芬奈莫德 (Ponesimod)                                                               | ACTELION                        | 有待确定                                       |
| 雷特格韦(靶向逆转录病毒整合酶疱疹病毒 DNA 包封末端酶)                                                 | MERCK                           | 根据得自制造商的信息, 每天两次口服 400 mg 片剂               |
| RHB-104                                                                        | REDHILL<br>BIOPHARMA<br>LIMITED | 95 mg 克拉霉素, 45 mg 利福布丁和 10 mg 氯法齐明         |
| 利鲁唑(靶向谷氨酸能神经传递谷氨酸摄取和释放电压门控钠通道蛋白激酶 C)                                           | COVIS PHARMA /<br>SANOFI        | 口服                                         |

[0772] MS疾病进展在疾病进展的初期阶段可能是最密集并且最具破坏性的。因此, 与许多报销政策和根据例如成本和副作用减轻观点的医生实践相反, 用最密集DMT开始治疗, 例如所谓的第二线疗法可能对患者的长期疾病状态最有益。在一些实施方案中, 用所述PD-1或PD-L1结合剂与第二线疗法组合的方案来治疗患者。使用这种组合来降低一种或多种第

二线疗法的副作用特性。在一些实施方案中,使用所述组合来降低一种或多种二线疗法的剂量或施用频率。举例来说,在所述组合的情形下,上文提供的表中列出的剂的剂量可以减少约50%、或约40%、或约30%、或约25%,和/或给药频率可以降至往常的一半或往常的三分之一,或者可以从例如每天一次减至每隔一天一次或每周一次、从每隔一天一次减至每周一次或每两周一次、从每周一次减至每两周一次或每个月一次等等。因此,在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂通过允许更方便的治疗方案而增加了患者依从性。此外,一些DMT有建议终生剂量限制,例如,对于米托蒽醌,终生累积剂量应当严格限制在140mg/m<sup>2</sup>,或者治疗2至3年。在一些实施方案中,补充所述PD-1或PD-L1结合剂通过允许这种DMT的较低或较少频率给药来保证患者有权使用米托蒽醌。

[0773] 在一些实施方案中,所述患者是还没有接受利用一种或多种DMT的治疗的未治疗患者,并且所述PD-1或PD-L1结合剂是用于缓冲二线疗法的副作用。因此,所述未治疗患者在疾病最初时能够受益于二线疗法的长期益处。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂用作使用二线疗法之前的进入疗法。举例来说,所述PD-1或PD-L1结合剂可以施用约3个月的初步治疗周期以稳定疾病,然后所述患者可以过渡至二线剂的维持疗法。

[0774] 总体上认为未治疗患者与已经接受过一种或多种DMT并且可能失败了的患者相比更可能对疗法作出应答。在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂可用于已经接受过一种或多种DMT并且可能失败了的患者。举例来说,在一些实施方案中,所述PD-1或PD-L1结合剂增加了在已经接受过一种或多种DMT并且可能失败了的患者中的治疗效果,并且可能允许这些患者像未治疗患者那样应答。

[0775] 在一些实施方案中,所述患者已经接受或正在接受利用一种或多种DMT的治疗并且应答不佳。举例来说,所述患者可能对一种或多种DMT无感受或应答不良。在一些实施方案中,所述患者可能对以下一者或多者无感受或应答不良:特立氟胺(AUBAGIO(GENZYME));干扰素 $\beta$ -1a(AVONEX(BIOGEN IDEC));干扰素 $\beta$ -1b(BETASERON(BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.));醋酸格拉替雷(COPAXONE(TEVA NEUROSCIENCE));干扰素 $\beta$ -1b(EXTAVIA(NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.));芬戈莫德(GILENYA(NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.));阿仑单抗(LEMTRADA(GENZYME));米托蒽醌(NOVANTRONE(EMD SERONO));聚乙二醇化干扰素 $\beta$ -1a(PEGASYS(BIOGEN IDEC));干扰素 $\beta$ -1a(REBIF(EMD SERONO, INC.));富马酸二甲酯(BG-12)(TECFIDERA(BIOGEN IDEC));和那他珠单抗(TYSABRI(BIOGEN IDEC))。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂在患者中获得了一种或多种DMT的治疗益处,并且因此减轻或消除了对所述DMT的无应答。举例来说,这可以免除利用一种或多种DMT以较高剂量或频率对患者进行治疗。

[0776] 在患有更具侵袭性的疾病的患者中,一种方法是诱导治疗模型,其中首先将给予具有强功效但存在强安全性隐患的疗法,然后给予维持疗法。这种模型的一个实例可以包括利用阿仑单抗进行初步治疗,然后是IFN- $\beta$ 、GA或BG-12。在一些实施方案中,使用一种或多种所公开的结合剂以防止需要变换维持疗法。在一些实施方案中,使用一种或多种所公开的结合剂作为一种或多种DMT,包括二线疗法的维持疗法。在一些实施方案中,使用一种或多种所公开的结合剂作为第一疗法用于诱导,然后进行作为维持疗法的另一种DMT,例如第一线疗法。

[0777] 在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以施用约3个月的初步治疗周

期以稳定疾病,然后所述患者可以过渡至第一线剂的维持疗法。

[0778] 在各个实施方案中,使用一种或多种所公开的结合剂来减轻DMT,包括但不限于本文公开的任何剂的一种或多种副作用。举例来说,一种或多种所公开的结合剂可以用于方案中而允许剂量节约一种或多种DMT并且因此使得较少副作用。举例来说,在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻AUBAGIO或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用可以包括头发稀疏、腹泻、流感、恶心、肝脏检验异常和手部或足部罕见性麻木或刺痛(感觉异常)、能增加感染风险的白细胞水平;血压增高;和严重肝脏损伤。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻AVONEX或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括注射后的流感样症状、抑郁、轻微贫血、肝脏异常、过敏反应和心脏问题。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻BETASERON或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、过敏反应、抑郁、肝脏异常和低白细胞计数。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻COPAXONE或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括注射部位反应、血管舒张(血管膨胀);胸痛;注射后立即出现的反应,包括焦虑、胸痛、心悸、气短和面部潮红。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻EXTAVIA或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、过敏反应、抑郁、肝脏异常和低白细胞计数。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻GILENYA或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括头痛、流感、腹泻、背痛、肝脏酶升高、咳嗽、第一个剂量后心率减缓、感染和眼部肿胀。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻LEMTRADA或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括皮疹、头痛、发烧、鼻充血、恶心、尿路感染、疲劳、失眠、上呼吸道感染、荨麻疹、瘙痒、甲状腺病症、真菌感染、关节、四肢和背部疼痛、腹泻、呕吐、面部潮红和输液反应(包括恶心、荨麻疹、瘙痒、失眠、寒战、面部潮红、疲劳、气短、味觉变化、消化不良、眩晕、疼痛)。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻NOVANTRONE或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括施用后24小时尿液呈蓝绿色;感染、骨髓阻抑(疲劳、瘀伤、低血细胞计数)、恶心、头发稀疏、膀胱感染、口腔溃疡以及严重肝脏和心脏损伤。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻PLEGRIDY或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、抑郁、轻微贫血、肝脏异常、过敏反应和心脏问题。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻REBIF或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、肝脏异常、抑郁、过敏反应和低红细胞或白细胞计数。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻TECFIDERA或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括面部潮红(热觉或瘙痒和皮肤泛红)、胃肠问题(恶心、腹泻、腹痛)、皮疹、尿蛋白、肝酶升高;和血液淋巴细胞(白细胞)计数减少。在一些实施方案中,一种或多种所公开的结合剂可以减轻TYSABRI或相关剂的一种或多种副作用,所述副作用包括头痛、疲劳、尿路感染、抑郁、呼吸道感染、关节疼痛、胃部不适、腹部不适、腹泻、阴道炎、臂痛或腿痛、皮疹、输液两小时内的过敏或超敏反应(眩晕、发烧、皮疹、瘙痒、恶心、面部潮红、低血压、呼吸困难、胸痛)。

[0779] 在一些实施方案中,本发明涉及利用WO 2013/10779、WO 2015/007536、WO 2015/007520、WO 2015/007542和WO 2015/007903中所描述的一种或多种嵌合剂的组合疗法,所述文献的全部内容特此以引用的方式整体并入。

[0780] 在一些实施方案中,包括但不限于感染性疾病应用,本发明涉及抗感染剂作为其他治疗剂。在一些实施方案中,所述抗感染剂是抗病毒剂,包括但不限于阿巴卡韦(Abacavir)、阿昔洛韦(Acyclovir)、阿德福韦(Adefovir)、安普那韦(Amprenavir)、阿扎那韦(Atazanavir)、西多福韦(Cidofovir)、达芦那韦(Darunavir)、地拉韦啉(Delavirdine)、去羟肌苷(Didanosine)、多可沙诺(Docosanol)、依非韦仑(Efavirenz)、埃替格韦(Elvitegravir)、恩曲他滨(Emtricitabine)、恩福韦地(Enfuvirtide)、依曲韦林(Etravirine)、泛昔洛韦(Famciclovir)和膦甲酸盐(Foscarnet)。在一些实施方案中,抗感染剂是抗菌剂,包括但不限于头孢菌素类抗生素(头孢胺苄(cephalexin)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢羟胺苄(cefadroxil)、头孢唑林(cefazolin)、头孢噻吩(cephalothin)、头孢克洛(cefaclor)、头孢孟多(cefamandole)、头孢西丁(cefoxitin)、头孢丙烯(cefprozil)和头孢托罗酯(ceftobiprole));氟喹诺酮类抗生素(fluoroquinolone antibiotics)(环丙沙星(cipro)、左氟沙星(Levaquin)、氧氟沙星(floxin)、加替沙星(tequin)、莫西沙星(avelox)和诺氟沙星(norflox));四环素类抗生素(四环素、米诺环素(minocycline)、羟四环素(oxytetracycline)和去氧环素(doxycycline));青霉素类抗生素(阿莫西林(amoxicillin)、胺苄西林(ampicillin)、青霉素V、双氯西林(dicloxacillin)、羧苄西林(carbenicillin)、万古霉素(vancomycin)和甲氧西林(methicillin));单酰胺环类抗生素(胺曲南(aztreonam));以及碳青霉烯类抗生素(厄他培南(ertapenem)、多尼培南(doripenem)、亚胺培南(imipenem)/西司他丁(cilastatin)和美罗培南(meropenem))。在一些实施方案中,抗感染剂包括抗疟药(例如氯喹(chloroquine)、奎宁(quinine)、甲氟喹(mefloquine)、伯胺喹(primaquine)、去氧环素(doxycycline)、蒿甲醚(artemether)/苯茛醇(lumefantrine)、阿托伐醌(atovaquone)/氯胍(proguanil)和磺胺多辛(sulfadoxine)/乙胺嘧啶(pyrimethamine))、甲硝唑(metronidazole)、替硝唑(tinidazole)、伊维菌素(ivermectin)、双羟萘酸噻嘧啶(pyrantel pamoate)和阿苯达唑(albendazole)。

[0781] 在一些实施方案中,包括但不限于自身免疫应用,所述其他治疗剂是免疫抑制剂。在一些实施方案中,所述免疫抑制剂是消炎剂,诸如类固醇类消炎剂或非类固醇类消炎剂(NSAID)。类固醇,特别是肾上腺皮质类固醇及其合成类似物在本领域中是众所周知的。可用于本发明中的皮质类固醇的实例包括但不限于羟基曲安西龙(hydroxyltriamcinolone)、 $\alpha$ -甲基地塞米松(alpha-methyl-dexamethasone)、 $\beta$ -甲基地塞米松、二丙酸倍氯米松(beclomethasone dipropionate)、苯甲酸倍他米松(betamethasone benzoate)、二丙酸倍他米松、戊酸倍他米松、戊酸氯倍他素(clobetasol valerate)、地奈德(desonide)、去羟米松(desoxymethasone)、地塞米松(dexamethasone)、二乙酸二氟拉松(diflorasone diacetate)、戊酸二氟可龙(difluocortolone valerate)、氟氢缩松(fludrenolone)、氟氯奈德(fluclorolone acetonide)、特戊酸氟美松(flumethasone pivalate)、氟轻松(flucortolone acetonide)、醋酸氟轻松(flucortone butylester)、氟可龙(flucortolone)、醋酸氟泼尼定(fluprednidene/fluprednylidene)、氟氢缩松(flurandrenolone)、哈西奈德(halcinonide)、醋酸氢化可的松(hydrocortisone acetate)、丁酸氢化可的松(hydrocortisone butyrate)、甲泼尼龙(methylprednisolone)、曲安奈德(triamcinolone acetonide)、可的松(cortisone)、可托

