



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110831963 B

(45) 授权公告日 2024.10.29

(21) 申请号 201880031791.0

(73) 专利权人 高山免疫科学股份有限公司

(22) 申请日 2018.03.13

地址 美国华盛顿州

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 R·斯旺森 M·科纳克

申请公布号 CN 110831963 A

M·F·莫伊雷尔 D·阿尔杜雷尔

(43) 申请公布日 2020.02.21

D·W·德蒙泰 J·L·库伊普

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

62/472,554 2017.03.16 US

专利代理人 罗文锋 彭昶

62/475,076 2017.03.22 US

62/537,923 2017.07.27 US

(51) Int.CI.

62/582,249 2017.11.06 US

C07K 14/705 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.11.13

CN 103987405 A, 2014.08.13

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 105579471 A, 2016.05.11

PCT/US2018/022265 2018.03.13

审查员 杨啸天

(87) PCT国际申请的公布数据

权利要求书3页 说明书200页

W02018/170021 EN 2018.09.20

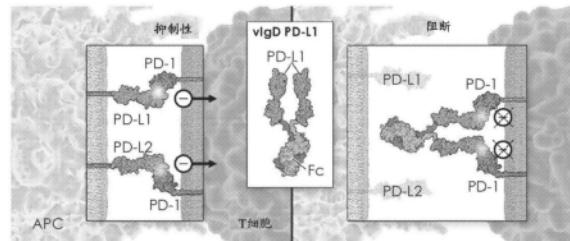
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

PD-L1变体免疫调节蛋白及其用途

(57) 摘要

本文提供包含变体PD-L1的免疫调节蛋白和编码此类蛋白质的核酸。所述免疫调节蛋白提供用于多种免疫学和肿瘤学病状的治疗实用性。提供用于制备和使用此类蛋白质的组合物和方法。



1. 一种变体PD-L1多肽,其包含IgV结构域或IgV结构域和IgC结构域二者,其中与未修饰人PD-L1相比,所述变体PD-L1多肽中的氨基酸取代选自:D43G/N45D/V58A、I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/N78I、V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-*ins*、I20L/I36T/N45D/A33D/D43G/N45D/V58A/S75P、K23R/D43G/N45D/D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G-*ins*、I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I、N45D/N45D/K144E、N45D/P198S、N45D/P198T、N45D/R195G、N45D/R195S、N45D/S131F、N45D/V58D、N45D/I148V/R195G、N45D/K111T/R195G、N45D/N113Y/R195S、N45D/N165Y/E170G、N45D/Q89R/I98V、N45D/S131F/P198S、N45D/S75P/P198S、N45D/V50A/R195T、E27D/N45D/T183A/I188V、K23N/N45D/S75P/N120S、N45D/G102D/R194W/R195G、N45D/I148V/R195G/N201D、N45D/K111T/T183A/I188V、N45D/T163I/K167R/R195G、N45D/V50A/I119T/K144E、V11E/N45D/T130A/P198T、K23N/N45D/Q73R/T163I、K28R/N45D/V129D/T163N/R195T、M41K/D43G/N45D/R64S/R195G、M41K/D43G/N45D/R64S/S99G、N45D/R68L/F173L/D197G/P198S、N45D/V50A/I148V/R195G/N201D、M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D和N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G,其参考SEQ ID NO:30的编号,

其中与所述未修饰人PD-L1与PD-1的胞外域的结合相比,所述变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至PD-1的胞外域;

其中所述未修饰人PD-L1包含SEQ ID NO:30中所列出的氨基酸序列或者SEQ ID NO:30的包含IgV结构或IgV结构域和IgC结构域的部分。

2. 如权利要求1所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽中的氨基酸取代为I20L/D43G/N45D/N78I。

3. 如权利要求1所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽中的氨基酸取代为D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G-*ins* (G101GG)。

4. 如权利要求1所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽中的氨基酸取代为I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-*ins* (G101GG)。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中:

所述变体PD-L1多肽包含PD-L1细胞外结构域(ECD);

所述变体PD-L1多肽包含所述IgV结构域以及所述IgC结构域;或者

所述变体PD-L1多肽包含所述IgV结构域。

6. 如权利要求5所述的变体PD-L1多肽,其中所述IgV结构域是所述变体PD-L1多肽的唯一PD-L1部分。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:270、289-292、295、298、300、301、303-305、1727、1772、1774-1780、1785-1793、1795、1796、1798、1799、1802、1804、1806、1809和1812-1818中任一者中所列出的氨基酸序列。

8. 如权利要求7所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:292的氨基酸序列。

9. 如权利要求7所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:303的氨基酸序列。

10. 如权利要求7所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1727

的氨基酸序列。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽是可溶性蛋白。

12. 如权利要求11所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽连接至多聚化结构域。

13. 一种免疫调节蛋白,其包含如权利要求1-12中任一项所述的变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽直接或经由接头间接连接至包含免疫球蛋白超家族(IgSF)家族成员的IgSF结构域的第二多肽。

14. 如权利要求13所述的免疫调节蛋白,其中所述IgSF结构域是亲和力修饰的IgSF结构域,所述亲和力修饰的IgSF结构域与所述IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰,并且与未修饰或野生型IgSF结构域相比,表现出改变的与其同源结合配偶体中的一种或多种的结合。

15. 如权利要求14所述的免疫调节蛋白,其中所述IgSF结构域是变体CTLA-4多肽。

16. 如权利要求15所述的免疫调节蛋白,其中所述变体CTLA-4多肽包含参考SEQ ID NO:36的一个或多个氨基酸修饰。

17. 如权利要求13-16中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述免疫调节蛋白还包含连接至所述变体PD-L1多肽或所述第二多肽中的至少一种的多聚化结构域。

18. 如权利要求17所述的免疫调节蛋白,其中所述多聚化结构域是Fc区。

19. 一种免疫调节蛋白,其包含如权利要求1-12中任一项所述的变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽连接至Fc区或其具有降低的效应功能的变体。

20. 一种核酸分子,其编码如权利要求1-12中任一项所述的变体PD-L1多肽或如权利要求13-19中任一项所述的免疫调节蛋白。

21. 一种载体,其包含如权利要求20所述的核酸分子。

22. 如权利要求21所述的载体,其中所述载体为表达载体。

23. 一种产生变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白的方法,其包括在宿主细胞中表达所述蛋白质的条件下将如权利要求20所述的核酸分子或如权利要求21或权利要求22所述的载体引入到所述细胞中,其中所述方法是离体的。

24. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-12中任一项所述的变体PD-L1多肽、如权利要求13-19中任一项所述的免疫调节蛋白、如权利要求20所述的核酸或如权利要求21或22所述的载体。

25. 如权利要求24所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含药学上可接受的赋形剂。

26. 一种制品,其包含小瓶中的如权利要求24或25所述的药物组合物。

27. 一种试剂盒,其包含如权利要求24或25所述的药物组合物或如权利要求26所述的制品和使用说明书。

28. 药物组合物在制备用于降低受试者的免疫反应的药物中的用途,其中所述药物组合物包含如权利要求1-12中任一项所述的变体PD-L1多肽、如权利要求13-19中任一项所述的免疫调节蛋白、如权利要求20所述的核酸或如权利要求21或22所述的载体。

29. 如权利要求28所述的用途,其中所述药物组合物包含药学上可接受的赋形剂。

30. 如权利要求28或29所述的用途,其中降低所述免疫反应治疗所述受试者的疾病或病状。

31. 如权利要求30所述的用途,其中所述疾病或病状是炎性或自身免疫疾病或病状。

## PD-L1变体免疫调节蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2017年3月16日提交的名称为“PD-L1 Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof”的美国临时申请号62/472,554,2017年3月22日提交的名称为“PD-L1 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof”的美国临时申请号62/475,076,2017年7月27日提交的名称为“PD-L1 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof”的美国临时申请号62/537,923,以及2017年11月6日提交的名称为“PD-L1 Ligand Variant Immunomodulatory Proteins and Uses Thereof”的美国临时申请号62/582,249的优先权,所述申请中的每个的内容以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表以引用的方式并入

[0004] 本申请连同序列表一起以电子格式提交。序列表提供为在2018年2月24日创建的名称为761612001040SeqList.TXT的文件,所述文件的大小为3,329,416字节。电子格式的序列表中的信息以引用的方式整体并入。

### 技术领域

[0005] 本公开涉及用于在治疗癌症和免疫学疾病时调节免疫反应的治疗性组合物。在一些方面,本公开涉及表现出对于同源结合配偶体蛋白PD-1和CD80中的一种或多种的改善的结合(诸如改善的结合亲和力或选择性)的PD-L1的特定变体。

### 背景技术

[0006] 通过干预在由抗原递呈细胞(APC)或靶细胞和淋巴细胞形成并在其之间形成的免疫突触(IS)中发生的过程来调节免疫反应具有逐渐增加的医学意义。在机制上,IS中的细胞表面蛋白可以涉及多种蛋白质靶标与它们所结合的单一蛋白质的协调的以及通常同时的相互作用。IS相互作用与两个细胞的接合紧密相关地发生,并且在此结构中的单一蛋白质可以同时与同一细胞上的蛋白质(顺式)以及缔合细胞上的蛋白质(反式)二者相互作用。尽管可以调节IS的治疗剂是已知的,但是仍需要改进的治疗剂。提供满足此类需要的免疫调节蛋白,包括能够在细胞上表达的可溶性蛋白或跨膜免疫调节蛋白。

### 发明内容

[0007] 本文提供一种变体PD-L1多肽,其含有IgV结构域或其特异性结合片段、IgC结构域或其特异性结合片段或二者,其中所述变体PD-L1多肽含有在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中与选自以下的位置相对应的一个或多个氨基酸修饰:6、10、11、14、15、16、17、18、19、20、22、23、26、27、28、33、35、36、40、41、43、44、45、46、47、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、60、64、65、68、71、72、73、74、75、78、79、83、85、87、89、90、93、97、98、99、101、102、103、104、106、110、111、112、113、117、119、120、121、124、129、130、131、134、137、138、144、148、149、150、155、158、160、163、165、167、170、171、173、175、176、177、179、180、183、185、188、

189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、206、207、213或221,其参考SEQ ID NO:30或1728的编号。在一些情况下,氨基酸修饰是氨基酸取代、插入或缺失。

[0008] 在一些实施方案中,未修饰PD-L1是哺乳动物PD-L1或其特异性结合片段。在一些实施方案中,未修饰PD-L1是人PD-L1或其特异性结合片段。在一些任何此类实施方案中,未修饰PD-L1含有(i) SEQ ID NO:30或1728中所列出的氨基酸序列,(ii)与SEQ ID NO:30或1728具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或者(iii)其包含IgV结构域或IgC结构域或其特异性结合片段或二者的部分。

[0009] 在一些任何此类实施方案中,IgV结构域或IgC结构域的特异性结合片段具有至少50、60、70、80、90、100、110或更多个氨基酸的长度;或者IgV结构域的特异性结合片段含有作为SEQ ID NO:3的氨基酸24-130所列出的IgV结构域的长度的至少80%的长度;并且/或者IgC结构域的特异性结合片段含有作为SEQ ID NO:3的氨基酸133-225所列出的IgC结构域的长度的至少80%的长度。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1含有多至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸修饰,任选地为氨基酸取代、插入和/或缺失。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽含有与SEQ ID NO:30、1728具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列或其特异性结合片段。

[0010] 在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1与PD-1的胞外域的结合相比,变体PD-L1多肽表现出改变的与PD-1的胞外域的结合。在一些实施方案中,与未修饰PD-L1与CD80的胞外域的结合相比,变体PD-L1多肽表现出改变的与CD80的胞外域的结合。在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1相比,变体PD-L1多肽表现出改变的与PD-1的胞外域的结合。在一些实施方案中,改变的结合是改变的结合亲和力和/或改变的结合选择性。

[0011] 在一些任何此类实施方案中,一个或多个氨基酸修饰选自P6S、Y10F、V11A、V11E、Y14S、G15A、S16G、N17D、M18I、M18T、M18V、T19A、T19I、I20L、C22R、K23E、K23N、K23R、E26A、E27D、E27G、K28E、K28I、K28N、K28R、A33D、L35P、I36S、I36T、E40G、M41K、M41V、D43G、D43V、K44E、N45D、N45I、N45T、I46V、I47T、F49S、V50A、H51N、H51R、H51Y、G52R、G52V、E53G、E53V、E54G、D55G、D55N、D55S、D55V、L56Q、K57E、K57R、V58A、V58D、H60R、R64S、Q65L、R68L、K71E、D72G、Q73R、L74P、S75P、N78I、N78S、A79T、I83T、D85E、Q89R、D90G、V93E、M97I、M97K、M97L、I98L、I98T、I98V、S99G、G101D、G101G-*ins* (G101GG)、G102D、A103V、D104G、K106E、K106R、V110M、K111E、K111T、V112A、N113Y、N117S、I119T、N120S、Q121L、L124S、V129A、V129D、T130A、S131F、E134G、C137R、Q138R、K144E、K144Q、I148V、W149R、T150A、Q155H、S158G、K160M、T163I、K163N、N165Y、K167R、K167T、E170G、K171R、F173I、F173L、K173Y、V175A、S177C、L179P、R180S、T183A、T183I、T185A、I188V、F189L、F189S、T192S、F193S、R194G、R194W、R195G、R195S、R195T、L196S、D197G、P198S、P198T、E199G、E200K、E200N、N201D、N201Y、H202Q、T203A、A204T、L206F、V207A、L213P、T221L或其保守性氨基酸取代。在一些任何此类实施方案中,一个或多个氨基酸修饰选自K28N/M41V/N45T/H51N/K57E、I20L/I36T/N45D/I47T、I20L/M41K/K44E、P6S/N45T/N78I/I83T、N78I、M41K/N78I、N45T/N78I、I20L/N45T、N45T、M41K、I20L/I36T/N45D、N17D/N47T/V50A/D72G、I20L/F49S、N45T/V50A、I20L/N45T/N78I、I20L/N45T/V50A、M41V/N45T、M41K/N45T、A33D/S75P/D85E、M18I/M41K/D43G/H51R/N78I、V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P、A33D/V50A、S16G/A33D/K71E/S75P、E27G/

N45T/M97I、E27G/N45T/K57R、A33D/E53V、D43G/N45D/V58A、E40G/D43V/N45T/V50A、Y14S/K28E/N45T、A33D/N78S、A33D/N78I、A33D/N45T、A33D/N45T/N78I、E27G/N45T/V50A、N45T/V50A/N78S、I20L/N45T/V110M、I20L/I36T/N45T/V50A、N45T/L74P/S75P、N45T/S75P、S75P/K106R、S75P、A33D/S75P、A33D/S75P/D104G、A33D/S75P、I20L/E27G/N45T/V50A、I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/N78I、E27G/N45T/V50A/N78I、N45T/V50A/N78I、V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G、I20L/E27G/D43G/N45T/V50A、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R、I20L/I36T/N45D、I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I、A33D/D43G/N45D/V58A/S75P、K23R/D43G/N45D、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D、D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G-ins(G101GG)、I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I、T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K、I20L/M41K/D43G/N45D、K23R/N45T/N78I、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-ins(G101GG)、K57R/S99G、K57R/S99G/F189L、M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q、I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/H202Q/L206F、C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/H202Q/T221L、M18V/I98L/L124S/P198T/L206F、S99G/N117S/I148V/K171R/R180S、I36T/M97L/A103V/Q155H、K28I/S99G、R195S、A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/L206F、K57R/S99G/L124S/K144Q、K57R/S99G/R195G、D55V/M97L/S99G、E27G/I36T/D55N/M97L/K111E、E54G/M97L/S99G、G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q、G15A/I36T/V129D、G15A/I36T/V129D/R195G、G15A/V129D、I36S/M97L/I36T/D55N/M97L/K111E/A204T、I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L、I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S、I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P198T、I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T185A/R195G、I36T/I83T/M97L/K144E/P198T、I36T/M97L/K111E、I36T/M97L/K144E/P198T、I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y、I36T/M97L/V129D、L35P/I36S/M97L/K111E、M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A、M18T/I36T/D55N/M97L/K111E、M18V/M97L/T176N/R195G、M97L/S99G、N17D/M97L/S99G、S99G/T185A/R195G/P198T、V129D/H202Q、V129D/P198T、V129D/T150A、V93E/V129D、Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A、N45D、K160M/R195G、N45D/K144E、N45D/P198S、N45D/P198T、N45D/R195G、N45D/R195S、N45D/S131F、N45D/V58D、V129D/R195S、I98T/F173Y/L196S、N45D/E134G/L213P、N45D/F173I/S177C、N45D/I148V/R195G、N45D/K111T/R195G、N45D/N113Y/R195S、N45D/N165Y/E170G、N45D/Q89R/I98V、N45D/S131F/P198S、N45D/S75P/P198S、N45D/V50A/R195T、E27D/N45D/T183A/I188V、F173Y/T183I/L196S/T203A、K23N/N45D/S75P/N120S、N45D/G102D/R194W/R195G、N45D/G52V/Q121L/P198S、N45D/I148V/R195G/N201D、N45D/K111T/T183A/I188V、N45D/Q89R/F189S/P198S、N45D/S99G/C137R/V207A、N45D/T163I/K167R/R195G、N45D/T183A/T192S/R194G、N45D/V50A/I119T/K144E、T19A/N45D/K144E/R195G、V11E/N45D/T130A/P198T、V26A/N45D/T163I/T185A、K23N/N45D/L124S/K167T/R195G、K23N/N45D/Q73R/T163I、K28E/N45D/W149R/S158G/P198T、K28R/N45D/K57E/I98V/R195S、K28R/N45D/V129D/T163N/R195T、M41K/D43G/N45D/R64S/R195G、M41K/D43G/N45D/R64S/S99G、N45D/R68L/F173L/D197G/P198S、N45D/V50A/I148V/R195G/N201D、M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D或N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G。

[0012] 在一些任何此类实施方案中,一个或多个氨基酸修饰对应于选自20、27、28、33、36、41、43、45、50、58、71、75或78的一个或多个位置。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸

取代选自I20L、E27G、K28E、A33D、I36T、M41K、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、K71E、S75P、N78I或其保守性氨基酸取代。

[0013] 在一些任何此类实施方案中,一个或多个氨基酸修饰对应于选自20、27、33、36、43、45、50、58、75、78、97、99或195的一个或多个位置。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代选自I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽含有氨基酸修饰I20L/I36T、I20L/D43G、I20L/N45D、I20L/N45T、I20L/N45T、I20L/V50A、I20L/V58A、I20L/S75P、I20L/N78I、I36T/D43G、I36T/N45D、I36T/N45T、I36T/V50A、I36T/V58A、I36T/S75P、I36T/N78I、D43G/N45D、D43G/N45T、D43G/V50A、D43G/V58A、D43G/S75P、D43G/N78I、N45D/V50A、N45D/V58A、N45D/S75P、N45D/N78I、N45T/V50A、N45T/V58A、N45T/S75P、N45T/N78I、V50A/V58A、V50A/S75P、V50A/N78I、V58A/S75P、V58A/N78I或S75P/N78I。在一些具体实施方案中,变体PD-L1多肽含有氨基酸修饰D43G/N45D/V58A。在一些方面,变体PD-L1多肽含有氨基酸修饰D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G- ins (G101GG) 或I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G- ins (G101GG)。

[0014] 在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽包括变体PD-L1多肽,其包含PD-L1细胞外结构域(ECD)或由其组成;和/或变体PD-L1多肽,其包含IgV结构域或其特异性片段和IgC结构域或其特异性片段或由其组成。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中任一者中所列出的氨基酸序列或其特异性结合片段,或与SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中的任一者具有至少95%序列同一性并且含有一个或多个氨基酸取代的氨基酸序列或其特异性结合片段。

[0015] 在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽含有IgV结构域或其特异性结合片段。在一些任何此类实施方案中,IgV结构域或其特异性结合片段是变体PD-L1多肽的唯一PD-L1部分。在一些实施方案中,IgC结构域或其特异性结合片段是变体PD-L1多肽的唯一PD-L1部分。

[0016] 在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽含有SEQ ID NO:121-185、244-308、1726-1727、1908-1937中任一者中所列出的氨基酸序列或其特异性结合片段,与SEQ ID NO:121-185、244-308、1726-1727、1908-1937中的任一者具有至少95%序列同一性并且含有一个或多个氨基酸取代的氨基酸序列或其特异性结合片段。在一些实施方案中,IgC结构域或其特异性结合片段是变体PD-L1多肽的唯一PD-L1部分。

[0017] 在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1与PD-1或CD80的胞外域的结合相比,变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至PD-1或CD80的相同胞外域。在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1与PD-1的胞外域的结合相比,变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至PD-1的胞外域。在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1与PD-1的胞外域和CD80的胞外域的结合相比,变体PD-L1多肽分别以增加的亲和力特异性结合至相同的胞外域。在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1与PD-1的胞外域和CD80的胞外域的结合相比,变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至相同的PD-1的胞外域并且以降低的亲和力结合至相同的CD80的胞外域。

[0018] 在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1相比,增加的对PD-1的胞外域的亲和力增加了超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、

50倍或60倍。在一些方面,与未修饰PD-L1相比,增加的对CD80的胞外域的亲和力增加了超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或60倍。在一些方面,与未修饰PD-L1相比,降低的对CD80的胞外域的亲和力降低了超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或60倍。

[0019] 在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1相比,变体多肽以增加的选择性特异性结合至PD-1的胞外域。在一些情况下,与未修饰PD-L1多肽对PD-1对比CD80的结合的比率相比,增加的选择性包括变体多肽对PD-1对比CD80的相同胞外域的结合的比率更大。在一些实例中,所述比率大至少或至少约1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍或更多倍。

[0020] 在一些任何此类实施方案中,PD-1是人PD-1。在一些任何此类实施方案中,CD80是人CD80。

[0021] 在一些任何此类实施方案中,与未修饰PD-L1相比,结合活性改变(增加或降低)超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。

[0022] 在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽是可溶性蛋白。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽缺乏PD-L1跨膜结构域和细胞内信号传导结构域;并且/或者变体PD-L1多肽不能够在细胞表面上表达。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽连接至多聚化结构域。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽是包含连接至多聚化结构域的第一变体PD-L1多肽和连接至多聚化结构域的第二变体PD-L1多肽的多聚体多肽,任选地是二聚体多肽。在一些实施方案中,第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽是相同的或不同的。

[0023] 在一些任何此类实施方案中,多聚化结构域是Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽连接至增加所述多肽的生物半衰期的部分。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽连接至Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体。

[0024] 在一些任何此类实施方案中,Fc结构域是哺乳动物Fc结构域,任选地是人Fc结构域;或者变体Fc结构域与哺乳动物(任选地人)未修饰Fc结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰。在一些任何此类实施方案中,Fc结构域或其变体含有在SEQ ID NO:187或SEQ ID NO:188中所列出的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:187或SEQ ID NO:188具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰:E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236de1、G237A、S267K、N297G、R292C、V302C和K447de1,其各自通过EU编号。在一些实施方案中,Fc结构域包含通过EU编号的氨基酸修饰C220S。在一些任何此类实施方案中,Fc结构域包含SEQ ID NO:1155、1157、1158、1159、1715、1938、1939和1940中任一者中所列出的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1155、1157、1158、1159、1715、1938、1939和1940中的任一者具有至少85%序列同一性并且表现出降低的效应功能的氨基酸序列。

[0025] 在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽经由接头(任选地G4S接头)间接连接。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽是跨膜免疫调节蛋白,其还含有连接至变体PD-L1多肽的细胞外结构域(ECD)或其特异性结合片段的跨膜结构域。

[0026] 在一些任何此类实施方案中,跨膜结构域含有作为SEQ ID NO:3的残基239-259所

列出的氨基酸序列或者其与SEQ ID NO:3的残基239-259具有至少85%序列同一性的功能性变体。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有连接至跨膜结构域的细胞质信号传导结构域。在一些情况下,细胞质信号传导结构域含有作为SEQ ID NO:3的残基260-290所列出的氨基酸序列或者其与SEQ ID NO:3的残基260-290具有至少85%序列同一性的功能性变体。

[0027] 在一些任何提供的实施方案中,变体PD-L1多肽调节免疫细胞(诸如T细胞)的反应。在一些实施方案中,反应(例如,T细胞反应)增加或降低。在一些任何此类实施方案中,在体外T细胞测定中,变体PD-L1相对于未修饰PD-L1增加IFN- $\gamma$ (干扰素- $\gamma$ )表达。在一些任何此类实施方案中,在体外T细胞测定中,变体PD-L1相对于未修饰PD-L1减少IFN- $\gamma$ (干扰素- $\gamma$ )表达。

[0028] 在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽是去糖基化的。

[0029] 在本文所述的变体PD-L1多肽中的任一种的一些实施方案中,变体PD-L1多肽相对于未修饰PD-L1增加T细胞信号传导,诸如使用涉及用可操作地连接至IL-2启动子的报告基因(例如,荧光素酶)工程改造的T细胞(例如,Jurkat)的报告基因测定来确定。在本文所述的变体PD-L1多肽中的任一种的一些实施方案中,变体PD-L1多肽相对于未修饰PD-L1减少T细胞信号传导,诸如使用涉及用可操作地连接至IL-2启动子的报告基因(例如,荧光素酶)工程改造的T细胞(例如,Jurkat)的报告基因测定来确定。在一些任何此类实施方案中,变体PD-L1多肽以多种形式中的任一种提供,诸如可溶性或固定的(例如,板结合的)。

[0030] 还提供一种免疫调节多肽,其含有根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1,所述变体PD-L1直接或经由接头间接连接至包含免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域的第二多肽。在一些情况下,与未修饰或野生型IgSF结构域与其同源结合配偶体中的一种或多种的结合相比,所述IgSF结构域是亲和力修饰的并且表现出改变的与相同的一种或多种同源结合配偶体的结合。在一些实施方案中,亲和力修饰的IgSF结构域与IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域相比含有一个或多个氨基酸修饰。在一些情况下,与IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域与其同源结合配偶体中的一种或多种的结合相比,所述IgSF结构域表现出增加的与相同的一种或多种同源结合配偶体的结合。在一些实例中,与IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域与其同源结合配偶体中的一种或多种的结合相比,所述IgSF结构域是亲和力修饰的并且表现出改变的与相同的一种或多种同源结合配偶体的结合。在一些实施方案中,变体PD-L1是第一PD-L1变体并且第二多肽的IgSF结构域是来自第二变体PD-L1的IgSF结构域,其中第一PD-L1变体和第二PD-L1变体是相同或不同的。

[0031] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽能够特异性结合至PD-1或CD80,并且第二多肽的IgSF结构域能够结合至除了被所述PD-L1变体多肽特异性结合的同源结合配偶体之外的同源结合配偶体。在一些实施方案中,IgSF结构域来自B7家族的成员。在一些情况下,IgSF结构域是结合至肿瘤上表达的配体的肿瘤定位部分,或者是结合至与炎性环境相关联的细胞或组织的炎性定位部分。在一些实施方案中,IgSF结构域是结合至肿瘤上表达的配体的肿瘤定位部分。在一些情况下,配体是B7H6。在一些实施方案中,IgSF结构域来自NKP30。

[0032] 在一些实施方案中,任选地第二多肽或第三多肽的IgSF结构域或其亲和力修饰的IgSF结构域是或含有IgV结构域。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽是或含有IgV结构域。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含连接至变体PD-L1多肽或IgSF结构域之一者或二者

的多聚化结构域。在一些情况下,多聚化结构域是Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是二聚体。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是同源二聚体。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是异源二聚体。

**[0033]** 在一些任何此类实施方案中,第二多肽的IgSF结构域是配体的结合至抑制性受体的IgSF结构域或者是其亲和力修饰的IgSF结构域。在一些情况下,与未修饰IgSF结构域与抑制性受体的结合相比,亲和力修饰的IgSF结构域表现出增加的对相同抑制性受体的结合亲和力和/或结合选择性。在一些实施方案中,抑制性受体是TIGIT、PD-1或CTLA-4;或者抑制性受体的配体是PD-L2、CD155、CD112或CD80。

**[0034]** 在一些任何此类实施方案中,第二多肽的IgSF结构域是包含以下的亲和力修饰的IgSF结构域: (i) 包含SEQ ID NO:47、310或353中任一者中所列出的IgSF的野生型CD155,或包含表5中所列出的SEQ ID NO中的任一者,任选地SEQ ID NO:311-352、354-665、1505-1576、1551-1714中任一者的IgSF结构域的变体CD155多肽; (ii) 包含SEQ ID NO:48、666或761中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型CD112,或包含表4中所列出的SEQ ID NO中的任一者,任选地SEQ ID NO:667-760、762-931、1433-1504中任一者的IgSF结构域的变体CD112多肽; (iii) 包含SEQ ID NO:28、1005或2030中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型CD80,或包含表3中所列出的SEQ ID NO:中的任一者,任选地SEQ ID NO:932-964、966-1038、1040-1078、1080-1112、1114-1152中任一者的IgSF的变体CD80多肽; (iv) 包含SEQ ID NO:31、1203或1263中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型PD-L2,或包含表3中所列出的SEQ ID NO中的任一者,任选地SEQ ID NO:1204-1254、1256-1331、1333-1407、1409-1432中任一者的IgSF结构域的变体PD-L2多肽; (v) 与 (i) - (iv) 的SEQ ID NO中的任一者具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸取代的氨基酸序列;或 (vi) (i) - (v) 中的任一者的特异性结合片段。

**[0035]** 在一些实施方案中,免疫调节蛋白还含有第三多肽,所述第三多肽包含IgSF家族成员的IgSF结构域或其亲和力修饰的IgSF结构域,所述亲和力修饰的IgSF结构域与所述IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰。在一些情况下,第三多肽与第一多肽和/或第二多肽是相同的,或者第三多肽与第一多肽和/或第二多肽是不同的。在一些实例中,第三多肽选自 (i) 包含SEQ ID NO:47、310或353中任一者中所列出的IgSF的野生型CD155,或包含SEQ ID NO:311-352、354-665、1505-1576、1551-1714中任一者中所列出的IgSF结构域的变体CD155多肽; (ii) 包含SEQ ID NO:48、666或761中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型CD112,或包含SEQ ID NO:667-760、762-931、1433-1504中任一者中所列出的IgSF结构域的变体CD112多肽; (iii) 包含SEQ ID NO:28、1005或2030中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型CD80,或包含SEQ ID NO:932-964、966-1038、1040-1078、1080-1112、1114-1152中任一者中所列出的IgSF结构域的变体CD80多肽; (iv) 包含SEQ ID NO:31、1203或1263中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型PD-L2,或包含SEQ ID NO:1204-1254、1256-1331、1333-1407、1409-1432中任一者中所列出的IgSF结构域的变体PD-L2多肽; (v) 与 (i) - (iv) 的SEQ ID NO中的任一者具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸取代的氨基酸序列;或 (vi) (i) - (v) 中的任一者的特异性结合片段。在一些情况下,任选地第二多肽或第三多肽的IgSF结构域或其亲和力修饰的IgSF结构域是或含有IgV结构域。在一些情况下,变体PD-L1多肽是或含有IgV结构域。

[0036] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白还含有至少一个额外的多肽,所述额外的多肽包含IgSF家族成员的IgSF结构域或其亲和力修饰的IgSF结构域,所述亲和力修饰的IgSF结构域与所述IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,免疫调节蛋白还含有连接至变体PD-L1多肽或第二多肽中的至少一种的多聚化结构域。在一些方面,免疫调节蛋白还含有连接至变体PD-L1多肽、第二多肽和/或第三多肽中的至少一种的多聚化结构域。在一些情况下,多聚化结构域是Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体。在一些实施方案中,多聚化结构域促进异源二聚体形成。

[0037] 提供一种免疫调节蛋白,其含有第一变体PD-L1多肽,其中多聚化结构域是第一多聚化结构域;和第二变体PD-L1多肽,其中多聚化结构域是第二多聚化结构域,其中第一多聚化结构域和第二多聚化结构域相互作用以形成含有第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽的多聚体,任选地其中第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽是相同的。在一些情况下,多聚化结构域是第一多聚化结构域并且与第二多聚化结构域相互作用以形成包含所述免疫调节蛋白的多聚体。在一些实例中,免疫调节蛋白是第一免疫调节蛋白并且第二免疫调节蛋白直接或经由接头间接连接至第二多聚化结构域,其中所述多聚体包含第一免疫调节蛋白和第二免疫调节蛋白。在一些实施方案中,第二免疫球调节蛋白是所述的任何免疫球调节蛋白,并且多聚化结构是第二多聚化结构域。在一些情况下,所述多聚体是二聚体。在一些实施方案中,所述第二多肽是变体CD155多肽,并且第一免疫调节蛋白和/或第二免疫调节蛋白包含SEQ ID NO:1716-1721中任一者中所列出的序列,或与SEQ ID NO:1716-1721中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;或者第二多肽是CD112或CD155并且第三多肽是CD112或CD155中的另一者,并且第一免疫调节蛋白和/或第二免疫调节蛋白包含SEQ ID NO:1722-1724中任一者中所列出的序列或与SEQ ID NO:1716-1721中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0038] 在一些情况下,免疫调节蛋白是同源二聚体。在一些方面,免疫调节蛋白是异源二聚体,任选地其中第一多聚化结构域和第二多聚化结构域是不同的和/或能够相互作用以介导异源二聚体形成。

[0039] 在一些实施方案中,第一多聚化结构域和/或第二多聚化结构域是Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体,任选地其中所述Fc结构域是人免疫球蛋白的Fc结构域并且/或者Fc区是人Fc区,任选地其中所述Fc区是免疫球蛋白G1(IgG1)或免疫球蛋白G2(IgG2)的Fc区,任选地在SEQ ID NO:187或SEQ ID NO:188中列出,任选地其中所述Fc区表现出一种或多种效应功能;或者变体Fc结构域包含在野生型Fc区中的一个或多个氨基酸取代,任选地其中与野生型Fc区相比降低的效应功能降低,任选地其中野生型人Fc是人IgG1的Fc。在一些情况下,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域是相同的或不同的。

[0040] 在一些实施方案中,变体Fc区含有氨基酸取代E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236del、G237A、S267K或N297G,其中残基编号根据Kabat的EU索引;或氨基酸取代R292C/N297G/V302C或L234A/L235E/G237A,其中残基编号根据Kabat的EU索引。在一些实例中,Fc区或变体Fc区含有氨基酸取代C220S,其中残基编号根据Kabat的EU索引。在一些情况下,Fc区或变体Fc区含有K447del,其中残基编号根据Kabat的EU索引。

[0041] 还提供一种缀合物,其含有连接至一个部分的根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1或根据任何所提供的实施方案的免疫调节多肽。在一些情况下,所述部分是特异性结合至细胞表面上的分子的靶向部分。在一些方面,所述靶向部分特异性结合至免疫细胞表面上的分子。

[0042] 在一些实施方案中,免疫细胞是抗原递呈细胞或淋巴细胞。在一些情况下,所述靶向部分是结合至肿瘤表面上的分子的肿瘤定位部分。在一些实例中,所述部分是蛋白质、肽、核酸、小分子或纳米粒子。在一些实施方案中,所述部分是抗体或抗原结合片段。在一些任何此类实施方案中,所述缀合物是二价、四价、六价或八价的。在一些方面,缀合物是融合蛋白。

[0043] 还提供一种核酸分子,其编码根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1多肽,或作为融合蛋白的根据任何所提供的实施方案的免疫调节多肽或缀合物。在一些实施方案中,核酸分子是合成核酸。在一些实施方案中,核酸分子是cDNA。

[0044] 还提供一种载体,其含有根据任何所提供的实施方案的核酸分子。在一些情况下,所述载体是表达载体。在一些方面,所述载体是哺乳动物表达载体或病毒载体。

[0045] 还提供一种细胞,其包含根据任何所提供的实施方案的载体。在一些情况下,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些方面,所述细胞是人细胞。

[0046] 还提供一种产生变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白的方法,其包括在宿主细胞中表达所述蛋白质的条件下将根据任何所提供的实施方案的核酸分子或根据任何所提供的实施方案的载体引入到所述细胞中。在一些情况下,所述方法还包括从所述细胞中分离或纯化变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白。还提供一种工程改造表达变体PD-L1变体多肽的细胞的方法,其包括在所述多肽在宿主细胞中表达的条件下将编码根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1多肽的核酸分子引入到所述细胞中。

[0047] 还提供一种工程改造的细胞,其表达根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1多肽、根据任何所提供的实施方案的免疫调节蛋白、作为融合蛋白的根据任何所提供的实施方案的缀合物、根据任何所提供的实施方案的核酸分子或根据任何所提供的实施方案的载体。在一些情况下,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白包含信号肽。在一些情况下,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白由包含编码信号肽的核苷酸序列的核酸编码。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白不含有跨膜结构域和/或不在细胞表面上表达。

[0048] 在工程改造的细胞的一些实施方案中,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白从工程改造的细胞分泌或能够从工程改造的细胞分泌。在一些实施方案中,工程改造的细胞含有变体PD-L1多肽,其含有跨膜结构域和/或是根据任何所提供的实施方案的跨膜免疫调节蛋白。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽在细胞表面上表达。

[0049] 在工程改造的细胞的一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞。在一些情况下,免疫细胞是抗原递呈细胞(APC)或淋巴细胞。在一些实施方案中,所述细胞是原代细胞。在一些实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述淋巴细胞是T细胞。在一些实施方案中,所述APC是人工APC。在一些实例中,所述细胞是淋巴细胞,并且所述淋巴细胞是T细胞。在一些方面,所述细胞是APC,并且所述APC是人工APC。在一些任何此类实施方案中,工程改造的细胞还含有嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。

[0050] 还提供一种感染剂,其含有核酸分子,所述核酸分子编码根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1多肽、作为融合蛋白的根据任何所提供的实施方案的缀合物或根据任何所提供的实施方案的免疫调节多肽。在一些情况下,所编码的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽不含有跨膜结构域和/或不在它在其中表达的细胞的表面上表达。在一些实施方案中,所编码的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽从它在其中表达的细胞分泌或能够由所述细胞分泌。在一些情况下,所编码的变体PD-L1多肽含有跨膜结构域。在一些实施方案中,所编码的变体PD-L1多肽在它在其中表达的细胞的表面上表达。

[0051] 在一些任何此类实施方案中,感染剂是细菌或病毒。在一些实施方案中,病毒是慢病毒或逆转录病毒构建体或其杂合物。在一些方面,病毒是溶瘤病毒。在一些实例中,溶瘤病毒是腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、单纯疱疹病毒、水疱性口腔病毒 (Vesicular Stomatitis virus)、呼肠孤病毒、新城疫病毒、细小病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒 (VSV)、柯萨奇病毒或牛痘病毒。在一些情况下,病毒特异性靶向树突细胞 (DC) 和/或为树突细胞嗜性的。在一些实例中,病毒是用修饰的辛德毕斯病毒 (Sindbis virus) 包膜产物假型化的慢病毒载体。在一些任何此类实施方案中,感染剂还含有编码另一种基因产物的核酸分子,所述另一种基因产物引起靶细胞死亡或者可以增强或提高免疫反应。在一些实例中,另一种基因产物选自抗癌剂、抗转移剂、抗血管生成剂、免疫调节分子、免疫检查点抑制剂、抗体、细胞因子、生长因子、抗原、细胞毒性基因产物、促细胞凋亡基因产物、抗细胞凋亡基因产物、细胞基质降解基因、用于组织再生或将人体细胞重新程序化成多能性的基因。

[0052] 还提供一种药物组合物,其含有根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1多肽、根据任何所提供的实施方案的免疫调节蛋白、根据任何实施方案的缀合物、根据任何所提供的实施方案的工程改造的细胞或根据任何所提供的实施方案的感染剂。在一些情况下,药物组合物含有药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物为无菌的。

[0053] 还提供一种制品,其含有小瓶中的根据任何所提供的实施方案的药物组合物。在一些情况下,小瓶是密封的。

[0054] 还提供一种试剂盒,其含有根据任何所提供的实施方案的药物组合物和使用说明书。还提供一种试剂盒,其含有根据任何所提供的实施方案的制品和使用说明书。

[0055] 还提供一种调节受试者的免疫反应 (诸如增加或降低免疫反应) 的方法,其包括向受试者施用根据任何所提供的实施方案的药物组合物。在一些实施方案中,调节受试者的免疫反应的方法包括向受试者施用根据任何所提供的实施方案的工程改造的细胞。在一些情况下,工程改造的细胞是受试者自体的。在一些情况下,工程改造的细胞是受试者异体的。在一些实施方案中,调节免疫反应的方法治疗受试者的疾病或病状。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用根据本文所述的实施方案中的任一者的可溶性变体PD-L1多肽、根据本文所述实施方案中的任一者的免疫调节蛋白或者根据本文所述的实施方案中的任一者的缀合物。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用编码根据本文所述的实施方案中的任一者的变体PD-L1多肽的感染剂。

[0056] 在一些任何此类实施方案中,免疫反应增加。在一些实施方案中,向受试者施用可溶的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白是Fc融合蛋白。在一些实施方案中,向受试者施用可溶的、任选地缺乏PD-L1跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白。在一些情况下,可溶性免疫调节

蛋白是免疫调节Fc融合蛋白。在一些实施方案中,向受试者施用根据任何所提供的实施方案的变体PD-L1多肽、根据任何所提供的实施方案的免疫调节蛋白或根据任何所提供的实施方案的缀合物。在一些实施方案中,向受试者施用含有可分泌变体PD-L1多肽的工程改造的细胞。在一些任何此类实施方案中,向受试者施用根据任何所提供的实施方案的工程改造的细胞。在一些方面,任选地在编码为可分泌免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽的感染剂感染肿瘤细胞或免疫细胞并且可分泌免疫调节蛋白从受感染细胞分泌的条件下,向受试者施用所述感染剂。

[0057] 在一些实施方案中,所述疾病或病状为肿瘤或癌症。在一些实例中,疾病或病状选自黑素瘤、肺癌、膀胱癌、血液恶性肿瘤、肝癌、脑癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、脾癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、肌肉骨骼癌、头颈癌、胃肠道癌、生殖细胞癌或内分泌性和神经内分泌癌症。

[0058] 在一些任何此类实施方案中,免疫反应降低。在一些实施方案中,向受试者施用含有连接至IgSF结构域或一个部分的变体PD-L1多肽的免疫调节蛋白或缀合物,所述部分定位至炎性环境的细胞或组织。在一些情况下,结合分子包含抗体或其抗原结合片段或者含有野生型IgSF结构域或其变体。在一些实施方案中,向受试者施用根据任何所提供的实施方案的免疫调节蛋白或根据任何所提供的实施方案的缀合物。

[0059] 在一些实施方案中,向受试者施用为跨膜免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽。在一些实施方案中,向受试者施用含有根据任何所提供的实施方案的为跨膜免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽的工程改造的细胞。在一些情况下,任选地在编码为跨膜免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽的感染剂感染肿瘤细胞或免疫细胞并且跨膜免疫调节蛋白在受感染细胞的表面上表达的条件下,向受试者施用所述感染剂。

[0060] 在一些实施方案中,疾病或病状是炎性或自身免疫疾病或病状。在一些任何此类实施方案中,疾病或病状是抗中性粒细胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎、血管炎、自身免疫性皮肤疾病、移植、风湿病、炎性胃肠道疾病、炎性眼病、炎性神经疾病、炎性肺病、炎性内分泌性疾病或自身免疫性血液疾病。在一些实例中,疾病或病状选自炎性肠病、移植、克罗恩氏病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、多发性硬化症、哮喘、类风湿性关节炎或牛皮癣。在一些任何此类实施方案中,施用降低受试者的免疫反应的形式的变体PD-L1。

## 附图说明

[0061] 图1A至图1C描绘所提供的变体IgSF结构域分子的不同形式。图1A描绘可溶性分子,包括:(1)融合至Fc链的变体IgSF结构域(vIgD);(2)含有第一变体IgSF结构域(第一vIgD)和第二IgSF结构域,诸如第二变体IgSF结构域(第二vIgD)的堆叠分子;(3)含有第一变体IgSF结构域(vIgD)和靶向肿瘤抗原的IgSF结构域,诸如NKp30 IgSF结构域的靶向肿瘤的IgSF分子;以及(4)连接至抗体(V-mAb)的变体IgSF结构域(vIgD)。图1B描绘在细胞表面上表达的含有变体IgSF结构域(vIgD)的跨膜免疫调节蛋白(TIP)。在一个示例性实施方案中,跨膜结合的vIgD的同源结合配偶体是抑制性受体(例如,PD-L1),并且含有vIgD(例如,PD-L1 vIgD)的TIP拮抗或阻断抑制性受体的负性信号传导,从而产生活化的T细胞或效应T细胞。在一些情况下,如果抑制性受体(PD-1)的簇接近活化受体(例如,CD28),那么可以实现通过TIP进行的活性激动。图1C描绘分泌的免疫调节蛋白(SIP),其中变体IgSF结构域

(vIgD) 从一种细胞, 诸如第一T细胞(例如, CAR T细胞) 分泌。在一个示例性实施方案中, 分泌的vIgD的同源结合配偶体为抑制性受体(例如, PD-1), 其可以由第一细胞(例如, T细胞, 诸如CAR T细胞) 表达和/或在第二细胞(例如T细胞; 同源或工程改造的细胞, 诸如CAR T细胞) 上表达。在SIP与其同源结合配偶体结合时, SIP拮抗或阻断经由抑制性受体进行的负性信号传导, 从而产生活化的T细胞或效应T细胞。在所有情况下, vIgD可以是仅V-结构域(IgV)、V-结构域(IgV) 和C-结构域(IgC) 的组合(包括整个细胞外结构域(ECD))、或IgSF超家族成员的Ig结构域的任何组合。

[0062] 图2描绘融合至Fc的变体IgSF结构域(vIgD) (vIgD-Fc) 的活性的示例性示意图, 其中vIgD是PD-L1的IgSF结构域的变体。如图所示, PD-L1的可溶性vIgD与其同源结合配偶体相互作用, 以阻断PD-L1或PD-L2与PD-1的相互作用, 从而阻断PD-1抑制性受体, 并且在一些情况下, 使T细胞分化成效应子表型。

[0063] 图3描绘堆叠分子的示例性示意图, 所述堆叠分子是含有为PD-L1或PD-L2 vIgD的第一变体IgSF结构域(第一vIgD) 和结合至第二抑制性受体的第二IgSF结构域(例如, 第二vIgD) 的多靶检查点拮抗剂。在示例性示意图中, 第二IgSF结构域(例如, 第二vIgD) 是CD112或CD155 vIgD。如图所示, 第一vIgD和第二vIgD与其同源结合配偶体相互作用, 以分别阻断PD-L1或PD-L2与PD-1的相互作用并且阻断CD155或CD112与TIGIT和/或CD112R的相互作用, 从而阻断多种抑制性受体。

[0064] 图4描绘用于将变体IgSF(vIgD) 定位至肿瘤细胞的堆叠分子的示例性示意图。在此形式中, 堆叠分子含有第一变体IgSF结构域(第一vIgD) 和第二IgSF结构域(例如, 第二vIgD), 其中第二IgSF结构域(例如, 第二vIgD) 是结合至肿瘤抗原的靶向肿瘤的IgSF结构域。示例性靶向肿瘤的IgSF结构域是NKP30的结合至肿瘤抗原B7-H6的IgSF结构域。在此描绘中, 变体IgSF结构域(vIgD) 是PD-L1的IgSF结构域的变体。如图所示, 靶向肿瘤的IgSF结构域与肿瘤细胞表面结合将第一变体IgSF结构域定位在肿瘤细胞表面上, 其中所述第一变体IgSF结构域可以与其在相邻免疫细胞(例如, T细胞) 表面上表达的一种或多种同源结合配偶体相互作用, 以拮抗PD-1抑制性活性并促进T细胞活化。

[0065] 图5A描绘堆叠分子的各种示例性构型, 所述堆叠分子含有第一变体IgSF结构域(第一vIgD) 和第二IgSF结构域, 诸如第二变体IgSF结构域(第二vIgD)。如图所示, 第一vIgD和第二IgSF结构域独立地直接或间接连接至Fc区的N端或C端。为了生成同源二聚体Fc分子, Fc区是能够通过在细胞中共同表达单个Fc区来与匹配的Fc区形成同源二聚体的Fc区。为了生成异源二聚体Fc分子, 单个Fc区含有突变(例如, CH3结构域中的“球入孔(knob-into-hole)”突变), 使得当单个Fc区在细胞中共同表达时与同源二聚体相比偏好形成异源二聚体。

[0066] 图5B描绘堆叠分子的各种示例性构型, 所述堆叠分子含有第一变体IgSF结构域(第一vIgD); 第二IgSF结构域, 诸如第二变体IgSF结构域(第二vIgD); 以及第三IgSF结构域, 诸如第三变体IgSF结构域(第三vIgD)。如图所示, 第一vIgD、第二IgSF和第三IgSF结构域独立地直接或间接连接至Fc区的N端或C端。为了生成同源二聚体Fc分子, Fc区是能够通过在细胞中共同表达单个Fc区来与匹配的Fc区形成同源二聚体的Fc区。

[0067] 图6描绘缀合至抗体(V-Mab) 的变体IgSF结构域(vIgD) 的活性的示例性示意图, 其中抗体(例如, 抗HER2抗体) 结合至肿瘤细胞表面上的抗原, 以将vIgD定位至细胞。如图所

示,抗体与肿瘤细胞表面结合将vIgD定位在肿瘤细胞表面上,其中所述vIgD可以与其在相邻免疫细胞(例如,T细胞)表面上表达的一种或多种同源结合配偶体相互作用,以激动或拮抗受体信号传导。在如图所示的示例性实施方案中,变体IgSF结构域(vIgD)是结合抑制性受体PD-1(诸如具有增加的对所述抑制性受体PD-1的亲和力)的PD-L1的IgSF结构域的变体。PD-L1 vIgD与PD-1抑制性受体的结合拮抗或阻断抑制性受体的负性信号传导,从而产生活化的T细胞或效应T细胞。在一些情况下,如果抑制性受体(PD-1)的簇接近活化受体(例如,CD28),那么可以实现通过TIP进行的抑制性受体活性的激动。

[0068] 图7A至图7C描绘变体IgSF-抗体缀合物(V-Mab)的各种示例性构型。图7A示出各种构型,其中变体IgSF结构域直接或间接连接至抗体轻链的N端和/或C端。图7B示出各种构型,其中变体IgSF结构域直接或间接连接至抗体重链的N端和/或C端。图7C描绘当图7A的轻链和图7B的重链在细胞中共同表达时所得的V-Mab构型。

[0069] 图8和图9描绘在人混合淋巴细胞反应(MLR)中测试的可溶性变体PD-L1 IgV-Fc生物活性的结果。将大约10,000个成熟DC和100,000个纯化同种异体CD3+ T细胞与各种增加浓度的变体PD-L1 IgV-Fc融合蛋白共同培养。非相关人IgG或仅培养基(标示为“无添加”)用作阴性对照。评定对照蛋白PDL1-Fc(全野生型PD-L1细胞外结构域)、野生型PD-L1 IgV-Fc和阳性对照抗PD-1单克隆抗体(纳武单抗(nivolumab))。图8和图9列出在指示浓度的变体IgV-Fc融合分子下培养物上清液中IFN- $\gamma$ 的计算水平(pg/mL)。

[0070] 图10描绘用示例性测试的变体PD-L1 SIP转导的T细胞的增殖研究。

[0071] 图11描绘指示的变体IgV-Fc融合分子、PD-L1/CD155堆叠Fc融合分子或PD-L1/CD155/CD112堆叠Fc融合分子与耗竭性T细胞的结合的剂量响应。

[0072] 图12列出在指示浓度的变体IgV-Fc融合分子、PD-L1/CD155堆叠Fc融合分子或抗体对照下耗竭性T细胞的培养物上清液中IFN- $\gamma$ 的计算水平(pg/mL)。

## 具体实施方式

[0073] 本文提供免疫调节蛋白,所述免疫调节蛋白是或包含表现出结合至至少一种靶配体同源结合配偶体(也称为相对结构(counter-structure)蛋白)的活性的程序性细胞死亡1配体1或PD-L1(也称为分化簇274、CD274.B7同源物1或B7-H1)的变体或突变体或其特异性结合片段。在一些实施方案中,与未修饰或野生型PD-L1多肽相比,变体PD-L1多肽含有一个或多个氨基酸序列(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)是在未修饰或野生型PD-L1多肽的IgSF结构域(例如,IgV或ECD)中。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽和免疫调节蛋白表现出改变的(诸如增加的或降低的)对至少一种同源结合配偶体(诸如PD-1或CD80中的至少一种)的结合活性或亲和力。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是可溶的。在一些实施方案中,免疫调节蛋白是能够在细胞表面上表达的跨膜免疫调节蛋白。在一些实施方案中,本文还提供一种或多种其他免疫调节蛋白,其为含有本文所提供的变体PD-L1多肽和一种或多种其他部分或多肽的缀合物或融合物。

[0074] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽和免疫调节蛋白调节免疫学免疫反应,诸如增加或降低免疫反应。在一些实施方案中,本文所提供的变体PD-L1多肽和免疫调节蛋白可以用于治疗与失调的免疫反应相关联的疾病或病状。

[0075] 在一些实施方案中,所提供的变体PD-L1多肽经由与共刺激和/或共抑制信号传导

分子调节T细胞活化。一般而言,抗原特异性T细胞活化通常需要两种不同的信号。第一信号通过T细胞受体 (TCR) 与存在于抗原递呈细胞 (APC) 上的主要组织相容性复合物 (MHC) 相关抗原的相互作用来提供。第二信号对于TCR接合是共刺激的,并且对于T细胞增殖、分化和/或存活(在一些情况下包括避免T细胞细胞凋亡或失能)是所必需的。

[0076] 在一些实施方案中,在正常生理条件下,T细胞介导的免疫反应通过T细胞受体 (TCR) 进行的抗原识别开始并且通过共刺激信号和抑制性信号(例如,免疫检查点蛋白)的平衡来调节。免疫系统依赖于免疫检查点以预防自身免疫(即,自身耐受)并预防组织在免疫反应期间,例如在针对病原体感染攻击期间受到过量损害。然而,在一些情况下,这些免疫调节蛋白可以在疾病和病状(包括肿瘤)中失调,从而作为逃避免疫系统的机制。

[0077] 在一些实施方案中,已知的T细胞共刺激受体是程序性细胞死亡蛋白1或PD-1,它是配体PD-L1(也称为分化簇274、CD274.B7同源物1或B7-H1)和程序性细胞死亡1配体2或PD-L2(也称为PDCD1L2、PDCD1LG2、分化簇273、CD273.或B7-DC)的T细胞共刺激受体。PD-L1和PD-L2通常在T细胞、B细胞和骨髓细胞的表面上表达。PD-L1和PD-L2是免疫活化的负性调节物,并且能够经由与程序性死亡1(PD-1)受体的相互作用下调免疫反应。在一些方面,PD-1在NK细胞和T细胞(包括CD4+和CD8+ T细胞)上表达,由此PD-1的接合可以抑制活化细胞活化、增殖和/或扩增。

[0078] 然而,PD-L1配体也可以结合至分化簇80(也称为CD80或B7-1)。PD-L1与CD80的结合可以阻断PD-L1与PD-1之间的相互作用,并且因此加强或增强免疫反应。因此,在一些情况下,PD-L1与CD80以及PD-L1与PD-1之间的相互作用在调节免疫反应中产生相反作用。因此,PD-1和CD80可以在免疫反应中发挥相反的作用以调节促炎或抗炎反应,这在一些情况下与多种疾病和病状相关联。

[0079] 在一些实施方案中,PD-1和CD80可以在建模免疫反应中发挥互补作用。在一些实施方案中,PD-1受体的活性的增强或抑制具有用于治疗炎性和自身免疫病症、癌症和病毒感染的临床意义。然而,在一些情况下,干预并改变此类受体的免疫调节作用的疗法受限于空间定向要求以及由免疫学突触的边界所施加的大小限制。在一些方面,现有治疗性药物(包括抗体药物)可能不能同时与参与调节这些相互作用的多种靶蛋白相互作用。此外,在一些情况下,现有治疗性药物可能仅具有拮抗而非激动免疫反应的能力。另外,独立地靶向这些受体中的一种的药物之间的药代动力学差异可能产生在整个治疗过程中适当维持此类药物组合的所需血液浓度的困难。

[0080] 在一些实施方案中,所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白调节(例如,增加或降低)PD-1关联的免疫活性。因此,在一些实施方案中,所提供的多肽通过提供具有改变的(例如,增加的或降低的)对PD-1的结合亲和力的变体PD-L1、从而激动或拮抗受体的作用来克服这些约束。在一些实施方案中,所提供的多肽通过提供具有改变的(例如,增加的或降低的)对CD80的结合亲和力的变体PD-L1、从而调节PD-1与PD-L1之间的相互作用的作用来克服这些约束。还提供制备和使用这些变体PD-L1的方法。

[0081] 本说明书中提及的所有出版物(包括专利、专利申请、科技论文和数据库)均出于所有目的以引用的方式整体并入本文,其引用程度如同特别且单独地指示将每个单独的出版物(包括专利、专利申请、科技论文或数据库)以引用的方式并入一般。如果本文中列出的定义与以引用的方式并入本文的专利、申请、公布的申请以及其他公布陈述的定义相反或

以另外的方式不一致,那么相比以引用的方式并入本文的定义,以本文中列出的定义为准。

[0082] 本文所用的章节标题仅出于组织目的,并且不应解释为限制所描述的主题。

[0083] I. 定义

[0084] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语、标记法和其他技术和科学术语或专门名词意图具有与要求保护的主题所属的领域的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,具有通常理解的含义的术语在本文中出于清楚和/或便于参考的目的加以定义,并且在本文中纳入所述定义应不必解释为代表与本领域中的通常理解有实质性差异。

[0085] 除非在特定情况下另外受限,否则在本说明书中通篇使用的术语如下定义。如说明书和所附权利要求书中所使用,除非上下文另外明确规定之外,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数指示物。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语、缩略词和缩写具有与发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。除非另外指示,否则化学和生物化学名称的缩写和符号是根据IUPAC-IUB命名法。除非另外指示,否则所有数值范围包括限定范围的值以及之间的所有整数值。

[0086] 如免疫球蛋白超家族结构域背景下所用的术语“亲和力修饰的”意指哺乳动物免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域具有改变的氨基酸序列(相对于对应的野生型亲本或未修饰IgSF结构域),使得与亲本野生型或未修饰(即,非亲和力修饰的)IgSF对照结构域相比,它具有增加或降低的对其至少一种同源结合配偶体(或者“相对结构”)的结合亲和力或亲合力。在此背景下包括亲和力修饰的PD-L1 IgSF结构域。在一些实施方案中,亲和力修饰的IgSF结构域可以在野生型或未修饰IgSF结构域中含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸差异,诸如氨基酸取代。结合亲和力或亲合力的增加或降低可以使用熟知的结合测定诸如流式细胞术确定。Larsen等人,American Journal of Transplantation,第5卷:443-453(2005)。还参见Linsley等人,Immunity,第1卷(9):793-801(1994)。蛋白质对其一种或多种同源结合配偶体的结合亲和力或亲合力的增加是大于野生型IgSF结构域对照至少10%的值,并且在一些实施方案中,大于野生型IgSF结构域对照值至少20%、30%、40%、50%、100%、200%、300%、500%、1000%、5000%或10000%的值。蛋白质对其至少一种同源结合配偶体的结合亲和力或亲合力的降低是不大于对照的90%但不小于野生型IgSF结构域对照值的10%的值,并且在一些实施方案中,不大于野生型IgSF结构域对照值的80%、70%、60%、50%、40%、30%或20%但不小于10%的值。亲和力修饰的蛋白质在一级氨基酸序列中通过氨基酸残基的取代、添加或缺失来改变。术语“亲和力修饰的IgSF结构域”不应被解释为利用产生亲和力修饰的IgSF结构域所借助的任何特定起始组合物或方法的任何条件。因此,本发明的亲和力修饰的IgSF结构域不限于野生型IgSF结构域,其然后通过任何特定亲和力修饰方法转化成亲和力修饰的IgSF结构域。亲和力修饰的IgSF结构域多肽可以例如由野生型哺乳动物IgSF结构域序列信息开始生成,然后在计算机上建模以用于结合至其同源结合配偶体,并且最后重组或化学合成以产生主题的亲和力修饰的IgSF结构域组合物。在仅一个替代性实例中,亲和力修饰的IgSF结构域可以通过定点诱变野生型IgSF结构域来产生。因此,亲和力修饰的IgSF结构域表示一种产物并且不一定表示通过任何给定方法产生的产物。可以采用多种技术,包括重组方法、化学合成或它们的组合。

[0087] 如本文所用,术语“同种异体”意指细胞或组织从一种生物体取出并且然后输注或过继性转移至相同物种的遗传上不同的生物体中。在本发明的一些实施方案中,所述物种是鼠或人。

[0088] 如本文所用,术语“自体”意指细胞或组织从生物体取出,随后输注或过继性转移至同一生物体。自体细胞或组织可以通过例如重组DNA方法来改变,使得它不再与从生物体取出的天然细胞或天然组织遗传上相同。例如,天然自体T细胞可以通过重组DNA技术进行遗传工程改造以变成表达跨膜免疫调节蛋白和/或嵌合抗原受体(CAR)的自体工程改造的细胞,这在一些情况下涉及使T细胞或TIL(肿瘤浸润性淋巴细胞)工程改造。然后将工程改造的细胞输注到从中分离天然T细胞的患者。在一些实施方案中,所述生物体是人或鼠。

[0089] 如本文所用,术语“结合亲和力”和“结合亲合力”分别意指在特异性结合条件下蛋白质对其相对结构的特异性结合亲和力和特异性结合亲合力。在生物化学动力学中,亲合力是指个体非共价结合相互作用(诸如PD-L1与其相对结构PD-1和/或CD80之间)的多种亲和力的累积强度。因此,亲合力不同于描述单一相互作用强度的亲和力。含有亲和力修饰的PD-L1 IgSF结构域的变体PD-L1对其相对结构的结合亲和力的增加或减弱相对于未修饰PD-L1,诸如含有天然或野生型IgSF结构域(诸如IgV结构域)的未修饰PD-L1的结合亲和力来确定。用于确定结合亲和力或亲合力的方法为本领域中已知的。参见例如Larsen等人,American Journal of Transplantation,第5卷:443-453(2005)。在一些实施方案中,本发明的变体PD-L1(即,含有亲和力修饰的IgSF结构域的PD-L1蛋白)以一个结合亲和力特异性结合至通过流式细胞术测量的PD-1和/或CD80,所述结合亲和力在结合测定中产生比野生型PD-L1对照大至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的平均荧光强度(MFI)值。

[0090] 术语“生物半衰期”是指物质诸如包含本发明的变体PD-L1的免疫调节多肽失去其一半药理学或生理学活性或浓度所花费的时间量。生物半衰期可以通过消除、排泄、降解(例如,酶促)在身体某些器官或组织中的物质、或吸收和浓度来实现。在一些实施方案中,生物半衰期可以通过确定物质血浆浓度达到其稳态水平的一半(“血浆半衰期”)所花费的时间来评定。可以用于衍生化并增加本发明的多肽的生物半衰期的缀合物为本领域中已知的并且包括但不限于聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、XTEN(延长的重组肽;参见W02013130683)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、脂质(酰化)以及聚Pro-Ala-Ser(PAS)、聚谷氨酸(谷氨酰化)。

[0091] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指在哺乳动物细胞上表达的包含至少胞外域、跨膜和胞内域(ectodomain)的人工(即,人造)跨膜蛋白。任选地,CAR蛋白包括将胞外域共价连接至跨膜结构域的“间隔物”。间隔物通常是经由肽键将胞外域连接至跨膜结构域的多肽。CAR通常在哺乳动物淋巴细胞上表达。在一些实施方案中,CAR在哺乳动物细胞诸如T细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上表达。在T细胞上表达的CAR在本文中称为“CAR T细胞”或“CAR-T”。在一些实施方案中,CAR-T是T辅助细胞、细胞毒性T细胞、天然杀伤T细胞、记忆T细胞、调节T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞。当以例如过继性细胞转移在临幊上使用时,对患者肿瘤具有抗原结合特异性的CAR-T通常被工程改造以在从患者获得的T细胞上表达。然后将表达CAR的工程改造的T细胞输注回到患者中。因此,CAR-T通常为自体CAR-T,尽管同种异体CAR-T包括在本发明的范围内。CAR的胞外域包含抗原结合区域,诸如抗体或其抗原结合片段(例

如,scFv),其在生理条件下与靶抗原诸如肿瘤特异性抗原特异性结合。在特异性结合时,事件的生物化学链(即,信号转导)引起CAR-T的免疫学活性的调节。因此,例如,在通过CAR-T的抗原结合区域与其靶抗原进行特异性结合时,可以导致T细胞活性的免疫学活性的变化,如通过细胞毒性、增殖或细胞因子产生的变化所反映的。在一些实施方案中,在CAR-T活化时的信号转导通过在天然哺乳动物T细胞中参与信号转导的CD3- $\zeta$ 链(“CD3-z”)来实现。CAR-T可以还包含多种信号传导结构域,诸如CD28、41BB或OX40,以进一步调节T细胞的免疫调节反应。CD3-z包含参与T细胞受体信号转导的保守性基序,其称为免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。

[0092] 术语“集合地(collectively)”或“集合(collective)”在参考由体外测定中两种或更多种变体PD-L1的存在诱导的细胞因子产生来使用时,意指总体细胞因子表达水平,而不管由个体变体PD-L1诱导的细胞因子产生如何。在一些实施方案中,正在测定的细胞因子在体外原代T细胞测定中为IFN- $\gamma$ 。

[0093] 参考多肽,诸如参考变体PD-L1的IgSF结构域的术语“同源结合配偶体”(与“相对结构”可互换使用)是指至少一种分子(通常为天然哺乳动物蛋白质),参考多肽在特异性结合条件下特异性结合至所述至少一种分子。在一些方面,含有亲和力修饰的IgSF结构域的变体PD-L1特异性结合至对应天然或野生型PD-L1的相对结构,但以增加或减弱的亲和力结合。所识别的并且在特异性结合条件下特异性结合至其同源受体的配体种类是此受体的相对结构或同源结合配偶体的实例。“同源细胞表面结合配偶体”是在哺乳动物细胞表面上表达的同源结合配偶体。“细胞表面分子种类”是免疫学突触(IS)的配体的同源结合配偶体,其在细胞(诸如哺乳动物细胞)上并由所述细胞表达,从而形成免疫学突触。

[0094] 如本文所用,“缀合物”、“缀合”或其语法变形是指通过本领域已知的任何接合或连接方法将两个或更多个化合物接合或连接在一起,从而形成另一种化合物。其还可以是指通过将两个或更多个化合物接合或连接一起来生成的化合物。例如,直接或间接连接至一个或多个化学部分或多肽的变体PD-L1多肽是示例性缀合物。此类缀合物包括融合蛋白、通过化学缀合产生的缀合物和通过任何其他方法产生的缀合物。

[0095] 如本文所用,术语“竞争性结合”意指蛋白质能够特异性结合至少两种同源结合配偶体,但是一种同源结合配偶体的特异性结合抑制(诸如预防或阻止)第二同源结合配偶体的同时结合。因此,在一些情况下,蛋白质不可能同时结合两种同源结合配偶体。通常,竞争性结合物含有用于特异性结合的相同或重叠结合位点,但这并不是必需的。在一些实施方案中,竞争性结合引起对蛋白质与其同源结合配偶体之一的特异性结合的可测量抑制(部分或完全),这是由于第二同源结合配偶体的特异性结合。已知多种方法定量竞争性结合,诸如ELISA(酶联免疫吸附测定)测定。

[0096] 如本文所用,术语“保守性氨基酸取代”意指其中某一氨基酸残基被具有类似化学特性(例如,电荷或疏水性)侧链R基团的另一氨基酸残基取代的氨基酸取代。具有类似化学特性的侧链的氨基酸基团的实例包括1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。保守性氨基酸取代基团是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及

天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0097] 术语,参考蛋白质的位置的“对应于”(诸如核苷酸或氨基酸位置“对应于”所公开的序列(诸如序列表中所列出)中的核苷酸或氨基酸位置的陈述)是指在基于结构序列比对或使用标准比对算法诸如GAP算法与所公开的序列比对时鉴定的核苷酸或氨基酸位置。例如,对应残基可以通过经由如本文所述的结构比对方法将参考序列与SEQ ID NO:30或1728(ECD结构域)中所列出的或SEQ ID NO:55或309(IgV结构域)中所列出的野生型PD-L1的序列比对来确定。通过比对所述序列,本领域技术人员可以例如使用保守且相同的氨基酸残基作为引导物来鉴定对应残基。

[0098] 如本文所用,术语“降低”或“减轻”或“抑制”意指降低了统计学显著的量。降低可以是至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0099] 术语“衍生物”或“衍生化”是指通过将它直接或间接共价连接至组合物以便改变诸如生物半衰期、生物利用率、免疫原性、溶解度、毒性、效能或功效的特征,同时保留或增强其治疗益处的蛋白质修饰。本发明的免疫调节多肽的衍生物处于本发明的范围内并且可以通过例如糖基化、peg化、脂质化或Fc融合来制备。

[0100] 如本文所用,结构域(通常为三个或更多个、通常5个或7个或更多个氨基酸,诸如10至200个氨基酸残基的序列)是指分子(诸如蛋白质或编码核酸)的一个部分,所述部分在结构上和/或功能上与所述分子的其他部分不同并且是可鉴定的。例如,结构域包括多肽链的可以形成蛋白质内的独立折叠结构的那些部分,所述独立折叠结构由一个或多个结构基序构成和/或借助于功能活性诸如结合活性识别。蛋白质可以具有一个或超过一个不同的结构域。例如,结构域可以通过一级序列或结构与相关家族成员的同源性,诸如与基序的同源性来鉴定、限定或区分。在另一个实例中,结构域可以通过其功能,诸如其与生物分子诸如同源结合配偶体相互作用的能力来区分。结构域可以独立地表现出生物功能或活性,使得独立地或融合至另一个分子的结构域可以执行活性,例如像结合。结构域可以是线性氨基酸序列或者非线性氨基酸序列。许多多肽含有多个结构域。此类结构域是已知的,并且可以通过本领域技术人员鉴定。为了在本文中举例说明,提供了定义,但是应理解,以名称识别特定结构域是在本领域的技术内。在需要时,可以使用适当软件来鉴定结构域。

[0101] 如本文所用,术语“胞外域”是指膜蛋白(诸如跨膜蛋白)的位于液胞膜外部的区域。胞外域通常包含特异性结合至配体或细胞表面受体的结合结构域,诸如经由特异性结合至配体或细胞表面受体的结合结构域。细胞跨膜蛋白的胞外域交替地称为细胞外结构域。

[0102] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指本发明的治疗组合物(包括蛋白质组合物或细胞组合物)在单独(即,作为单一疗法)或与额外治疗剂组合地离体(通过与来自患者的细胞接触)或体内(通过向患者施用)施用时例如通过减轻或消除疾病的症状和/或病因而引起疾病进展的统计学显著减少的量和/或浓度。有效量可以是减轻、减少或缓解至少一种与疾病或病症相关联的症状或生物反应或作用,预防疾病或病症的进展,或者改善患者的身体功能的量。在细胞疗法的情况下,有效量是通过过继性细胞疗法向患者施用的细胞的有效剂量或数目。在一些实施方案中,患者为哺乳动物,诸如非人灵长类或人患者。

[0103] 如本文所用,术语“胞内域”是指一些膜蛋白(诸如跨膜蛋白)中存在的区域,其延伸到由细胞表面膜限定的内部空间。在哺乳动物细胞中,胞内域是膜蛋白的胞质区。在细胞

中,胞内域与细胞内成分相互作用并且可以在信号转导中起作用,并且因此在一些情况下可以是细胞内信号传导结构域。细胞跨膜蛋白的胞内域替代地称为细胞质结构域,其在一些情况下可以是细胞质信号传导结构域。

[0104] 如本文在增加哺乳动物淋巴细胞的免疫学活性的背景下使用的术语“增强的”或“增加的”意指增加淋巴细胞中的一种或多种活性。增加的活性可以是以下一种或多种:增加的细胞存活、细胞增殖、细胞因子产生、或T细胞细胞毒性,诸如增加了统计学显著的量。在一些实施方案中,对增加的免疫学活性的提及意指增加干扰素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )产生,诸如增加了统计学显著的量。在一些实施方案中,免疫学活性可以在混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定中评定。进行MLR测定的方法为本领域中已知的。Wang等人,Cancer Immunol Res.2014年9月:2(9):846-56。其他评定淋巴细胞活性的方法为本领域中已知的,包括如本文所述的任何测定。在一些实施方案中,增强可以是大于非零对照值的至少10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、400%或500%的增加。

[0105] 如本文所用,术语“工程改造的细胞”是指已通过人类干预,诸如通过重组DNA方法或病毒转导来进行遗传修饰的哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞,诸如淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞、NK细胞)或抗原递呈细胞(例如,树突细胞)。细胞可以是来自患者的原代细胞或者可以是细胞系。在一些实施方案中,本发明的工程改造的细胞包含本发明的变体PD-L1,其被工程改造以调节表达PD-1和/或CD80的T细胞的免疫学活性,变体PD-L1特异性结合至所述PD-1和/或CD80。在一些实施方案中,变体PD-L1是含有细胞外结构域的跨膜免疫调节蛋白(在下文中称为“TIP”)或其含有连接至跨膜结构域(例如,PD-L1跨膜结构域)的IgV或ECD结构域和任选地细胞内信号传导结构域的部分。在一些情况下,TIP被格式化为含有异源细胞质信号传导结构域或胞内域的嵌合受体。在一些实施方案中,工程改造的细胞能够表达并分泌如本文所述的免疫调节蛋白。所提供的工程改造的细胞中还有进一步含有工程改造的T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞。

[0106] 如本文所用,术语“工程改造的T细胞”是指已通过人类干预,诸如通过重组DNA方法或病毒转导方法进行遗传修饰的T细胞,诸如T辅助细胞、细胞毒性T细胞(或者,细胞毒性T淋巴细胞或CTL)、天然杀伤T细胞、调节T细胞、记忆T细胞或 $\gamma$   $\delta$ T细胞。工程改造的T细胞包含本发明的变体PD-L1跨膜免疫调节蛋白 (TIP) 或分泌的免疫调节蛋白 (SIP),其在T细胞上表达并且被工程改造来调节工程改造的T细胞本身或T细胞上表达的变体PD-L1所特异性结合的哺乳动物细胞的免疫学活性。