多松(cortodoxone)、醋酸氟轻松、氟氢可的松(fludrocortisone)、二醋酸二氟拉松(difluorosone diacetate)、丙酮化氟雄诺龙(fluradrenolone acetonide)、甲羟松(medrysone)、安西缩松(amcinafel)、安西非特(amcinafide)、倍他米松及其相应酯、氯泼尼松(chloroprednisone)、氯可托龙(clocortelone)、克西诺龙(clescinalone)、二氯松(dichlorisone)、二氟泼尼酯(difluprednate)、氟氯奈德(flucoronide)、氟尼缩松(flunisolid)、氟米龙(fluoromethalone)、氟培龙(fluperolone)、氟泼尼龙(fluprednisolone)、氢化可的松(hydrocortisone)、甲泼尼松(meprednisone)、帕拉米松(paramethasone)、泼尼松龙(prednisolone)、泼尼松(prednisone)、二丙酸倍他米松。可以用于本发明中的(NASID)包括但不限于水杨酸、乙酰水杨酸、水杨酸甲酯、乙二醇水杨酸酯、水杨酰胺、苯甲基-2,5-二乙酰氧基苯甲酸、布洛芬(ibuprofen)、舒林酸(fulindac)、萘普生(naproxen)、酮洛芬(ketoprofen)、依托芬那酯(etofenamate)、保泰松(phenylbutazone)和吲哚美辛(indomethacin)。在一些实施方案中,所述免疫抑制剂可以是细胞抑制剂,诸如烷化剂、抗代谢物(例如硫唑嘌呤、甲氨蝶呤)、细胞毒性抗生素、抗体(例如巴利昔单抗(basiliximab)、达克珠单抗(daclizumab)和莫罗单抗(muromonab))、抗免疫亲和素(anti-immunophilin)(例如环孢素(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司(sirolimus))、干扰素、阿片类、TNF结合蛋白、霉酚酸酯以及小生物剂(例如芬戈莫德、多球壳素(myriocin))。其他消炎剂描述于例如美国专利号4,537,776中,所述文献的完整内容特此以引用方式并入。

[0782] 在一些实施方案中,本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂包括经过修饰的衍生物,即通过将任何类型的分子共价附接至该组合物以使得共价附接不会妨碍该组合物的活性。举例来说但不限于,衍生物包括通过特别是糖基化、脂化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、利用已知的保护基团/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、连接至细胞配体或其他蛋白质等进行修饰的组合物。可以利用已知技术,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等进行多种化学修饰中的任一种。

[0783] 在其他实施方案中,本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂还包含细胞毒性剂,在说明性实施方案中,所述细胞毒性剂包含毒素、化疗剂、放射性同位素以及引起细胞凋亡或细胞死亡的剂。此类剂可以与本文所描述的组合物缀合。

[0784] 因此,本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂可以经历翻译后修饰以添加效应子部分,诸如化学接头;可检测部分,诸如荧光染料、酶、底物、生物发光材料、放射性材料和化学发光部分;或功能性部分,诸如链霉亲和素、抗生物素蛋白、生物素、细胞毒素、细胞毒性剂和放射性材料。

[0785] 说明性细胞毒性剂包括但不限于甲氨蝶呤、氨基蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪;烷化剂,诸如氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、丝裂霉素C、洛莫司汀(CCNU)、1-甲基亚硝基脲、环磷酰胺、氮芥、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C、顺-二氯二胺铂(II)(DDP)、顺铂和卡铂(伯尔定);蒽环霉素,包括佐柔比星(先前的道诺霉素)、多柔比星(阿霉素)、地托比星、卡米诺霉素、伊达比星、表柔比星、米托蒽醌和比生群;抗生素,包括放线菌素D(dactinomycin/actinomycin D)、博来霉素、刺孢霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC);以及抗有丝分裂剂,诸如长春生物碱类(vinca alkaloid)、长春新碱(vincristine)和长春花碱(vinblastine)。其他细胞毒性剂包括太平

洋紫杉醇(紫杉醇)、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、吉西他滨、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴乙锭、依米丁(emetine)、依托泊苷、替尼泊苷、秋水仙素、二羟基蒽二酮、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、丙卡巴肼、羟基脲、天冬酰胺酶、皮质类固醇、米托坦(0,P'-(DDD))、干扰素,以及这些细胞毒性剂的混合物。

[0786] 其他细胞毒性剂包括但不限于化疗剂,诸如卡铂、顺铂、太平洋紫杉醇、吉西他滨、刺孢霉素、多柔比星、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素C、放线菌素D、环磷酰胺、长春新碱、博来霉素、VEGF拮抗剂、EGFR拮抗剂、铂、紫杉醇、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、亚叶酸、类固醇、环磷酰胺、美法仑、长春生物碱类(例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨)、莫司汀类、酪氨酸激酶抑制剂、放射疗法、性激素拮抗剂、选择性雄激素受体调节剂、选择性雌激素受体调节剂、PDGF拮抗剂、TNF拮抗剂、IL-1拮抗剂、白介素(例如IL-12或IL-2)、IL-12R拮抗剂、毒素缀合的单克隆抗体、肿瘤抗原特异性单克隆抗体、爱必妥(Erbix)、阿瓦斯丁(Avastin)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、抗CD20抗体、美罗华(Rituxan)、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、DXL625、HERCEPTIN®或它们的任何组合。来自植物和细菌的有毒酶,诸如蓖麻毒素、白喉毒素和假单胞菌毒素可以与这些治疗剂(例如抗体)缀合以产生细胞类型特异性杀伤试剂(Youle等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5483(1980);Gilliland等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:4539(1980);Krolick等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5419(1980))。

[0787] 其他细胞毒性剂包括如Goldenberg在美国专利号6,653,104中所描述的细胞毒性核糖核酸酶。本发明的实施方案还涉及放射免疫缀合物,其中在使用或不使用复合物形成剂的情况下,发射 $\alpha$ 或 $\beta$ 粒子的放射性核种稳定偶合至PD-1或PD-L1结合剂。此类放射性核素包括 $\beta$ -发射体,诸如磷-32、钷-47、铜-67、镓-67、钇-88、钇-90、碘-125、碘-131、钷-153、镱-177、铈-186或铈-188;以及 $\alpha$ 发射体,诸如砒-211、铅-212、铋-212、铋-213或钋-225。

[0788] 说明性可检测部分还包括但不限于辣根过氧化物酶、乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和荧光素酶。其他说明性荧光材料包括但不限于罗丹明、荧光素、异硫氰酸荧光素、伞形酮、二氯三嗪基胺、藻红蛋白和丹磺酰氯。其他说明性化学发光部分包括但不限于鲁米诺。其他说明性生物发光材料包括但不限于荧光素和水母发光蛋白。其他说明性放射性材料包括但不限于碘-125、碳-14、硫-35、氚和磷-32。

#### [0789] 治疗方法

[0790] 本文所描述的方法和组合物可应用于治疗各种疾病和病症,包括但不限于癌症、感染、免疫病症和炎症性疾病或疾患。

[0791] 另外,任何本发明的剂都可以用于治疗各种疾病和病症,或制造用于治疗各种疾病和病症的药物,所述疾病和病症包括但不限于癌症、感染、免疫病症、炎症性疾病或疾患,以及自身免疫性疾病。

[0792] 在一些实施方案中,本发明涉及对患癌患者的治疗或患癌患者。如本文所使用,癌症是指可能干扰身体器官和系统的正常功能的任何不受控制的细胞生长,并且包括原发性和转移性肿瘤两种。原发性肿瘤或癌症从其原始位置迁移并且种在重要器官可以通过受影响器官的功能减退而最终导致受试者死亡。转移是由于癌细胞从原发性肿瘤播散至身体其他部分而在远离原发性肿瘤位置出现的一个癌细胞或一组癌细胞。转移最终可能导致受试者死亡。举例来说,癌症可以包括良性和恶性癌症、息肉、增生以及休眠肿瘤或微转移。

[0793] 可以治疗的说明性癌症包括但不限于基底细胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨癌；脑和中枢神经系统癌症；乳腺癌；腹膜癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌（包括胃肠癌）；成胶质细胞瘤；肝癌；肝细胞瘤；上皮内赘瘤；肾脏癌或肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌）；黑素瘤；骨髓瘤；成神经细胞瘤；口腔癌（唇、舌、口和咽）；卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌症；唾液腺癌；肉瘤；皮肤癌；鳞状细胞癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫或子宫内膜癌；泌尿系统癌症；外阴癌；淋巴瘤，包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤，以及B细胞淋巴瘤（包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤（NHL）；小淋巴细胞性（SL）NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性NHL；高级成免疫细胞性NHL；高级成淋巴细胞性NHL；高级小非核裂细胞NHL；巨大肿块性NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；慢性淋巴细胞性白血病（CLL）；急性成淋巴细胞性白血病（ALL）；急性骨髓性白血病（AML）；毛细胞性白血病；慢性成髓细胞性白血病；以及其他癌瘤和肉瘤；和移植后淋巴组织增生性病症（PTLD），以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生、水肿（例如，与脑肿瘤相关的水肿）和梅格斯氏综合征。

[0794] 在各个实施方案中，本发明提供了供治疗癌症用的PD-1或PD-L1结合剂，所述PD-1或PD-L1结合剂是嵌合体的一部分，所述嵌合体还包含经修饰的信号传导剂。在一些实施方案中，本发明的PD-1或PD-L1结合剂显著减小和/或消除肿瘤。在一些实施方案中，本发明的PD-1或PD-L1结合剂当与其他抗癌剂诸如化疗剂、检查点抑制剂和免疫抑制剂组合施用至受试者时显著减小和/或消除肿瘤。在各个实施方案中，PD-1或PD-L1结合剂与其他抗癌剂的组合协同减小肿瘤大小和/或消除肿瘤细胞。

[0795] 在各个实施方案中，本发明涉及利用PD-1或PD-L1结合剂的癌症组合疗法，所述PD-1或PD-L1结合剂是嵌合体的一部分，所述嵌合体包含一个或多个靶向部分和一种或多种经修饰的信号传导剂。因此，本发明提供了包括例如针对PD-1或PD-L1的靶向部分和一种或多种信号转导剂的嵌合或融合蛋白及其与抗癌剂组合的用途。

[0796] 举例来说，在各个实施方案中，本发明有关于癌症组合疗法，所述癌症组合疗法涉及本文所描述的PD-1或PD-L1结合剂与经修饰的信号传导剂，包括但不限于突变的人干扰素诸如IFN $\alpha$ ，包括人干扰素 $\alpha$ 2的嵌合体。

[0797] 在一些实施方案中，本发明涉及对患有微生物感染和/或慢性感染的患者的治疗，或患有微生物感染和/或慢性感染的患者。说明性感染包括但不限于HIV/AIDS，结核病、骨髓炎、乙型肝炎、丙型肝炎、爱波斯坦-巴尔病毒（Epstein-Barr virus）或细小病毒、T细胞白血病病毒、细菌过度生长综合征、真菌或寄生虫感染。

[0798] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗或预防一种或多种炎症性疾病或疾患，诸如炎症、急性炎症、慢性炎症、呼吸道疾病、动脉粥样硬化、再狭窄、哮喘、过敏性鼻炎、特异性皮炎、脓毒性休克、类风湿性关节炎、炎症性肠病、炎症性盆腔病、疼痛、眼部炎症性疾病、乳糜泻、莱氏综合征（Leigh Syndrome）、甘油激酶缺乏症、家族性嗜酸性粒细胞增多症（FE）、常染色体隐性痉挛性共济失调、喉部炎症性疾病；结核病、慢性胆囊炎、支气管扩张、硅肺病和其他尘肺病。

[0799] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗或预防一种或多种自身免疫性和/或神经退行性疾病或疾患，诸如MS、糖尿病、狼疮、乳糜泻、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、

格林-巴利综合征 (Guillain-barre syndrome)、硬皮病、古德帕斯彻氏综合征 (Goodpasture's syndrome)、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、自身免疫性癫痫、拉斯马森氏脑炎 (Rasmussen's encephalitis)、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、艾迪森氏病 (Addison's disease)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、纤维肌痛症、美尼尔氏综合征 (Menier's syndrome); 移植排斥 (例如预防同种异体移植排斥)、恶性贫血、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、皮肤炎、修格连氏综合征 (Sjogren's syndrome)、红斑狼疮、重症肌无力、瑞特氏综合征 (Reiter's syndrome)、格雷夫氏病 (Grave's disease) 和其他自身免疫性疾病。

[0800] 在各个实施方案中, 本发明用于治疗或预防各种自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病。在一些实施方案中, 所述自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病选自MS (包括但不限于本文所描述的亚型)、阿尔茨海默氏病 (包括但不限于早期发作阿尔茨海默氏病、晚期发作阿尔茨海默氏病和家族性阿尔茨海默氏病 (FAD)、帕金森氏病和帕金森症 (包括但不限于特发性帕金森氏病、血管帕金森症、药物诱发的帕金森症、路易体痴呆、遗传性帕金森氏病、青少年帕金森氏病)、亨廷顿氏病、肌萎缩性侧索硬化 (ALS, 包括但不限于偶发性ALS、家族性ALS、西太平洋ALS、青少年ALS、西拉玛雅病 (Hiramaya Disease))。

#### [0801] 药盒

[0802] 本发明还提供了用于施用本文所描述的任何PD-1或PD-L1结合剂 (例如具有或没有其他治疗剂) 的药盒。所述药盒是包括至少一种本文所描述的本发明药物组合物在内的材料或组分的组合体。因此, 在一些实施方案中, 所述药盒含有至少一种本文所描述的药物组合物。

[0803] 配置在药盒中的组分的确切特性取决于其预定目的。在一个实施方案中, 所述药盒被配置用于治疗人受试者的目的。

[0804] 在所述药盒中可以包括使用说明书。使用说明书典型地包括有形表示, 其描述了使用所述药盒的组分实现所期望的治疗结果, 诸如治疗癌症时将要采用的技术。任选地, 所述药盒还含有本领域技术人员容易了解的其他有用组分, 诸如稀释剂、缓冲剂、药学上可接受的载体、注射器、导管、敷涂器、吸移工具或测量工具、包扎材料或其他有用的附件。

[0805] 装配在药盒中的材料和组分可以提供给从业人员, 以保持其可操作性和效用的任何便利且适合的方式储存。举例来说, 这些组分可以在室温、冷藏温度或冷冻温度下提供。这些组分典型地包含在合适的包装材料中。在各个实施方案中, 包装材料是由众所周知的方法构造, 优选地以提供无菌、无污染的环境。包装材料可以具有指示所述药盒和/或其组分的内含物和/或目的的外部标签。

#### [0806] 定义

[0807] 如本文所使用, “一个/一种 (a/an)” 或 “所述 (the)” 可以意指一个或多于一个。

[0808] 此外, 术语 “约” 当与引用的数值指示结合使用时意指所引用的数值指示加或减所述引用的数值指示的至多10%。举例来说, 语言 “约50” 覆盖45至55的范围。

[0809] “有效量” 当与医学用途结合使用时是有效提供目标疾病的发病率的可测量治疗、预防或降低的量。

[0810] 如本文所使用, 如果活性和/或效应的读出在剂或刺激物存在下相对于不存在此类调节降低了显著量, 诸如降低了至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少

约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或更多、多达并且包括至少约100%,那么某性质“降低”。如本领域普通技术人员所理解,在一些实施方案中,活性降低并且一些下游读出将降低但其他下游读出可以增加。

[0811] 相反地,如果活性和/或效应的读出在剂或刺激物存在下相对于不存在此类剂或刺激物增加了显著量,例如增加了至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或更多、多达并且包括至少约100%或更多、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍,那么活性“增加”。

[0812] 如本文所提及,除非另外规定,否则全部组成百分比都以总组合物的重量计。如本文所使用,词语“包括”及其变化形式旨在是非限制性的,使得在列表中对项目的列举不应排除也可以用于这项技术的组合物和方法中的其他类似项目。类似地,术语“可以(can/may)”及其变化形式旨在是非限制性的,使得一个实施方案可以包含某些要素或特征的列举不排除本发明技术的不含有那些要素或特征的其他实施方案。

[0813] 尽管开放性的术语“包含”作为术语诸如包括、含有或具有的同义词在本文中用以描述和要求本发明,但本发明或其实施方案可以可选地使用替代性术语如“由……组成”或“基本上由……组成”加以描述。

[0814] 如本文所使用,词语“优选的”和“优选地”是指所述技术的在某些情况下提供某些益处的实施方案。然而,其他实施方案在相同或其他情况下也可以是优选的。此外,列举一个或多个优选实施方案不意指其他实施方案是无用的,并且不打算将其他实施方案从所述技术的范围中排除。

[0815] 用于实现治疗效果所需要的本文所描述的组合物量可以出于特定目的根据常规程序凭经验确定。一般来说,对于出于治疗目的而施用治疗剂而言,治疗剂是以药理学有效剂量给予。“药理学有效量”、“药理学有效剂量”、“治疗有效量”或“有效量”是指足以产生所期望的生理效应的量或能够实现所期望的结果、特别是用于治疗病症或疾病的量。如本文所使用,有效量将包括足以例如延迟病症或疾病的症状的发展、改变病症或疾病的症状的过程(例如,减缓疾病的症状的进展)、减少或消除病症或疾病的一种或多种症状或表现形式,以及逆转病症或疾病的症状的量。治疗益处还包括中断或减缓潜在疾病或病症的进展,无关于是否实现了改善。

[0816] 有效量、毒性和治疗功效可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中测定,例如测定LD50(约50%群体的致死剂量)和ED50(在约50%群体中具有治疗有效性的剂量)。剂量可以取决于所用剂型和所用施用途径而变化。毒性与治疗效果之间的剂量比率是治疗指数并且可以表示为比率LD50/ED50。在一些实施方案中,展现较大治疗指数的组合物和方法是优选的。治疗有效剂量最初可以由体外测定(包括例如细胞培养物测定)加以估算。此外,剂量可以在动物模型中配制以实现包括如在细胞培养物中或在适当动物模型中测定的IC50的循环血浆浓度范围。所描述的组合物在血浆中的含量可以例如通过高效液相色谱法加以测量。任何特定剂量的效应都可以通过合适的生物测定来监测。剂量可以由医师确定并且根据需要调整以适应观察到的治疗效果。

[0817] 在某些实施方案中,效应将引起至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约

50%、至少约70%或至少约90%的可定量变化。在一些实施方案中,效应将引起约10%、约20%、约30%、约50%、约70%或甚至约90%或更大的可定量变化。治疗益处还包括中断或减缓潜在疾病或病症的进展,无关于是否实现了改善。

[0818] 如本文所使用,“治疗方法”同样适用于组合物用于治疗本文所描述的疾病或病症的用途和/或组合物用于制造用以治疗本文所描述的疾病或病症的药物的一种和/或多种用途。

[0819] 实施例

[0820] 术语“AcTaferon”(AFN)在本文中有时用于指代基于干扰素的嵌合体。

[0821] 在以下实施例中,除非另外指明,否则IFN的突变是相对于人IFN- $\alpha$ 2的突变。

[0822] 实施例1. 单特异性人嵌合体的人PD-1或PD-L1靶向效率

[0823] 通过基于FACS的STAT1磷酸化定量检测了包含PD-1或PD-L1抗体的人AcTaferon $\alpha$ 的靶向效率。具体而言,在原代外周血单核细胞(PBMC)、转染的Hek293T细胞(对于PD-1靶向)或人乳腺癌细胞系MDA-MB-321(对于PD-L1靶向)中分析靶向。使用以下抗体:

[0824] 抗PD-1抗体:

[0825] -Pem: 喷罗珠单抗/Keytruda(Merck)

[0826] -Niv: 纳武单抗/Opdivo(BMS)

[0827] 抗PD-L1抗体:

[0828] -Ate: 阿特朱单抗/Tecentriq/MPDL3280(Roche/Genetech)

[0829] -Dur: 度伐鲁单抗/MEDI4736(Celgene/AstraZeneca)

[0830] -Ave: 阿维鲁单抗/MSB0010718C(Merck/Pfizer)

[0831] -Bms: BMS-936559/MDX-1105(BMS)

[0832] 本文其他部分描述了这些抗体的序列。特别地对于抗PD-L1 BMS-936559/MDX-1105抗体,将该抗体的可变结构域移植到通用IgG上。因此,用于本文提供的方法中的BMS-936559或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1242的重链可变区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:1243的轻链可变区。

[0833] 在将可变结构域移植到人IgG上之后,获得了以下重链和轻链序列:

[0834] 重链: SEQ ID NO:1244

[0835] 轻链: SEQ ID NO:1245

[0836] 在pMTW表达载体中经由柔性20\*GGG接头将各抗体重链基因融合至hIFNa2\_R149序列(例如,具有R149A突变的人IFN- $\alpha$ 2)(所得载体:pMTW-SIgK-重链-(GGG)<sub>20</sub>-hIFNa2\_R149A-GGS-(His)<sub>9</sub>。在相同载体中克隆轻链(所得载体:pMTW-SIgK-轻链)。图1提供了克隆策略的示意图。根据标准方案,用25K PEI(聚乙烯亚胺)在FreeStyle 293-F细胞(ThermoFisher)中瞬时转染两个质粒,从而产生PD-L1 AFN。收获培养基,通过离心除去细胞并进行过滤灭菌。根据制造商的说明,使用Ni Excel树脂(GE Healthcare)纯化重组蛋白,并用PD-10柱(GE Healthcare)从样品中除去咪唑。

[0837] PD-L1 Ab-AFN与转染的Hek293T细胞结合

[0838] 使用磷酸钙用膜结合的PD-1或PD-L1转染Hek293T细胞。转染两天后,将细胞重新悬浮,并与PD-L1 Ab-AFN(1 $\mu$ g/ml, FACS缓冲液: PBS, 补充有2%FBS; 0.5 mM EDTA)一起在4 $^{\circ}$ C下孵育2小时。两次洗涤后,将细胞与FITC偶联的THE HIS抗体(GenScript; 在4 $^{\circ}$ C下孵育1

小时)一起孵育。利用CellQuest专业版4.0.2软件(BD Biosciences),用FACSCalibur仪器(BD Biosciences)测量结合。图2中的数据清楚地显示,PD-L1 AFN与经PD-L1转染的细胞选择性结合,而PD-1 AFN仅与表达PD-1的细胞结合。

[0839] PD-1靶向:外周血单核细胞(PBMC)中的pSTAT1

[0840] 使用Lymphoprep(StemCell Technologies)进行密度梯度离心,从健康供体的血沉棕黄层中分离出PBMC。将细胞用FACS缓冲液(2%FBS,0,5 mM EDTA,PBS溶液)洗涤两次,并在4℃下用FITC偶联的抗人PD-1(克隆PD-1.3.1.3;Miltenyi Biotec)染色20分钟。两次洗涤后,将细胞用连续稀释的PD-1 Ab-AFN在37℃下刺激15分钟。在固定(10分钟,37℃,固定缓冲液I;BD Biosciences)和透化(30分钟,在冰上,Perm III缓冲液I;BD Biosciences)以及洗涤后,将细胞用抗STAT1 pY701 Ab(BD Biosciences)染色。利用CellQuest专版4.0.2软件(BD Biosciences),用FACSCalibur(BD Biosciences)获取样品。图3中的数据 displays, 喷罗珠单抗和纳武单抗偶联的AcTaferon能够使PD-1阳性的PBMC中的STAT1磷酸化,而不能使PD-1阴性的PBMC的STAT1磷酸化。