[0107] 术语“工程改造的T细胞受体”或“工程改造的TCR”是指被工程改造来以所需亲和力特异性结合至主要组织相容性复合物 (MHC) /肽靶抗原的T细胞受体 (TCR),其被选择、克隆和/或随后引入到T细胞群体中,所述T细胞群体通常用于过继性免疫疗法。相比于工程改造的TCR,CAR被工程改造来以MHC独立性方式结合靶抗原。

[0108] 如本文所用,术语“在...上表达”参考在细胞(诸如哺乳动物细胞)表面上表达的蛋白质来使用。因此,蛋白质被表达为膜蛋白。在一些实施方案中,表达的蛋白质为跨膜蛋白。在一些实施方案中,蛋白质缀合至小分子部分,诸如药物或可检测标签。在细胞表面上表达的蛋白质可以包括在哺乳动物细胞上表达的细胞表面蛋白质,诸如细胞表面受体。

[0109] 术语“半衰期延长部分”是指多肽融合物或化学缀合物的部分,与未如此缀合至所述部分的蛋白质的半衰期相比,所述部分延长了哺乳动物血清中循环的蛋白质的半衰期。

在一些实施方案中,半衰期被延长了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍或6.0倍。在一些实施方案中,在体内施用之后,与无半衰期延长部分的蛋白质相比,半衰期被延长了超过6小时、超过12小时、超过24小时、超过48小时、超过72小时、超过96小时或超过1周。半衰期是指蛋白质失去其浓度、量或活性的一半所花费的时间量。半衰期可以例如通过使用ELISA测定或活性测定来确定。示例性半衰期延长部分包括Fc结构域、多聚化结构域、聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、XTEN(延长的重组肽;参见WO2013130683)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、脂质(酰化)和聚Pro-Ala-Ser(PAS)以及聚谷氨酸(谷氨酰化)。

[0110] 如本文所用,术语“免疫学突触”或“免疫突触”意指在表达MHC I(主要组织相容性复合物)或MHC II的哺乳动物细胞诸如抗原递呈细胞或肿瘤细胞与哺乳动物淋巴细胞诸如效应T细胞或天然杀伤(NK)细胞之间的界面。

[0111] 免疫球蛋白分子的Fc(可结晶片段)区或结构域(也称为Fc多肽)主要对应于免疫球蛋白重链的恒定区,并且负责不同功能,包括抗体的一种或多种效应功能。Fc结构域含有免疫球蛋白分子的部分或全部铰链结构域加上CH2和CH3结构域。Fc结构域可以形成通过一个或多个二硫键接合的两个多肽的二聚体。在一些实施方案中,Fc是表现出降低的(例如,降低大于30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大)活性以促进效应功能的变体Fc。在一些实施方案中,除非参考特定SEQ ID NO描述,否则对Fc区中的氨基酸取代的提及是通过EU编号系统进行的。EU编号是已知的并且是根据最新更新的IMGT科学图标(IMGTR®, international ImMunoGeneTics information system®, <http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/HuIGHGnber.html>(创建:2001年5月17日,最后更新:2013年1月10日)以及如Kabat,E.A.等人Sequences of Proteins of Immunologic interest.第5版.US Department of Health and Human Services,NIH公布号91-3242(1991)中所报告的EU索引。

[0112] 免疫球蛋白Fc融合物(“Fc融合物”)(诸如免疫调节Fc融合蛋白)为包含可操作地连接至免疫球蛋白的Fc区的一种或多种多肽(或一种或多种小分子)的分子。Fc融合物可以包含例如抗体的Fc区(其促进效应功能和药代动力学)和变体PD-L1。免疫球蛋白Fc区可以间接或直接连接至一个或多个变体PD-L1或小分子(融合物配偶体)。不同接头为本领域中已知的并且可以任选地用于将Fc连接至融合物配偶体以生成Fc融合物。相同物种的Fc融合物可以被二聚化以形成Fc融合物同源二聚体,或者使用不相同物种以形成Fc融合物异源二聚体。在一些实施方案中,Fc是哺乳动物Fc,诸如鼠或人Fc。

[0113] 术语“宿主细胞”是指可以用于表达由重组表达载体编码的蛋白质的细胞。宿主细胞可以是原核生物,例如大肠杆菌,或者它可以是真核生物,例如单细胞真核生物(例如,酵母或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物诸如Veggie CHO以及在无血清培养基中生长的相关细胞系或缺乏DHFR的CHO品系DX-B11。另一个实例是人内皮肾293细胞或其衍生物。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)。

[0114] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”(缩写为“Ig”)是指哺乳动物免疫球蛋白,包括抗

体的五种人类别中的任一种: IgA(其包括子类别IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(其包括子类别IgG1、IgG2、IgG3以及IgG4)以及IgM。所述术语还包括小于全长的免疫球蛋白,无论是全部或部分合成(例如,重组或化学合成)或天然产生,诸如抗原结合片段(Fab)、含有V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的可变片段(Fv)、含有一起连接在一条链中的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的单链可变片段(scFv)、以及其他抗体V区片段,诸如Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、dsFv双体抗体(diabody)、Fc和Fd多肽片段。所述术语的含义内包括双特异性抗体,即同源双特异性和异源双特异性。

[0115] 如本文所用,术语“免疫球蛋白超家族”或“IgSF”意指参与细胞的识别、结合或粘附过程的细胞表面和可溶性蛋白的组。基于与免疫球蛋白(即,抗体)共有的结构特征,分子被分类为此超家族的成员;它们全部具有称为免疫球蛋白结构域的结构域或折叠。IgSF的成员包括免疫系统的细胞表面抗原受体、共受体和共刺激分子,参与抗原递呈至淋巴细胞的分子,细胞粘附分子,某些细胞因子受体和细胞内肌蛋白。它们通常与免疫系统中的作用相关联。免疫学突触中的蛋白质通常是IgSF的成员。IgSF也基于共有的特性诸如功能分类到“子家族”中。此类子家族通常由4个至30个IgSF成员组成。

[0116] 如本文所用,术语“IgSF结构域”或“免疫球蛋白结构域”或“Ig结构域”是指IgSF蛋白的结构域。Ig结构域以免疫球蛋白分子命名。它们含有约70-110个氨基酸并且根据其大小和功能分类。Ig结构域具有特征性Ig折叠,其具有通过反平行β链的两个片层形成的夹层样结构。在夹层的内侧上的疏水性氨基酸与在B链和F链的半胱氨酸残基之间形成的高度保守性二硫键之间的相互作用使Ig折叠稳定。Ig结构域的一端具有称为互补决定区的区段,其对于抗体对其配体的特异性而言为重要的。Ig样结构域可以分类为(以下类别): IgV、IgC(其可以是IgC1或IgC2)或IgI。大部分Ig结构域为可变的(IgV)或恒定的(IgC)。具有9条β链的IgV结构域通常长于具有7条β链的IgC结构域。IgSF的一些成员的Ig结构域的氨基酸序列类似于IgV结构域,但大小类似于IgC结构域。这些结构域被称为IgC2结构域,而标准IgC结构域称为IgC1结构域。T细胞受体(TCR)链在细胞外部分中含有两个Ig结构域;一个IgV结构域在N端并且一个IgC1结构域与细胞膜相邻。PD-L1含有两个Ig结构域:一个IgV结构域和一个IgC结构域。

[0117] 如本文所用,术语“IgSF种类”意指具有相同或基本上相同的一级氨基酸序列的全部IgSF成员蛋白。每个哺乳动物免疫球蛋白超家族(IgSF)成员定义了属于此IgSF成员的所有IgSF种类的独特身份。因此,每个IgSF家族成员相对于其他IgSF家族成员为独特的,并且因此特定IgSF家族成员的每个种类相对于另一个IgSF家族成员的种类为独特的。然而,在相同IgSF种类的分子之间可以存在变化,其归因于翻译后修饰诸如糖基化、磷酸化、泛素化、亚硝基化、甲基化、乙酰化和脂质化的差异。另外,归因于基因多态性的单一IgSF种类内的微小序列差异构成另一种形式的单一IgSF种类内的变化,归因于例如蛋白水解裂解的IgSF种类的野生型截短形式也如此。“细胞表面IgSF种类”是在细胞(通常为哺乳动物细胞)表面上表达的IgSF种类。

[0118] 如本文在哺乳动物淋巴细胞诸如T细胞的背景下使用的,术语“免疫学活性”是指细胞存活、细胞增殖、细胞因子产生(例如,干扰素-γ)或T细胞细胞毒性活性中的一种或多种。在一些情况下,免疫学活性可以意指细胞因子诸如趋化因子或白介素的细胞表达。用于确定免疫学活性的增强或抑制的测定包括测量培养物上清液中的干扰素-γ细胞因子水平的MLR(混合淋巴细胞反应)测定(Wang等人,Cancer Immunol Res.2014年9月:2(9):846-

56)、SEB(葡萄球菌肠毒素B)T细胞刺激测定(Wang等人,Cancer Immunol Res.2014年9月:2(9):846-56)以及抗CD3 T细胞刺激测定(Li和Kurlander,J Transl Med.2010;8:104)。由于T细胞活化与IFN- $\gamma$ 细胞因子的分泌相关联,所以可以使用商业ELISA试剂盒测定这些体外人T细胞测定对培养物上清液中的IFN- $\gamma$ 水平的检测(Wu等人,Immunol Lett 2008年4月15日;117(1):57-62)。免疫反应的诱导使得免疫学活性相对于静息淋巴细胞有所增加。如本文所提供的含有亲和力修饰的IgSF结构域的免疫调节蛋白(诸如变体PD-L1多肽)可以相对于野生型IgSF成员或IgSF结构域对照,在原代T细胞测定中,在一些实施方案中增加或者在替代性实施方案中降低IFN- $\gamma$ (干扰素- $\gamma$ )表达。技术人员将认识到,用于确定IFN- $\gamma$ 表达的增加的原代T细胞测定的形式可以不同于用于测定IFN- $\gamma$ 表达的降低的测定。在原代T细胞测定中测定本发明的免疫调节蛋白或亲和力修饰的IgSF结构域改变IFN- $\gamma$ 表达的能力时,可以使用混合淋巴细胞反应(MLR)测定。方便地,在一些情况下,可以采用本发明的亲和力修饰的IgSF结构域的可溶性形式来确定其增加或降低MLR中的IFN- $\gamma$ 表达的能力。可替代地,可以使用共固定测定。在共固定测定中,在一些实施方案中由抗CD3抗体提供的T细胞受体信号与共固定的亲和力修饰的IgSF结构域(诸如变体PD-L1)结合使用,以确定相对于野生型IgSF结构域对照增加或降低IFN- $\gamma$ 表达的能力。测定工程改造的细胞的免疫学活性(包括评价变体PD-L1跨膜免疫调节蛋白的活性)的方法为本领域中已知的并且包括但不限于在抗原刺激之后扩增T细胞的能力、在不存在重新刺激时维持T细胞扩增的能力以及适当动物模型中的抗癌活性。测定还包括评定细胞毒性的测定,包括标准<sup>51</sup>Cr释放测定(参见例如Milone等人,(2009)Molecular

[0119] Therapy 17:1453-1464)或基于流的细胞毒性测定,或者基于阻抗的细胞毒性测定(Peper等人(2014)Journal of Immunological Methods,405:192-198)。

[0120] “免疫调节多肽”或“免疫调节蛋白”为调节免疫学活性的多肽或蛋白质分子。“调节(modulation/modulating)”免疫反应意指使免疫学活性增加或降低。免疫调节蛋白可以是单一多肽链或者例如通过链内二硫键彼此共价键合的至少两条多肽链的多聚体(二聚体或更高级多聚体)。因此,单体、二聚体和更高级多聚体多肽处于所定义术语的范围内。多聚体多肽可以是同源多聚体(相同多肽链)或异源多聚体(不同多肽链)。本发明的免疫调节蛋白包含变体PD-L1。

[0121] 如本文所用,术语“增加”意指增加了统计学显著的量。增加可以是至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%或大于非零对照值。

[0122] PD-L1的“同种型”是氨基酸序列不同的多种天然存在的PD-L1多肽之一。同种型可以是由单一基因表达的RNA转录物的剪接变体的产物或者高度类似但不同的基因的表达产物,从而产生功能类似的蛋白质,诸如可以由基因复制产生。如本文所用,术语PD-L1的“同种型”也是指PD-L1基因的不同等位基因的产物。

[0123] 如本文所用,术语“淋巴细胞”意指哺乳动物免疫系统中白血细胞的三种亚型中的任一种。它们包括天然杀伤细胞(NK细胞)(其在细胞介导的细胞毒性先天性免疫方面起作用)、T细胞(对于细胞介导的细胞毒性获得性免疫)和B细胞(对于体液的抗体驱动的获得性免疫)。T细胞包括:T辅助细胞、细胞毒性T细胞、天然杀伤T细胞、记忆T细胞、调节T细胞或 $\gamma$ δT细胞。先天性淋巴细胞(ILC)也包括在淋巴细胞的定义内。

[0124] 术语“哺乳动物”或“患者”具体包括对以下至少一种的提及:人、黑猩猩、猕猴、食

蟹猴、狗、猫、小鼠或大鼠。

[0125] 如本文所用,术语“膜蛋白”意指在生理条件下直接或间接附接至脂质双层的蛋白质。形成膜的脂质双层可以是生物膜,诸如真核生物(例如,哺乳动物)细胞膜或人工(即,人造)膜,诸如脂质体上存在的膜。膜蛋白附接到脂质双层可以通过共价附接或者通过非共价相互作用,诸如疏水性或静电相互作用进行。膜蛋白可以是整合膜蛋白或外周膜蛋白。为外周膜蛋白的膜蛋白非共价附接至脂质双层或者非共价附接至整合膜蛋白。外周膜蛋白形成与脂质双层的临时附接,使得在哺乳动物生理的条件范围内,外周膜蛋白可以与脂质双层缔合和/或解离。相比于外周膜蛋白,整合膜蛋白形成与膜脂质双层的基本上永久性的附接,使得在哺乳动物生理的条件范围内,整合膜蛋白不会从与脂质双层的附接中解离。膜蛋白可以通过脂质双层的一个层(单境(monotopic))形成与膜的附接或者通过膜的两个层附接(多境(polytopic))。与仅一个脂质双层相互作用的整合膜蛋白是“整合单境蛋白”。与两个脂质双层相互作用的整合膜蛋白是“整合多境蛋白”,或者在本文中称为“跨膜蛋白”。

[0126] 如本文在免疫反应(诸如哺乳动物免疫反应)的背景下使用的术语“调节(modulating/modulate)”是指由于施用包含本发明的变体PD-L1的免疫调节多肽或者由于施用表达本发明的免疫调节蛋白(诸如变体PD-L1跨膜免疫调节蛋白)而发生的现有或潜在免疫反应的任何改变,诸如增加或降低。因此,其是指与不存在施用包含变体PD-L1的免疫调节蛋白或表达这种免疫调节多肽的细胞时发生或存在的免疫反应相比的免疫反应的改变,诸如增加或降低。此调节包括免疫细胞的免疫学活性的程度或范围的任何诱导、激活、抑制或改变。免疫细胞包括B细胞、T细胞、NK(天然杀伤)细胞、NK T细胞、专职抗原递呈细胞(APC)和非专职抗原递呈细胞以及炎性细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)。调节包括对现有免疫反应、发展的免疫反应、潜在免疫反应、或诱导、调节、影响免疫反应或响应于免疫反应的能力赋予的任何变化。调节包括基因、蛋白质和/或其他分子在免疫细胞中的表达和/或功能作为免疫反应的一部分的任何变化。免疫反应的调节或免疫学活性的调节包括例如以下:使免疫细胞消除、缺失或螯合;诱导或生成可以调节其他细胞诸如自身反应性淋巴细胞、抗原递呈细胞或炎性细胞的功能能力的免疫细胞;诱导免疫细胞的非响应状态(即,失能);增强或抑制免疫细胞的活性或功能,包括但不限于改变这些细胞表达的蛋白质的模式。实例包括诸如细胞因子、趋化因子、生长因子、转录因子、激酶、共刺激分子或其他细胞表面受体的分子的某些类别的产生和/或分泌发生改变或者这些调节事件的任何组合。调节可以在原代T细胞测定中例如通过IFN- $\gamma$ (干扰素 $\gamma$ )表达相对于野生型PD-L1对照的改变来评定(参见Zhao和Ji,Exp Cell Res.2016年1月1日;340(1):132-138)。调节可以例如通过工程改造的细胞的免疫学活性相对于用野生型PD-L1跨膜蛋白工程改造的细胞的改变,诸如工程改造的细胞的细胞毒性活性的改变或者工程改造的细胞的细胞因子分泌的改变。

[0127] 如本文所用,术语“分子种类”意指具有相同或基本上相同的一级氨基酸序列的全部蛋白质。每种哺乳动物免疫球蛋白超家族(IgSF)成员限定了相同或基本上相同的分子种类的集合。因此,例如,人PD-L1是IgSF成员并且每种人PD-L1分子是PD-L1的分子种类。在相同分子种类的分子之间可以存在变化,其归因于翻译后修饰诸如糖基化、磷酸化、泛素化、亚硝基化、甲基化、乙酰化和脂质化的差异。另外,归因于基因多态性的单一分子种类内的微小序列差异构成另一种形式的单一分子种类内的变化,归因于例如蛋白水解裂解的单一

分子种类的野生型截短形式也如此。“细胞表面分子种类”是在哺乳动物细胞表面上表达的分子种类。两种或更多种不同的蛋白质种类各自唯一地存在于形成IS的两个哺乳动物细胞之一上或唯一地存在于另一个哺乳动物细胞上(但不存在于两个哺乳动物细胞上),所述蛋白质种类被认为相对于彼此呈“顺式”或“顺式构型”。两种不同的蛋白质种类中的第一种唯一地存在于形成IS的两个哺乳动物细胞之一上并且第二种唯一地存在于形成IS的两个哺乳动物细胞的第二个细胞上,所述蛋白质种类被认为是呈“反式”或“反式构型”。两种不同的蛋白质种类各自存在于形成IS的两个哺乳动物细胞的两个细胞上,所述蛋白质种类在这些细胞上呈顺式和反式构型。

[0128] 术语“多聚化结构域”是指促进多肽分子与一种或多种额外多肽分子发生稳定相互作用的氨基酸序列,所述多肽分子各自含有互补多聚化结构域(例如,第一多聚化结构域和第二多聚化结构域),其可以是相同或不同的多聚化结构域。互补多聚化结构域之间的相互作用,例如第一多聚化结构域与第二多聚化结构域之间的相互作用形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用,以产生多肽分子与额外多肽分子的多聚体。在一些情况下,多聚化结构域是相同的并且与其自身相互作用以形成两条多肽链之间的稳定蛋白质-蛋白质相互作用。通常,多肽直接或间接接合至多聚化结构域。示例性多聚化结构域包括免疫球蛋白序列或其部分、亮氨酸拉链、疏水性区域、亲水性区域和相容性蛋白质-蛋白质相互作用结构域。多聚化结构域例如可以是免疫球蛋白恒定区或结构域,例如像来自IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA、IgE、IgD和IgM以及其修饰形式的Fc结构域或其部分。

[0129] 术语“核酸”和“多核苷酸”可互换用于指示单链或双链形式的核酸残基(例如,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合物。除非特别限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,并且其具有与所述天然核苷酸类似的结合特性,并且以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。除非另外指示,否则一个特定核酸序列也隐含地涵盖其经过保守性修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补核苷酸序列,以及明确指示的序列(“参考序列”)。具体地,简并密码子取代可通过产生序列来实现,其中一个或多个选择的(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代。术语核酸或多核苷酸涵盖由基因编码的cDNA或mRNA。

[0130] 如本文所用,术语“非竞争性结合”意指蛋白质同时特异性结合至至少两个同源结合配偶体的能力。因此,蛋白质能够同时结合至至少两个不同的同源结合配偶体,尽管结合相互作用不需要持续相同的持续时间,使得在一些情况下蛋白质特异性结合至仅一个同源结合配偶体。在一些实施方案中,在特异性结合条件下发生结合。在一些实施方案中,同时结合使得一个同源结合配偶体的结合基本上不会抑制与第二同源结合配偶体的同时结合。在一些实施方案中,非竞争性结合意指第二同源结合配偶体与其在蛋白质上的结合位点的结合不会置换第一同源结合配偶体与其在蛋白质上的结合位点的结合。测定非竞争性结合的方法为本领域中熟知的,诸如Perez de La Lastra等人, *Immunology*, 1999年4月:96(4):663-670中所述的方法。在一些情况下,在非竞争性相互作用中,第一同源结合配偶体在不与第二同源结合配偶体的相互作用位点重叠的相互作用位点处特异性结合,使得第二同源结合配偶体的结合不会直接干扰第一同源结合配偶体的结合。因此,第二同源结合配偶体的结合对所述同源结合配偶体的结合的任何作用是通过除了直接干扰第一同源结合配偶体的结合之外的机制。例如,在酶-底物相互作用的背景下,非竞争性抑制剂结合至除了酶

活性位点之外的位点。非竞争性结合涵盖无竞争性结合相互作用,其中第二同源结合配偶体在不与第一同源结合配偶体的结合重叠的相互作用位点处特异性结合,但是仅在第一相互作用位点被第一同源结合配偶体占据时结合至第二相互作用位点。

[0131] 术语“药物组合物”是指适合在哺乳动物受试者(通常为人)中用于药物使用的组合物。药物组合物通常包含有效量的活性剂(例如,包含变体PD-L1的免疫调节多肽或表达变体PD-L1跨膜免疫调节蛋白的工程改造的细胞)和载剂、赋形剂或稀释剂。载剂、赋形剂或稀释剂通常分别是药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

[0132] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换地使用,并且是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的分子链。所述术语不涉及产物的特定长度。因此,“肽”和“寡肽”包括在多肽的定义之内。所述术语包括多肽的翻译后修饰,例如,糖基化、乙酰化、磷酸化等。所述术语还包括其中由于可以使用已知的蛋白质工程改造技术合成或重组表达而包括一个或多个氨基酸类似物或非典型或非天然氨基酸的分子。此外,可以将蛋白质衍生化。

[0133] 如本文所用,术语“原代T细胞测定”是指测量干扰素- $\gamma$  (“IFN- $\gamma$ ”)表达的体外测定。多种此类原代T细胞测定为本领域中已知的。在一个优选的实施方案中,所用的测定是抗CD3共固定测定。在此测定中,原代T细胞通过在额外重组蛋白存在或不存在下固定的抗CD3来刺激。在某些时间点,通常24-72小时收获培养物上清液。在另一个实施方案中,所用的测定是MLR。在此测定中,原代T细胞用异体APC刺激。在某些时间点,通常24-72小时收获培养物上清液。培养物上清液中的人IFN- $\gamma$ 水平通过标准ELISA技术测量。商业试剂盒购自供应商并且根据制造商的建议进行所述测定。

[0134] 如对于核酸(诸如本发明的编码免疫调节蛋白)所应用的术语“纯化的”通常表示基本上不含其他组分的核酸或多肽,如通过本领域熟知的分析技术确定(例如,纯化的多肽或多核苷酸在电泳凝胶、色谱洗脱物和/或经历密度梯度离心的介质中形成离散的带)。例如,在电泳凝胶中产生基本上一条带的核酸或多肽是“纯化的”。本发明的纯化的核酸或蛋白质是至少约50%纯的,通常至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、99%或更大纯的(例如,按重量计百分比或摩尔基础)。

[0135] 术语“重组”指示通过人工干预对材料(例如,核酸或多肽)进行人工(即,非天然地)改变。改变可以在材料处于其天然环境或状态时或从其中移除时对材料执行。例如,“重组核酸”是在例如克隆、亲和力修饰、DNA改组或其他熟知的分子生物学程序期间通过对核酸进行重组所制备的核酸。“重组DNA分子”由借助于此类分子生物学技术接合在一起的DNA的区段构成。如本文所用,术语“重组蛋白”或“重组多肽”是指使用重组DNA分子表达的蛋白质分子。“重组宿主细胞”是含有和/或表达重组核酸或者另外通过遗传工程改造,诸如通过将编码重组蛋白(诸如本文所提供的跨膜免疫调节蛋白)的核酸分子引入到细胞中来改变的细胞。真核生物中的转录控制信号包括“启动子”和“增强子”元件。启动子和增强子由与参与转录的细胞蛋白质特异性相互作用的短DNA序列阵列组成。启动子和增强子元件从多种真核来源分离而来,所述真核来源包括酵母、昆虫和哺乳动物细胞以及病毒的基因(自体控制元件,即,启动子还在原核生物中发现)。特定启动子和增强子的选择取决于将使用什么细胞类型来表达目标蛋白质。如本文所用,术语“处于可操作的组合中”、“处于可操作的顺序”以及“可操作地连接”是指核酸序列的连接处于这种方式或取向中,所述方式或取向使得产生能够指导给定基因的转录和/或所希望的蛋白质分子的合成的核酸分子。

[0136] 如本文所用,术语“重组表达载体”是指含有所需编码序列以及在特定宿主细胞中表达可操作地连接的编码序列所必需的适当核酸序列的DNA分子。在原核生物中表达所必需的核酸序列包括启动子、任选操纵子序列、核糖体结合位点以及可能的其他序列。已知真核细胞利用启动子、增强子以及终止信号和聚腺苷酸化信号。分泌信号肽序列还可以任选地由可操作地连接至重组蛋白(诸如重组融合蛋白)的编码序列的重组表达载体编码,以使得所表达的融合蛋白可以由重组宿主细胞分泌,以根据需要使融合蛋白更容易从细胞中分离。所述术语包括呈自我复制核酸结构的载体,以及并入其已引入的宿主细胞的基因组中的载体。载体是病毒载体,诸如慢病毒载体。

[0137] 术语“选择性”是指主题蛋白或多肽与对另一种底物(诸如主题蛋白的不同同源结合配偶体)的特异性结合相比偏好对一种底物(诸如一种同源结合配偶体)的特异性结合。选择性可以反映为主题蛋白和第一底物(诸如第一同源结合配偶体)的结合活性(例如,结合亲和力)(例如, $K_{d1}$ )与同一主题蛋白和第二同源结合配偶体的结合活性(例如,结合亲和力)(例如, $K_{d2}$ )的比率。

[0138] 如本文所用,术语“序列同一性”是指基因或蛋白质之间分别在核苷酸或氨基酸水平下的序列同一性。“序列同一性”是蛋白质之间的同一性在氨基酸水平的量度和核酸之间的同一性在核苷酸水平下的量度。蛋白质序列同一性可以在比对序列时通过比较每个序列中的给定位置的氨基酸序列来确定。类似地,核酸序列同一性可以在比对序列时通过比较每个序列中的给定位置的核苷酸序列来确定。用于比对用以比较的序列的方法为本领域熟知的,此类方法包括GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA。BLAST算法计算序列同一性百分比并且对两个序列之间的相似性执行统计分析。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(NCBI)网站公开获得。

[0139] 如本文中参考蛋白质所用的术语“可溶性”意指蛋白质不是膜蛋白。一般而言,可溶性蛋白仅含有IgSF家族成员受体的细胞外结构域或其含有一个或多个IgSF结构域或其特异性结合片段的部分,但是不含有跨膜结构域。在一些情况下,蛋白质的溶解度可以通过直接或经由接头间接连接或附接至Fc结构域来改进,在一些情况下,这也可以改进蛋白质的稳定性和/或半衰期。在一些方面,可溶性蛋白是Fc融合蛋白。

[0140] 如本文关于多肽或核酸所用的术语“种类”意指具有相同或基本上相同的序列的全部分子。在相同种类的多肽之间可以存在变化,其归因于翻译后修饰诸如糖基化、磷酸化、泛素化、亚硝基化、甲基化、乙酰化和脂质化的差异。多肽的与全长种类在氨基端或羧基端相差不超过1、2或3个氨基酸残基的稍微截短的序列被认为是单一种类。此类微观不均一性是制造的蛋白质的共同特征。

[0141] 如本文参考全长野生型哺乳动物PD-L1多肽或其IgV或IgC(例如,IgC2)结构域所用的术语“特异性结合片段”意指具有全长多肽或IgV和/或IgC结构域的子序列并且在体外和/或体内特异性结合至哺乳动物PD-1和/或哺乳动物CD80(诸如人或鼠PD-1或CD80)的多肽。在一些实施方案中,特异性结合片段包含PD-L1 IgV或PD-L1 IgC2子序列,其是全长野生型序列或其IgV或IgC(例如,IgC2)序列的序列长度的至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。可以改变特异性结合片段的序列以形成本发明的变体PD-L1。

[0142] 如本文所用,术语“特异性结合”意指蛋白质在特异性结合条件下结合至靶蛋白,

使其亲和力或亲合力大至同一蛋白对具有足够统计大小的随机肽或多肽的集合的平均亲和力或亲合力的至少5倍,但任选地至少10、20、30、40、50、100、250或500倍,或甚至至少1000倍的能力。特异性结合蛋白不需要唯一地结合至单一靶分子,但可以由于靶与非靶(例如,横向同源物或直向同源物)之间的结构构象相似性来特异性结合至非靶分子。技术人员将认识到,与在不同动物种类中具有相同功能的分子(即,直向同源物)或与靶分子具有基本上相似的表位的非靶分子(例如,横向同源物)的特异性结合是可能的,并且不会减弱相对于独特非靶的统计学有效集合(例如,随机多肽)确定的结合特异性。因此,本发明的多肽可以由于交叉反应性而特异性结合至超过一种不同靶分子种类。固相ELISA免疫测定、ForteBio Octet或Biacore测量可以用于确定两个蛋白质之间的特异性结合。通常,两个结合蛋白之间的相互作用的解离常数( $K_d$ )小于 $1 \times 10^{-5} M$ ,并且通常低至 $1 \times 10^{-12} M$ 。在本公开的某些实施方案中,两个结合蛋白之间的相互作用的解离常数小于或小于约 $1 \times 10^{-6} M$ 、 $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-10} M$ 或 $1 \times 10^{-11} M$ 或更小。

[0143] 参考表达多肽的哺乳动物细胞的术语“表面表达(surface expresses/surface expression)”意指多肽作为膜蛋白表达。在一些实施方案中,膜蛋白为跨膜蛋白。

[0144] 如本文所用,参考例如合成核酸分子或合成基因或合成肽的“合成”是指通过重组方法和/或通过化学合成方法产生的核酸分子或多肽分子。

[0145] 如本文所用,术语“靶向部分”是指共价或非共价附接至包含本发明的变体PD-L1的多肽或者物理地包封所述多肽的组合物。靶向部分对于所需相对结构诸如细胞表面受体(例如,PD-1)或者肿瘤抗原诸如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)诸如B7-H6具有特异性结合亲和力。通常,所需相对结构定位在特定组织或细胞类型上。靶向部分包括:抗体、抗原结合片段(Fab)、含有 $V_H$ 和 $V_L$ 的可变片段(Fv)、含有一起连接在一条链中的 $V_H$ 和 $V_L$ 的单链可变片段(scFv)、以及其他抗体V区片段,诸如Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、dsFv双体抗体、纳米抗体、可溶性受体、受体配体、亲和力成熟的受体或配体、以及小分子(<500道尔顿)组合物(例如,特异性结合受体组合物)。靶向部分也可以共价或非共价附接至脂质体的脂质膜,所述脂质膜包封本发明的多肽。

[0146] 如本文所用,术语“跨膜蛋白”意指基本上或完全跨越脂质双层,诸如生物膜(诸如哺乳动物细胞)或人工构建体(诸如脂质体)中存在的那些脂质双层的膜蛋白。跨膜蛋白包含跨膜结构域(“跨膜结构域”),所述跨膜蛋白通过所述跨膜结构域整合到脂质双层中并且通过所述跨膜结构域进行的整合在生理条件下是热力学稳定的。跨膜结构域通常经由任何数量的可商购获得的生物信息学软件应用程序基于其相对于与含水环境(例如,细胞溶胶、细胞外流)相互作用的蛋白质区域升高的疏水性由其氨基酸序列可预测。跨膜结构域通常是跨越膜的疏水性 $\alpha$ 螺旋。跨膜蛋白可以穿过脂质双层的两个层一次或多次。跨膜蛋白包括本文所述的提供的跨膜免疫调节蛋白。除了跨膜结构域之外,本发明的跨膜免疫调节蛋白还包含胞外域并且在一些实施方案中包含胞内域。

[0147] 如本文所用,术语疾病或病症的“治疗(treating/treatment/therapy)”意指通过单独或与如本文所述的另一种化合物组合施用治疗性组合物(例如,含有免疫调节蛋白或工程改造的细胞)来减慢、中止或逆转疾病或病症的进展,如由临床或诊断症状的减少、停止或消除所证明。“治疗”还意指急性或慢性疾病或病症的症状严重性降低,或者如例如在复发性或缓解性自身免疫疾病病程情况下复发率的降低,或者在自身免疫疾病的炎性方面

的情况下的炎症减少。如本文在癌症背景下所用,术语癌症的“治疗”或“抑制(inhibit/inhibiting/inhibition)”是指以下至少一者:肿瘤生长速率的统计学显著降低,肿瘤生长停止,或肿瘤的大小、质量、代谢活性或体积的减小,如通过规范标准测量,所述规范标准诸如但不限于实体肿瘤反应评价标准(RECIST)或无进展存活(PFS)或总体存活(OS)的统计学显著增加。如本发明背景下所用的“预防(Preventing/prophylaxis/prevention)”是指本发明的免疫调节多肽或工程改造的细胞单独或与另一种化合物组合施用,以预防疾病或病症或者疾病或病症的一些或所有症状的发生或发作或减小疾病或病症发作的可能性。

**[0148]** 如本文所用,术语“肿瘤特异性抗原”或“TSA”是指主要存在于哺乳动物受试者的肿瘤细胞上但是一般在哺乳动物受试者的正常细胞上不可见的相对结构。肿瘤特异性抗原不需要为肿瘤细胞所专有的,但是特定哺乳动物中具有肿瘤特异性抗原的细胞百分比是足够高的,或者肿瘤表面上的肿瘤特异性抗原的水平是足够高的,使得它可以被抗肿瘤治疗剂诸如本发明的免疫调节多肽所靶向,并且提供使哺乳动物免于肿瘤作用的预防或治疗。在一些实施方案中,来自患有肿瘤的哺乳动物的随机统计学细胞样品中,至少展示TSA的50%细胞为癌性的。在其他实施方案中,至少60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%展示TSA的细胞是癌性的。

**[0149]** 参考变体PD-L1使用的术语“变体”(也为“修饰的”或“突变体”)意指通过人类干预形成的PD-L1,诸如哺乳动物(例如,人或鼠)PD-L1。变体PD-L1是相对于未修饰或野生型PD-L1具有改变的氨基酸序列的多肽。变体PD-L1是与野生型PD-L1同种型序列相差一个或多个氨基酸取代、缺失、添加或其组合的多肽。出于本文的目的,变体PD-L1含有至少一个亲和力修饰的结构域,因此在IgSF结构域(例如,IgV结构域或ECD)中存在一个或多个氨基酸差异。变体PD-L1可以含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个氨基酸差异,诸如氨基酸取代。变体PD-L1多肽通常与对应野生型或未修饰PD-L1,诸如与序列SEQ ID NO:3、其含有细胞外结构域或其IgSF结构域的成熟序列(缺乏信号序列)或其部分具有至少50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽与包含SEQ ID NO:30或1728或SEQ ID NO:55或309中所列出的序列的对应野生型或未修饰PD-L1具有至少50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性。非天然存在的氨基酸以及天然存在的氨基酸包括在可允许的取代或添加的范围内。变体PD-L1不限于任何特定制备方法并且包括例如重新化学合成、重新重组DNA技术或它们的组合。本发明的变体PD-L1特异性结合至哺乳动物种类的PD-1或CD80中的至少一种或多种。在一些实施方案中,改变的氨基酸序列引起与野生型或未修饰PD-L1蛋白相比改变的(即,增加的或降低的)对PD-1和/或CD80的结合亲和力或亲合力。结合亲和力或亲合力的增加或降低可以使用熟知的结合测定诸如流式细胞术确定。Larsen等人,American Journal of Transplantation,第5卷:443-453(2005)。还参见Linsley等人,Immunity,第1卷(9):793-801(1994)。变体PD-L1对PD-1和/或CD80的结合亲和力或亲合力的增加是大于野生型或未修饰PD-L1的至少5%的值,并且在一些实施方案是大于野生型或未修饰PD-L1对照值的至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、100%的值。PD-L1对PD-1和/或CD80的结合亲和力或亲合力的降低是不大于野生型或未修饰对照值的95%的值,并且在一些实施方案是不

大于野生型或未修饰对照值的80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%的值或不可检测的结合亲和力或亲合力。变体PD-L1在一级氨基酸序列中通过氨基酸残基的取代、添加或缺失来改变。在变体PD-L1的背景下术语“变体”不应被解释为利用产生变体PD-L1所借助的任何特定起始组合物或方法的任何条件。变体PD-L1可以例如由野生型哺乳动物PD-L1序列信息开始生成,然后在计算机上建模以与PD-1和/或CD80结合,并且最后重组或化学地合成,以产生本发明的变体PD-L1。在仅一个替代性实例中,变体PD-L1可以通过定点诱变野生型PD-L1来产生。因此,变体PD-L1表示一种组合物并且不一定表示通过任何给定方法产生的产物。可以采用多种技术,包括重组方法、化学合成或它们的组合。

[0150] 如本文所用,术语“野生型”或“天然”或“原生”与生物材料诸如核酸分子、蛋白质(例如,PD-L1)、IgSF成员、宿主细胞等结合来使用,是指自然界中可见的并且并非通过人工干预进行修饰的那些材料。

## [0151] II. 变体PD-L1多肽

[0152] 本文提供对一种或多种PD-L1同源结合配偶体表现出改变的(增加或降低的)结合活性或亲和力的变体PD-L1多肽。在一些实施方案中,PD-L1同源结合配偶体是PD-1或CD80。在一些实施方案中,PD-L1同源结合配偶体是PD-1。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽或者野生型或未修饰PD-L1的含有IgD或其特异性结合片段的部分,变体PD-L1多肽在免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域(IgD)中含有一个或多个氨基酸修饰,诸如一个或多个取代(可替代地,“突变”或“置换”)、缺失或添加。因此,所提供的变体PD-L1多肽是或者包含变体IgD(下文中称为“vIgD”),其中一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)是在IgD中。

[0153] 在一些实施方案中,IgD包含IgV结构域或IgC(例如,IgC2)结构域、或者IgV结构域或IgC(例如,IgC2)结构域的特异性结合片段或者它们的组合。在一些实施方案中,IgD可以是仅IgV、IgV和IgC的组合(包括整个细胞外结构域(ECD))、或PD-L1的Ig结构域的任何组合。表2提供了对应于PD-L1的IgV或IgC区的示例性残基。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽含有IgV结构域或IgC结构域或其特异性结合片段,其中至少一个氨基酸修饰(例如,取代)是在IgV结构域或IgC结构域或其特异性结合片段中。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽含有IgV结构域或其特异性结合片段,其中至少一个氨基酸修饰(例如,取代)是在IgV结构域或其特异性结合片段中。在一些实施方案中,通过改变的结合活性或亲和力,改变的IgV结构域或IgC(例如,IgC2)结构域是亲和力修饰的IgSF结构域。

[0154] 在一些实施方案中,变体在一个多个IgSF结构域中相对于未修饰PD-L1序列的序列进行修饰。在一些实施方案中,未修饰PD-L1序列是野生型PD-L1。在一些实施方案中,未修饰或野生型PD-L1具有天然PD-L1或其直向同源物的序列。在一些实施方案中,未修饰PD-L1是或包含PD-L1的细胞外结构域(ECD)或其含有一个或多个IgSF结构域的部分(参见表2)。在一些实施方案中,未修饰或野生型PD-L1多肽的细胞外结构域包含IgV结构域和一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域。然而,变体PD-L1多肽不需要包含所述IgV结构域和一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域二者。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含IgV结构域或其特异性结合片段或者基本上由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含IgC(例如,IgC2)结构域或其特异性结合片段中的一者或二者或者基本上由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含IgC(例如,IgC2)结构域或其特异性结合片段中的仅一者或者基本上由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含:IgV结构域或其特异性结合片段;以

及第一和第二 IgC (例如, IgC2) 结构域或其特异性结合片段。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽是可溶性的并且缺乏跨膜结构域。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽还包含跨膜结构域, 并且在一些情况下还包含细胞质结构域。

[0155] 在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1序列是哺乳动物PD-L1序列。在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1序列可以是哺乳动物PD-L1, 其包括但不限于人、小鼠、食蟹猴或大鼠PD-L1。在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1序列是人序列。

[0156] 在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1序列具有(i) SEQ ID NO:3中所列出的氨基酸序列或者其缺乏信号序列的成熟形式, (ii) 与SEQ ID NO:3或其成熟形式具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列, 或者(iii) 是(i)或(ii)的含有IgV结构域或IgC (例如, IgC2) 结构域或其特异性结合片段的部分。

[0157] 在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1序列是或包含PD-L1的细胞外结构域或其部分。在一些实施方案中, 未修饰或野生型PD-L1多肽包含SEQ ID NO:30或1728中所列出的氨基酸序列或其直向同源物。在一些情况下, 未修饰或野生型PD-L1多肽可以包含(i) SEQ ID NO:30或1728中所列出的氨基酸序列, (ii) 与SEQ ID NO:30或1728具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列, 或(iii) (i)或(ii)的包含IgV结构域或IgC (例如, IgC2) 结构域的序列的特异性结合片段。

[0158] 在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1多肽包含IgV结构域或一个或多个IgC (例如, IgC2) 结构域或其特异性结合片段。在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1多肽的IgV结构域包含SEQ ID NO:55或309中所列出的氨基酸序列 (对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基24-130) 或其直向同源物。例如, 未修饰或野生型PD-L1多肽的IgV结构域可以含有(i) SEQ ID NO:55或309中所列出的氨基酸序列, (ii) 与SEQ ID NO:55或309具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列, 或(iii) (i)或(ii)的序列的特异性结合片段。在一些实施方案中, 野生型或未修饰IgV结构域能够结合一种或多种PD-L1同源结合蛋白, 诸如PD-1或CD80中的一种或多种。

[0159] 在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1多肽的第一IgC2结构域包含作为SEQ ID NO:3的残基133-225所列出的氨基酸序列或其直向同源物。例如, 未修饰或野生型PD-L1多肽的IgC2结构域可以含有(i) 作为SEQ ID NO:3的残基133-225所列出的氨基酸序列, (ii) 与SEQ ID NO:3的残基133-225具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列, 或(iii) (i)或(ii)的特异性结合片段。在一些实施方案中, 野生型或未修饰IgC结构域能够结合一种或多种PD-L1同源结合蛋白。

[0160] 在一些实施方案中, 野生型或未修饰PD-L1多肽含有PD-L1的特异性结合片段, 诸如IgV结构域或IgC (例如, IgC2) 结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中, 所述特异性结合片段可以结合PD-1和/或CD80。特异性结合片段的氨基酸长度可以是至少50个氨基酸, 诸如至少60、70、80、90、100或110个氨基酸。在一些实施方案中, IgV结构域的特异性结合片段含有作为SEQ ID NO:3的氨基酸24-130所列出的IgV结构域的长度的至少约85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的氨基酸序列。在一些实施方案中, IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段包含为作为SEQ ID NO:3的氨基酸133-225所列出的IgC结构域的长度的至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的氨基酸序列。

[0161] 在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含ECD结构域或其包含一个或多个亲和力修饰的IgSF结构域的部分。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽可以包含IgV结构域或一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域、或者IgV结构域的特异性结合片段、或者一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段, 其中IgSF结构域(IgV或IgC)中的一个或多个含有一个或多个氨基酸修饰(例如, 取代)。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽可以包含IgV结构域和一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域、或者IgV结构域的特异性结合片段和一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段, 其中IgV或IgC结构域中的至少一个含有一个或多个氨基酸修饰(例如, 一个或多个取代)。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含全长IgV结构域。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含一个或多个全长IgC(例如, IgC2)结构域。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含IgV结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含全长IgV结构域和一个或多个全长IgC(例如, IgC2)结构域。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含全长IgV结构域和一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含IgV结构域的特异性结合片段和一个或多个全长IgC(例如, IgC2)结构域。在一些实施方案中, 变体PD-L1多肽包含IgV结构域的特异性结合片段和一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段。

[0162] 在任何此类实施方案中, 变体PD-L1多肽的一个或多个氨基酸修饰(例如, 取代)可以位于PD-L1多肽IgSF结构域的任一个或多个中。例如, 在一些实施方案中, 一个或多个氨基酸修饰(例如, 取代)位于变体PD-L1多肽的细胞外结构域中。在一些实施方案中, 一个或多个氨基酸修饰(例如, 取代)位于IgV结构域或者IgC结构域的特异性结合片段中。在一些实施方案中, 一个或多个氨基酸修饰(例如, 取代)位于IgC(例如, IgC2)结构域或者IgC(例如, IgC2)结构域的特异性结合片段中。

[0163] 通常, 在下文中单独公开了多肽的各种属性中的每一种(例如, 可溶性和膜结合多肽、PD-L1对PD-1和CD80的亲和力、每条多肽链的变化数目、连接的多肽链的数目、每个变体PD-L1的氨基酸改变的数目和性质等)。然而, 技术人员将清楚的是, 任何特定多肽可以包含这些独立属性的组合。应理解对用于描述IgSF结构域的结构域组成的氨基酸(包括作为SEQ ID NO所列出的特定序列)的提及是出于说明性目的并且不意图限制所提供的实施方案的范围。应理解, 多肽及其结构域的描述理论上基于同源性分析和与类似分子的比对来推导。因此, 精确基因座可以改变并且对于每种蛋白质不一定相同。因此, 特异性IgSF结构域(诸如特异性IgV结构域或IgC结构域)可以是若干个氨基酸(诸如一个、两个、三个或四个)更长或更短。

[0164] 另外, 本发明的如下文所讨论的各种实施方案频繁提供于如上文所公开的定义的术语的含义内。特定定义中所描述的实施方案因此应解释为当定义的术语用于讨论本文所述的各个方面和属性时以引用的方式并入。因此, 各个方面和实施方案的呈现顺序和各独立属性的单独公开不意图限制本公开的范围。

[0165] A.示例性修饰

[0166] 本文提供以下变体PD-L1多肽:相对于野生型或未修饰PD-L1多肽所含有的IgSF结构域含有至少一个亲和力修饰的IgSF结构域(例如,ECD、IgV或IgC)或其特异性结合片段,使得变体PD-L1多肽与野生型或未修饰PD-L1多肽相比表现出改变的(增加或降低的)对一种或多种配体PD-1或CD80的结合活性或亲和力。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽对PD-1和/或CD80的结合亲和力与野生型或未修饰PD-L1多肽对照序列不同,如通过例如固相ELISA免疫测定、流式细胞术、ForteBio Octet或Biacore测定来确定的。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽具有增加的对PD-1和/或CD80的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有降低的对PD-1和/或CD80的结合亲和力。PD-1和/或CD80可以是哺乳动物蛋白质,诸如人蛋白质或鼠蛋白质。

[0167] 对于每种同源结合配偶体的结合亲和力是独立的;即,在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有增加的对PD-1和/或CD80中的一种或两种的结合亲和力以及降低的对PD-1和CD80中的一种或两种的结合亲和力。

[0168] 在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有增加的对PD-1的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有增加的对CD80的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有降低的对PD-1的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有降低的对CD80的结合亲和力。

[0169] 在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有增加的对PD-1和CD80的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有增加的对PD-1的结合亲和力和降低的对CD80的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有降低的对PD-1和CD80的结合亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽,变体PD-L1多肽具有降低的对PD-1的结合亲和力和增加的对CD80的结合亲和力。

[0170] 在一些实施方案中,具有增加的或更大的对PD-1和/或CD80的结合亲和力的变体PD-L1多肽具有的对PD-1和/或CD80的结合亲和力相对于野生型或未修饰PD-L1多肽对照增加至少约5%,诸如至少约10%、15%、20%、25%、35%或50%。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽的结合亲和力增加超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。在此类实例中,野生型或未修饰PD-L1多肽具有与变体PD-L1多肽相同的序列,不同的是它不含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。

[0171] 在一些实施方案中,具有降低的对PD-1和/或CD80的结合亲和力的变体PD-L1多肽具有的对PD-1和/或CD80的结合亲和力相对于野生型或未修饰PD-L1多肽对照降低至少5%,诸如至少约10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施方案中,相对于野生型或未修饰PD-L1多肽的结合亲和力降低超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。在此类实例中,野生型或未修饰PD-L1多肽具有与变体PD-L1多肽相同的序列,不同的是它不含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。

[0172] 在一些实施方案中,任一前述实施方案与PD-1和/或CD80的平衡解离常数( $K_d$ )可以是小于 $1\times 10^{-5}M$ 、 $1\times 10^{-6}M$ 、 $1\times 10^{-7}M$ 、 $1\times 10^{-8}M$ 、 $1\times 10^{-9}M$ 、 $1\times 10^{-10}M$ 或 $1\times 10^{-11}M$ 或 $1\times 10^{-12}M$ 或更小。

[0173] 野生型或未修饰PD-L1序列不一定必须用作生成本文所述的变体PD-L1多肽的起始组合物。因此,使用术语“修饰”,诸如“取代”未暗示本发明的实施方案局限于制备变体PD-L1多肽的特定方法。变体PD-L1多肽可以例如通过重新肽合成来制备并且因此不一定需要在改变密码子以编码所述修饰(例如,取代)的意义上的修饰,诸如“取代”。此理论也延伸到术语氨基酸残基的“添加”和“缺失”,其同样未暗示特定制备方法。设计或产生变体PD-L1多肽的手段不限于任何特定方法。然而,在一些实施方案,编码野生型或未修饰PD-L1的核酸由野生型或未修饰PD-L1遗传物质诱变并且针对所需特异性结合亲和力和/或IFN- $\gamma$ 表达或其他功能活性的诱导进行筛选。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽利用在任何数目的可公开获得的数据库处可用的蛋白质或核酸序列来重新合成并且然后随后筛选。国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)提供了此类信息并且其网址经由互联网公开访问,与先前所讨论的UniProtKB数据库一样。

[0174] 除非另外说明,否则如贯穿本公开所指示,一个或多个氨基酸修饰由与SEQ ID NO:30或1728中所列出的未修饰ECD序列或在适当时SEQ ID NO:309中所列出的如下未修饰IgV序列(分别含有SEQ ID NO:30的残基1-114)的位置编号相对应的氨基酸位置编号所指示:

[0175] FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR  
LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPK  
AEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNER  
(SEQ ID NO:30)

[0176] FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR  
LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPK  
AEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNER  
(SEQ ID NO:1728)

[0177] F T V T V P K D L V V E Y G S N M T I E C K F P V E K Q L D L A A L I V Y W E M E D K N I I Q F V  
H G E E D L K V Q H S S Y R Q R A R L L K D Q L S L G N A A L Q I T D V K L Q D A G V Y R C M I S Y G G A D Y K R I T V K V N A (SEQ ID NO:  
309)

[0178] 本文所提供的修饰可以在SEQ ID NO:30、309或1728中所列出的未修饰PD-L1多肽中。在一些情况下,修饰还可以在SEQ ID NO:55中所列出的未修饰IgV中。在一些实施方案中,未修饰PD-L1多肽与SEQ ID NO:30、55、309或1728具有85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性。

[0179] PKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLL  
KDQSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKV (SEQ ID NO:55)

[0180] 诸如通过比对参考序列与SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:309来鉴定PD-L1多肽(包括其含有IgSF结构域(例如,ECD或IgV)的部分)中的修饰(例如,氨基酸取代)的对应位置,是在技术人员的水平内。在贯穿本公开的修饰的列表中,氨基酸位置在中间指示,其中对应的未修饰(例如,野生型)氨基酸列出在编号之前并且所鉴定的变体氨基酸取代列出在编号之后。如果修饰是位置的缺失,则指示“del”,并且如果修饰是位置处的插入,则指示“ins”。在一些情况下,插入以氨基酸位置在中间指示列出,其中对应的未修饰(例如,野生型)氨基酸列出在编号之前和之后并且所鉴定的变体氨基酸插入列出在未修饰(例如,野生型)氨基酸

之后。

[0181] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽在野生型或未修饰PD-L1序列中具有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)可以是在野生型或未修饰PD-L1序列的胞外域(细胞外结构域)中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)是在IgV结构域或其特异性结合片段中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)是在ECD结构域或其特异性结合片段中。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)是在IgC(例如,IgC2)结构域或其特异性结合片段中。在变体PD-L1多肽的一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)中的一些是在IgV结构域或其特异性结合片段中,并且一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)中的一些是在一个或多个IgC结构域(例如,IgC2)或其特异性结合片段中。

[0182] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽具有多至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸修饰(例如,取代)。修饰(例如,取代)可以是在IgV结构域或一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域中。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽在IgV结构域或其特异性结合片段中具有多至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸修饰(例如,取代)。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽在一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域或其特异性结合片段中具有多至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸修饰(例如,取代)。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽与野生型或未修饰PD-L1多肽或其特异性结合片段诸如氨基酸序列SEQ ID NO:30、1728、55或309具有至少约85%、86%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0183] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽具有在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中与以下位置相对应的一个或多个氨基酸修饰,例如取代:6、10、11、14、15、16、17、18、19、20、22、23、26、27、28、33、35、36、40、41、43、44、45、46、47、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、60、64、65、68、71、72、73、74、75、78、79、83、85、89、90、93、97、98、99、101、102、103、104、106、110、111、112、113、117、119、120、121、124、129、130、131、134、137、138、144、148、149、150、155、158、160、163、165、167、170、171、173、175、176、177、179、180、183、185、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、206、207、213或221,其参考SEQ ID NO:30或1728中所列出的位置。在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽相比,此类变体PD-L1多肽表现出改变的对PD-1和/或CD80中的一种或多种的结合亲和力。例如,在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽相比,变体PD-L1多肽表现出增加的对PD-1和/或CD80的结合亲和力。在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽相比,变体PD-L1多肽表现出降低的对PD-1或CD80的结合亲和力。

[0184] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽具有选自以下的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代:P6S、Y10F、V11A、V11E、Y14S、G15A、S16G、N17D、M18I、M18T、M18V、T19A、T19I、I20L、C22R、K23E、K23N、K23R、E26A、E27D、E27G、K28E、K28I、K28N、K28R、A33D、L35P、I36S、I36T、E40G、M41K、M41V、D43G、D43V、K44E、N45D、N45I、N45T、I46V、I47T、F49S、V50A、H51N、H51R、H51Y、G52R、G52V、E53G、E53V、E54G、D55G、D55N、D55S、D55V、L56Q、K57E、K57R、V58A、V58D、H60R、R64S、Q65L、R68L、K71E、D72G、Q73R、L74P、S75P、N78I、N78S、A79T、I83T、D85E、Q89R、D90G、V93E、M97I、M97K、M97L、I98L、I98T、I98V、S99G、G101D、G101G-ins (G101GG)、

G102D、A103V、D104G、K106E、K106R、V110M、K111E、K111T、V112A、N113Y、N117S、I119T、N120S、Q121L、L124S、V129A、V129D、T130A、S131F、E134G、C137R、Q138R、K144E、K144Q、I148V、W149R、T150A、Q155H、S158G、K160M、T163I、K163N、N165Y、K167R、K167T、E170G、K171R、F173I、F173L、K173Y、V175A、T176N、S177C、L179P、R180S、T183A、T183I、T185A、I188V、F189L、F189S、T192S、F193S、R194G、R194W、R195G、R195S、R195T、L196S、D197G、P198S、P198T、E199G、E200K、E200N、N201D、N201Y、H202Q、T203A、A204T、L206F、V207A、L213P或T221L或其保守性氨基酸取代。保守性氨基酸取代是属于与取代的氨基酸相同的类别的、除了野生型或未修饰氨基酸之外的任何氨基酸。氨基酸的类别是脂族的(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)、含羟基或硫的(丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)、环状的(脯氨酸)、芳族的(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)、碱性的(组氨酸、赖氨酸和精氨酸)以及酸性/酰胺的(天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺)。

[0185] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽具有选自以下的两个或更多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代:P6S、Y10F、V11A、V11E、Y14S、G15A、S16G、N17D、M18I、M18T、M18V、T19A、T19I、I20L、C22R、K23E、K23N、K23R、E26A、E27D、E27G、K28E、K28I、K28N、K28R、A33D、L35P、I36S、I36T、E40G、M41K、M41V、D43G、D43V、K44E、N45D、N45I、N45T、I46V、I47T、F49S、V50A、H51N、H51R、H51Y、G52R、G52V、E53G、E53V、E54G、D55G、D55N、D55S、D55V、L56Q、K57E、K57R、V58A、V58D、H60R、R64S、Q65L、R68L、K71E、D72G、Q73R、L74P、S75P、N78I、N78S、A79T、I83T、D85E、Q89R、D90G、V93E、M97I、M97K、M97L、I98L、I98T、I98V、S99G、G101D、G101G-ins (G101GG)、G102D、A103V、D104G、K106E、K106R、V110M、K111E、K111T、V112A、N113Y、N117S、I119T、N120S、Q121L、L124S、V129A、V129D、T130A、S131F、E134G、C137R、Q138R、K144E、K144Q、I148V、W149R、T150A、Q155H、S158G、K160M、T163I、K163N、N165Y、K167R、K167T、E170G、K171R、F173I、F173L、K173Y、V175A、S177C、L179P、R180S、T183A、T183I、T185A、I188V、F189L、F189S、T192S、F193S、R194G、R194W、R195G、R195S、R195T、L196S、D197G、P198S、P198T、E199G、E200K、E200N、N201D、N201Y、H202Q、T203A、A204T、L206F、V207A、L213P或T221L。

[0186] 在一些实施方案中,氨基酸修饰,例如氨基酸取代包括K28N/M41V/N45T/H51N/K57E、I20L/I36T/N45D/I47T、I20L/M41K/K44E、P6S/N45T/N78I/I83T、N78I、M41K/N78I、N45T/N78I、I20L/N45T、N45T、M41K、I20L/I36T/N45D、N17D/N45T/V50A/D72G、I20L/F49S、N45T/V50A、I20L/N45T/N78I、I20L/N45T/V50A、M41V/N45T、M41K/N45T、A33D/S75P/D85E、M18I/M41K/D43G/H51R/N78I、V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P、A33D/V50A、S16G/A33D/K71E/S75P、E27G/N45T/M97I、E27G/N45T/K57R、A33D/E53V、D43G/N45D/V58A、E40G/D43V/N45T/V50A、Y14S/K28E/N45T A33D/N78S、A33D/N78I、A33D/N45T、A33D/N45T/N78I、E27G/N45T/V50A、N45T/V50A/N78S、I20L/N45T/V110M、I20L/I36T/N45T/V50A、N45T/L74P/S75P、N45T/S75P、S75P/K106R、S75P、A33D/S75P、A33D/S75P/D104G、A33D/S75P、I20L/E27G/N45T/V50A、I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/N78I、E27G/N45T/V50A/N78I、N45T/V50A/N78I、V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G、I20L/E27G/D43G/N45T/V50A、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R、I20L/I36T/N45D、I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I、A33D/D43G/N45D/V58A/S75P、K23R/D43G/N45D、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D、D43G/N45D/L56Q/

V58A/G101GG、I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I、T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K、I20L/M41K/D43G/N45D、K23R/N45T/N78I、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-ins (G101GG)、K57R/S99G、K57R/S99G/F189L、M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q、I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/H202Q/L206F、C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/H202Q/T221L、M18V/I98L/L124S/P198T/L206F、S99G/N117S/I148V/K171R/R180S、I36T/M97L/A103V/Q155H、K28I/S99G、R195S、A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/L206F、K57R/S99G/L124S/K144Q、K57R/S99G/R195G、D55V/M97L/S99G、E27G/I36T/D55N/M97L/K111E、E54G/M97L/S99G、G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q、G15A/I36T/V129D、G15A/I36T/V129D/R195G、G15A/V129D、I36S/M97L、I36T/D55N/M97L/K111E/A204T、I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L、I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S、I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P198T、I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T185A/R195G、I36T/I83T/M97L/K144E/P198T、I36T/M97L/K111E、I36T/M97L/K144E/P198T、I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y、I36T/M97L/V129D、L35P/I36S/M97L/K111E、M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A、M18T/I36T/D55N/M97L/K111E、M18V/M97L/T176N/R195G、M97L/S99G、N17D/M97L/S99G、S99G/T185A/R195G/P198T、V129D/H202Q、V129D/P198T、V129D/T150A、V93E/V129D、Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A、N45D、K160M/R195G、N45D/K144E、N45D/P198S、N45D/P198T、N45D/R195G、N45D/R195S、N45D/S131F、N45D/V58D、V129D/R195S、I98T/F173Y/L196S、N45D/E134G/L213P、N45D/F173I/S177C、N45D/I148V/R195G、N45D/K111T/R195G、N45D/N113Y/R195S、N45D/N165Y/E170G、N45D/Q89R/I98V、N45D/S131F/P198S、N45D/S75P/P198S、N45D/V50A/R195T、E27D/N45D/T183A/I188V、F173Y/T183I/L196S/T203A、K23N/N45D/S75P/N120S、N45D/G102D/R194W/R195G、N45D/G52V/Q121L/P198S、N45D/I148V/R195G/N201D、N45D/K111T/T183A/I188V、N45D/Q89R/F189S/P198S、N45D/S99G/C137R/V207A、N45D/T163I/K167R/R195G、N45D/T183A/T192S/R194G、N45D/V50A/I119T/K144E、T19A/N45D/K144E/R195G、V11E/N45D/T130A/P198T、V26A/N45D/T163I/T185A、K23N/N45D/L124S/K167T/R195G、K23N/N45D/Q73R/T163I、K28E/N45D/W149R/S158G/P198T、K28R/N45D/K57E/I98V/R195S、K28R/N45D/V129D/T163N/R195T、M41K/D43G/N45D/R64S/R195G、M41K/D43G/N45D/R64S/S99G、N45D/R68L/F173L/D197G/P198S、N45D/V50A/I148V/R195G/N201D、M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D或N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G。

**[0187]** 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID NO:30中所列出的位置的编号的位置20相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代I20L或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置27、33、36、43、45、50、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/E27G、I20L/A33D、I20L/I36T、I20L/D43G、I20L/N45D、I20L/N45T、I20L/V50A、I20L/V58A、I20L/S75P、I20L/N78I、I20L/M97L、I20L/S99G、I20L/R195G、I20L/P198S或I20L/R198T。

**[0188]** 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在

与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置27相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代E27G或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、33、36、43、45、50、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/E27G、E27G/A33D、E27G/I36T、E27G/D43G、E27G/N45D、E27G/N45T、E27G/V50A、E27G/V58A、E27G/S75P、E27G/N78I、E27G/M97L、E27G/S99G、E27G/R195G、E27G/P198S或E27G/R198T。

[0189] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置33相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代A33D或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、36、43、45、50、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/A33D、E27G/A33D、A33D/I36T、A33D/D43G、A33D/N45D、A33D/N45T、A33D/V50A、A33D/V58A、A33D/S75P、A33D/N78I、A33D/M97L、A33D/S99G、A33D/R195G、A33D/P198S或A33D/R198T。

[0190] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置36相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代I36T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、43、45、50、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/I36T、E27G/I36T、A33D/I36T、I36T/D43G、I36T/N45D、I36T/N45T、A33D/V50A、I36T/V58A、I36T/S75P、I36T/N78I、I36T/M97L、I36T/S99G、I36T/R195G、I36T/P198S或I36T/R198T。

[0191] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置43相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代D43G或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、45、50、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/D43G、E27G/D43G、A33D/D43G、I36T/D43G、D43G/N45D、D43G/N45T、D43G/V50A、D43G/V58A、D43G/S75P、D43G/N78I、D43G/M97L、D43G/S99G、D43G/R195G、D43G/P198S或D43G/R198T。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰D43G/N45D/V58A。

[0192] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置45相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代N45D或N45T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、50、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/N45D、E27G/N45D、A33D/N45D、I36T/N45D、D43G/N45D、N45D/V50A、N45D/V58A、N45D/S75P、N45D/S75P、N45D/N78I、N45D/M97L、N45D/S99G、N45D/R195G、N45D/P198S或N45D/R198T。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/N45T、E27G/N45T、A33D/N45T、I36T/N45T、D43G/N45T、N45T/V50A、N45T/V58A、N45T/S75P、N45T/N78I、N45T/M97L、N45T/S99G、N45T/R195G、N45T/P198S或N45T/R198T。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰D43G/N45D/V58A。

[0193] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置50相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代V50A或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、58、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/V50A、E27G/V50A、A33D/V50A、I36T/V50A、D43G/V50A、N45D/V50A、V50A/V58A、V50A/S75P、V50A/N78I、V50A/M97L、V50A/S99G、V50A/R195G、V50A/P198S或V50A/R198T。

[0194] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置58相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代V58A或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、75、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、S75P、N78I、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/V58A、E27G/V58A、A33D/V58A、I36T/V58A、D43G/V58A、N45D/V58A、V50A/V58A、V58A/S75P、V58A/N78I、V58A/M97L、V58A/S99G、V58A/R195G、V58A/P198S或V58A/R198T。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰D43G/N45D/V58A。

[0195] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID N0:30中所列出的位置的编号的位置75相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代S75P或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、58、78、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、N78I、M97L、

S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/S75P、E27G/S75P、A33D/S75P、I36T/S75P、D43G/S75P、N45D/S75P、V50A/S75P、V58A/S75P、S75P/N78I、S75P/M97L、S75P/S99G、S75P/R195G、S75P/P198S或S75P/R198T。

[0196] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID NO:30中所列出的位置的编号的位置78相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代N78I或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、58、75、97、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、M97L、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/N78I、E27G/N78I、A33D/N78I、I36T/N78I、D43G/N78I、N45D/N78I、V50A/N78I、V58A/N78I、S75P/N78I、N78I/M97L、N78I/S99G、N78I/R195G、N78I/P198S或N78I/R198T。

[0197] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID NO:30中所列出的位置的编号的位置97相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代M97L或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、58、75、78、99、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、S99G、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/M97L、E27G/M97L、A33D/M97L、I36T/M97L、D43G/M97L、N45D/M97L、V50A/M97L、V58A/M97L、S75P/M97L、N78I/M97L、M97L/S99G、M97L/R195G、M97L/P198S或M97L/R198T。

[0198] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID NO:30中所列出的位置的编号的位置99相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代S99G或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、58、75、78、97、195或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、R195G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/S99G、E27G/S99G、A33D/S99G、I36T/S99G、D43G/S99G、N45D/S99G、V50A/S99G、V58A/S99G、S75P/S99G、N78I/S99G、M97L/S99G、S99G/R195G、S99G/P198S或S99G/R198T。

[0199] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID NO:30中所列出的位置的编号的位置195相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代R195G或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、58、75、78、97、99或198处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸

修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G、P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/R195G、E27G/R195G、A33D/R195G、I36T/R195G、D43G/R195G、N45D/R195G、V50A/R195G、V58A/R195G、S75P/R195G、N78I/R195G、M97L/R195G、S99G/R195G、R195G/P198S或R195G/R198T。

[0200] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中在与参考SEQ ID NO:30中所列出的位置的编号的位置198相对应的位置处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,氨基酸修饰是氨基酸取代P198S或P198T或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽还含有在一个或多个位置20、27、33、36、43、45、50、58、75、78、97、99或195处的一个或多个氨基酸修饰,例如氨基酸取代。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸修饰是一个或多个氨基酸取代I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I、M97L、S99G或R195G或其保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/P198S、E27G/P198S、A33D/P198S、I36T/P198S、D43G/P198S、N45D/P198S、V50A/P198S、V58A/P198S、S75P/P198S、N78I/P198S、M97L/P198S、S99G/P198S或R195G/P198S。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/P198T、E27G/P198T、A33D/P198T、I36T/P198T、D43G/P198T、N45D/P198T、V50A/P198T、V58A/P198T、S75P/P198T、N78I/P198T、M97L/P198T、S99G/P198T或R195G/P198T。

[0201] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含表1中所列出的任何取代(突变)。表1还通过参考SEQ ID NO提供野生型PD-L1或示例性变体PD-L1多肽的细胞外结构域(ECD)或IgV结构域的示例性序列。正如指示,对于给定结构域的精确基因座或残基可以诸如根据用于鉴定或分类所述结构域的方法来改变。另外,在一些情况下,给定结构域(例如,ECD或IgV)的相邻N端和/或C端氨基酸可以包含在变体IgSF多肽的序列中,诸如以确保在表达时结构域的适当折叠。因此,应理解,表1中的SEQ ID NO的举例说明不应解释为限制性的。例如,变体PD-L1多肽的特定结构域(诸如ECD或IgV结构域)可以比相应SEQ ID NO中所列出的氨基酸序列长或短若干个氨基酸,诸如长或短1-10个,例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0202] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含表1中所列出的任一个细胞外结构域(ECD)序列(即,SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中的任一个)或由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含与表1中所列出的任一个细胞外结构域(ECD)序列(即,SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中的任一个)具有至少90%同一性、至少91%同一性、至少92%同一性、至少93%同一性、至少94%同一性、至少95%同一性,诸如至少96%同一性、97%同一性、98%同一性或99%同一性,并且含有不存在于野生型或未修饰PD-L1中的一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个取代)的多肽序列或由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含表1中所列出的任一个细胞外结构域(ECD)序列的特异性结合片段(即,SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中的任一个)或由其组成,并且含有不存在于野生型或未修饰PD-L1中的一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个取代)。

[0203] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含表1中所列出的任何IgV序列(即,SEQ ID NO:121-185、244-308、1726-1727、1908-1937中的任一个)或由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含与表1中所列出的任何IgV序列(即,SEQ ID NO:121-185、244-308、

1726-1727、1908-1937中的任一个)具有至少90%同一性、至少91%同一性、至少92%同一性、至少93%同一性、至少94%同一性、至少95%同一性,诸如至少96%同一性、97%同一性、98%同一性或99%同一性,并且含有不存在于野生型或未修饰PD-L1中的一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个取代)的多肽序列或由其组成。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽包含表1中所列出的任何IgV序列的特异性结合片段(即,SEQ ID NO:121-185、244-308、1726-1727、1908-1937中的任一个)或由其组成,并且含有不存在于野生型或未修饰PD-L1中的一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个取代)。

表 1:示例性变体 PD-L1 多肽			
[0204]	突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO

表 1:示例性变体 PD-L1 多肽			
突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO	
野生型	30, 1728	55, 309	
K28N/M41V/N45T/H51N/K57E	56, 1943	121, 244	
I20L/I36T/N45D/I47T	57, 1944	122, 245	
I20L/M41K/K44E	58, 1945	123, 246	
P6S/N45T/N78I/I83T	59, 1946	124, 247	
N78I	60, 1947	125, 248	
M41K/N78I	61, 1948	126, 249	
N45T/N78I	62, 1949	127, 250	
I20L/N45T	63, 1950	128, 251	
N45T	64, 1951	129, 252	
M41K	65, 1952	130, 253	
I20L/I36T/N45D	66, 1953	131, 254	
N17D/N45T/V50A/D72G	67, 1954	132, 255	
I20L/F49S	68, 1955	133, 256	
N45T/V50A	69, 1956	134, 257	
I20L/N45T/N78I	70, 1957	135, 258	
I20L/N45T/V50A	71, 1958	136, 259	
M41V/N45T	72, 1959	137, 260	
M41K/N45T	73, 1960	138, 261	
A33D/S75P/D85E	74, 1961	139, 262	
M18I/M41K/D43G/H51R/N78I	75, 1962	140, 263	
V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P	76, 1963	141, 264	
A33D/V50A	77, 1964	142, 265	
S16G/A33D/K71E/S75P	78, 1965	143, 266	
E27G/N45T/M97I	79, 1966	144, 267	
E27G/N45T/K57R	80, 1967	145, 268	
A33D/E53V	81, 1968	146, 269	
D43G/N45D/V58A	82, 1969	147, 270	
E40G/D43V/N45T/V50A	83, 1970	148, 271	
Y14S/K28E/N45T	84, 1971	149, 272	
A33D/N78S	85, 1972	150, 272	
A33D/N78I	86, 1973	151, 274	
A33D/N45T	87, 1974	152, 275	
A33D/N45T/N78I	88, 1975	153, 276	
E27G/N45T/V50A	89, 1976	154, 277	
N45T/V50A/N78S	90, 1977	155, 278	
I20L/N45T/V110M	91, 1978	156, 279	
I20L/I36T/N45T/V50A	92, 1979	157, 280	
N45T/L74P/S75P	93, 1980	158, 281	
N45T/S75P	94, 1981	159, 282	
S75P/K106R	95, 1982	160, 283	
S75P	96, 1983	161, 284	
A33D/S75P	97, 1984	162, 285	
A33D/S75P/D104G	98, 1985	163, 286	
A33D/S75P	99, 1986	164, 287	

[0205]

表 1:示例性变体 PD-L1 多肽

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
I20L/E27G/N45T/V50A	100, 1987	165, 288
I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I	101, 1988	166, 289
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I	102, 1989	167, 290
I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I	103, 1990	168, 291
I20L/D43G/N45D/N78I	104, 1991	169, 292
E27G/N45T/V50A/N78I	105, 1992	170, 293
N45T/V50A/N78I	106, 1993	171, 294
V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G	107, 1994	172, 295
I20L/E27G/D43G/N45T/V50A	108, 1995	173, 296
I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R	109, 1996	174, 297
I20L/I36T/N45D	110, 1997	175, 298
I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I	111, 1998	176, 299
A33D/D43G/N45D/V58A/S75P	112, 1999	177, 300
K23R/D43G/N45D	113, 2000	178, 301
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D	114, 2001	179, 302
D43G/N45D/L56Q/V58A/ G101G-ins (G101GG)	115, 2002	180, 303
I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I	116, 2003	181, 304
I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I	117, 2004	182, 305
T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K	118, 2005	183, 306
I20L/M41K/D43G/N45D	119, 2006	184, 307
K23R/N45T/N78I	120, 2007	185, 308
[0206] I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-ins (G101GG)	1725, 2008	1726, 1727
	1729, 1819	1908, 1923
K57R/S99G	1730, 1820	
M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q	1731, 1821	
I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/H202Q/L2 06F	1732, 1822	
C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/H202Q/T 221L	1733	
M18V/I98L/L124S/P198T/L206F	1734, 1823	
S99G/N117S/I148V/K171R/R180S	1735, 1824	
I36T/M97L/A103V/Q155H	1736, 1825	
K28I/S99G	1737, 1826	1909, 1924
R195S	1738, 1827	
A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/L206F	1739, 1828	
K57R/S99G/L124S/K144Q	1740, 1829	
K57R/S99G/R195G	1741, 1830	
D55V/M97L/S99G	1742, 1831	1910, 1925
E27G/I36T/D55N/M97L/K111E	1743, 1832	1911, 1926
E54G/M97L/S99G	1744, 1833	1912, 1927
G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q	1745, 1834	
G15A/I36T/V129D	1746, 1835	
G15A/I36T/V129D/R195G	1747, 1836	
G15A/V129D	1748, 1837	

表 1:示例性变体 PD-L1 多肽			
突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO	
I36S/M97L	1749, 1838	1913, 1928	
I36T/D55N/M97L/K111E/A204T	1750, 1839		
I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L	1751, 1840		
I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S	1752, 1841		
I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P198T	1753, 1842		
I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T185A/R195G	1754, 1843		
I36T/I83T/M97L/K144E/P198T	1755, 1844		
I36T/M97L/K111E	1756, 1845	1914, 1929	
I36T/M97L/K144E/P198T	1757, 1846		
I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y	1758, 1847		
I36T/M97L/V129D	1759, 1848		
L35P/I36S/M97L/K111E	1760, 1849	1915, 1930	
M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A	1761, 1850		
M18T/I36T/D55N/M97L/K111E	1762, 1851	1916, 1931	
M18V/M97L/T176N/R195G	1763, 1852		
M97L/S99G	1764, 1853	1917, 1932	
N17D/M97L/S99G	1765, 1854	1918, 1933	
S99G/T185A/R195G/P198T	1766, 1855		
V129D/H202Q	1767, 1856		
V129D/P198T	1768, 1857		
V129D/T150A	1769, 1858		
V93E/V129D	1770, 1859		
Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A	1771, 1860		
N45D	1772, 1861	1919, 1934	
K160M/R195G	1773, 1862		
N45D/K144E	1774, 1863		
N45D/P198S	1775, 1864		
N45D/P198T	1776, 1865		
N45D/R195G	1777, 1866		
N45D/R195S	1778, 1867		
N45D/S131F	1779, 1868		
N45D/V58D	1780, 1869	1920, 1935	
V129D/R195S	1781, 1870		
I98T/F173Y/L196S	1782, 1871		
N45D/E134G/L213P	1783, 1872		
N45D/F173I/S177C	1784, 1873		
N45D/I148V/R195G	1785, 1874		
N45D/K111T/R195G	1786, 1875		
N45D/N113Y/R195S	1787, 1876		
N45D/N165Y/E170G	1788, 1877		
N45D/Q89R/I98V	1789, 1878	1921, 1936	
N45D/S131F/P198S	1790, 1879		
N45D/S75P/P198S	1791, 1880		
N45D/V50A/R195T	1792, 1881		

[0207]

表 1:示例性变体 PD-L1 多肽		ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
E27D/N45D/T183A/I188V		1793, 1882	
F173Y/T183I/L196S/T203A		1794, 1883	
K23N/N45D/S75P/N120S		1795, 1884	
N45D/G102D/R194W/R195G		1796, 1885	
N45D/G52V/Q121L/P198S		1797, 1886	
N45D/I148V/R195G/N201D		1798, 1887	
N45D/K111T/T183A/I188V		1799, 1888	
N45D/Q89R/F189S/P198S		1800, 1889	
N45D/S99G/C137R/V207A		1801, 1890	
N45D/T163I/K167R/R195G		1802, 1891	
N45D/T183A/T192S/R194G		1803, 1892	
N45D/V50A/I119T/K144E		1804, 1893	
T19A/N45D/K144E/R195G		1805, 1894	
V11E/N45D/T130A/P198T		1806, 1895	
V26A/N45D/T163I/T185A		1807, 1896	
K23N/N45D/L124S/K167T/R195G		1808, 1897	
K23N/N45D/Q73R/T163I		1809, 1898	
K28E/N45D/W149R/S158G/P198T		1810, 1899	
K28R/N45D/K57E/I98V/R195S		1811, 1900	
K28R/N45D/V129D/T163N/R195T		1812, 1901	
M41K/D43G/N45D/R64S/R195G		1813, 1902	
M41K/D43G/N45D/R64S/S99G		1814, 1903	1922, 1937
N45D/R68L/F173L/D197G/P198S		1815, 1904	
N45D/V50A/I148V/R195G/N201D		1816, 1905	
M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D		1817, 1906	
N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G		1818, 1907	

[0208]

[0209] 在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽(诸如包含SEQ ID NO:30、1728、55或309中所列出的序列)相比,变体PD-L1多肽表现出增加的对PD-1的胞外域的亲和力。在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1(诸如包含SEQ ID NO:30、1728、55或309中所列出的序列)相比,变体PD-L1多肽表现出增加的对CD80的胞外域的亲和力。在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1(诸如包含SEQ ID NO:30、1728、55或309中所列出的序列)相比,PD-L1多肽表现出增加的对PD-1的胞外域和CD80的胞外域的亲和力。

[0210] 在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽(诸如包含SEQ ID NO:30、1728、55或309中所列出的序列)相比,变体PD-L1多肽表现出增加的结合PD-1或CD80的胞外域中的一者的结合亲和力并且表现出降低的结合PD-1或CD80的胞外域中的另一者的结合亲和力。在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽(诸如包含SEQ ID NO:30、1728、55或309中所列出的序列)相比,变体PD-L1多肽表现出增加的对PD-1的胞外域的亲和力和降低的对CD80的胞外域的亲和力。在一些实施方案中,与野生型或未修饰PD-L1多肽(诸如包含SEQ ID NO:30、1728、55或309中所列出的序列)相比,变体PD-L1多肽表现出增加的对CD80的胞外域的亲和力和降低的对PD-1的胞外域的亲和力。

[0211] 在一些实施方案中,与未修饰PD-L1多肽(例如,SEQ ID NO:30、55或309中所列出的)结合PD-1对比CD80的结合比率相比,变体PD-L1多肽表现出增加的对PD-1对比CD80的选

择性,诸如由大于1的PD-1结合与CD80结合的比率(PD-1:CD80结合比率)所指示。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽表现出的结合PD-1对比CD80的比率大于或大于约或1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70或更大。

[0212] III.变体多肽的形式

[0213] 包含含有vIgD的本文所提供的变体PD-L1的免疫调节多肽可以多种方式形式化,包括作为可溶性蛋白、膜结合蛋白或分泌的蛋白。在一些实施方案中,特定形式可以针对所需治疗性应用来选择。在一些情况下,包含变体PD-L1多肽的免疫调节多肽以一种形式提供,以拮抗或阻断其同源结合配偶体例如PD-1的活性。在一些实施方案中,对PD-1的拮抗作用可以适用于促进肿瘤学的免疫力。在一些情况下,包含变体PD-L1多肽的免疫调节多肽以一种形式提供,以激动或刺激其同源结合配偶体例如PD-1的活性。在一些实施方案中,对PD-1的激动作用可以适用于治疗炎症或自身免疫。技术人员可以容易确定特定形式的活性,诸如用于拮抗或激动一种或多种特异性同源结合配偶体。本文(包括在实施例中)提供用于评定此类活性的示例性方法。

[0214] 在一些方面,提供包含PD-L1的vIgD的免疫调节蛋白,其中此类蛋白质为可溶的,例如融合至Fc链。在一些方面,一个或多个额外IgSF结构域(诸如一个或多个额外vIgD)可以连接至如本文所提供的PD-L1的vIgD(在下文中称为“堆叠”或“堆叠的”免疫调节蛋白)。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白的模块化形式提供了用于工程改造或生成用以调节多个相对结构(多个同源结合配偶体)的活性的免疫调节蛋白的灵活性。在一些实施方案中,此类“堆叠”分子可以可溶性形式提供,或者在一些情况下可以膜结合或分泌的蛋白质的形式提供。在一些实施方案中,变体PD-L1免疫调节蛋白以含有PD-L1的vIgD的缀合物的形式提供,其直接或间接连接至靶向剂或部分(例如,抗体或其他结合分子),所述靶向剂或部分特异性结合至配体(例如,抗原),诸如当向受试者施用时,例如用于将vIgD靶向或定位至特定环境或细胞。在一些实施方案中,靶向剂(例如,抗体或其他结合分子)结合至肿瘤抗原,从而将含有vIgD的变体PD-L1定位至肿瘤微环境,例如以调节对肿瘤微环境具有特异性的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性。在一些实施方案中,靶向剂(例如,抗体或其他结合分子)结合至在炎性环境中的抗原递呈细胞或正常组织上表达的抗原,从而将含有vIgD的变体PD-L1定位至不想要的自身免疫炎症的区域,例如以调节靶向自身抗原的T细胞的活性。

[0215] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白在细胞中表达并且作为工程改造的细胞疗法(ECT)的一部分提供。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽在细胞诸如免疫细胞(例如,T细胞或抗原递呈细胞)中以膜结合形式表达,从而提供跨膜免疫调节蛋白(在下文中也称为“TIP”)。在一些实施方案中,根据TIP所识别的同源结合配偶体,表达TIP的工程改造的细胞可以通过提供对其他工程改造的细胞和/或内源性T细胞呈阳性或阴性的共刺激信号来激动同源结合配偶体。在一些方面,变体PD-L1多肽在细胞诸如免疫细胞(例如,T细胞或抗原递呈细胞)中以可分泌形式表达,从而诸如当向受试者施用细胞时,产生分泌或可溶形式的变体PD-L1多肽(在下文中也称为“SIP”)。在一些方面,SIP可以拮抗它所分泌的环境(例如,肿瘤微环境)中的同源结合配偶体。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽在感染剂(例如,病毒或细菌剂)中表达,所述感染剂在向受试者施用时能够感染体内细胞,诸如免疫细

胞(例如, T细胞或抗原递呈细胞), 以用于在细胞中递送或表达作为TIP或SIP的变体多肽。

[0216] 在一些实施方案中, 可溶性免疫调节多肽(诸如含有vIgD的变体PD-L1)可以包封在脂质体内, 所述脂质体本身可以缀合至所提供的缀合物(例如, 靶向部分)中的任一个或其任何组合。在一些实施方案中, 本发明的可溶性或膜结合免疫调节多肽是去糖基化的。在更具体的实施方案中, 变体PD-L1序列是去糖基化的。在甚至更具体的实施方案中, 变体PD-L1的IgV和/或一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域是去糖基化的。

[0217] 所提供的形式的非限制性实例描述于图1A至图1C中并进一步描述于下文中。

[0218] A. 可溶性蛋白

[0219] 在一些实施方案中, 含有变体PD-L1多肽的免疫调节蛋白是可溶性蛋白。技术人员将了解的是, 细胞表面蛋白通常具有细胞内、跨膜和细胞外结构域(ECD), 并且此类蛋白质的可溶性形式可以使用细胞外结构域或其免疫活性子序列来制备。因此, 在一些实施方案中, 含有变体PD-L1多肽的免疫调节蛋白缺乏跨膜结构域或跨膜结构域的一部分。在一些实施方案中, 含有变体PD-L1的免疫调节蛋白缺乏细胞内(细胞质)结构域或细胞内结构域的一部分。在一些实施方案中, 含有变体PD-L1多肽的免疫调节蛋白仅包含含有ECD结构域的vIgD部分或其含有IgV结构域和/或一个或多个IgC(例如, IgC2)结构域的部分或其含有一个或多个氨基酸修饰的特异性结合片段。

[0220] 在一些实施方案中, 免疫调节蛋白是或含有单体形式和/或表现出与其结合配偶体单价结合的变体PD-L1多肽。在一些方面, 所述变体PD-L1多肽(诸如可溶性和/或缺乏跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的变体PD-L1)直接或间接连接至另一个部分。在一些实施方案中, 另一个部分是蛋白质、肽、小分子或核酸。在一些实施方案中, 单价免疫调节蛋白是融合蛋白。在一些实施方案中, 所述部分是半衰期延长分子。此类半衰期延长分子的实例包括但不限于白蛋白、白蛋白结合多肽、Pro/Ala/Ser(PAS)、人绒毛膜促性腺激素的β亚基的C端肽(CTP)、聚乙二醇(PEG)、长的非结构化亲水氨基酸序列(XTEN)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合小分子或它们的组合。

[0221] 在一些实施方案中, 包含变体PD-L1的免疫调节多肽可以连接至包含由氨基酸Pro、Ala和Ser构成的构象无序多肽序列的部分(参见例如WO2008/155134, SEQ ID NO: 2025)。在一些情况下, 氨基酸重复序列是至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸残基, 其中每个重复序列包含Ala、Ser和Pro残基。因此, 本文提供为PAS化蛋白质的免疫调节蛋白, 其中变体PD-L1多肽直接或经由接头间接连接至Pro/Ala/Ser(PAS)。在一些实施方案中, 可以使用一个或多个额外接头结构。

[0222] 在一些实施方案中, 所述部分有利于检测或纯化变体PD-L1多肽。在一些情况下, 免疫调节多肽包含直接或间接连接至PD-L1多肽的N端和/或c端的标记或融合结构域, 例如亲和力或纯化标记。各种合适的多肽标记和/或融合结构域为已知的, 并且包括但不限于聚组氨酸(His)标记、FLAG标记(SEQ ID NO: 2010)、Myc标记和荧光蛋白标记(例如, EGFP, 在SEQ ID NO: 2027-2029中列出)。在一些情况下, 包含变体PD-L1的免疫调节多肽包含至少六个组氨酸残基(在SEQ ID NO: 2011中列出)。在一些情况下, 包含变体PD-L1的免疫调节多肽还包含各部分的不同组合。例如, 包含变体PD-L1的免疫调节多肽还包含一个或多个聚组氨酸标记和FLAG标记。

[0223] 在一些实施方案中,PD-L1多肽连接至修饰的免疫球蛋白重链恒定区(Fc),其以单价形式保持,诸如在SEQ ID NO:1187中列出。

[0224] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有直接或经由接头间接连接至多聚化结构域的变体PD-L1多肽。在一些方面,多聚化结构域增加了分子的半衰期。两个或更多个变体PD-L1多肽的相互作用可以通过其与本身能够相互作用以形成稳定结构的任何部分或其他多肽直接或间接连接来促成。例如,单独编码的变体PD-L1多肽链可以通过多聚化连接,从而通过多聚化结构域介导所述多肽的多聚化。通常,多聚化结构域提供了第一变体PD-L1多肽与第二变体PD-L1多肽之间的稳定蛋白质-蛋白质相互作用的形成。

[0225] 同源多聚体或异源多聚体多肽可以由单独变体PD-L1多肽的共同表达生成。第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽可以是相同的或不同的。在具体实施方案中,第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽在同源二聚体中是相同的并且各自连接至相同的多聚化结构域。在其他实施方案中,异源二聚体可以通过将不同的第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽连接在一起形成。在此类实施方案中,在一些方面,第一变体PD-L1多肽和第二变体PD-L1多肽连接至能够促进异源二聚体形成的不同多聚化结构域。

[0226] 在一些实施方案中,多聚化结构域包括能够形成稳定蛋白质-蛋白质相互作用的任何结构域。多聚化结构域可以经由以下相互作用:免疫球蛋白序列(例如Fc结构域;参见例如国际专利公布号WO 93/10151和WO 2005/063816US;美国公布号2006/0024298;美国专利号5,457,035);亮氨酸拉链(例如,来自核转化蛋白fos和jun或原癌基因c-myc或来自一般氮控制(General Control of Nitrogen,GCN4))(参见例如Busch和Sassone-Corsi(1990)Trends Genetics,6:36-40;Gentz等人,(1989)Science,243:1695-1699);疏水性区域;亲水性区域;或者在同源二聚体或异源二聚体的嵌合分子之间形成分子内二硫键的游离硫醇。此外,多聚化结构域可以包含含有与包含孔的氨基酸序列互补的突出部的氨基酸序列,诸如例如美国专利号5,731,168;国际专利公布号WO 98/50431和WO 2005/063816;Ridgway等人(1996)Protein Engineering,9:617-621所述。此多聚化区域可以被工程改造,使得空间相互作用不仅促进稳定的相互作用,而且进一步促进异源二聚体优于同源二聚体由嵌合单体的混合物形成。通常,突出部通过将第一多肽的界面的小氨基酸侧链用更大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换来构造。在第二多肽的界面上通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)来替换而任选地产生具有与突出部相同或相似的尺寸的补偿性腔穴。以下描述示例性多聚化结构域。

[0227] 变体PD-L1多肽可以在任何位置,但通常经由其N端或C端接合至多聚化结构域的N端或C端以形成嵌合多肽。所述连接可以是直接或经由接头间接进行。嵌合多肽可以是融合蛋白或者可以通过化学连接,诸如通过共价或非共价相互作用来形成。例如,当制备含有多聚化结构域的嵌合多肽时,编码全部或部分PD-L1多肽的核酸可以直接或间接或任选地经由接头结构域可操作地连接至编码多聚化结构域序列的核酸。在一些情况下,构建体编码嵌合蛋白,其中变体PD-L1多肽的C端接合至多聚化结构域的N端。在一些情况下,构建体可以编码嵌合蛋白,其中变体PD-L1多肽的N端接合至多聚化结构域的C端。

[0228] 多肽多聚体含有通过将两个相同或不同变体PD-L1多肽直接或间接连接至多聚化结构域来形成的多个(诸如两个)嵌合蛋白。在一些实例中,在多聚化结构域为多肽时,将编码变体PD-L1多肽和多聚化结构域的基因融合物插入到适当表达载体中。所得嵌合或融合

蛋白可以在用重组表达载体转化的宿主细胞中表达,并且使其组装成多聚体,其中多聚化结构域相互作用以形成多价多肽。多聚化结构域与变体PD-L1多肽的化学连接可以使用异源双功能接头实现。

[0229] 所得嵌合多肽(诸如融合蛋白)和由其形成的多聚体可以通过任何合适的方法,例如像通过在蛋白质A或蛋白质G柱上进行亲和力色谱来纯化。在将编码不同多肽的两个核酸分子转化到细胞中时,将发生同源二聚体和异源二聚体的形成。用于表达的条件可以被调整,以使得相对于同源二聚体形成偏好异源二聚体形成。

[0230] 在一些实施方案中,多聚化结构域是来自免疫球蛋白的Fc结构域或其部分。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含附接至免疫球蛋白Fc的变体PD-L1多肽(产生“免疫调节Fc融合物”,诸如“PD-L1-Fc变体融合物”,也称为PD-L1 v IgD-Fc融合物)。在一些实施方案中,所述变体PD-L1多肽的附接是在所述Fc的N端。在一些实施方案中,所述变体PD-L1多肽的附接是在所述Fc的C端。在一些实施方案中,两个或更多个PD-L1变体多肽(相同或不同)独立地附接在N端和C端处。

[0231] 在一些实施方案中,Fc是鼠或人Fc。在一些实施方案中,Fc是哺乳动物或人IgG1、1gG2、1gG3或1gG4 Fc区。在一些实施方案中,Fc来源于IgG1,诸如人IgG1。在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:187中所列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:187具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施方案中,Fc区含有改变(例如,减小)其一种或多种正常功能的一个或多修饰。一般而言,Fc区负责效应功能,诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC),以及为免疫球蛋白的主要功能的抗原结合能力。在一些情况下,Fc区的效应功能可以包括程序性细胞死亡和细胞吞噬作用。另外,存在于Fc区中的FcRn序列通过经由与体内FcRn受体缀合来增加体内半衰期,从而起到调节血清IgG水平的作用。在一些实施方案中,在Fc中此类功能可以减小或改变以与所提供的Fc融合蛋白一起使用。

[0233] 在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的PD-L1-Fc变体融合物的Fc区中,由此生成Fc区变体。在一些实施方案中,所述Fc区变体具有降低的效应功能。存在可以改变效应功能的Fc序列的变化或突变的许多实例。例如,WO 00/42072、W02006019447、W02012125850、W02015/107026、US2016/0017041和Shields等人J Biol. Chem. 9 (2) :6591-6604 (2001) 描述具有与FcR的提高或减弱的结合的示例性Fc变体。这些出版物的内容均以引用的方式明确并入本文。

[0234] 在一些实施方案中,所提供的变体PD-L1-Fc融合物包含表现出降低的效应功能的Fc区,所述Fc区使其成为如下应用的期望候选物,其中PD-L1-Fc变体融合物的体内半衰期是重要的,而某些效应功能(诸如CDC和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/缺失。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保PD-L1-Fc变体融合物缺乏Fc  $\gamma$  R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞,NK细胞仅表达Fc  $\gamma$  RIII,而单核细胞表达Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII及Fc  $\gamma$  RIII。FcR在造血细胞上的表达在Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) 第464页上的表2中进行概述。评定感兴趣的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例在美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom, I. 等人Proc. Nat'l Acad. Sci. USA

83:7059-7063 (1986) 和 Hellstrom, I 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 美国专利号 5,821,337 (参见 Bruggemann, M. 等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)) 中描述。可替代地, 可以采用非放射性测定方法, (参见例如用于流式细胞术的 ACTI<sup>TM</sup> 非放射性细胞毒性测定 (Cell Technology 公司 Mountain View, Calif.); 及 CytoTox96<sup>TM</sup> 非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, Wis.))。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。可替代地或另外, 感兴趣分子的 ADCC 活性可以例如在动物模型, 诸如 Clynes 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 中公开的动物模型中进行体内评定。还可以进行 C1q 结合测定以确认 PD-L1-Fc 变体融合物不能结合 C1q 并且因此缺乏 CDC 活性。参见, 例如 WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评定补体活化, 可以进行 CDC 测定 (参见例如 Gazzano-Santoro 等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. 等人, Blood 101:1045-1052 (2003); 和 Cragg, M.S. 和 M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域中已知的方法进行 FcRn 结合及体内清除率/半衰期确定 (参见例如 Petkova, S.B. 等人, Int. J. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006))。

[0235] 具有降低的效应功能的 PD-L1-Fc 变体融合物包括具有 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 (通过 EU 编号) 中的一个或多个的取代的那些 (美国专利号 6,737,056)。此类 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 (通过 EU 编号) 中的两个或更多个处具有取代的 Fc 突变体, 包括残基 265 和 297 置换成丙氨酸的所谓“DANA”Fc 突变体 (美国专利号 7,332,581)。

[0236] 在一些实施方案中, PD-L1-Fc 变体融合物的 Fc 区具有以下 Fc 区, 其中与天然 Fc 区相比在位置 234、235、236、237、238、239、270、297、298、325 和 329 (通过 EU 编号指示) 处的任何一个或多个氨基酸被不同氨基酸取代。Fc 区的此类改变不限于上文所述的改变, 并且包括例如 Current Opinion in Biotechnology (2009) 20(6), 685-691 中所述的改变, 诸如去糖基化链 (N297A 和 N297Q)、IgG1-N297G、IgG1-L234A/L235A、IgG1-L234A/L235E/G237A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A 和 IgG4-L236E; WO 2008/092117 中所述的改变, 诸如 G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R 和 N325LL328R; 在位置 233、234、235 和 237 (通过 EU 编号指示) 处的氨基酸插入; 以及 WO 2000/042072 中所述的位点处的改变。

[0237] 与 FcR 的结合改善或减弱的某些 Fc 变体已有描述。(参见例如美国专利号 6,737,056; WO 2004/056312、WO 2006/019447 以及 Shields 等人, J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001)。)

[0238] 在一些实施方案中, 提供一种包含变体 Fc 区的 PD-L1-Fc 变体融合物, 所述变体 Fc 区包含增加半衰期和/或改善与新生 Fc 受体 (FcRn) 的结合的一个或多个氨基酸取代。具有增加的半衰期和改善的与 FcRn 的结合的抗体描述于 US2005/0014934A1 (Hinton 等人) 或 WO2015107026 中。那些抗体包含其中具有改善 Fc 区与 FcRn 的结合的一个或多个取代的 Fc 区。此类 Fc 变体包括在一个或多个以下 Fc 区残基处具有取代的那些变体: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434

(通过EU编号),例如Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[0239] 在一些实施方案中,PD-L1-Fc变体融合物的Fc区包含一个或多个氨基酸取代E356D和M358L(通过EU编号)。在一些实施方案中,PD-L1-Fc变体融合物的Fc区包含一个或多个氨基酸取代C220S、C226S和/或C229S(通过EU编号)。在一些实施方案中,PD-L1变体融合物的Fc区包含一个或多个氨基酸取代R292C和V302C。还参见Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及关于Fc区变体的其他实例的WO 94/29351。

[0240] 在一些实施方案中,在Fc区中进行引起C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)减弱的改变,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人,J. Immunol. 164:4178-4184(2000)中所述。

[0241] 在一些实施方案中,提供一种包含变体Fc区的PD-L1-Fc变体融合物,所述变体Fc区包含一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体Fc区来源于IgG1,诸如人IgG1。在一些实施方案中,变体Fc区来源于SEQ ID NO:187中所列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc含有至少一个氨基酸取代,其为通过SEQ ID NO:187的编号的N82G(对应于通过EU编号的N297G)。在一些实施方案中,Fc还含有至少一个氨基酸取代,其为通过SEQ ID NO:187的编号的R77C或V87C(对应于通过EU编号的R292C或V302C)。在一些实施方案中,变体Fc区还包含通过SEQ ID NO:187的编号的C5S氨基酸修饰(对应于通过EU编号的C220S)。例如,在一些实施方案中,变体Fc区包含以下氨基酸修饰:通过EU编号的V297G和一个或多个以下氨基酸修饰C220S、R292C或V302C(对应于参考SEQ ID NO:187的N82G和一个或多个以下氨基酸修饰C5S、R77C或V87C),例如Fc区包含SEQ ID NO:1157中所列出的序列。在一些实施方案中,变体Fc区包含氨基酸修饰C220S、L234A、L235E或G237A中的一个或多个,例如Fc区包含SEQ ID NO:1158中所列出的序列。在一些实施方案中,变体Fc区包含氨基酸修饰C220S、L235P、L234V、L235A、G236del或S267K中的一个或多个,例如Fc区包含SEQ ID NO:1159中所列出的序列。在一些实施方案中,变体Fc包含氨基酸修饰C220S、L234A、L235E、G237A、E356D或M358L中的一个或多个,例如Fc区包含SEQ ID NO:1155中所列出的序列。

[0242] 在一些实施方案中,Fc区缺乏与SEQ ID NO:187中所列出的野生型或未修饰Fc的位置232相对应(对应于通过EU编号的K447del)的C端赖氨酸。在一些方面,此Fc区可以另外包含一个或多个额外修饰,例如氨基酸取代,诸如所述的任一者。这种Fc区的实例在SEQ ID NO:1938、1939、1940或1715中列出。

[0243] 在一些实施方案中,提供一种PD-L1-Fc变体融合物,其包含变体Fc区,其中变体Fc包含SEQ ID NO:1155、1157、1158、1159、1715、1938、1939或1940中任一者中所列出的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1155、1157、1158、1159、1715、1938、1939或1940中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列。

[0244] 在一些实施方案中,Fc来源于IgG2,诸如人IgG2。在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:188中所列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:188具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列。

[0245] 在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:1200中所列出的氨基酸序列或与SEQ ID

NO:1200具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,IgG4 Fc是其中人IgG4的CH3结构域被人IgG1的CH3结构域取代并且表现出抑制的聚集物形成的稳定化的Fc、其中人IgG4的CH3和CH2结构域分别被人IgG1的CH3和CH2结构域取代的抗体或者其中人IgG4的由Kabat等人提出的EU索引中指示的位置409处的精氨酸被赖氨酸取代并表现出抑制的聚集物形成的抗体(参见例如美国专利号8,911,726。在一些实施方案中,Fc是含有S228P突变的IgG4,其已显示预防在治疗性抗体与内源性IgG4之间通过Fab-臂交换进行的重组(参见例如Labrijin等人(2009)Nat.Biotechnol.,27(8):767-71。)在一些实施方案中,Fc包含SEQ ID NO:1201中所列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1201具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列。

[0246] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽直接连接至Fc序列。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽诸如经由接头间接连接至Fc序列。在一些实施方案中,一个或多个“肽接头”将变体PD-L1多肽与Fc结构域连接在一起。在一些实施方案中,肽接头的长度可以是单一氨基酸残基或更大。在一些实施方案中,肽接头具有至少一个氨基酸残基但长度不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头是三个丙氨酸(AAA)。在一些实施方案中,接头是柔性接头。在一些实施方案中,接头是(呈一个字母氨基酸密码的形式):GGGGS(“4GS”或“G<sub>4</sub>S”;SEQ ID NO:1942)或4GS接头的多聚体,诸如2、3、4或5个4GS接头的重复序列,诸如SEQ ID NO:240中列出(2xGGGGS)或SEQ ID NO:239中列出(3xGGGGS)。在一些实施方案中,接头(呈一个字母氨基酸密码的形式)是GSGGGGS(SEQ ID NO:1941)。在一些实施方案中,接头还可以包括单独的或除了另一个肽接头(诸如4GS接头或其多聚体)之外的一系列丙氨酸残基。在一些实施方案中,每个系列中的丙氨酸残基的数目为:2、3、4、5或6个丙氨酸。在一些实施方案中,接头是刚性接头。例如,接头是 $\alpha$ 螺旋接头。在一些实施方案中,接头是(呈一个字母氨基酸密码的形式):EAAAK或EAAAK接头的多聚体,诸如2、3、4或5个EAAAK接头的重复序列,诸如SEQ ID NO:2022中列出(1xEAAAK)、SEQ ID NO:2023中列出(3xEAAAK)或SEQ ID NO:2024中列出(5xEAAAK)。在一些实施方案中,接头可以还包含通过克隆和/或从限制性位点引入的氨基酸,例如接头可以包含如通过使用限制性位点BAMHI引入的氨基酸GS(呈一个字母氨基酸密码的形式)。例如,在一些实施方案中,接头(呈一个字母氨基酸密码的形式)是GSGGGGS(SEQ ID NO:1941)、GS(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:2031)或GS(G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>(SEQ ID NO:2032)。在一些实例中,接头是2xGGGGS后接三个丙氨酸(GGGGSGGGGSAAA;SEQ ID NO:241)。在一些情况下,包含变体PD-L1的免疫调节多肽包含肽接头的不同组合。

[0247] 在一些实施方案中,变体PD-L1-Fc融合蛋白为通过连接至Fc结构域的两个变体PD-L1 Fc多肽形成的二聚体。在一些实施方案中,二聚体是两个变体PD-L1 Fc多肽是相同的同源二聚体。在一些实施方案中,二聚体是两个变体PD-L1 Fc多肽是不同的异源二聚体。

[0248] 还提供编码变体PD-L1-Fc融合蛋白的核酸分子。在一些实施方案中,为了产生Fc融合蛋白,将编码变体PD-L1-Fc融合蛋白的核酸分子插入到适当表达载体中。所得变体PD-L1-Fc融合蛋白可以在用表达转化的宿主细胞中表达,其中Fc结构域之间的组装通过Fc部分之间形成的链间二硫键来发生,以产生二聚体(诸如二价)变体PD-L1-Fc融合蛋白。

[0249] 所得Fc融合蛋白可以容易在蛋白质A或蛋白质G柱上通过亲和力色谱法纯化。为了生成异源二聚体,用于纯化的额外步骤可以是必需的。例如,在编码不同变体PD-L1多肽的两个核酸转化到细胞中时,异源二聚体的形成必须以生物化学方式实现,因为携带Fc结构域的变体PD-L1分子也将表达为二硫键连接的同源二聚体。因此,同源二聚体可以在有利于破坏链间二硫键但不影响链内二硫键的条件下减少。在一些情况下,不同变体PD-L1 Fc单体以等摩尔量混合并氧化以形成同源二聚体和异源二聚体的混合物。此混合物的组分通过色谱技术分离。可替代地,这种类型的异源二聚体的形成可以通过使用下文所述球入孔方法遗传工程改造并表达含有变体PD-L1多肽的Fc融合分子来偏向。

[0250] B. 具有额外IgSF结构域的堆叠分子

[0251] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白可以含有本文所提供的变体PD-L1中的任一者,其直接或间接连接至一个或多个其他免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域(“堆叠的”免疫调节蛋白构建体并且也称为“II型”免疫调节蛋白)。在一些方面,这可以产生独特的多结构域免疫调节蛋白,其结合两个或更多个(诸如三个或更多个)同源结合配偶体,从而提供免疫突触的多靶向调节。

[0252] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含变体PD-L1结构域与另一个IgSF家族成员(例如,哺乳动物IgSF家族成员)的野生型IgSF家族成员中不存在的一个或多个其他亲和力修饰和/或非亲和力修饰的IgSF结构域序列的组合(“非野生型组合”)和/或布置(“非野生型布置”或“非野生型排列”)。在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有2、3、4、5或6个免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域,其中IgSF结构域中的至少一个根据所提供的描述是变体PD-L1 IgSF结构域(PD-L1的vIgD)。

[0253] 在一些实施方案中,额外IgSF结构域的序列可以是与野生型或未修饰IgSF结构域相比含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)的修饰的IgSF结构域。在一些实施方案中,IgSF结构域可以是非亲和力修饰的(例如,野生型)或已亲和力修饰的。在一些实施方案中,未修饰或野生型IgSF结构域可以是来自小鼠、大鼠、食蟹猴或人来源或它们的组合。在一些实施方案中,额外IgSF结构域可以是表2中所列出的IgSF家族成员的IgSF结构域。在一些实施方案中,额外IgSF结构域可以是与表2中所列出的IgSF家族成员所含有的IgSF结构域相比含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)的亲和力修饰的IgSF结构域。

[0254] 在一些实施方案中,额外IgSF结构域为选自以下的家族的IgSF家族成员所含有的亲和力或非亲和力修饰的IgSF结构域:信号调节蛋白(SIRP)家族、骨髓细胞上表达的触发受体样(TREML)家族、癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)家族、水杨酸结合Ig样凝集素(SIGLEC)家族、嗜乳脂蛋白家族、B7家族、CD28家族、含V型和免疫球蛋白结构域(VSIG)家族、V型跨膜结构域(VSTM)家族、主要组织相容性复合物(MHC)家族、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族、白细胞免疫球蛋白样受体(LIR)、结合素(Nec)家族、结合素样(NECL)家族、脊髓灰质炎病毒受体相关(PVR)家族、天然细胞毒性触发受体(NCR)家族、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白(TIM)家族或者杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)家族。在一些实施方案中,额外IgSF结构域独立地来源于选自由以下组成的组的IgSF蛋白质:CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、CD274(PD-L1、B7-H1)、PDCD1LG2(PD-L2、CD273)、ICOSLG(B7RP1、CD275、ICOSL、B7-H2)、CD276(B7-H3)、VTCN1(B7-H4)、CD28、CTLA4、PDCD1(PD-1)、ICOS、BTLA(CD272)、CD4、CD8A(CD8- $\alpha$ )、CD8B(CD8- $\beta$ )、LAG3、HAVCR2(TIM-3)、CEACAM1、TIGIT、PVR(CD155)、PVRL2(CD112)、

CD226、CD2、CD160、CD200、CD200R1 (CD200R)、NCR3 (NKp30) 和 VSIG8。

[0255] 表2的第一列提供了该特定IgSF成员的名称以及任选地一些可能的同义词的名称。第二列提供了UniProtKB数据库的蛋白质标识或在一些情况下提供了GenBank编号,所述数据库是经由互联网在uniprot.org处可访问的公开可用数据库。通用蛋白质资源 (UniProt) 是蛋白质序列和注释数据的综合资源。UniProt数据库包括UniProt知识库 (UniProtKB)。UniProt是欧洲生物信息研究所 (EMBL-EBI)、SIB瑞士生物信息学研究所和蛋白质信息库 (PIR) 之间的合作并且主要受到美国国家健康研究所 (NIH) 的资助支持。GenBank是NIH基因序列数据库,其为所有公开可用DNA序列的注释集合 (Nucleic Acids Research, 2013年1月;41 (D1):D36-42)。第三列提供了指示的IgSF结构域所位于的区域。所述区域被指定为一个范围,其中所述结构域包括限定所述范围的残基。第3列还指示特定 IgSF区的IgSF结构域类别。第4列提供了指示的额外结构域所位于的区域 (信号肽, S; 细胞外结构域, E; 跨膜结构域, T; 细胞质结构域, C)。应理解,结构域的描述可以根据用于鉴定或分类结构域的方法而改变,并且可以不同地从不同来源鉴定。对于表2中的结构域的残基的描述仅为了举例说明并且可以若干个氨基酸 (诸如一个、两个、三个或四个) 更长或更短。第5列指示一些列出的IgSF成员、其一些同源细胞表面结合配偶体。

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

[0256]

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号 /UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)		
					前体 (成熟残基)	成熟	EC D
CD80 (B7-1)	NP_005182.1 P33681	35-135、 35-138、 37-138 或 35-141	S: 1-34, E: 35-242,	CD28、 CTLA4、 PD-L1	SEQ ID NO: 1 (35-288)	SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 28

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号/UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)		
					前体(成熟残基)	成熟	EC D
		IgV, 145-230 或 154-232 IgC	T: 243-263 , C: 264-288				
CD86 (B7-2)	P42081.2	33-131 IgV、 150-225 IgC2	S: 1-23, E: 24-247, T: 248-268 , C: 269-329	CD28、 CTLA4	SEQ ID NO: 2 (24-329)	SEQ ID NO: 190	SEQ ID NO: 29
[0257]	CD274 (PD-L1、 B7-H1) Q9NZQ7 .1 NP_0548 62.1	24-130 或 19-127 IgV, 133-225 IgC2	S: 1-18, E: 19-238, T: 239-259 , C: 260-290	PD-1、B7-1	SEQ ID NO: 3 (19-290)	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 30
	PDCD1L G2 (PD-L2、 CD273) Q9BQ51. 2	21-118 IgV、 122-203 IgC2	S: 1-19, E: 20-220, T: 221-241 , C: 242-273	PD-1、 RGMb	SEQ ID NO: 4 (20-273)	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 31
	ICOSLG (B7RP1、 CD275、 ICOSL、 B7-H2) O75144.2	19-129 IgV、 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277 , C: 278-302	ICOS、 CD28、 CTLA4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 32
CD276	Q5ZPR3.	29-139	S:		SEQ ID NO:	SEQ ID	SEQ

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号 /UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)		
					前体(成熟残基)	成熟	EC D
(B7-H3)	1	IgV, 145-238 IgC2, 243-357 IgV2, 363-456、 367-453 IgC2	1-28, E: 29-466, T: 467-487 , C: 488-534		6 (29-534)	NO: 194	ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3. 1	35-146 IgV、 153-241 IgV	S: 1-24, E: 25-259, T: 260-280 , C: 281-282		SEQ ID NO: 7 (25-282)	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 34
CD28	P10747.1	28-137 IgV	S: 1-18, E: 19-152, T: 153-179 , C: 180-220	B7-1、 B7-2、 B7RP1	SEQ ID NO: 8 (19-220)	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 35
CTLA-4	P16410.3	39-140 IgV	S: 1-35, E: 36-161, T: 162-182 , C: 183-223	B7-1、 B7-2、 B7RP1	SEQ ID NO: 9 (36-223)	SEQ ID NO: 197	SEQ ID NO: 36
PDCD1 (PD-1)	Q15116.3	35-145 IgV	S: 1-20, E: 21-170, T:	PD-L1、 PD-L2	SEQ ID NO: 10 (21-288)	SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 37

[0258]

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号 /UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)		
					前体(成熟残基)	成熟	EC D
			171-191 , C: 192-288				
ICOS	Q9Y6W8 .1	30-132 IgV	S: 1-20, E: 21-140, T: 141-161 , C: 162-199	B7RP1	SEQ ID NO: 11 (21-199)	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 38
BTLA (CD272)	Q7Z6A9. 3	31-132 IgV	S: 1-30, E: 31-157, T: 158-178 , C: 179-289	HVEM	SEQ ID NO: 12 (31-289)	SEQ ID NO: 200	SEQ ID NO: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV、 126-203 IgC2、 204-317 IgC2、 317-389、 318-374 IgC2	S: 1-25, E: 26-396, T: 397-418 , C: 419-458	MHC II 类	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8- $\alpha$ )	P01732.1	22-135 IgV	S: 1-21, E: 22-182, T: 183-203 , C: 204-235	MHC I 类	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 202	SEQ ID NO: 41
CD8B	P10966.1	22-132	S:	MHC I 类	SEQ ID NO:	SEQ ID	SEQ

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号/UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)		
					前体(成熟残基)	成熟	EC D
(CD8-β)		IgV	1-21, E: 22-170, T: 171-191 , C: 192-210		15 (22-210)	NO: 203	ID NO: 42
LAG3	P18627.5	37-167 IgV、 168-252 IgC2、 265-343 IgC2、 349-419 IgC2	S: 1-28, E: 29-450, T: 451-471 , C: 472-525	MHC II 类	SEQ ID NO: 16 (29-525)	SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 43
[0260] HAVCR 2 (TIM-3)	Q8TDQ0 .3	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-202, T: 203-223 , C: 224-301	CEACAM-1、 磷酰基丝氨酸、半 乳凝素-9、 HMGB1	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 44
CEACAM1	P13688.2	35-142 IgV、 145-232 IgC2、 237-317 IgC2、 323-413 IgC2	S: 1-34, E: 35-428, T: 429-452 , C: 453-526	TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	SEQ ID NO: 206	SEQ ID NO: 45
TIGIT	Q495A1. 1	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-141, T: 142-162	CD155、 CD112	SEQ ID NO: 19 (22-244)	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 46

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号/UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)		
					前体(成熟残基)	成熟	EC D
			, C: 163-244				
PVR (CD155)	P15151.2	24-139 IgV、 145-237 IgC2、 244-328 IgC2	S: 1-20, E: 21-343, T: 344-367 , C: 368-417	TIGIT、 CD226、 CD96、脊髓 灰质炎病 毒	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 208	SEQ ID NO: 47
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV、 162-256 IgC2、 261-345 IgC2	S: 1-31, E: 32-360, T: 361-381 , C: 382-538	TIGIT、 CD226、 CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 48
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2、 135-239 IgC2	S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275 , C: 276-336	CD155、 CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 210	SEQ ID NO: 49
CD2	P06729.2	25-128 IgV、 129-209 IgC2	S: 1-24, E: 25-209, T: 210-235 , C: 236-351	CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 50
CD160	O95971.1	27-122 IgV	不适用	HVEM、 MHC 蛋白 质家族	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 212	SEQ ID NO:

[0261]

表 2. 根据本公开的 IgSF 成员。

IgSF 成员(同义词)	NCBI 蛋白质登录号/UniProt KB 蛋白质标识	IgSF 区和结构域类别	其他结构域	同源细胞表面结合配偶体	IgSF 成员氨基酸序列(SEQ ID NO)			
					前体(成熟残基)	成熟	EC D	
							51	
CD200	P41217.4	31-141 IgV、 142-232 IgC2	S: 1-30, E: 31-232, T: 233-259 , C: 260-278	CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 213	SEQ ID NO: 52	
[0262]	CD200R 1 (CD200 R)	Q8TD46. 2	53-139 IgV、 140-228 IgC2	S: 1-28, E: 29-243, T: 244-264 , C: 265-325	CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 53
	NCR3 (NKp30)	O14931.1	19-126 IgC 样	S: 1-18, E: 19-135, T: 136-156 , C: 157-201	B7-H6	SEQ ID NO: 27 (19-201)	SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 54
	VSIG8	Q5VU13	22-141 IgV1, 146-257 IgV2	S: 1-21 E: 22-263 T: 264-284 C: 285-414	VISTA	SEQ ID NO: 216 (22-414)	SEQ ID NO: 217	SEQ ID NO: 218

[0263] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白除了含有变体PD-L1多肽之外还含有至少1、2、3、4、5或6个额外免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域,诸如表2中所列出的IgSF家族成员的IgD结构域。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少一个额外IgSF结构域(例如,第二IgSF结构域)。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少两个额外IgSF结构域(例如,第二IgSF结构域和第三IgSF结构域)。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少三个额外IgSF结构域(例如,第二、第三和第四)。在一些实施方案中,所

提供的免疫调节蛋白含有至少四个额外IgSF结构域(例如,第二、第三、第四和第五)。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少五个额外IgSF结构域(例如,第二、第三、第四、第五和第六)。在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少六个额外IgSF结构域(例如,第二、第三、第四、第五、第六和第七)。在一些实施方案中,免疫调节蛋白中的每个IgSF结构域为不同的。在一些实施方案中,额外IgSF结构域中的至少一个与免疫调节蛋白中的至少另一个IgSF结构域相同。在一些实施方案中,每个IgSF结构域是来自或来源于不同IgSF家族成员。在一些实施方案中,IgSF结构域中的至少两个是来自或来源于相同IgSF家族成员。

**[0264]** 在一些实施方案中,额外IgSF结构域包含IgV结构域或一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域、或者IgV结构域的特异性结合片段或一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中,额外IgSF结构域是或包含全长IgV结构域。在一些实施方案中,额外IgSF结构域是或包含一个或多个全长IgC(例如,IgC2)结构域。在一些实施方案中,额外IgSF结构域是或包含IgV结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中,额外IgSF结构域是或包含一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域的特异性结合片段。在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有来自单一(相同)IgSF成员的至少两个额外IgSF结构域。例如,在一些方面,免疫调节蛋白含有IgSF成员的ECD或其含有全长IgV结构域和一个或多个全长IgC(例如,IgC2)结构域或其特异性结合片段的部分。

**[0265]** 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少一个额外IgSF结构域(例如,第二IgSF结构域,或在一些情况下还有第三IgSF结构域等),其中至少一个额外,例如第二或第三IgSF结构域为在SEQ ID NO:1-27和216中任一者中所列出的氨基酸序列中所含有的野生型或未修饰IgSF结构域中所列出的IgSF结构域或其特异性结合片段。在一些实施方案中,野生型或未修饰IgSF结构域是IgV结构域或IgC结构域,诸如IgC1或IgC2结构域。

**[0266]** 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白除了含有变体PD-L1多肽之外,还含有至少一个额外亲和性修饰的IgSF结构域(例如,第二IgSF结构域,或在一些情况下还含有第三亲和力修饰的IgSF结构域等),其中至少一个额外IgSF结构域是与野生型或未修饰IgSF结构域(诸如表2中所列出的IgSF家族成员中的IgSF结构域)相比含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或突变)的vIgD。在一些实施方案中,额外(例如,第二或第三)亲和力修饰的IgSF结构域与SEQ ID NO:1-27和216中任一者中所列出的氨基酸序列中所含有的野生型或未修饰IgSF结构域或其特异性结合片段具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性。在一些实施方案中,野生型或未修饰IgSF结构域是IgV结构域或IgC结构域,诸如IgC1或IgC2结构域。在一些实施方案中,额外(例如,或第二或第三)IgSF结构域为亲和力修饰的IgV结构域和/或IgC结构域。在一些实施方案中,一个或多个额外IgSF结构域为含有IgV结构域和/或一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域或者IgV结构域的特异性结合片段和/或一个或多个IgC(例如,IgC2)结构域的特异性结合片段的亲和力修饰的IgSF结构域,其中IgV和/或IgC结构域含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。在一些实施方案中,一个或多个额外亲和力修饰的IgSF结构域含有包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)的IgV结构域。在一些实施方案中,一个或多个额外亲和力修饰的IgSF结构域包括存在于对应未修饰IgSF家族成员的ECD或ECD的一部分中的IgSF结构域,诸如全长IgV结构域和一个或多个全长IgC(例如,IgC2)结

构域或其特异性结合片段,其中IgV和IgC之一者或二者含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。

[0267] 在一些实施方案中,包含变体PD-L1的免疫调节多肽可以包含本文提供的PD-L1的一个或多个vIgD。在一些实施方案中,本文提供的变体PD-L1免疫调节蛋白将准确地包含1、2、3、4、5或更多个变体PD-L1序列。在一些实施方案中,变体PD-L1序列中的至少两个是相同的变体IgSF结构域。

[0268] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节多肽包含PD-L1的两个或更多个vIgD序列。多肽链内的多个变体PD-L1可以是彼此相同的(即,相同种类)或可以是不同的(即,不同种类)变体PD-L1序列。除了单多肽链实施方案之外,在一些实施方案中,本发明的多肽的两个、三个、四个或更多个可以彼此共价或非共价附接。因此,本文提供单体、二聚体和更高级别(例如3、4、5级或更高级)多聚体蛋白。例如,在一些实施方案中,本发明的恰好两个多肽可以彼此共价或非共价附接以形成二聚体。在一些实施方案中,附接经由链内半胱氨酸二硫键进行。包含本发明的两个或更多个多肽的组合物可以是相同种类或基本上相同种类的多肽(例如,同源二聚体)或不同种类的多肽(例如,异源二聚体)。如上文所述,具有多个本发明的连接多肽的组合物可以在每条多肽链中具有一个或多个本发明的相同或不同的变体PD-L1。在一些具体实施方案中,相同或基本相同种类(允许3个或更少N端或C端氨基酸序列差异)的PD-L1-Fc变体融合多肽将被二聚化以产生同源二聚体。可替代地,不同种类的PD-L1-Fc变体融合多肽可以被二聚化以产生异源二聚体。

[0269] 在一些实施方案中,所提供的免疫调节蛋白含有至少一个额外(例如,或第二或在一些情况下还有第三IgSF结构域等)IgSF结构域,其为除了PD-L1之外的与野生型或未修饰IgSF结构域的IgSF结构域(例如,IgV)相比,含有一个或多个氨基酸取代的vIgD。

[0270] 在一些实施方案中,一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二或第三IgSF)结构域为本身也结合至抑制性受体的另一种IgSF家族成员的IgSF结构域(例如,ECD或IgV)。在一些方面,一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二或第三IgSF)结构域为亲和力修饰的IgSF结构域,其为结合至抑制性受体并含有IgSF结构域(例如,ECD或IgV)中的一个或多个氨基酸取代的IgSF家族成员的变体IgSF结构域(vIgD),其中在一些情况下一个或多个氨基酸修饰引起与抑制性受体的结合增加。在一些实施方案中,vIgD在结合至抑制性受体的IgSF家族成员的野生型或未修饰IgSF结构域(例如,ECD或IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)。除了PD-1之外,此类抑制性受体的示例性实例为CTLA-4、LAG3、TIGIT、TIM-3或BTLA。在一些实施方案中,一个或多个额外IgSF结构域是来自选自以下的IgSF家族成员:CD155、CD112、PD-L2、CD80或CEACAM1。因此,在一些方面,提供靶向或阻断超过一种抑制性受体的活性的多靶检查点拮抗剂。

[0271] 在一些实施方案中,多靶检查点拮抗剂中的免疫调节蛋白靶向或阻断至少两种、三种、四种或更多种抑制性受体的活性。在一些实施方案中,提供一种含有变体PD-L1多肽中的任一种和抑制性受体(诸如野生型或未修饰抑制性受体)的一个或多个IgSF结构域的免疫调节蛋白。在一些实施方案中,提供一种含有变体PD-L1多肽中的任一种和CD80(例如,野生型或未修饰CD80)的一个或多个IgSF结构域(诸如SEQ ID NO:1005、1079或2030中列出的IgV结构域或者SEQ ID NO:28或其部分中列出的ECD或其部分(含有IgV和IgC结构域或其特异性结合片段))的免疫调节蛋白。在一些实施方案中,提供一种含有变体PD-L1多肽中的

任一种和CD112(例如,野生型或未修饰CD112)的一个或多个IgSF结构域(诸如SEQ ID NO:666或761中列出的IgV结构域或者SEQ ID NO:48或其部分中列出的ECD或其部分(含有IgV和IgC结构域或其特异性结合片段))的免疫调节蛋白。在一些实施方案中,提供一种含有变体PD-L1多肽中的任一种和PD-L2(例如,野生型或未修饰PD-L2)的一个或多个IgSF结构域(诸如SEQ ID NO:1203或1263中列出的IgV结构域或者SEQ ID NO:31或其部分中列出的ECD或其部分(含有IgV和IgC结构域或其特异性结合片段))的免疫调节蛋白。在一些实施方案中,提供一种含有变体PD-L1多肽中的任一种和CD155(例如,野生型或未修饰CD155)的一个或多个IgSF结构域(诸如SEQ ID NO:310或353中列出的IgV结构域或者SEQ ID NO:47或其部分中列出的ECD或其部分(含有IgV和IgC结构域或其特异性结合片段))的免疫调节蛋白。

[0272] 在一些实施方案中,提供一种含有一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二或第三IgSF)的免疫调节蛋白,所述结构域为结合至抑制性受体的IgSF家族成员的vIgD,其中IgSF结构域(例如,IgV)中的一个或多个氨基酸修饰导致与未修饰IgSF结构域相比vIgD或含有vIgD的融合物或免疫调节蛋白对抑制性受体同源结合配偶体的结合亲和力增加,诸如结合亲和力增加超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。在一些实施方案中,IgSF结构域(例如,IgV)中的一个或多个氨基酸修饰导致与未修饰IgSF结构域相比vIgD或含有vIgD的融合物或免疫调节蛋白对其抑制性受体的选择性增加。在一些实施方案中,与未修饰IgSF对抑制性受体对比另一种同源结合配偶体(诸如非抑制性受体的同源结合配偶体)的结合比率相比,增加的选择性是vIgD对抑制性受体对比另一种同源结合配偶体的最大结合比率。在一些实施方案中,所述比率大至少或至少约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。

[0273] 在一些实施方案中,所述至少一个额外(例如,第二或第三)vIgD为在IgSF结构域(例如,IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)的变体CD80多肽的IgSF结构域(例如,IgV),所述CD80为结合至抑制性受体TIGIT的IgSF家族成员。在一些实施方案中,至少一个额外(例如,第二)vIgD在结合至抑制性受体CTLA-4的IgSF家族成员的CD80的IgSF结构域(例如,IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)。变体CD80多肽的IgSF结构域(例如,ECD或含有IgV和IgC的IgV)中的示例性氨基酸修饰(诸如取代、缺失或添加)在表3中列出。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD80多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD80多肽含有IgV结构域,包括表3中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1006-1078、1080-1112、1114-1152中任一者中所列出的IgV结构域或具有SEQ ID NO:1006-1078、1080-1112、1114-1152中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的IgV结构域。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD80多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD80多肽含有ECD或其含有IgV和/或IgC结构域的部分,其中含有表3中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:932-964、966-1004中任一者中所列出的ECD或含有SEQ ID NO:932-964、966-1004中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的ECD。

[0274] 在一些实施方案中,所述至少一个额外(例如,第二或第三)vIgD为与未修饰或野生型CD155相比在IgSF结构域(例如,IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失

或添加)的变体CD155多肽的IgSF结构域(例如, IgV),这在一些方面导致与抑制性受体TIGIT的结合增加。变体CD155多肽的IgSF结构域(例如, IgV或含有IgV和IgC的ECD)中的示例性氨基酸修饰(诸如取代、缺失或添加)在表5中列出。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD155多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD155多肽含有IgV结构域,包括表5中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:332-352、354-374、472-665、1505-1550、1570-1714中任一者中所列出的IgV结构域或具有SEQ ID NO:332-352、354-374、472-665、1505-1550、1570-1714中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个多个氨基酸修饰的IgV结构域。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD155多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD155多肽含有ECD或其含有IgV和/或IgC结构域的部分,其中含有表5中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:311-331、375-471、1551-1622中任一者中所列出的ECD或含有SEQ ID NO:311-331、375-471、1551-1622中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的ECD。

[0275] 在一些实施方案中,所述至少一个额外(例如,第二或第三) vIgD为与未修饰或野生型CD112相比在IgSF结构域(例如, IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)的变体CD112多肽的IgSF结构域(例如, IgV),这在一些方面导致与抑制性受体TIGIT的结合增加。变体CD112多肽的IgSF结构域(例如, IgV或含有IgV和IgC的ECD)中的示例性氨基酸修饰(诸如取代、缺失或添加)在表4中列出。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD112多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD112多肽含有IgV结构域,包括表4中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:714-760、762-808、850-931中任一者中所列出的IgV结构域或具有SEQ ID NO:714-760、762-808、850-931中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个多个氨基酸修饰的IgV结构域。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD112多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD112多肽含有ECD或其含有IgV和/或IgC结构域的部分,其中含有表4中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:667-713、809-849、1433-1456中任一者中所列出的ECD或含有SEQ ID NO:667-713、809-849、1433-1456中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的ECD。

[0276] 在一些实施方案中,所述至少一个额外(例如,第二或第三) vIgD为与未修饰或野生型PD-L2相比在IgSF结构域(例如, ECD或IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)的变体PD-L2多肽的IgSF结构域(例如, IgV),这在一些方面导致与抑制性受体PD-1的结合增加。变体PD-L2多肽的IgSF结构域(例如, IgV或含有IgV和IgC的ECD)中的示例性氨基酸修饰(诸如取代、缺失或添加)在表8中列出。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体PD-L2多肽的免疫调节蛋白,所述变体PD-L2多肽含有IgV结构域,包括表8中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1281-1331、1333-1407、1409-1432中任一者中所列出的IgV结构域或具有SEQ ID NO:1281-1331、1333-1407、1409-1432中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的IgV结构域。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体PD-L2多肽的免疫调节蛋白,所述变体PD-L2多肽含有ECD或其含有IgV和/或IgC结构域的部分,其中含有表8中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1204-1254、1256-1280中任一者中所列出的ECD或含有SEQ ID NO:1204-1254、1256-1280中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的ECD。

**[0277]** 在一些实施方案中,一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二IgSF)结构域为结合或识别肿瘤抗原的另一种IgSF家族成员的IgSF结构域(例如,IgV)。在此类实施方案中,IgSF家族成员用作肿瘤定位部分,从而使PD-L1的vIgD接近肿瘤微环境中的免疫细胞。在一些实施方案中,额外IgSF结构域(例如,第二IgSF)结构域为结合或识别肿瘤细胞上表达的B7-H6的NKp30的IgSF结构域。在一些实施方案中,至少一个额外(例如,第二)IgSF结构域(例如,NKp30)为含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)的亲和力修饰的IgSF结构域或vIgD。在一些实施方案中,与未修饰IgSF结构域(例如,NKp30)相比,一个或多个氨基酸修增加了对B7-H6的结合亲和力和/或选择性,诸如增加了至少或至少约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。变体NKp30多肽的IgSF结构域(例如,IgC样或全ECD)中的示例性氨基酸修饰(诸如取代、缺失或添加)在表6中列出。示例性多肽为含有参考与SEQ ID NO:54中列出的位置相对应的NKp30细胞外结构域中的位置的突变L30V/A60V/S64P/S86G的NKp30变体。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体NKp30多肽的免疫调节蛋白,所述变体NKp30多肽含有IgC样结构域,包括表6中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1184-1188中任一者中所列出的IgC样结构域或具有SEQ ID NO:1184-1188中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的IgC样结构域。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体NKp30多肽的免疫调节蛋白,所述变体NKp30多肽含有ECD或其含有一个或多个IgSF结构域的部分,其中含有表6中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1178-1182中任一者中所列出的ECD或含有SEQ ID NO:1178-1182中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的ECD。

**[0278]** 在一些实施方案中,所述至少一个额外(例如,第二或第三)vIgD为与未修饰或野生型CD86相比在IgSF结构域(例如,IgV)中含有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代、缺失或添加)的变体CD86多肽的IgSF结构域(例如,IgV),这在一些方面导致与其同源结合配偶体的结合增加。变体CD86多肽的IgSF结构域(例如,IgV或含有IgV和IgC的ECD)中的示例性氨基酸修饰(诸如取代、缺失或添加)在表7中列出。示例性多肽包括含有参考与SEQ ID NO:29中列出的位置相对应的CD86细胞外结构域中的位置的突变Q35H/H90L/Q102H的CD86变体。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD86多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD86多肽含有IgV结构域,包括表7中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1196-1199中任一者中所列出的IgV结构域或具有SEQ ID NO:1196-1199中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的IgV结构域。在一些实施方案中,提供一种含有所提供的变体PD-L1多肽中的任一种和变体CD86多肽的免疫调节蛋白,所述变体CD86多肽含有ECD或其含有IgV和/或IgC结构域的部分,其中含有表7中所列出的氨基酸修饰中的任一者,诸如SEQ ID NO:1191-1194中任一者中所列出的ECD或含有SEQ ID NO:1191-1194中的任一者的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%并含有一个或多个氨基酸修饰的ECD。

[0279] 表3-8提供了含有可以用于本文所提供的堆叠构建体中的一个或多个亲和力修饰的IgSF结构域的示例性多肽。

表 3: 示例性变体 CD80 多肽

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	28	1005, 2030
L70P	932	1006, 1080
I30F/L70P	933	1007, 1081
Q27H/T41S/A71D	934	1008, 1082
I30T/L70R	935	1009, 1083
T13R/C16R/L70Q/A71D	936	1010, 1084
T57I	937	1011, 1085
M43I/C82R	938	1012, 1086
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	939	1013, 1087
I30V/T57I/L70P/A71D/A91T	940	1014, 1088
V22I/L70M/A71D	941	1015, 1089

[0280]

表 3: 示例性变体 CD80 多肽

[0281]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N55D/L70P/E77G	942	1016, 1090
T57A/I69T	943	1017, 1091
N55D/K86M	944	1018, 1092
L72P/T79I	945	1019, 1093
L70P/F92S	946	1020, 1094
T79P	947	1021, 1095
E35D/M47I/L65P/D90N	948	1022, 1096
L25S/E35D/M47I/D90N	949	1023, 1097
A71D	951	1025, 1099
E81K/A91S	953	1027, 1101
A12V/M47V/L70M	954	1028, 1102
K34E/T41A/L72V	955	1029, 1103
T41S/A71D/V84A	956	1030, 1104
E35D/A71D	957	1031, 1105
E35D/M47I	958	1032, 1106
K36R/G78A	959	1033, 1107
Q33E/T41A	960	1034, 1108
M47V/N48H	961	1035, 1109
M47L/V68A	962	1036, 1110
S44P/A71D	963	1037, 1111
Q27H/M43I/A71D/R73S	964	1038, 1112
E35D/T57I/L70Q/A71D	966	1040, 1114
M47I/E88D	967	1041, 1115
M42I/I61V/A71D	968	1042, 1116
P51A/A71D	969	1043, 1117
H18Y/M47I/T57I/A71G	970	1044, 1118
V20I/M47V/T57I/V84I	971	1045, 1119
V20I/M47V/A71D	972	1046, 1120
A71D/L72V/E95K	973	1047, 1121
V22L/E35G/A71D/L72P	974	1048, 1122
E35D/A71D	975	1049, 1123
E35D/I67L/A71D	976	1050, 1124
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	977	1051, 1125
T13R/M42V/M47I/A71D	978	1052, 1126
E35D	979	1053, 1127
E35D/M47I/L70M	980	1054, 1128
E35D/A71D/L72V	981	1055, 1129
E35D/M43L/L70M	982	1056, 1130
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	983	1057, 1131
E35D/D46V/L85Q	984	1058, 1132
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D	985	1059, 1133
M47V/I69F/A71D/V83I	986	1060, 1134
E35D/T57A/A71D/L85Q	987	1061, 1135
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	988	1062, 1136

表 3: 示例性变体 CD80 多肽		
突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
E35D/M47L	989	1063, 1137
E23D/M42V/M43I/I58V/L70R	990	1064, 1138
V68M/L70M/A71D/E95K	991	1065, 1139
N55I/T57I/I69F	992	1066, 1140
E35D/M43I/A71D	993	1067, 1141
T41S/T57I/L70R	994	1068, 1142
H18Y/A71D/L72P/E88V	995	1069, 1143
V20I/A71D	996	1070, 1144
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	997	1071, 1145
A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V	998	1072, 1146
V22L/E35D/M43L/A71G/D76H	999	1073, 1147
E35G/K54E/A71D/L72P	1000	1074, 1148
L70Q/A71D	1001	1075, 1149
A26E/E35D/M47L/L85Q	1002	1076, 1150
D46E/A71D	1003	1077, 1151
Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W	1004	1078, 1152

表 4: 示例性变体 CD112 多肽		
突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	48	666, 761
Y33H, A112V, G117D	667	714, 762
V19A, Y33H, S64G, S80G, G98S, N106Y, A112V	668	715, 763
L32P, A112V	669	716, 764
A95V, A112I	670	717, 765
P28S, A112V	671	718, 766
P27A, T38N, V101A, A112V	672	719, 767
S118F	673	720, 768
R12W, H48Y, F54S, S118F	674	721, 769
R12W, Q79R, S118F	675	722, 770
T113S, S118Y	676	723, 771
S118Y	677	724, 772
N106I, S118Y	678	725, 773
N106I, S118F	679	726, 774
A95T, L96P, S118Y	680	727, 775
Y33H, P67S, N106Y, A112V	681	728, 776
N106Y, A112V	682	729, 777
T18S, Y33H, A112V	683	730, 778
P9S, Y33H, N47S, A112V	684	731, 779

[0282]

[0283]

表 4：示例性变体 CD112 多肽

[0284]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
P42S, P67H, A112V	685	732, 780
P27L, L32P, P42S, A112V	686	733, 781
G98D, A112V	687	734, 782
Y33H, S35P, N106Y, A112V	688	735, 783
L32P, P42S, T100A, A112V	689	736, 784
P27S, P45S, N106I, A112V	690	737, 785
Y33H, N47K, A112V	691	738, 786
Y33H, N106Y, A112V	692	739, 787
K78R, D84G, A112V, F114S	693	740, 788
Y33H, N47K, F54L, A112V	694	741, 789
Y33H, A112V	695	742, 790
A95V, A112V	696	743, 791
R12W, A112V	697	744, 792
R12W, P27S, A112V	698	745, 793
Y33H, V51M, A112V	699	746, 794
Y33H, A112V, S118T	700	747, 795
Y33H, V101A, A112V, P115S	701	748, 796
H24R, T38N, D43G, A112V	702	749, 797
A112V	703	750, 798
P27A, A112V	704	751, 799
A112V, S118T	705	752, 800
R12W, A112V, M122I	706	753, 801
Q83K, N106Y, A112V	707	754, 802
R12W, P27S, A112V, S118T	708	755, 803
P28S, Y33H, A112V	709	756, 804
P27S, Q90R, A112V	710	757, 805
L15V, P27A, A112V, S118T	711	758, 806
Y33H, N106Y, T108I, A112V	712	759, 807
Y33H, P56L, V75M, V101M, A112V	713	760, 808
N47K, Q79R, S118F	809	850, 891
Q40R, P60T, A112V, S118T	810	851, 892
F114Y, S118F	811	852, 893
Y33H, K78R, S118Y	812	853, 894
R12W, A46T, K66M, Q79R, N106I, T113A, S118F	813	854, 895
Y33H, A112V, S118F	814	855, 896
R12W, Y33H, N106I, S118F	815	856, 897
L15V, Q90R, S118F	816	857, 898
N47K, D84G, N106I, S118Y	817	858, 899
L32P, S118F	818	859, 900
Y33H, Q79R, A112V, S118Y	819	860, 901
T18A, N106I, S118T	820	861, 902
L15V, Y33H, N106Y, A112V, S118F	821	862, 903
V37M, S118F	822	863, 904

表 4：示例性变体 CD112 多肽

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N47K, A112V, S118Y	823	864, 905
A46T, A112V	824	865, 906
P28S, Y33H, N106I, S118Y	825	866, 907
P30S, Y33H, N47K, V75M, Q79R, N106I, S118Y	826	867, 908
V19A, N47K, N106Y, K116E, S118Y	827	868, 909
Q79R, T85A, A112V, S118Y	828	869, 910
V101M, N106I, S118Y	829	870, 911
Y33H, Q79R, N106I, A112V, S118T	830	871, 912
Q79R, A112V	831	872, 913
Y33H, A46T, Q79R, N106I, S118F	832	873, 914
A112V, G121S	833	874, 915
Y33H, Q79R, N106I, S118Y	834	875, 916
Y33H, N106I, A112V	835	876, 917
Y33H, A46T, V101M, A112V, S118T	836	877, 918
L32P, L99M, N106I, S118F	837	878, 919
L32P, T108A, S118F	838	879, 920
R12W, Q79R, A112V	839	880, 921
Y33H, N106Y, E110G, A112V	840	881, 922
Y33H, N106I, S118Y	841	882, 923
Q79R, S118F	842	883, 924
Y33H, Q79R, G98D, V101M, A112V	843	884, 925
N47K, T81S, V101M, A112V, S118F	844	885, 926
G82S, S118Y	845	886, 927
Y33H, A112V, S118Y	846	887, 928
Y33H, N47K, Q79R, N106Y, A112V	847	888, 929
Y33H, S118T	848	889, 930
R12W, Y33H, Q79R, V101M, A112V	849	890, 931
Y33H, Q83K, A112V, S118T	1433	1457, 1481
V29M, Y33H, N106I, S118F	1434	1458, 1482
Y33H, A46T, A112V	1435	1459, 1483
Y33H, Q79R, S118F	1436	1460, 1484
Y33H, N47K, F74L, S118F	1437	1461, 1485
R12W, V101M, N106I, S118Y	1438	1462, 1486
A46T, V101A, N106I, S118Y	1439	1463, 1487
N106Y, A112V, S118T	1440	1464, 1488
S76P, T81I, V101M, N106Y, A112V, S118F	1441	1465, 1489
P9R, L21V, P22L, I34M, S69F, F74L, A87V, A112V, L125A	1442	1466, 1490
Y33H, V101M, A112V	1443	1467, 1491
V29A, L32P, S118F	1444	1468, 1492
Y33H, V101M, N106I, A112V	1445	1469, 1493
R12W, Y33H, N47K, Q79R, S118Y	1446	1470, 1494
Y33H, A46T, A112V, S118T	1447	1471, 1495

[0285]

表 4: 示例性变体 CD112 多肽

[0286]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Y33H, A112V, F114L, S118T	1448	1472, 1496
Y33H, T38A, A46T, V101M, A112V	1449	1473, 1497
P28S, Y33H, S69P, N106I, A112V, S118Y	1450	1474, 1498
Y33H, P42L, N47K, V101M, A112V	1451	1475, 1499
Y33H, N47K, F74S, Q83K, N106I, F111L, A112V, S118T	1452	1476, 1500
Y33H, A112V, S118T, V119A	1453	1477, 1501
Y33H, N106I, A112V, S118F	1454	1478, 1502
Y33H, K66M, S118F, W124L	1455	1479, 1503
N106I, A112V	1456	1480, 1504

表 5: 示例性变体 CD155 多肽

[0287]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	47	310, 353
P18S, P64S, F91S	311	332, 354
P18S, F91S, L104P	312	333, 355
L44P	313	334, 356
A56V	314	335, 357
P18L, L79V, F91S	315	336, 358
P18S, F91S	316	337, 359
P18T, F91S	317	338, 360
P18T, S42P, F91S	318	339, 361
G7E, P18T, Y30C, F91S	319	340, 362
P18T, F91S, G111D	320	341, 363
P18S, F91P	321	342, 364
P18T, F91S, F108L	322	343, 365
P18T, T45A, F91S	323	344, 366
P18T, F91S, R94H	324	345, 367
P18S, Y30C, F91S	325	346, 368
A81V, L83P	326	347, 369
L88P	327	348, 370
R94H	328	349, 371
A13E, P18S, A56V, F91S	329	350, 372
P18T, F91S, V115A	330	351, 373
P18T, Q60K	331	352, 374
S52M	375	472, 569
T45Q, S52L, L104E, G111R	376	473, 570

表 5：示例性变体 CD155 多肽

[0288]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
S42G	377	474, 571
Q62F	378	475, 572
S52Q	379	476, 573
S42A, L104Q, G111R	380	477, 574
S42A, S52Q, L104Q, G111R	381	478, 575
S52W, L104E	382	479, 576
S42C	383	480, 577
S52W	384	481, 578
S52M, L104Q	385	482, 579
S42L, S52L, Q62F, L104Q	386	483, 580
S42W	387	484, 581
S42Q	388	485, 582
S52L	389	486, 583
S52R	390	487, 584
L104E	391	488, 585
G111R	392	489, 586
S52E	393	490, 587
Q62Y	394	491, 588
T45Q, S52M, L104E	395	492, 589
S42N, L104Q, G111R	396	493, 590
S52M, V57L	397	494, 591
S42N, S52Q, Q62F	398	495, 592
S42A, S52L, L104E, G111R	399	496, 593
S42W, S52Q, V57L, Q62Y	400	497, 594
L104Q	401	498, 595
S42L, S52Q, L104E	402	499, 596
S42C, S52L	403	500, 597
S42W, S52R, Q62Y, L104Q	404	501, 598
T45Q, S52R, L104E	405	502, 599
S52R, Q62F, L104Q, G111R	406	503, 600
T45Q, S52L, V57L, L104E	407	504, 601
S52M, Q62Y	408	505, 602
Q62F, L104E, G111R	409	506, 603
T45Q, S52Q	410	507, 604
S52L, L104E	411	508, 605
S42V, S52E	412	509, 606
T45Q, S52R, G111R	413	510, 607
S42G, S52Q, L104E, G111R	414	511, 608
S42N, S52E, V57L, L104E	415	512, 609
S42C, S52M, Q62F	416	513, 610
S42L	417	514, 611
S42A	418	515, 612
S42G, S52L, Q62F, L104Q	419	516, 613