[0841] PD-1-靶向:转染的Hek293T细胞中的pSTAT1

[0842] 使用磷酸钙用人PD-1或空载体转染Hek293T细胞。两天后,将细胞重新悬浮并用连续稀释的PD-1AFN刺激(15分钟;37℃)。如上所述对pSTAT1进行定量。图4中的数据示出,PD-1Ab AFN在表达PD-1的Hek293T细胞中有效诱导STAT1磷酸化,但在经MOCK转染的细胞中不能有效诱导。

[0843] PD-L1靶向:MDA-MB-231细胞中的pSTAT1

[0844] 在补充有10%FBS的DMEM培养基中,在37℃下将MDA-MB-321细胞用PD-(L)1AFN刺激15分钟。刺激后,如前所述定量pSTAT1。PD-L1偶联的而非PD-1偶联的AFN能够有效地使STAT1磷酸化,从而证明PD-L1的靶向效应(图5)。

[0845] 实施例2.人PD-1或PD-L1特异性VHH的构建和评估

[0846] 如本文其他部分所述,进行ELISA测定以评估各种PD-1 VHH对PD-1抗原的结合亲和力和。PD-1 VHH的亲和力呈现在以下表1中(参见A/对照列):

[0847] 表1

|        | 克隆     | 集合编号 | 家族 | ELISA  | ELISA  | A/控制    |
|--------|--------|------|----|--------|--------|---------|
|        |        |      |    | A      | 对照     |         |
| [0848] | 2PD23  | 6418 | 1  | 0.9399 | 0.2061 | 4.56041 |
|        | 2PD26  | 6419 | 1  | 0.7177 | 0.1708 | 4.20199 |
|        | 2PD90  | 6423 | 1  | 1.3425 | 0.2566 | 5.23188 |
|        | 2PD106 | 6424 | 1  | 1.462  | 0.2118 | 6.90274 |
|        | 2PD16  | 6417 | 2  | 1.8255 | 0.475  | 3.84316 |
|        | 2PD71  | 6421 | 2  | 2.5085 | 0.6984 | 3.59178 |
|        | 2PD152 | 6425 | 2  | 2.3148 | 0.3628 | 6.38037 |
|        | 2PD12  | 6416 | 3  | 3.8075 | 0.1775 | 21.4507 |
|        | 3PD55  | 6427 | 3  | 3.578  | 0.0886 | 40.3837 |

|        |       |      |   |        |        |         |
|--------|-------|------|---|--------|--------|---------|
| [0849] | 3PD82 | 6428 | 3 | 4      | 0.0886 | 45.1467 |
|        | 2PD8  | 6415 | 4 | 0.7629 | 0.2521 | 3.02618 |
|        | 2PD27 | 6420 | 4 | 1.1358 | 0.329  | 3.45228 |
|        | 2PD82 | 6422 | 5 | 2.9666 | 0.6775 | 4.37875 |
|        | 3PD36 | 6426 | 6 | 3.9512 | 0.0957 | 41.2874 |

[0850] 还通过ELISA评定了本文所描述的各种PD-L1 VHH对PD-L1抗原的结合亲和力。PD-L1 VHH的亲和力呈现在以下表2中(参见A/对照列)：

[0851] 表2

|        | 克隆      | 集合编号 | 家族 | ELISA<br>A | ELISA<br>对照 | A/控制    |
|--------|---------|------|----|------------|-------------|---------|
|        |         |      |    |            |             |         |
| [0852] | 2LIG2   | 6283 | 5  | 0.5099     | 0.1322      | 3.85703 |
|        | 2LIG3   | 6284 | 1  | 1.4632     | 0.15        | 9.75467 |
|        | 2LIG16  | 6285 | 3  | 3.0203     | 0.1144      | 26.4012 |
|        | 2LIG22  | 6286 | 6  | 0.4687     | 0.1031      | 4.54607 |
|        | 2LIG27  | 6287 | 1  | 0.4289     | 0.1134      | 3.78219 |
|        | 2LIG29  | 6288 | 2  | 3.772      | 0.109       | 34.6055 |
|        | 2LIG30  | 6289 | 7  | 1.1105     | 0.1158      | 9.58981 |
|        | 2LIG34  | 6290 | 1  | 0.5681     | 0.1581      | 3.5933  |
|        | 2LIG35  | 6291 | 2  | 0.8438     | 0.1031      | 8.18429 |
|        | 2LIG48  | 6292 | 3  | 4          | 0.1204      | 33.2226 |
|        | 2LIG65  | 6293 | 4  | 2.108      | 0.0892      | 23.6323 |
|        | 2LIG85  | 6294 | 10 | 2.6661     | 0.1182      | 22.5558 |
|        | 2LIG86  | 6295 | 9  | 3.803      | 0.1133      | 33.5658 |
|        | 2LIG89  | 6296 | 4  | 2.8804     | 0.106       | 27.1736 |
|        | 2LIG97  | 6297 | 1  | 1.0302     | 0.201       | 5.12537 |
|        | 2LIG99  | 6298 | 1  | 2.1105     | 0.2304      | 9.16016 |
|        | 2LIG109 | 6299 | 2  | 3.5455     | 0.1088      | 32.5873 |
|        | 2LIG127 | 6300 | 4  | 3.7303     | 0.1079      | 34.5718 |
|        | 2LIG139 | 6301 | 4  | 4          | 0.1202      | 33.2779 |
|        | 2LIG176 | 6302 | 11 | 0.4153     | 0.0983      | 4.22482 |
|        | 2LIG189 | 6303 | 7  | 2.2343     | 0.1726      | 12.945  |
|        | 3LIG3   | 6304 | 5  | 0.5797     | 0.081       | 7.15679 |
|        | 3LIG7   | 6305 | 2  | 3.6414     | 0.0968      | 37.6178 |
|        | 3LIG8   | 6306 | 1  | 0.4292     | 0.0978      | 4.38855 |
|        | 3LIG9   | 6307 | 2  | 3.6634     | 0.0972      | 37.6893 |
|        | 3LIG18  | 6308 | 4  | 3.505      | 0.0877      | 39.9658 |
|        | 3LIG20  | 6309 | 8  | 0.5131     | 0.1179      | 4.35199 |

|        |        |      |   |        |        |         |
|--------|--------|------|---|--------|--------|---------|
| [0853] | 3LIG28 | 6310 | 6 | 3.0276 | 0.0913 | 33.161  |
|        | 3LIG29 | 6311 | 2 | 3.9596 | 0.0967 | 40.9473 |
|        | 3LIG30 | 6312 | 3 | 4      | 0.0845 | 47.3373 |
|        | 3LIG33 | 6313 | 5 | 1.7581 | 0.0921 | 19.089  |

[0854] 还检测了PD-L1 VHH与转染的Hek293T细胞的结合。具体而言,将经人PD-L1转染的Hek293T细胞用PD-L1 VHH(2 $\mu$ g/ml;在4 $^{\circ}$ C下2小时)和FITC偶联的抗His抗体(GenScript;在4 $^{\circ}$ C下1小时)染色。利用CellQuest专业版4.0.2软件(BD Biosciences),用FACSCalibur仪器(BD Biosciences)测量结合。结合测定的结果显示在图6中。

[0855] 实施例3.对人PD-L1 VHH AcTaferon的表征

[0856] 在初步筛选抗人PD-L1 VHH抑制与PD-1的相互作用的能力后,选择以下PD-L1 VHH进行进一步表征:2LIG3(SEQ ID NO:287)、2LIG27(SEQ ID NO:290)、2LIG 97(SEQ ID NO:300)、2LIG99(SEQ ID NO:301)、3LIG8(SEQ ID NO:309)、2LIG189(SEQ ID NO:306)、and 2LIG176(SEQ ID NO:305)。

[0857] 将PD-L1 VHH 2LIG3、2LIG27、2LIG97、2LIG99、3LIG8、2L IG189和2LIG176克隆到pHEN6C表达载体中,如下所示:pHEN6C-Pe1B-PD-L1 VHH-(His)<sub>6</sub>。在IPTG刺激后在大肠杆菌中过夜产生蛋白质,并且根据制造商的说明使用TALON金属亲和树脂(Clontech)从周质提取物中纯化所述蛋白质。

[0858] 在平板结合测定中测试PD-L1 VHH对PD-1与PD-L1之间的相互作用的效应。使用PD-L1的C端FLAG标签和M2抗FLAG Ab(Sigma),将PD-L1的重组细胞外结构域在MaxiSorp平板(Nunc)上固定过夜。将板封闭(PBS+0.1%酪蛋白),并在存在或不存在连续稀释的VHH的情况下与hPD-1-hFc融合蛋白(SinoBiologics)一起孵育。洗涤后,使用HRP(辣根过氧化物酶)偶联的抗人Ab(Jackson ImmunoResearch)和TMB过氧化物酶底物(KPL)测量结合的PD-1。

[0859] 使用生物层干涉法以Octet RED96系统(FortéBio)测量PD-L1VHH对人和食蟹猴PD-L1的亲合力:将VHH固定在Penta-HIS(HIS1K)生物传感器(FortéBio)上并且浸入连续稀释的人PD-L1-Fc或食蟹猴PD-L1-Fc蛋白质(均得自SinoBiological)中。用Octet软件(FortéBio)计算亲合力。

[0860] 表3显示,所有测试的PD-L1 VHH均能够有效抑制PD-L1/PD-1相互作用。另外,所有PD-L1 VHH对人和食蟹猴PD-L1表现出相似的结合亲合力。

[0861] 表3

| 克隆      | K <sub>50</sub> 中和<br>PD1-PD1 (ng/ml) | 人 PD-L1 亲合力 |            |            | 食蟹猴 PD-L1 亲合力 |            |            | HL116 细胞中的 EC50<br>荧光素酶 (ng/ml) |
|---------|---------------------------------------|-------------|------------|------------|---------------|------------|------------|---------------------------------|
|         |                                       | KD (M)      | kon (1/Ms) | kdis (1/s) | KD (M)        | kon (1/Ms) | kdis (1/s) |                                 |
| 2LIG3   | 18.87                                 | 1.19E-09    | 3.73E+05   | 4.48E-04   | 8.90E-10      | 3.58E+05   | 3.18E-04   | 0.0220                          |
| 2LIG27  | 9.57                                  | 7.51E-09    | 4.72E+05   | 3.50E-03   | 8.74E-09      | 3.21E+05   | 2.80E-03   | 1.0380                          |
| 2LIG97  | 4.81                                  | 4.35E-09    | 4.23E+05   | 1.98E-03   | 9.16E-09      | 3.19E+05   | 2.93E-03   | 1.1100                          |
| 2LIG99  | 6.21                                  | 8.75E-10    | 7.29E+05   | 6.34E-04   | 1.01E-09      | 5.84E+05   | 5.85E-04   | 0.0062                          |
| 3LIG8   | 12.79                                 | 8.77E-09    | 4.84E+05   | 4.19E-03   | 5.98E-09      | 5.12E+05   | 3.05E-03   | 0.2400                          |
| 2LIG189 | 8.81                                  | 3.03E-09    | 1.74E+05   | 5.24E-04   | 3.80E-09      | 1.14E+05   | 4.37E-04   | 0.4900                          |
| 2LIG176 | 5.68                                  | 6.87E-09    | 1.18E+06   | 8.05E-03   | 1.13E-08      | 5.08E+05   | 5.73E-03   | 0.2300                          |