表 5：示例性变体 CD155 多肽

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
S42N	420	517, 614
P18T, S65A, S67V, F91S	421	518, 615
P18F, T39A, T45Q, T61R, S65N, S67L, E73G, R78G	422	519, 616
P18T, T45Q, T61R, S65N, S67L	423	520, 617
P18F, S65A, S67V, F91S	424	521, 618
P18F, T45Q, T61R, S65N, S67L, F91S, L104P	425	522, 619
P18S, L79P, L104M	426	523, 620
P18S, L104M	427	524, 621
L79P, L104M	428	525, 622
P18T, T45Q, L79P	429	526, 623
P18T, T45Q, T61R, S65H, S67H	430	527, 624
P18T, A81E	431	528, 625
P18S, D23Y, E37P, S52G, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	432	529, 626
A13R, D23Y, E37P, S42P, Q62Y, A81E	433	530, 627
A13R, D23Y, E37P, G99Y, S112N	434	531, 628
A13R, D23Y, E37P, Q62M, A77V, G80S, A81P, G99Y	435	532, 629
P18L, E37S, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	436	533, 630
P18S, L104T	437	534, 631
P18S, Q62H, L79Q, F91S	438	535, 632
T45Q, S52K, Q62F, L104Q, G111R	439	536, 633
T45Q, S52Q, Q62Y, L104Q, G111R	440	537, 634
T45Q, S52Q, Q62Y, L104E, G111R	441	538, 635
V57A, T61M, S65W, S67A, E96D, L104T	442	539, 636
P18L, V57T, T61S, S65Y, S67A, L104T	443	540, 637
P18T, T45Q	444	541, 638
P18L, V57A, T61M, S65W, S67A, L104T	445	542, 639
T61M, S65W, S67A, L104T	446	543, 640
P18S, V41A, S42G, T45G, L104N	447	544, 641
P18H, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104N	448	545, 642
P18S, S42G, T45V, F58L, S67W, L104N	449	546, 643
P18S, T45I, L104N	450	547, 644
P18S, S42G, T45G, L104N, V106A	451	548, 645
P18H, H40R, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104Y, V106L, F108H	452	549, 646
E37V, S42G, T45G, L104N	453	550, 647
P18S, T45Q, L79P, L104T	454	551, 648
P18L, Q62R	455	552, 649
A13R, D23Y, E37P, S42L, S52G, Q62Y, A81E	456	553, 650
P18L, H49R, L104T, D116N	457	554, 651
A13R, D23Y, E37P, Q62M, G80S, A81P, L104T	458	555, 652
S65T, L104T	459	556, 653

[0289]

表 5：示例性变体 CD155 多肽

[0290]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
A13R, D23Y, E37P, S52G, V57A, Q62M, K70E, L104T	460	557, 654
P18L, A47V, Q62Y, E73D, L104T	461	558, 655
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, D97G, E98S, L104T, D116N	462	559, 656
P18L, S42P, T45Q, T61G, S65H, S67E, L104T, D116N	463	560, 657
P18S, H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, L104M, V106A	464	561, 658
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E68G, E73R, D97G, E98S, L104T	465	562, 659
T45Q, S52E, L104E	466	563, 660
T45Q, S52E, Q62F, L104E	467	564, 661
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, F91S, L104M, G111D	468	565, 662
P18S, T45S, T61K, S65W, S67A, F91S, G111R	469	566, 663
P18S, L79P, L104M, T107M	470	567, 664
P18S, S65W, S67A, M90V, V95A, L104Q, G111R	471	568, 665
P18S, A47G, L79P, F91S, L104M, T107A, R113W	1551	1505, 1528
P18T, D23G, S24A, N35D, H49L, L79P, F91S, L104M, G111R	1552	1506, 1529
V9L, P18S, Q60R, V75L, L79P, R89K, F91S, L104E, G111R	1553	1507, 1530
P18S, H49R, E73D, L79P, N85D, F91S, V95A, L104M, G111R	1554	1508, 1531
V11A, P18S, L79P, F91S, L104M, G111R	1555	1509, 1532
V11A, P18S, S54R, Q60P, Q62K, L79P, N85D, F91S, T107M	1556	1510, 1533
P18T, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, G111R	1557	1511, 1534
P18T, M36T, L79P, F91S, G111R	1558	1512, 1535
D8G, P18S, M36I, V38A, H49Q, A76E, F91S, L104M, T107A, R113W	1559	1513, 1536
P18S, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, T107S, R113W	1560	1514, 1537
T15I, P18T, L79P, F91S, L104M, G111R	1561	1515, 1538
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, E82D, F91S, L104M, G111D	1562	1516, 1539
P18T, E37G, G53R, Q62K, L79P, F91S, E98D, L104M, T107M	1563	1517, 1540
P18L, K70E, L79P, F91S, V95A, G111R	1564	1518, 1541
V9I, Q12K, P18F, S65A, S67V, L79P, L104T, G111R, S112I	1565	1519, 1542
P18F, S65A, S67V, F91S, L104M, G111R	1566	1520, 1543
V9I, V10I, P18S, F20S, T45A, L79P, F91S, L104M, F108Y, G111R, S112V	1567	1521, 1544
V9L, P18L, L79P, M90I, F91S, T102S, L104M, G111R	1568	1522, 1545
P18C, T26M, L44V, M55I, Q62K, L79P, F91S, L104M,	1569	1523, 1546

表 5：示例性变体 CD155 多肽

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
T107M		
V9I, P18T, D23G, L79P, F91S, G111R	1570	1524, 1547
P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1571	1525, 1548
P18T, M36T, S65A, S67E, L79Q, A81T, F91S, G111R	1572	1526, 1549
V9L, P18T, Q62R, L79P, F91S, L104M, G111R	1573	1527, 1550
P18S, S65W, S67A, L104Q, G111R	1574	1575, 1576
P18T, G19D, M36T, S54N, L79P, L83Q, F91S, T107M, F108Y	1577	1623, 1669
V9L, P18L, M55V, S69L, L79P, A81E, F91S, T107M	1578	1624, 1670
P18F, H40Q, T61K, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107V	1579	1625, 1671
P18S, Q32R, Q62K, R78G, L79P, F91S, T107A, R113W	1580	1626, 1672
Q12H, P18T, L21S, G22S, V57A, Q62R, L79P, F91S, T107M	1581	1627, 1673
V9I, P18S, S24P, H49Q, F58Y, Q60R, Q62K, L79P, F91S, T107M	1582	1628, 1674
P18T, W46C, H49R, S65A, S67V, A76T, L79P, S87T, L104M	1583	1629, 1675
P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1584	1630, 1676
V10F, T15S, P18L, R48Q, L79P, F91S, T107M, V115M	1585	1631, 1677
P18S, L21M, Y30F, N35D, R84W, F91S, T107M, D116G	1586	1632, 1678
P18F, E51V, S54G, Q60R, L79Q, E82G, S87T, M90I, F91S, G92R, T107M	1587	1633, 1679
Q16H, P18F, F91S, T107M	1588	1634, 1680
P18T, D23G, Q60R, S67L, L79P, F91S, T107M, V115A	1589	1635, 1681
D8G, V9I, V11A, P18T, T26M, S52P, L79P, F91S, G92A, T107L, V115A	1590	1636, 1682
V9I, P18F, A47E, G50S, E68G, L79P, F91S, T107M	1591	1637, 1683
P18S, M55I, Q62K, S69P, L79P, F91S, T107M	1592	1638, 1684
P18T, T39S, S52P, S54R, L79P, F91S, T107M	1593	1639, 1685
P18S, D23N, L79P, F91S, T107M, S114N	1594	1640, 1686
P18S, P34S, E51V, L79P, F91S, G111R	1595	1641, 1687
P18S, H59N, V75A, L79P, A81T, F91S, L104M, T107M	1596	1642, 1688
P18S, W46R, E68D, L79P, F91S, T107M, R113G	1597	1643, 1689
V9L, P18F, T45A, S65A, S67V, R78K, L79V, F91S, T107M, S114T	1598	1644, 1690
P18T, M55L, T61R, L79P, F91S, V106I, T107M	1599	1645, 1691
T15I, P18S, V33M, N35F, T39S, M55L, R78S, L79P, F91S, T107M	1600	1646, 1692
P18S, Q62K, K70E, L79P, F91S, G92E, R113W	1601	1647, 1693
P18F, F20I, T26M, A47V, E51K, L79P, F91S	1602	1648, 1694
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1603	1649, 1695
P18S, D23G, C29R, N35D, E37G, M55I, Q62K, S65A,	1604	1650, 1696

[0291]

表 5: 示例性变体 CD155 多肽

[0292]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
S67G, R78G, L79P, F91S, L104M, T107M, Q110R		
A13E, P18S, M36R, Q62K, S67T, L79P, N85D, F91S, T107M	1605	1651, 1697
V9I, P18T, H49R, L79P, N85D, F91S, L104T, T107M	1606	1652, 1698
V9A, P18F, T61S, Q62L, L79P, F91S, G111R	1607	1653, 1699
D8E, P18T, T61A, L79P, F91S, T107M	1608	1654, 1700
P18S, V41A, H49R, S54C, L79S, N85Y, L88P, F91S, L104M, T107M	1609	1655, 1701
V11E, P18H, F20Y, V25E, N35S, H49R, L79P, F91S, T107M, G111R	1610	1656, 1702
V11A, P18F, D23A, L79P, G80D, V95A, T107M	1611	1657, 1703
P18S, K70R, L79P, F91S, G111R	1612	1658, 1704
V9L, V11M, P18S, N35S, S54G, Q62K, L79P, L104M, T107M, V115M	1613	1659, 1705
V9L, P18Y, V25A, V38G, M55V, A77T, L79P, M90I, F91S, L104M	1614	1660, 1706
V10G, P18T, L72Q, L79P, F91S, T107M	1615	1661, 1707
P18S, H59R, A76G, R78S, L79P	1616	1662, 1708
V9A, P18S, M36T, S65G, L79P, F91S, L104T, G111R, S112I	1617	1663, 1709
P18T, S52A, V57A, Q60R, Q62K, S65C, L79P, F91T, N100Y, T107M	1618	1664, 1710
V11A, P18F, N35D, A47E, Q62K, L79P, F91S, G99D, T107M, S114N	1619	1665, 1711
V11A, P18T, N35S, L79P, S87T, F91S	1620	1666, 1712
V9D, V11M, Q12L, P18S, E37V, M55I, Q60R, K70Q, L79P, F91S, L104M, T107M	1621	1667, 1713
T15S, P18S, Y30H, Q32L, Q62R, L79P, F91S, T107M	1622	1668, 1714

表 6: 示例性变体 NKp30 多肽

[0293]

突变	ECD SEQ ID NO	IgC 样结 构域 SEQ ID NO
野生型	54	1183
L30V/A60V/S64P/S86G	1178	1184
L30V	1179	1185
A60V	1180	1186
S64P	1181	1187
S86G	1182	1188

表 7: 示例性变体 CD86 多肽

[0294]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	29	1195
Q35H/H90L/Q102H	1191	1196
Q35H	1192	1197
H90L	1193	1198
Q102H	1194	1199

表 8: 示例性变体 PD-L2 多肽

[0295]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
野生型	31	1203, 1263
H15Q	1204	1281, 1357
N24D	1205	1282, 1358
E44D	1206	1283, 1359
V89D	1207	1284, 1360
Q82R/V89D	1208	1285, 1361
E59G/Q82R	1209	1286, 1362
S39I/V89D	1210	1287, 1363
S67L/V89D	1211	1288, 1364
S67L/I85F	1212	1289, 1365
S67L/I86T	1213	1290, 1366
H15Q/K65R	1214	1291, 1367
H15Q/Q72H/V89D	1215	1292, 1368
H15Q/S67L/R76G	1216	1293, 1369
H15Q/R76G/I85F	1217	1294, 1370
H15Q/T47A/Q82R	1218	1295, 1371
H15Q/Q82R/V89D	1219	1296, 1372
H15Q/C23S/I86T	1220	1297, 1373
H15Q/S39I/I86T	1221	1298, 1374
H15Q/R76G/I85F	1222	1299, 1375
E44D/V89D/W91R	1223	1300, 1376
I13V/S67L/V89D	1224	1301, 1377
H15Q/S67L/I86T	1225	1302, 1378
I13V/H15Q/S67L/I86T	1226	1303, 1379
I13V/H15Q/E44D/V89D	1227	1304, 1380
I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D	1228	1305, 1381
I13V/E44D/Q82R/V89D	1229	1306, 1382
I13V/Q72H/R76G/I86T	1230	1307, 1383

表 8：示例性变体 PD-L2 多肽

[0296]

突变	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
I13V/H15Q/R76G/I85F	1231	1308, 1384
H15Q/S39I/R76G/V89D	1232	1309, 1385
H15Q/S67L/R76G/I85F	1233	1310, 1386
H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T	1234	1311, 1387
H15Q/T47A/Q72H/R76G	1235	1312, 1388
I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G	1236	1313, 1389
H15Q/E44D/R76G/I85F	1237	1314, 1390
H15Q/S39I/S67L/V89D	1238	1315, 1391
H15Q/N32D/S67L/V89D	1239	1316, 1392
N32D/S67L/V89D	1240	1317, 1393
H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D	1241	1318, 1394
H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T	1242	1319, 1395
G28V/Q72H/R76G/I86T	1243	1320, 1396
I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L	1244	1321, 1397
E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D	1245	1322, 1398
H15Q/V89D	1246	1323, 1399
H15Q/T47A	1247	1324, 1400
I13V/H15Q/Q82R	1248	1325, 1401
I13V/H15Q/V89D	1249	1326, 1402
I13V/S67L/Q82R/V89D	1250	1327, 1403
I13V/H15Q/Q82R/V89D	1251	1328, 1404
H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D	1252	1329, 1405
I13V/H15Q/T47A/Q82R	1253	1330, 1406
I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D	1254	1331, 1407
H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D	1256	1333, 1409
I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D	1257	1334, 1410
I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D	1258	1335, 1411
I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D	1259	1336, 1412
I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D	1260	1337, 1413
I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D	1261	1338, 1414
I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D	1262	1339, 1415
I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D	1264	1340, 1416
H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D	1265	1341, 1417
H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D	1266	1342, 1418
I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T	1267	1343, 1419
H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D	1268	1344, 1420
F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D	1269	1345, 1421
I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D	1270	1346, 1422
I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D	1271	1347, 1423
H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D	1272	1348, 1424
I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D	1273	1349, 1425
H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D	1274	1350, 1426
I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D	1275	1351, 1427

表 8: 示例性变体 PD-L2 多肽		ECD SEQ NO	IgV SEQ NO	ID
[0297]	突变			
	H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D	1276	1352, 1428	
	I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T	1277	1353, 1429	
	H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89 D	1278	1354, 1430	
	H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D	1279	1355, 1431	
	I13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89 D	1280	1356, 1432	

[0298] 存在于“堆叠的”免疫调节蛋白构建体(无论是非野生型组合或非野生型布置)中的此类非亲和力修饰的或亲和力修饰的IgSF结构域的数目是至少2、3、4或5以及在一些实施方案中正好2、3、4或5个IgSF结构域(因此亲和力修饰的IgSF结构域的数目的确定忽视了其任何非特异性结合部分序列和/或其基本上无免疫活性的部分序列)。

[0299] 在本文所提供的堆叠免疫调节蛋白的一些实施方案中, IgSF结构域的数目为至少2, 其中亲和力修饰的IgSF结构域的数目和非亲和力修饰的IgSF结构域的数目各自独立地为至少:0、1、2、3、4、5或6。因此, 亲和力修饰的IgSF结构域的数目和非亲和力修饰的IgSF结构域的数目(亲和力修饰的IgSF结构域:非亲和力修饰的IgSF结构域)分别可为正好或至少:2:0(亲和力修饰:野生型)、0:2、2:1、1:2、2:2、2:3、3:2、2:4、4:2、1:1、1:3、3:1、1:4、4:1、1:5或5:1。

[0300] 在堆叠免疫调节蛋白的一些实施方案中, 至少两个非亲和力修饰的IgSF结构域和/或亲和力修饰的IgSF结构域为相同的IgSF结构域。

[0301] 在一些实施方案中, 本文所提供的堆叠的免疫调节蛋白包含来自单一IgSF成员但在非野生型布置(可替代地“排列”)中的至少两个亲和力修饰的IgSF结构域和/或非亲和力修饰的IgSF结构域。非野生型布置或排列的一个说明性实例为相对于IgSF结构域序列用作如本文所提供的变体IgSF结构域来源的野生型PD-L1中存在的那些免疫调节蛋白, 包含非野生型顺序的亲和力修饰的IgSF结构域和/或非亲和力修饰的IgSF结构域的免疫调节蛋白。因此, 在一个实例中, 免疫调节蛋白可以包含在跨膜结构域近端的IgV和远端的IgC, 虽然呈非亲和力修饰的形式和/或亲和力修饰的形式。非亲和力修饰的IgSF结构域和/或亲和力修饰的IgSF结构域的非野生型组合和非野生型布置在本文所提供的免疫调节蛋白中的存在也处于所提供的主题范围内。

[0302] 在堆叠免疫调节蛋白的一些实施方案中, 非亲和力修饰的IgSF结构域和/或亲和力修饰的IgSF结构域为不相同(即, 不同)的IgSF结构域。不相同的亲和力修饰的IgSF结构域在特异性结合条件下特异性结合不同的同源结合配偶体并且是“不相同的”, 而不管它们由其工程改造的野生型或未修饰IgSF结构域是否是相同的。因此, 例如, 免疫调节蛋白中至少两个不相同的IgSF结构域的非野生型组合可以包含至少一个来源为来自一个PD-L1并为其所特有的IgSF结构域序列和至少一个来源为来自另一个非PD-L1的IgSF家族成员并为其所特有的第二IgSF结构域, 其中免疫调节蛋白的IgSF结构域呈非亲和力修饰的形式和/或亲和力修饰的形式。然而, 在替代性实施方案中, 两个不相同的IgSF结构域来源于相同的IgSF结构域序列, 但至少一个是亲和力修饰的, 使得它们特异性结合至不同的同源结合配

偶体。

[0303] 堆叠的免疫调节蛋白多肽链中的多个非亲和力修饰的和/或亲和力修饰的IgSF结构域不需要彼此直接共价连接。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸残基的中间跨度彼此间接共价结合非亲和力修饰的和/或亲和力修饰的IgSF结构域。连接可以是经由N端至C端残基。

[0304] 在一些实施方案中,两个或更多个IgSF结构域(包括PD-L1的vIgD和来自另一个IgSF家族成员的一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二或第三变体IgSF结构域)共价或非共价连接在一起。在一些实施方案中,两个或更多个IgSF结构域直接或诸如经由接头间接连接。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸残基的中间跨度彼此间接共价结合IgSF结构域。连接可以是经由N端至C端残基。在一些实施方案中,连接可以经由不位于IgSF结构域的N端或C端的氨基酸残基的侧链进行。因此,连接可以经由末端或内部氨基酸残基或它们的组合进行。

[0305] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有各自直接或经由接头间接连接的至少两个IgSF结构域。在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有各自直接或经由接头间接连接的至少三个免疫调节蛋白。各种构型示出在图5A和图5B中。

[0306] 在一些实施方案中,一个或多个“肽接头”将PD-L1的vIgD和一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二或第三变体IgSF结构域)连接在一起。在一些实施方案中,肽接头的长度可以是单一氨基酸残基或更大。在一些实施方案中,肽接头具有至少一个氨基酸残基但长度不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头是柔性接头。在一些实施方案中,接头是(呈一个字母氨基酸密码的形式):GGGGS(“4GS”;SEQ ID NO:1942)或4GS接头的多聚体,诸如2、3、4或5个4GS接头的重复序列。在一些实施方案中,肽接头是(GGGGS)<sub>2</sub>(SEQ ID NO:240)或(GGGGS)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:239)。在一些实施方案中,接头(呈一个字母氨基酸密码的形式)是GSGGGGS(SEQ ID NO:1941)。在一些实施方案中,接头还可以包括单独的或除了另一个肽接头(诸如4GS接头或其多聚体)之外的一系列丙氨酸残基。在一些实施方案中,每个系列中的丙氨酸残基的数目为:2、3、4、5或6个丙氨酸。在一些实施方案中,接头还可以包括单独的或除了另一个肽接头(诸如4GS接头或其多聚体)之外的一系列丙氨酸残基。在一些实施方案中,每个系列中的丙氨酸残基的数目为:2、3、4、5或6个丙氨酸。在一些实施方案中,接头是刚性接头。例如,接头是 $\alpha$ 螺旋接头。在一些实施方案中,接头是(呈一个字母氨基酸密码的形式):EAAAK或EAAAK接头的多聚体,诸如2、3、4或5个EAAAK接头的重复序列,诸如SEQ ID NO:2022中列出(1xEAAAK)、SEQ ID NO:2023中列出(3xEAAAK)或SEQ ID NO:2024中列出(5xEAAAK)。在一些实施方案中,接头可以还包含通过克隆和/或从限制性位点引入的氨基酸,例如接头可以包含如通过使用限制性位点BAMHI引入的氨基酸GS(呈一个字母氨基酸密码的形式)。例如,在一些实施方案中,接头(呈一个字母氨基酸密码的形式)是GSGGGGS(SEQ ID NO:1941)、GS(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:2031)或GS(G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>(SEQ ID NO:2032)。在一些实例中,接头是2xGGGGS后接三个丙氨酸(GGGGSGGGSAAA;SEQ ID NO:241)。在一些情况下,肽的各种组合用作接头。

[0307] 在一些实施方案中,非亲和力修饰的和/或亲和力修饰的IgSF结构域通过插入在非亲和力修饰的和/或亲和力修饰的IgSF结构域的N端和/或C端的“野生型肽接头”连接。这些接头也称为前导序列(非亲和力修饰的或亲和力修饰的IgSF结构域的N端)或尾部序列

(非亲和力修饰的或亲和力修饰的IgSF结构域的C端),以及存在于野生型蛋白中的正在IgSF的Ig折叠的结构预测之外跨越的序列。在一些实施方案中,“野生型接头”是在野生型蛋白的氨基酸序列中在信号序列之后但在IgSF结构域(诸如限定的IgV结构域)之前存在的氨基酸序列。在一些实施方案中,“野生型”接头是在野生型蛋白的氨基酸序列中紧接在IgSF结构域之后(诸如紧接在限定的IgV结构域之后)但在IgC结构域之前存在的氨基酸序列。这些接头序列可以有助于相邻的一个或多个IgSF结构域的适当折叠和功能。在一些实施方案中,存在插入在第一IgSF结构域的N端处的前导肽序列和/或插入在第一非亲和力修饰和/或亲合力修饰的IgSF结构域的C端处的尾部序列。在一些实施方案中,存在插入在第二IgSF结构域的N端处的第二前导肽序列和/或插入在第二非亲和力修饰和/或亲合力修饰的IgSF结构域的C端处的第二尾部序列。当第一和第二非亲和力修饰的和/或亲和力修饰的IgSF结构域来源于相同亲本蛋白质并且在相同取向中连接时,第一与第二非亲和力修饰的和/或亲和力修饰的IgSF结构域之间的野生型肽接头未复制。例如,当第一尾部野生型肽接头和第二前导野生型肽接头是相同的时,II型免疫调节蛋白不包含第一尾部野生型肽接头或第二前导野生型肽接头。

[0308] 在一些实施方案中,II型免疫调节蛋白包含插入在第一非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域的N端处的第一前导野生型肽接头,其中所述第一前导野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接前面的结构域(诸如信号肽或IgSF结构域)之间包含至少5个(诸如至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个中的任一者)来自第一非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的插入序列的连续氨基酸。在一些实施方案中,第一前导野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接前面的结构域(诸如信号肽或IgSF结构域)之间包含第一非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的整个插入序列。

[0309] 在一些实施方案中,II型免疫调节蛋白还包含插入在第一非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域的C端处的第一尾部野生型肽接头,其中所述第一尾部野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接后面的结构域(诸如IgSF结构域或跨膜结构域)之间包含至少5个(诸如至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个中的任一者)来自第一非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的插入序列的连续氨基酸。在一些实施方案中,第一尾部野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接后面的结构域(诸如IgSF结构域或跨膜结构域)之间包含第一非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的整个插入序列。

[0310] 在一些实施方案中,II型免疫调节蛋白还包含插入在第二非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域的N端处的第二前导野生型肽接头,其中所述第二前导野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接前面的结构域(诸如信号肽或IgSF结构域)之间包含至少5个(诸如至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个中的任一者)来自第二非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的插入序列的连续氨基酸。在一些实施方案中,第二前导野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接前面的结构域(诸如信号肽或IgSF结构域)之间包含第二非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的整个插入序列。

[0311] 在一些实施方案中,II型免疫调节蛋白还包含插入在第二非亲和力修饰和/或亲

和力修饰的IgSF结构域的C端处的第二尾部野生型肽接头,其中所述第二尾部野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接后面的结构域(诸如IgSF结构域或跨膜结构域)之间包含至少5个(诸如至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个中的任一者)来自第二非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的插入序列的连续氨基酸。在一些实施方案中,第二尾部野生型肽接头在亲本IgSF结构域与紧接后面的结构域(诸如IgSF结构域或跨膜结构域)之间包含第二非亲和力修饰和/或亲和力修饰的IgSF结构域所来源的野生型蛋白的整个插入序列。

[0312] 在一些实施方案中,两个或更多个IgSF结构域(包括PD-L1的vIgD和来自另一个IgSF家族成员的一个或多个额外IgSF结构域(例如,第二和/或第三变体IgSF结构域))连接或附接至多聚化结构域,诸如附接至Fc,以形成Fc融合物,所述融合物在细胞中表达时在一些方面可以产生二聚体多结构域堆叠免疫调节蛋白。因此,还提供二聚体多结构域免疫调节蛋白。

[0313] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽和一个或多个额外IgSF结构域独立地直接或间接连接至多聚化结构域诸如Fc区的N端或C端。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽和一个或多个额外IgSF结构域中的至少一个直接或间接连接至多聚化结构域诸如Fc区的N端或C端,并且变体PD-L1之一和一个或多个额外IgSF结构域之一也直接或间接连接至多聚化结构域诸如Fc区的N端或C端。在一些实施方案中,多聚化结构域诸如Fc区的N端或C端连接至变体PD-L1多肽或一个或多个额外IgSF结构域,并且Fc区的N端或C端中的另一者连接至PD-L1变体中的另一者或一个或多个额外IgSF结构域中的另一者。在一些实施方案中,与多聚化结构域诸如与Fc的连接是经由肽接头,例如肽接头,诸如上文所述。在一些实施方案中,变体PD-L1与一个或多个额外IgSF结构域之间的连接是经由肽接头,例如肽接头,诸如上文所述。在一些实施方案中,PD-L1的vIgD、一个或多个额外IgSF结构域和多聚化结构域诸如Fc结构域可以如图5A和图5B中所描绘的许多构型中的任一者连接在一起。示例性构型描述于实施例中。

[0314] 在一些实施方案中,叠堆的免疫调节蛋白为通过两个免疫调节Fc融合多肽形成的二聚体。还提供编码堆叠的免疫调节蛋白中的任一者的核酸分子。在一些实施方案中,二聚体多结构域堆叠免疫调节蛋白可以在细胞中通过表达或者在一些情况下共表达堆叠的免疫调节Fc融合多肽(诸如上文根据生成二聚体Fc融合蛋白所述)来产生。

[0315] 在一些实施方案中,二聚体多结构域堆叠免疫调节蛋白对于每个Fc区为二价的,对于每个亚基为单价的,或者对于一个亚基为二价的并且对于另一个亚基为四价的。

[0316] 在一些实施方案中,二聚体多结构域堆叠免疫调节蛋白为同源二聚体多结构域堆叠Fc蛋白。在一些实施方案中,二聚体多结构域堆叠免疫调节蛋白包含第一堆叠免疫调节Fc融合多肽和第二堆叠免疫调节Fc融合多肽,其中第一多肽和第二多肽是相同的。在一些实施方案中,多结构域堆叠分子含有包含变体PD-L1和第二IgSF结构域的第一Fc融合多肽和包含变体PD-L1和第二IgSF结构域的第二Fc融合多肽。在一些实施方案中,多结构域堆叠分子含有包含变体PD-L1、第二IgSF结构域和第三IgSF结构域的第一Fc融合多肽和包含变体PD-L1、第二IgSF结构域和第三IgSF结构域的第二Fc融合多肽。在一些实施方案中,第一和/或第二融合多肽的Fc部分可以是如上文所述的任何Fc。在一些实施方案中,第一和第二融合多肽的Fc部分或区域是相同的。

[0317] 在一些实施方案中,多结构域堆叠分子为包含两个不同Fc融合多肽(例如,第一和第二Fc融合多肽)的异源二聚体,其中至少一个为含有变体PD-L1多肽的Fc融合多肽并且/或者至少一个为含有第二IgSF结构域(例如,第二变体IgSF结构域)的Fc融合多肽。在一些实施方案中,第一或第二Fc融合多肽还含有第三IgSF结构域(例如,第三变体IgSF结构域)。

[0318] 在一些实施方案中,多结构域堆叠分子含有包含变体PD-L1的第一Fc融合多肽和包含第二IgSF结构域的第二Fc融合多肽,其中在一些情况下第一或第二Fc融合多肽另外含有第三IgSF结构域。在一些实施方案中,多结构域堆叠分子含有包含变体PD-L1、第二IgSF结构域和(在一些情况下)第三IgSF结构域的第一Fc融合多肽和未连接至变体PD-L1多肽或额外IgSF结构域的第二Fc融合多肽。在一些实施方案中,第一和第二融合多肽的Fc部分或区域是相同的。在一些实施方案中,第一和第二融合多肽的Fc部分或区域是不同的。

[0319] 在一些实施方案中,多结构域堆叠分子含有包含1、2、3、4或更多个变体PD-L1多肽和1、2、3、4或更多个额外IgSF结构域的第一Fc融合多肽,其中第一堆叠Fc融合多肽中的IgSF结构域的总数目大于2、3、4、5、6或更大。在这种实施方案的一个实例中,第二堆叠Fc融合多肽含有1、2、3、4或更多个变体PD-L1多肽和1、2、3、4或更多个额外IgSF结构域,其中第二堆叠Fc融合多肽中的IgSF结构域的总数目大于2、3、4、5、6或更大。在这种实施方案的另一个实例中,第二Fc融合多肽未连接至变体PD-L1多肽或额外IgSF结构域。

[0320] 在一些实施方案中,异源二聚体堆叠分子含有第一堆叠免疫调节Fc融合多肽和第二堆叠免疫调节Fc融合多肽,其中第一多肽和第二多肽是不同的。在一些实施方案中,异源二聚体堆叠分子含有包含Fc区和第一变体PD-L1多肽和/或第二IgSF结构域(例如,第二变体IgSF结构域)的第一Fc多肽融合物以及包含Fc区和第一变体PD-L1多肽或第二IgSF结构域中的另一者的第二多肽融合物。在一些实施方案中,异源二聚体堆叠分子含有包含Fc区和第一变体PD-L1多肽和/或第二IgSF结构域(例如,第二变体IgSF结构域)的第一Fc多肽融合物以及包含Fc区和第一变体PD-L1多肽和第二IgSF结构域(例如,第二变体IgSF结构域)但处于与第一Fc区不同的取向或构型中的第二Fc多肽融合物。在一些实施方案中,第一和/或第二Fc融合多肽还含有第三IgSF结构域(例如,第三变体IgSF结构域)。

[0321] 在一些实施方案中,第一和第二堆叠免疫调节Fc融合多肽之一者或二者的Fc结构域包含修饰(例如,取代),使得Fc分子的界面被修饰以有利于和/或促进异源二聚化。在一些实施方案中,修饰包括将突出部(球状突起)引入第一Fc多肽以及将空腔(孔)引入第二Fc多肽,使得突出部可定位在空腔中,以促进第一和第二含Fc多肽的复杂化。靶向置换和/或修饰以在多肽中产生突出部或空腔的氨基酸通常是界面氨基酸,其与第二多肽的界面中的一个或多个氨基酸相互作用或接触。

[0322] 在一些实施方案中,氨基酸序列添加在构建体的Fc序列前面,其中Fc序列是所述序列的N端部分。在一些情况下,氨基酸序列HMSSVSAQ(SEQ ID NO:1156)添加紧接在构建体的Fc序列前面,其中Fc序列是所述序列的N端部分。在一些实施方案中,异源二聚体堆叠分子含有包含Fc区(球状突起)和第一变体多肽和/或第二IgSF结构域(例如,第二变体IgSF结构域)的第一Fc多肽融合物以及包含Fc区(孔)的第二Fc多肽融合物,包含紧接第一和第二Fc多肽融合物的两个Fc区前面的填充序列HMSSVSAQ(SEQ ID NO:1156)。

[0323] 在一些实施方案中,被修饰以含有突出部(孔)氨基酸的第一多肽包括将天然或初始氨基酸用具有至少一条侧链的氨基酸置换,所述至少一条侧链从第一多肽的界面伸出并

且因此可定位在第二多肽的相邻界面中的互补空腔(孔)中。最经常,置换氨基酸为具有比初始氨基酸残基大的侧链体积的氨基酸。本领域技术人员知道如何确定和/或评定氨基酸残基的特性以鉴定理想置换氨基酸,从而产生突出部。在一些实施方案中,用于形成突出部的置换残基为天然存在的氨基酸残基并且包括例如精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)。在一些实例中,鉴定用于置换的初始残基为具有小侧链的氨基酸残基,例如像丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0324] 在一些实施方案中,被修饰以含有空腔(孔)的第二多肽为包括将天然或初始氨基酸用具有至少一条侧链的氨基酸置换的多肽,所述至少一条侧链从第二多肽的界面凹陷并且因此能够容纳来自第一多肽的界面的对应突出部。最经常,置换氨基酸为具有比初始氨基酸残基小的侧链体积的氨基酸。本领域技术人员知道如何确定和/或评定氨基酸残基的特性以鉴定理想置换残基以用于形成空腔。一般而言,用于形成空腔的置换残基为天然存在的氨基酸,并且包括例如丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。在一些实例中,鉴定用于置换的初始氨基酸为具有大侧链的氨基酸,例如像酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0325] 人IgG1的CH3界面例如涉及位于四条反平行 $\beta$ 链上的每个结构域上的十六个残基,其从每个表面隐藏了1090  $\text{\AA}$ 2(参见例如Deisenhofer等人(1981) *Biochemistry*, 20: 2361-2370; Miller等人, (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-973; Ridgway等人, (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621; 美国专利号5,731,168; 国际专利申请W098/50431和W0 2005/063816; 以及 Ridgway等人, (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621。在一些实例中,产生突出部或空腔的CH3结构域的修饰描述于例如美国专利号5,731,168; 国际专利申请W098/50431和W0 2005/063816; 以及 Ridgway等人, (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621。在一些实例中,产生突出部或空腔的CH3结构域的修饰通常靶向位于两个中心反平行 $\beta$ 链上的残基。目标为使所产生的突出部可能通过突出到周围溶剂中来容纳而非通过配偶体CH3结构域中的互补空腔来容纳的风险最小化。

[0326] 在一些实施方案中,异源二聚体分子在“球状突起链”的CH3结构域中含有T366W突变并且在“孔链”的CH3结构域中含有T366S、L368A、Y407V突变。在一些情况下,还可以使用CH3结构域之间的额外链间二硫桥(Merchant, A.M.等人, *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681),例如通过将Y349C突变引入到“球状突起”或“孔”链的CH3结构域中并将E356C突变或S354C突变引入到另一条链的CH3结构域中。在一些实施方案中,异源二聚体分子在两个CH3结构域之一中含有S354C、T366W突变并且在两个CH3结构域中的另一个结构域中含有Y349C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,异源二聚体分子在两个CH3结构域之一中包含E356C、T366W突变并且在两个CH3结构域中的另一个结构域中包含Y349C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,异源二聚体分子在两个CH3结构域之一中包含Y349C、T366W突变并且在两个CH3结构域中的另一个结构域中包含E356C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,异源二聚体分子在两个CH3结构域之一中包含Y349C、T366W突变并且在两个CH3结构域中的另一个结构域中包含S354C、T366S、L368A、Y407V突变。其他球入孔技术的实例为本领域中已知的,例如,通过EP 1 870 459 A1所述。

[0327] 在一些实施方案中,异源二聚体分子的Fc区另外可以含有一个或多个其他Fc突变,诸如任何上文所述。在一些实施方案中,异源二聚体分子含有具有减小效应功能的突变的Fc区。

[0328] 在一些实施方案中,含有CH3突出部(球状突起)或空腔(孔)修饰的Fc变体可以接合至堆叠的免疫调节多肽的任何位置,但是通常经由其N端或C端接合至第一和/或第二堆叠免疫调节多肽的N端或C端,诸如以形成融合多肽。所述连接可以是直接或经由接头间接进行。通常,球状突起和孔分子通过共表达连接至含有一个或多个CH3突出部修饰的Fc变体的第一堆叠免疫调节多肽与连接至含有一个或多个CH3空腔修饰的Fc变体的第二堆叠的免疫调节多肽来生成。

[0329] 本文提供一种由含有变体PD-L1多肽的IgSF结构域(例如,IgV结构域)和变体CD155多肽的第二IgSF结构域(例如,IgV)的堆叠免疫调节Fc融合多肽产生的同源二聚体多结构域堆叠分子。在一些实施方案中,多结构域堆叠分子的第一免疫调节Fc融合多肽和第二免疫调节Fc融合多肽具有SEQ ID NO:1716、1717、1718、1719、1720或1721中任一者中所列出的序列,或与SEQ ID NO:1716、1717、1718、1719、1720或1721中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性并含有变体PD-L1和/或CD155 IgSF结构域中的一个多个氨基酸修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,所得多结构域堆叠分子结合至TIGIT和PD-1二者。在一些方面,和与未修饰或野生型PD-L1或CD155的对应IgSF结构域的TIGIT的结合相比,与TIGIT的结合的程度为相同或类似的,或者在一些情况下有所增加。在一些方面,和与未修饰或野生型PD-L1的对应IgSF结构域的PD-1的结合相比,与PD-1的结合的程度为相同或类似的,或者在一些情况下有所增加。在一些实施方案中,与TIGIT或PD-1的结合为非堆叠形式的变体PD-L1 IgSF-Fc与TIGIT或PD-1的结合的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,与TIGIT的结合为与非堆叠形式的变体CD155 IgSF-Fc的TIGIT的结合的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,与非堆叠变体PD-L1 IgSF-Fc和/或变体CD155-IgSF-Fc相比,所得多结构域堆叠分子增加了T细胞免疫反应,诸如在报告基因测定中确定的。在一些实施方案中,增加为大于1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍或更多倍。

[0330] 本文提供一种由含有变体PD-L1多肽的IgSF结构域(例如,IgV结构域)、变体CD155多肽的第二IgSF结构域(例如,IgV)和变体CD112多肽的第三IgSF结构域(例如,IgV)的堆叠免疫调节Fc融合多肽产生的同源二聚体多结构域堆叠分子。在一些实施方案中,多结构域堆叠分子的第一免疫调节Fc融合多肽和第二免疫调节Fc融合多肽具有SEQ ID NO:1722、1723和1724中任一者中所列出的序列或与SEQ ID NO:1722、1723和1724中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性并含有变体CD112、CD155和/或PD-L1 IgSF结构域中的一个多个氨基酸修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,所得多结构域堆叠分子结合至TIGIT、CD112R和PD-1二者。在一些方面,和与未修饰或野生型CD112或CD155的对应IgSF结构域的TIGIT的结合相比,与TIGIT的结合的程度为相同或类似的,或者在一些情况下有所增加。在一些方面,和与未修饰或野生型CD112的对应IgSF结构域的CD112R的结合相比,与CD112R的结合的程度为相同或类似的,或者在一些情况下有所增加。在一些方面,和与未修饰或野生型PD-L1的对应IgSF结构域的PD-1的结合相比,与PD-1的结合的程度为相同或类似的,或者在一些情况下有所增加。在一些实施方案中,与TIGIT或CD112R的结合为与非堆叠形式的变体CD112 IgSF-Fc的TIGIT或CD112R的结合的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在

一些实施方案中,与TIGIT的结合为与非堆叠形式的变体CD155 IgSF-Fc的TIGIT的结合的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,与PD-1的结合为与非堆叠形式的变体PD-1 IgSF-Fc的PD-1的结合的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大。在一些实施方案中,与非堆叠变体CD112 IgSF-Fc、变体CD155-IgSF-Fc和/或变体PD-L1-IgSF-Fc相比,所得多结构域堆叠分子增加了T细胞免疫反应,诸如在报告基因测定中确定的。在一些实施方案中,增加为大于1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍或更多倍。

[0331] C. 变体多肽和免疫调节蛋白的缀合物和融合物

[0332] 在一些实施方案中,本文所提供的变体多肽为包含IgSF家族的Ig结构域的变体(vIgD)的免疫调节蛋白,所述变体多肽可以与一个部分(诸如效应部分,诸如另一种蛋白)直接或间接缀合或融合,以形成缀合物(“IgSF缀合物”)。在一些实施方案中,附接可以是共价或非共价,例如经由生物素-链霉抗生物素蛋白非共价相互作用。在一些实施方案中,所述部分可以是靶向部分、小分子药物(小于500道尔顿摩尔质量的非多肽药物)、毒素、细胞生长抑制剂、细胞毒性剂、免疫抑制剂、适用于诊断目的的放射活性剂、用于治疗目的的放射活性金属离子、前药活化酶、增加生物半衰期的药剂或诊断剂或可检测剂。

[0333] 在一些实施方案中,效应部分为细胞毒性、细胞抑制或另外提供一些治疗益处的治疗剂,诸如癌症治疗剂。在一些实施方案中,效应部分为靶向部分或靶向剂,诸如靶向细胞表面抗原(例如肿瘤细胞表面上的抗原)的药剂。在一些实施方案中,效应部分为标签,其可以直接或间接生成可检测信号。在一些实施方案中,效应部分为毒素。在一些实施方案中,效应部分为蛋白质、肽、核酸、小分子或纳米粒子。

[0334] 在一些实施方案中,1、2、3、4、5或更多个效应部分(可以是相同或不同的)被缀合、连接或融合至变体多肽或蛋白质以形成IgSF缀合物。在一些实施方案中,此类效应部分可以使用本领域已知和下文描述的分子生物学或化学缀合和连接方法来附接至变体多肽或免疫调节蛋白。在一些实施方案中,接头诸如肽接头、可裂解接头、不可裂解接头或有助于缀合反应的接头可以用于将效应部分连接或缀合至变体多肽或免疫调节蛋白。

[0335] 在一些实施方案中,IgSF缀合物包含以下组分:(蛋白质或多肽)、(L)<sub>q</sub>和(效应部分)<sub>m</sub>,其中所述蛋白质或多肽为能够结合所述一个或多个同源相对结构配体的所述变体多肽或免疫调节蛋白中的任一者;L为将蛋白质或多肽连接至所述部分的接头;m为至少1;q为0或更大;并且所得IgSF缀合物结合至一个或多个相对结构配体。在具体实施方案中,m是1至4并且q是0至8。

[0336] 在一些实施方案中,提供一种包含与结合细胞表面分子的靶向剂缀合的本文所提供的变体多肽或免疫调节蛋白的IgSF缀合物,例如以用于将所述变体多肽或免疫调节蛋白靶向递送至特定细胞。在一些实施方案中,靶向剂为一种或多种具有定位并结合至存在于受试者的正常细胞/组织和/或肿瘤细胞/肿瘤上的分子的能力的分子。换言之,包含靶向剂的IgSF缀合物可以结合至存在于细胞(诸如肿瘤细胞)上的配体(直接或间接)。涵盖用于使用的本发明的靶向剂包括可以结合靶细胞或分子的组分的抗体、多肽、肽、适配体、其他配体或它们的任何组合。

[0337] 在一些实施方案中,在向受试者施用之后,靶向剂结合肿瘤细胞或者可以结合在肿瘤细胞附近(例如,肿瘤血管或肿瘤微环境)。靶向剂可以结合至癌细胞表面上的受体或

配体。在本发明的另一方面中,选择对非癌细胞或组织具有特异性的靶向剂。例如,靶向剂可以对正常存在于特定细胞或组织上的分子具有特异性。此外,在一些实施方案中,相同分子可以存在于正常细胞和癌细胞上。各种细胞组分和分子为已知的。例如,如果靶向剂对EGFR有特异性,则所得IgSF缀合物可以靶向表达EGFR的癌细胞以及表达EGFR的正常皮肤上皮细胞。因此,在一些实施方案中,本发明的IgSF缀合物可以通过两种单独的机制(靶向癌细胞和非癌细胞)起作用。

[0338] 在本文所公开的本发明的各个方面中,本发明的IgSF缀合物包含靶向剂,其可以结合/靶向细胞组分,诸如肿瘤抗原、细菌抗原、病毒抗原、支原体抗原、真菌抗原、朊病毒抗原、来自寄生生物的抗原。在一些方面,细胞组分、抗原或分子可以各自用于意指靶向剂的所需靶。例如,在各种实施方案中,靶向剂对一种组分具有特异性或结合至所述组分,其包括但不限于表皮生长因子受体(EGFR、ErbB-1、HER1)、ErbB-2(HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFR配体家族;胰岛素样生长因子受体(IGFR)家族、IGF结合蛋白(IGFBP)、IGFR配体家族;血小板源性生长因子受体(PDGFR)家族、PDGFR配体家族;成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族、FGFR配体家族、血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族、VEGF家族;HGF受体家族;TRK受体家族;肝配蛋白(EPH)受体家族;AXL受体家族;白细胞酪氨酸激酶(LTK)受体家族;TIE受体家族、血管生成素1,2;受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR)受体家族,例如ROR1;CD171(L1CAM);B7-H6(NCR3LG1);PD-L1、肿瘤糖基化抗原,例如sTn或Tn,诸如MUC1的sTn Ag;LHR(LHCGR);磷脂酰丝氨酸、网柄菌凝素结构域受体(DDR)家族;RET受体家族;KLG受体家族;RYK受体家族;MuSK受体家族;转化生长因子- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )受体、TGF- $\beta$ ;细胞因子受体,I类(红细胞生成素家族)和II类(干扰素/IL-10家族)受体、肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族(TNFRSF)、死亡受体家族;癌症-睾丸(CT)抗原、谱系特异性抗原、分化抗原、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、ARTC1、裂点簇区-阿贝尔森(Abelson)(Bcr-ab1)融合产物、B-RAF、半胱天冬酶-5(CASP-5)、半胱天冬酶-8(CASP-8)、 $\beta$ -连环蛋白(CTNNB1)、细胞分裂周期27(CDC27)、周期素依赖性激酶4(CDK4)、CDKN2A、COA-I、dek-can融合蛋白、EFTUD-2、延长因子2(ELF2)、Ets变体基因6/急性髓性白血病1基因ETS(ETC6-AML1)融合蛋白、纤连蛋白(FN),例如纤连蛋白的A结构域(EDA)、GPNMB、低密度脂质受体/GDP-L海藻糖: $\beta$ -D-半乳糖2- $\alpha$ -L-岩藻糖基转移酶(LDLR/FUT)融合蛋白、HLA-A2.在HLA-A2基因的 $\alpha$ 2结构域的 $\alpha$ 螺旋的残基170处的精氨酸至异亮氨酸转换(HLA-A\*201-R170I)、HLA-A1-1、突变的热休克蛋白70-2(HSP70-2M)、K1AA0205、MART2、突变的黑素瘤泛素1、2、3(MUM-1、2、3)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、neo-PAP、I类肌浆球蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RAR $\alpha$ 融合蛋白、PRDX5、PTPRK、K-ras(KRAS2)、N-ras(NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、磷酸丙糖异构酶、BAGE、BAGK-1、BAGE-2,3,4,5、GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8、GnT-V(异常N-乙酰基葡萄糖胺基转移酶V、MGAT5)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-I、LAGE、LAGE-I、黑素瘤上的CTL-识别的抗原(CAMEL)、MAGE-A1(MAGE-I)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A1-1、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、mucin 1(MUC1)、MART-1/Melan-A(MLANA)、gp100、gp100/Pme117(SILV)、酪氨酸酶(TYR)、TRP-I、HAGE、NA-88、NY-ESO-I、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1,2,3,4、TRP2-INT2、癌胚抗原(CEA)、激肽释放酶4、乳腺珠蛋白-A、OA1、前列腺特异性抗原(PSA)、TRP-1/gp75、TRP-2、脂肪分化相关蛋白、黑素瘤中不存在的干扰素诱导性蛋白质2(AIM-2)、

BING-4、CPSF、周期素D1、上皮细胞粘附分子(Ep-CAM)、EphA3、纤维母细胞生长因子-5(FGF-5)、糖蛋白250(gp250)、EGFR(ERBB1)、HER-2/neu(ERBB2)、干扰素13受体α2链(IL13Ra2)、IL-6受体、肠道羧基酯酶(iCE)、甲胎蛋白(AFP)、M-CSF、mdm-2、MUC1、p53(TP53)、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-I、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、存活素(BIRC5)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、端粒酶、Wilms肿瘤基因(WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIP1、CTAGE-I、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF15q14、HCA661、LDHC、MORC、SGY-I、SP011、TPX1、NY-SAR-35、FTHL17、NXF2、TDRD1、TEX15、FATE、TPTE、免疫球蛋白个体基因型、尿本周蛋白、雌激素受体(ER)、雄激素受体(AR)、CD40、CD30、CD20、CD 19、CD33、癌症抗原72-4(CA 72-4)、癌症抗原15-3(CA 15-3)、癌症抗原27-29(CA 27-29)、癌症抗原125(CA 125)、癌症抗原19-9(CA 19-9)、β-人绒毛膜促性腺激素、β-2微球蛋白、鳞状细胞癌抗原、神经特异性烯醇、热休克蛋白gp96、GM2、沙格司亭、CTLA-4、707丙氨酸脯氨酸(707-AP)、由T细胞识别的腺癌抗原4(ART-4)、癌胚抗原肽-1(CAP-I)、钙活化氯通道-2(CLCA2)、亲环蛋白B(Cyp-B)、人印戒瘤-2(HST-2)、人乳头状瘤病毒(HPV)蛋白(HPV-E6、HPV-E7、主要或微小壳抗原、其他)、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)蛋白(EBV潜在膜蛋白-LMP1、LMP2；其他)、乙型肝炎或丙型肝炎蛋白以及HIV蛋白。

**[0339]** 在一些实施方案中，IgSF缀合物通过其靶向剂将结合肿瘤细胞、肿瘤血管或肿瘤微环境的细胞组分，从而经由调节免疫反应(例如，通过活化共刺激分子或抑制免疫细胞活化的负性调节分子)、抑制存活信号(例如，生长因子或细胞因子或激素受体拮抗剂)、活化死亡信号和/或免疫介导的细胞毒性(诸如通过抗体依赖性细胞毒性)来促进靶向细胞的杀灭。此类IgSF缀合物可以通过若干种机制起作用，以预防、减少或消除肿瘤细胞，诸如以便于将缀合的效应部分递送至肿瘤靶，诸如通过IgSF缀合物的受体介导的内吞；或者此类缀合物可以募集、结合和/或活化免疫细胞(例如，NK细胞、单核细胞/巨噬细胞、树突细胞、T细胞、B细胞)。此外，在一些情况下，前述途径中的一种或多种可以在施用一种或多种本发明的IgSF缀合物后起作用。

**[0340]** 在一些实施方案中，IgSF缀合物通过其靶向剂将定位至(诸如结合至)肿瘤细胞、肿瘤血管或肿瘤微环境的细胞组分，从而调节肿瘤附近的免疫反应细胞。在一些实施方案中，靶向剂有利于将缀合的IgSF(例如，vIgD)递送至肿瘤靶，诸如以便与其同源结合配偶体相互作用以改变携带同源结合配偶体的免疫细胞(例如，NK细胞、单核细胞/巨噬细胞、树突细胞、T细胞、B细胞)的信号传导。在一些实施方案中，定位的递送介导了PD-1抑制性受体的拮抗或阻断活性。在一些实施方案中，定位的递送激动了PD-1抑制性受体，其在一些情况下可以出现，其中存在活化受体的近侧成簇。

**[0341]** 在一些实施方案中，靶向剂是免疫球蛋白。如本文所用，术语“免疫球蛋白”包括天然或人工单价或多价抗体，包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、通过Fab表达库产生的片段、单链Fv(scFv)；抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗Id抗体至本发明的抗体)以及以上任一者的表位结合片段。如本文所用，术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，例如含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。本发明的免疫球蛋白分子可以具有任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类别的免疫球蛋白分子。

[0342] 在一些实施方案中, IgSF缀合物通过其抗体靶向部分将结合肿瘤细胞、肿瘤血管或肿瘤微环境的细胞组分,从而经由调节免疫反应(例如,通过活化共刺激分子或抑制免疫细胞活化的负性调节分子)、抑制存活信号(例如,生长因子或细胞因子或激素受体拮抗剂)、活化死亡信号和/或免疫介导的细胞毒性(诸如通过抗体依赖性细胞毒性)来促进靶向细胞的细胞凋亡。此类IgSF缀合物可以通过若干种机制起作用,以预防、减少或消除肿瘤细胞,诸如以便于将缀合的效应部分递送至肿瘤靶,诸如通过IgSF缀合物的受体介导的内吞;或者此类缀合物可以募集、结合和/或活化免疫细胞(例如,NK细胞、单核细胞/巨噬细胞、树突细胞、T细胞、B细胞)。

[0343] 在一些实施方案中, IgSF缀合物通过其抗体靶向部分将结合肿瘤细胞、肿瘤血管或肿瘤微环境的细胞组分,从而调节免疫反应(例如,通过活化共刺激分子或抑制免疫细胞活化的负性调节分子)。在一些实施方案中,此类缀合物可以识别、结合和/或调节(例如,抑制或活化)免疫细胞(例如,NK细胞、单核细胞/巨噬细胞、树突细胞、T细胞、B细胞)。

[0344] 本发明的抗体靶向部分包括抗体片段,包括但不限于Fab、Fab'和F(ab')2、Fd、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)和包含VL或VH结构域的片段。包括单链抗体的抗原结合抗体片段可以包括单独或与以下中的全部或一部分组合的一个或多个可变区:铰链区、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域。本发明还包括一个或多个可变区与铰链区、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域的任何组合的抗原结合片段。本发明还包括Fc片段、抗原-Fc融合蛋白和Fc靶向部分缀合物或融合产物(Fc肽、Fc适配体)。本发明的抗体靶向部分可以是来自任何动物来源,包括鸟和哺乳动物。在一个方面,抗体靶向部分为人、鼠(例如,小鼠和大鼠)、猴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡。另外,此类抗体可以是动物抗体的人源化版本。本发明的抗体靶向部分可以是单特异性、双特异性、三特异性或具有更大多特异性。

[0345] 在各种实施方案中,抗体/靶向部分经由Fc(在抗体中)与Fc受体(在免疫细胞上)之间的相互作用并经由本文所提供的缀合的变体多肽或免疫调节蛋白募集、结合和/或活化免疫细胞(例如,NK细胞、单核细胞/巨噬细胞、树突细胞)。在一些实施方案中,抗体/靶向部分经由本文所提供的缀合的变体多肽或免疫调节蛋白识别或结合肿瘤剂并定位至肿瘤细胞,以便于调节肿瘤附近的免疫细胞。

[0346] 可以并入到IgSF缀合物中的抗体的实例包括但不限于诸如以下的抗体:西妥昔单抗(IMC-C225; Erbitux®)、曲妥珠单抗(Herceptin®)、利妥昔单抗(Rituxan®; MabThera®)、贝伐珠单抗(Avastin®)、阿来组单抗(Campath®; Campath-1H®; Mabcampath®)、帕尼单抗(ABX-EGF; Vectibix®)、兰尼单抗(Lucentis®)、替伊莫单抗、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan) (Zevalin®)、托西莫单抗、碘I131托西莫单抗(BEXXAR®)、卡妥索单抗(Catumaxomab) (Removab®)、吉妥珠单抗、吉妥珠单抗(Gemtuzumab ozogamicine) (Mylotarg®)、阿巴西普(Abatacept) (CTLA4-Ig; Orencia®)、贝拉西普(Belatacept) (L104EA29YIg; LEA29Y; LEA)、易普利姆玛(Ipilimumab) (MDX-010; MDX-101)、曲美木单抗(Tremelimumab) (ticilimumab; CP-675,206)、PRS-010、PRS-050、阿柏西普(VEGF Trap; AVE005)、伏洛昔单抗(Volociximab) (M200)、F200、MORAb-009、SS1P (CAT-

5001)、西妥木单抗(Cixutumumab) (IMC-A12)、马妥珠单抗(Matuzumab) (EMD72000)、尼妥珠单抗(Nimotuzumab) (h-R3)、扎鲁木单抗(Zalutumumab) (HuMax-EGFR)、耐昔妥珠单抗(Necitumumab) IMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004、mAb-425、Panorex@ (17-1A) (鼠单克隆抗体)；Panorex@ (17-1A) (嵌合鼠单克隆抗体)；IDEc-Y2B8 (鼠抗CD20 MAb)；BEC2 (抗独特型MAb, 模拟GD表位) (具有BCG)；Oncolym (Lym-1单克隆抗体)；SMART MI95 Ab、人源化13'I LYM-I (Oncolym)、Ovarex (B43.13, 抗独特型小鼠MAb)；MDX-210 (人源化抗HER-2双特异性抗体)；结合至腺癌上的EGP40 (17-1A) 泛癌抗原的3622W94 Mab；抗VEGF、Zenapax (SMART抗Tac (IL-2受体)；SMART MI95 Ab、人源化Ab、人源化)；MDX-210 (人源化抗HER-2双特异性抗体)；MDX-447 (人源化抗EGF受体双特异性抗体)；NovoMAb-G2 (泛癌特异性Ab)；TNT (组蛋白抗原的嵌合MAb)；TNT (组蛋白抗原的嵌合MAb)；Gliomab-H (单克隆-人源化Ab)；GNI-250Mab；EMD-72000 (嵌合-EGF拮抗剂)；LymphoCide (人源化LL2抗体)；以及MDX-260双特异性靶GD-2、ANA Ab、SMART ID10 Ab、SMART ABL 364 Ab或ImmuroAIT-CEA。如上述列表所说明,常规地制备特定靶表位的抗体。

[0347] 在一些实施方案中,抗体靶向部分为含有Fc结构域的全长抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,变体多肽或免疫调节蛋白诸如通过缀合至抗体的Fc部分的N端来缀合至抗体靶向部分的Fc部分。

[0348] 在一些实施方案中,vIgD直接或间接连接至抗体的轻链和/或重链的N端或C端。在一些实施方案中,连接可以是经由肽接头,诸如上文所述的任何接头。可以构建各种构型。图7A至图7C描绘示例性构型。在一些实施方案中,抗体缀合物可以通过在细胞中共表达抗体的重链和轻链来产生。

[0349] 在本发明的一个方面,靶向剂为适配体分子。例如,在一些实施方案中,适配体包含用作靶向剂的核酸。在各种实施方案中,本发明的IgSF缀合物包含对肿瘤细胞、肿瘤血管和/或肿瘤微环境上的分子具有特异性的适配体。在一些实施方案中,适配体本身可以包含生物活性序列以及靶向模块(序列),其中生物活性序列可以诱导对靶细胞的免疫反应。换言之,这种适配体分子为双重用途药剂。在一些实施方案中,本发明的IgSF缀合物包含适配体与抗体的缀合,其中所述适配体和抗体特异性结合至肿瘤细胞、肿瘤血管、肿瘤微环境和/或免疫细胞上的单独分子。

[0350] 术语“适配体”包括基于与特定分子的特异性结合特性选择的DNA、RNA或肽。例如,一种或多种适配体可以被选择用于结合肿瘤细胞、肿瘤血管、肿瘤微环境和/或免疫细胞中的特定基因或基因产物,如本文所公开,其中选择通过本领域已知并且本领域技术人员熟悉的方法来进行。

[0351] 在本发明的一些方面,靶向剂为肽。例如,本文所提供的变体多肽或免疫调节蛋白可以缀合至肽,所述肽可以与癌症或肿瘤细胞的组分结合。因此,本发明的此类IgSF缀合物包含结合至肿瘤细胞、肿瘤血管的细胞组分和/或肿瘤微环境的组分的肽靶向剂。在一些实施方案中,靶向剂肽可以是整联蛋白的拮抗剂或激动剂。整联蛋白包含 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基,包括技术人员熟知的许多种类型。

[0352] 在一个实施方案中,靶向剂为Vv $\beta$ 3。整联蛋白Vv $\beta$ 3在多种细胞上表达并且已显示介导若干种生物相关过程,包括将破骨细胞粘附至骨基质、迁移血管平滑肌细胞以及血管生成。整联蛋白的合适靶向分子包括其他整联蛋白诸如V4. $\beta$ i (VLA-4)、V4-P7 (参见例如美

国专利号6,365,619;Chang等人,Bioorganic&Medicinal Chem Lett,12:159-163(2002);Lin等人,Bioorganic&Medicinal Chem Lett,12:133-136(2002)的RGD肽或肽模拟物以及非RGD肽或肽模拟物(参见例如美国专利号5,767,071和5,780,426)等。

[0353] 在一些实施方案中,提供一种IgSF缀合物,其包含与治疗剂缀合的本文所提供的变体多肽或免疫调节蛋白。在一些实施方案中,治疗剂包括例如道诺霉素、阿霉素、甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等人,Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187,1986)。在一些实施方案中,治疗剂具有细胞内活性。在一些实施方案中,IgSF缀合物被内化并且治疗剂是阻断细胞的蛋白质合成,在其中导致细胞死亡的细胞毒素。在一些实施方案中,治疗剂为包含具有核糖体灭活活性的多肽的细胞毒素,包括例如白树毒素、三角梅核糖体失活蛋白(bouganin)、皂草素、蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、异株泻根毒蛋白(bryodin)、白喉毒素、局限曲菌素(restrictocin)、假单胞菌外毒素A以及它们的变体。在一些实施方案中,在治疗剂为包含具有核糖体灭活活性的多肽的细胞毒素时,IgSF缀合物必须在结合至靶细胞时内化,以便使所述蛋白质对所述细胞具有细胞毒性。

[0354] 在一些实施方案中,提供一种IgSF缀合物,其包含与毒素缀合的本文所提供的变体多肽或免疫调节蛋白。在一些实施方案中,毒素包括例如细菌毒素诸如白喉毒素,植物毒素诸如蓖麻毒素,小分子毒素诸如格尔德霉素(Mandler等人,J.Nat.Cancer Inst. 92(19):1573-1581(2000);Mandler等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 10:1025-1028(2000);Mandler等人,Bioconjugate Chem. 13:786-791(2002))、美登木素生物碱(EP 1391213;Liu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623(1996))和加利车霉素(calicheamicin)(Lode等人,Cancer Res. 58:2928(1998);Hinman等人,Cancer Res. 53:3336-3342(1993))。毒素可以通过包括微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制在内的机制发挥其细胞毒性和细胞抑制作用。

[0355] 在一些实施方案中,提供一种IgSF缀合物,其包含与可以间接或直接地生成可检测信号的标签缀合的本文所提供的变体多肽或免疫调节蛋白。这些IgSF缀合物可以用于研究或诊断应用,诸如用于体内检测癌症。标签优选地能够直接或间接产生可检测信号。例如,标签可以是不透射线的或放射性同位素,诸如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I;荧光(荧光团)或化学发光(发色团)化合物,诸如荧光素异硫氰酸酯、若丹明或荧光素;酶,诸如碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶;成像剂;或金属离子。在一些实施方案中,标签为用于闪烁摄影研究的放射性原子,例如<sup>99</sup>Tc或<sup>123</sup>I;或用于核磁共振(NMR)成像(还称为磁共振成像,MRI)的自旋标签,诸如镥-89、碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。镥-89可与各种金属螯合剂络合并且缀合抗体例如以用于PET成像(WO 2011/056983)。在一些实施方案中,IgSF缀合物为间接可检测的。例如,对IgSF缀合物具有特异性并含有可检测标签的第二抗体可以用于检测IgSF缀合物。

[0356] IgSF缀合物可以使用本领域已知的任何方法来制备。还参见WO 2009/067800、WO 2011/133886以及美国专利申请公布号2014322129,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0357] IgSF缀合物的变体多肽或免疫调节蛋白可以通过任何方式“附接至”效应部分,通过所述方式变体多肽或免疫调节蛋白可以与效应部分缔合或连接。例如,IgSF缀合物的变体多肽或免疫调节蛋白可以通过化学或重组方式附接至效应部分。用于制备融合物或缀合物的化学方式为本领域中已知的并且可以用于制备IgSF缀合物。用于将变体多肽或免疫调

节蛋白和效应部分缀合的方法必须能够将变体多肽或免疫调节蛋白与效应部分接合而不会干扰变体多肽或免疫调节蛋白结合至其一种或多个相对结构配体的能力。

[0358] IgSF缀合物的变体多肽或免疫调节蛋白可以间接连接至效应部分。例如, IgSF缀合物的变体多肽或免疫调节蛋白可以直接连接至含有若干种类型之一的效应部分的脂质体。一种或多种效应部分和/或变体多肽或免疫调节蛋白也可以结合至固体表面。

[0359] 在一些实施方案中, IgSF缀合物的变体多肽或免疫调节蛋白与效应部分二者均为蛋白质并且可以使用本领域熟知的技术缀合。存在数百种可以将两种蛋白质缀合的交联剂。(参见例如“Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking,” 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor)。交联剂通常基于变体多肽或免疫调节蛋白和/或效应部分上可用或插入在其上的反应性官能团来选择。此外, 如果不存在反应性基团, 则可以使用光活化交联剂。在某些情况下, 可能希望在变体多肽或免疫调节蛋白与效应部分之间包括间隔物。本领域已知的交联剂包括同源双功能剂: 戊二醛、二甲基己二酰亚胺酯和双(二氮杂联苯胺); 以及异源双功能剂: 间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺和磺基-间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺。

[0360] 在一些实施方案中, IgSF缀合物的变体多肽或免疫调节蛋白可以使用用于化学附接效应部分的特定残基工程改造。用于化学附接本领域已知的分子的特定残基包括赖氨酸和半胱氨酸。交联剂基于变体多肽或免疫调节蛋白上插入或效应部分上可用的反应性官能团来选择。

[0361] IgSF缀合物也可以使用重组DNA技术来制备。在这种情况下, 编码变体多肽或免疫调节蛋白的DNA序列融合至编码效应部分的DNA序列, 从而产生嵌合DNA分子。将嵌合DNA序列转染到表达融合蛋白的宿主细胞中。融合蛋白可以从细胞培养物回收并使用本领域已知的技术纯化。

[0362] 将为标签的效应部分附接至变体多肽或免疫调节蛋白的实例包括以下中描述的方法: Hunter等人, *Nature* 144:945 (1962); David等人, *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain等人, *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982); Wensel和Meares, *Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y. (1983); 以及Colcher等人, “Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice”, *Meth. Enzymol.*, 121:802-16 (1986)。

[0363] 可以用已知的方式将放射性标签或其他标签并入缀合物中。例如, 肽可以是生物合成的或可以通过化学氨基酸合成使用合适的氨基酸前体来合成, 所述氨基酸前体包含, 例如代替氢的氟-19。诸如99Tc或123I、186Re、188Re和111In的标签可以经由肽中的半胱氨酸残基来附接。钇-90可以经由赖氨酸残基附接。IODOGEN方法(Fraker等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 (1978))可以用于并入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy” (Chatal, CRC Press 1989) 详细描述了其他方法。

[0364] 可以使用多种双功能蛋白质偶联剂来生成变体多肽或免疫调节蛋白和细胞毒性剂的缀合物, 诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP), 琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC), 亚氨基硫烷(IT), 亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠

氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述的那样制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-p-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合至抗体的示例性螯合剂。参见例如W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可裂解接头”。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari等人,Cancer Research 52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0365] 本发明的IgSF缀合物明确涵盖但不限于用以下交联剂试剂制备的药物缀合物: BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代EMCS、硫代GMBS、硫代KMUS、硫代MBS、硫代SIAB、硫代SMCC和硫代SMPB以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯砜)苯甲酸酯),其为可商购获得的(例如,获自Pierce Biotechnology公司,Rockford, IL, U.S.A)。参见第467-498页,2003-2004申请手册和目录。

[0366] D. 跨膜和可分泌免疫调节蛋白和工程改造的细胞

[0367] 本文提供表达免疫调节变体PD-L1多肽的工程改造的细胞(可替代地,“工程改造的细胞”)。在一些实施方案中,表达的免疫调节变体PD-L1多肽为跨膜蛋白并且在表面上表达。在一些实施方案中,表达并从细胞分泌表达的免疫调节变体PD-L1多肽。

[0368] 1. 跨膜免疫调节蛋白

[0369] 在一些实施方案中,包含变体PD-L1的免疫调节多肽可以是膜结合蛋白。如下文更详细描述,免疫调节多肽可以是包含变体PD-L1的跨膜免疫调节多肽,在所述变体PD-L1中含有:含有至少一个亲和力修饰的IgSF结构域(IgV或IgC)的胞外域、跨膜结构域以及任选地细胞质结构域。在一些实施方案中,免疫调节蛋白可以在免疫细胞(诸如哺乳动物细胞)的表面上,包括在淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)或抗原递呈细胞的表面上表达。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白在哺乳动物T细胞,包括诸如以下的T细胞的表面上表达:T辅助细胞、细胞毒性T细胞(可替代地,细胞毒性T淋巴细胞或CTL)、天然杀伤T细胞、调节T细胞、记忆T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是抗原递呈细胞(APC)。通常但非唯一地,胞外域(可替代地,“细胞外结构域”)包含本发明的变体PD-L1的一个或多个氨基酸变化(例如,氨基酸取代)。因此,例如,在一些实施方案中,跨膜蛋白将包含胞外域,所述胞外域包含本发明的变体PD-L1的一个或多个氨基酸取代。

[0370] 在一些实施方案中,工程改造的细胞表达变体PD-L1多肽,所述多肽为跨膜免疫调节多肽(TIP),其可以是膜蛋白诸如跨膜蛋白。在典型实施方案中,膜蛋白的胞外域包含本文所提供的变体PD-L1的细胞外结构域或其IgSF结构域,其中在所述至少一个IgSF结构域中含有一个或多个氨基酸取代。本文所提供的跨膜免疫调节蛋白还含有连接至胞外域的跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域产生在细胞上进行细胞表面表达的编码的蛋白质。在一些实施方案中,跨膜结构域直接连接至胞外域。在一些实施方案中,跨膜结构域经由一个或多个接头或间隔物间接连接至胞外域。在一些实施方案中,跨膜结构域主要含有疏水性氨基酸残基,诸如亮氨酸和缬氨酸。

[0371] 在一些实施方案中,全长跨膜锚结构域可以用于确保TIP将在工程改造的细胞,诸如工程改造的T细胞的表面上表达。方便地,这可以来自特定天然蛋白,其被亲和力修饰(例

如,PD-L1或其他天然IgSF蛋白)并且以与天然IgSF蛋白(例如,PD-L1)类似的方式简单融合至第一膜近端结构域的序列。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白包含对应野生型或未修饰IgSF成员的跨膜结构域,诸如SEQ ID NO:3中所列出的氨基酸序列所含有的跨膜结构域(表2)。在一些实施方案中,膜结合形式包含对应野生型或未修饰多肽的跨膜结构域,诸如对应于SEQ ID NO:3的残基239-259。

[0372] 在一些实施方案中,跨膜结构域为不是天然PD-L1的跨膜结构域的非天然跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于来自另一种非PD-L1家族成员多肽的跨膜结构域,其为膜结合或为跨膜蛋白。在一些实施方案中,可以使用来自T细胞上的另一种蛋白质的跨膜锚结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD8。在一些实施方案中,跨膜结构域可以还含有CD8的用作间隔物结构域的细胞外部分。示例性CD8来源的跨膜结构域列出在SEQ ID NO:242或1164或其含有CD8跨膜结构域的部分中。在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的跨膜结构域。

[0373] 在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白还含有连接至跨膜结构域的胞内域,诸如细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞质信号传导结构域诱导细胞信号传导。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白的胞内域包含对应野生型或未修饰多肽的细胞质结构域,诸如SEQ ID NO:3中所列出的氨基酸序列所含有的细胞质结构域(参见表2)。

[0374] 在一些实施方案中,为或包含变体PD-L1的所提供的跨膜免疫调节蛋白包含与SEQ ID NO:191具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且含有包含至少一个如所述的亲和力修饰的PD-L1 IgSF结构域和跨膜结构域的胞外域。在一些实施方案中,免疫调节蛋白在所述IgSF结构域(例如,IgV结构域)中含有任何一个或多个氨基酸取代,包括表1中所列出的任何取代。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白可以还包含所述细胞质结构域。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白可以还含有信号肽。在一些实施方案中,信号肽为野生型IgSF成员的天然信号肽,诸如SEQ ID NO:3中所列出的氨基酸序列所含有的信号肽(参见例如表2)。

[0375] 还提供一种编码此类跨膜免疫调节蛋白的核酸分子。在一些实施方案中,编码跨膜免疫调节蛋白的核酸分子包含编码与SEQ ID NO:191具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的核苷酸序列,并且含有包含至少一个如所述的亲和力修饰的IgSF结构域、跨膜结构域和任选地细胞质结构域的胞外域。在一些实施方案中,核酸分子可以还包含编码信号肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,信号肽为对应野生型IgSF成员的天然信号肽(参见例如表2)。

[0376] 在一些实施方案中,提供CAR相关的跨膜免疫调节蛋白,其中跨膜免疫调节蛋白的胞内域包含细胞质信号传导结构域,其包含至少一个含ITAM(免疫受体酪氨酸活化基序)的信号传导结构域。ITAM为参与免疫细胞的信号转导的许多蛋白质信号传导结构域中存在的保守性基序,包括在参与T细胞受体信号转导的CD3- $\zeta$ 链(“CD3- $\zeta$ ”)中存在的。在一些实施方案中,胞内域包含CD3- $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3- $\zeta$ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:243中所列出的氨基酸序列或表现出SEQ ID NO:243的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%并保留T细胞信号传

导活性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR相关的跨膜免疫调节蛋白的胞内域可以还包含共刺激信号传导结构域以进一步调节T细胞的免疫调节反应。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域为CD28、ICOS、41BB或OX40。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域来源于CD28或4-1BB,并且包含SEQ ID NO:1165-1168中任一者中所列出的氨基酸序列或表现出SEQ ID NO:1165-1168的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%并保留T细胞共刺激信号传导活性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所提供的CAR相关的跨膜免疫调节蛋白具有CAR的在使亲和力修饰的IgSF结构域结合至同源结合配偶体或相对结构后刺激T细胞信号传导的特征。在一些实施方案中,在亲和力修饰的IgSF结构域与其相对结构特异性结合后,可以引起T细胞活性的免疫学活性的变化,如通过细胞毒性、增殖或细胞因子产生的变化所反映。

[0377] 在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白不含有能够介导细胞质信号传导的胞内域。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白缺乏野生型或未修饰多肽的信号转导机制并且因此本身不会诱导细胞信号传导。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白缺乏对应野生型或未修饰多肽的细胞内(细胞质)结构域或细胞内结构域的一部分,诸如SEQ ID NO:3中所列出的氨基酸序列所含有的细胞质信号传导结构域(参见表2)。在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白不含有ITIM(免疫受体酪氨酸活化基序),诸如某些抑制性受体中所含有的,包括IgSF家族的抑制性受体(例如,PD-1或TIGIT)。因此,在一些实施方案中,跨膜免疫调节蛋白仅含有胞外域和跨膜结构域,诸如所述任何此类结构域。

[0378] 2. 分泌的免疫调节蛋白和工程改造的细胞

[0379] 在一些实施方案中,含有如本文所述的氨基酸突变中的任一个或多个的PD-L1变体免疫调节多肽为可分泌的,诸如当由细胞表达时。这种变体PD-L1免疫调节蛋白不包含跨膜结构域。在一些实施方案中,变体PD-L1免疫调节蛋白未缀合至半衰期延长部分(诸如Fc结构域或多聚化结构域)。在一些实施方案中,变体PD-L1免疫调节蛋白包含信号肽,诸如抗体信号肽或其他有效信号序列,以获得细胞外部的结构域。当免疫调节蛋白包含信号肽并由工程改造的细胞表达时,信号肽使得免疫调节蛋白被工程改造的细胞分泌。通常,信号肽或信号肽的一部分在分泌时从免疫调节蛋白裂解。免疫调节蛋白可以由核酸(其可以是表达载体的一部分)编码。在一些实施方案中,免疫调节蛋白由细胞(诸如免疫细胞,例如原代免疫细胞)表达并分泌。

[0380] 因此,在一些实施方案中,提供还包含信号肽的变体PD-L1免疫调节蛋白。在一些实施方案中,本文提供编码变体PD-L1免疫调节蛋白的核酸分子,其可操作地连接至编码信号肽的分泌序列。

[0381] 信号肽为在免疫调节蛋白的N端上的发送从细胞分泌免疫调节蛋白的信号的序列。在一些实施方案中,信号肽的长度为约5至约40个氨基酸(诸如长度为约5至约7、约7至约10、约10至约15、约15至约20、约20至约25、或约25至约30、约30至约35、或约35至约40个氨基酸)。

[0382] 在一些实施方案中,信号肽为来自对应野生型PD-L1的天然信号肽(参见表2)。在一些实施方案中,信号肽为非天然信号肽。例如,在一些实施方案中,非天然信号肽为来自对应野生型PD-L1的突变体天然信号肽,并且可以包含一个或多个(诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个)取代、插入或缺失。在一些实施方案中,非天然信号肽为来自与野生型

IgSF家族成员相同的IgSF家族的家族成员的信号肽或其突变体。在一些实施方案中,非天然信号肽为来自与野生型IgSF家族成员不同的IgSF家族的IgSF家族成员的信号肽或其突变体。在一些实施方案中,信号肽为来自非IgSF蛋白家族的信号肽或其突变体,诸如来自免疫球蛋白的信号肽(诸如IgG重链或IgG-κ轻链)、细胞因子(诸如干扰素-2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白(例如,HSA或白蛋白)、人天青杀素前蛋白信号序列、荧光素酶、胰蛋白酶原(例如,胰凝乳蛋白酶原或胰蛋白酶原)或能够从细胞有效分泌蛋白质的其他信号肽。示例性信号肽包括表9中所述的任何信号肽。

表 9. 示例性信号肽		
SEQ ID NO	信号肽	肽序列
[0383]	SEQ ID NO: 221	HSA 信号肽
	SEQ ID NO: 222	Igκ 轻链
	SEQ ID NO: 223	人天青杀素前蛋白信号序列
	SEQ ID NO: 224	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 225	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 226	IgG 重链信号肽
[0384]	SEQ ID NO: 227	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 228	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 229	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 230	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 231	IgG 重链信号肽
	SEQ ID NO: 232	IgGκ 轻链信号序列:
	SEQ ID NO: 233	IgGκ 轻链信号序列:
	SEQ ID NO: 234	高斯荧光素酶(Gaussia luciferase)
	SEQ ID NO: 235	人白蛋白
	SEQ ID NO: 236	人胰凝乳蛋白酶原
	SEQ ID NO: 237	人白介素-2
	SEQ ID NO: 238	人胰蛋白酶原-2

[0385] 在可分泌变体PD-L1免疫调节蛋白的一些实施方案中,免疫调节蛋白当表达时包含信号肽,并且在分泌时信号肽(或其一部分)从免疫调节蛋白裂解。

[0386] 在一些实施方案中,工程改造的细胞表达变体PD-L1多肽,其从细胞中分泌。在一些实施方案中,这种变体PD-L1多肽由在用于分泌的信号序列的可操作控制下编码免疫调节蛋白的核酸分子编码。在一些实施方案中,编码的免疫调节蛋白在由细胞表达后分泌。在一些实施方案中,由核酸分子编码的免疫调节蛋白不包含跨膜结构域。在一些实施方案中,由核酸分子编码的免疫调节蛋白不包含半衰期延长部分(诸如Fc结构域或多聚化结构域)。在一些实施方案中,由核酸分子编码的免疫调节蛋白包含信号肽。在一些实施方案中,本发明的核酸还包含编码分泌或信号肽的核苷酸序列,其可操作地连接至编码免疫调节蛋白的

核酸,从而允许分泌免疫调节蛋白。

[0387] 3. 细胞和工程改造的细胞

[0388] 本文提供表达所提供的免疫调节多肽中的任一种的工程改造的细胞。在一些实施方案中,工程改造的细胞在其表面上表达所提供的跨膜免疫调节多肽中的任一种。在一些实施方案中,工程改造的细胞表达免疫调节蛋白并能够或能够分泌在适用于分泌所述蛋白的条件下从所述细胞分泌免疫调节蛋白。在一些实施方案中,免疫调节蛋白在淋巴细胞诸如肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、T细胞或NK细胞上或者在骨髓细胞上表达。在一些实施方案中,工程改造的细胞是抗原递呈细胞(APC)。在一些实施方案中,工程改造的细胞是工程改造的哺乳动物T细胞或工程改造的哺乳动物抗原递呈细胞(APC)。在一些实施方案中,工程改造的T细胞或APC为人细胞或鼠细胞。

[0389] 在一些实施方案中,工程改造的T细胞包括但不限于T辅助细胞、细胞毒性T细胞(可替代地,细胞毒性T淋巴细胞或CTL)、天然杀伤T细胞、调节T细胞、记忆T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,工程改造的T细胞是CD4+或CD8+。

[0390] 在一些实施方案中,工程改造的APC包括例如表达MHC II的APC,诸如巨噬细胞、B细胞和树突细胞,以及人工APC(aAPC),包括细胞和非细胞(例如,生物可降解聚合物微粒)aAPC。人工APC(aAPC)为合成版本的APC,其可以类似于APC的方式起作用,因为它们将抗原递呈至T细胞以及活化它们。通过MHC(I类或II类)进行抗原递呈。在一些实施方案中,在工程改造的APC诸如aAPC中,装载到MHC上的抗原在一些实施方案中为肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原。装载到MHC上的抗原由T细胞的T细胞受体(TCR)识别,所述T细胞在一些情况下可以表达PD-1或CD80或由本文所提供的变体PD-L1多肽识别的其他分子。可以用于使aAPC工程改造的材料包括:聚(乙醇酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)、氧化铁、脂质体、脂质双层、琼脂糖和聚苯乙烯。

[0391] 在一些实施方案中,细胞aAPC可以被工程改造以含有TIP和TCR激动剂,其用于过继性细胞疗法中。在一些实施方案中,细胞aAPC可以被工程改造以含有TIP和TCR激动剂,其用于诸如在施用之前离体扩增人T细胞,例如用于重新引入到患者中。在一些方面,aAPC可以包括表达至少一种抗CD3抗体克隆,例如像OKT3和/或UCHT1。在一些方面,aAPC可以被灭活(例如,照射)。在一些实施方案中,TIP可以包含表现出对T细胞上的同源结合配偶体的结合亲和力的任何变体IgSF结构域。

[0392] 在一些实施方案中,本文所提供的免疫调节蛋白诸如跨膜免疫调节蛋白或可分泌免疫调节蛋白被共表达或被工程改造到表达抗原结合受体,诸如重组受体,诸如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞中。在一些实施方案中,工程改造的细胞诸如工程改造的T细胞识别与癌症、炎性病症和自身免疫病症或病毒感染相关联的所需抗原。在具体实施方案中,抗原结合受体含有特异性结合肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原的抗原结合部分。在一些实施方案中,工程改造的T细胞为CAR(嵌合抗原受体)T细胞,其含有特异性结合至抗原诸如肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原的抗原结合结构域(例如,scFv)。在一些实施方案中,TIP蛋白在工程改造的T细胞受体细胞或和工程改造的嵌合抗原受体细胞中表达。在此类实施方案中,工程改造的细胞共表达TIP和CAR或TCR。在一些实施方案中,SIP蛋白在工程改造的T细胞受体细胞或工程改造的嵌合抗原受体细胞中表达。在此类实施方案中,工程改造的细胞共表达SIP和CAR或TCR。

[0393] 嵌合抗原受体 (CAR) 为包含抗原结合结构域 (胞外域)、跨膜结构域和细胞内信号传导区域 (胞内域) 的重组受体, 所述细胞内信号传导区域能够在抗原结合之后诱导或介导对T细胞的活化信号。在一些实例中, 表达CAR的细胞被工程改造以表达对连接至细胞内信号传导部分的特定肿瘤抗原具有特异性的细胞外单链可变片段 (scFv), 所述细胞内信号传导部分包含活化结构域并且在一些情况下包含共刺激结构域。共刺激结构域可以来源于例如CD28、OX-40、4-1BB/CD137、诱导性T细胞共刺激剂 (ICOS)。活化结构域可以来源于例如CD3, 诸如CD3 $\zeta$ 、 $\epsilon$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 等。在某些实施方案中, CAR被设计为具有两个、三个、四个或更多个共刺激结构域。CAR scFv可以被设计为靶向细胞上表达的与疾病或病状相关联的抗原, 例如肿瘤抗原, 例如像CD19, 所述抗原为B细胞谱系中的细胞表达的跨膜蛋白, 所述细胞包括所有正常B细胞和B细胞恶性肿瘤, 包括但不限于NHL、CLL和非T细胞ALL。示例性CAR+ T细胞疗法和构建体描述于美国专利公布号2013/0287748、2014/0227237、2014/0099309和2014/0050708, 并且这些参考文献以引用的方式整体并入。

[0394] 在一些方面, 抗原结合结构域为抗体或其抗原结合片段, 诸如单链片段 (scFv)。在一些实施方案中, 抗原在肿瘤或癌细胞上表达。抗原的实例是CD19。CAR的实例为抗CD19 CAR, 诸如含有SEQ ID NO:1163或SEQ ID NO:1174中所列出的抗CD19 scFv的CAR。在一些实施方案中, CAR还含有间隔物、跨膜结构域和包含ITAM信号传导结构域 (诸如CD3 $\zeta$ 信号传导结构域) 的细胞内信号传导结构域或区域。在一些实施方案中, CAR还包含共刺激信号传导结构域。

[0395] 在一些实施方案中, 间隔物和跨膜结构域为来源于CD8的铰链和跨膜结构域, 诸如具有SEQ ID NO:242、1164、2014中所列出的示例性序列或与SEQ ID NO:242、1164或2014具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 胞内域包含CD3- $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中, CD3- $\zeta$ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:243中所列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:243具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性并保留T细胞信号传导活性的氨基酸序列。在一些实施方案中, CAR的胞内域可以还包含共刺激信号传导区以进一步调节T细胞的免疫调节反应。在一些实施方案中, 共刺激信号传导结构域是或包含CD28、ICOS、41BB或OX40的共刺激区域, 或者来源于其共刺激区域。在一些实施方案中, 共刺激信号传导结构域来源于CD28或4-1BB, 并且包含SEQ ID NO:1165-1168中任一者中所列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1165-1168具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性并保留T细胞共刺激信号传导活性的氨基酸序列。

[0396] 在一些实施方案中, 编码CAR的构建体还编码可由自我裂解的肽序列与CAR分开的第二蛋白, 诸如标记物, 例如可检测蛋白。在一些实施方案中, 自我裂解肽序列为F2A、T2A、E2A或P2A自我裂解肽。T2A自我裂解肽的示例性序列在SEQ ID NO:1167、1177或2021中的任一者中或与SEQ ID NO:1167、1177或2021中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性的氨基酸序列中列出。在一些实施方案中, T2A由SEQ ID NO:1176中所列出的核苷酸序列或与SEQ ID NO:1176中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性的序列编码。P2A自我裂解肽的示例性序列在SEQ ID NO:2026中或与SEQ ID NO:2026具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性的氨基酸序列中列出。在一些情况下,核酸构建体编码超过一种P2A自我裂解肽(诸如P2A1和P2A2),其中核苷酸序列P2A1和P2A2各自编码SEQ ID NO:2026中列出的P2A,核苷酸序列可以是不同的以避免序列之间的重组。

[0397] 在一些实施方案中,标记物为可检测蛋白,诸如荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白(GFP)或蓝色荧光蛋白(BFP)。荧光蛋白标记物的示例性序列在SEQ ID NO:1170、2020、2027-2029中或与SEQ ID NO:1170或2020具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性的氨基酸序列中列出。

[0398] 在一些实施方案中,CAR具有SEQ ID NO:1160、1171、1172、1173、2015、2016、2018或2019中任一者中所列出的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1160、1171、1172、1173、2015、2016、2018或2019中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR由SEQ ID NO:1175或2017中所列出的核苷酸序列或与SEQ ID NO:1175或2017中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大序列同一性的氨基酸序列编码。

[0399] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞具有TCR,包括重组或工程改造的TCR。在一些实施方案中,TCR可以是天然TCR。本领域技术人员将认识到,通常,天然哺乳动物T细胞受体包含参与抗原特异性识别和结合的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链(或 $\gamma$ 或 $\delta$ 链)。在一些实施方案中,TCR为修饰的工程改造的TCR。在一些实施方案中,工程改造的T细胞的TCR特异性结合至由APC递呈的肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

[0400] 在一些实施方案中,免疫调节多肽诸如跨膜免疫调节多肽或可分泌免疫调节多肽可以通过多种策略诸如对于重组宿主细胞所采用的策略来并入到工程改造的细胞,诸如工程改造的T细胞或工程改造的APC中。将DNA构建体引入到原代T细胞中的许多方法为本领域中已知的。在一些实施方案中,采用病毒转导或质粒电穿孔。在典型实施方案中,编码免疫调节蛋白的核酸分子或表达载体包含将表达的跨膜免疫调节蛋白定位至细胞膜或用于分泌的信号肽。在一些实施方案中,编码本发明的跨膜免疫调节蛋白的核酸被克隆到允许在宿主哺乳动物细胞中表达的病毒载体诸如逆转录病毒载体中。表达载体可以引入到哺乳动物宿主细胞中,并且在宿主细胞培养条件下,免疫调节蛋白在表面上表达或被分泌。

[0401] 在一个示例性实例中,原代T细胞可以离体纯化(CD4细胞或CD8细胞或二者)并用由各种TCR/CD28激动剂(诸如抗CD3/抗CD28涂覆的珠粒)组成的活化方案刺激。在2天或3天活化过程之后,含有免疫调节多肽的重组表达载体可以通过本领域标准慢病毒或逆转录病毒转导方案或质粒电穿孔策略来稳定地引入到原代T细胞中。可以例如通过流式细胞术使用与天然亲本分子和包含变体PD-L1的多肽交叉反应的抗表位标记或抗体来监测细胞的免疫调节多肽的表达。可以通过使用抗表位标记抗体进行分选来富集表达免疫调节多肽的T细胞或者根据应用富集高表达或低表达的T细胞。

[0402] 在免疫调节多肽表达时,可以通过各种方式评定工程改造的T细胞的适当功能。工

程改造的CAR或TCR共表达可以被验证以显示,工程改造的T细胞的此部分未受到免疫调节蛋白的表达的显著影响。一旦得到验证,就可以使用标准体外细胞毒性、增殖或细胞因子测定(例如,IFN- $\gamma$ 表达)来评定工程改造的T细胞的功能。示例性标准端点为肿瘤品系的裂解百分比、工程改造的T细胞的增殖或培养物上清液中的IFN- $\gamma$ 蛋白表达。可以选择工程改造的构建体,相对于对照构建体,其引起肿瘤品系的裂解统计学显著增加、工程改造的T细胞的增殖增加或IFN- $\gamma$ 表达增加。另外,未工程改造的(诸如天然)原代或内源性T细胞也可以并入到相同体外测定中,以测量工程改造的细胞(诸如工程改造的T细胞)上表达的免疫调节多肽构建体调节活性(在一些情况下包括活化并生成旁观天然T细胞中的效应功能)的能力。可以监测内源性T细胞上的活化标记物诸如CD69、CD44或CD62L的表达增加,并且增殖和/或细胞因子产生增加可以指示工程改造的T细胞上表达的免疫调节蛋白的所需活性。

[0403] 在一些实施方案中,可以使用类似测定来比较含有单独CAR或TCR的工程改造的T细胞与含有CAR或TCR和TIP构建体的T细胞的功能。通常,通过将不同比率的含有同源CAR或TCR抗原的工程改造的T细胞和“肿瘤”细胞系一起接种在培养物中来进行这些体外测定。标准端点为肿瘤品系的裂解百分比、工程改造的T细胞的增殖或培养物上清液中的IFN- $\gamma$ 产生。可以选择工程改造的免疫调节蛋白,相对于相同的单独TCR或CAR构建体,其引起肿瘤品系的裂解统计学显著增加、工程改造的T细胞的增殖增加或IFN- $\gamma$ 产生增加。可以在缺乏小鼠T细胞、NK细胞和B细胞的免疫受损小鼠(如NSG品系)中分析工程改造的人T细胞。工程改造的人T细胞可以在体内以与异种移植物相比不同的细胞数目和比率过继性转移,在所述工程改造的人T细胞中CAR或TCR结合异种移植物上的靶相对结构并与TIP亲和力修饰的IgSF结构域共表达。例如,可以通过生物发光或离体通过流式细胞术来监测含有荧光素酶/GFP载体的CD19<sup>+</sup>白血病肿瘤品系的移植。在一个普通实施方案中,异种移植物被引入到鼠模型中,随后在若干天之后引入工程改造的T细胞。可以相对于含有单独CAR或TCR的工程改造的T细胞评定含有免疫调节蛋白的工程改造的T细胞的存活增加、肿瘤清除率或工程改造的T细胞数目扩增。与在体外测定中一样,天然(即,未工程改造)人T细胞可以过继性转移以查看在该群体中的成功表位扩散,从而得到更好的存活或肿瘤清除率。

[0404] E. 表达变体多肽和免疫调节蛋白的感染剂

[0405] 还提供含有编码变体多肽中的任一种的核酸的感染剂,所述变体多肽诸如PD-L1 vIgD多肽,包括本文所述的可分泌或跨膜免疫调节蛋白。在一些实施方案中,此类感染剂可以将编码本文所述的变体免疫调节多肽诸如PD-L1 vIgD多肽的核酸递送至受试者的靶细胞,例如受试者的免疫细胞和/或抗原递呈细胞(APC)或肿瘤细胞中。还提供此类感染剂中所含有的核酸和/或用于生成或修饰此类感染剂诸如载体和/或质粒的核酸,以及含有此类感染剂的组合物。

[0406] 在一些实施方案中,感染剂是微生物(microorganism/microbe)。在一些实施方案中,感染剂是病毒或细菌。在一些实施方案中,感染剂是病毒。在一些实施方案中,感染剂是细菌。在一些实施方案中,此类感染剂可以递送编码变体多肽中的任一种的核酸序列,所述变体多肽诸如PD-L1 vIgD多肽,包括本文所述的可分泌或跨膜免疫调节蛋白。因此,在一些实施方案中,可以使得由感染剂感染或接触的受试者的细胞在细胞表面上表达或分泌变体免疫调节多肽。在一些实施方案中,感染剂也可以将一种或多种其他治疗剂或编码其他治疗剂的核酸递送至受试者内的细胞和/或环境。在一些实施方案中,可以由感染剂递送的其

他治疗剂包括细胞因子或其他免疫调节分子。

[0407] 在一些实施方案中,感染剂(例如,病毒或细菌)含有编码本文所述的变体多肽中的任一种的核酸序列,所述变体多肽诸如PD-L1 vIgD多肽,包括可分泌或跨膜免疫调节蛋白,并且凭借接触和/或感染受试者的细胞,所述细胞表达由感染剂中所含有的核酸序列编码的变体多肽,诸如PD-L1 vIgD多肽,包括可分泌或跨膜免疫调节蛋白。在一些实施方案中,可以向受试者施用感染剂。在一些实施方案中,可以使感染剂与来自受试者的细胞离体接触。

[0408] 在一些实施方案中,由感染剂感染的细胞表达的变体多肽为跨膜蛋白并在表面上表达,所述变体多肽诸如PD-L1 vIgD多肽,包括跨膜免疫调节蛋白。在一些实施方案中,由感染剂感染的细胞表达的变体多肽被表达并从细胞分泌,所述变体多肽诸如PD-L1 vIgD多肽,包括可分泌免疫调节蛋白。跨膜免疫调节蛋白或分泌的免疫调节蛋白可以为本文所述的任何蛋白。

[0409] 在一些实施方案中,受试者中由感染剂靶向的细胞包括肿瘤细胞、免疫细胞和/或抗原递呈细胞(APC)。在一些实施方案中,感染剂靶向肿瘤微环境(TME)中的细胞。在一些实施方案中,感染剂将编码变体多肽的核酸递送至适当细胞(例如APC,诸如在其细胞表面上显示肽/MHC复合物的细胞,诸如树突细胞)或组织(例如,淋巴细胞),所述变体多肽诸如PD-L1 vIgD多肽,包括可分泌或跨膜免疫调节蛋白,这将诱导和/或增强所需作用,例如免疫调节和/或特异性细胞介导的免疫反应,例如CD4和/或CD8 T细胞反应,所述CD8 T细胞反应可以包括细胞毒性T细胞(CTL)反应。在一些实施方案中,感染剂靶向APC,诸如树突细胞(DC)。在一些实施方案中,由本文所述的感染剂递送的核酸分子包括在特定靶细胞中表达编码变体免疫调节多肽的可操作连接的编码序列所必需的适当核酸序列(例如,调节元件,诸如启动子)。

[0410] 在一些实施方案中,含有编码免疫调节多肽的核酸序列的感染剂也可以含有编码一种或多种额外基因产物(例如,细胞因子、前药转化酶、细胞毒素和/或可检测基因产物)的核酸序列。例如,在一些实施方案中,感染剂为溶瘤病毒并且所述病毒可以包含编码额外治疗性基因产物的核酸序列(参见例如Kirn等人, (2009) Nat Rev Cancer 9:64-71; Garcia-Aragoncillo等人, (2010) Curr Opin Mol Ther 12:403-411;参见美国专利号7,588,767、7,588,771、7,662,398和7,754,221以及美国专利公布号2007/0202572、2007/0212727、2010/0062016、2009/0098529、2009/0053244、2009/0155287、2009/0117034、2010/0233078、2009/0162288、2010/0196325、2009/0136917和2011/0064650。在一些实施方案中,额外基因产物可以是可以导致靶细胞(例如,肿瘤细胞)死亡的治疗性基因产物或者可以增强或强化或调节免疫反应的基因产物(例如,细胞因子)。示例性基因产物还包括抗癌剂、抗转移剂、抗血管生成剂、免疫调节分子、免疫检查点抑制剂、抗体、细胞因子、生长因子、抗原、细胞毒性基因产物、促细胞凋亡基因产物、抗细胞凋亡基因产物、细胞基质降解基因、用于组织再生或将人体细胞重新程序化成多能性的基因以及本文所述或本领域技术人员已知的其他基因。在一些实施方案中,额外基因产物为粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0411] 1. 病毒

[0412] 在一些实施方案中,感染剂是病毒。在一些实施方案中,感染剂是溶瘤病毒或靶向特定细胞(例如,免疫细胞)的病毒。在一些实施方案中,感染剂靶向受试者中的肿瘤细胞

和/或癌细胞。在一些实施方案中,感染剂靶向免疫细胞或抗原递呈细胞(APC)。

[0413] 在一些实施方案中,感染剂是溶瘤病毒。溶瘤病毒为在肿瘤细胞内积累并在肿瘤细胞内复制的病毒。凭借在细胞中复制并任选递送编码本文所述的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽的核酸,裂解肿瘤细胞,并且肿瘤缩小并且可以被消除。溶瘤病毒也可以具有广泛的宿主和细胞类型范围。例如,溶瘤病毒可以在免疫豁免细胞或免疫豁免组织(包括肿瘤和/或转移癌,并且还包括受伤组织和细胞)中积累,因此允许在广泛范围的细胞类型中递送并表达编码本文所述的变体免疫调节多肽的核酸。溶瘤病毒也可以肿瘤细胞特异性方式复制,从而导致肿瘤细胞裂解和有效肿瘤消退。

[0414] 示例性溶瘤病毒包括腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、单纯疱疹病毒、水疱性口腔病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒、细小病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、柯萨奇病毒和牛痘病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒可以特异性定殖于实体肿瘤中,而不感染其他器官,并且可以用作感染剂以将编码本文所述的变体免疫调节多肽的核酸递送至此类实体肿瘤。

[0415] 用于递送编码本文所述的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽的核酸的溶瘤病毒可以是本领域技术人员已知的那些中的任一种并且包括例如水疱性口炎病毒,参见例如美国专利号7,731,974、7,153,510、6,653,103和美国专利公布号2010/0178684、2010/0172877、2010/0113567、2007/0098743、20050260601、20050220818和欧洲专利号1385466、1606411和1520175;单纯疱疹病毒,参见例如美国专利号7,897,146、7,731,952、7,550,296、7,537,924、6,723,316、6,428,968和美国专利公布号2014/0154216、2011/0177032、2011/0158948、2010/0092515、2009/0274728、2009/0285860、2009/0215147、2009/0010889、2007/0110720、2006/0039894、2004/0009604、2004/0063094、国际专利公布号W0 2007/052029、W0 1999/038955;逆转录病毒,参见例如美国专利号6,689,871、6,635,472、5,851,529、5,716,826、5,716,613和美国专利公布号20110212530;牛痘病毒,参见例如2016/0339066;以及腺相关病毒,参见例如美国专利号8,007,780、7,968,340、7,943,374、7,906,111、7,927,585、7,811,814、7,662,627、7,241,447、7,238,526、7,172,893、7,033,826、7,001,765、6,897,045和6,632,670。

[0416] 溶瘤病毒还包括已被遗传改变以减轻其毒力、以改进其安全性特性、增强其肿瘤特异性的病毒,并且它们已被装备有额外基因,例如细胞毒素、细胞因子、前药转化酶,以改进病毒的总体功效(参见例如Kirn等人, (2009) *Nat Rev Cancer* 9:64-71; Garcia-Aragoncillo等人, (2010) *Curr Opin Mol Ther* 12:403-411;参见美国专利号7,588,767、7,588,771、7,662,398和7,754,221以及美国专利公布号2007/0202572、2007/0212727、2010/0062016、2009/0098529、2009/0053244、2009/0155287、2009/0117034、2010/0233078、2009/0162288、2010/0196325、2009/0136917和2011/0064650)。在一些实施方案中,溶瘤病毒可以是已被修饰使得它们在癌细胞中选择性复制并因此具有溶瘤性的那些病毒。例如,溶瘤病毒为已被工程改造以对肿瘤疗法具有修改的向性并且也用作基因疗法载体的腺病毒。此类腺病毒的实例为ONYX-015、H101和Ad5 Δ CR (Hallden和Portella (2012) *Expert Opin Ther Targets*, 16:945-58) 以及TNFerade (McLoughlin等人 (2005) *Ann. Surg. Oncol.*, 12:825-30) 或者条件复制型腺病毒Oncorine®。

[0417] 在一些实施方案中,感染剂是修饰的单纯疱疹病毒。在一些实施方案中,感染剂为

修饰版本的Talimogene laherparepvec(也称为T-Vec、Imlygic或OncoVex GM-CSF),其被修饰以含有编码本文所述的变体免疫调节多肽中的任一种(诸如本文所述的变体PD-L1多肽)的核酸。在一些实施方案中,感染剂为WO 2007/052029、WO 1999/038955、US 2004/0063094、US 2014/0154216中所述的修饰的单纯疱疹病毒或其变体。

[0418] 在一些实施方案中,感染剂是靶向受试者的特定类型的细胞的病毒,向所述受试者施用所述病毒,例如靶向免疫细胞或抗原递呈细胞(APC)的病毒。树突细胞(DC)是用于起始和控制免疫反应的必要APC。DC可以俘获和加工抗原,从外周器官迁移到淋巴器官,并以主要组织相容性复合物(MHC)限制性方式将抗原递呈至静止T细胞。在一些实施方案中,感染剂是可以特异性靶向DC以递送编码变体PD-L1多肽或免疫调节多肽的核酸以在DC中表达的病毒。在一些实施方案中,病毒为慢病毒或其变体或衍生物,诸如整合缺陷型慢病毒载体。在一些实施方案中,病毒为被假型化以有效结合至表达细胞表面标记物树突细胞特异性细胞内粘附分子-3-抓获性非整联蛋白(DC-SIGN)的细胞诸如DC并且有效感染所述细胞的慢病毒。在一些实施方案中,病毒为用辛德毕斯病毒E2糖蛋白或其修饰形式假型化的慢病毒,诸如WO 2013/149167中所述的那些。在一些实施方案中,所述病毒允许将感兴趣的序列(例如,编码本文所述的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽中的任一种的核酸)递送至DC并表达。在一些实施方案中,病毒包括WO 2008/011636或US 2011/0064763;Tareen等人(2014)Mol.Ther.,22:575-587所述的那些或其变体。树突细胞向性载体平台的实例为ZVex<sup>TM</sup>。

[0419] 2. 细菌

[0420] 在一些实施方案中,感染剂是细菌。例如,在一些实施方案中,细菌可以将编码本文所述的变体免疫调节多肽中的任一种的核酸递送至受试者的靶细胞(诸如肿瘤细胞、免疫细胞、抗原递呈细胞和/或吞噬细胞)。在一些实施方案中,细菌可以优选靶向受试者内的特定环境,诸如肿瘤微环境(TME),以用于表达和/或分泌变体免疫调节多肽,和/或靶向环境中的特定靶细胞以表达变体免疫调节多肽。

[0421] 在一些实施方案中,细菌经由将质粒DNA细菌介导的转移至哺乳动物细胞(也称为“细菌感染(bactofection)”)来将核酸递送至细胞。例如,在一些实施方案中,通过使整个细菌进入靶细胞来实现遗传物质的递送。在一些实施方案中,自发的或诱导的细菌裂解可以导致质粒释放,以用于后续真核细胞表达。在一些实施方案中,细菌可以将核酸递送至非吞噬哺乳动物细胞(例如,肿瘤细胞)和/或吞噬细胞,例如某些免疫细胞和/或APC。在一些实施方案中,由细菌递送的核酸可以转移至受试者的细胞核以用于表达。在一些实施方案中,核酸还包括在特定宿主细胞中表达编码变体免疫调节多肽的可操作连接的序列所必需的适当核酸序列(例如,调节元件,诸如启动子或增强子)。在一些实施方案中,为细菌的感染剂可以递送呈RNA形式的编码免疫调节蛋白的核酸,诸如递送至靶细胞的细胞质以用于通过靶细胞的机构翻译的预置的能够翻译的RNA。

[0422] 在一些实施方案中,细菌可以复制并裂解靶细胞,例如肿瘤细胞。在一些实施方案中,细菌可以在靶细胞的细胞质中含有和/或释放核酸序列和/或基因产物,从而杀灭靶细胞,例如肿瘤细胞。在一些实施方案中,感染剂为可以在受试者的特定环境(例如,肿瘤微环境(TME))中特异性复制的细菌。例如,在一些实施方案中,细菌可以在厌氧或低氧微环境中特异性复制。在一些实施方案中,存在于特定环境中的条件或因子(例如,由TME中的细胞产

生的天冬氨酸、丝氨酸、柠檬酸、核糖或半乳糖)可以充当化学吸引剂以将细菌吸引至所述环境。在一些实施方案中,细菌可以在环境(例如,TME)中表达和/或分泌本文所述的免疫调节蛋白。

[0423] 在一些实施方案中,感染剂为细菌,其为李斯特氏菌属某种、双歧杆菌属某种、埃希氏菌属某种、梭菌属某种、沙门氏菌属某种、志贺氏菌属某种、弧菌属某种或耶尔森氏菌属某种。在一些实施方案中,细菌选自以下一种或多种:单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、猪霍乱沙门菌(*Salmonella choleraesuis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、诺氏梭菌(*Clostridium novyi*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)和青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)。在一些实施方案中,细菌为工程改造细菌。在一些实施方案中,细菌为工程改造细菌,诸如以下所述的那些:例如Seow和Wood (2009) *Molecular Therapy* 17 (5) :767-777; Baban等人 (2010) *Bioengineered Bugs* 1:6, 385-394; Patyar等人 (2010) *J Biomed Sci* 17:21; Tangney等人 (2010) *Bioengineered Bugs* 1:4, 284-287; van Pijkeren等人 (2010) *Hum Gene Ther.* 21 (4) : 405-416; WO 2012/149364; WO 2014/198002; US 9103831; US 9453227; US 2014/0186401; US 2004/0146488; US 2011/0293705; US 2015/0359909和EP 3020816。细菌可以被修饰以递送编码本文所提供的变体免疫调节多肽、缀合物和/或融合物中的任一种的核酸序列,和/或以在受试者中表达此类变体免疫调节多肽。

[0424] F. 核酸、载体和用于产生多肽或细胞的方法

[0425] 本文提供分离的或重组的核酸,其总体称为“核酸”,编码本文所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽的各种提供的实施方案中的任一种。在一些实施方案中,本文所提供的核酸(包括下文所述的所有核酸)均适用于重组产生(例如,表达)本文所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽。在一些实施方案中,本文所提供的核酸(包括下文所述的所有核酸)均适用于在细胞(诸如工程改造的细胞,例如免疫细胞,或感染剂细胞)中表达本文所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽。本文所提供的核酸可以是呈RNA的形式或呈DNA的形式,并且包括mRNA、cRNA、重组或合成RNA和DNA以及cDNA。本文所提供的核酸通常为DNA分子,并且通常为双链DNA分子。然而,还提供包含本发明的核苷酸序列中的任一种的单链DNA、单链RNA、双链RNA和杂合DNA/RNA核酸或它们的组合。

[0426] 本文还提供适用于产生本文所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽的重组表达载体和重组宿主细胞。

[0427] 本文还提供含有所提供的核酸或编码的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽中的任一种(诸如跨膜免疫调节多肽或可分泌免疫调节多肽中的任一种)的工程改造的细胞,诸如工程改造的免疫细胞。

[0428] 本文还提供含有所提供的核酸或编码的变体PD-L1多肽或免疫调节多肽中的任一种(诸如跨膜免疫调节多肽或可分泌免疫调节多肽中的任一种)的感染剂,诸如细菌或病毒细胞。

[0429] 在上文提供的实施方案中的任一个中,编码本文所提供的免疫调节多肽的核酸可

以使用重组DNA和克隆技术引入到细胞中。为了实现这一目的,制备编码免疫调节多肽的重组DNA分子。制备此类DNA分子的方法在本领域是熟知的。例如,编码所述肽的序列可以使用合适的限制性内切酶从DNA中切除。可替代地,所述DNA分子可以使用化学合成技术合成,诸如亚磷酰胺方法。也可以使用这些技术的组合。在一些情况下,重组或合成核酸可以通过聚合酶链反应(PCR)来生成。在一些实施方案中,可以生成DNA插入物,其编码含有至少一个亲和力修饰的IgSF结构域并且在一些实施方案中根据所提供的描述含有信号肽、跨膜结构域和/或胞内域的一种或多种变体PD-L1多肽。此DNA插入物可以克隆到适当转导/转染载体中,如本领域技术人员已知的。还提供含有核酸分子的表达载体。

[0430] 在一些实施方案中,表达载体能够在适于表达免疫调节蛋白的条件下在适当细胞中表达所述蛋白质。在一些方面,核酸分子或表达载体包含操作性地连接至适当表达控制序列的编码免疫调节蛋白的DNA分子。在将DNA分子插入所述载体之前或之后,实行该操作性连接的方法是熟知的。表达控制序列包括启动子、活化子、增强子、操纵子、核糖体结合位点、起始信号、停止信号、cap信号、多腺苷酸化信号和其他涉及转录或翻译控制的信号。

[0431] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白的表达通过启动子或增强子来控制以控制或调节表达。启动子可操作地连接至编码变体多肽或免疫调节蛋白的核酸分子的部分。在一些实施方案中,启动子为组成型活性启动子(诸如组织特异性组成型活性启动子或其他组成型启动子)。在一些实施方案中,启动子为诱导型启动子,其可以响应于诱导剂(诸如T细胞活化信号)。

[0432] 在一些实施方案中,组成型启动子操作性地连接至编码变体多肽或免疫调节蛋白的核酸分子。示例性组成型启动子包括猴空泡病毒40(Sv40)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、泛素C(UbC)启动子和EF-1 $\alpha$ (EF1a)启动子。在一些实施方案中,组成型启动子是组织特异性的。例如,在一些实施方案中,启动子允许在特定组织(诸如免疫细胞、淋巴细胞或T细胞)中组成型表达免疫调节蛋白。示例性组织特异性启动子描述于美国专利号5,998,205,包括例如胎蛋白、DF3、酪氨酸酶、CEA、表面活性剂蛋白和ErbB2启动子。

[0433] 在一些实施方案中,诱导型启动子操作性地连接至编码变体多肽或免疫调节蛋白的核酸分子,使得核酸的表达可通过控制适当转录诱导剂的存在或不存在来控制。例如,启动子可以是调节的启动子和转录因子表达系统,诸如公布的四环素调节的系统或其他可调节系统(参见例如公布的国际PCT申请号W0 01/30843),以允许调节所编码的多肽的表达。示例性可调节启动子系统为可获得自例如Clontech(Palo Alto, CA)的Tet-On(和Tet-Off)系统。此启动子系统允许调节由四环素或四环素衍生物诸如强力霉素控制的转基因的表达。其他可调节启动子系统为已知的(参见例如公布的美国申请号2002-0168714,题为“Regulation of Gene Expression Using Single-Chain, Monomeric, Ligand Dependent Polypeptide Switches”,其描述了含有配体结合结构域和转录调节结构域的基因开关,诸如来自激素受体的那些)。

[0434] 在一些实施方案中,启动子对响应于T细胞活化信号传导的元件有反应。仅作为实例,在一些实施方案中,工程改造的T细胞包含编码免疫调节蛋白的表达载体和操作性地连接至免疫调节蛋白的控制表达的启动子。工程改造的T细胞可以例如通过经由工程改造的T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)进行信号传导并因此通过响应性启动子触发免疫调节蛋白的表达和分泌来活化。

[0435] 在一些实施方案中,诱导型启动子操作性地连接至编码免疫调节蛋白的核酸分子,使得免疫调节蛋白响应于活化T细胞的核因子(NFAT)或活化B细胞的核因子κ轻链增强子(NF-κB)来表达。例如,在一些实施方案中,诱导型启动子包含NFAT或NF-κB的结合位点。例如,在一些实施方案中,启动子为NFAT或NF-κB启动子或其功能性变体。因此,在一些实施方案中,核酸使得可以控制免疫调节蛋白的表达,同时还减小或消除免疫调节蛋白的毒性。具体地,仅当细胞(例如,由细胞表达的T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))被抗原特异性刺激并且/或者细胞(例如,细胞的钙信号传导路径)被例如豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)/离子霉素非特异性刺激时,包含本发明的核酸的工程改造免疫细胞表达并分泌免疫调节蛋白。因此,免疫调节蛋白的表达以及在一些情况下的分泌可以被控制来仅在需要时并在需要的部位(例如,在感染性疾病引发剂的存在下、癌症时或在肿瘤部位处)发生,这可以减少或避免不希望的免疫调节蛋白相互作用。

[0436] 在一些实施方案中,编码本文所述的免疫调节蛋白的核酸包含编码NFAT启动子、NF-κB启动子或其功能性变体的合适核苷酸序列。如本文所用,“NFAT启动子”意指连接至最小启动子的一种或多种NFAT响应性元件。“NF-κB启动子”是指连接至最小启动子的一种或多种NF-κB响应性元件。在一些实施方案中,基因的最小启动子为最小人IL-2启动子或CMV启动子。NFAT响应性元件可以包括例如NFAT1、NFAT2、NFAT3和/或NFAT4响应性元件。NFAT启动子、NF-κB启动子或其功能性变体可以包含任何数目的结合基序,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或多至十二个结合基序。

[0437] 其上具有DNA分子的所得重组表达载体用来转化适当的宿主。此转化可以使用本领域熟知的方法进行。在一些实施方案中,本文所提供的核酸还包含编码分泌肽或信号肽的核苷酸序列,其可操作地连接至编码免疫调节多肽的核酸,使得所得可溶性免疫调节多肽从培养基、宿主细胞或宿主细胞周质中回收。在其他实施方案中,适当的表达控制信号被选择以允许免疫调节多肽的膜表达。此外,可商购获得的试剂盒以及合约制造公司也用来制备本文所提供的工程改造的细胞或重组宿主细胞。

[0438] 在一些实施方案中,其上具有DNA分子的所得表达载体用于转化(诸如转导)适当的细胞。引入可以使用本领域熟知的方法进行。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的方法,包括经由病毒(例如,逆转录病毒或慢病毒)、转导、转座子和电穿孔。在一些实施方案中,表达载体是病毒载体。在一些实施方案中,核酸通过慢病毒或逆转录病毒转导方法转移至细胞中。

[0439] 可以使用大量可公开获得和熟知的哺乳动物宿主细胞(包括哺乳动物T细胞或APC)中的任一种来制备多肽或工程改造的细胞。细胞的选择取决于本领域所认识到的大量因素。这些因素包括例如与所选表达载体的相容性、DNA分子所编码的肽的毒性、转化率、肽回收的容易程度、表达特征、生物安全性和成本。必须在了解并非所有细胞都可以同样有效地表达特定DNA序列的前提下,对这些因素权衡利弊。

[0440] 在一些实施方案中,宿主细胞可以是各种真核细胞,诸如在酵母细胞中,或使用哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或HEK293细胞。在一些实施方案中,宿主细胞为悬浮细胞并且多肽在培养的悬浮液中,诸如在培养的悬浮CHO细胞中,例如CHO-S细胞中工程改造或产生。在一些实例中,细胞系为缺乏DHFR(DHFR-) (诸如DG44和DUXB11)的CHO细胞

系。在一些实施方案中,细胞缺乏谷氨酸合酶(GS),例如CHO-S细胞、CHOK1 SV细胞和CHOZN ((R)) GS-/-细胞。在一些实施方案中,CHO细胞(诸如悬浮CHO细胞)可以是CHO-S-2H2细胞、CHO-S-克隆14细胞或ExpiCHO-S细胞。

[0441] 在一些实施方案中,宿主细胞也可以是原核细胞,诸如使用大肠杆菌。在多肽表达条件下培养转化的重组宿主并且然后纯化以获得可溶性蛋白。可以在常规发酵条件下培养重组宿主细胞,以便表达所需多肽。此类发酵条件在本领域中是熟知的。最后,本文所提供的多肽可以通过许多本领域熟知的方法中的任一种从重组细胞培养物回收和纯化,所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水性相互作用色谱法和亲和力色谱法。蛋白质再折叠步骤可以按需要用于完成成熟蛋白的构型。最后,高效液相色谱法(HPLC)可以用于最终纯化步骤。

[0442] 在一些实施方案中,细胞是免疫细胞,诸如上文结合制备工程改造的细胞所述的任何免疫细胞。在一些实施方案中,此类工程改造的细胞是原代细胞。在一些实施方案中,工程改造的细胞是受试者自体的。在一些实施方案中,工程改造的细胞是受试者同种异体的。在一些实施方案中,工程改造的细胞诸如通过白细胞除去法从受试者获得,并且离体转化以用于表达免疫调节多肽,例如跨膜免疫调节多肽或可分泌免疫调节多肽。

[0443] 还提供本文所述的感染剂中所含有的编码变体免疫调节多肽中的任一种的核酸。在一些实施方案中,感染剂将核酸递送至受试者的细胞,和/或允许在细胞中表达编码的变体多肽。还提供用于生成、产生或修饰此类感染剂的核酸。例如,在一些实施方案中,提供含有编码变体免疫调节多肽的核酸的载体和/或质粒,以用于生成感染剂、递送至受试者的细胞和/或在受试者的细胞中表达变体免疫调节多肽。

[0444] 在一些实施方案中,所提供的核酸为含有编码变体免疫调节多肽的核酸序列的重组病毒或细菌载体。在一些实施方案中,重组载体可以用于产生含有编码变体免疫调节多肽的核酸序列和/或待递送至受试者的靶细胞中以由靶细胞表达的感染剂。在一些实施方案中,重组载体是表达载体。在一些实施方案中,重组载体包括生成和/或产生感染剂并在靶细胞中表达所必需的适当序列。

[0445] 在一些实施方案中,重组载体是质粒或粘粒。含有编码如本文所述的变体免疫调节多肽的核酸序列的质粒或粘粒容易使用本领域熟知的标准技术构建。为了生成感染剂,载体或基因组可以质粒形式构建,然后可以转染到包装或生产者细胞系或宿主细菌中。重组载体可以使用本领域已知的重组技术中的任一种生成。在一些实施方案中,载体可以包括原核复制起点和/或其表达赋予可检测或可选择标记物的基因,诸如用于在原核系统中传播和/或选择的药物抗性。

[0446] 在一些实施方案中,重组载体是病毒载体。示例性重组病毒载体包括慢病毒载体基因组、痘病毒载体基因组、牛痘病毒载体基因组、腺病毒载体基因组、腺病毒相关病毒载体基因组、疱疹病毒载体基因组和甲病毒载体基因组。病毒载体可以是活的、减毒的、复制条件性或复制缺陷型、非病原性(缺陷性)、能够复制的病毒载体,和/或被修饰以表达异源基因产物,例如本文所提供的变体免疫调节多肽。用于生成病毒的载体可以被修饰以改变病毒的减毒,这包括增加或减少转录或翻译负荷的任何方法。

[0447] 可以使用的示例性病毒载体包括修饰的牛痘病毒载体(参见例如Guerra等人, J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia等人, AIDS Research and Human Retroviruses 8:

1445-47 (1992); Gheradi等人, J. Gen. Virol. 86: 2925-36 (2005); Mayr等人, Infection 3: 6-14 (1975); Hu等人, J. Virol. 75: 10300-308 (2001); 美国专利号 5,698,530、6,998,252、5,443,964、7,247,615 和 7,368,116; 腺病毒载体或腺病毒相关病毒载体 (参见例如 Molin 等人, J. Virol. 72: 8358-61 (1998); Narumi 等人, Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19: 936-41 (1998); Mercier 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 6188-93 (2004); 美国专利号 6,143,290; 6,596,535; 6,855,317; 6,936,257; 7,125,717; 7,378,087; 7,550,296); 逆转录病毒载体, 包括基于鼠白细胞病毒 (MuLV)、长臂猿白血病病毒 (GaLV)、亲嗜性逆转录病毒、猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 以及它们的组合的那些逆转录病毒载体 (参见例如 Buchscher 等人, J. Virol. 66: 2731-39 (1992); Johann 等人, J. Virol. 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt 等人, Virology 176: 58-59 (1990); Wilson 等人, J. Virol. 63: 2374-78 (1989); Miller 等人, J. Virol. 65: 2220-24 (1991); Miller 等人, Mol. Cell Biol. 10: 4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4: 43 1992; Cornetta 等人, Hum. Gene Ther. 2: 215 (1991)); 慢病毒载体, 包括基于人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)、HIV-2、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、马传染性贫血病毒、猿猴免疫缺陷病毒 (SIV) 和梅迪/维斯那病毒 (maedi/visna virus) 的那些慢病毒载体 (参见例如 Pfeifer 等人, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211 (2001); Zufferey 等人, J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi 等人, J. Virol. 72: 8150, 1998; Philpott 和 Thrasher, Human Gene Therapy 18: 483, 2007; Engelman 等人, J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale 等人, Mol. Therapy, 13: 1121, 2006; Brown 等人, J. Virol. 73: 9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams 等人, J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell 等人, J. Virol. 70: 5288, 1996) 或其任何变体、和/或可以用于生成上文所述的任何病毒的载体。在一些实施方案中, 重组载体可以包含可以调节病毒基因组 (诸如在 RNA 病毒的情况下) 在包装细胞系中的表达的调节序列, 诸如启动子或增强子序列 (参见例如美国专利号 5,385,839 和 5,168,062)。

**[0448]** 在一些实施方案中, 重组载体是表达载体, 例如在递送到靶细胞, 例如受试者的细胞, 例如肿瘤细胞、免疫细胞和/或 APC 中时允许编码的基因产物表达的表达载体。在一些实施方案中, 感染剂中所含有的重组表达载体能够在适于表达免疫调节蛋白的条件下在受试者的靶细胞中表达所述蛋白质。

**[0449]** 在一些方面, 核酸或表达载体包含操作性地连接至适当表达控制序列的编码免疫调节蛋白的核酸序列。在将编码免疫调节蛋白的核酸序列插入所述载体之前或之后实行该操作性连接的方法是熟知的。表达控制序列包括启动子、活化子、增强子、操纵子、核糖体结合位点、起始信号、停止信号、cap 信号、多腺苷酸化信号和其他涉及转录或翻译控制的信号。启动子可以可操作地连接至编码免疫调节蛋白的核酸序列的部分。在一些实施方案中, 启动子为靶细胞中的组成型活性启动子 (诸如组织特异性组成型活性启动子或其他组成型启动子)。例如, 重组表达载体也可以包括淋巴组织特异性转录调节元件 (TRE), 诸如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞或树突细胞特异性 TRE。淋巴组织特异性 TRE 为本领域已知的 (参见例如 Thompson 等人, Mol. Cell. Biol. 12: 1043-53 (1992); Todd 等人, J. Exp. Med. 177: 1663-74 (1993); Penix 等人, J. Exp. Med. 178: 1483-96 (1993))。在一些实施方案中, 启动子为诱导型启动子, 其可以响应于诱导剂 (诸如 T 细胞活化信号)。在一些实施方案中, 递送至受试者靶细胞 (例如, 肿瘤细胞、免疫细胞和/或 APC) 的核酸可以可操作地连接至上文所述的调节元

件中的任一种。

[0450] 在一些实施方案中,载体为细菌载体,例如细菌质粒或粘粒。在一些实施方案中,细菌载体经由将质粒DNA细菌介导转移至哺乳动物细胞(也称为“细菌感染”)来递送至靶细胞,例如肿瘤细胞、免疫细胞和/或APC。在一些实施方案中,所递送的细菌载体还含有用于在靶细胞中表达的适当表达控制序列,诸如启动子序列和/或增强子序列或上文所述的任何调节或控制序列。在一些实施方案中,细菌载体在感染剂(例如,细菌)中含有用于表达和/或分泌所编码的变体多肽的适当表达控制序列。

[0451] 在一些实施方案中,本文所提供的多肽也可以通过合成方法来制备。固相合成是制备单个肽的优选技术,因为其是制备小肽的最具成本效益的方法。例如,熟知的固相合成技术包括使用保护基团、接头和固相支持物以及特异性保护和脱保护反应条件、接头裂解条件、使用清除剂、以及固相肽合成的其他方面。然后肽可以组装成如本文所提供的多肽。

[0452] IV. 评定变体PD-L1多肽和免疫调节蛋白的活性免疫调节的方法

[0453] 在一些实施方案中,本文所提供的变体PD-L1多肽(例如,全长和/或特异性结合片段或缀合物、堆叠构建体或其融合物、工程改造的细胞或感染剂)表现出免疫调节活性以调节T细胞活化。在一些实施方案中,PD-L1多肽在T细胞测定中相对于野生型或未修饰PD-L1对照调节了IFN- $\gamma$ 表达。在一些情况下,IFN- $\gamma$ 表达的调节可以相对于对照增加或降低IFN- $\gamma$ 表达。确定特异性结合和IFN- $\gamma$ 表达的测定为本领域熟知的并且包括测量培养物上清液中的干扰素- $\gamma$ 细胞因子水平的MLR(混合淋巴细胞反应)测定(Wang等人,Cancer Immunol Res. 2014年9月;2(9):846-56)、SEB(葡萄球菌肠毒素B)T细胞刺激测定(Wang等人,Cancer Immunol Res. 2014年9月;2(9):846-56)以及抗CD3 T细胞刺激测定(Li和Kurlander,J Transl Med. 2010;8:104)。

[0454] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽可以相对于野生型PD-L1对照,在原代T细胞测定中,在一些实施方案中增加或者在替代性实施方案中降低IFN- $\gamma$ (干扰素- $\gamma$ )表达。在一些实施方案中,此类活性可以取决于变体PD-L1多肽是以拮抗剂活性的形式还是以激动剂活性的形式提供。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白为细胞中的抑制性受体的拮抗剂,诸如阻断可以出现来降低对活化刺激(例如,CD3和/或CD28共刺激信号或促有丝分裂信号)的反应的抑制性信号。技术人员将认识到存在用于确定IFN- $\gamma$ 表达的增加或降低的不同形式的原代T细胞测定。

[0455] 在原代T细胞测定中测定变体PD-L1增加或降低IFN- $\gamma$ 表达的能力时,可以使用混合淋巴细胞反应(MLR)测定。在一些实施方案中,以拮抗剂形式(诸如可溶性形式)提供的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白(例如,变体PD-L1-Fc或可分泌免疫调节蛋白)在测定中阻断了PD-1抑制性受体的活性并因此增加了MLR活性,诸如通过测定中的IFN- $\gamma$ 产生增加所观察到的。在一些实施方案中,以激动剂形式提供的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白(诸如含有肿瘤定位部分的定位vIgD堆叠或缀合物或表达所提供的跨膜免疫调节蛋白的工程改造的细胞)可以刺激PD-1抑制性受体的活性并因此降低MLR活性,诸如通过IFN- $\gamma$ 产生减少所证实。在一些实施方案中,以激动剂形式提供的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白(诸如含有肿瘤定位部分的定位vIgD堆叠或缀合物或表达所提供的跨膜免疫调节蛋白的工程改造的细胞)可以阻断PD-1抑制性受体的活性并因此增加MLR活性,诸如增加的IFN- $\gamma$ 产生。

[0456] 可替代地,在原代T细胞测定中测定变体PD-L1调节IFN- $\gamma$ 表达的增加或降低的能

力时,可以使用共固定测定。在共固定测定中,在一些实施方案中由抗CD3抗体提供的TCR信号与共固定的变体PD-L1结合使用,以确定相对于PD-L1未修饰或野生型对照增加或降低IFN- $\gamma$ 表达的能力。在一些实施方案中,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白(例如,共固定的变体PD-L1(例如,PD-L1-Fc))在共固定测定中降低了IFN- $\gamma$ 产生。

[0457] 在一些实施方案中,在测定变体PD-L1调节IFN- $\gamma$ 表达的增加或降低的能力时,可以使用T细胞报告基因测定。在一些实施方案中,T细胞为Jurkat T细胞系或者来源于Jurkat T细胞系。在报告基因测定中,还生成报告基因细胞系(例如,Jurkat报告基因细胞)以过表达抑制性受体,其为变体IgSF结构域多肽的同源结合配偶体。例如,在变体PD-L1的情况下,生成报告基因细胞系(例如,Jurkat报告基因细胞)以过表达PD-1。在一些实施方案中,报告基因T细胞还含有报告基因构建体,其含有响应于T细胞活化的可操作地连接至报告基因的诱导型启动子。在一些实施方案中,报告基因是荧光或发光报告基因。在一些实施方案中,报告基因是荧光素酶。在一些实施方案中,启动子响应于CD3信号传导。在一些实施方案中,启动子是NFAT启动子。在一些实施方案中,启动子响应于共刺激信号传导,例如CD28共刺激信号传导。在一些实施方案中,启动子是IL-2启动子。

[0458] 在报告基因测定的方面中,报告基因细胞系诸如通过与表达抑制性受体例如PD-L1的野生型配体的抗原递呈细胞(APC)共同孵育来刺激。在一些实施方案中,APC为人工APC。人工APC是熟练的技术人员熟知的。在一些实施方案中,人工APC来源于一种或多种哺乳动物细胞系,诸如K562、CHO或293细胞。

[0459] 在一些实施方案中,Jurkat报告基因细胞在变体IgSF结构域分子或免疫调节蛋白(例如,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白)存在下与过表达抑制性配体的人工APC共同孵育。在一些实施方案中,报告基因表达诸如通过确定细胞的发光或荧光来监测。在一些实施方案中,抑制性受体与配体之间的正常相互作用引起报告基因信号诸如与对照相比的消退或减少,例如通过与对照T细胞和其中不存在抑制性受体和配体相互作用的APC(例如,不过表达PD-L1的APC)共同孵育进行报告基因表达。在一些实施方案中,例如当以可溶性形式作为变体PD-L1-Fc提供时或当由APC表达为可分泌免疫调节蛋白时,本文所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白拮抗所述相互作用,从而使得与变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白不存在时相比报告基因信号增加。在一些情况下,本文所提供的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白的某些形式可以提供激动剂活性,从而与变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白不存在时相比降低报告基因表达。

[0460] 适当控制的使用为本领域技术人员已知的,然而,在上述实施方案中,控制通常涉及使用来自变体PD-L1由其来源或开发的相同哺乳动物种类的未修饰PD-L1(诸如野生型或天然PD-L1同种型)。在一些实施方案中,野生型或天然PD-L1具有与变体相同的形式或对应形式。例如,如果变体PD-L1为含有融合至Fc蛋白的变体ECD的可溶性形式,那么对照为含有融合至Fc蛋白的PD-L1的野生型或天然ECD的可溶性形式。不管与PD-1和CD80中的一种或多种的结合亲和力和/或选择性是增加或降低,在T细胞测定中相对于野生型PD-L1对照,变体PD-L1在一些实施方案中将增加IFN- $\gamma$ 表达并且在替代性实施方案中降低IFN- $\gamma$ 表达。

[0461] 在一些实施方案中,变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白相对于野生型或未修饰PD-L1对照使IFN- $\gamma$ 表达(即,蛋白质表达)增加了至少:5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高。在其他实施方案中,变体PD-L1或免疫调节蛋白相对于野生型或未

修饰PD-L1对照使IFN- $\gamma$ 表达(即,蛋白质表达)减少了至少:5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高。在一些实施方案中,野生型PD-L1对照为鼠PD-L1,诸如通常将用于在序列中由野生型鼠PD-L1序列改变的变体PD-L1。在一些实施方案中,野生型PD-L1对照为人PD-L1,诸如通常将用于在序列中由野生型人PD-L1序列改变的变体PD-L1,所述人PD-L1序列诸如包含氨基酸序列SEQ ID NO:30或1728或者SEQ ID NO:55或309的PD-L1序列。

[0462] V. 药物制剂

[0463] 本文提供含有本文所述的变体PD-L1多肽、免疫调节蛋白、缀合物、工程改造的细胞或感染剂中的任一种的组合物。药物组合物可以还包含药学上可接受的赋形剂。例如,药物组合物可以含有用于调节、维持或保持例如组合物的pH、渗透压、粘度、澄清度、颜色、等张性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的一种或多种赋形剂。在一些方面,技术人员了解的是,含有细胞的药物组合物可以不同于含有蛋白质的药物组合物。

[0464] 在一些实施方案中,药物组合物为固体,诸如粉末、胶囊或片剂。例如,药物组合物的组分可以是冻干的。在一些实施方案中,固体药物组合物在施用之前以液体重构或溶解于液体中。

[0465] 在一些实施方案中,药物组合物为液体,例如溶解于水溶液(诸如生理盐水或林格溶液(Ringer's solution))中的变体PD-L1多肽。在一些实施方案中,药物组合物的pH在约4.0与约8.5之间(诸如约4.0与约5.0之间、约4.5与约5.5之间、约5.0与约6.0之间、约5.5与约6.5之间、约6.0与约7.0之间、约6.5与约7.5之间、约7.0与约8.0之间或约7.5与约8.5之间)。

[0466] 在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的赋形剂,例如填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。药学上可接受的填充剂的实例包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽酚、预胶凝淀粉、玉米淀粉或马铃薯淀粉。药学上可接受的粘合剂的实例包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素或纤维素。药学上可接受的包衣剂的实例包括羟丙基甲基纤维素(HPMC)、紫胶、玉米蛋白玉米素或明胶。药学上可接受的崩解剂的实例包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素或羧甲淀粉钠。药学上可接受的润滑剂的实例包括聚乙二醇、硬脂酸镁或硬脂酸。药学上可接受的防腐剂的实例包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸或山梨酸。药学上可接受的甜味剂的实例包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学上可接受的缓冲剂的实例包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐、乙酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0467] 在一些实施方案中,药物组合物还包含用于控制或持续释放产品的药剂,诸如可注射微球、生物溶蚀颗粒、聚合物化合物(聚乳酸、聚乙醇酸)、珠粒或脂质体。

[0468] 在一些实施方案中,药物组合物为无菌的。可以通过无菌滤膜过滤或辐射来达成灭菌。在冻干组合物时,使用此方法进行的灭菌可以在冻干和重构之前或之后进行。用于胃肠外施用的组合物可以冻干形式或溶液形式储存。此外,通常将胃肠外组合物放置在具有无菌接取口的容器中,例如具有可用皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶中。

[0469] 在一些实施方案中,提供含有跨膜免疫调节蛋白的药物组合物,包括表达此类跨膜免疫调节蛋白的工程改造的细胞。在一些实施方案中,药物组合物和制剂包含一种或多

种任选的药学上可接受的载剂或赋形剂。此类组合物可以包含缓冲液,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;糖类,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘胺酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);以及防腐剂。本发明的组合物优选被配制用于静脉内施用。

[0470] 这种制剂可以例如呈适用于静脉内输注的形式。药学上可接受的载剂可以是涉及从身体的一种组织、器官或部分携带或运送感兴趣的细胞至身体的另一组织、器官或部分的药学上可接受的物质、组合物或媒介物。例如,载剂可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料或它们的一些组合。载剂的各组分必须是“药学上可接受的”,因为它必须与制剂的其他成分相容。它还必须适用于与它可能碰到的任何身体组织、器官或部分接触,这意味着它必须不携有毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或过度超过其治疗益处的任何其他并发症的风险。

[0471] VI. 制品和试剂盒

[0472] 本文还提供处于合适包装中的包含本文所述的药物组合物的制品。用于本文所述的组合物(诸如眼用组合物)的合适包装是本领域中已知的,并且包括例如小瓶(诸如密封的小瓶)、容器、安瓿瓶、瓶子、罐、柔软包装(例如,密封的聚酯薄膜或塑料袋)等。可以进一步对这些制品进行灭菌和/或密封。

[0473] 还提供包括本文所述的药物组合物(或制品)的试剂盒,其还可以包括关于使用所述组合物的方法(诸如本文所述的用途)的说明书。本文所述的试剂盒还可以包括从商业和使用者立场来看合乎需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器以及具有关于进行本文所述的任何方法的说明书的包装插页。

[0474] VII. 治疗性应用

[0475] 本文提供使用含有本文所述的变体PD-L1多肽免疫调节蛋白、缀合物、工程改造的细胞或感染剂所提供的药物组合物来用于调节受试者(诸如人患者)的免疫反应(包括关于治疗疾病或病状)的方法。本文所述的药物组合物(包括包含本文所述的变体PD-L1多肽、免疫调节蛋白、缀合物、工程改造的细胞和感染剂的药物组合物)可以用于各种治疗性应用中,诸如治疗疾病。例如,在一些实施方案中,药物组合物用于治疗哺乳动物的炎性或自身免疫病症、癌症、器官移植、病毒感染和/或细菌感染。药物组合物可以调节(例如增加或降低)免疫反应以治疗疾病。

[0476] 在一些实施方案中,所提供的方法适用于本文所述的变体PD-L1多肽、免疫调节蛋白、缀合物、工程改造的细胞和感染剂的治疗性施用。根据所提供的公开内容,根据免疫反应的调节类型(例如,所需的增加或降低)选择用于适应症的形式处于技术人员的水平内。

[0477] 在一些实施方案中,施用本文所提供的刺激免疫反应的药物组合物,其可以适用于例如治疗癌症、病毒感染或细菌感染。在一些实施方案中,药物组合物含有一种形式的变体PD-L1多肽,所述形式表现出其同源结合配偶体PD-1的拮抗剂活性和/或经由PD-1抑制共刺激信号传导。用于与此类治疗性应用结合的PD-L1多肽的示例性形式包括例如可溶性变体PD-L1多肽(例如,变体PD-L1-Fc融合蛋白)、免疫调节蛋白或变体PD-L1多肽和另一个IgSF结构域的“堆叠物”(包括其Fc融合物的可溶性形式)、表达可分泌免疫调节蛋白的工程改造的细胞、或包含编码可分泌免疫调节蛋白的核酸分子的感染剂,诸如用于在受感染细胞(例如,肿瘤细胞或APC,例如树突细胞)中表达和分泌可分泌免疫调节蛋白。此类方法为

通过递送可溶性形式的变体PD-L1多肽来进行的方法。本文描述了示例性可溶性形式，包括含有亲和力修饰的IgSF结构域(例如，IgV)的变体PD-L1多肽的细胞外部分直接或间接连接至多聚化结构域(例如，Fc结构域或区域)的形式。在一些实施方案中，这种治疗剂为变体PD-L1-Fc融合蛋白。

[0478] 所提供的调节免疫反应的方法可以用于治疗疾病或病状，诸如肿瘤或癌症。在一些实施方案中，药物组合物可以用于抑制哺乳动物癌细胞(诸如人癌细胞)的生长。一种治疗癌症的方法可以包括向患有癌症的受试者施用有效量的本文所述的药物组合物中的任一种。有效量的药物组合物可以被施用来抑制、停止或逆转癌症的进展，包括对于诸如通过所提供的变体或免疫调节蛋白进行的免疫活性的调节敏感的癌症。人癌细胞可以体内或离体治疗。在人类患者的离体治疗中，在身体外部治疗含有癌细胞的组织或流体并且然后将组织或流体再引入回到患者中。在一些实施方案中，通过向患者施用治疗性组合物来体内治疗人类患者的癌症。因此，本发明提供抑制、停止或逆转肿瘤的进展或者另外引起无进展存活(即，治疗期间和之后的时间长度，其中患有癌症而未恶化的患者得以存活)或总体存活(也称为“存活率”，即研究或治疗组中在人们被诊断患有癌症或针对癌症进行治疗之后的一定时间段存活的人的百分比)相对于使用对照进行的治疗统计学显著增加的离体和体内方法。

[0479] 可以通过本文所述的药物组合物和治疗方法治疗的癌症包括但不限于黑素瘤、膀胱癌、血液恶性肿瘤(白细胞、淋巴瘤、骨髓瘤)、肝癌、脑癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌(腺癌)、结肠直肠癌、肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、脾癌、胸腺或血细胞癌症(即，白血病)、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、子宫癌、肌肉骨骼癌、头颈癌、胃肠道癌、生殖细胞癌或内分泌性和神经内分泌癌症。在一些实施方案中，癌症是尤文氏肉瘤。在一些实施方案中，癌症选自黑素瘤、肺癌、膀胱癌和血液恶性肿瘤。在一些实施方案中，癌症是淋巴瘤、淋巴性白血病、骨髓性白血病、宫颈癌、成神经细胞瘤或多发性骨髓瘤。

[0480] 在一些实施方案中，药物组合物作为单一疗法(即，作为单一药剂)或作为组合疗法(即，与一种或多种另外的抗癌剂，诸如化学治疗药物、癌症疫苗或免疫检查点抑制剂组合)施用。在一些实施方案中，药物组合物也可以与放射疗法一起施用。在本公开的一些方面，免疫检查点抑制剂为纳武单抗、曲美木单抗、派姆单抗、易普利姆玛等。

[0481] 在一些实施方案中，药物组合物抑制免疫反应，其可以适用于治疗炎性或自身免疫病症或器官移植。在一些实施方案中，药物组合物含有一种形式的变体PD-L1多肽，所述形式表现出其同源结合配偶体PD-1的激动剂活性和/或经由PD-1刺激抑制性信号传导。在一些方面，变体PD-L1多肽通过诸如在淋巴细胞或APC上表达的CD80刺激抑制性信号。用于与此类治疗性应用结合使用的PD-L1多肽的示例性形式包括例如定位至炎性环境的细胞或组织的免疫调节蛋白或变体PD-L1多肽与IgSF结构域或其变体的“堆叠物”、含有连接至定位到炎性环境的细胞或组织的部分的变体PD-L1多肽的缀合物、表达跨膜免疫调节蛋白的工程改造的细胞或包含编码跨膜免疫调节蛋白的核酸分子的感染剂，诸如用于在受感染细胞中表达跨膜免疫调节蛋白。

[0482] 所提供的调节免疫反应的方法可以用于治疗疾病或病状，诸如炎性或自身免疫病症。在一些实施方案中，炎性或自身免疫病症是抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎、血管炎、自身免疫性皮肤疾病、移植、风湿病、炎性胃肠道疾病、炎性眼病、炎性神经疾

病、炎性肺病、炎性内分泌性疾病或自身免疫性血液疾病。

[0483] 在一些实施方案中,可以通过本文所述的药物组合物治疗的炎性和自身免疫病症为艾迪生氏病(Addison's Disease)、过敏症、斑秃、阿尔茨海默氏病、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征(休斯综合征(Hughes Syndrome))、哮喘、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性睾丸炎、精子缺乏、白塞病(Behcet's Disease)、伯杰氏病(Berger's Disease)、大疱性类天疱疮、心肌症、心血管疾病、口炎性腹泻/乳糜泄、慢性疲劳免疫功能失调综合征(CFIDS)、慢性特发性多神经炎、慢性炎性脱髓鞘性、多神经根神经病(polyradiculoneuropathy, CIDP)、慢性复发性多神经病(格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome))、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss Syndrome, CSS)、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病(CAD)、COPD(慢性阻塞性肺病)、CREST综合征、克罗恩氏病(Crohn's disease)、皮炎、泡疹样皮炎、皮肌炎、糖尿病、盘状狼疮、湿疹、获得性大疱性表皮松解症、原发性冷球蛋白血症、伊文综合征(Evan's Syndrome)、眼球突出、纤维肌痛、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's Syndrome)、格雷夫斯病(Graves' Disease)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、免疫增生性疾病或病症、炎性肠病(IBD)、间质性肺病、幼年型关节炎、幼年特发性关节炎(JIA)、川崎病(Kawasaki's Disease)、莱伯特-伊顿肌无力综合征(Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome)、紫癜风、狼疮性肾炎、淋巴细胞性垂体炎、美尼尔氏病(Ménière's Disease)、米勒菲施综合征(Miller Fish Syndrome)/急性播散性脊髓神经根病、混合性结缔组织病、多发性硬化(MS)、肌风湿病、肌痛性脑脊髓炎(ME)、重症肌无力、眼部炎症、落叶型天疱疮、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征(惠特克氏综合征(Whitaker's syndrome))、风湿性多肌痛、多肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化/自身免疫性胆管病、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷诺现象(Raynaud's Phenomenon)、赖特综合征(Reiter's Syndrome)/反应性关节炎、再狭窄、风湿热、风湿性疾病、结节病、施密特氏综合征(Schmidt's syndrome)、硬皮病、干燥综合症(Sjögren's Syndrome)、僵人综合征、全身性红斑狼疮(SLE)、系统性硬皮病、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、甲状腺炎、1型糖尿病、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风、间质性肠病或韦格纳肉芽肿(Wegener's Granulomatosis)。在一些实施方案中,炎性或自身免疫病症选自炎性肠病、移植、克罗恩氏病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、多发性硬化症、哮喘、类风湿性关节炎和牛皮癣。

[0484] 在一些实施方案中,施用药物组合物以调节自身免疫病症。例如,抑制免疫反应可以有利于用于抑制受体对来自供体的组织、细胞或器官移植植物的排斥的方法中。因此,在一些实施方案中,本文所述的药物组合物用于限制或预防移植植物相关或植入物相关疾病或病症,诸如移植抗宿主病(GVHD)。在一些实施方案中,药物组合物用于抑制植入或移植的骨髓、器官、皮肤、肌肉、神经元、胰岛或实质细胞的自身免疫排斥。

[0485] 本文所述的包含工程改造的细胞的药物组合物和方法可以用于过继性细胞转移应用中。在一些实施方案中,包含工程改造的细胞的细胞组合物可以用于相关方法中,例如用于在免疫疗法方案中调节免疫学活性,以治疗例如哺乳动物癌症或(在其他实施方案中)

治疗自身免疫病症。所采用的方法通常包括在允许亲和力修饰的IgSF结构域的特异性结合和调节哺乳动物细胞的免疫学活性的条件下使本发明的TIP与哺乳动物细胞接触的方法。在一些实施方案中,免疫细胞(诸如肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、T细胞(包括CD8+或CD4+ T细胞)或APC)被工程改造以表达为如本文所述的膜蛋白和/或可溶性变体PD-L1多肽、免疫调节蛋白或缀合物。工程改造的细胞然后可以接触哺乳动物细胞,诸如APC、第二淋巴细胞或肿瘤细胞,其中在允许亲和力修饰的IgSF结构域特异性结合至哺乳动物细胞上的相对结构的条件下,需要调节免疫学活性,使得可以在哺乳动物细胞中调节免疫学活性。细胞可以体内或离体接触。