[0863] 然后将PD-L1 VHH(即,2LIG3、2LIG27、2LIG97、2LIG99、3LIG8、2LIG189和2LIG176)克隆到pHEN6C表达载体中呈Actaferon (AFN)形式(即,pHEN6C-Pe1B-PD-L1\_VHH-(GGG)<sub>20</sub>-

hIFNa2\_R149A-GGS-(His)<sub>6</sub>,其中PD-L1\_VHH选自2LIG3、2LIG27、2LIG97、2LIG99、3LIG8、2LIG189和2LIG176)。在IPTG刺激后在大肠杆菌中过夜产生蛋白质,并且根据制造商的说明使用TALON金属亲和树脂(Clontech)从周质提取物中纯化所述蛋白质。

[0864] 在亲本HL116细胞(用p6-16荧光素酶报告子稳定转染的IFN应答细胞系)上测量生物活性。将细胞接种过夜,并在存在或不存在过量(20 $\mu$ g/ml)相应VHH的情况(后者用以模仿未靶向的情况)下,用连续稀释的PD-L1 AFN刺激6小时。在EnSight多模式酶标仪(Perkin Elmer)上测量荧光素酶活性。

[0865] 如图7A-图7G所示,所有被格式化为AcTaferon的PD-L1 VHH都能够在HL116细胞中诱导IFN荧光素酶报告子。通过比较在存在过量的未连接至IFN部分的各相应PD-L1 VHH的情况下的荧光素酶报告子活性来评定AcTaferon活性的特异性(参见图7A-图7G)。

#### [0866] 实施例4. 人PD-L1抗体AcTaferon的体外功效

[0867] 选择单克隆抗体阿特朱单抗(Ate)(靶向PD-L1的单克隆抗体)作为示例来评估干扰素活性对靶向细胞的特异性。

[0868] 阿特朱单抗获自InVivogen。如下生成阿特朱单抗\_hIFNa2(R149A)(Ate-IFNa2mut):在pMTW表达载体中经由柔性20\*GGS接头将Ab重链基因融合至hIFNa2\_R149序列(所得载体:pMTW-SIgK-重链-(GGS)<sub>20</sub>-hIFNa2\_R149A-GGS-(His)<sub>9</sub>。在相同载体中克隆轻链(所得载体:pMTW-SIgK-轻链)。根据制造商的指南,将两种质粒共转染到ExpiCHO细胞(ThermoFisher)中。使用Ni Sepharose excel树脂(GE Healthcare)从培养基中纯化所得的Ate-IFNa2mut。使用与先前实施例3中所述相同的测定法,在体外使用过量的阿特朱单抗(Ate)(50 $\mu$ g/ml)证明Ate-IFNa2mut的效应,从而证明特异性(参见图8)。

[0869] 图8显示Ate-IFNa2mut能够在HL116细胞中诱导IFN荧光素酶报告子。通过比较在存在过量的未连接至IFN部分的阿特朱单抗(Ate)的情况下的荧光素酶报告子活性来评定Ate-IFNa2mut活性的特异性。

#### [0870] 实施例5. 人PD-L1抗体AcTaferon的体内功效

[0871] 选择PD-L1 VHH 2LIG99以评估靶向人PD-L1 VHH的AcTaferon(AFN)的体内抗肿瘤功效。

[0872] 具有人源化免疫系统的小鼠中的人RL滤泡性淋巴瘤细胞系(RL)肿瘤模型:具有人源化免疫系统的小鼠是根据以下方案生成的。在使用Lymphoprep进行密度梯度离心后从HLA-A2+人脐带血样品中收集单核细胞。随后通过MACS技术分离人CD34+造血干细胞(HSC),并使用FACS检测CD34+纯度和CD3+污染。然后在经历100cGy下的清髓性辐射治疗的2-3天龄NSG小鼠中肝内注射CD34纯度>80%的HSC。在HSC注射后8-12周,使用FACS以全白细胞人和小鼠CD45标记物分析人细胞移植,并选择总活血淋巴细胞中有>5%的人CD45细胞的小鼠来进行肿瘤植入。在HSC注射后12周,给小鼠皮下注射2 $\times 10^6$ 个RL肿瘤细胞。五天后,通过每天腹膜注射F1t3L来治疗小鼠直至第18天。自肿瘤注射后的第9天(当肿瘤已经达到约10mm<sup>2</sup>的大小时)起,通过每天病灶周围施用开始利用PBS(对照物)或基于2LIG99的AFN(即,包含与hIFNa2\_R149A连接的2LIG99的AFN)的治疗。

[0873] 如图9所示,基于2LIG99的AFN具有体内抗肿瘤效应。

#### [0874] 实施例6. 人PD-1AcTaferon的体外功效

[0875] 通过在FACS中定量经PD-1或空载体转染的Hek293T细胞中的STAT1磷酸化,检测

AcTaferon (AFN) 对人PD-1 (程序性死亡-1) 的靶向效率。

[0876] 选择了两种不同的PD-1 VHH进行分析：

[0877] 102C3：

[0878] QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSIFSIIHAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGITYYEDSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAADRAESSWYDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:1246)；和

[0879] 102C12：

[0880] QVQLQESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSIIASIIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRF  
TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:1247)。

[0881] 将这些PD-1 VHH克隆到AcTaferon (AFN) 中：将AFN克隆到pHEN6C表达载体中，如下所示：pHEN6C-Pe1B-PD-1\_VHH- (GGG)<sub>20</sub>-hIFNa2\_R149A-GGS- (His)<sub>6</sub> (其中PD-1\_VHH是102C3或102C12；即，102C3 AFN和102C12 AFN)。在IPTG刺激后在大肠杆菌中过夜产生蛋白质，并且根据制造商的说明使用TALON金属亲和树脂 (Clontech) 从周质提取物中纯化所述蛋白质。

[0882] 使用标准磷酸钙技术，用空载体或人PD-1表达质粒转染Hek293T细胞。转染后两天，将细胞重新悬浮，用FACS缓冲液 (2% FBS, 1mM EDTA, PBS溶液) 洗涤两次，并在37°C下用连续稀释的102C3 AFN或102C12 AFN或野生型IFNa2 (阳性对照) 刺激15分钟。在固定 (10分钟, 37°C, 固定缓冲液I; BD Biosciences) 和透化 (30分钟, 在冰上, Perm III缓冲液; BD Biosciences) 以及洗涤后，将细胞用抗STAT1 pY701 Ab (BD Biosciences) 染色。利用CellQuest专业版4.0.2软件 (BD Biosciences)，在FACSCalibur (BD Biosciences) 上获取样品，并使用FlowJo软件 (FlowJo) 进行分析。

[0883] 在FACS中定量pSTAT1阳性细胞的百分比，并以浓度的函数作图。图10A-图10C显示，102C3 AFN和102C12 AFN在表达PD-1的Hek293T细胞中有效诱导STAT1磷酸化，但是在经MOCK转染的细胞中诱导程度低得多。这与野生型IFNa2相反，后者对经PD-1和MOCK转染的HEK293T细胞具有同等活性。

[0884] 等效方案

[0885] 尽管已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明，但应当理解，总体来说，按照本发明的原理，能够进行进一步修改并且本申请意在涵盖本发明的任何变化方案、用途或改编，并且包括如在本发明所属领域内的已知或惯用实践范围内和如可以应用于上文所阐述的基本特征和如在所附权利要求书范围内的对本公开的背离。

[0886] 本领域技术人员仅仅使用常规实验就将认识到或者能够确定本文具体描述的实施方案的众多等效方案。此类等效方案意图涵盖在以下权利要求书的范围内。

[0887] 以引用的方式并入

[0888] 本文引用的所有专利和出版物特此都以引用方式整体并入。

[0889] 本文讨论的出版物只提供其在本申请提交日期之前的公开内容。在本文中不应被解释为承认本发明由于在先发明而有权先于此类出版物。

[0890] 如本文所使用，所有标题都只用于组织，而非意在以任何方式限制本公开。任何个别部分的内容都可以同样适用于所有部分。

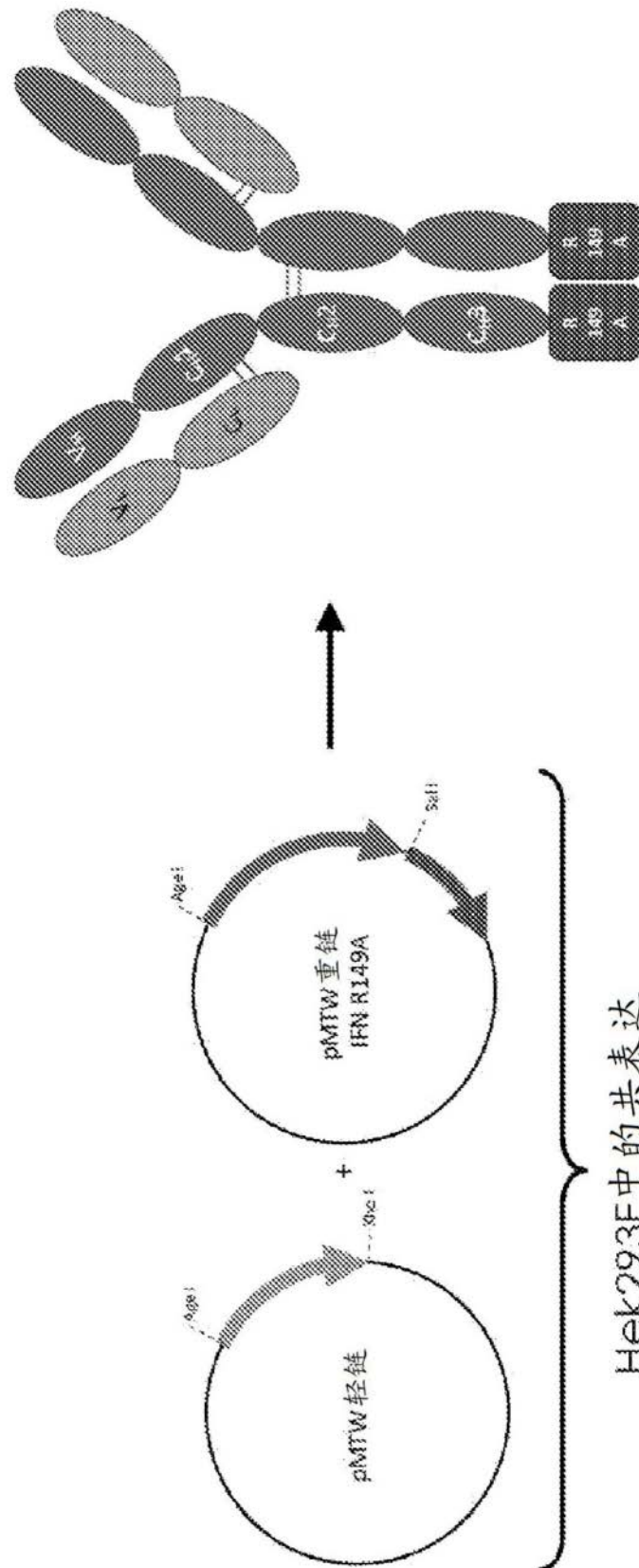
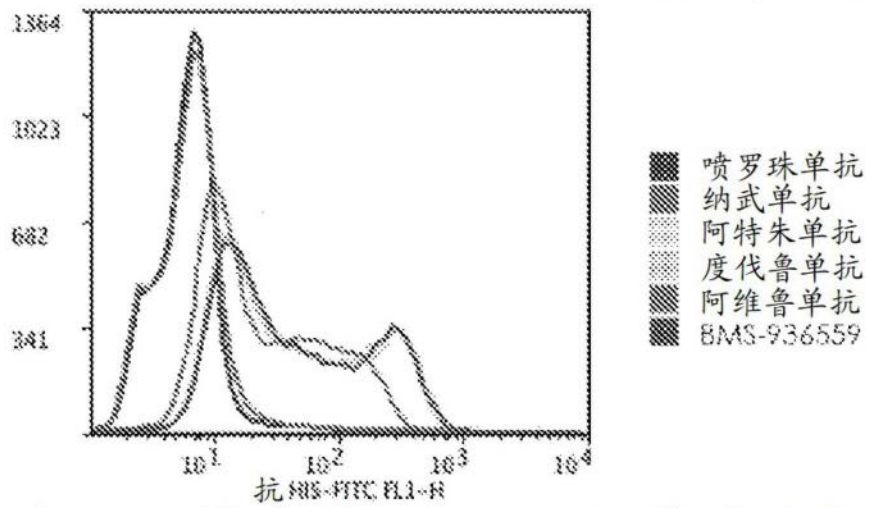