[0486] 在一些实施方案中,工程改造的细胞是自体细胞。在其他实施方案中,细胞是同种异体的。在一些实施方案中,细胞是再输注到它所分离自的哺乳动物中的自体工程改造的细胞。在一些实施方案中,细胞是输注到哺乳动物中的同种异体工程改造的细胞。在一些实施方案中,细胞从患者血液或肿瘤中收获,被工程改造以表达多肽(诸如本文所述的变体PD-L1多肽、免疫调节蛋白或缀合物),在体外培养系统中扩增(例如,通过刺激所述细胞),并且再输注到患者中以介导肿瘤破坏。在一些实施方案中,所述方法通过过继性细胞转移来进行,其中表达TIP的细胞(例如,T细胞)输注回到患者中。在一些实施方案中,本发明的治疗组合物和方法用于治疗哺乳动物患者的癌症,诸如淋巴瘤、淋巴性白血病、骨髓性白血病、子宫颈癌、成神经细胞瘤或多发性骨髓瘤。

[0487] 在一些实施方案中,药物组合物施用至受试者。在一些实施方案中,受试者是人患者。通常,药物组合物的剂量和施用路径根据受试者的大小和状况、根据标准药物实践来确定。例如,治疗有效剂量最初可以在细胞培养物测定中或在动物模型诸如小鼠、大鼠、兔、狗、猪或猴中评估。动物模型也可以用于确定适当浓度范围和施用路径。此类信息然后可以用于确定人的有用剂量和施用路径。精确剂量将根据与需要治疗的受试者相关的因素确定。剂量和施用被调整来提供足够水平的活性化合物或维持所需效果。可以考虑的因素包括疾病状态的严重性、受试者的一般健康、受试者的年龄、体重和性别、施用时间和频率、药物组合、反应敏感性以及对疗法的反应。

[0488] 长效药物组合物可以根据特定制剂的半衰期和清除率每3至4天、每周或每两周施用。给药的频率将取决于所使用的制剂中的分子的药物代谢动力学参数。通常,施用组合物,直至达到实现所需效果的剂量。所述组合物因此可以单剂量或随时间推移以多剂量(以相同或不同浓度/剂量)施用或以连续输注施用。常规地进行适当剂量的进一步细化。适当的剂量可以通过使用适当的剂量反应数据判定。可以监测许多用于治疗效果的生物标记物或生理标记物,包括T细胞活化或增值、细胞因子合成或产生(例如,TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2的产生)、各种活化标记物(例如,CD25、IL-2受体)的诱导、炎症、关节肿胀或压痛、C反应性蛋白的血清水平、抗胶原抗体产生和/或T细胞依赖性抗体反应。

[0489] 在一些实施方案中,药物组合物通过任何路径施用给受试者,所述途径包括口服、经皮、通过吸入、静脉内、动脉内、肌肉内、直接施加至伤口部位、施加至手术部位、腹内、通过栓剂、皮下、真皮内、经皮、通过喷雾、胸膜内、心室内、关节内、眼内或脊柱内。

[0490] 在一些实施方案中,药物组合物的剂量为单剂量或重复剂量。在一些实施方案中,向受试者每天一次、每天两次、每天三次或每天四次或更多次给予剂量。在一些实施方案中,在一周内给予约1个或多个(诸如约2个或更多个、约3个或更多个、约4个或更多个、约5

个或更多个、约6个或更多个或者约7个或更多个)剂量。在一些实施方案中,在数天、数周、数月或数年过程中给予多个剂量。在一些实施方案中,治疗过程为约1个或多个剂量(诸如约2个或更多个剂量、约3个或更多个剂量、约4个或更多个剂量、约5个或更多个剂量、约7个或更多个剂量、约10个或更多个剂量、约15个或更多个剂量、约25个或更多个剂量、约40个或更多个剂量、约50个或更多个剂量或者约100个或更多个剂量)。

[0491] 在一些实施方案中,施用的药物组合物的剂量为约1 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大(诸如约2 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约5 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约10 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约25 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约50 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约100 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约250 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约500 $\mu$ g蛋白质/kg受试者体重或更大、约1mg蛋白质/kg受试者体重或更大、约2mg蛋白质/kg受试者体重或更大、或者约5mg蛋白质/kg受试者体重或更大)。

[0492] 在一些实施方案中,施用治疗量的细胞组合物。通常,待施用的本发明的组合物的精确量可以通过医师考虑患者(受试者)的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度以及病状的个体差异来确定。一般说来,包含如本文所述的工程改造的细胞(例如,T细胞)的药物组合物可以 $10^4$ 至 $10^9$ 个细胞/kg体重,诸如 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞/kg体重的剂量(包括那些范围内的所有整数值)施用。工程改造的细胞组合物(诸如T细胞组合物)也可以这些剂量多次施用。所述细胞可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用(参见例如Rosenberg等人,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)。用于特定患者的最佳剂量和治疗方案可以容易由医药领域技术人员通过监测患者的疾病征象并因此调节治疗来确定。

[0493] 在一些实施方案中,药物组合物含有包含编码免疫调节变体多肽的核酸序列的感染剂。在一些实施方案中,药物组合物含有一个剂量的适用于施用至适合治疗的受试者的感染剂。在一些实施方案中,药物组合物含有以下单剂量或多剂量的量的为病毒的感染剂:约 $1 \times 10^5$ 个与约 $1 \times 10^{12}$ 个空斑形成单位(pfu)之间、 $1 \times 10^6$ 与 $1 \times 10^{10}$ pfu之间、或 $1 \times 10^7$ 与 $1 \times 10^{10}$ pfu之间,各自包括端点,诸如至少或至少约或约 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ pfu或约 $1 \times 10^{10}$ pfu。在一些实施方案中,药物组合物含有以下病毒浓度:从或从约 $10^5$ 至约 $10^{10}$ pfu/mL,例如 $5 \times 10^6$ 至 $5 \times 10^9$ 或 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^9$ pfu/mL,诸如至少或至少约或约 $10^6$ pfu/mL、 $10^7$ pfu/mL、 $10^8$ pfu/mL或 $10^9$ pfu/mL。在一些实施方案中,药物组合物含有以下单剂量或多剂量的量的为细菌的感染剂:约 $1 \times 10^3$ 个与约 $1 \times 10^9$ 个菌落形成单位(cfu)之间、 $1 \times 10^4$ 与 $1 \times 10^9$ cfu之间、或 $1 \times 10^5$ 与 $1 \times 10^7$ cfu之间,各自包括端点,诸如至少或至少约或约 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $1 \times 10^9$ cfu。在一些实施方案中,药物组合物含有以下细菌浓度:从或从约 $10^3$ 至约 $10^8$ cfu/mL,例如 $5 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^7$ 或 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ cfu/mL,诸如至少或至少约或约 $10^5$ cfu/mL、 $10^6$ cfu/mL、 $10^7$ cfu/mL或 $10^8$ cfu/mL。

[0494] 已知多种方式用于确定施用本发明的治疗组合物是否通过消除、隔绝或灭活介导或能够介导不希望的免疫反应的免疫细胞;诱导、生成或启动介导或能够介导保护性免疫反应的免疫细胞;改变免疫细胞的身体或功能特性;或这些作用的组合来充分调节免疫学活性。免疫学活性调节的测量实例包括但不限于检查免疫细胞群体的存在或不存在(使用流式细胞术、免疫组织化学、组织学、电子显微镜检查、聚合酶链反应(PCR));测量免疫细胞的功能能力,包括响应于信号而增殖或分裂的能力或阻力(诸如在用抗CD3抗体、抗T细胞受体抗体、抗CD28抗体、钙离子载体、装载有肽或蛋白质抗原的PMA(佛波醇12-豆蔻酸酯13-乙

酸酯)抗原递呈细胞刺激之后使用基于<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶掺入法的T细胞增殖测定和肽扫描分析;B细胞增殖测定);测量杀灭或裂解其他细胞的能力(诸如细胞毒性T细胞测定);测量细胞因子、趋化因子、细胞表面分子、抗体和其他细胞产物(例如,通过流式细胞术、酶联免疫吸附测定、蛋白质印迹分析、蛋白质微阵列分析、免疫沉淀分析);测量免疫细胞或免疫细胞内的信号传导途径的活化的生物化学标记物(例如,酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化、多肽裂解、以及蛋白质复合物的形成或解离的蛋白质印迹和免疫沉淀分析;蛋白质阵列分析;使用DNA阵列或消减性杂交的DNA转录谱图);测量通过细胞凋亡、坏死或其他机制进行的细胞死亡(例如,膜联蛋白V染色、TUNEL测定、测量DNA梯度化的凝胶电泳、组织学;荧光半胱天冬酶测定、半胱天冬酶底物的蛋白质印迹分析);测量基因、蛋白质和免疫细胞产生的其他分子(例如, RNA印迹分析、聚合酶链反应、DNA微阵列、蛋白质微阵列、2维凝胶电泳、蛋白质印迹分析、酶联免疫吸附测定、流式细胞术);以及测量临床症状或结果,诸如自身免疫、神经变性和涉及自身蛋白质或自身多肽的其他疾病的改善(临床评分、使用额外疗法的需要、功能状态、成像研究),例如通过在多发性硬化的情况下测量复发率或疾病严重性(使用普通技术人员已知的临床评分),在I型糖尿病的情况下测量血糖,或在类风湿性关节炎的情况下测量关节炎症。

[0495] VIII.示例性实施方案

[0496] 所提供的实施方案为:

[0497] 1. 一种变体PD-L1多肽,其包含ECD或IgV结构域或其特异性结合片段、IgC结构域或其特异性结合片段或二者,其中所述变体PD-L1多肽包含在未修饰PD-L1或其特异性结合片段中与选自以下的位置相对应的一个或多个氨基酸修饰:6、10、11、14、15、16、17、18、19、20、22、23、26、27、28、33、35、36、40、41、43、44、45、46、47、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、60、64、65、68、71、72、73、74、75、78、79、83、85、89、90、93、97、98、99、101、102、103、104、106、110、111、112、113、117、119、120、121、124、129、130、131、134、137、138、144、148、149、150、155、158、160、163、165、167、170、171、173、175、176、177、179、180、183、185、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、206、207、213或221,其参考SEQ ID NO:30或1728的编号。

[0498] 2. 如实施方案1所述的变体PD-L1多肽,其中所述氨基酸修饰是氨基酸取代、插入或缺失。

[0499] 3. 如实施方案1或实施方案2所述的变体PD-L1多肽,其中所述未修饰PD-L1是哺乳动物PD-L1或其特异性结合片段。

[0500] 4. 如实施方案3所述的变体PD-L1多肽,其中所述未修饰PD-L1是人PD-L1或其特异性结合片段。

[0501] 5. 如实施方案1-4中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述未修饰PD-L1包含(i) SEQ ID NO:30或1728中所列出的氨基酸序列,(ii)与SEQ ID NO:30或1728具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或者(iii)其包含IgV结构或IgC结构域或其特异性结合片段或二者的一部分。

[0502] 6. 如实施方案1-5中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中:

[0503] 所述IgV结构域或IgC结构域的特异性结合片段具有至少50、60、70、80、90、100、110或更多个氨基酸的长度;或者

[0504] 所述IgV结构域的特异性结合片段包含作为SEQ ID NO:3的氨基酸24-130所列出的IgV结构域的长度的至少80%的长度；并且/或者所述IgC结构域的特异性结合片段包含作为SEQ ID NO:3的氨基酸133-225所列出的IgC结构域的长度的至少80%的长度。

[0505] 7. 如实施方案1-6中任一项所述的变体PD-L1多肽，其中：

[0506] 所述变体PD-L1包含多至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸修饰，任选地为氨基酸取代、插入和/或缺失；或者

[0507] 所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:30或1728具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列或其特异性结合片段。

[0508] 8. 如实施方案1-7中任一项所述的变体PD-L1多肽，其中与所述未修饰PD-L1相比，所述变体PD-L1多肽表现出改变的与PD-1或CD80的胞外域的结合。

[0509] 9. 如实施方案1-8中任一项所述的变体PD-L1多肽，其中：

[0510] 与所述未修饰PD-L1与PD-1的胞外域的结合相比，所述变体PD-L1多肽表现出改变的与PD-1的胞外域的结合；并且/或者

[0511] 与所述未修饰PD-L1与CD80的胞外域的结合相比，所述变体PD-L1多肽表现出改变的与CD80的胞外域的结合。

[0512] 10. 如实施方案8或实施方案9所述的变体PD-L1多肽，其中所述改变的结合是改变的结合亲和力和/或改变的结合选择性。

[0513] 11. 如实施方案1-10中任一项所述的变体PD-L1多肽，其中所述一个或多个氨基酸修饰选自P6S、Y10F、V11A、V11E、Y14S、G15A、S16G、N17D、M18I、M18T、M18V、T19A、T19I、I20L、C22R、K23E、K23N、K23R、E26A、E27D、E27G、K28E、K28I、K28R、K28N、A33D、L35P、I36S、I36T、E40G、M41K、M41V、D43G、D43V、K44E、N45D、N45I、N45T、I47T、I46V、F49S、V50A、H51N、H51R、H51Y、G52R、G52V、E53G、E53V、E54G、D55G、D55N、D55S、D55V、L56Q、K57E、K57R、V58A、V58D、H60R、S75P、R64S、Q65L、R68L、K71E、D72G、Q73R、L74P、S75P、N78I、N78S、A79T、I83T、D85E、Q89R、D90G、V93E、M97I、M97K、M97L、I98L、I98T、I98V、S99G、G101D、G101G-ins (G101GG)、G102D、A103V、D104G、K106E、K106R、V110M、K111E、K111T、V112A、N113Y、N117S、I119T、N120S、Q121L、L124S、V129A、V129D、T130A、S131F、E134G、C137R、Q138R、K144E、K144Q、I148V、W149R、T150A、Q155H、S158G、K160M、T163I、K163N、N165Y、K167R、K167T、E170G、K171R、F173I、F173L、K173Y、V175A、T176N、S177C、L179P、R180S、T183A、T183I、T185A、I188V、F189L、F189S、T192S、F193S、R194G、R194W、R195G、R195S、R195T、L196S、D197G、P198S、P198T、E199G、E200K、E200N、N201D、N201Y、H202Q、T203A、A204T、L206F、V207A、L213P、T221L或其保守性氨基酸取代。

[0514] 12. 如实施方案1-11中任一项所述的变体PD-L1多肽，其中所述一个或多个氨基酸修饰选自K28N/M41V/N45T/H51N/K57E、I20L/I36T/N45D/I47T、I20L/M41K/K44E、P6S/N45T/N78I/I83T、N78I、M41K/N78I、N45T/N78I、I20L/N45T、N45T、M41K、I20L/I36T/N45D、N17D/N47T/V50A/D72G、I20L/F49S、N45T/V50A、I20L/N45T/N78I、I20L/N45T/V50A、M41V/N45T、M41K/N45T、A33D/S75P/D85E、M18I/M41K/D43G/H51R/N78I、V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P、A33D/V50A、S16G/A33D/K71E/S75P、E27G/N45T/M97I、E27G/N45T/K57R、A33D/E53V、D43G/N45D/V58A、E40G/D43V/N45T/V50A、Y14S/K28E/N45T A33D/N78S、A33D/N78I、A33D/

N45T、A33D/N45T/N78I、E27G/N45T/V50A、N45T/V50A/N78S、I20L/N45T/V110M、I20L/I36T/N45T/V50A、N45T/L74P/S75P、N45T/S75P、S75P/K106R、S75P、A33D/S75P、A33D/S75P/D104G、A33D/S75P、I20L/E27G/N45T/V50A、I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/D43G/N45D/N78I、E27G/N45T/V50A/N78I、N45T/V50A/N78I、V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G、I20L/E27G/D43G/N45T/V50A、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R、I20L/I36T/N45D、I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I、A33D/D43G/N45D/V58A/S75P、K23R/D43G/N45D、I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D、D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G-ins (G101GG)、I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I、I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I、T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K、I20L/M41K/D43G/N45D、K23R/N45T/N78I、I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-ins (G101GG)、K57R/S99G、K57R/S99G/F189L、M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q、I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/H202Q/L206F、C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/H202Q/T221L、M18V/I98L/L124S/P198T/L206F、S99G/N117S/I148V/K171R/R180S、I36T/M97L/A103V/Q155H、K28I/S99G、R195S、A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/L206F、K57R/S99G/L124S/K144Q、K57R/S99G/R195G、D55V/M97L/S99G、E27G/I36T/D55N/M97L/K111E、E54G/M97L/S99G、G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q、G15A/I36T/V129D、G15A/I36T/V129D/R195G、G15A/V129D、I36S/M97L/I36T/D55N/M97L/K111E/A204T、I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L、I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S、I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P198T、I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T185A/R195G、I36T/I83T/M97L/K144E/P198T、I36T/M97L/K111E、I36T/M97L/K144E/P198T、I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y、I36T/M97L/V129D、L35P/I36S/M97L/K111E、M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A、M18T/I36T/D55N/M97L/K111E、M18V/M97L/T176N/R195G、M97L/S99G、N17D/M97L/S99G、S99G/T185A/R195G/P198T、V129D/H202Q、V129D/P198T、V129D/T150A、V93E/V129D、Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A、N45D、K160M/R195G、N45D/K144E、N45D/P198S、N45D/P198T、N45D/R195G、N45D/R195S、N45D/S131F、N45D/V58D、V129D/R195S、I98T/F173Y/L196S、N45D/E134G/L213P、N45D/F173I/S177C、N45D/I148V/R195G、N45D/K111T/R195G、N45D/N113Y/R195S、N45D/N165Y/E170G、N45D/Q89R/I98V、N45D/S131F/P198S、N45D/S75P/P198S、N45D/V50A/R195T、E27D/N45D/T183A/I188V、F173Y/T183I/L196S/T203A、K23N/N45D/S75P/N120S、N45D/G102D/R194W/R195G、N45D/G52V/Q121L/P198S、N45D/I148V/R195G/N201D、N45D/K111T/T183A/I188V、N45D/Q89R/F189S/P198S、N45D/S99G/C137R/V207A、N45D/T163I/K167R/R195G、N45D/T183A/T192S/R194G、N45D/V50A/I119T/K144E、T19A/N45D/K144E/R195G、V11E/N45D/T130A/P198T、V26A/N45D/T163I/T185A、K23N/N45D/L124S/K167T/R195G、K23N/N45D/Q73R/T163I、K28E/N45D/W149R/S158G/P198T、K28R/N45D/K57E/I98V/R195S、K28R/N45D/V129D/T163N/R195T、M41K/D43G/N45D/R64S/R195G、M41K/D43G/N45D/R64S/S99G、N45D/R68L/F173L/D197G/P198S、N45D/V50A/I148V/R195G/N201D、M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D或N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G。

[0515] 13. 如实施方案1-13中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述一个或多个氨基酸修饰对应于选自以下的一个或多个位置:20、27、28、33、36、41、43、45、50、58、71、75、78、97、99或195,任选地其中所述一个或多个氨基酸取代选自I20L、E27G、K28E、A33D、I36T、M41K、

D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、K71E、S75P、N78I、M97L、S99G或R195G或其保守性氨基酸取代。

[0516] 14. 如实施方案1-13中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述一个或多个氨基酸修饰对应于选自以下的一个或多个位置:20、27、33、36、43、45、50、58、75或78,任选地其中所述一个或多个氨基酸取代选自I20L、E27G、A33D、I36T、D43G、N45D、N45T、V50A、V58A、S75P、N78I或其保守性氨基酸取代。

[0517] 15. 如实施方案1-14中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰I20L/I36T、I20L/D43G、I20L/N45D、I20L/N45T、I20L/N45T、I20L/V50A、I20L/V58A、I20L/S75P、I20L/N78I、I36T/D43G、I36T/N45D、I36T/N45T、I36T/V50A、I36T/V58A、I36T/S75P、I36T/N78I、D43G/N45D、D43G/N45T、D43G/V50A、D43G/V58A、D43G/S75P、D43G/N78I、N45D/V50A、N45D/V58A、N45D/S75P、N45D/N78I、N45T/V50A、N45T/V58A、N45T/S75P、N45T/N78I、V50A/V58A、V50A/S75P、V50A/N78I、V58A/S75P、V58A/N78I或S75P/N78I。

[0518] 16. 如权利要求1-15中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰D43G/N45D/V58A。

[0519] 17. 如权利要求1-16中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含氨基酸修饰D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G-ins (G101GG) 或I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G-ins (G101GG) 。

[0520] 18. 如实施方案1-17中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中:

[0521] 所述变体PD-L1多肽包含细胞外结构域 (ECD) 或者由其组成;并且/或者

[0522] 所述变体PD-L1多肽包含所述IgV结构域或其特异性片段以及所述IgC结构域或其特异性片段或者由其组成。

[0523] 19. 如实施方案1-18中任一项所述的变体PD-L1多肽,其包含SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中任一者中所列出的氨基酸序列或其特异性结合片段,或与SEQ ID NO:56-120、1725、1729-1818、1819-1907、1943-2008中的任一者具有至少95%序列同一性并且含有所述氨基酸取代中的一个或多个的氨基酸序列或其特异性结合片段或者由其组成。

[0524] 20. 如实施方案1-19中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽包含所述ECD或IgV结构域或其特异性结合片段或者由其组成。

[0525] 21. 如实施方案1-20中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述IgV结构域或其特异性结合片段是所述变体PD-L1多肽的唯一PD-L1部分。

[0526] 22. 如实施方案1-21中任一项所述的变体PD-L1多肽,其包含SEQ ID NO:121-185、244-308、1726-1727、1908-1937中任一者中所列出的氨基酸序列或其特异性结合片段,与SEQ ID NO:121-185、244-308、1726-1727、1908-1937中的任一者具有至少95%序列同一性并且含有所述氨基酸取代中的一个或多个的氨基酸序列或其特异性结合片段或者由其组成。

[0527] 23. 如实施方案1-17中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述IgC结构域或其特异性结合片段是所述变体PD-L1多肽的唯一PD-L1部分。

[0528] 24. 如实施方案1-23中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至PD-1或CD80的胞外域。

[0529] 25. 如实施方案1-24中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相

比,所述变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至PD-1的胞外域。

[0530] 26.如实施方案1-25中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述变体PD-L1多肽分别以增加的亲和力特异性结合至PD-1的胞外域和CD80的胞外域。

[0531] 27.如实施方案1-24中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述变体PD-L1多肽以增加的亲和力特异性结合至PD-1的胞外域并且以降低的亲和力特异性结合至CD80的胞外域。

[0532] 28.如实施方案24-27中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述增加的对PD-1的胞外域的亲和力增加了超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或60倍。

[0533] 29.如实施方案24或实施方案26所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述增加的对CD80的胞外域的亲和力增加了超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或60倍。

[0534] 30.如实施方案27所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述降低的对CD80的胞外域的亲和力降低了超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或60倍。

[0535] 31.如实施方案1-30中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述变体多肽以增加的选择性特异性结合至PD-1的胞外域。

[0536] 32.如实施方案31所述的变体PD-L1多肽,其中所述增加的选择性包括与所述未修饰PD-L1多肽对PD-1对比CD80的结合的比率相比,所述变体多肽对PD-1对比CD80的结合的比率更大。

[0537] 33.如实施方案32所述的变体PD-L1多肽,其中所述比率大至少或至少约1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍或更多倍。

[0538] 34.如实施方案9-33中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述PD-1为人PD-1。

[0539] 35.如实施方案9-34中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述CD80为人CD80。

[0540] 36.如实施方案1-35中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中与所述未修饰PD-L1相比,所述结合活性改变(增加或降低)超过1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍。

[0541] 37.如实施方案1-36中任一项所述的变体PD-L1多肽,其为可溶性蛋白。

[0542] 38.如实施方案1-37中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽连接至多聚化结构域。

[0543] 39.如实施方案38所述的变体PD-L1多肽,其中所述多聚化结构域是Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体。

[0544] 40.如实施方案1-39中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽连接至增加所述多肽的生物半衰期的部分。

[0545] 41.如实施方案1-40中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽连接至Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体。

[0546] 42.如实施方案39-41中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中:

[0547] 所述Fc结构域为哺乳动物Fc结构域,任选地人Fc结构域;或者

[0548] 所述变体Fc结构域与哺乳动物,任选地人的未修饰Fc结构域相比包含一个或多个

氨基酸修饰。

[0549] 43. 如实施方案39、41和42中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述Fc结构域或其变体包含在SEQ ID NO:187或SEQ ID NO:188中所列出的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:187或SEQ ID NO:188具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0550] 44. 如实施方案39和41-43中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述Fc结构域包含选自以下的一个或多个氨基酸修饰:E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236del、G237A、S267K、N297G、R292C、V302C和K447del,其各自通过EU编号。

[0551] 45. 如实施方案39和41-44中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述Fc结构域包含通过EU编号的氨基酸修饰C220S。

[0552] 46. 如实施方案39和41-45中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述Fc结构域包含SEQ ID NO:1155、1157、1158、1159、1715、1938、1939和1940中任一者中所列出的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1155、1157、1158、1159、1715、1938、1939和1940中的任一者具有至少85%序列同一性并且表现出降低的效应功能的氨基酸序列。

[0553] 47. 如实施方案38-46中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中所述变体PD-L1多肽经由接头,任选地G4S接头间接连接。

[0554] 48. 如实施方案1-47中任一项所述的变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽是跨膜免疫调节蛋白,其还包含连接至所述变体PD-L1多肽的细胞外结构域(ECD)或其特异性结合片段的跨膜结构域。

[0555] 49. 如实施方案48所述的变体PD-L1多肽,其中所述跨膜结构域包含作为SEQ ID NO:3的残基239-259所列出的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:3的残基239-259具有至少85%序列同一性的功能性变体。

[0556] 50. 如实施方案48或实施方案49所述的变体PD-L1多肽,其还包含连接至所述跨膜结构域的细胞质信号传导结构域。

[0557] 51. 如实施方案50所述的变体PD-L1多肽,其中所述细胞质信号传导结构域包含作为SEQ ID NO:3的残基260-290所列出的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:3的残基260-290具有至少85%序列同一性的功能性变体。

[0558] 52. 如实施方案1-51中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中在体外T细胞测定中,所述变体PD-L1相对于所述未修饰PD-L1增加IFN- $\gamma$  (干扰素- $\gamma$ )表达。

[0559] 53. 如实施方案1-52中任一项所述的变体PD-L1多肽,其中在体外T细胞测定中,所述变体PD-L1相对于所述未修饰PD-L1降低IFN- $\gamma$  (干扰素- $\gamma$ )表达。

[0560] 54. 如实施方案1-55中任一项所述的变体PD-L1多肽,其为去糖基化的。

[0561] 55. 一种免疫调节蛋白,其包含如实施方案1-54中任一项所述的变体PD-L1多肽和第二多肽,所述第二多肽包含IgSF家族成员的免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域或其亲和力修饰的IgSF结构域,所述亲和力修饰的IgSF结构域与所述IgSF家族成员的未修饰或野生型IgSF结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰。

[0562] 56. 如实施方案55所述的免疫调节蛋白,其中所述变体CD112多肽和所述第二多肽直接连接或经由接头间接连接。

[0563] 57. 如实施方案55或实施方案56所述的免疫调节蛋白,其中与所述IgSF家族成员的所述未修饰或野生型IgSF结构域相比,所述IgSF结构域是亲和力修饰的并且表现出改变

的与其同源结合配偶体中的一种或多种的结合。

[0564] 58. 如实施方案57所述的免疫调节蛋白,其中与所述IgSF家族成员的所述未修饰或野生型IgSF结构域相比,所述IgSF结构域表现出增加的与其同源结合配偶体中的一种或多种的结合。

[0565] 59. 如实施方案58-58中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述变体PD-L1多肽是第一PD-L1变体并且所述第二多肽的IgSF结构域是来自如实施方案1-58中任一项所述的第二变体PD-L1多肽的IgSF结构域,其中所述第一PD-L1变体多肽和所述第二PD-L1变体多肽是相同的或不同的。

[0566] 60. 如实施方案58-59中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述变体PD-L1多肽能够特异性结合至PD-1或CD80,并且所述第二多肽的IgSF结构域能够结合至除了被所述PD-L1变体多肽特异性结合的同源结合配偶体之外的同源结合配偶体。

[0567] 61. 如实施方案58-60中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述IgSF结构域来自B7家族的成员。

[0568] 62. 如实施方案58-61中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述IgSF结构域是结合至肿瘤上表达的配体的肿瘤定位部分,或者是结合至与炎性环境相关联的细胞或组织的炎性定位部分。

[0569] 63. 如实施方案62所述的免疫调节蛋白,其中所述配体为B7H6。

[0570] 64. 如实施方案62或实施方案63所述的免疫调节蛋白,其中所述IgSF结构域来自NKp30。

[0571] 65. 如实施方案55-64中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述第二多肽的IgSF结构域是结合至抑制性受体的配体的IgSF结构域或者是其亲和力修饰的IgSF结构域,任选地其中与所述未修饰IgSF结构域与所述抑制性受体的结合相比,所述亲和力修饰的IgSF结构域表现出增加的对所述抑制性受体的结合亲和力和/或结合选择性。

[0572] 66. 如实施方案65所述的免疫调节蛋白,其中:

[0573] 所述抑制性受体为TIGIT、PD-1或CTLA-4;或者

[0574] 所述抑制性受体的配体为PD-L2、CD155、CD112或CD80。

[0575] 67. 如实施方案55-66中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述第二多肽选自:

[0576] (i) 包含SEQ ID NO:47、310或353中任一者中所列出的IgSF的野生型CD155,或包含SEQ ID NO:311-352、354-665、1505-1576、1551-1714中任一者中所列出的IgSF结构域的变体CD155多肽;

[0577] (ii) 包含SEQ ID NO:48、666或761中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型CD112,或包含SEQ ID NO:667-760、762-931、1433-1504中任一者中所列出的IgSF结构域的变体CD112多肽;

[0578] (iii) 包含SEQ ID NO:28、1005或2030中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型CD80,或包含SEQ ID NO:932-964、966-1038、1040-1078、1080-1112、1114-1152中任一者中所列出的IgSF结构域的变体CD80多肽;

[0579] (iv) 包含SEQ ID NO:31、1203或1263中任一者中所列出的IgSF结构域的野生型PD-L2,或包含SEQ ID NO:1204-1254、1256-1331、1333-1407、1409-1432中任一者中所列出的IgSF结构域的变体PD-L2多肽;

[0580] (v) 与 (i) - (iv) 的 SEQ ID NO 中的任一者具有至少 95% 序列同一性并且包含氨基酸取代的氨基酸序列;或者

[0581] (vi) (i) - (v) 中的任一者的特异性结合片段。

[0582] 68. 如实施方案 55-67 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其还包含第三多肽, 所述第三多肽包含 IgSF 家族成员的 IgSF 结构域或其亲和力修饰的 IgSF 结构域, 所述亲和力修饰的 IgSF 结构域与所述 IgSF 家族成员的所述未修饰或野生型 IgSF 结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰, 其中:

[0583] 所述第三多肽与所述第一多肽和/或所述第二多肽是相同的;或者

[0584] 所述第三多肽与所述第一多肽和/或所述第二多肽是不同的。

[0585] 69. 如实施方案 68 所述的免疫调节蛋白, 其中所述第三多肽选自:

[0586] (i) 包含 SEQ ID NO: 47、310 或 353 中任一者中所列出的 IgSF 的野生型 CD155, 或包含 SEQ ID NO: 311-352、354-665、1505-1576、1551-1714 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的变体 CD155 多肽;

[0587] (ii) 包含 SEQ ID NO: 48、666 或 761 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的野生型 CD112, 或包含 SEQ ID NO: 667-760、762-931、1433-1504 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的变体 CD112 多肽;

[0588] (iii) 包含 SEQ ID NO: 28、1005 或 2030 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的野生型 CD80, 或包含 SEQ ID NO: 932-964、966-1038、1040-1078、1080-1112、1114-1152 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的变体 CD80 多肽;

[0589] (iv) 包含 SEQ ID NO: 31、1203 或 1263 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的野生型 PD-L2, 或包含 SEQ ID NO: 1204-1254、1256-1331、1333-1407、1409-1432 中任一者中所列出的 IgSF 结构域的变体 PD-L2 多肽;

[0590] (v) 与 (i) - (iv) 的 SEQ ID NO 中的任一者具有至少 95% 序列同一性并且包含氨基酸取代的氨基酸序列;或者

[0591] (vi) (i) - (v) 中的任一者的特异性结合片段。

[0592] 70. 如实施方案 55-69 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中任选地所述第二多肽或所述第三多肽的所述 IgSF 结构域或其亲和力修饰的 IgSF 结构域是或包含 IgV 结构域。

[0593] 71. 如实施方案 55-70 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述变体 PD-L1 多肽是或包含 IgV 结构域。

[0594] 72. 如实施方案 55-71 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其还包含至少一种额外多肽, 所述额外多肽包含 IgSF 家族成员的 IgSF 结构域或其亲和力修饰的 IgSF 结构域, 所述亲和力修饰的 IgSF 结构域与所述 IgSF 家族成员的所述未修饰或野生型 IgSF 结构域相比包含一个或多个氨基酸修饰。

[0595] 73. 如实施方案 55-67 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述免疫调节蛋白还包含连接至所述变体 PD-L1 多肽或所述第二多肽中的至少一种的多聚化结构域。

[0596] 74. 如实施方案 55-73 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述免疫调节蛋白还包含连接至所述变体 PD-L1 多肽、所述第二多肽和/或所述第三多肽中的至少一种的多聚化结构域, 任选地其中所述多聚化结构域是 Fc 结构域或其具有降低的效应功能的变体。

[0597] 75. 如实施方案 68-75 中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述多聚化结构域促进

异源二聚体形成。

[0598] 76. 一种免疫调节蛋白, 其包含如实施方案38-47中任一项所述的第一变体PD-L1多肽, 其中多聚化结构域是第一多聚化结构域; 和如实施方案38-47中任一项所述的第二变体PD-L1多肽, 其中多聚化结构域是第二多聚化结构域, 其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域相互作用以形成含有所述第一变体PD-L1多肽和所述第二变体PD-L1多肽的多聚体, 任选地其中所述第一变体PD-L1多肽和所述第二变体PD-L1多肽是相同的。

[0599] 77. 一种免疫调节蛋白, 其包含如实施方案73-75中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述多聚化结构域为第一多聚化结构域并且与第二多聚化结构域相互作用以形成包含所述免疫调节蛋白的多聚体。

[0600] 78. 如实施方案77所述的免疫调节蛋白, 其中所述免疫调节蛋白是第一免疫调节蛋白并且第二免疫调节蛋白直接或经由接头间接连接至所述第二多聚化结构域, 其中所述多聚体包含所述第一免疫调节蛋白和所述第二免疫调节蛋白, 任选地其中所述第二免疫调节蛋白是如权利要求68-70中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述多聚化结构域为所述第二多聚化结构域。

[0601] 79. 如实施方案76-78中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述多聚体是二聚体。

[0602] 80. 如实施方案76-79中任一项所述的免疫调节蛋白, 所述免疫调节蛋白是同源二聚体, 任选地其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是相同的。

[0603] 81. 如权利要求77-80中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中:

[0604] 所述第二多肽是变体CD155多肽, 并且所述第一免疫调节蛋白和/或所述第二免疫调节蛋白包含SEQ ID NO:1716-1721中任一者中所列出的序列, 或与SEQ ID NO:1716-1721中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列; 或者

[0605] 或者第二多肽是CD112或CD155并且所述第三多肽是CD112或CD155中的另一者, 并且所述第一免疫调节蛋白和/或所述第二免疫调节蛋白包含SEQ ID NO:1722-1724中任一者中所列出的序列或与SEQ ID NO:1716-1721中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0606] 82. 如权利要求76-79中任一项所述的免疫调节蛋白, 所述免疫调节蛋白是异源二聚体, 任选地其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是不同的和/或能够相互作用以介导异源二聚体形成。

[0607] 83. 如实施方案76-82中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述第一多聚化结构域和/或所述第二多聚化结构域是Fc结构域或其具有降低的效应功能的变体, 任选地其中:

[0608] 所述Fc结构域是人免疫球蛋白的Fc结构域并且/或者所述Fc区是人Fc区, 任选地其中所述Fc区是免疫球蛋白G1(IgG1)或免疫球蛋白G2(IgG2)的Fc区, 任选地在SEQ ID NO:187或SEQ ID NO:188中列出, 任选地其中所述Fc区表现出一种或多种效应功能; 或者

[0609] 所述变体Fc结构域包含在野生型Fc区中的一个或多个氨基酸取代, 任选地其中与野生型Fc区相比, 所述降低的效应功能降低, 任选地其中所述野生型人Fc是人IgG1的Fc。

[0610] 84. 如实施方案76-83中任一项所述的免疫调节蛋白, 其中所述第一多聚化结构域和所述第二多聚化结构域是相同的或不同的。

[0611] 85. 如实施方案74、75、83和84中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述变体Fc区包含:

[0612] 氨基酸取代E233P、L234A、L234V、L235A、L235E、G236del、G237A、S267K或N297G,其中残基编号根据Kabat的EU索引;或者

[0613] 氨基酸取代R292C/N297G/V302C或L234A/L235E/G237A,其中残基编号根据Kabat的EU索引。

[0614] 86. 如实施方案74、75和83-85中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述Fc区或变体Fc区包含氨基酸取代C220S,其中残基编号根据Kabat的EU索引。

[0615] 87. 如实施方案74、75和83-86中任一项所述的免疫调节蛋白,其中所述Fc区或变体Fc区包含K447del,其中残基编号根据Kabat的EU索引。

[0616] 88. 一种缀合物,其包含如实施方案1-54中任一项所述的变体PD-L1或如实施方案55-87中任一项所述的连接至一个部分的免疫调节蛋白。

[0617] 89. 如实施方案88所述的缀合物,其中所述部分是特异性结合至细胞表面上的分子的靶向部分。

[0618] 90. 如实施方案89所述的缀合物,其中所述靶向部分特异性结合至免疫细胞表面上的分子,任选地其中所述免疫细胞是抗原递呈细胞或淋巴细胞。

[0619] 91. 如实施方案89所述的缀合物,其中所述靶向部分是结合至肿瘤表面上的分子的肿瘤定位部分。

[0620] 92. 如实施方案88-91中任一项所述的缀合物,其中所述部分是蛋白质、肽、核酸、小分子或纳米粒子。

[0621] 93. 如实施方案88-93中任一项所述的缀合物,其中所述部分是抗体或抗原结合片段。

[0622] 94. 如实施方案88-94中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物是二价、四价、六价或八价的。

[0623] 95. 如实施方案88-94中任一项所述的缀合物,其为融合蛋白。

[0624] 96. 一种核酸分子,其编码如实施方案1-54中任一项所述的变体PD-L1多肽、如实施方案55-87中任一项所述的免疫调节蛋白或为如实施方案88-95中任一项所述的融合蛋白的缀合物。

[0625] 97. 如实施方案96所述的核酸分子,其为合成的核酸。

[0626] 98. 如实施方案96或实施方案97所述的核酸分子,其为cDNA。

[0627] 99. 一种载体,其包含如实施方案96-98中任一项所述的核酸分子。

[0628] 100. 如实施方案99所述的载体,其为表达载体。

[0629] 101. 如实施方案99或实施方案100所述的载体,其中所述载体为哺乳动物表达载体或病毒载体。

[0630] 102. 一种细胞,其包含如实施方案100或实施方案101所述的载体。

[0631] 103. 如实施方案102所述的细胞,其为哺乳动物细胞。

[0632] 104. 如实施方案102或实施方案103所述的细胞,其为人细胞。

[0633] 105. 一种产生变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白的方法,其包括在宿主细胞中表达所述蛋白质的条件下将如实施方案96-98中任一项所述的核酸分子或如实施方案99-101中

任一项所述的载体引入到所述细胞中。

[0634] 106. 如实施方案105所述的方法,其还包括从所述细胞中分离或纯化所述变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白。

[0635] 107. 一种工程改造表达变体PD-L1变体多肽的细胞的方法,其包括在所述多肽在宿主细胞中表达的条件下将编码如实施方案1-54中任一项所述的变体PD-L1多肽的核酸分子引入到所述细胞中。

[0636] 108. 一种工程改造的细胞,其表达如实施方案1-54中任一项所述的变体PD-L1多肽、如实施方案55-87中任一项所述的免疫调节蛋白、为如权利要求88-95中任一项所述的融合蛋白的缀合物、如实施方案96-98中任一项所述的核酸分子或如实施方案99-101中任一项所述的载体。

[0637] 109. 如实施方案108所述的工程改造的细胞,其中所述变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白由包含编码信号肽的核苷酸序列的核酸编码。

[0638] 110. 如实施方案108或实施方案109所述的工程改造的细胞,其中所述变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白不包含跨膜结构域和/或不在所述细胞的表面上表达。

[0639] 111. 如实施方案108-110中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白从所述工程改造的细胞分泌。

[0640] 112. 如实施方案108或实施方案110所述的工程改造的细胞,其中所述工程改造的细胞包含变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含跨膜结构域并且/或者为如实施方案48-54中任一项所述的跨膜免疫调节蛋白。

[0641] 113. 如实施方案108、110和112中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述变体PD-L1多肽在所述细胞的表面上表达。

[0642] 114. 如实施方案108-113中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述细胞是免疫细胞。

[0643] 115. 如实施方案114所述的工程改造的细胞,其中所述免疫细胞是抗原递呈细胞(APC)或淋巴细胞。

[0644] 116. 如实施方案108-115中任一项所述的工程改造的细胞,其为原代细胞。

[0645] 117. 如实施方案108-116中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0646] 118. 如实施方案108-117中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述细胞是人细胞。

[0647] 119. 如实施方案108-118中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述细胞是淋巴细胞并且所述淋巴细胞是T细胞。

[0648] 120. 如实施方案115所述的工程改造的细胞,其中所述细胞是APC并且所述APC是人工APC。

[0649] 121. 如实施方案108-120中任一项所述的工程改造的细胞,其还包含嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。

[0650] 122. 一种感染剂,其包含编码如实施方案1-54中任一项所述的变体PD-L1多肽、或如实施方案55-84中任一项所述的免疫调节蛋白或为如权利要求88-95中任一项所述的融合蛋白的缀合物的核酸分子。

[0651] 123. 如实施方案122所述的感染剂,其中所编码的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白不包含跨膜结构域和/或不在它所表达的细胞的表面上表达。

[0652] 124. 如实施方案122或实施方案123所述的感染剂,其中所编码的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白从它所表达的细胞分泌。

[0653] 125. 如实施方案122所述的感染剂,其中所编码的变体PD-L1多肽包含跨膜结构域。

[0654] 126. 如实施方案122或实施方案125所述的感染剂,其中所编码的变体PD-L1多肽在它所表达的细胞的表面上表达。

[0655] 127. 如实施方案122-126中任一项所述的感染剂,其中所述感染剂是细菌或病毒。

[0656] 128. 如实施方案127所述的感染剂,其中所述感染剂是病毒并且所述病毒是溶瘤病毒。

[0657] 129. 如实施方案128所述的感染剂,其中所述溶瘤病毒是腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、单纯疱疹病毒、水疱性口腔病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒、细小病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、柯萨奇病毒或牛痘病毒。

[0658] 130. 如实施方案129所述的感染剂,其中所述病毒特异性靶向树突细胞(DC)和/或为树突细胞向性的。

[0659] 131. 如实施方案130所述的感染剂,其中所述病毒是用修饰的辛德毕斯病毒包膜产物假型化的慢病毒载体。

[0660] 132. 如实施方案122-131中任一项所述的感染剂,其还包含编码另一种基因产物的核酸分子,所述另一种基因产物引起靶细胞死亡或者能够增强或提高免疫反应。

[0661] 133. 如实施方案132所述的感染剂,其中所述另一种基因产物选自抗癌剂、抗转移剂、抗血管生成剂、免疫调节分子、免疫检查点抑制剂、抗体、细胞因子、生长因子、抗原、细胞毒性基因产物、促细胞凋亡基因产物、抗细胞凋亡基因产物、细胞基质降解基因、用于组织再生或将人体细胞重新程序化成多能性的基因。

[0662] 134. 一种药物组合物,其包含如实施方案1-47和48-54中任一项所述的变体PD-L1多肽、如实施方案55-87中任一项所述的免疫调节蛋白、如实施方案88-95中任一项所述的缀合物、或如实施方案108-121中任一项所述的工程改造的细胞或如实施方案122-133中任一项所述的感染剂。

[0663] 135. 如实施方案134所述的药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂。

[0664] 136. 如实施方案134或实施方案135所述的药物组合物,其中所述药物组合物是无菌的。

[0665] 137. 一种制品,其包含小瓶中的如实施方案134-136中任一项所述的药物组合物。

[0666] 138. 如实施方案137所述的制品,其中所述小瓶是密封的。

[0667] 139. 一种试剂盒,其包含如实施方案134-136中任一项所述的药物组合物和使用说明书。

[0668] 140. 一种试剂盒,其包含如实施方案137或实施方案138所述的制品和使用说明书。

[0669] 141. 一种调节受试者的免疫反应的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案123-125中任一项所述的药物组合物。

[0670] 142. 一种调节受试者的免疫反应的方法, 其包括向所述受试者施用如实施方案108-121中任一项所述的工程改造的细胞。

[0671] 143. 如实施方案142所述的方法, 其中所述工程改造的细胞对于所述受试者是自体的。

[0672] 144. 如实施方案142所述的方法, 其中所述工程改造的细胞对于所述受试者是同种异体的。

[0673] 145. 如实施方案141-144中任一项所述的方法, 其中调节所述免疫反应治疗所述受试者的疾病或病状。

[0674] 146. 如实施方案141-145中任一项所述的方法, 其中所述免疫反应增加。

[0675] 147. 如实施方案141-146中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用可溶的变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白。

[0676] 148. 如实施方案141-147中任一项所述的方法, 其中所述变体PD-L1多肽或免疫调节蛋白是Fc融合蛋白。

[0677] 149. 如实施方案142-148中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用如实施方案1-47和52-54中任一项所述的变体PD-L1多肽、如实施方案55-87中任一项所述的免疫调节蛋白或如88-95所述的缀合物。

[0678] 150. 如实施方案142-146中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用包含可分泌变体PD-L1多肽的工程改造的细胞。

[0679] 151. 如实施方案142-146和150中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用如实施方案97-100和103-110中任一项所述的工程改造的细胞。

[0680] 152. 如实施方案141、145和146中任一项所述的方法, 其中任选地在编码为可分泌免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽的感染剂感染肿瘤细胞或免疫细胞并且所述可分泌免疫调节蛋白从受感染细胞分泌的条件下, 向所述受试者施用所述感染剂。

[0681] 153. 如实施方案141-152中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病状是肿瘤或癌症。

[0682] 154. 如实施方案141-153中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病状选自黑素瘤、肺癌、膀胱癌、血液恶性肿瘤、肝癌、脑癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、脾癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、子宫癌、胃癌、肌肉骨骼癌、头颈癌、胃肠道癌、生殖细胞癌或内分泌性和神经内分泌癌症。

[0683] 155. 如实施方案141-145中任一项所述的方法, 其中所述免疫反应降低。

[0684] 156. 如实施方案141、145和155中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用包含连接至IgSF结构域或一个部分的变体PD-L1多肽的免疫调节蛋白或缀合物, 所述部分定位至炎性环境的细胞或组织。

[0685] 157. 如实施方案156所述的方法, 其中所述结合分子包含抗体或其抗原结合片段或者包含野生型IgSF结构域或其变体。

[0686] 158. 如实施方案141-145和155-157中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用如实施方案57-76中任一项所述的免疫调节蛋白或如实施方案77-84中任一项所述的缀合物。

[0687] 159. 如实施方案141-145和155中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用为跨

膜免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽。

[0688] 160. 如实施方案142-145和155-159中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用所述包含变体PD-L1多肽的工程改造的细胞,所述变体PD-L1多肽是如实施方案48-87中任一项所述的跨膜免疫调节蛋白。

[0689] 161. 如实施方案141、145和155中任一项所述的方法,其中任选地在编码为跨膜免疫调节蛋白的变体PD-L1多肽的感染剂感染肿瘤细胞或免疫细胞并且所述跨膜免疫调节蛋白在受感染细胞的表面上表达的条件下,向受试者施用所述感染剂。

[0690] 162. 如实施方案141-145和155-161中任一项所述的方法,其中所述疾病或病状是炎性或自身免疫疾病或病状。

[0691] 163. 如实施方案141-145和155-162中任一项所述的方法,其中所述疾病或病状是抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 相关性血管炎、血管炎、自身免疫性皮肤疾病、移植、风湿病、炎性胃肠道疾病、炎性眼病、炎性神经疾病、炎性肺病、炎性内分泌性疾病或自身免疫性血液疾病。

[0692] 164. 如实施方案162或实施方案163所述的方法,其中所述疾病或病状选自炎性肠病、移植、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、多发性硬化症、哮喘、类风湿性关节炎或牛皮癣。

[0693] IX. 实施例

[0694] 以下实施例仅出于例示性目的而被包括在内,并且不旨在限制本发明的范围。

[0695] 实施例1

[0696] IgSF结构域的突变体DNA构建体的生成

[0697] 实施例1描述了用于在酵母表面上翻译和表达的人PD-L1 IgSF结构域的突变体DNA构建体作为酵母展示文库的生成。

[0698] A. 简并文库

[0699] 构建体基于SEQ ID NO:309中列出的野生型人PD-L1序列来生成,所述序列含有如下免疫球蛋白样V型 (IgV) IgV结构域:

[0700] FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARL LKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNA

[0701] 对于靶向用于使用简并密码子完全或部分随机化的特异性残基的文库,编码各种氨基酸取代的简并密码子(诸如特异性混合型碱基)集合使用在以下URL处的算法来生成: rosettadesign.med.unc.edu/SwiftLib/。

[0702] 一般而言,突变的位置选自PDL1::PD1复合物(例如,PDB:4ZQK)的直接晶体结构信息。可替代地,如果同源蛋白复合物的结构是可用的,则可以生成同源模型。使用结构信息,结构查看器(在URL:spdbv.vital-it.ch处可获得)用于鉴定接触或非接触界面残基以用简并密码子诱变。

[0703] 文库设计的下一个步骤为比对人、小鼠、大鼠和猴PD-L1序列以鉴定选择用于诱变的哪些残基是保守性残基。基于此分析,保守性靶残基使用简并密码子突变,所述简并密码子仅指定保守性氨基酸变化加上野生型残基。非保守性残基更具强烈地突变,但也包括野生型残基。还编码野生型残基的简并密码子被布置来避免过量诱变靶蛋白。出于相同原因,仅靶向多至20个位置来对每个文库进行诱变。突变分析集中于接触和非接触界面残基,其处于结合表面的6 Å内,其侧链朝向配体/相对结构。为了生成编码靶向文库的DNA,长度多

至80个核苷酸并在靶向诱变的残基位置处含有简并密码子的重叠寡核苷酸从Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) 订购。将寡核苷酸溶解于无菌水中,以等摩尔比率混合,加热至95°C持续五分钟并缓慢冷却至室温以退火。然后使用退火至IgV结构域基因序列的开头和结尾的IgV结构域特异性寡核苷酸引物来生成第一PCR产物。然后使用IgV结构域特异性寡核苷酸来扩增来自前一个步骤的100ng PCR产物以生成总计至少12μg DNA用于每次电穿孔,所述寡核苷酸与pBYDS03克隆载体 (Life Technologies, USA) 重叠至少40bp,超过并包括BamHI和KpnI克隆位点。两种PCR是使用OneTaq 2x PCR主混合物 (New England Biolabs, USA) 的聚合酶链反应 (PCR)。第二PCR产物使用PCR纯化试剂盒 (Qiagen, Germany) 纯化并重悬浮于无菌去离子水中。可替代地,使用长度多至200bp的超聚体 (Integrated DNA Technologies) 与大引物PCR (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146891/pdf/253371.pdf>) 结合以生成更大的简并密码子片段,其不能容易地使用多个小重叠引物来生成。在使用大引物PCR生成全长产物之后,再使用含有与修饰的pBYDS03克隆变体的40bp重叠区域的DNA引物对突变体IgV结构域文库进行PCR扩增,以用于同源重组到酵母中。

[0704] 为了制备文库插入物,用BamHI和KpnI限制性酶 (New England Biolabs, USA) 消化pBYDS03载体,并且对大载体片段进行凝胶纯化并将其溶解于无菌去离子水中。通过将12μg 文库DNA插入物与4μg线性化载体混合在总体积50μl的去离子无菌水中来生成用于下一个步骤的准备电穿孔的DNA。生成靶向文库的替代性方法为使用含有简并密码子的寡核苷酸对靶IgV结构域进行定点诱变 (Multisite kit, Agilent, USA)。此方法用于生成仅靶向几种用于诱变的DNA的特异性片段的子文库。在这些情况下,将子文库混合,之后进行选择步骤。一般而言,文库大小的范围为10E7 (10<sup>7</sup>) 至10E8 (10<sup>8</sup>) 个克隆,不同的是子文库的范围仅为10E4 (10<sup>4</sup>) 至10E5 (10<sup>5</sup>)。

[0705] B.随机文库

[0706] 还构建随机文库以鉴定SEQ ID NO:309中所列出的PD-L1 (含有对应于UniProt登录号Q9NZQ7中所列出的残基19-132的PD-L1 IgV结构域,由野生型序列的相邻C端和C端残基侧接) 的IgV结构域的变体。在酵母展示载体pBYDS03的BamHI与KpnI位点之间克隆编码野生型IgV结构域的DNA。然后用Genemorph II试剂盒 (Agilent, USA) 诱变DNA以生成每个文库变体平均三至五个氨基酸变化。然后通过两步PCR扩增诱变的DNA并且如上文对于靶向文库所描述地进行进一步处理。

[0707] 实施例2

[0708] 将DNA文库引入到酵母中

[0709] 实施例2描述了将PD-L1 DNA文库引入到酵母中。

[0710] 为了将简并和随机文库DNA引入到酵母中,制备酵母菌株BJ5464 (ATCC.org; ATCC号208288) 的能够电穿孔的细胞并且在Gene Pulser II (Biorad, USA) 上使用来自基本上如上文所述的步骤的准备电穿孔的DNA进行电穿孔 (Colby, D. W. 等人. 2004 Methods Enzymology 388, 348-358)。唯一例外在于,转化的细胞在非诱导性微小选择性SCD-Leu培养基中生长以适应由修饰的质粒pBYDS03携带的LEU2选择性标记物。一升SCD-Leu培养基由14.7克柠檬酸钠、4.29克柠檬酸一水合物、20克右旋糖、6.7克酵母氮源和1.6克无亮氨酸的酵母合成缺陷培养基补充剂组成。培养基在使用之前使用0.22μm真空过滤装置进行过滤灭

菌。

[0711] 文库大小通过在SCD-Leu琼脂板上接种新鲜回收的细胞的系列稀释液并且然后由来自每个板生成至少50个菌落的接种的单个菌落数目推导文库大小来确定。使电穿孔的培养物的其余部分生长至饱和并且将来自此培养物的细胞再一次继代培养1/100到相同培养基中并使其生长至饱和,以使未转化的细胞的部分最小化并允许从可能含有两个或更多个文库变体的细胞分离质粒。为了维持文库多样性,使用含有比计算的文库大小多至少10x细胞的接种物进行此继代培养步骤。将来自第二饱和培养物的细胞重悬浮于含有无菌25% (重量/体积) 甘油的新鲜培养基中至10E10/mL的密度并在-80°C下冷冻并储存(冷冻的文库储液)。

[0712] 实施例3

[0713] 酵母选择

[0714] 实施例3描述了表达PD-L1的亲和力修饰的变体的酵母细胞的选择。

[0715] 由个别文库储液解冻等于至少10倍所评估文库大小的细胞数目,将其以0.1x 10E6个细胞/mL悬浮于非诱导性SCD-Leu培养基中,并使其生长过夜。次日,在2000RPM下将等于10倍文库大小的细胞数目离心两分钟并且将其以0.5x 10E6个细胞/mL重悬浮于诱导性SCDG-Leu培养基中。一升SCDG-Leu诱导培养基由溶解于水中并通过0.22μm膜过滤装置灭菌的5.4克Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、8.56克NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、20克半乳糖、2.0克右旋糖、6.7克酵母氮源和1.6克无亮氨酸的酵母合成缺陷培养基补充剂组成。使培养物在诱导培养基中在室温下生长1天,以诱导文库蛋白在酵母细胞表面上表达。

[0716] 使用装载有同源配体的蛋白A磁珠(New England Biolabs, USA)分选两次至三次细胞以减少非结合物并富集具有结合其外源重组相对结构蛋白的能力的所有变体PD-L1变体。然后在此之后使用外源相对结构蛋白染色进行一至两轮荧光活化细胞分选(FACS),以富集显示改善的结合物的酵母细胞部分。磁珠富集和通过流式细胞术进行的选择基本上如Miller K.D.等人,Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30,2008年7月所述进行。

[0717] 使用PD-L1文库,靶配体蛋白是人rPD-1.Fc(即,重组PD-1-Fc融合蛋白,来自R&D Systems, USA)。蛋白A磁珠获得自New England Biolabs, USA。对于双色流式细胞术分选,使用Bio-Rad S3e分选仪。PD-L1展示水平使用以Alexafluor 488(Life Technologies, USA)标记的抗凝集素抗体监测。使用PE缀合的人Ig特异性山羊Fab(Jackson ImmunoResearch, USA)检测Fc融合蛋白与rPD-1.Fc的配体结合。使用前向散射(FSC)/侧向散射(SSC)参数选通双峰酵母,并且分选通道是基于在FL2中检测到的更高配体结合,其在FL1中具有更多限制的标记表达。可替代地,使用人rCD80.Fc(即,人重组CD80 Fc融合蛋白,来自R&D Systems, USA)进行选择。主要如上文对于PD-1所述进行选择。

[0718] 测定来自流式细胞术分选的酵母输出物的更高特异性结合亲和力。对分选输出酵母进行扩增和再诱导以表达它们所编码的特定IgSF亲和力修饰的结构域变体。然后可以通过流式细胞术将此群体与亲本野生型酵母菌株或任何其他选择的输出物(诸如珠粒输出酵母群体)相比较。

[0719] 对于PD-L1,通过用抗HA(凝集素)标记表达和辅助抗人Fc对每个群体进行双重染色以检测配体结合来比较第二轮FACS输出物(F2)与亲本对rPD-1.Fc或rCD80.Fc的结合。

[0720] 所选择的变体PD-L1 IgV结构域被进一步格式化为融合蛋白并且如下文所述测试结合和功能活性。

[0721] 实施例4

[0722] 重新格式化选择输出物为Fc融合物和各种免疫调节蛋白类型

[0723] 实施例4描述了实施例3中鉴定的选择输出物重新格式化为含有融合至Fc分子的PD-L1的亲和力修饰的(变体)免疫球蛋白样V型(IgV)结构域(变体IgV结构域-Fc融合分子)的免疫调节蛋白。

[0724] 使来自最后流式细胞术PD-L1分选的输出物细胞集合在SCD-Leu培养基中生长至最终密度。使用酵母质粒DNA分离试剂盒(Zymoresearch, USA)分离来自各输出物的质粒DNA。对于Fc融合物, 使用具有适用于克隆到选择的Fc融合载体中的添加的限制性位点的PCR引物来由质粒DNA制备物分批扩增突变体靶IgV结构域的编码DNA。在限制性消化之后, 将PCR产物连接到Fc融合载体中, 之后热休克转化到大肠杆菌菌株XL1 Blue(Agilent, USA)或NEB5 $\alpha$ (New England Biolabs, USA)中, 如供应商所指示的。可替代地, 使用在任一端上含有与Fc融合载体的40bp重叠区域的引物对输出物进行PCR扩增, 以使用Gibson Assembly Mastermix(New England Biolabs)进行体外重组, 随后将其用于热休克转化到大肠杆菌菌株NEB5 $\alpha$ 中。Fc融合载体的实例为pFUSE-hIgG1-Fc2(Invivogen, USA)。

[0725] 将转化反应稀释液接种在含有100 $\mu$ g/mL羧苄西林的LB-琼脂(Teknova, USA)上, 以分离单个菌落用于选择。然后使来自每次转化的多至96个菌落在96孔板中在37℃下在含有100 $\mu$ g/mL羧苄西林的LB-液体培养基(Teknova目录号L8112)中生长至饱和, 持续过夜, 并且提交来自每个孔的小等分试样以用于对IgV结构域插入物进行DNA测序, 以便鉴定所有克隆中的突变。使用由服务提供者(Genewiz; South Plainfield, NJ)提供的方法进行用于DNA测序的样品制备。在取出用于DNA测序的样品之后, 然后将甘油添加到剩余培养物中使最终甘油含量为25%, 并且将板储存在-20℃下用于未来用作母板(参见下文)。可替代地, 通过使用一次性96孔复制器(VWR, USA)从生长的液体培养物重复接种到固体琼脂板来生成用于DNA测序的样品。将这些板孵育过夜以生成生长批次, 并且将所述板提交至Genewiz, 如Genewiz所指示。

[0726] 在通过分析Genewiz生成的DNA测序数据来鉴定感兴趣的克隆之后, 从母板回收感兴趣的克隆并使其在含有100 $\mu$ g/mL羧苄西林的液体LB-液体培养基(Teknova, USA)中单独生长至一定密度, 并且然后使用标准试剂盒诸如PureYield Plasmid Miniprep System(Promega, USA)或MidiPlus试剂盒(Qiagen)将培养物用于制备每种克隆的质粒DNA。由Genewiz测序数据鉴定感兴趣的克隆通常涉及以下步骤。首先, 从Genewiz网站下载DNA序列数据文件。然后手动绘制所有序列, 使得它们在IgV结构域编码区开始时开始。然后使用在以下URL处可获得的合适程序分批翻译绘制的序列:[www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)。然后使用在以下URL处可获得的合适程序比对翻译的序列:[multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)。可替代地, 处理Genewiz序列以使用Ugene软件(<http://ugene.net>)生成比对。

[0727] 然后使用以下标准由比对鉴定感兴趣的克隆:1.)相同克隆在比对中出现至少两次, 并且2.)突变在比对中并且优选地在不同克隆中出现至少两次。假定满足这些标准中的至少一者的克隆为由于改进的结合而通过分选方法富集的克隆。

[0728] 为了生成为含有PD-L1 IgV结构域的亲和力修饰变体的Fc融合蛋白(例如,变体PD-L1 IgV-Fc)的重组免疫调节蛋白,生成编码DNA以编码如下蛋白质:变体(突变体)IgV结构域后接三个丙氨酸(AAA)的接头后接人IgG1 Fc,所述人IgG1 Fc在SEQ ID NO:1157中列出,含有通过EU编号的突变R292C、N297G和V302C(对应于参考在SEQ ID NO:187中所列出的野生型人IgG1 Fc的R77C、N82G和V87C)。由于构建体不包括可以与半胱氨酸形成共价键的任何抗体轻链,所以人IgG1 Fc在通过EU编号的位置220(C220S)处含有半胱氨酸残基置换为丝氨酸残基(对应于参考SEQ ID NO:187中所列出的野生型或未修饰Fc的位置5(C5S))。

[0729] 实施例5

[0730] Fc融合物的表达和纯化

[0731] 实施例5描述了如以上实施例所述的含有变体IgV PD-L1的Fc融合蛋白的高通量表达和纯化。

[0732] 重组变体Fc融合蛋白使用Expi293表达系统(Invitrogen, USA)由悬浮适应的人胚肾(HEK) 293细胞产生。将4 $\mu$ g来自前一个步骤的每种质粒DNA添加到200 $\mu$ L Opti-MEM(Invitrogen, USA)中,同时将10.8 $\mu$ L ExpiFectamine单独添加到另一个200 $\mu$ L Opti-MEM中。5分钟后,将200 $\mu$ L质粒DNA与200 $\mu$ L ExpiFectamine混合并且另外再孵育20分钟,之后将此混合物添加到细胞中。将一千万个Expi293细胞分配到4mL体积的Expi293培养基(Invitrogen, USA)的无菌10mL锥形底深24孔生长板(Thomson Instrument Company, USA)的单个孔中。将板在120RPM下在设置为95%湿度和8%CO<sub>2</sub>的哺乳动物细胞培养孵育器中振动5天。在5天孵育之后,使细胞成团并保留培养物上清液。

[0733] 使用高通量96孔过滤板(Thomson目录号931919)由上清液纯化蛋白质,每个孔装载有60 $\mu$ L的Mab SelectSure沉淀珠粒(GE Healthcare目录号17543801)。用四个连续200 $\mu$ L 50mM乙酸盐pH 3.3部分洗脱蛋白质。每个部分的pH用4 $\mu$ L 2M Tris pH 8.0调整至高于pH 5.0。合并各部分并且使用通过Nanodrop仪器(Thermo Fisher Scientific, USA)测量的280nm吸光度定量,并且通过在变性和非还原条件并且随后在凝胶电泳下将5 $\mu$ g蛋白质装载在NUPAGE预制聚丙烯酰胺凝胶(Life Technologies, USA)上来评定蛋白质纯度。然后使用标准考马斯染色在凝胶中对蛋白质进行可视化。

[0734] 实施例6

[0735] 评定含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的结合

[0736] A.与细胞表达的相对结构的结合

[0737] 此实施例描述了来自以上实施例的纯化蛋白质的Fc融合物结合研究以评定PD-L1结构域变体免疫调节蛋白对同源结合配偶体的特异性和亲和力。

[0738] 使用Jurkat/IL-2报告基因细胞(购自Promega Corp. USA),然后对其进行转导以稳定表达人PD-1(Jurkat/PD-1细胞)来进行结合研究。为了通过流式细胞术进行染色,将100,000个Jurkat/PD-1细胞或阴性对照(仅Jurkat)接种在96孔圆底板中。使细胞离心并重新悬浮于染色缓冲液(PBS(磷酸盐缓冲盐水)、1% BSA(牛血清白蛋白)和0.1%叠氮化钠)中20分钟以阻断非特异性结合。然后,再次使细胞离心并重新悬浮于含有100nM至46pM每种候选PD-L1变体Fc融合蛋白的50 $\mu$ L染色缓冲液中。作为对照,还测试融合至Fc的野生型PD-L1(由一个IgV和一个IgC结构域构成)的全细胞外结构域(“PD-L1的全长ECD”)和野生型PD-L1的IgV结构域(“野生型PD-L1 IgV”)。在冰上进行45分钟初级染色,之后在150 $\mu$ L染色缓冲液

中洗涤细胞两次。将PE缀合的抗人Fc (Jackson ImmunoResearch, USA) 在50 $\mu$ L染色缓冲液中以1:150稀释并添加到细胞中, 并且在冰上再孵育30分钟。洗涤两次第二抗体, 将细胞以4% 甲醛/PBS固定, 并且在Intellicyt流式细胞仪 (Intellicyt Corp., USA) 上分析样品。

[0739] 计算平均荧光强度 (MFI) 并且用FlowJo Version 10 (FlowJo Version 10, USA) 与作为对照的野生型PD-L1 IgV进行比较。示例性测试的变体PD-L1 IgV-Fc融合分子的结合研究的结果在表10中示出。表10还指示以上所述的筛选中选择的变体PD-L1的IgV中的氨基酸取代(置换或由“ins”表示的插入)。在表中, IgV结构域中的示例性氨基酸取代和插入由与SEQ ID NO:30或1728中所列出的相应参考未修饰成熟PD-L1细胞外结构域 (ECD) 序列中的氨基酸位置相对应的氨基酸位置号指示。氨基酸位置在中间指示, 其中对应的未修饰(例如, 野生型)氨基酸列出在编号之前并且所鉴定的变体氨基酸取代(或由“ins”表示的插入)列出在编号之后。第2列列出了变体IgV-Fc融合分子中所含有的每种变体IgV结构域的SEQ ID NO识别符。

[0740] 还示出了结合活性, 如通过50nM的每种变体Fc融合分子与Jurkat/PD-1细胞的结合的平均荧光强度 (MFI) 值以及所述MFI与不含有一个或多个氨基酸取代的对应未修饰(野生型) IgV-Fc融合分子与PD-1的结合相比的比率所测量的。如表10所示, 选择能够鉴定许多PD-L1 IgSF (例如, IgV) 结构域变体, 所述变体被亲和力修饰以表现出增加的对PD-1的结合。

表 10：所选的 PD-L1 变体和结合数据。

PD-L1 突变	SEQ ID NO (IgV)	与 Jurkat/PD-1 细胞的结合	
		在 50 nM 下的 MFI	相对于野生型 PD-L1 IgV-Fc 的倍数增加
K28N, M41V, N45T, H51N, K57E	244	12585	2.4
I20L, I36T, N45D, I47T	245	3119	0.6
I20L, M41K, K44E	246	9206	1.8
P6S, N45T, N78I, I83T	247	419	0.1
N78I	248	2249	0.4
M41K, N78I	249	产生很少至不产生蛋白质	
N17D, N45T, V50A, D72G	255	产生很少至不产生蛋白质	
N45T, V50A	257	23887	4.6
I20L, N45T, N78I	258	29104	5.6
N45T, N78I	250	24865	4.7
I20L, N45T	251	24279	4.6
I20L, N45T, V50A	259	34158	6.5
N45T	252	6687	1.3
M41K	253	5079	1.0
M41V, N45T	260	产生很少至不产生蛋白质	
M41K, N45T	261	产生很少至不产生蛋白质	
A33D, S75P, D85E	262	685	0.1
M18I, M41K, D43G, H51R, N78I	263	20731	4.0
V11E, I20L, I36T, N45D, H60R, S75P	264	3313	0.6
A33D, V50A		产生很少至不产生蛋白质	
S16G, A33D, K71E, S75P	266	产生很少至不产生蛋白质	
E27G, N45T, M97I	267	881	0.2
E27G, N45T, K57R	268	5022	1.0
A33D, E53V	269	650	0.1
D43G, N45D, V58A	270	63960	12.2
E40G, D43V, N45T, V50A	271	809	0.2
Y14S, K28E, N45T	272	16232	3.1
A33D, N78S	273	1725	0.3
A33D, N78I	274	8482	1.6
A33D, N45T	275	17220	3.3
E27G, N45T, V50A	277	25267	4.8
N45T, V50A, N78S	278	28572	5.4
N45T, V50A	257	18717	3.6
I20L, N45T, V110M	279	464	0.1
I20L, I36T, N45T, V50A	280	7658	1.5
N45T, L74P, S75P	281	5251	1.0
N45T, S75P	282	12200	2.3
S75P, K106R	283	388	0.1
S75P	284	1230	0.2

[0741]

表 10：所选的 PD-L1 变体和结合数据。

PD-L1 变体	SEQ ID NO (IgV)	与 Jurkat/PD-1 细胞的结合	
		在 50 nM 下的 MFI	相对于野生型 PD-L1 IgV-Fc 的倍数增加
A33D, S75P	285	306	0.1
A33D, S75P, D104G	286	251	0.0
A33D, S75P	287	1786	0.3
I20L, E27G, N45T, V50A	288	29843	5.7
I20L, E27G, D43G, N45D, V58A, N78I	289	69486	13.3
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I	290	72738	13.9
I20L, A33D, D43G, N45D, V58A, N78I	291	80205	15.3
I20L, D43G, N45D, N78I	292	67018	12.8
E27G, N45T, V50A, N78I	293	30677	5.9
N45T, V50A, N78I	294	32165	6.1
V11A, I20L, E27G, D43G, N45D, H51Y, S99G	295	73727	14.1
I20L, E27G, D43G, N45T, V50A	296	36739	7.0
I20L, K28E, D43G, N45D, V58A, Q89R, G101G-ins (G101GG)	1727	80549	15.4
I20L, I36T, N45D	298	16870	3.2
I20L, K28E, D43G, N45D, E53G, V58A, N78I	299	139	0.0
A33D, D43G, N45D, V58A, S75P	300	58484	11.2
K23R, D43G, N45D	301	67559	12.9
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I, D90G, G101D	302	259	0.0
D43G, N45D, L56Q, V58A, G101G-ins (G101GG)	303	88277	16.8
I20L, K23E, D43G, N45D, V58A, N78I	304	89608	17.1
I20L, K23E, D43G, N45D, V50A, N78I	305	88829	16.9
T19I, E27G, N45I, V50A, N78I, M97K	306	25496	4.9
I20L, M41K, D43G, N45D	307	599	0.1
K23R, N45T, N78I	308	84980	16.2
全长 ECD PD-L1	-	18465	3.5
野生型 PD-L1 IgV	309	5243	1.0
抗 PD-1 单克隆抗体(纳武单抗)	-	79787	15.2
人 IgG	-	198	0.0

[0742]

[0743] B.ForteBio Octet结合测定

[0744] 使用ForteBio结合测定评定PD-L1结构域变体免疫调节蛋白与结合配偶体PD-1和CD80之间的蛋白质-蛋白质相互作用。将PD-1或CD80单个地加载到抗人捕获传感器

(ForteBio Octet AHC) 上, 并且将PD-L1的全长野生型(未修饰)ECD的Fc融合物、野生型(未修饰)PD-L1 IgV-Fc融合分子或变体PD-L1 IgV-Fc融合分子在100nM的单一浓度下结合至受体。

[0745] 确定用变体IgV-Fc融合分子测试的每种结合蛋白的抗人捕获传感器的加载响应, 并且与野生型PD-L1 IgV-Fc的响应进行比较。还确定每种变体PD-L1 IgV-Fc融合分子对PD-1和CD80的响应之间的比率, 如表11A-B中所列出的。在以下每个表中, 第2列列出了测试的变体IgV-Fc融合分子中所含有的每种变体IgV结构域的SEQ ID NO识别符。

[0746] 如表11A-B所示, 选择能够鉴定许多PD-L1 IgSF(例如, IgV)结构域变体, 所述变体被亲和力修饰以表现出改变的对PD-1和/或CD80的结合。