图1

## 与PD-L1转染的Hek293T细胞的结合



## 与PD-1转染的Hek293T细胞的结合

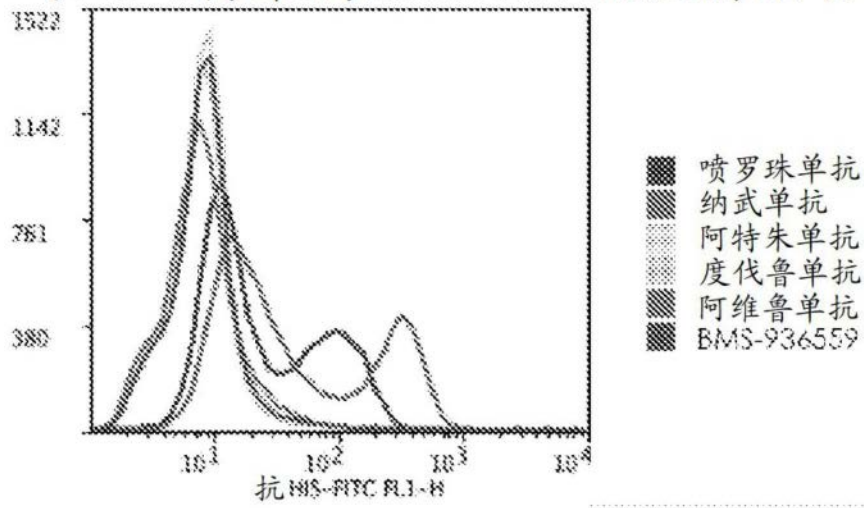


图2

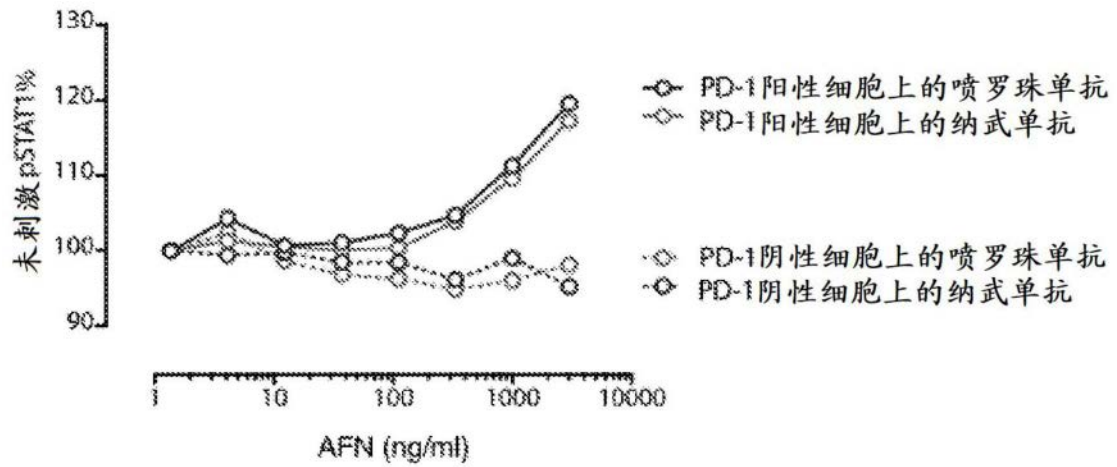


图3

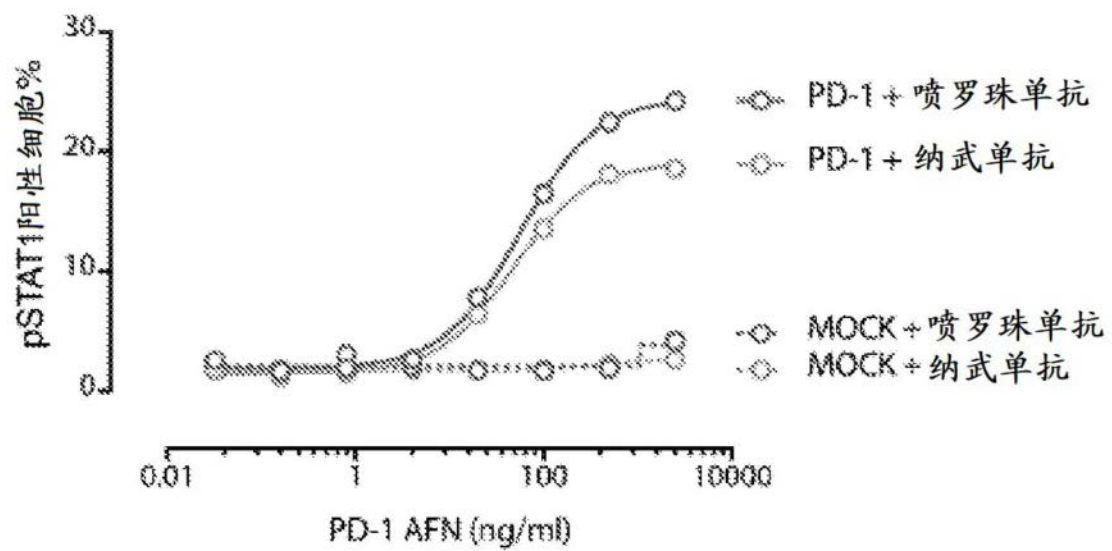


图4

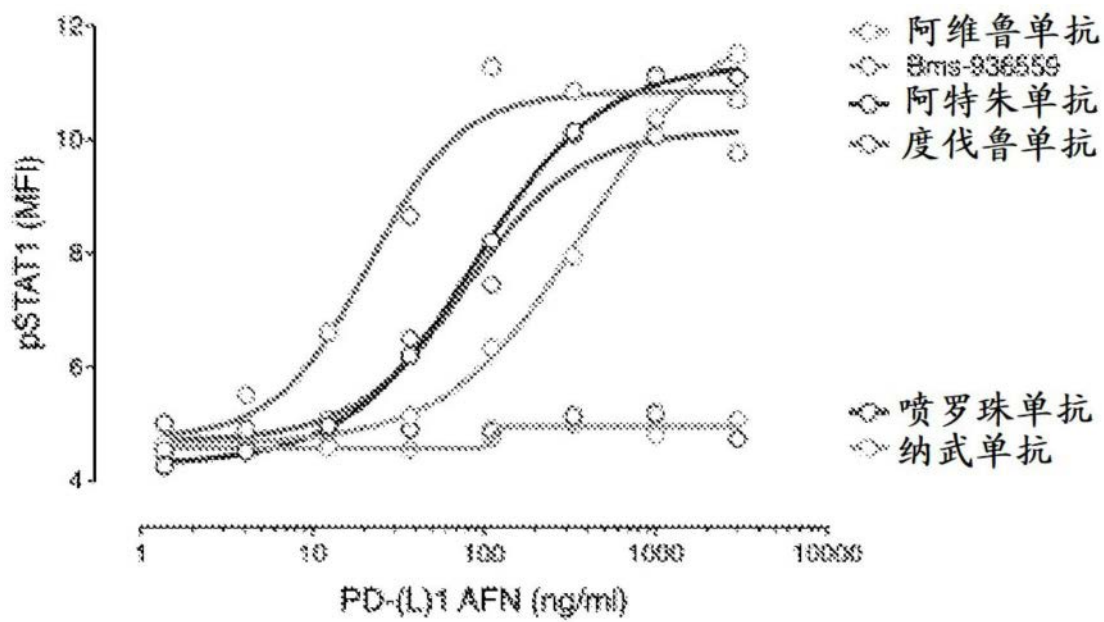


图5

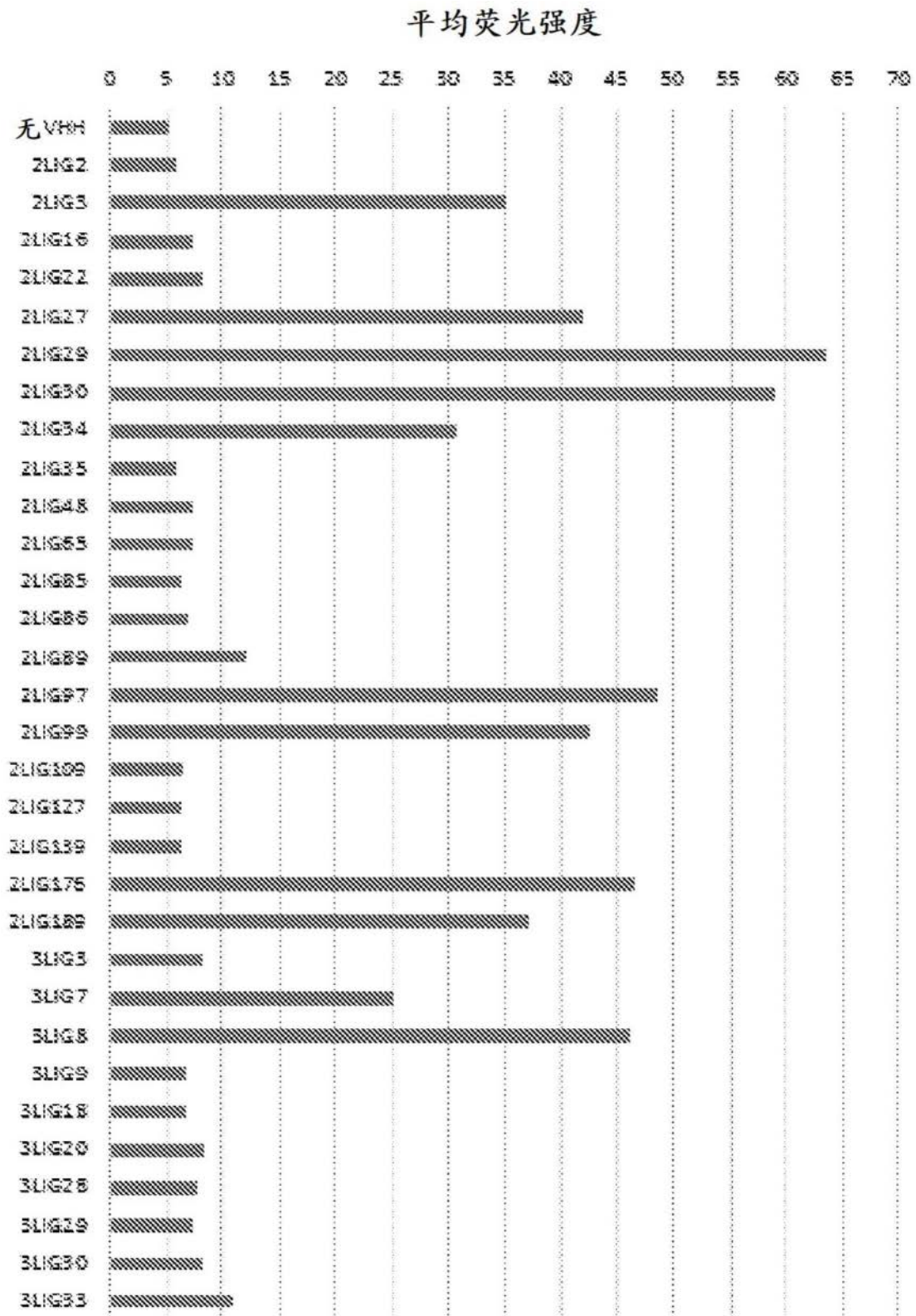


图6

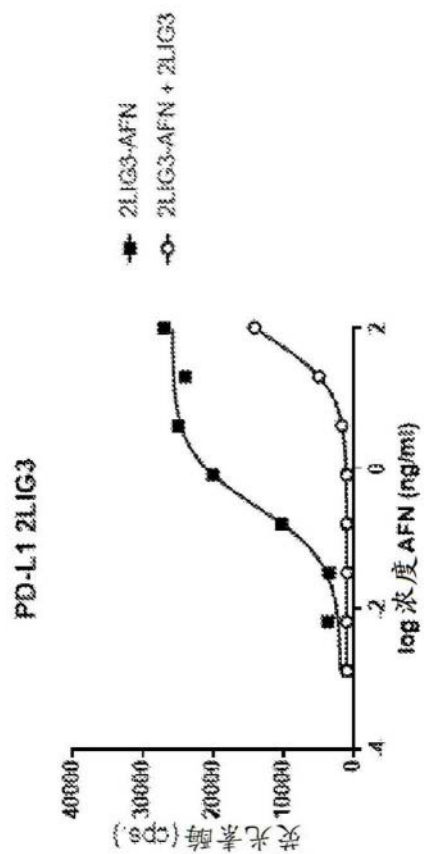


图7A

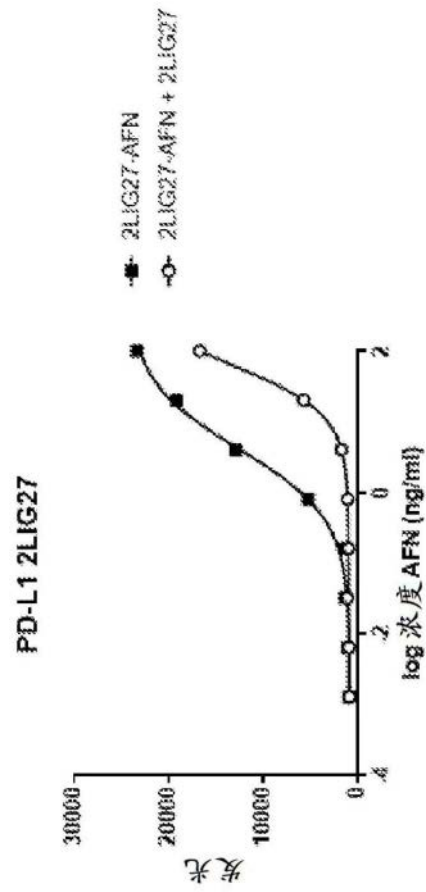


图7B

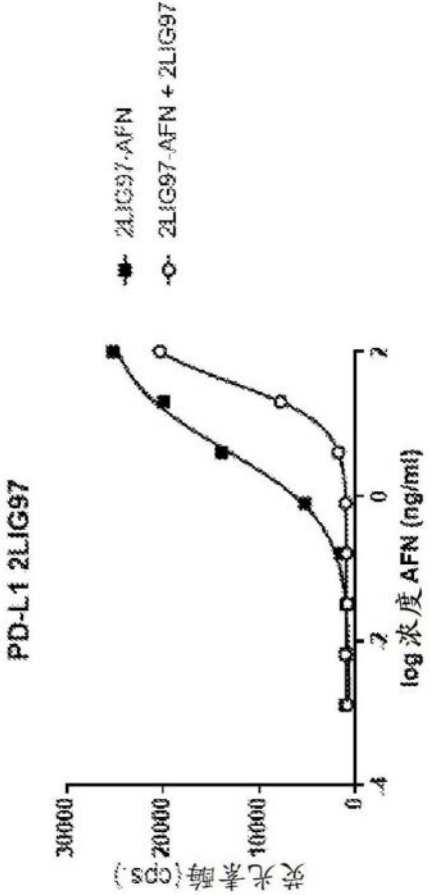


图7C

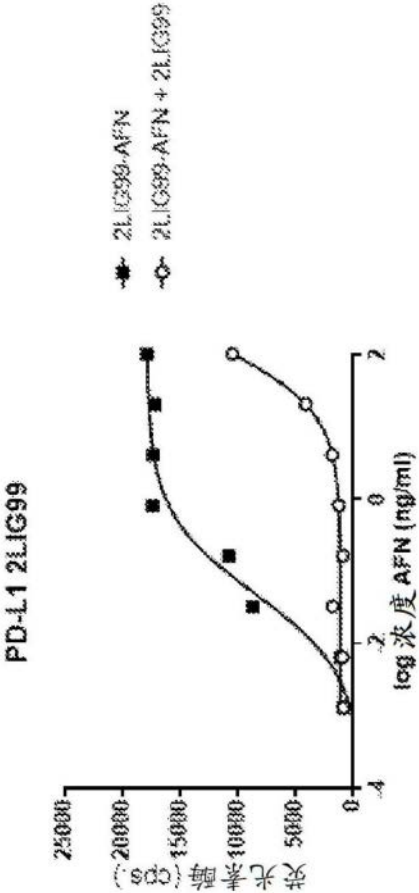


图7D

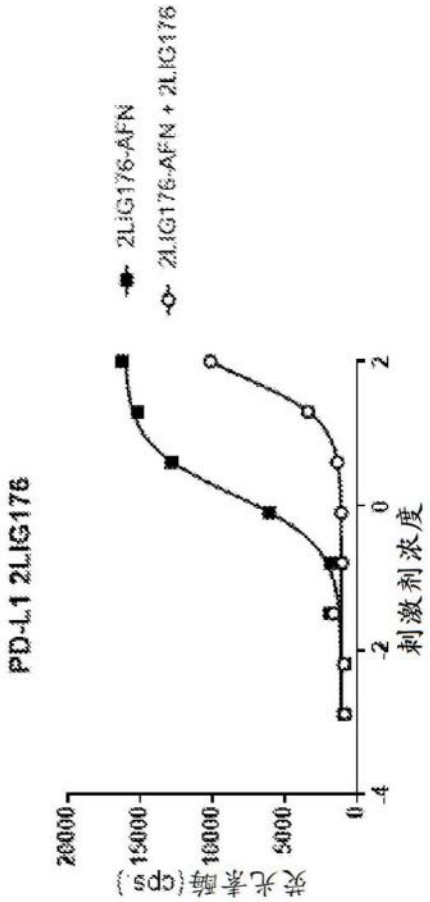


图7E

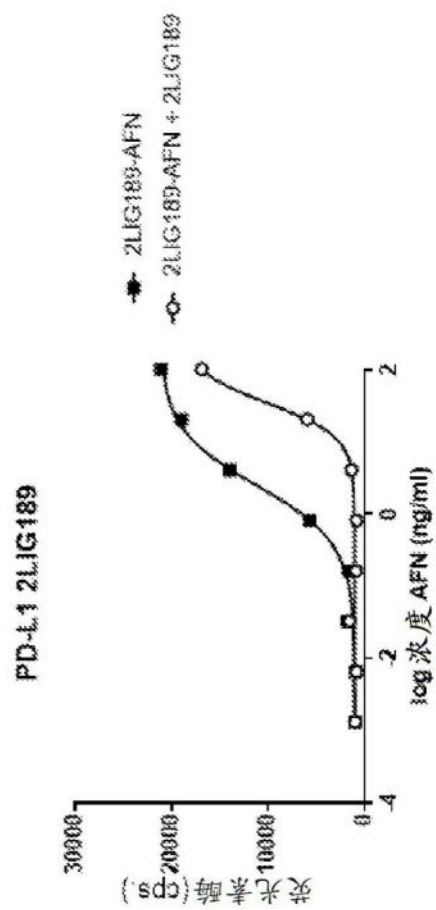


图7F