**表 11A: ForteBio 结合数据。**

PD-L1 突变	SEQ ID NO (IgV)	PD-1: Fc 响应	相对于 WT PD-L1 IgV-Fc 的倍数	CD80:F c 响应	相对于 WT PD-L1 IgV-Fc 的倍数	PD-1: CD80 比率
K28N, M41V, N45T, H51N, K57E	244	1.16	0.8	0.49	0.6	2.4
I20L, I36T, N45D, I47T		0.73	0.5	0.52	0.7	1.4
I20L, I36T, N45D		1.25	0.9	0.61	0.8	2.0
I20L, M41K, K44E		2.26	1.6	1.67	2.1	1.4
P6S, N45T, N78I, I83T		0.27	0.2	0.23	0.3	1.2
I20L, F49S		0.79	0.6	0.58	0.7	1.4
N78L		2.23	1.6	1.55	2.0	1.4
N45T, V50A		1.90	1.4	0.79	1.0	2.4
I20L, N45T, N78I		2.34	1.7	1.85	2.3	1.3

[0747]

表 11A: ForteBio 结合数据。

PD-L1 突变	SEQ ID NO (IgV)	PD-1: Fc 响应	相对于 WT PD-L1 IgV-Fc 的倍数	CD80:F c 响应	相对于 WT PD-L1 IgV-Fc 的倍数	PD-1: CD80 比率
N45T, N78I	250	2.38	1.7	1.73	2.2	1.4
I20L, N45T	251	2.30	1.7	1.58	2.0	1.5
I20L, N45T, V50A	259	2.32	1.7	1.22	1.5	1.9
N45T	252	1.34	1.0	0.65	0.8	2.0
M41k	253	2.25	1.6	1.70	2.2	1.3
A33D, S75P, D85E	262	0.84	0.6	0.55	0.7	1.5
M18I, M41K, D43G, H51R, N78I	263			2.14	2.7	1.1
		2.33	1.7			
V11E, I20L, I36T, N45D, H60R, S75P	264	0.93	0.7	0.56	0.7	1.7
E27G, N45T, M97I	267	2.10	1.5	1.05	1.3	2.0
E27G, N45T, K57R	268	2.31	1.7	1.57	2.0	1.5
A33D, E53V	269	1.09	0.8	0.62	0.8	1.7
D43G, N45D, V58A	270	1.55	1.1	0.71	0.9	2.2
Y14S, K28E, N45T	272	2.28	1.7	1.18	1.5	1.9
A33D, N78S	273	1.61	1.2	0.79	1.0	2.0
A33D, N78I	274	2.35	1.7	1.57	2.0	1.5
A33D, N45T	275	1.90	1.4	0.80	1.0	2.4
A33D, N45T, N78I	276	2.34	1.7	1.59	2.0	1.5
E27G, N45T, V50A	277	2.26	1.6	1.22	1.5	1.9
N45T, V50A, N78S	278	2.23	1.6	0.88	1.1	2.5
N45T, V50A	257	1.79	1.3	0.63	0.8	2.8
I20L, N45T, V110M	279					
		0.38	0.3	0.27	0.3	1.4
I20L, I36T, N45T, V50A	280					
		2.27	1.7	0.96	1.2	2.4
N45T, L74P, S75P	281	0.90	0.7	0.44	0.6	2.0
N45T, S75P	282	2.31	1.7	1.24	1.6	1.9
S75P, K106R	283	0.84	0.6	0.45	0.6	1.9
S75P	284	2.09	1.5	1.09	1.4	1.9
A33D, S75P	285	0.72	0.5	0.43	0.5	1.7
A33D, S75P, D104G	286					
		0.71	0.5	0.66	0.8	1.1
A33D, S75P	287	2.07	1.5	0.93	1.2	2.2
全长 ECD PD-L1	-	2.53	1.8	1.46	1.8	1.7
野生型 PD-L1 IgV	309	1.37	1.0	0.79	1.0	1.7

[0749]

表 11B. ForteBio 结合数据。

PD-L1 突变	SEQ ID NO (IgV)	PD-1: Fc 响应	相对于 WT PD-L1 IgV 的倍数	CD80:Fc 响应	相对于 WT PD-L1 IgV 的倍数	PD-1 : CD80 比率
I20L, E27G, N45T, V50A	288	1.08	2.0	0.39	3.2	2.7
I20L, E27G, D43G, N45D, V58A, N78I	289	1.20	2.2	0.62	5.1	1.9
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I	290	1.27	2.4	0.54	4.5	2.3
I20L, A33D, D43G, N45D, V58A, N78I	291	1.22	2.3	0.47	3.9	2.6
I20L, D43G, N45D, N78I	292	1.25	2.3	0.49	4.0	2.6
E27G, N45T, V50A, N78I	293	1.12	2.1	0.48	3.9	2.4
N45T, V50A, N78I	294	1.24	2.3	0.31	2.5	4.0
V11A, I20L, E27G, D43G, N45D, H51Y, S99G	295	1.20	2.2	0.28	2.3	4.3
I20L, E27G, D43G, N45T, V50A	296	1.10	2.1	0.55	4.5	2.0
I20L, K28E, D43G, N45D, V58A, Q89R, G101G-ins (G101GG)	1727	1.20	2.2	0.06	0.5	18.9
I20L, I36T, N45D	298	0.72	1.3	0.10	0.8	7.2
A33D, D43G, N45D, V58A, S75P	300	0.67	1.2	0.09	0.7	7.5
K23R, D43G, N45D	301	1.08	2.0	0.27	2.2	4.1
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I, D90G, G101D	302	-0.02	0.0	-0.04	-0.3	0.5
D43G, N45D, L56Q, V58A, G101G-ins (G101GG)	303	1.24	2.3	0.07	0.6	18.4
I20L, K23E, D43G, N45D, V58A, N78I	304	1.20	2.2	0.37	3.0	3.3
I20L, K23E, D43G, N45D, V50A, N78I	305	1.14	2.1	0.21	1.7	5.4
T19I, E27G, N45I, V50A, N78I, M97K	306	1.12	2.1	0.72	5.9	1.6
I20L, M41K, D43G, N45D	307	0.01	0.0	0.02	0.2	0.6
K23R, N45T, N78I	308	1.19	2.2	0.53	4.3	2.3
全长 ECD PD-L1	-	1.44	-	0.80	-	-
野生型 PD-L1 IgV	309	0.54	1.0	0.12	1.0	4.4

[0751] 实施例7

[0752] 使用Jurkat/IL2/PD-1报告基因测定评定含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的

## 生物活性

[0753] 此实施例描述了评定PD-L1结构域变体免疫调节蛋白阻断PD-1的生物活性的Jurkat/IL2/PD-1报告基因测定。

[0754] 将在其表面上表达IL-2-荧光素酶报告基因和PD-1的Jurkat效应细胞以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL悬浮于Jurkat测定缓冲液(RPMI1640+5%FBS)中,并且添加 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗CD28。然后将Jurkat细胞以总计100,000个细胞/孔在 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 下接种。

[0755] 将变体PD-L1 IgV-Fc融合分子和对照蛋白(全长PD-L1-Fc、野生型PD-L1 IgV-Fc)或抗PD-1单克隆抗体(纳武单抗)稀释至200nM,并且将 $25 \mu\text{L}$ 的每种蛋白质添加至接种的Jurkat细胞。将具有PD-L1变体IgV-Fc融合分子或对照蛋白的Jurkat细胞在室温下孵育15分钟。将展示细胞表面抗CD3单链Fv(OKT3)和PD-L1的K562来源的人工抗原递呈细胞(aAPC)细胞增加至 $0.67 \times 10^6$ 个细胞/mL,并且将 $25 \mu\text{L}$ 添加到每个孔中,使得每个孔的最终体积为 $100 \mu\text{L}$ 。每个孔具有6:1的Jurkat:K562细胞的最终比率, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗CD28和50nM的测试蛋白浓度。将Jurkat细胞和K562细胞在 $37^\circ\text{C}$ 下在潮湿5% $\text{CO}_2$ 孵育室中孵育5-6小时。然后从孵育器取出板并使其适应室温15分钟。将 $100 \mu\text{L}$ 细胞裂解物和荧光素酶底物溶液(BioGlo®, Promega Corp, USA)添加到每个孔中并且将所述板在室温下放置在轨道式震荡器上10分钟。使用BioTek Cytation光度计(BioTek Corp., USA)以1秒/孔整合时间测量发光。

[0756] 确定每种变体PD-L1 IgV Fc的平均相对发光值,并且计算每种变体与野生型PD-L1 IgV-Fc变体蛋白相比的IL-2报告基因信号的倍数增加。

[0757] 如表12所示,与抗CD3/PD-L1 aAPC和变体PD-L1 IgV-Fc分子共同培养的表达PD-1和IL-2-荧光素酶报告基因的Jurkat效应细胞的荧光素酶活性被改变(增加和降低)。发光值的差异证明变体PD-L1 IgV-Fc分子结合至PD-1并且能够阻断PD-1和PD-L1的相互作用。更高的值指示对PD-1介导的抑制的阻断增加。在表中,第2列列出了测试的变体IgV-Fc融合分子中所含有的每种变体IgV结构域的SEQ ID NO识别符。

表 12. Jurkat/IL2/PD-1 报告基因测定

PD-L1 突变	SEQ ID NO (IgV)	平均相对发光单位	IL2 报告基因信号的倍数增加
K28N, M41V, N45T, H51N, K57E	244	2348.00	1.05
I20L, I36T, N45D, I47T	245	2249.50	1.01
I20L, I36T, N45D	254	2109.50	0.95
I20L, M41K, K44E	246	2220.50	1.00
P6S, N45T, N78I, I83T	247	2246.00	1.01
I20L, F49S	256	2226.50	1.00
N78L	248	2243.50	1.01
N45T, V50A	257	2076.50	0.93
I20L, N45T, N78I	258	2066.00	0.93
N45T, N78I	250	2179.50	0.98
I20L, N45T	251	2176.50	0.98
I20L, N45T, V50A	259	2226.50	1.00
N45T	252	2193.00	0.98
M41K	253	2154.00	0.97
A33D, S75P, D85E	262	2217.50	0.99
M18I, M41K, D43G, H51R, N78I	263	2124.50	0.95
V11E, I20L, I36T, N45D, H60R, S75P	264	2283.00	1.02
E27G, N45T, M97I	267	1971.00	0.88
E27G, N45T, K57R	268	2034.00	0.91
A33D, E53V	269	2142.00	0.96
D43G, D45D, V58A	270	2464.00	1.11
E40G, D43V, N45T, V50A	271	2216.00	0.99
Y14S, K28E, N45T	272	2151.50	0.97
A33D, N78S	273	2056.50	0.92
A33D, N78I	274	2057.00	0.92
A33D, N45T	275	1995.00	0.90
A33D, N45T, N78I	276	1973.00	0.89
E27G, N45T, V50A	277	2004.00	0.90
N45T, V50A, N78S	278	2224.50	1.00
N45T, V50A	257	2201.50	0.99
I20L, N45T, V110M	279	2210.00	0.99
I20L, I36T, N45T, V50A	280	2157.50	0.97

[0758]

表 12. Jurkat/IL2/PD-1 报告基因测定

PD-L1 突变	SEQ ID NO (IgV)	平均相对发光单位	IL2 报告基因信号的倍数增加	
N45T, L74P, S75P	281	2031.00	0.91	
N45T, S75P	282	1963.50	0.88	
A33D, V50A	265	2251.50	1.01	
S75P, K106R	283	2127.50	0.95	
S75P	284	2233.50	1.00	
A33D, S75P	285	2168.50	0.97	
A33D, S75P, D104G	286	2168.50	0.97	
A33D, S75P	287	2044.50	0.92	
I20L, E27G, N45T, V50A	288	1804.50	0.81	
I20L, E27G, D43G, N45D, V58A, N78I	289	4588.50	2.06	
I20L, D43G, N45D, V58A, N78I	290	4191.50	1.88	
I20L, A33D, D43G, N45D, V58A, N78I	291	4384.50	1.97	
I20L, D43G, N45D, N78I	292	3471.50	1.56	
E27G, N45T, V50A, N78I	293	1960.00	0.88	
N45T, V50A, N78I	294	1899.00	0.85	
[0759]	V11A, I20L, E27G, D43G, N45D, H51Y, S99G	295	3381.50	1.52
	I20L, E27G, D43G, N45T, V50A	296	2013.50	0.90
	I20L, K28E, D43G, N45D, V58A, Q89R, G101G-ins (G101GG)	1727	4294.00	1.93
	I20L, I36T, N45D,	298	2210.50	0.99
	A33D, D43G, N45D, V58A, S75P	300	2312.50	1.04
	K23R, D43G, N45D	301	2361.00	1.06
	I20L, D43G, N45D, V58A, N78I, D90G, G101D	302	1998.50	0.90
	D43G, N45D, L56Q, V58A, G101G-ins (G101GG)	303	3926.00	1.76
	I20L, K23E, D43G, N45D, V58A, N78I	304	3506.00	1.57
	I20L, K23E, D43G, N45D, V50A, N78I	305	3586.00	1.61
	T19I, E27G, N45I, V50A, N78I, M97K	306	2047.00	0.92
	I20L, M41K, D43G, N45D	307	2109.50	0.95
	K23R, N45T, N78I	308	2690.50	1.21
	全长 PD-L1 Fc	-	1945.00	0.87
	野生型 PD-L1 IgV	309	2229.00	1.00
	抗 PD-1 单克隆抗体(纳武单抗)	-	8892.00	3.99

[0760] 实施例8

[0761] 额外的亲和力修饰的IgSF结构域

[0762] 此实施例描述了额外的亲和力修饰的CD80 (B7-1)、PD-L2、CD155和CD112以及CD86

(B7-2) 免疫调节蛋白的设计、创建和筛选,所述免疫调节蛋白为具有已证明的免疫活化和抑制的双重作用的免疫突触 (IS) 的其他组分。生成并筛选亲和力修饰的NKp30变体。这些实施例证明IgSF结构域的亲和力修饰产生可以用于增加和降低免疫调节活性的蛋白质。那些结构域的各种组合可以与变体亲和力修饰的PD-L1成对融合(即,堆叠)以形成II型免疫调节蛋白以实现免疫调节活性。

[0763] 基本上如实施例1所述,生成编码人CD80的IgV结构域、或PD-L2、CD155和CD112的IgV结构域的变体的突变体DNA构建体,以用于翻译并表达为酵母展示文库。构建靶向特异性残基以与简并密码子完全或部分随机化的靶向文库和/或随机文库,以鉴定CD80 (SEQ ID NO:2030) 的IgV的变体、PD-L2 (SEQ ID NO:1263) 的IgV的变体、CD155 (SEQ ID NO:353) 的IgV的变体和CD112 (SEQ ID NO:761) 的IgV的变体,基本上如实施例1中所述。还使用类似方法生成NKp30的IgC样结构域的文库 (SEQ ID NO:1190)。

[0764] 基本上如实施例2中所述将简并或随机文库DNA引入到酵母中以生成酵母文库。使用所述文库选择表达亲和力修饰的CD80、PD-L2、CD155、CD112、CD86 (B7-2) 和NKp30变体的酵母,基本上如实施例3中所述。处理细胞以减少非结合物并且富集具有结合其外源重组相对结构蛋白的能力的CD80、PD-L2、CD155或CD112、CD86 (B7-2) 和NKp30变体,基本上如实施例3中所述。

[0765] 在CD80、CD86和NKp30文库的情况下,如下的靶配体蛋白来源于R&D Systems (USA) :人rCD28.Fc (即,重组CD28-Fc融合蛋白)、rPDL1.Fc、rCTLA4.Fc和rB7H6.Fc。基本上如实施例3中所述进行双色流式细胞术。测定来自流式细胞术分选的酵母输出物的更高特异性结合亲和力。对分选输出酵母进行扩增和再诱导以表达它们所编码的特定IgSF亲和力修饰的结构域变体。然后可以通过流式细胞术将此群体与亲本野生型酵母菌株或任何其他选择的输出物(诸如珠粒输出酵母群体)相比较。

[0766] 在针对与B7-H6结合选择的NKp30酵母变体的情况下,F2分选输出物在用16.6nM rB7H6.Fc染色时得到533的MFI值,而在用相同浓度的rB7H6.Fc染色时,测量亲本NKp30菌株MFI为90(6倍改善)。

[0767] 鉴定的NKp30变体为含有参考与SEQ ID NO:54中所列出的位置相对应的NKp30细胞外结构域中的位置的突变L30V/A60V/S64P/S86G的变体。

[0768] 对于表13A-B中提供的CD80变体,CD80文库由具有所需相对结构CTLA4的阳性选择和具有相对结构CD28的阴性选择组成。

[0769] 对于表14A中提供的CD155变体,单独针对TIGIT、CD96和CD226中的每一种选择CD155文库。对于表14B-F中提供的CD155变体,选择涉及使用所需相对结构TIGIT和CD96进行两次阳性选择,随后使用相对结构CD226进行一次阴性选择,以选择远离CD226并改善变体CD155的结合特异性。基本上如以上实施例3中所述进行选择,不同的是相对结构(TIGIT/CD96)的浓度和阳性分选的选择严格性被改变以优化引导鉴定(lead identification)。将阴性选择的CD226的浓度保持为100nM。

[0770] 对于表15A中提供的CD112变体,单独针对TIGIT、CD112R和CD226中的每一种选择CD112文库。对于表15B-15C中提供的额外CD112变体,选择涉及使用所需相对结构TIGIT和CD112R进行两次阳性选择,随后使用相对结构CD226进行一次阴性选择,以选择远离CD226并改善变体CD112的结合特异性。基本上如以上实施例3所述进行选择,不同的是相对结构

(TIGIT/CD112R) 的浓度和阳性分选的选择严格性被改变以优化先导鉴定 (lead identification)。将阴性选择的CD226的浓度保持为100nM。

[0771] 对于表16A-B中提供的PD-L2变体,针对PD-1选择酵母展示靶向的或随机PD-L2文库。然后在此之后使用外源相对结构蛋白染色进行三轮流式细胞术分选,以富集显示改善的结合物的酵母细胞部分。磁珠富集和通过流式细胞术进行的选择基本上如Miller K.D. 等人,Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30,2008年7月所述。

[0772] 将示例性选择输出物重新格式化为含有各自融合至基本上如实施例4中所述的Fc分子(变体ECD-Fc融合分子或变体IgV-Fc融合分子)的CD80的亲和力修饰的(变体)IgV、PD-L2的变体IgV、CD155的变体IgV、CD112的变体IgV的免疫调节蛋白,并且Fc融合蛋白基本上如实施例5中所述表达和纯化。

[0773] 然后基本上如实施例6中所述评定示例性IgSF结构域变体与细胞表达的相对结构的结合。产生表达同源结合配偶体的细胞,并且基本上如实施例6所述进行结合研究和流式细胞术。此外,Fc融合变体蛋白的生物活性通过基本上如实施例6中所述的混合型淋巴细胞反应 (MLR) 或抗CD3共固定测定进行表征。

[0774] 如上,对于各表,示例性氨基酸取代由与相应参考未修饰ECD序列(表2)相对应的氨基酸位置编号指示。氨基酸位置在中间指示,其中对应的未修饰(例如,野生型)氨基酸列出在编号之前并且所鉴定的变体氨基酸取代列出(插入,由编号指示)在编号之后。

[0775] 还示出了结合活性,如通过每种变体Fc融合分子与工程化以表达同源相对结构配体的细胞的结合的平均荧光强度(MFI)值以及所述MFI与不含有一个或多个氨基酸取代的对应未修饰Fc融合分子与相同细胞表达的相对结构配体的结合相比的比率所测量的。在MLR测定中,基于i)用所指示的用抗CD3共固定的变体Fc融合分子或ii)用所指示的变体Fc融合分子生成的在培养物上清液中的IFN- $\gamma$ 的计算水平(pg/mL),还示出了变体Fc融合分子调节T细胞的活性的功能活性。表还描绘了在功能性测定中由每种变体ECD-Fc或IgV-Fc产生的IFN- $\gamma$ 与对应未修饰ECD-Fc或IgV-Fc相比的比率。

[0776] 如表13A-16F所示,选择能够鉴定许多PD-L2、CD155、CD112和CD80 IgSF结构域变体,所述变体被亲和力修饰以对至少一种同源相对结构配体以及在一些情况下对多于一种同源相对结构配体表现出增加的结合。此外,结果显示,变体分子的亲和力修饰也表现出改善的活性以增加和降低免疫学活性,这取决于分子的形式。

表 13A: 变体 CD80 与用 CTLA4、CD28 或 PD-L1 转染的 HEK293 细胞的结合									
CD80 突变	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4:C D28 的比 率	
		在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 22.2 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化		
L70P	1080	未测试							
I30F/L70P	1081	未测试							
Q27H/T41S/A71D	1082	368176	2.3	25051	1.01	24181	不适用	14.7	
I30T/L70R	1083	2234	0.0	2596	0.10	5163	不适用	0.9	
T13R/C16R/L70Q/A71D	1084	197357	1.2	16082	0.65	9516	不适用	12.3	
T57I	1085	393810	2.4	23569	0.95	3375	不适用	16.7	
M43I/C82R	1086	3638	0.0	3078	0.12	7405	不适用	1.2	
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	1087	175235	1.1	3027	0.12	6144	不适用	57.9	
I30V/T57I/L70P/A71D/A91T	1088	116085	0.7	10129	0.41	5886	不适用	11.5	
V22I/L70M/A71D	1089	163825	1.0	22843	0.92	33404	不适用	7.2	
N55D/L70P/E77G	1090	未测试							
T57A/I69T	1091	未测试							
N55D/K86M	1092	3539	0.0	3119	0.13	5091	不适用	1.1	
L72P/T79I	1093	50176	0.3	3397	0.14	6023	不适用	14.8	
L70P/F92S	1094	4035	0.0	2948	0.12	6173	不适用	1.4	

[0777]

表 13A: 变体 CD80 与用 CTLA4、CD28 或 PD-L1 转染的 HEK293 细胞的结合

CD80 突变	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4:C D28 的比 率
		在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 22.2 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	
T79P	1095	2005	0.0	2665	0.11	4412	不适用	0.8
E35D/M4 7I/L65P/D90N	1096	4411	0.0	2526	0.10	4034	不适用	1.7
L25S/E3 5D/M47I/D90N	1097	61265	0.4	4845	0.20	20902	不适用	12.6
Q27X*/S 44P/I67T/P74S/E81G/E9 5D	1098	195637	1.2	17524	0.71	17509	不适用	11.2
A71D	1099	220090	1.4	16785	0.68	29642	不适用	13.1
T13A/Q2 7X*/I61N/A71D	1100	195061	1.2	17519	0.71	21717	不适用	11.1
E81K/A9 1S	1101	98467	0.6	3309	0.13	44557	不适用	29.8
A12V/M 47V/L70 M	1102	81616	0.5	7400	0.30	31077	不适用	11.0
K34E/T4 1A/L72V	1103	88982	0.6	3755	0.15	35293	不适用	23.7
T41S/A7 1D/V84A	1104	103010	0.6	5573	0.22	83541	不适用	18.5
E35D/A7 1D	1105	106069	0.7	18206	0.73	40151	不适用	5.8
E35D/M4 7I	1106	353590	2.2	14350	0.58	149916	不适用	24.6
K36R/G7 8A	1107	11937	0.1	2611	0.11	5715	不适用	4.6
Q33E/T4 1A	1108	8292	0.1	2442	0.10	3958	不适用	3.4
M47V/N 48H	1109	207012	1.3	14623	0.59	145529	不适用	14.2
M47L/V6 8A	1110	74238	0.5	13259	0.53	11223	不适用	5.6
S44P/A7 1D	1111	8839	0.1	2744	0.11	6309	不适用	3.2
Q27H/M 43I/A71 D/R73S	1112	136251	0.8	12391	0.50	8242	不适用	11.0
E35D/T5 7I/L70Q/A71D	1114	121901	0.8	21284	0.86	2419	不适用	5.7
M47I/E8 8D	1115	105192	0.7	7337	0.30	97695	不适用	14.3
M42I/I61 V/A71D	1116	54478	0.3	6074	0.24	4226	不适用	9.0
P51A/A7	1117	67256	0.4	4262	0.17	5532	不适用	15.8

[0778]

表 13A: 变体 CD80 与用 CTLA4、CD28 或 PD-L1 转染的 HEK293 细胞的结合								
CD80 突变	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4:C D28 的比 率
		在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 22.2 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	
1D								
H18Y/M47I/T57I/A71G	1118	136455	0.8	20081	0.81	13749	不适用	6.8
V20I/M47V/T57I/V84I	1119	183516	1.1	26922	1.08	3583	不适用	6.8
WT	2030	161423	1.0	24836	1.00	未测试	不适用	6.5

[0779] [0780] \*指示位置处的终止密码子

表 13B: 变体 CD80 与用 CTLA4、CD28 或 PD-L1 转染的 HEK293 细胞的结合								
CD80 突变	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA4:CD28 的比 率
		在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	在 22.2 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍数变化	
V20I/M47V/A71D	1120	149937	7.23	15090	9.33	9710	5.48	9.9
A71D/L72V/E95K	1121	140306	6.77	6314	3.90	8417	4.75	22.2
V22L/E35G/A71D/L72P	1122	152588	7.36	8150	5.04	1403	0.79	18.7
E35D/A71D	1123	150330	7.25	14982	9.26	13781	7.77	10.0
E35D/I67L/A71D	1124	146087	7.04	11175	6.91	9354	5.28	13.1
T13R/M42V/M47I/A71D	1126	108900	5.25	16713	10.33	1869	1.05	6.5
E35D	1127	116494	5.62	3453	2.13	25492	14.38	33.7
E35D/M47I/L70M	1128	116531	5.62	14395	8.90	49131	27.71	8.1
E35D/A71/L72V	1129	134252	6.47	11634	7.19	13125	7.40	11.5
E35D/M43L/L70M	1130	102499	4.94	3112	1.92	40632	22.92	32.9
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	1131	83139	4.01	5406	3.34	9506	5.36	15.4
E35D/D46V/L85Q	1132	85989	4.15	7510	4.64	38133	21.51	11.4
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D	1133	59793	2.88	14011	8.66	1050	0.59	4.3
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	1125	85117	4.10	10317	6.38	1452	0.82	8.3
M47V/I69F/A71D/V83I	1134	76944	3.71	15906	9.83	3399	1.92	4.8
E35D/T57A/	1135	85724	4.13	3383	2.09	1764	0.99	25.3

表 13B: 变体 CD80 与用 CTLA4、CD28 或 PD-L1 转染的 HEK293 细胞的结合								
CD80 突变	SEQ ID NO (IgV)	CTLA4		CD28		PD-L1		CTLA 4:CD2 8 的比 率
		在 66.6 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍 数变化	在 66.6 nM 下 的 MFI	相对于 WT 的倍 数变化	在 22.2 nM 下的 MFI	相对于 WT 的倍 数变化	
A71D/L85Q								
H18Y/A26T/ E35D/A71D/ L85Q	1136	70878	3.42	6487	4.01	8026	4.53	10.9
E35D/M47L	1137	82410	3.97	11508	7.11	58645	33.08	7.2
E23D/M42V/ M43I/I58V/ L70R	1138	37331	1.80	10910	6.74	2251	1.27	3.4
V68M/L70M/ A71D/E95K	1139	56479	2.72	10541	6.51	38182	21.53	5.4
N55I/T57I/I69 F	1140	2855	0.14	1901	1.17	14759	8.32	1.5
E35D/M43I/A 71D	1141	63789	3.08	6369	3.94	27290	15.39	10.0
T41S/T57I/L7 0R	1142	59844	2.89	4902	3.03	19527	11.01	12.2
H18Y/A71D/ L72P/E88V	1143	68391	3.30	8862	5.48	1085	0.61	7.7
V20I/A71D	1144	60323	2.91	10500	6.49	3551	2.00	5.7
E23G/A26S/E 35D/T62N/ A71D/L72V/ L85M	1145	59025	2.85	5484	3.39	10662	6.01	10.8
A12T/E24D/E 35D/D46V/ I61V/L72P/E9 5V	1146	63738	3.07	7411	4.58	1221	0.69	8.6
V22L/E35D/ M43L/A71G/ D76H	1147	2970	0.14	1498	0.93	1851	1.04	2.0
E35G/K54E/ A71D/L72P	1148	71899	3.47	3697	2.29	1575	0.89	19.4
L70Q/A71D	1149	45012	2.17	18615	11.50	1692	0.95	2.4
A26E/E35D/ M47L/L85Q	1150	40325	1.94	2266	1.40	55548	31.33	17.8
D46E/A71D	1151	69674	3.36	16770	10.36	22777	12.85	4.2
Y31H/E35D/ T41S/V68L/ K93R/R94W	1152	3379	0.16	2446	1.51	18863	10.64	1.4
WT CD80 IgV Fc	2030 (IgV)	20739	1.00	1618	1.00	1773	1.00	12.8
WT CD80 ECD Fc	-	72506	3.50	3072	1.90	4418	2.49	23.6

[0782]

表 14A: 针对同源结合配偶体选择的变体 CD155。分子序列、结合数据和共刺激生物活性数据。

[0783]

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	CD226 tfxn MFI (CD226 MFI 亲本比率)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 亲本比率)	CD96 MFI (TIGIT MFI 亲本比率)	模拟物 Expi293 MFI (模拟物 MFI 亲本比率)	抗 CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗 CD3 IFN- $\gamma$ 亲本比率)
P18S, P64S, F91S	354	497825 (133.7)	247219 (91.1)	140065 (45.4)	3528 (1.2)	270.1 (0.7)
P18S, F91S, L104P	355	26210 (7.0)	75176 (27.7)	10867 (3.5)	2130 (0.7)	364.2 (0.9)
L44P	356	581289 (156.1)	261931 (96.5)	152252 (49.4)	3414 (1.2)	277.6 (0.7)
A56V	357	455297 (122.3)	280265 (103.2)	161162 (52.2)	2601 (0.9)	548.2 (1.4)
P18L, L79V, F91S	358	5135 (1.4)	4073 (1.5)	3279 (1.1)	2719 (0.9)	1241.5 (3.2)
P18S, F91S	359	408623 (109.8)	284190 (104.7)	147463 (47.8)	3348 (1.1)	760.6 (2.0)
P18T, F91S	360	401283 (107.8)	223985 (82.5)	157644 (51.1)	3065 (1.1)	814.7 (2.1)
P18T, S42P, F91S	361	554105 (148.8)	223887 (82.5)	135395 (43.9)	3796 (1.3)	539.7 (1.4)
G7E, P18T, Y30C, F91S	362	12903 (3.5)	12984 (4.8)	7906 (2.6)	2671 (0.9)	275.9 (0.7)
P18T, F91S, G111D	363	438327 (117.7)	287315 (105.8)	167583 (54.3)	4012 (1.4)	307.2 (0.8)
P18S, F91P	364	4154 (1.1)	3220 (1.2)	2678 (0.9)	2816 (1.0)	365.7 (0.9)
P18T, F91S, F108L	365	394546 (106.0)	298680 (110.0)	193122 (62.6)	2926 (1.0)	775.4 (2.0)
P18T, T45A, F91S	366	435847 (117.1)	222044 (81.8)	191026 (61.9)	2948 (1.0)	1546.8 (4.0)
P18T, F91S, R94H	367	3589 (1.0)	2942 (1.1)	2509 (0.8)	2390 (0.8)	1273.2 (3.3)
P18S, Y30C, F91S	368	382352 (102.7)	276358 (101.8)	56934 (18.5)	3540 (1.2)	426.5 (1.1)
A81V, L83P	369	4169 (1.1)	2912 (1.1)	2616 (0.8)	2993 (1.0)	339.7 (0.9)
L88P	370	65120 (17.5)	74845 (27.6)	35280 (11.4)	2140 (0.7)	969.2 (2.5)
野生型	353	3723 (1.0)	2715 (1.0)	3085 (1.0)	2913 (1.0)	389.6 (1.0)
R94H	371	18905 (5.1)	104013 (38.3)	11727 (3.8)	1663 (0.6)	372.6 (1.0)
A13E, P18S, A56V, F91S	372	357808 (96.1)	179060 (66.0)	118570 (38.4)	2844 (1.0)	349.2 (0.9)
P18T, F91S, V115A	373	38487 (10.3)	46313 (17.1)	22718 (7.4)	2070 (0.7)	1574.5 (4.0)
P18T, Q60K	374	238266 (64.0)	173730 (64.0)	154448 (50.1)	4778 (1.6)	427.2 (1.1)

[0785]

表 14B: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96		
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数 ↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的 倍数↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的 倍数↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数↑	
[0786]	S52M	569	1865.3	0.00	1901.0	0.01	1553.4	0.87	1609.8	0.02
	T45Q, S52L, L104E, G111R	570	2287.0	0.01	2390.4	0.01	1735.1	0.97	1575.1	0.02
	S42G	571	4837.5	0.01	2448.1	0.01	1815.4	1.02	1699.6	0.02
	Q62F	572	2209.5	0.01	2572.1	0.01	2706.5	1.52	2760.7	0.03
	S52Q	573	2288.1	0.01	2022.3	0.01	1790.1	1.00	1822.3	0.02
	S42A, L104Q, G111R	574	1923.7	0.00	1901.7	0.01	1815.1	1.02	1703.8	0.02
	S42A, S52Q, L104Q, G111R	575	1807.5	0.00	2157.2	0.01	1894.4	1.06	1644.0	0.02
	S52W, L104E	576	1938.2	0.00	1905.6	0.01	2070.6	1.16	1629.5	0.02
	S42C	577	1914.0	0.00	2096.1	0.01	1685.0	0.95	1592.4	0.02
	S52W	578	1991.6	0.00	2037.3	0.01	1612.8	0.90	1712.9	0.02
	S52M, L104Q	579	2666.6	0.01	2252.2	0.01	1706.0	0.96	1633.1	0.02
	S42L, S52L, Q62F, L104Q	580	2021.4	0.00	2643.8	0.02	1730.1	0.97	2318.7	0.02
	S42W	581	2434.5	0.01	2133.4	0.01	2325.7	1.30	2555.4	0.03
	S42Q	582	2073.5	0.00	2225.9	0.01	1905.1	1.07	2143.1	0.02
	S52L	583	2224.8	0.01	2676.3	0.02	2038.6	1.14	2043.2	0.02
	S52R	584	4395.4	0.01	3964.4	0.02	2741.7	1.54	4846.9	0.05
	L104E	585	3135.4	0.01	2264.2	0.01	1803.5	1.01	1556.7	0.02
	G111R	586	2082.7	0.00	2791.3	0.02	2470.9	1.39	3317.1	0.03
	S52E	587	2655.4	0.01	2599.8	0.02	1904.9	1.07	1799.0	0.02
	Q62Y	588	2528.6	0.01	2621.4	0.02	1918.4	1.08	1827.5	0.02
	T45Q, S52M, L104E	589	79498.2	0.19	143238.5	0.83	2600.6	1.46	6310.4	0.06
	S42N, L104Q, G111R	590	2432.1	0.01	2311.3	0.01	1847.4	1.04	1958.3	0.02
	S52M, V57L	591	1760.7	0.00	2431.6	0.01	2006.9	1.13	1858.7	0.02
	S42N, S52Q, Q62F	592	2402.7	0.01	2152.0	0.01	1855.0	1.04	1737.6	0.02
	S42A, S52L, L104E, G111R	593	2262.7	0.01	1889.4	0.01	1783.2	1.00	1606.2	0.02
	S42W, S52Q,	594	1961.4	0.00	2138.3	0.01	1844.9	1.03	1699.6	0.02

表 14B: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数 ↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的 倍数↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的 倍数↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数↑
[0787]	V57L, Q62Y								
	L104Q	595	10314.4	0.02	3791.4	0.02	2119.9	1.19	1542.6
	S42L, S52Q, L104E	596	1946.9	0.00	6474.3	0.04	1749.0	0.98	1702.2
	S42C, S52L	597	1762.5	0.00	2147.3	0.01	1663.4	0.93	1484.7
	S42W, S52R, Q62Y, L104Q	598	1918.8	0.00	2300.1	0.01	1824.6	1.02	1756.0
	T45Q, S52R, L104E	599	121636.9	0.29	142381.2	0.82	2617.9	1.47	3748.2
	S52R, Q62F, L104Q, G111R	600	2969.2	0.01	3171.6	0.02	1725.4	0.97	2362.3
	T45Q, S52L, V57L, L104E	601	2857.7	0.01	5943.5	0.03	1496.8	0.84	1533.3
	S52M, Q62Y	602	1926.6	0.00	2000.3	0.01	1771.6	0.99	1651.1
	Q62F, L104E, G111R	603	1966.4	0.00	2043.5	0.01	1701.9	0.95	1524.8
	T45Q, S52Q	604	4812.8	0.01	5787.5	0.03	1765.6	0.99	2451.3
	S52L, L104E	605	4317.8	0.01	2213.9	0.01	1756.9	0.99	1829.3
	S42V, S52E	606	2055.0	0.00	2272.6	0.01	1808.0	1.01	2530.2
	T45Q, S52R, G111R	607	4092.3	0.01	2075.2	0.01	1793.6	1.01	2336.6
	S42G, S52Q, L104E, G111R	608	2010.1	0.00	2019.2	0.01	1706.4	0.96	1707.6
	S42N, S52E, V57L, L104E	609	1784.2	0.00	1743.6	0.01	1690.1	0.95	1538.7
	野生型	353	1964.7	0.00	2317.1	0.01	2169.6	1.22	1893.4
	S42C, S52M, Q62F	610	1861.0	0.00	2084.2	0.01	1592.3	0.89	1481.3
									0.01

表 14B: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数 ↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的 倍数↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的 倍数↑	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数↑
S42L	611	1930.4	0.00	2187.2	0.01	1743.2	0.98	1618.4	0.02
野生型	353	2182.6	0.01	2374.5	0.01	1743.1	0.98	1680.4	0.02
S42A	612	1929.2	0.00	2188.6	0.01	1733.7	0.97	1623.6	0.02
S42G, S52L, Q62F, L104Q	613	1924.3	0.00	2157.6	0.01	1661.3	0.93	1642.1	0.02
S42N	614	1817.4	0.00	1910.9	0.01	1699.7	0.95	1691.5	0.02
CD155 IgV Fc (IgV)	353	4690	0.01	4690	0.03	2941	1.65	3272	0.03
野生型 CD155 ECD-Fc	47 (EC D)	423797	1.00	172839	1.00	1783	1.00	99037	1.00
抗人 Fc PE	-	1506.3	0.00	3774	0.02	1587	0.89	1618	0.02

表 14C: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增 加
P18T, S65A, S67V, F91S	615	297843	1.99	351195	3.22	128180	1.68
P18T, T45Q, T61R, S65N, S67L	617	224682	1.50	270175	2.48	22820	0.30
P18F, T39A, T45Q, T61R, S65N, S67L, E73G, R78G	616						产生很少至不产生蛋白质
P18F, S65A, S67V, F91S	618	534106	3.57	350410	3.21	144069	1.89
P18F, T45Q, T61R, S65N, S67L, F91S, L104P	619						产生很少至不产生蛋白质
P18S, L79P, L104M	620	342549	2.29	320823	2.94	107532	1.41
P18S, L104M	621	449066	3.00	295126	2.70	121266	1.59
L79P, L104M	622	3210	0.02	8323	0.08	2894	0.04
P18T, T45Q, L79P	623	542878	3.63	371498	3.40	193719	2.55
P18T, T45Q, T61R, S65H,	624	312337	2.09	225439	2.07	152903	2.01

[0788]

[0789]

表 14C: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加
S67H							
P18T, A81E	625					产生很少至不产生蛋白质	
P18S, D23Y, E37P, S52G, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	626					产生很少至不产生蛋白质	
A13R, D23Y, E37P, S42P, Q62Y, A81E	627	4161	0.03	11673	0.11	5762	0.08
A13R, D23Y, E37P, G99Y, S112N	627					产生很少至不产生蛋白质	
A13R, D23Y, E37P, Q62M, A77V, G80S, A81P, G99Y	629					产生很少至不产生蛋白质	
P18L, E37S, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	630	5900	0.04	14642	0.13	3345	0.04
P18S, L104T	631	321741	2.15	367470	3.37	108569	1.43
P18S, Q62H, L79Q, F91S	632	283357	1.89	324877	2.98	125541	1.65
P18S, F91S	359	222780	1.49	300049	2.75	48542	0.64
T45Q, S52K, Q62F, L104Q, G111R	633					产生很少至不产生蛋白质	
T45Q, S52Q, Q62Y, L104Q, G111R	634					产生很少至不产生蛋白质	
T45Q, S52Q, Q62Y, L104E, G111R	635					产生很少至不产生蛋白质	
V57A, T61M, S65W, S67A, E96D, L104T	636					产生很少至不产生蛋白质	
P18L, V57T, T61S, S65Y, S67A, L104T	637	278178	1.86	276870	2.54	121499	1.60
P18T, T45Q	638	326769	2.18	357515	3.28	92389	1.21
P18L, V57A, T61M, S65W, S67A, L104T	639					产生很少至不产生蛋白质	
T61M, S65W, S67A, L104T	640	360915	2.41	417897	3.83	148954	1.96
P18S, V41A, S42G, T45G, L104N	641	3821	0.03	11449	0.10	3087	0.04

表 14C: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加
P18H, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104N	642	5066	0.03	177351	1.63	3700	0.05
P18S, S42G, T45V, F58L, S67W, L104N	643	14137	0.09	15175	0.14	15324	0.20
P18S, T45I, L104N	644	141745	0.95	298011	2.73	97246	1.28
P18S, S42G, T45G, L104N, V106A	645	29387	0.20	117965	1.08	15884	0.21
P18H, H40R, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104Y, V106L, F108H	646	12335	0.08	14657	0.13	15779	0.21
E37V, S4G, T45G, L104N	647	产生很少至不产生蛋白质					
P18S, T45Q, L79P, L104T	648	206674	1.38	285512	2.62	87790	1.15
P18L, Q62R	649	66939	0.45	25063	0.23	10928	0.14
A13R, D23Y, E37P, S42L, S52G, Q62Y, A81E	650	产生很少至不产生蛋白质					
P18L, H49R, L104T, D116N	651	167980	1.12	214677	1.97	62451	0.82
A13R, D23Y, E37P, Q62M, G80S, A81P, L104T	652	产生很少至不产生蛋白质					
S65T, L104T	653	205942	1.38	187147	1.71	65207	0.86
A13R, D23Y, E37P, S52G, V57A, Q62M, K70E, L104T	654	产生很少至不产生蛋白质					
P18L, A47V, Q62Y, E73D, L104T	655	146142	0.98	248926	2.28	73956	0.97
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T,	656	产生很少至不产生蛋白质					

[0791]

表 14C: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT ECD 的倍数增加
E73R, D97G, E98S, L104T, D116N							
P18L, S42P, T45Q, T61G, S65H, S67E, L104T, D116N	657	153536	1.03	402503	3.69	53044	0.70
P18S, H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, L104M, V106A	658						产生很少至不产生蛋白质
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E68G, E73R, D97G, E98S, L104T	659						产生很少至不产生蛋白质
T45Q, S52E, L104E	660						产生很少至不产生蛋白质
T45Q, S52E, Q62F, L104E	661	132850	0.89	276434	2.53	14558	0.19
野生型 CD155 ECD-Fc	47 (ECD)	149692	1.00	109137	1.00	76083	1.00
抗人 Fc PE	-	2287	0.02	4799	0.04	2061	0.03

表 14D: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, F91S, L104M, G111D	662	117327	1.2	1613	0.1	1629	0.1
P18S, T45S, T61K, S65W, S67A, F91S, G111R	663	124936	1.3	2114	0.1	2223	0.1

[0794]	P18S, L79P, L104M, T107M	664	110512	1.1	18337	0.9	22793	1.3
	P18S, S65W, S67A, M90V, V95A, L104Q, G111R	665	101726	1.0	1605	0.1	2571	0.1
	野生型 CD155-ECD	47 (ECD)	98935	1.0	20029	1.0	17410	1.0

表 14E: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化
P18S, A47G, L79P, F91S, L104M, T107A, R113W	1528	56,409	1.19	1,191	0.08	25,362	1.49
P18T, D23G, S24A, N35D, H49L, L79P, F91S, L104M, G111R	1529	128,536	2.72	987	0.06	3,497	0.20
V9L, P18S, Q60R, V75L, L79P, R89K, F91S, L104E, G111R	1530	125,329	2.65	986	0.06	959	0.06
[0795]	P18S, H49R, E73D, L79P, N85D, F91S, V95A, L104M, G111R	1531	产生很少至不产生蛋白质				
	V11A, P18S, L79P, F91S, L104M, G111R	1532	48,246	1.02	974	0.06	923
V11A, P18S, S54R, Q60P, Q62K, L79P, N85D, F91S, T107M	1533	190,392	4.02	1,019	0.07	1,129	0.07
P18T, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, G111R	1534	121,611	2.57	986	0.06	16,507	0.97
P18T, M36T, L79P, F91S, G111R	1535	150,015	3.17	1,029	0.07	2,514	0.15
D8G, P18S, M36I, V38A,	1536	79,333	1.68	1,026	0.07	2,313	0.14

表 14E: 额外的 CD155 变体和结合数据。

[0796]

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96	
		在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化
H49Q, A76E, F91S, L104M, T107A, R113W							
P18S, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, T107S, R113W	1537	23,766	0.50	1,004	0.07	1,080	0.06
T15I, P18T, L79P, F91S, L104M, G111R	1538	55,498	1.17	1,516	0.10	1,030	0.06
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, E82D, F91S, L104M, G111D	1539	213,640	4.51	991	0.06	1,276	0.07
P18T, E37G, G53R, Q62K, L79P, F91S, E98D, L104M, T107M	1540	251,288	5.31	2,001	0.13	45,878	2.69
P18L, K70E, L79P, F91S, V95A, G111R	1541	62,608	1.32	1,117	0.07	973	0.06
V9I, Q12K, P18F, S65A, S67V, L79P, L104T, G111R, S112I	1542	81,932	1.73	803	0.05	68,295	4.00
P18F, S65A, S67V, F91S, L104M, G111R	1543	30,661	0.65	901	0.06	3,193	0.19
V9I, V10I, P18S, F20S, T45A, L79P, F91S, L104M, F108Y, G111R, S112V	1544	151,489	3.20	973	0.06	974	0.06
V9L, P18L, L79P, M90I, F91S, T102S, L104M, G111R	1545	155,279	3.28	910	0.06	10,568	0.62
P18C, T26M, L44V, M55I, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107M	1546	137,521	2.91	973	0.06	111,085	6.51
V9I, P18T, D23G, L79P, F91S, G111R	1547	151,426	3.20	897	0.06	2,725	0.16

表 14E: 额外的 CD155 变体和结合数据。								
CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD96		
		在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	在 11.1 nM 下的 MFI	相对于 CD155-ECD 的倍数变化	
[0797]	P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1548	125,639	2.66	917	0.06	3,939	0.23
	P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1548	115,156	2.43	1,073	0.07	2,464	0.14
	P18T, M36T, S65A, S67E, L79Q, A81T, F91S, G111R	1549	10,616	0.22	1,130	0.07	963	0.06
	V9L, P18T, Q62R, L79P, F91S, L104M, G111R	1550	195,111	4.12	835	0.05	1,497	0.09
	CD155-ECD-Fc	47 (ECD)	47,319	1.00	15,421	1.00	17,067	1.00
	Fc 对照	1155	2,298	0.05	1,133	0.07	996	0.06

表 14F: 额外的 CD155 变体和结合数据。										
CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96		
		在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI		
[0798]	P18T, G19D, M36T, S54N, L79P, L83Q, F91S, T107M, F108Y	1669	905	0.02	748	0.02	1276	1.56	726	0.01
	V9L, P18L, M55V, S69L, L79P, A81E, F91S, T107M	1670	58656	1.34	11166	0.29	920	1.13	67364	1.39
	P18F, H40Q, T61K, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107V	1671	108441	2.48	853	0.02	918	1.13	8035	0.17
	P18S, Q32R, Q62K, R78G, L79P,	1672	5772	0.13	701	0.02	843	1.03	831	0.02

表 14F: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV )	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 25 nM 下 的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化	在 25 nM 下 的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化	在 25 nM 下 的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化
[0799]	F91S, T107A, R113W								
	Q12H, P18T, L21S, G22S, V57A, Q62R, L79P, F91S, T107M	1673	1084	0.02	687	0.02	876	1.07	818
	V9I, P18S, S24P, H49Q, F58Y, Q60R, Q62K, L79P, F91S, T107M	1674	69926	1.60	1089	0.03	1026	1.26	43856
	P18T, W46C, H49R, S65A, S67V, A76T, L79P, S87T, L104M	1675	918	0.02	640	0.02	803	0.98	717
	P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1676	12630	0.29	707	0.02	857	1.05	1050
	P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1676	7476	0.17	851	0.02	935	1.15	924
	V10F, T15S, P18L, R48Q, L79P, F91S, T107M, V115M	1677	1168	0.03	792	0.02	901	1.10	998
	P18S, L21M, Y30F, N35D, R84W, F91S, T107M, D116G	1678	1377	0.03	743	0.02	946	1.16	1033
	P18F, E51V, S54G, Q60R, L79Q, E82G, S87T, M90I, F91S, G92R, T107M	1679	46090	1.05	15701	0.41	1012	1.24	61814
	Q16H, P18F, F91S, T107M	1680	产生很少至不产生蛋白质						

表 14F: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化
[0800]	P18T, D23G, Q60R, S67L, L79P, F91S, T107M, V115A	1681	64091	1.47	30931	0.81	874	1.07	10887 <sub>5</sub>
	D8G, V9I, V11A, P18T, T26M, S52P, L79P, F91S, G92A, T107L, V115A	1682	52508	1.20	9483	0.25	817	1.00	97770
	V9I, P18F, A47E, G50S, E68G, L79P, F91S, T107M	1683	55167	1.26	54341	1.43	752	0.92	10211 <sub>5</sub>
	P18S, M55I, Q62K, S69P, L79P, F91S, T107M	1684	产生很少至不产生蛋白质						
	P18T, T39S, S52P, S54R, L79P, F91S, T107M	1685	45927	1.05	744	0.02	1038	1.27	1225
	P18S, D23N, L79P, F91S, T107M, S114N	1686	产生很少至不产生蛋白质						
	P18S, P34S, E51V, L79P, F91S, G111R	1687	7917	0.18	769	0.02	853	1.04	892
	P18S, H59N, V75A, L79P, A81T, F91S, L104M, T107M	1688	800	0.02	676	0.02	915	1.12	759
	P18S, W46R, E68D, L79P, F91S, T107M, R113G	1689	1359	0.03	717	0.02	798	0.98	737
	V9L, P18F, T45A, S65A, S67V, R78K, L79V, F91S, T107M,	1690	13027 <sub>4</sub>	2.98	15356 <sub>9</sub>	4.04	812	1.00	85605

表 14F: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化
S114T									
P18T, M55L, T61R, L79P, F91S, V106I, T107M	1691	133399	3.05	1906	0.05	827	1.01	57927	1.19
T15I, P18S, V33M, N35F, T39S, M55L, R78S, L79P, F91S, T107M	1692	7550	0.17	1015	0.03	789	0.97	2709	0.06
P18S, Q62K, K70E, L79P, F91S, G92E, R113W	1693	11173	0.26	691	0.02	735	0.90	1951	0.04
P18F, F20I, T26M, A47V, E51K, L79P, F91S	1694	136088	3.11	54026	1.42	1401	1.72	96629	1.99
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1695	43795	1.00	98241	2.58	888	1.09	70891	1.46
P18S, D23G, C29R, N35D, E37G, M55I, Q62K, S65A, S67G, R78G, L79P, F91S, L104M, T107M, Q110R	1696	1599	0.04	1030	0.03	1115	1.37	1944	0.04
A13E, P18S, M36R, Q62K, S67T, L79P, N85D, F91S, T107M	1697	产生很少至不产生蛋白质							
V9I, P18T, H49R, L79P, N85D, F91S, L104T, T107M	1698	46375	1.06	76851	2.02	794	0.97	80210	1.65
V9A, P18F, T61S, Q62L, L79P, F91S, G111R	1699	26109	0.60	891	0.02	825	1.01	2633	0.05

[0801]

表 14F: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV )	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 25 nM 下 的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化	在 25 nM 下 的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化	在 25 nM 下 的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍 数变化
D8E, P18T, T61A, L79P, F91S, T107M	1700	产生很少至不产生蛋白质							
P18S, V41A, H49R, S54C, L79S, N85Y, L88P, F91S, L104M, T107M	1701	1098	0.03	830	0.02	876	1.07	1678	0.03
V11E, P18H, F20Y, V25E, N35S, H49R, L79P, F91S, T107M, G111R	1702	979	0.02	846	0.02	844	1.03	928	0.02
V11A, P18F, D23A, L79P, G80D, V95A, T107M	1703	45249	1.04	913	0.02	830	1.02	33883	0.70
P18S, K70R, L79P, F91S, G111R	1704	16180	0.37	793	0.02	854	1.05	1182	0.02
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1695	17567 3	4.02	16195 8	4.26	879	1.08	50981	1.05
V9L, V11M, P18S, N35S, S54G, Q62K, L79P, L104M, T107M, V115M	1705	2999	0.07	2315	0.06	893	1.09	925	0.02
V9L, P18Y, V25A, V38G, M55V, A77T, L79P, M90I, F91S, L104M	1706	13801 1	3.16	26015	0.68	919	1.13	17970	0.37
V10G, P18T, L72Q, L79P, F91S, T107M	1707	4253	0.10	1584	0.04	863	1.06	3643	0.07
P18S, H59R,	1708	13062	2.99	79435	2.09	1009	1.24	44493	0.91

[0802]

表 14F: 额外的 CD155 变体和结合数据。

CD155 突变	SEQ ID NO (IgV )	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化	在 25 nM 下的 MFI	相对于 CD155-E CD 的倍数变化
[0803]	A76G, R78S, L79P	2							
	V9A, P18S, M36T, S65G, L79P, F91S, L104T, G111R, S112I	1709	92503	2.12	989	0.03	886	1.09	7850
	P18T, S52A, V57A, Q60R, Q62K, S65C, L79P, F91T, N100Y, T107M	1710	187338	4.29	10579	0.28	908	1.11	3791
	V11A, P18F, N35D, A47E, Q62K, L79P, F91S, G99D, T107M, S114N	1711							
	V11A, P18T, N35S, L79P, S87T, F91S	1712	218660	5.00	273825	7.20	1269	1.56	69871
	V9D, V11M, Q12L, P18S, E37V, M55I, Q60R, K70Q, L79P, F91S, L104M, T107M	1713	8693	0.20	790	0.02	852	1.04	1991
	T15S, P18S, Y30H, Q32L, Q62R, L79P, F91S, T107M	1714	16213	0.37	2092	0.06	1056	1.29	6994
	CD155-ECD-Fc	47 (EC D)	43704	1.00	38032	1.00	816	1.00	48638
	CD112-IgV	761	1289		824		17819		1172

表 15A：针对同源结合配偶体选择的变体 CD112。分子序列、结合数据和共刺激生物活性数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 亲本 比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 亲本 比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 亲本 比率)	模拟物 Expi293 MFI (模拟物 MFI 亲本 比率)	抗 CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗 CD3 IFN- $\gamma$ 亲本 比率)
WT CD112	761	210829 (1.00)	1452 (1.00)	265392 (1.00)	1112 (1.00)	676.6 (1.00)
Y33H, A112V, G117D	762	12948 (0.06)	1552 (1.07)	1368 (0.01)	1241 (1.12)	164.8 (0.24)
V19A, Y33H, S64G, S80G, G98S, N106Y, A112V	763	48356 (0.23)	1709 (1.18)	2831 (0.01)	1098 (0.99)	
L32P, A112V	764	191432 (0.91)	1557 (1.07)	11095 (0.04)	1259 (1.13)	390.4 (0.58)
A95V, A112I	765	238418 (1.13)	1706 (1.17)	51944 (0.20)	1215 (1.09)	282.5 (0.42)
P28S, A112V	766	251116 (1.19)	1985 (1.37)	153382 (0.58)	1189 (1.07)	503.4 (0.74)
P27A, T38N, V101A, A112V	767	255803 (1.21)	2138 (1.47)	222822 (0.84)	1399 (1.26)	240.7 (0.36)
S118F	768	11356 (0.05)	5857 (4.03)	6938 (0.03)	1270 (1.14)	271.7 (0.40)
R12W, H48Y, F54S, S118F	769	10940 (0.05)	3474 (2.39)	5161 (0.02)	1069 (0.96)	
R12W, Q79R, S118F	770	2339 (0.01)	7370 (5.08)	1880 (0.01)	1338 (1.20)	447.4 (0.66)
T113S, S118Y	771	6212 (0.03)	6823 (4.70)	1554 (0.01)	1214 (1.09)	225.1 (0.33)
S118Y	772	2921 (0.01)	6535 (4.50)	2003 (0.01)	1463 (1.32)	190.4 (0.28)
N106I, S118Y	773	2750 (0.01)	7729 (5.32)	1815 (0.01)	1222 (1.10)	265.8 (0.39)
N106I, S118F	774	1841 (0.01)	9944 (6.85)	1529 (0.01)	1308 (1.18)	437.9 (0.65)
A95T, L96P,	775	2352 (0.01)	4493 (3.09)	1412 (0.01)	1329 (1.19)	292.4 (0.43)

[0804]

表 15A：针对同源结合配偶体选择的变体 CD112。分子序列、结合数据和共刺激生物活性数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 亲本 比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 亲本 比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 亲本 比率)	模拟物 Expi293 MFI (模拟物 MFI 亲本 比率)	抗 CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗 CD3 IFN- $\gamma$ 亲本 比率)
[0805]	S118Y					
	Y33H, P67S, N106Y, A112V	776	225015 (1.07)	3259 (2.24)	204434 (0.77)	1296 (1.17)
	N106Y, A112V	777	6036 (0.03)	1974 (1.36)	15334 (0.06)	1108 (1.00)
	T18S, Y33H, A112V	778	252647 (1.20)	1347 (0.93)	183181 (0.69)	1412 (1.27)
	P9S, Y33H, N47S, A112V	779	240467 (1.14)	1418 (0.98)	203608 (0.77)	1361 (1.22)
	P42S, P67H, A112V	780	204484 (0.97)	1610 (1.11)	188647 (0.71)	1174 (1.06)
	P27L, L32P, P42S, A112V	781	219883 (1.04)	1963 (1.35)	84319 (0.32)	1900 (1.71)
	G98D, A112V	782	4879 (0.02)	2369 (1.63)	6100 (0.02)	1729 (1.55)
	Y33H, S35P, N106Y, A112V	783	250724 (1.19)	1715 (1.18)	94373 (0.36)	1495 (1.34)
	L32P, P42S, T100A, A112V	784	242675 (1.15)	1742 (1.20)	202567 (0.76)	1748 (1.57)
	P27S, P45S, N106I, A112V	785	223557 (1.06)	1799 (1.24)	84836 (0.32)	1574 (1.42)
	Y33H, N47K, A112V	786	251339 (1.19)	1525 (1.05)	199601 (0.75)	1325 (1.19)
	Y33H, N106Y, A112V	787	297169 (1.41)	1782 (1.23)	258315 (0.97)	1440 (1.30)

表 15A：针对同源结合配偶体选择的变体 CD112。分子序列、结合数据和共刺激生物活性数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 亲本 比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 亲本 比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 亲本 比率)	模拟物 Expi293 MFI (模拟物 MFI 亲本 比率)	抗 CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗 CD3 IFN- $\gamma$ 亲本 比率)
[0806]	K78R, D84G, A112V, F114S	788	236662 (1.12)	1638 (1.13)	24850 (0.09)	1345 (1.21)
	Y33H, N47K, F54L, A112V	789	14483 (0.07)	1617 (1.11)	2371 (0.01)	1353 (1.22)
	Y33H, A112V	790	98954 (0.47)	1216 (0.84)	1726 (0.01)	1298 (1.17)
	A95V, A112V	791	168521 (0.80)	2021 (1.39)	200789 (0.76)	1459 (1.31)
	R12W, A112V	792	135635 (0.64)	1582 (1.09)	23378 (0.09)	1412 (1.27)
	A112V	798	213576 (1.01)	1986 (1.37)	151900 (0.57)	1409 (1.27)
	Y33H, A112V	790	250667 (1.19)	1628 (1.12)	230578 (0.87)	1216 (1.09)
	R12W, P27S, A112V	793	3653 (0.02)	1308 (0.90)	9105 (0.03)	1051 (0.94)
	Y33H, V51M, A112V	794	218698 (1.04)	1384 (0.95)	195450 (0.74)	1170 (1.05)
	Y33H, A112V, S118T	795	219384 (1.04)	1566 (1.08)	192645 (0.73)	1313 (1.18)
	Y33H, V101A, A112V, P115S	796	5605 (0.03)	1582 (1.09)	5079 (0.02)	1197 (1.08)
	H24R, T38N, D43G, A112V	797	227095 (1.08)	1537 (1.06)	229311 (0.86)	1336 (1.20)
	A112V	798	4056 (0.02)	1356 (0.93)	10365 (0.04)	986 (0.89)
	P27A, A112V	799	193537 (0.92)	1531 (1.05)	230708 (0.87)	3084 (2.77)
	A112V, S118T	800	233173 (1.11)	1659 (1.14)	121817 (0.46)	845 (0.76)

表 15A: 针对同源结合配偶体选择的变体 CD112。分子序列、结合数据和共刺激生物活性数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT tfxn MFI (TIGIT MFI 亲本 比率)	CD112R tfxn MFI (CD112R MFI 亲本 比率)	CD226 MFI (CD226 MFI 亲本 比率)	模拟物 Expi293 MFI (模拟物 MFI 亲本 比率)	抗 CD3 IFN- $\gamma$ (pg/mL) (抗 CD3 IFN- $\gamma$ 亲本 比率)
[0807]	R12W, A112V, M122I	801	235935 (1.12)	1463 (1.01)	217748 (0.82)	1350 (1.21)
	Q83K, N106Y, A112V	802	205948 (0.98)	2042 (1.41)	234958 (0.89)	1551 (1.39)
	R12W, P27S, A112V, S118T	803	11985 (0.06)	2667 (1.84)	12756 (0.05)	1257 (1.13)
	P28S, Y33H, A112V	804	4711 (0.02)	1412 (0.97)	3968 (0.01)	955 (0.86)
	P27S, Q90R, A112V	805	3295 (0.02)	1338 (0.92)	6755 (0.03)	1048 (0.94)
	L15V, P27A, A112V, S118T	806	209888 (1.00)	1489 (1.03)	84224 (0.32)	1251 (1.13)
	Y33H, N106Y, T108I, A112V	807	未测试			
	Y33H, P56L, V75M, V101M, A112V	808	未测试			

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加
S118 F	768	1763	0.02	1645	0.08	2974	0.61	1659	0.19

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96		
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	
[0809]	N47 K, Q79R , S118 F	891	1738	0.02	1689	0.09	2637	0.54	1647	0.19
	Q40R , P60T, A112 V, S118 T	892	4980	0.06	1608	0.08	2399	0.50	2724	0.32
	F114 Y, S118 F	893	110506	1.34	7325	0.37	1502	0.31	1553	0.18
	N106 I, S118 Y	773	1981	0.02	1700	0.09	2394	0.49	1582	0.19
	S118 Y	772	101296	1.23	9990	0.50	1429	0.30	1551	0.18
	Y33 H, K78R , S118 Y	894	2276	0.03	2115	0.11	3429	0.71	2082	0.24
	N106 I, S118 F	774	1875	0.02	1675	0.08	2365	0.49	1662	0.19
	R12 W, A46T , K66 M, Q79R , N106 I, T113 A, S118 F	895	3357	0.04	1808	0.09	1664	0.34	4057	0.48
	Y33 H, A112	896	3376	0.04	2886	0.15	3574	0.74	3685	0.43

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加
[0810]	V, S118 F								
	R12 W, Y33 H, N106 I, S118 F	897	100624	1.22	24513	1.24	1490	0.31	2060
	L15V ,	898	5791	0.07	4169	0.21	2752	0.57	4458
	Q90R ,								0.52
	N47 K, D84 G, N106 I, S118 Y	899	3334	0.04	2819	0.14	2528	0.52	3498
	L32P, S118 F	900	3881	0.05	2506	0.13	2659	0.55	2518
	Y33 H, Q79R ,	901	产生很少至不产生蛋白质						
	A112 V, S118 Y								
	T18A ,	902	84035	1.02	10208	0.52	1585	0.33	1590
	N106 I, S118 T								0.19
	L15V ,	903	产生很少至不产生蛋白质						
	Y33 H, N106 Y, A112 V,								

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加
S118 F									
V37 M, S118 F	904	96986	1.18	2523	0.13	1985	0.41	1849	0.22
N47 K, A112 V, S118 Y	905	1980	0.02	1859	0.09	2733	0.56	1825	0.21
A46T ,	906	4224	0.05	4685	0.24	3288	0.68	4273	0.50
P28S, Y33 H, N106 I, S118 Y	907	6094	0.07	2181	0.11	1891	0.39	3021	0.35
P30S, Y33 H, N47 K, V75 M, Q79R ,	908	2247	0.03	2044	0.10	1796	0.37	2658	0.31
V19 A, N47 K, N106 Y, K116 E, S118 Y	909	2504	0.03	2395	0.12	2174	0.45	2852	0.33
Q79R ,	910	2192	0.03	1741	0.09	2367	0.49	1620	0.19

[0811]

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加
A112 V, S118 Y									
Y33 H, A112 V	790	20646	0.25	1465	0.07	1794	0.37	2589	0.30
V101 M, N106 I, S118 Y	911	55274	0.67	6625	0.33	1357	0.28	1494	0.17
Y33 H, Q79R ,, N106 I, A112 V, S118 T	912	6095	0.07	1760	0.09	2393	0.49	3033	0.36
Q79R ,, A112 V	913	1571	0.02	1490	0.08	2284	0.47	1326	0.16
Y33 H, A46T ,, Q79R ,, N106 I, S118 F	914	90813	1.10	15626	0.79	1298	0.27	3571	0.42
A112 V, G121 S	915	95674	1.16	19992	1.01	1252	0.26	4005	0.47
Y33 H, Q79R ,, N106 I, S118 Y	916	36246	0.44	2118	0.11	1970	0.41	3250	0.38

[0812]

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96		
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	
[0813]	Y33 H, N106 I, A112 V	917	47352	0.57	4217	0.21	2641	0.55	1488	0.17
	Y33 H, A46T ,	918	14413	0.17	1596	0.08	2335	0.48	1441	0.17
	V101 M, A112 V, S118 T									
	L32P, L99 M, N106 I, S118 F	919	3056	0.04	1791	0.09	2210	0.46	2000	0.23
	L32P, T108 A, S118 F	920	104685	1.27	4531	0.23	2308	0.48	1518	0.18
	A112 V	798	4937	0.06	1903	0.10	1646	0.34	3011	0.35
	R12 W, Q79R ,	921	55539	0.67	6918	0.35	1386	0.29	1740	0.20
	A112 V									
	Y33 H, N106 Y, E110 G, A112 V	922	2786	0.03	2517	0.13	1787	0.37	2023	0.24
	Y33 H, N106 I, S118 Y	923	1967	0.02	1579	0.08	2601	0.54	1517	0.18

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD1 12 突 变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96		
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	
[0814]	Q79R , S118 F	924	82055	1.00	7582	0.38	1298	0.27	1970	0.23
	Y33 H, Q79R , G98 D, V101 M, A112 V	92	21940	0.27	1632	0.08	1141	0.24	18423	2.16
	N47 K, T81S, V101 M, A112 V, S118 F	926	6889	0.08	1311	0.07	1303	0.27	1145	0.13
	G82S , S118 Y	927	4267	0.05	1938	0.10	2140	0.44	2812	0.33
	Y33 H, A112 V, S118 Y	928	14450	0.18	1532	0.08	2353	0.49	3004	0.35
	Y33 H, N47 K, Q79R , N106 Y, A112 V	929	70440	0.85	3557	0.18	1447	0.30	1679	0.20
	Y33 H, S118 T	930	113896	1.38	17724	0.89	1252	0.26	5001	0.59
	R12 W, Y33	931	3376	0.04	2727	0.14	2047	0.42	2339	0.27

表 15B: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD12 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		MFI 100nM	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加	在 100 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加
[0815]	H, Q79R, V101, M, A112, V								
	S118 F	768	2685	0.03	1864	0.09	2520	0.52	1566
	野生型 CD112-IgV Fc	761 (IgV)	82414	1.00	19803	1.00	4842	1.00	8541
	CD112-ECD-Fc	48 (ECD)	29157	0.35	8755	0.44	1107	0.23	1103
	抗 hFc PE	-	1383	0.02	1461	0.07	1358	0.28	1468

表 15C: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 20 nM 下 的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增 加						
[0816]	N106I, S118Y	773	1288	0.04	1334	0.12	6920	4.16	1102
	Y33H, Q83K, A112V, S118T	1481	115690	3.31	10046	0.93	1128	0.68	2053
	R12W, Q79R, S118F	779	1436	0.04	1296	0.12	6546	3.93	1046
	V29M, Y33H, N106I, S118F	1482	未测试						
	Y33H, A46T, A112V	1483	111256	3.18	14974	1.39	1148	0.69	3333
	Y33H, Q79R,	1484	1483	0.04	1326	0.12	7425	4.46	1138

表 15C: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96		
		在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	
S118F										
Y33H, N47K, F74L, S118F	1485	1338	0.04	1159	0.11	1516	0.91	1140	0.46	
R12W, V101M, N106I, S118Y	1486	1378	0.04	1249	0.12	5980	3.59	1182	0.47	
A46T, V101A, N106I, S118Y	1487	1359	0.04	1199	0.11	6729	4.04	1173	0.47	
Y33H, N106Y, A112V	787	113580	3.25	17771	1.65	1207	0.72	2476	0.99	
N106Y, A112V, S118T	1488	未测试								
[0817]	S76P, T81I, V101M, N106Y, A112V, S118F	1489	未测试							
	N106Y, A112V	777	29015	0.83	2760	0.26	1159	0.70	1639	0.66
	P9R, L21V, P22L, I34M, S69F, F74L, A87V, A112V, L125A	1490	1920	0.05	1218	0.11	1107	0.66	1074	0.43
	Y33H, V101M, A112V	1491	126266	3.61	24408	2.27	1150	0.69	4535	1.82
	N106I, S118F	774	1776	0.05	1385	0.13	9058	5.44	1370	0.55
	V29A, L32P, S118F	1492	1265	0.04	1148	0.11	5057	3.04	1194	0.48
	A112V	798	69673	1.99	6387	0.59	1140	0.68	1214	0.49
	Y33H, V101M, A112V	1491	133815	3.83	24992	2.32	1184	0.71	6338	2.54
	P28S, Y33H,	907	2745	0.08	1689	0.16	6625	3.98	1978	0.79

表 15C: 额外的 CD112 变体和结合数据。

CD112 突变	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加
[0818]	N106I, S118Y								
	Y33H, V101M, N106I, A112V	1493	118654	3.40	21828	2.03	1253	0.75	3871
	R12W, Y33H, N47K, Q79R, S118Y	1494	171390	4.91	5077	0.47	1124	0.68	2636
	A112V, S118T	800	103203	2.95	15076	1.40	1155	0.69	1426
	Y33H, A46T, A112V, S118T	1495	141859	4.06	29436	2.74	1184	0.71	5760
	Y33H, A112V, F114L, S118T	1496	5161	0.15	1734	0.16	1184	0.71	1249
	A112V	798	78902	2.26	6224	0.58	1114	0.67	1181
	Y33H, T38A, A46T, V101M, A112V	1497	111293	3.19	25702	2.39	1192	0.72	99015
	Q79R, A112V	913	96674	2.77	7264	0.67	1130	0.68	1216
	Y33H, N106I, S118Y	923	5720	0.16	1453	0.14	6543	3.93	1248
[0819]	P28S, Y33H, S69P, N106I, A112V, S118Y	1498	22393	0.64	1378	0.13	1550	0.93	19174
	Y33H, P42L, N47K, V101M, A112V	1499	214116	6.13	13878	1.29	1315	0.79	4753
	Y33H, N47K, F74S, Q83K, N106I, F111L, A112V,	1500	6719	0.19	1319	0.12	1305	0.78	1278
									0.51

表 15C: 额外的 CD112 变体和结合数据。									
CD112 变体	SEQ ID NO (IgV)	TIGIT		CD226		CD112R		CD96	
		在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加	在 20 nM 下的 MFI	相对于 WT IgV 的倍数增加
S118T									
Y33H, A112V, S118T, V119A	1501	184794	5.29	10204	0.95	1269	0.76	4321	1.73
Y33H, N106I, A112V, S118F	1502	6872	0.20	1591	0.15	2308	1.39	2796	1.12
[0819] Y33H, K66M, S118F, W124L	1503	1724	0.05	1259	0.12	6782	4.07	1197	0.48
S118F	768	1325	0.04	1213	0.11	7029	4.22	1135	0.46
N106I, A112V	1504	111342	3.19	4241	0.39	1546	0.93	1178	0.47
Y33H, A112V	790	177926	5.09	13761	1.28	1152	0.69	3117	1.25
WT CD112 IgV	1367	34932	1.00	10762	1.00	1665	1.00	2495	1.00
WT CD112-Fc ECD	48 (ECD)	28277	0.81	8023	0.75	1253	0.75	1064	0.43
抗 huFc PE	-	1138	0.03	1006	0.09	1010	0.61	1062	0.43

表 16A: 针对 PD-1 选择的变体 PD-L2。分子序列和结合数据。

PD-L2 变体	SEQ ID NO (IgV)	与 Jurkat/PD-1 细胞的结合		PD-1-Fc 的 Fortebio 结合响应单位
		在 50 nM 下的 MFI	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加	
H15Q	1357	15998	1.63	0.007
N24D	1358	1414	0.14	-0.039
E44D	1359	2928	0.3	-0.006
V89D	1360	3361	0.34	0.005
Q82R,V89D	1361	44977	4.57	1.111
E59G,Q82R	1362	12667	1.29	-0.028
S39I,V89D	1363	26130	2.65	0.26
S67L,V89D	1364	15991	1.62	0.608
S67L,I85F	1365	529	0.05	-0.005
S67L,I86T	1366	6833	0.69	0.141
H15Q,K65R	1367	13497	1.37	-0.001
H15Q,Q72H,V89D	1368	12629	1.28	0.718

[0820]