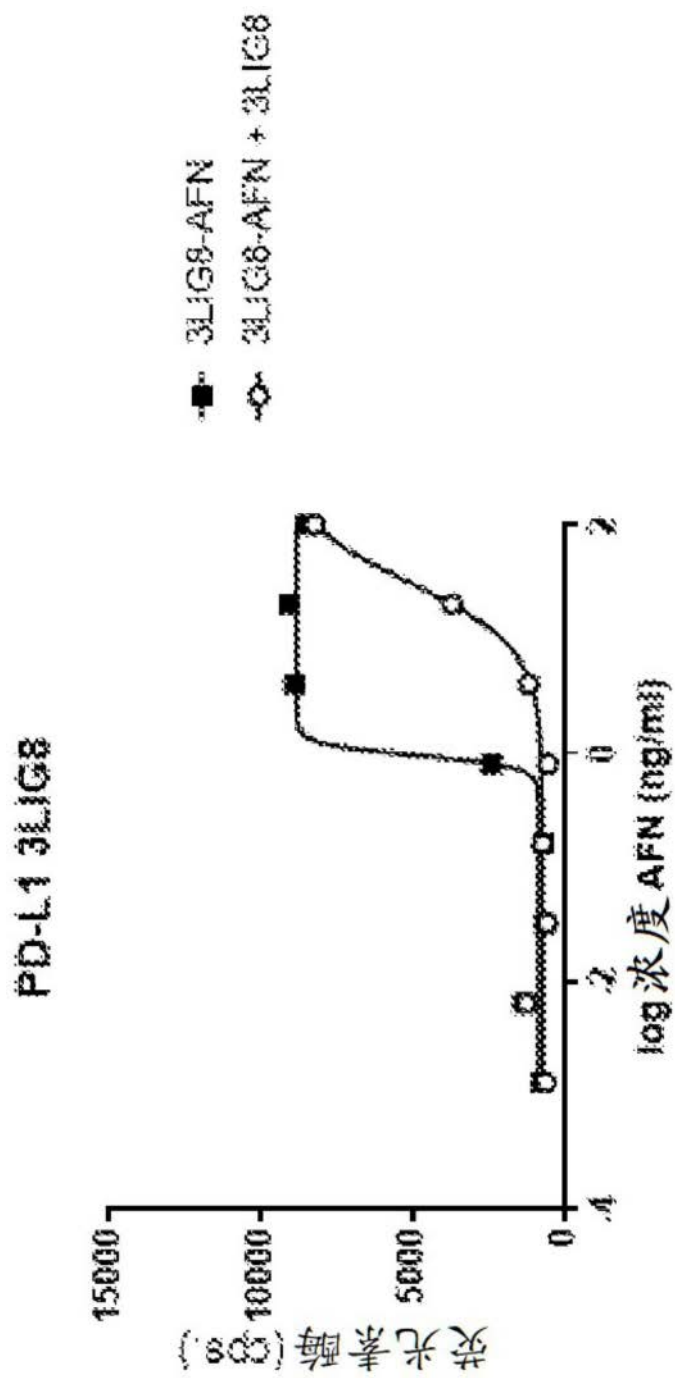


图7G

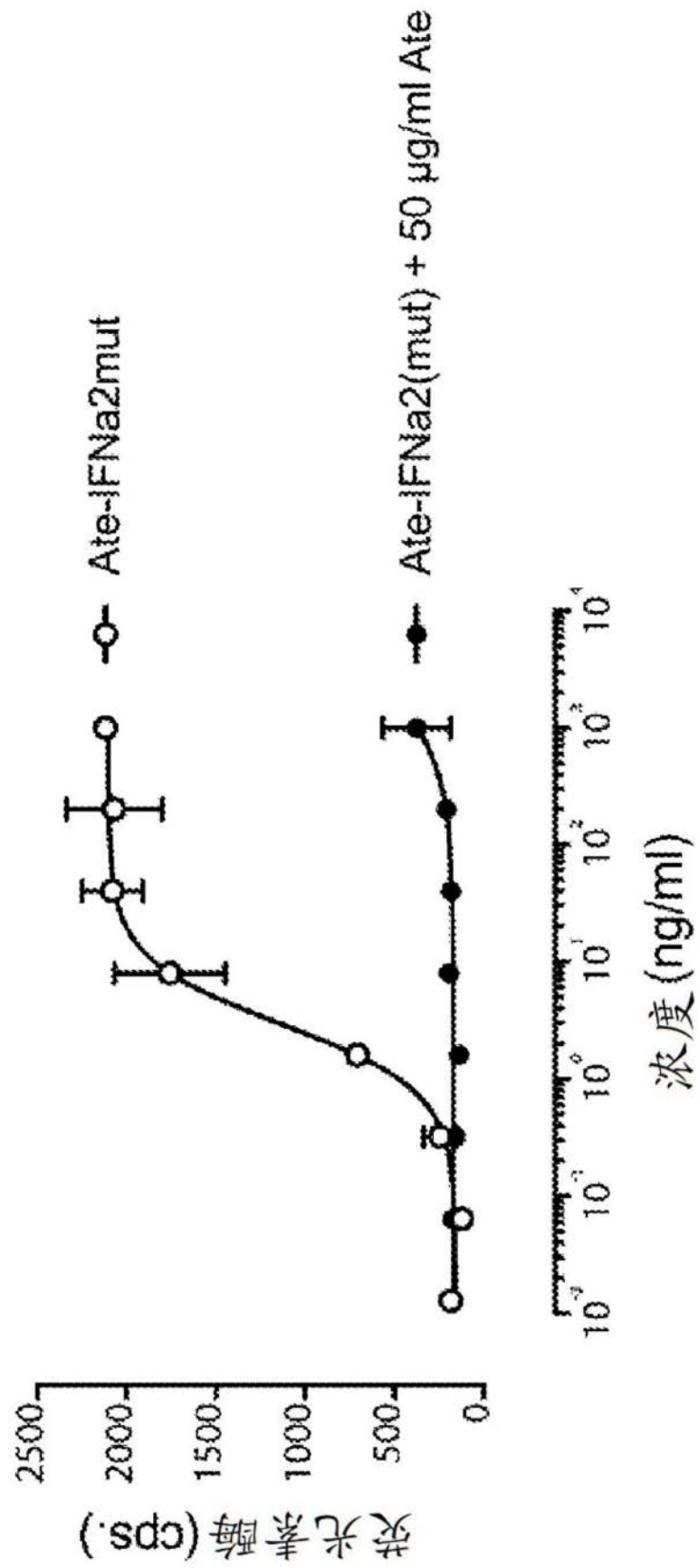


图8

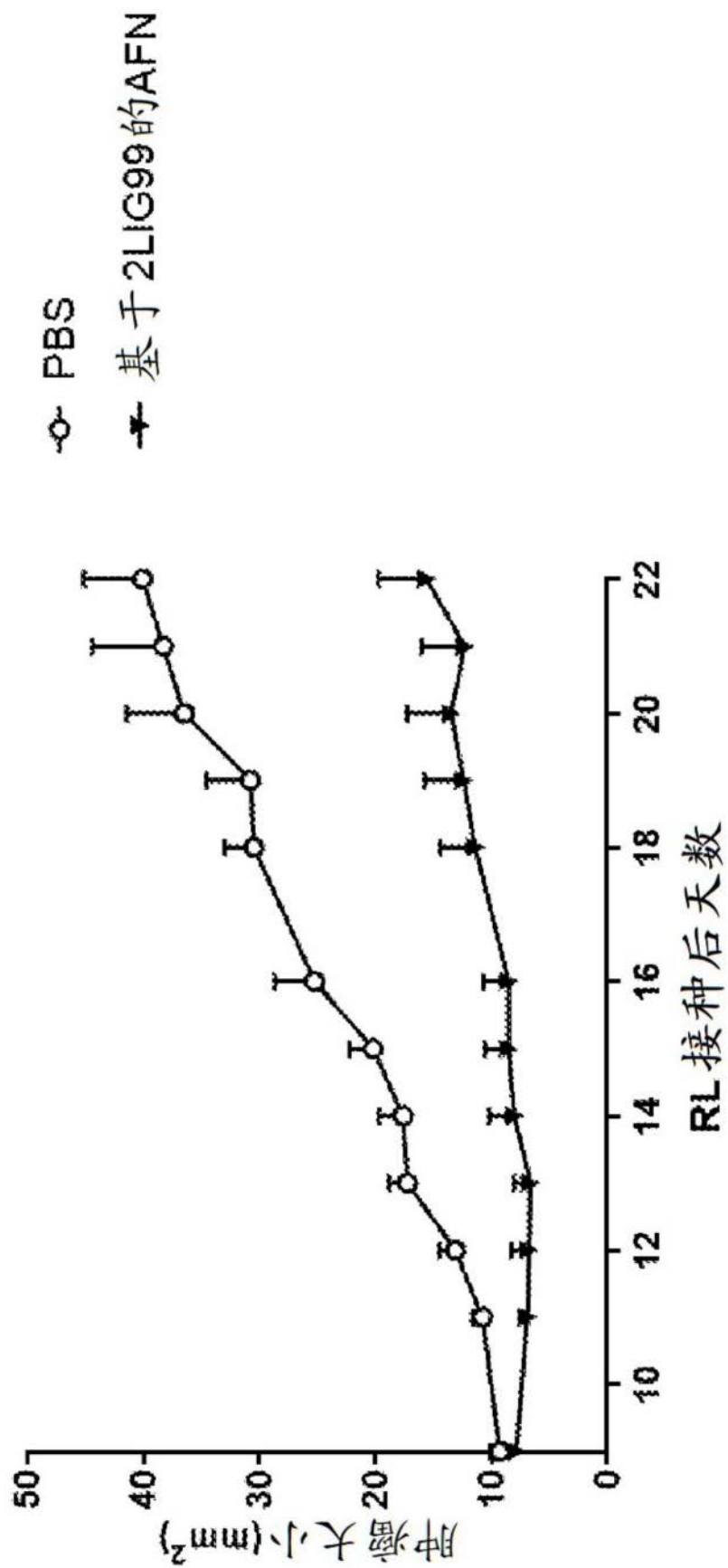


图9

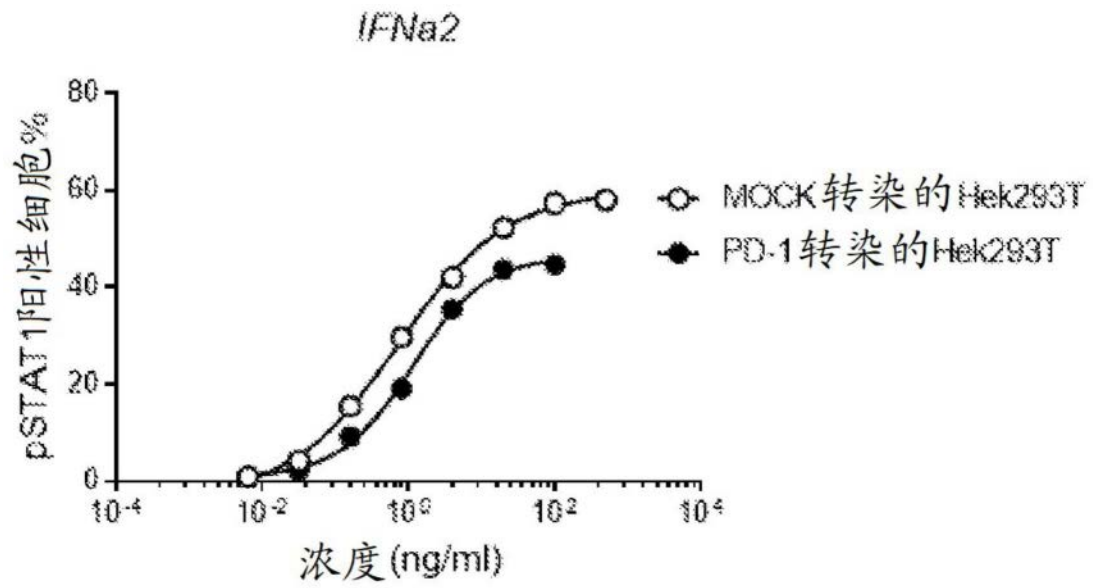


图10A

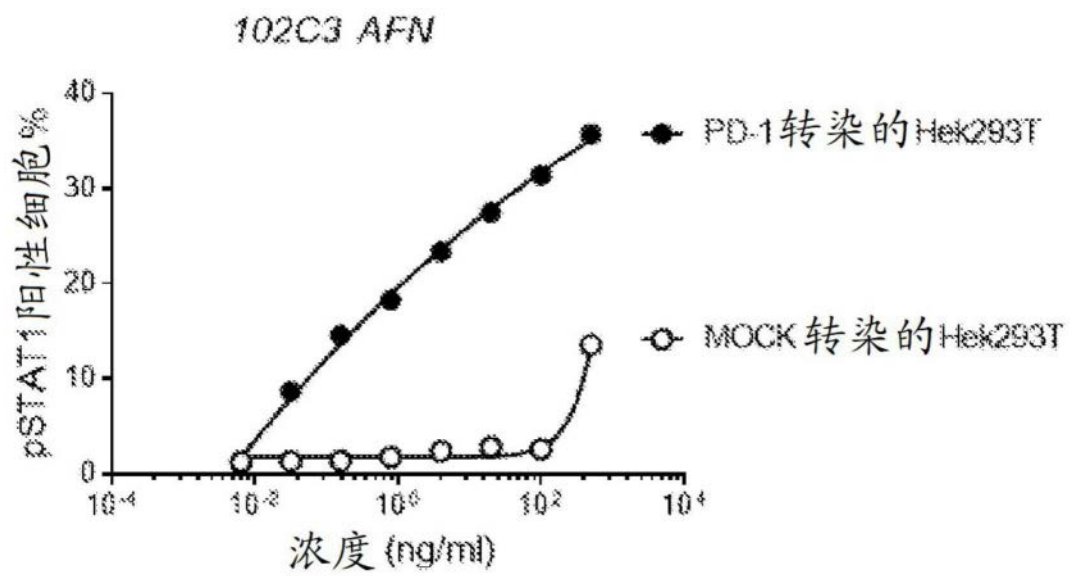


图10B

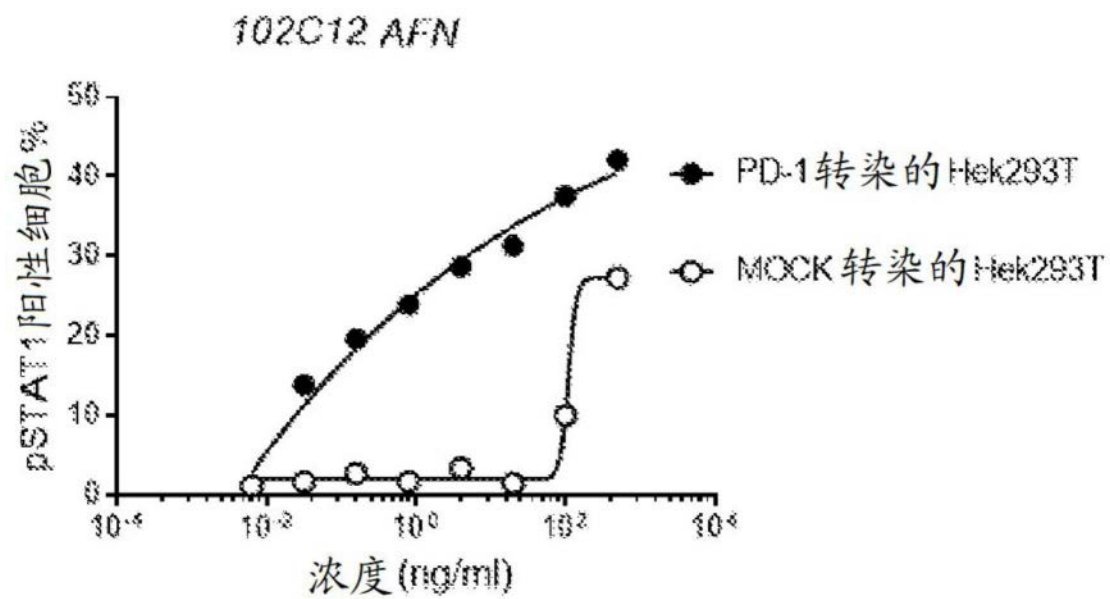


图10C