表 16A：针对 PD-1 选择的变体 PD-L2。分子序列和结合数据。

PD-L2 突变	SEQ ID NO (IgV)	与 Jurkat/PD-1 细胞的结合		PD-1-Fc 的 Fortebio 结合响应单位
		在 50 nM 下的 MFI	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加	
H15Q,S67L,R76G	1369	47201	4.8	0.418
H15Q,R76G,I85F	1370	2941	0.3	-0.038
H15Q,T47A,Q82R	1371	65174	6.62	0.194
H15Q,Q82R,V89D	1372	49652	5.04	1.198
H15Q,C23S,I86T	1373	830	0.08	-0.026
H15Q,S39I,I86T	1374	1027	0.1	0.309
H15Q,R76G,I85F	1375	1894	0.19	-0.006
E44D,V89D,W91R	1376	614	0.06	-0.048
I13V,S67L,V89D	1377	26200	2.66	1.42
H15Q,S67L,I86T	1378	15952	1.62	0.988
I13V,H15Q,S67L,I86T	1379	21570	2.19	1.391
I13V,H15Q,E44D,V89D	1380	23958	2.43	1.399
I13V,S39I,E44D,Q82R,V89D	1381	71423	7.26	0.697
I13V,E44D,Q82R,V89D	1382	45191	4.59	1.283
I13V,Q72H,R76G,I86T	1383	10429	1.06	0.733
I13V,H15Q,R76G,I85F	1384	4736	0.48	-0.04
H15Q,S67L,R76G,I85F	1386	2869	0.29	0.025
H15Q,S39I,R76G,V89D	1386	产生很少至不产生蛋白质		
H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	1387	32103	3.26	0.512
H15Q,T47A,Q72H,R76G	1388	16500	1.68	0.327
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G	1389	73412	7.46	0.896
H15Q,E44D,R76G,I85F	1390	2885	0.29	-0.013
H15Q,S39I,S67L,V89D	1391	45502	4.62	1.174
H15Q,N32D,S67L,V89D	1392	25880	2.63	1.407
N32D,S67L,V89D	1393	31753	3.23	1.155
H15Q,S67L,Q72H,R76G,V89D	1394	40180	4.08	1.464
H15Q,Q72H,Q74R,R76G,I86T	1395	4049	0.41	0.093
G28V,Q72H,R76G,I	1396	5563	0.57	0.003

[0821]

表 16A：针对 PD-1 选择的变体 PD-L2。分子序列和结合数据。

PD-L2 突变	SEQ ID NO (IgV)	与 Jurkat/PD-1 细胞的结合		PD-1-Fc 的 Fortebio 结合响应单位
		在 50 nM 下的 MFI	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加	
86T				
I13V,H15Q,S39I,E44D,S67L	1397	63508	6.45	0.889
E44D,S67L,Q72H,Q82R,V89D	1398	51467	5.23	1.061
H15Q,V89D	1399	17672	1.8	0.31
H15Q,T47A	1400	26578	2.7	0.016
I13V,H15Q,Q82R	1401	76146	7.74	0.655
I13V,H15Q,V89D	1402	28745	2.92	1.331
I13V,S67L,Q82R,V89D	1403	58992	5.99	1.391
I13V,H15Q,Q82R,V89D	1404	49523	5.03	1.419
H15Q,V31M,S67L,Q82R,V89D	1405	67401	6.85	1.37
I13V,H15Q,T47A,Q82R	1406	89126	9.05	0.652
I13V,H15Q,V31A,N45S,Q82R,V89D	1407	68016	6.91	1.327
H15Q,T47A,H69L,Q82R,V89D	1409	65598	6.66	1.44
I13V,H15Q,T47A,H69L,R76G,V89D	1410	54340	5.52	1.719
I12V,I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	1411	61207	6.22	1.453
I13V,H15Q,R76G,D77N,Q82R,V89D	1412	33079	3.36	0.065
I13V,H15Q,T47A,R76G,V89D	1413	53668	5.45	1.596
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	1414	63320	6.43	1.418
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	1414	60980	6.2	1.448
I13V,H15Q,I36V,T47A,S67L,V89D	1416	52835	5.37	1.627
H15Q,T47A,K65R,S67L,Q82R,V89D	1417	79692	8.1	1.453
H15Q,L33P,T47A,S67L,P71S,V89D	1418	45726	4.65	1.467
I13V,H15Q,Q72H,R76G,I86T	1419	24450	2.48	1.355
H15Q,T47A,S67L,Q82R,V89D	1420	67962	6.9	1.479
F2L,H15Q,D46E,T47A,Q72H,R76G,Q82	1421	23039	2.34	1.045

[0822]

表 16A: 针对 PD-1 选择的变体 PD-L2。分子序列和结合数据。

PD-L2 突变	SEQ ID NO (IgV)	与 Jurkat/PD-1 细胞的结合		PD-1-Fc 的 Fortebio 结合响应单位
		在 50 nM 下的 MFI	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加	
R,V89D				
I13V,H15Q,L33F,T47A,Q82R,V89D	1422	62254	6.32	1.379
H15Q,N24S,T47A,Q72H,R76G,V89D	1424	32077	3.26	0.4
I13V,H15Q,E44V,T47A,Q82R,V89D	1425	61005	6.2	1.329
H15Q,N18D,T47A,Q72H,V73A,R76G,I86T,V89D	1426	48317	4.91	0.475
I13V,H15Q,T37A,E44D,S48C,S67L,Q82R,V89D	1427	47605	4.84	1.255
H15Q,L33H,S67L,R76G,Q82R,V89D	1428	62326	6.33	1.507
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	1429	49016	4.98	1.477
H15Q,S39I,E44D,Q72H,V75G,R76G,Q82R,V89D	1430	43713	4.44	0.646
H15Q,T47A,S67L,R76G,Q82R,V89D	1431	71897	7.3	1.539
I13V,H15Q,T47A,S67L,Q72H,R76G,Q82R,V89D	1432	71755	7.29	1.536
野生型 PD-L2 IgV	1263	9843	1	-0.024
PD-L2 的全长 ECD	31	2145	0.22	0.071
PD-L1 的全长 ECD (R&D Systems)	30	23769	2.41	1.263
抗 PD-1 单克隆抗体 (纳武单抗)	-	87002	8.84	0.899

表 16B: MLR 中针对 PD-1 选择的 PD-L2 变体的生物活性数据。

PD-L2 突变	SEQ ID NO (IgV)	IFN γ 水平 pg/mL	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加
H15Q	1357	1817.1	1.32
N24D	1358	1976.3	1.44
E44D	1359	1499.4	1.09
V89D	1360	1168.1	0.85

表 16B: MLR 中针对 PD-1 选择的 PD-L2 变体的生物活性数据。

[0825]

PD-L2 突变	SEQ ID NO (IgV)	IFN $\gamma$ 水平 pg/mL	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加
Q82R,V89D	1361	1617	1.17
E59G,Q82R	1362	1511.3	1.1
S39I,V89D	1363	1314.5	0.95
S67L,V89D	1364	1230.1	0.89
S67L,I85F	1365	1281.9	0.93
S67L,I86T	1366	1020.4	0.74
H15Q,K65R	1367	1510.8	1.1
H15Q,Q72H,V89D	1368	1272.2	0.92
H15Q,S67L,R76G	1369	1426.2	1.04
H15Q,R76G,I85F	1370	1725.7	1.25
H15Q,T47A,Q82R	1371	1317.9	0.96
H15Q,Q82R,V89D	1372	1081.2	0.79
H15Q,C23S,I86T	1373	1847.2	1.34
H15Q,S39I,I86T	1374	1415.2	1.03
H15Q,R76G,I85F	1375	1437.8	1.04
E44D,V89D,W91R	1376	1560.1	1.13
I13V,S67L,V89D	1377	867.5	0.63
H15Q,S67L,I86T	1378	1034.2	0.75
I13V,H15Q,S67L,I86T	1379	1014.4	0.74
I13V,H15Q,E44D,V89D	1380	1384.2	1.01
I13V,S39I,E44D,Q82R,V89D	1381	935.6	0.68
I13V,E44D,Q82R,V89D	1382	1009.5	0.73
I13V,Q72H,R76G,I86T	1383	1953	1.42
I13V,H15Q,R76G,I85F	1384	1528.5	1.11
H15Q,S67L,R76G,I85F	1386	1318.7	0.96
H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	1387	1599.6	1.16
H15Q,T47A,Q72H,R76G	1388	1462.5	1.06
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G	1389	1469.8	1.07
H15Q,E44D,R76G,I85F	1390	1391.6	1.01
H15Q,S39I,S67L,V89D	1391	1227	0.89
H15Q,N32D,S67L,V89D	1392	1285.7	0.93
N32D,S67L,V89D	1393	1194	0.87
H15Q,S67L,Q72H,R76G,V89D	1394	1061.2	0.77
H15Q,Q72H,Q74R,R76G,I86T	1395	933.8	0.68
G28V,Q72H,R76G,I86T	1396	1781.6	1.29
I13V,H15Q,S39I,E44D,S67L	1397	1256.9	0.91
E44D,S67L,Q72H,Q82R,V89D	1398	1281.4	0.93
H15Q,V89D	1399	1495.4	1.09
H15Q,T47A	1400	1637.2	1.19
I13V,H15Q,Q82R	1401	1432.9	1.04
I13V,H15Q,V89D	1402	1123	0.82
I13V,S67L,Q82R,V89D	1403	1372.8	1
I13V,H15Q,Q82R,V89D	1404	1596.6	1.16

表 16B: MLR 中针对 PD-1 选择的 PD-L2 变体的生物活性数据。

PD-L2 突变	SEQ ID NO (IgV)	IFN $\gamma$ 水平 pg/mL	相对于野生型 PD-L2 IgV-Fc 的倍数增加
H15Q,V31M,S67L,Q82R,V89D	1405	1206.5	0.88
I13V,H15Q,T47A,Q82R	1406	1703.3	1.24
I13V,H15Q,V31A,N45S,Q82R,V89D	1407	1723.1	1.25
H15Q,T47A,H69L,Q82R,V89D	1409	1732.5	1.26
I13V,H15Q,T47A,H69L,R76G,V89D	1410	1075.5	0.78
I12V,I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	1411	1533.2	1.11
I13V,H15Q,R76G,D77N,Q82R,V89D	1412	1187.9	0.86
I13V,H15Q,T47A,R76G,V89D	1413	1253.7	0.91
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	1414	1445.5	1.05
I13V,H15Q,T47A,Q82R,V89D	1414	1737	1.26
I13V,H15Q,I36V,T47A,S67L,V89D	1416	1357.4	0.99
H15Q,T47A,K65R,S67L,Q82R,V89D	1417	1335.3	0.97
H15Q,L33P,T47A,S67L,P71S,V89D	1418	1289.1	0.94
I13V,H15Q,Q72H,R76G,I86T	1419	1221	0.89
H15Q,T47A,S67L,Q82R,V89D	1420	1197.1	0.87
F2L,H15Q,D46E,T47A,Q72H,R76G,Q82R,V89D	1421	1170.7	0.85
I13V,H15Q,L33F,T47A,Q82R,V89D	1422	1468.4	1.07
I13V,H15Q,T47A,E58G,S67L,Q82R,V89D	1423	836.1	0.61
H15Q,N24S,T47A,Q72H,R76G,V89D	1424	1091.8	0.79
I13V,H15Q,E44V,T47A,Q82R,V89D	1425	1270.5	0.92
H15Q,N18D,T47A,Q72H,V73A,R76G,I86T,V89D	1426	1065.8	0.77
I13V,H15Q,T37A,E44D,S48C,S67L,Q82R,V89D	1427	1751.7	1.27
H15Q,L33H,S67L,R76G,Q82R,V89D	1428	1502	1.09
I13V,H15Q,T47A,Q72H,R76G,I86T	1429	1088.1	0.79
H15Q,S39I,E44D,Q72H,V75G,R76G,Q82R,V89D	1430	940.9	0.68
H15Q,T47A,S67L,R76G,Q82R,V89D	1431	1097.8	0.8
I13V,H15Q,T47A,S67L,Q72H,R76G,Q82R,V89D	1432	1559.6	1.13
野生型 PD-L2 IgV	1263	1376.8	1
PD-L2 的全长 ECD	31	1173.2	0.85
PD-L1 的全长 ECD	30	2190.9	1.59
纳武单抗(抗 PD-1)	-	418.9	0.3

[0827] 实施例9

[0828] 使用混合淋巴细胞反应 (MLR) 评定含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的生物活性

[0829] 此实施例描述了在人原代T细胞体外测定中的Fc融合变体蛋白生物活性表征。

[0830] 在人混合淋巴细胞反应 (MLR) 中测试可溶性变体PD-L1 IgV-Fc生物活性。通过在离体15培养基 (Lonza, Switzerland) 中将从PBMC (BenTech Bio, USA) 分离的单核细胞与50ng/mL rIL-4 (R&D Systems, USA) 和80ng/mL rGM-CSF (R&D Systems, USA) 在体外一起培养7天来生成人原代树突细胞 (DC)。为了完全诱导DC成熟,在第6天将脂多糖 (LPS) (InvivoGen Corp., USA) 添加至DC培养物,并且将细胞额外孵育24小时。将大约10,000个成熟DC和100,000个纯化的同种异体CD3+ T细胞 (BenTech Bio, USA) 与若干浓度的变体PD-L1 IgV-Fc融合蛋白在200 $\mu$ l最终体积的离体15培养基中在96孔圆底板中共同培养。非相关

人IgG或仅培养基(标示为“无添加”)用作阴性对照。作为阳性对照,评定PDL1-Fc(全PD-L1细胞外结构域)、野生型PD-L1 IgV-Fc和或阳性对照抗PD-1单克隆抗体(纳武单抗)。在如图8和图9中指示的各种浓度下测试变体PD-L1 IgV-Fc融合蛋白。在第5天,使用人IFN- $\gamma$  DuoSet ELISA试剂盒(R&D Systems,USA)分析培养物上清液中的IFN- $\gamma$ 分泌。在BioTek Cytation多模式微板读数器(BioTek Corp.,USA)上测量光学密度,并且针对IFN- $\gamma$  DuoSet试剂盒(R&D Systems,USA)中包括的滴定的rIFN- $\gamma$ 标准物进行定量。

[0831] 示例性测试的变体PD-L1 IgV-Fc的生物活性研究的结果在图8和图9中示出,其列出了在指示浓度的变体IgV-Fc融合分子下培养物上清液中IFN- $\gamma$ 的计算水平(pg/mL)。参考PD-L1的IgV中的氨基酸取代鉴定变体,所述氨基酸取代参考与SEQ ID NO:30或1728中所列出的未修饰(野生型)PD-L1 ECD序列的位置相对应的位置。如图8所示,示例性变体PD-L1 IgV-Fc分子表现出改善的活性以增加MLR测定中的IFNg产生。如图9所示,所测试的示例性变体PD-L1 IgV-Fc融合分子在MLR测定中显示与纳武单抗相当的活性。

[0832] 实施例10

[0833] 含有不同的亲和力修饰的结构域的堆叠分子的生成

[0834] 此实施例描述了作为多结构域堆叠构建体生成的免疫调节蛋白,所述多结构域堆叠构建体含有来自以上所述的鉴定的变体PD-L1多肽、鉴定的变体CD112多肽和鉴定的变体CD155多肽的至少两个不同的亲和力修饰的IgV结构域。具体地,将示例性变体PD-L1 IgV D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G- ins (G101GG) (SEQ ID NO:303)、CD112 IgV分子S118F (SEQ ID NO:768) 和/或示例性变体CD155 IgV分子P18S/S65W/S67A/L104Q/G111R (SEQ ID NO:1576) 连接在一起并以各种构型融合至Fc。

[0835] 以各种构型生成同源二聚体堆叠物,如图5A和图5B和如下所总结的。在所生成的同源二聚体堆叠构建体中,将变体CD155 IgV变体、CD112 IgV和/或变体PD-L1 IgV经由2xGGGS (SEQ ID NO:240) 或3x GGGGS (SEQ ID NO:239) 肽接头不同地连接至人IgG1 Fc区的N端或C端。在此研究中,示例性IgG1 Fc区在SEQ ID NO:1155中列出并且含有通过EU编号的突变L234A、L235E、G237A、E356D和M358L(对应于参考SEQ ID NO:187中所列出的野生型人IgG1 Fc的L19A、L20E、G22A、E141D和M143L)。此外,与SEQ ID NO:187(对应于通过EU编号的C220S)中所列出的野生型或未修饰Fc相比,所述Fc区含有在位置5(C5S)处的半胱氨酸残基置换为丝氨酸残基。在一些实施例中,对Fc进一步修饰以去除SEQ ID NO:197(对应于通过EU编号的K447de1)中所列出的野生型或未修饰Fc的位置232处的C端赖氨酸。包含赖氨酸缺失的示例性IgG1 Fc区在SEQ ID NO:1715中列出。其他Fc区还适于生成堆叠分子。示例性生成的堆叠物在下文阐述。

[0836] 使用制造商的商业ExpiFectamine试剂和培养基,将编码感兴趣的Fc融合蛋白的表达构建体在来自Invitrogen的Expi293 HEK293细胞瞬时表达。收获上清液,并且捕获蛋白质并使用AKTA蛋白质纯化系统从蛋白质A柱洗脱。然后通过额外的制备型SEC步骤分离洗脱的物质以生成单体高度纯化的物质。将纯化的蛋白质在15mM乙酸盐、200mM NaCl、9%蔗糖,pH 5.0 (ASU5) 中配制。将蛋白质在无菌生物安全柜中装瓶并且在-80°C下冷冻。将小瓶解冻并通过分析型SEC评定以证明所述物质是稳定的并且在解冻之后主要是单体的。

[0837] 对于每种堆叠物,设计编码核酸分子来产生具有所示顺序的序列的呈各种构型的同源二聚体堆叠物:

[0838] A. 含有PD-L1和CD155的堆叠构建体

[0839] 设计编码核酸分子来生成具有所示顺序的序列的呈各种构型的同源二聚体堆叠物：

[0840] • PD-L1/CD155堆叠物1 (SEQ ID NO:1716) : CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - Fc (SEQ ID NO:1155) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - PD-L1 (SEQ ID NO:303)

[0841] • PD-L1/CD155堆叠物2 (SEQ ID NO:1717) : PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - Fc (SEQ ID NO:1155) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576)

[0842] • PD-L1/CD155堆叠物3 (SEQ ID NO:1718) : CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - Fc (SEQ ID NO:1155)

[0843] • PD-L1/CD155堆叠物4 (SEQ ID NO:1719) : PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - Fc (SEQ ID NO:1155)

[0844] • PD-L1/CD155堆叠物5 (SEQ ID NO:1720) : 在SEQ ID NO:1156中所列出的N端 HMSSVSAQ-Fc (SEQ ID NO:1155) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - PD-L1 (SEQ ID NO:303)

[0845] • PD-L1/CD155堆叠物6 (SEQ ID NO:1721) : 在SEQ ID NO:1156中所列出的N端 HMSSVSAQ-Fc (SEQ ID NO:1155) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576)

[0846] B. 含有PD-L1、CD112和CD155的堆叠构建体

[0847] 设计编码核酸分子来生成具有所示顺序的序列的呈各种构型的同源二聚体堆叠物：

[0848] • PD-L1/CD112/CD155堆叠物1 (SEQ ID NO:1722) : PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - 赖氨酸去除的Fc (SEQ ID NO:1715) - 3x GGGGS (SEQ ID NO:239) - CD112 (SEQ ID NO:768)

[0849] • PD-L1/CD112/CD155堆叠物2 (SEQ ID NO:1723) : PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - CD112 (SEQ ID NO:768) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - Fc (SEQ ID NO:1155)

[0850] • PD-L1/CD112/CD155堆叠物3 (SEQ ID NO:1724) : PD-L1 (SEQ ID NO:303) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - CD112 (SEQ ID NO:768) - 3xGGGS (SEQ ID NO:239) - CD155变体 (SEQ ID NO:1576) - 2xGGGS (SEQ ID NO:240) - Fc (SEQ ID NO:1155)

[0851] 实施例11

[0852] 评定PD-L1/CD155堆叠的含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的结合和生物活性

[0853] 此实施例描述了评定在实施例10中生成的示例性PD-L1/CD155变体IgV堆叠免疫调节蛋白 (PD-L1/CD155堆叠的IgV-Fc) 用于结合至同源结合配偶体的特异性和亲和力的结合研究。此外, 使用Jurkat/IL2/PD1/TIGIT报告基因测定来评定PD-L1/CD155堆叠的IgV-Fc分子的PD-1和TIGIT阻断活性。作为对照, 还评定分别含有在堆叠物中使用的相同变体PD-

L1 IgV (SEQ ID NO: 303) 或变体CD155 IgV (SEQ ID NO:1576) 的非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc 或CD155IgV-Fc融合分子的结合和阻断活性。还评定分别含有野生型CD155ECD (SEQ ID NO: 20) 或野生型PD-L1 ECD (SEQ ID NO:3) 的野生型CD155-ECD-Fc和野生型PD-L1-ECD-Fc。

[0854] A. 与细胞表达的相对结构的结合

[0855] 使用Jurkat/IL-2报告基因细胞(购自Promega Corp.USA) , 对其进行转导以稳定表达人PD-1 (Jurkat/PD-1细胞) 、人TIGIT (Jurkat/TIGIT细胞) 或PD-1和TIGIT (Jurkat/PD-1/TIGIT细胞) 二者来进行结合研究。为了通过流式细胞术进行染色, 将100,000个Jurkat/PD-1、Jurkat/TIGIT、Jurkat/PD-1/TIGIT细胞或阴性对照(仅Jurkat)接种在96孔圆底板中。使细胞离心并重新悬浮于染色缓冲液 (PBS (磷酸盐缓冲盐水) 、1% BSA (牛血清白蛋白) 和0.1% 叠氮化钠) 中20分钟以阻断非特异性结合。然后, 再次使细胞离心并重新悬浮于含有100nM至6pM每种候选Fc融合蛋白的50 $\mu$ L染色缓冲液中, 所述候选Fc融合蛋白为以上所述的变体PD-L1 IgV-Fc或CD155IgV-Fc融合分子或PD-L1/CD155堆叠的IgV-Fc融合分子。在冰上进行90分钟初级染色, 之后在200 $\mu$ L染色缓冲液中洗涤细胞两次。将PE缀合的抗人Fc (Jackson ImmunoResearch, USA) 在50 $\mu$ L染色缓冲液中以1:150稀释并添加到细胞中, 并且在冰上再孵育30分钟。洗涤两次第二抗体, 将细胞以4% 甲醛/PBS固定, 并且在Intellicyt 流式细胞仪 (Intellicyt Corp., USA) 上分析样品。

[0856] 使用FlowJo Version 10软件 (FlowJo LLC, USA) 计算平均荧光强度 (MFI) 。表17列出了20nM的每种堆叠Fc融合分子、非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc或CD155 IgV-Fc对照或野生型ECD对照与Jurkat/PD-1、Jurkat/TIGIT和Jurkat/PD-1/TIGIT细胞的结合的结合活性, 如通过平均荧光强度 (MFI) 所测量的。如表17所示, 若干堆叠蛋白以高亲和力结合PD-1和TIGIT 二者。基本上如上所述进行研究以进一步评定在各种剂量下堆叠蛋白的结合。

表 17: 堆叠物与细胞表达的相对结构的结合

[0857]

		与稳定表达以下的 Jurkat 细胞的流式结合:		
SEQ ID NO	描述	PD-1	TIGIT	PD-1 + TIGIT
1716	(CD155 IgV) (G4S)2 Fc (G4S)3 (PD-L1 IgV)	61805	80658	35128
1717	(PD-L1 IgV) (G4S)2 Fc(G4S)3 (CD155 IgV)	69813	36485	52538
1718	(CD155 IgV) (G4S)3 (PD-L1 IgV) (G4S)2 Fc	47261	81840	32188
1719	(PD-L1 IgV) (G4S)3 (CD155 IgV) (G4S)2 Fc	77959	60515	51615
303	非堆叠变体 PD-L1 IgV-Fc 对照	111746	630	41390
1576	非堆叠变体 CD155 IgV-Fc 对照	460	79152	7910
20 (ECD)	CD155-ECD-Fc	511	28790	1196
3 (ECD)	PD-L1-ECD-Fc (R&D Systems)	35005	557	10358
1155	Fc 对照(同源二聚体)	437	483	478
		在 20 nM 下的 MFI	在 20 nM 下的 MFI	在 20 nM 下 的 MFI

[0858] B. 评定含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的生物活性

[0859] 将表达IL-2-荧光素酶报告基因和细胞表面PD-1和TIGIT的Jurkat效应细胞以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL悬浮于Jurkat测定缓冲液(RPMI1640+5%FBS)中,并且将抗CD28添加至 $3\mu$ g/mL的最终浓度。然后将Jurkat细胞以总计100,000个细胞/孔在 $50\mu$ L/孔下接种。

[0860] 在每个孔中,将 $25\mu$ L PD-L1/CD155堆叠的IgV-Fc测试蛋白添加到Jurkat细胞中。作为对照,还评定单独或组合的非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc或CD155 IgV-Fc融合分子以用于比较。还使用抗TIGIT抗体(克隆MBSA43)、抗PD-1抗体(纳武单抗)或空Fc分子作为对照。所有蛋白质以五种浓度添加:400nM、100nM、25nM、6.25nM和1.56nM。将具有测试或对照蛋白的Jurkat细胞在室温下孵育15分钟。将展示转导细胞表面抗CD3单链Fv(OKT3)、PD-L1和CD155的CHO来源的人工抗原递呈细胞(aAPC)增加至 $0.8 \times 10^6$ 个细胞/mL,并且将 $25\mu$ L细胞添加到每个孔中,使得每个孔的最终体积为 $100\mu$ L。每个孔具有5:1 Jurkat:CHO细胞的最终比率和100、25、6.25、1.56或0.47nM的测试蛋白浓度以及 $1.5\mu$ g/mL的抗CD28浓度。将Jurkat细胞和CHO细胞在 $37^\circ\text{C}$ 下在潮湿5% $\text{CO}_2$ 孵育室中孵育5小时。然后从孵育器取出板并使其适应室温15分钟。将 $100\mu$ L细胞裂解物和荧光素酶底物溶液(BioGlo荧光素酶试剂, Promega)添加到每个孔中并且将所述板在轨道式震荡器上孵育10分钟。使用BioTek Cytation光度计以1秒/孔整合时间测量发光。

[0861] 确定每种测试样品的平均相对发光值,并且计算每种堆叠分子与非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc和变体CD155 IgV-Fc蛋白相比的IL-2报告基因信号的倍数增加(或降低)。因为

所述测定是抑制性信号的阻断的量度,所以与对照相比发光信号增加指示阻断活性的存在。

[0862] 如表18所示,对于每种测试的分子,与对照相比,与抗CD3/PD-L1/CD155 aAPC和100nM PD-L1/CD155堆叠Fc分子共同培养的Jurkat效应细胞的荧光素酶活性改变(增加)。发光信号的差异证明PD-L1/CD155堆叠物-Fc分子与PD-1和TIGIT的结合的差异并且引起抑制性活性的共同阻断。在表中,列1列出了所测试的每种PD-L1/CD155堆叠物-Fc变体的SEQ ID NO识别符。基本上如上所述进行研究以进一步评定在各种剂量下堆叠蛋白的结合。

**表 18: Jurkat/IL2/PD1/TIGIT + CHO/OKT3/PD-L1/CD155 报告基因测定结果**

SEQ ID NO	描述	RLU	与非堆叠变体 PD-L1 IgV-Fc 对照相比的倍数增加	与非堆叠变体 CD155 IgV-Fc 对照相比的倍数增加	与变体 PD-L1 IgV-Fc 和变体 CD155 IgV-Fc 相比的倍数增加
1716	(CD155 IgV) (G4S)2 Fc (G4S)3 (PD-L1 IgV)	573	0.6	1.7	0.8
1717	(PD-L1 IgV) (G4S)2 Fc(G4S)3 (CD155 IgV)	962	1.0	2.8	1.4
1718	(CD155 IgV) (G4S)3 (PD-L1 IgV) (G4S)2 Fc	434	0.5	1.3	0.6
1719	(PD-L1 IgV) (G4S)3 (CD155 IgV) (G4S)2 Fc	1923	2.0	5.6	2.7
303	非堆叠变体 PD-L1 IgV-Fc 对照	958	1.0	2.8	1.3
1576	非堆叠变体 CD155 IgV-Fc 对照	345	0.4	1.0	0.5
-	抗 TIGIT 抗体 (克隆 MBSA43), 抗 PD-1 抗体(纳 武单抗)	2192	2.3	6.4	3.1
303+1576	PD-L1 IgV + CD155 IgV	710	0.7	2.1	1.0
1715	Fc 对照(同源 二聚体)	235	0.2	0.7	0.3

[0865] 实施例12

[0866] 评定PD-L1/CD112/CD155堆叠的含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的结合和生物活性

[0867] 此实施例描述了评定在实施例10中生成的PD-L1/CD112/CD155堆叠免疫调节蛋白(PD-L1/CD112/CD155堆叠的IgV-Fc)用于结合至同源结合配偶体的特异性和亲和力的结合研究。此外,使用Jurkat/IL2/PD1/CD112R/TIGIT报告基因测定来评定PD-L1/CD112/CD155堆叠的IgV-Fc分子的PD-1、CD112R和TIGIT阻断活性。作为比较,还评定分别含有在堆叠物中使用的相同变体PD-L1 (SEQ ID NO:303)、CD112 IgV (SEQ ID NO:768)或变体CD155 IgV (SEQ ID NO:1576)的非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc、CD112 IgV-Fc或CD155 IgV-Fc融合分子的结合和阻断活性。

[0868] A.与细胞表达的相对结构的结合

[0869] 使用内源性表达CD112R的Jurkat/IL-2报告基因细胞(购自Promega Corp.USA),对其进行转导以稳定表达人PD-1(Jurkat/PD-1细胞)、人TIGIT(Jurkat/TIGIT细胞)或PD-1和TIGIT(Jurkat/PD-1/TIGIT细胞)二者来进行结合研究。为了通过流式细胞术进行染色,将100,000个Jurkat亲本(CD112R)、Jurkat/PD-1、Jurkat/TIGIT、Jurkat/PD-1/TIGIT细胞接种在96孔圆底板中。使细胞离心并重新悬浮于染色缓冲液(PBS(磷酸盐缓冲盐水)、1% BSA(牛血清白蛋白)和0.1%叠氮化钠)中20分钟以阻断非特异性结合。然后,再次使细胞离心并重新悬浮于含有100nM至6pM每种候选Fc融合蛋白的50μL染色缓冲液中。在冰上进行90分钟初级染色,之后在200μL染色缓冲液中洗涤细胞两次。将PE缀合的抗人Fc(Jackson ImmunoResearch,USA)在50μL染色缓冲液中以1:150稀释并添加到细胞中,并且在冰上再孵育30分钟。洗涤两次第二抗体,将细胞以4%甲醛/PBS固定,并且在LSRII流式细胞仪(Becton Dickinson Corp.,USA)上分析样品。

[0870] 确定33.3nM浓度的每种堆叠Fc融合蛋白和非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc、CD112 IgV-Fc和CD155 IgV-Fc蛋白的结合值,表达为平均荧光强度(MFI)。使用FlowJo Version 10软件(FlowJo LLC,USA)分析数据。示例性测试的PD-L1/CD112/CD155堆叠Fc融合分子(在33.3nM下测试)的结合研究的结果在表19中示出。如所示,若干堆叠蛋白以高亲和力结合PD-1、TIGIT和/或CD112R。

表 19: 堆叠物与细胞表达的相对结构的结合

类别	描述	SEQ ID NO	与 Jurkat 转染子的结合			
			TIGIT	CD112R	PD1	TIGIT/CD112R/PD1
堆 叠	(PD-L1 IgV) (G4S)3 (CD155 IgV) (G4S)3	1723	2457	969	16989	19041

[0872]	物 对照	(CD112 IgV) (G4S)2 Fc					
		(PD-L1 IgV) (G4S)3					
		(CD112 IgV) (G4S)3	1724	1504	289	21968	18727
		(CD155 IgV) (G4S)2 Fc					
	非堆叠变体 PD-L1 IgV-Fc 对照	303	101	100	20713	18468	
	非堆叠变体 CD155 IgV-Fc 对照	1576	6294	55	31	961	
	非堆叠变体 CD112 IgV-Fc 对照	768	358	516	459	477	
	Fc 对照	1155	23.3	27	22	35	
	在 33.3 nM 下的 MFI						

[0873] B. 评定含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子的生物活性

[0874] 将表达IL-2-荧光素酶报告基因和细胞表面PD-1、CD112R和TIGIT的Jurkat效应细胞以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL悬浮于Jurkat测定缓冲液(RPMI1640+5%FBS)中,并且将抗CD28添加至 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。然后将Jurkat细胞以总计100,000个细胞/孔在 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 下接种。

[0875] 在每个孔中,将 $25\mu\text{L}$  PD-L1/CD112/CD155堆叠的IgV-Fc测试蛋白添加到Jurkat细胞中。作为对照,还评定单独或组合的非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc、CD112 IgV-Fc或CD155 IgV-Fc融合分子以用于比较。使用抗TIGIT抗体(克隆MBSA43)、抗PD-1抗体(纳武单抗)或空Fc分子作为对照。所有蛋白质以五种浓度添加:400nM、100nM、25nM、6.25nM、1.56nM或0.49nM。将具有测试或对照蛋白的Jurkat细胞在室温下孵育15分钟。将展示转导细胞表面抗CD3单链Fv(OKT3)、PD-L1和CD112的CHO来源的人工抗原递呈细胞(aAPC)增加至 $0.8 \times 10^6$ 个细胞/mL,并且将 $25\mu\text{L}$ 细胞添加到每个孔中,使得每个孔的最终体积为 $100\mu\text{L}$ 。每个孔具有5:1 Jurkat:CHO细胞的最终比率和100、25、6.25、1.56、0.47或0.12nM的测试蛋白浓度以及 $1.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗CD28浓度。将Jurkat细胞和CHO细胞在 $37^\circ\text{C}$ 下在潮湿5% $\text{CO}_2$ 孵育室中孵育5小时。然后从孵育器取出板并使其适应室温15分钟。将 $100\mu\text{L}$ 细胞裂解物和荧光素酶底物溶液(BioGlo荧光素酶试剂, Promega)添加到每个孔中并且将所述板在轨道式震荡器上孵育10分钟。使用BioTek Cytation光度计以1秒/孔整合时间测量发光。

[0876] 确定每种测试样品的平均相对发光值(RLU),并且计算每种堆叠分子与非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc、变体CD112 IgV-Fc和变体CD155 IgV-Fc蛋白相比的IL-2报告基因信号的倍数增加(或降低)。因为所述测定是抑制性信号的阻断的量度,所以与对照相比发光信号增加指示阻断活性的存在。

[0877] 如表20所示,对于每种测试的分子,与抗CD3/PD-L1/CD112aAPC和PD-L1/CD112/CD155堆叠Fc分子共同培养的Jurkat效应细胞的荧光素酶活性改变(增加)。发光信号的差异证明PD-L1/CD112/CD155堆叠物-Fc分子与PD-1、CD112R和TIGIT的结合的差异并且引起抑制性活性的共同阻断。在表中,列2列出了所测试的每种PD-L1/CD112/CD155堆叠物-Fc变体的SEQ ID NO识别符。

表 20: Jurkat/IL2/TIGIT/PD1 报告基因测定

描述	SEQ ID NO	RLU	与 Fc 对照相比的倍数增加	与 PD-L1 IgV-Fc 相比的倍数增加	与 CD155 IgV-Fc 相比的倍数增加	与 CD112-Ig V-Fc 相比的倍数增加
[0878]	(PD-L1 IgV) (G4S)3 (CD155 IgV) (G4S)3 (CD112 IgV) (G4S)2 Fc	1723	896	1.44	1.12	1.04
	(PD-L1 IgV) (G4S)3 (CD112 IgV) (G4S)3 (CD155 IgV) (G4S)2 Fc	1724	961	1.54	1.20	1.12
	非堆叠变体 PD-L1 IgV-Fc 对照	303	800	1.28	1.00	0.93
	非堆叠变体 CD155 IgV-Fc 对照	1576	859	1.38	1.07	1.00
	非堆叠变体 CD112 IgV-Fc	768	640	1.03	0.80	0.75
[0879]	对照					
	Fc 对照	1155	624	1.00	0.78	0.73

[0880] 实施例13

[0881] 评定含有亲和力成熟的IgSF结构域的分子与细胞表达的相对结构的结合

[0882] 此实施例描述了使用第二轮针对rPD-1.Fc或rCD80.Fc的选择的如实施例3所述的选择方案评定PD-L1-细胞外结构域(ECD)变体免疫调节蛋白对同源结合配偶体PD-1和CD80的特异性和亲和力的流式细胞术结合研究,不同的是基于含有如下全细胞外结构域(IgV+ IgC)的SEQ ID NO:1728中所列出的野生型人PD-L1序列生成突变体构建体。

[0883] FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPK AEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERT (SEQ ID NO:1728)

[0884] 为了测量与PD-1的结合,使用Jurkat/IL-2报告基因细胞(购自Promega Corp.USA),对其进行转导以稳定表达人PD-1(Jurkat/PD-1细胞)来进行结合研究。为了测量与CD80的结合,使用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,对其进行转导以稳定表达人CD80(CHO/CD80)来进行研究。将100,000个细胞/孔的Jurkat/PD-1、CHO/CD80、Jurkat亲本或CHO亲本细胞接种到96孔圆底板中。使细胞离心并重新悬浮于染色缓冲液(PBS(磷酸盐缓冲盐水)、1% BSA(牛血清白蛋白)和0.1%叠氮化钠)中20分钟以阻断非特异性结合。然后,再次使细

胞离心并重新悬浮于含有100nM至3.7nM每种候选Fc融合蛋白的50μL染色缓冲液中。在冰上进行90分钟初级染色,之后在200μL染色缓冲液中洗涤细胞两次。将APC缀合的抗人Fc (Jackson ImmunoResearch, USA) 在50μL染色缓冲液中以1:150稀释并添加到细胞中,并且在冰上再孵育30分钟。洗涤两次第二抗体,将细胞以4%甲醛/PBS固定,并且在LSRII流式细胞仪(Becton Dickinson Corp., USA)上分析样品。

[0885] 在20nM浓度下计算平均荧光强度(MFI),并且用FlowJo Version 10软件(FlowJo LLC, USA)与野生型PD-L1 ECD-Fc蛋白进行比较。示例性测试的PD-L1-ECD-Fc融合分子的结合研究的结果在表21中示出。如所证明的,所述选择能够鉴定以高亲和力结合单独的PD-1、单独的CD80或两种蛋白的变体PD-L1蛋白。

PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)	PD-1		CD80	
		在 20 nM 下的 MFI	与 WT PD-L1 相比的倍数变化	在 20 nM 下的 MFI	与 WT PD-L1 相比的倍数变化
K57R, S99G	1729	2953	0.9	16253	121.3
K57R, S99G, F189L	1730	1930	0.6	12906	96.3
M18V, M97L, F193S, R195G, E200K, H202Q	1731	69	0.0	241	1.8
I36S, M41K, M97L, K144Q, R195G, E200K, H202Q, L206F	1732	3498	1.1	68715	512.8
C22R, Q65L, L124S, K144Q, R195G, E200N, H202Q, T221L	1733	产生很少至不产生蛋白质			
M18V, I98L, L124S, P198T, L206F	1734	2187	0.7	143	1.1
S99G, N117S, I148V, K171R, R180S	1735	产生很少至不产生蛋白质			
I36T, M97L, A103V, Q155H	1736	120	0.0	128	1.0
K28I, S99G	1737	830	0.3	693	5.2
R195S	1738	3191	1.0	138	1.0
A79T, S99G, T185A, R195G, E200K, H202Q,	1739	1963	0.6	643	4.8

[0886]

表 21：与表达 PD-1 或 CD80 的细胞的流式结合

[0887]

PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)	PD-1		CD80	
		在 20 nM 下的 MFI	与 WT PD-L1 相比的倍数变化	在 20 nM 下的 MFI	与 WT PD-L1 相比的倍数变化
L206F					
K57R, S99G, L124S, K144Q	1740	2081	0.7	14106	105.3
K57R, S99G, R195G	1741	2479	0.8	10955	81.8
D55V, M97L, S99G	1742	11907	3.8	71242	531.7
E27G, I36T, D55N, M97L, K111E	1743	1904	0.6	88724	662.1
E54G, M97L, S99G	1744	8414	2.7	51905	387.4
G15A, I36T, M97L, K111E, H202Q	1745	112	0.0	13530	101.0
G15A, I36T, V129D	1746	114	0.0	136	1.0
G15A, I36T, V129D, R195G	1747	125	0.0	134	1.0
G15A, V129D	1748	2075	0.7	128	1.0
I36S, M97L	1749	3459	1.1	44551	332.5
I36T, D55N, M97L, K111E, A204T	1750	265	0.1	62697	467.9
I36T, D55N, M97L, K111E, V129A, F173L	1751	393	0.1	72641	542.1
I36T, D55S, M97L, K111E, I148V, R180S	1752	94	0.0	30704	229.1
I36T, G52R, M97L, V112A, K144E, V175A, P198T	1753	81	0.0	149	1.1
I36T, I46V, D55G, M97L, K106E, K144E, T185A, R195G	1754	69	0.0	190	1.4
I36T, I83T, M97L, K144E, P198T	1755	62	0.0	6216	46.4
I36T, M97L, K111E	1756	产生很少至不产生蛋白质			
I36T, M97L, K144E, P198T	1757	197	0.1	40989	305.9
I36T, M97L, Q155H, F193S, N201Y	1758	69	0.0	1251	9.3
I36T, M97L, V129D	1759	523	0.2	50905	379.9
L35P, I36S, M97L, K111E	1760	190	0.1	155	1.2

表 21：与表达 PD-1 或 CD80 的细胞的流式结合

PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)	PD-1		CD80	
		在 20 nM 下的 MFI	与 WT PD-L1 相比的倍数变化	在 20 nM 下的 MFI	与 WT PD-L1 相比的倍数变化
[0888]	M18I, I36T, E53G, M97L, K144E, E199G, V207A	1761	104	0.0	47358
	M18T, I36T, D55N, M97L, K111E	1762	138	0.0	71440
	M18V, M97L, T176N, R195G	1763	1301	0.4	45300
	M97L, S99G	1764	12906	4.1	81630
	N17D, M97L, S99G	1765	10079	3.2	73249
	S99G, T185A, R195G, P198T	1766	2606	0.8	22062
	V129D, H202Q	1767	2001	0.6	219
	V129D, P198T	1768	3245	1.0	152
	V129D, T150A	1769	1941	0.6	142
	V93E, V129D	1770	1221	0.4	150
	Y10F, M18V, S99G, Q138R, T203A	1771	70	0.0	412
	WT PD-L1 (IgV+IgC) Fc	1728	3121	1.0	134
	CTLA4-Fc	-	59	不适用	199670
	抗 PD1 mAb	-	31482	不适用	134
	Fc 对照	1155	59	不适用	132

[0889] 如实施例3中所述的筛选中鉴定的额外变体在表22A中列出。

表 22A. 额外含有亲和力成熟的 IgSF 结构域的分子

PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)	PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)
[0890]	N45D	1772	N45D, G102D, R194W, R195G
	K160M, R195G	1773	N45D, G52V, Q121L, P198S
	N45D, K144E	1774	N45D, I148V, R195G, N201D
	N45D, P198S	1775	N45D, K111T, T183A, I188V
	N45D, P198T	1776	N45D, Q89R, F189S, P198S
	N45D, R195G	1777	N45D, S99G, C137R, V207A
	N45D, R195S	1778	N45D, T163I, K167R, R195G
	N45D, S131F	1779	N45D, T183A, T192S, R194G
	N45D, V58D	1780	N45D, V50A, I119T, K144E
	V129D, R195S	1781	T19A, N45D, K144E, R195G
	I98T, F173Y, L196S	1782	V11E, N45D, T130A, P198T
	N45D, E134G, L213P	1783	V26A, N45D, T163I, T185A
			1807

[0891]	N45D, F173I, S177C	1784	K23N, N45D, L124S, K167T, R195G	1808
	N45D, I148V, R195G	1785	K23N, N45D, Q73R, T163I	1809
	N45D, K111T, R195G	1786	K28E, N45D, W149R, S158G, P198T	1810
	N45D, N113Y, R195S	1787	K28R, N45D, K57E, I98V, R195S	1811
	N45D, N165Y, E170G	1788	K28R, N45D, V129D, T163N, R195T	1812
	N45D, Q89R, I98V	1789	M41K, D43G, N45D, R64S, R195G	1813
	N45D, S131F, P198S	1790	M41K, D43G, N45D, R64S, S99G	1814
	N45D, S75P, P198S	1791	N45D, R68L, F173L, D197G, P198S	1815
	N45D, V50A, R195T	1792	N45D, V50A, I148V, R195G, N201D	1816
	E27D, N45D, T183A, I188V	1793	M41K, D43G, K44E, N45D, R195G, N201D	1817
	F173Y, T183I, L196S, T203A	1794	N45D, V50A, L124S, K144E, L179P, R195G	1818
	K23N, N45D, S75P, N120S	1795		

[0892] 基本上如上所述,进行流式细胞术结合研究来评定PD-L1-细胞外结构域(ECD)变体免疫调节蛋白对同源结合配偶体PD-1的特异性和亲和力。为了测量与PD-1的结合,如上所述,使用进行转导以稳定表达人PD-1(Jurkat/PD-1细胞)的Jurkat/IL-2报告基因细胞。在20nM浓度下计算平均荧光强度(MFI),并且与野生型PD-L1 ECD-Fc蛋白和仅Fc对照进行比较。示例性测试的PD-L1-ECD-Fc融合分子的结合研究的结果在表22B中示出。如所证明的,所述选择能够鉴定以高亲和力结合单独的PD-1的变体PD-L1蛋白。

表 22B. 与表达 PD-1 的 Jurkat 细胞的流式结合

PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)	在 20 nM 浓度下的 MFI	相对于 WT PD-L1 ECD-Fc 的 倍数增加
N45D	1772	95635	19.1
R195S	1827	5365	1.1
K160M, R195G	1773	3931	0.8
N45D, K144E	1774	99704	19.9
N45D, P198S	1775	117460	23.5
N45D, P198T	1776	122118	24.4
N45D, R195G	1777	121779	24.3
N45D, R195S	1778	128736	25.7
N45D, S131F	1779	122458	24.5
N45D, V58D	1780	152085	30.4
V129D, R195S	1781	7699	1.5
I98T, F173Y, L196S	1782	236	0.0

[0894]

N45D, E134G, L213P	1783	2255	0.5
N45D, F173I, S177C	1784	2199	0.4
N45D, I148V, R195G	1785	109276	21.8
N45D, K111T, R195G	1786	65728	13.1
N45D, N113Y, R195S	1787	112042	22.4
N45D, N165Y, E170G	1788	88971	17.8
N45D, Q89R, I98V	1789	90467	18.1
N45D, S131F, P198S	1790	116162	23.2
N45D, S75P, P198S	1791	129814	25.9
N45D, V50A, R195T	1792	141881	28.3
E27D, N45D, T183A, I188V	1793	133100	26.6
K23N, N45D, S75P, N120S	1795	131995	26.4
N45D, G102D, R194W, R195G	1796	13381	2.7
N45D, G52V, Q121L, P198S	1797	296	0.1
N45D, I148V, R195G, N201D	1798	130537	26.1
N45D, K111T, T183A, I188V	1799	108670	21.7
N45D, S99G, C137R, V207A	1801	834	0.2
N45D, T163I, K167R, R195G	1802	133842	26.7
N45D, T183A, T192S, R194G	1803	1349	0.3
N45D, V50A, I119T, K144E	1804	34217	6.8
V11E, N45D, T130A, P198T	1806	137230	27.4
K23N, N45D, Q73R, T163I	1809	139149	27.8
K28E, N45D, W149R, S158G, P198T	1810	691	0.1
K28R, N45D, V129D, T163N, R195T	1812	137230	27.4
M41K, D43G, N45D, R64S, R195G	1813	137230	27.4
M41K, D43G, N45D, R64S, S99G	1814	134587	26.9
N45D, R68L, F173L, D197G, P198S	1815	59308	11.8
N45D, V50A, I148V, R195G, N201D	1816	131264	26.2
M41K, D43G, K44E, N45D, R195G, N201D	1817	144667	28.9
N45D, V50A, L124S, K144E, L179P, R195G	1818	18163	3.6
WT PD-L1 ECD-Fc N10653	1728	5005	1.0
仅 Fc 对照	1155	46	0.0

[0895] 使用表达IL-2-荧光素酶报告基因和细胞表面PD-1的Jurkat效应细胞进一步评定含有额外的亲和力成熟的PD-L1结构域的分子的生物活性,基本上如实施例12B所述。如表22C所示,对于具有指示的PD-L1变体的一些Fc融合分子,观察到与抗CD3和K562/CD80细胞共同培养的Jurkat效应细胞的荧光素酶活性增加。确定每种测试样品的平均相对发光值(RLU),并且计算每种测试的分子与野生型PD-L1或仅Fc对照蛋白相比的IL-2报告基因信号的倍数增加。在表中,列2列出了所测试的每种PD-L1变体的SEQ ID NO识别符。发光信号的差异证明PD-L1变体Fc分子与PD-1的结合的差异并且引起抑制性活性的共同阻断。

表 22C: Jurkat/IL2/PD-1 + K562/CD80 + 可溶性抗 CD3 报告基因测定

PD-L1 突变	SEQ ID NO (ECD)	相对荧光素酶单位(RLU) PD-L1 vECD-Fc 浓度 50.0 nM	相对于 WT PD-L1 ECD-Fc 的倍数增 加
N45D	1772	460	2.3
R195S	1827	215	1.1
K160M, R195G	1773	215	1.1
N45D, K144E	1774	385	1.9
N45D, P198S	1775	457	2.3
N45D, P198T	1776	476	2.3
N45D, R195G	1777	405	2.0
N45D, R195S	1778	417	2.1
N45D, S131F	1779	429	2.1
N45D, V58D	1780	484	2.4
V129D, R195S	1781	223	1.1
I98T, F173Y, L196S	1782	209	1.0
N45D, E134G, L213P	1783	276	1.4
N45D, F173I, S177C	1784	265	1.3
N45D, I148V, R195G	1785	496	2.4
N45D, K111T, R195G	1786	338	1.7
N45D, N113Y, R195S	1787	492	2.4
N45D, N165Y, E170G	1788	446	2.2
N45D, Q89R, I98V	1789	550	2.7
N45D, S131F, P198S	1790	422	2.1
N45D, S75P, P198S	1791	549	2.7
N45D, V50A, R195T	1792	594	2.9
E27D, N45D, T183A, I188V	1793	554	2.7
K23N, N45D, S75P, N120S	1795	504	2.5
N45D, G102D, R194W, R195G	1796	211	1.0
N45D, G52V, Q121L, P198S	1797	225	1.1
N45D, I148V, R195G, N201D	1798	401	2.0
N45D, K111T, T183A, I188V	1799	354	1.7
N45D, S99G, C137R, V207A	1801	226	1.1
N45D, T163I, K167R, R195G	1802	440	2.2
N45D, T183A, T192S, R194G	1803	250	1.2
N45D, V50A, I119T, K144E	1804	292	1.4
V11E, N45D, T130A, P198T	1806	470	2.3
K23N, N45D, Q73R, T163I	1809	449	2.2
K28E, N45D, W149R, S158G, P198T	1810	197	1.0
K28R, N45D, V129D, T163N,	1812	437	2.2

[0896]

[0897]	R195T			
	M41K, D43G, N45D, R64S, R195G	1813	590	2.9
	M41K, D43G, N45D, R64S, S99G	1814	597	2.9
	N45D, R68L, F173L, D197G, P198S	1815	327	1.6
	N45D, V50A, I148V, R195G, N201D	1816	494	2.4
	M41K, D43G, K44E, N45D, R195G, N201D	1817	464	2.3
	N45D, V50A, L124S, K144E, L179P, R195G	1818	308	1.5
	WT PD-L1 ECD-Fc	1728	203	1.0
	仅 Fc 对照	1155	205	1.0

[0898] 实施例14

[0899] 分泌性免疫调节蛋白的生成和用PD-L1 SIP转导的Pan T细胞的增殖的评定

[0900] 为了生成PD-L1分泌性免疫调节蛋白(SIP),从Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) 获得作为基因标识符(gene block)的DNA编码示例性SIP,并且然后通过 Gibson组装(New England Biolabs Gibson组装试剂盒)克隆到MND启动子下游的限制性位点之间的修饰版本的pRRL载体中(Du11等人, (1998) J Virol, 72 (11) :8463-8471)以去除 GFP。生成示例性SIP构建体来编码SEQ ID NO:2012-2013中所列出的蛋白质,包括信号肽。在此示例性实施例中,生成构建体以额外包含标记部分。基因标识符具有按顺序的以下结构:在第一限制性位点-第一限制性位点-GCCGCCACC (Kozak) 之前具有pRRL的39碱基对重叠;编码在SEQ ID NO:309中所列出的PD-L1 IgV野生型氨基酸序列或SEQ ID NO:303 (D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G- ins (G101GG) 中所列出的变体PD-L1 IgV的完整ORF,在所有情况下还包含SEQ ID NO:2009中所列出的信号肽MGSTAILALLAVLQGVSA;编码如SEQ ID NO:2010 (DYKDDDDK) 中所列出的Flag标记的DNA;编码如SEQ ID NO:2011 (HHHHHH) 中所列出的His标记的DNA; TAA终止密码子;具有超过第二限制性位点的pRRL的第二限制性位点-41碱基对重叠。为了进行比较,还评定编码野生型PD-L1的SIP。

[0901] 为了制备慢病毒载体,每个100mm盘接种3x10<sup>6</sup>个HEK293细胞。在第二天,将4.5μg的P-Mix (3μg的PAX2和1.5μg的pMD2G) 添加到在5mL聚丙烯管中的6μg的编码SIP构建体的DNA中。将稀释剂缓冲液(10mM HEPES/150mM NaCl pH 7.05/1L TC等级H2O) 添加到管中以升高至500μL的总体积。向稀释剂DNA (PEI:总DNA4:1) 添加42μL的PEI (1μg/μL) 并且通过涡旋混合。将混合物在室温下孵育10分钟,并且通过从盘中轻轻地抽吸培养基而不破坏粘附细胞来制备细胞,然后用6mL的Opti-MEM (1X) 替换。然后将DNA/PEI混合物添加到盘中并且在37°C下孵育24小时。在24小时之后,从盘中抽吸培养基,并且用10mL新鲜DMEM培养基替换,并且然后在37°C下孵育。在48小时之后使用附接至0.45μm过滤器PES的注射器采集病毒上清液以从培养物中去除细胞和碎片(Thermo Scientific Nalgene注射器过滤器)。还基本上如上所述制备单独的慢病毒载体储液,其编码抗CD19 CAR(含有抗CD19 scFv、铰链和来源于CD8和CD3ζ信号传导结构域的跨膜结构域)。使用的示例性抗CD19 CAR在SEQ ID NO:2016中列出(由在SEQ ID NO:2017中所列出的序列编码),其含有SEQ ID NO:1163中所列出的scFv、CD8来源的铰链和在SEQ ID NO:242中所列出的跨膜结构域和在SEQ ID NO:243中所列出的CD3ζ。

[0902] 将T细胞解冻并且用抗CD3/抗CD28珠粒 (Dynal) 以1:1比率活化。将T细胞 (1x 10<sup>6</sup>个细胞) 与1mL总慢病毒载体上清液混合, 所述上清液含有等体积(各自0.5mL)的编码指示的PD-L1 SIP (D43G/N45D/L56Q/V58A/G101GG或野生型) 的慢病毒载体上清液和编码抗CD19 CAR的慢病毒载体上清液。作为对照, 将细胞仅用编码抗CD19 CAR的慢病毒载体转导或用模拟物载体对照转导。在10μg/mL聚凝胺和50IU/mL IL-2的存在下进行转导。在2500rpm下在30°C下使细胞离心60min。在24小时之后, 将3mL的Xvivo15加培养基和IL2添加到每个孔中。每2天用新鲜培养基和细胞因子补给细胞。

[0903] 在活化之后14天, 将细胞用Na1m6细胞再刺激, 所述Na1m6细胞已用慢病毒载体转导以提供PD-L1 (Na1m6 PDL1+) 的表达。将转导的T细胞用Cell Trace Far Red标记, 并且在第3天时通过确定显示染料稀释的细胞的分数来测量增殖。用示例性测试的变体PD-L1 SIP 转导的T细胞的增殖研究的结果在图10中示出。

[0904] 实施例15

[0905] 关于原代耗竭性T细胞的活性评定PD-L1多结构域堆叠分子

[0906] 此实施例描述评定如实施例10中所述生成的示例性PD-L1/CD155和PD-L1/CD112/CD155变体IgV堆叠免疫调节蛋白(堆叠的IgV-Fc)用于经由阻断涉及同源结合配偶体PD-1、TIGIT和/或CD112R的相互作用来调节耗竭性T细胞的活性的特异性和亲和力的研究。

[0907] A. 耗竭性T细胞的生成

[0908] 为了生成耗竭性T细胞, 用稳定表达抗CD3单链Fc (OKT3) 的丝裂霉素C处理的K562细胞以10个T细胞比1个K562/OKT3细胞的比率刺激原代人T细胞7天。在第3天, 将50IU/mL的重组IL-2添加到培养基中以促进T细胞扩增和存活。在第7天, 收获T细胞, 计数并且然后设置用于额外两个循环的用K562/OKT3加上IL-2进行的再刺激。在21天结束(3轮刺激)时, 对T细胞进行计数, 表征抑制性受体PD-L1、TIGIT和Lag-3的表达并且然后冷冻以用于随后的测定。基于抑制性受体PD-1、TIGIT和Lag-3的表达升高检测耗竭性T细胞。

[0909] B. 与耗竭性T细胞的结合

[0910] 通过三轮用K562/OKT3+IL-2进行的刺激和扩增如上所述生成耗竭性T细胞。基本上如实施例12中所述进行结合研究, 不同的是用耗竭性T细胞进行。所测试的示例性堆叠分子包括PD-L1/CD155堆叠物4 (SEQ ID NO:1719) 和PD-L1/CD112/CD155堆叠物2 (SEQ ID NO:1724), 如以上实施例10中所述生成。作为对照, 评定融合至Fc的每种变体IgV的非堆叠形式(在SEQ ID NO:1157中列出, 含有通过EU编号的突变C220S、R292C、N297G和V302C(对应于参考在SEQ ID NO:187中所列出的野生型人IgG1 Fc的C5S、R77C、N82G和V87C)的结合活性, 即变体PD-L1 IgV-Fc(含有在SEQ ID NO:303中所列出的变体PD-L1 IgV)、CD155 IgV-Fc(含有在SEQ ID NO:1576中所列出的变体CD155 IgV)或CD112 IgV-Fc(含有在SEQ ID NO:768中所列出的CD112 IgV)。

[0911] 示例性测试的PD-L1/CD155和PD-L1/CD112/CD155堆叠Fc融合分子的结合研究的结果在图11中示出。如所示, 示例性测试的PD-L1/CD155堆叠Fc融合分子表现出比单独的结构域优异的与耗竭性T细胞的结合。

[0912] C. 生物活性的刺激和评定

[0913] 将如上所述生成的先前得到的耗竭性T细胞解冻并且以100,000个细胞/孔接种在测定缓冲液(增补谷氨酰胺(ThermoFisher, Inc. USA)的X-vivo 15培养基(Lonza, Corp.,

USA) 中的平底96孔板中。将示例性堆叠Fc融合分子PD-L1/CD155堆叠物4 (SEQ ID NO: 1719) 或对照非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc或CD155 IgV-Fc以100nM、10nM和1nM的浓度添加到T细胞中。对照非堆叠变体PD-L1 IgV-Fc或CD155 IgV-Fc融合分子含有在堆叠物中使用的相同变体PD-L1 IgV (SEQ ID NO:303) 或变体CD155 IgV (SEQ ID NO:1576)。还使用抗TIGIT抗体 (eBioscience, Inc., USA) 和抗PD-1抗体 (Bristol-Myers Squibb, Inc., USA) 或人IgG1抗体 (BioLegend, Inc., USA) 作为对照,并且以指示浓度添加到T细胞中。

[0914] 将先前进行转导以表达抗CD3单链Fv (OKT3) 和人PD-L1的K562细胞用50 $\mu$ g/mL丝裂霉素C (Millipore Sigma, Corp., USA) 处理20分钟以停止增殖,洗涤并且然后以10,000个细胞/孔添加到测定板中。作为另一个对照,将T细胞在不存在添加的分子的情况下与K562-OKT3-PD-L1细胞一起孵育,或者将T细胞在没有用K562-OKT3-PD-L1细胞刺激的情况下孵育。然后将测定板在37°C下在潮湿5% CO<sub>2</sub>孵育室中孵育3天。在3天之后,使用标准ELISA和流式细胞术技术测量IL-2、IFN  $\gamma$  和T细胞增殖。

[0915] 生物活性研究的结果在图12中示出,其列出了在指示浓度的测试分子下培养物上清液中的IFN-  $\gamma$  的水平 (pg/mL)。如所示,与非堆叠对照相比,示例性测试的PD-L1/CD155堆叠Fc融合分子表现出改善的活性而增加IFNg产生,从而证明阻断PD-1和TIGIT通路二者产生与仅单个通路阻断相比增加的信号。

[0916] 本发明在范围上不旨在受限于特定公开的实施方案,所述实施方案例如被提供来说明本发明的各个方面。所述的组合物和方法的各种修改将根据本文的描述和教义而变得显而易见。可以实践此类变化而不背离本公开的真实范围和精神并且旨在落入本公开的范围内。

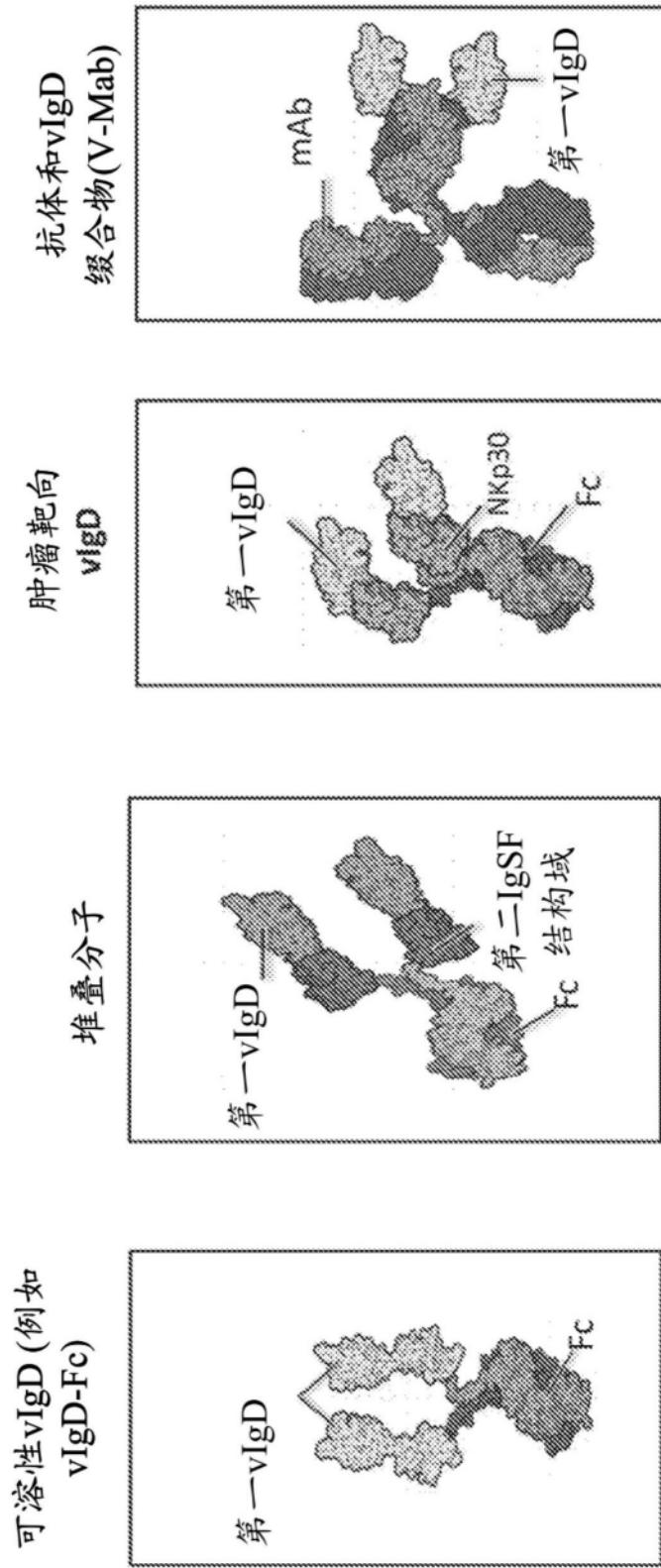


图1A

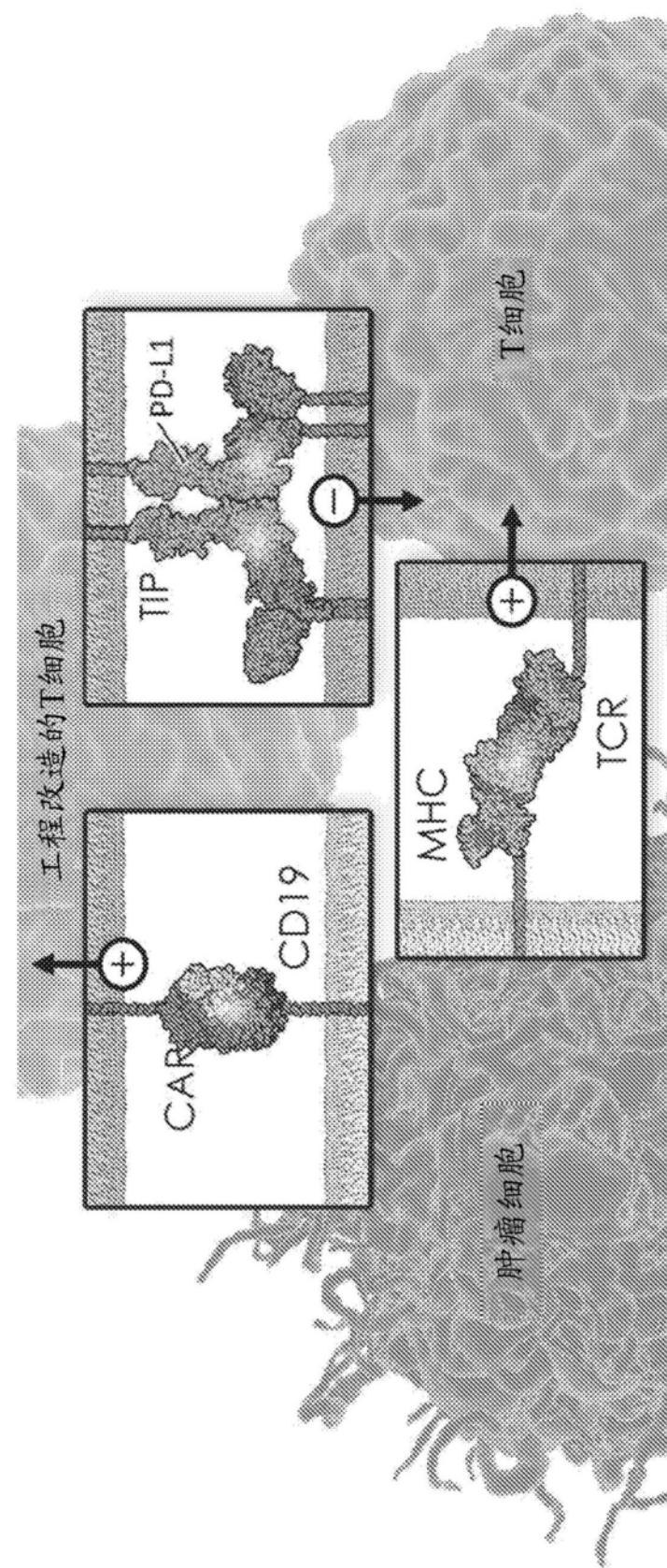


图1B

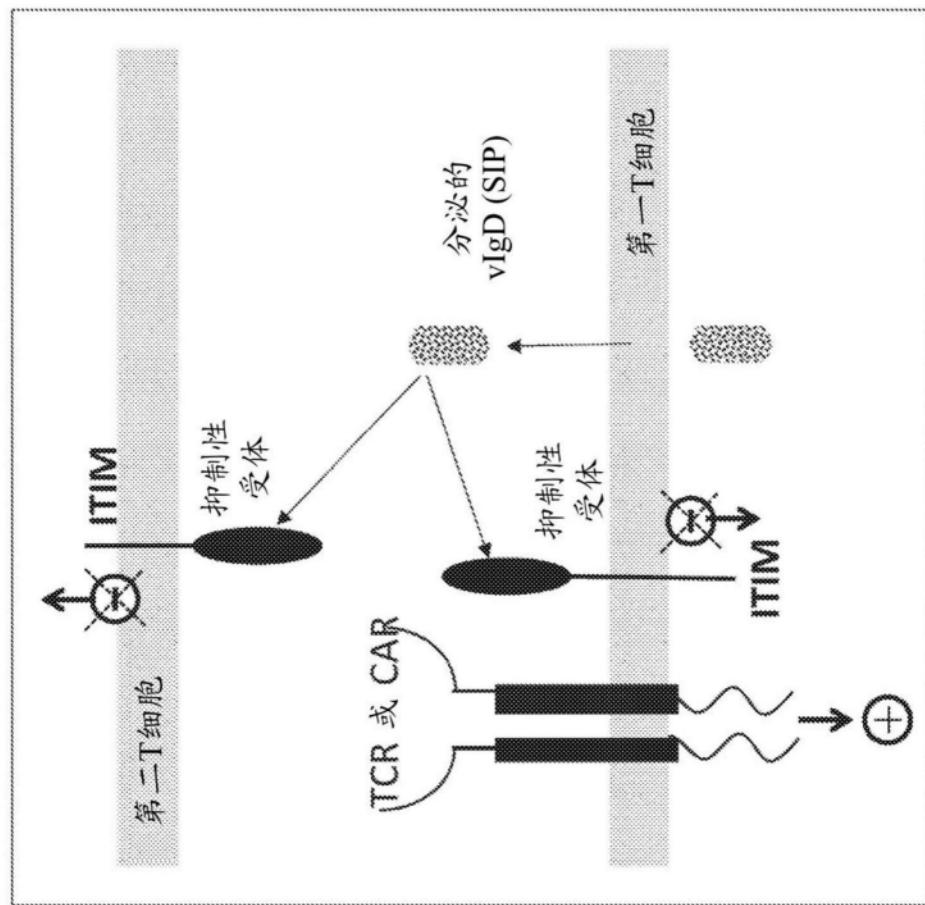


图1C

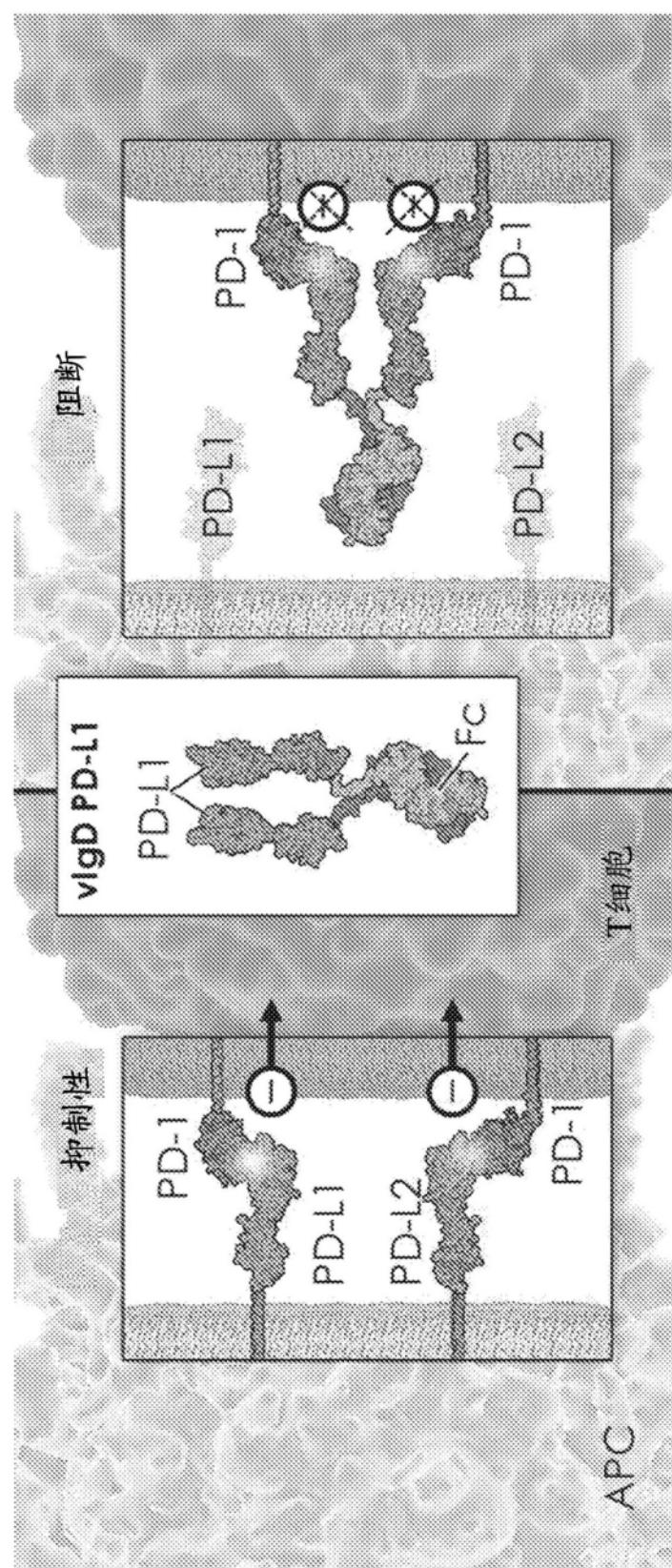


图2

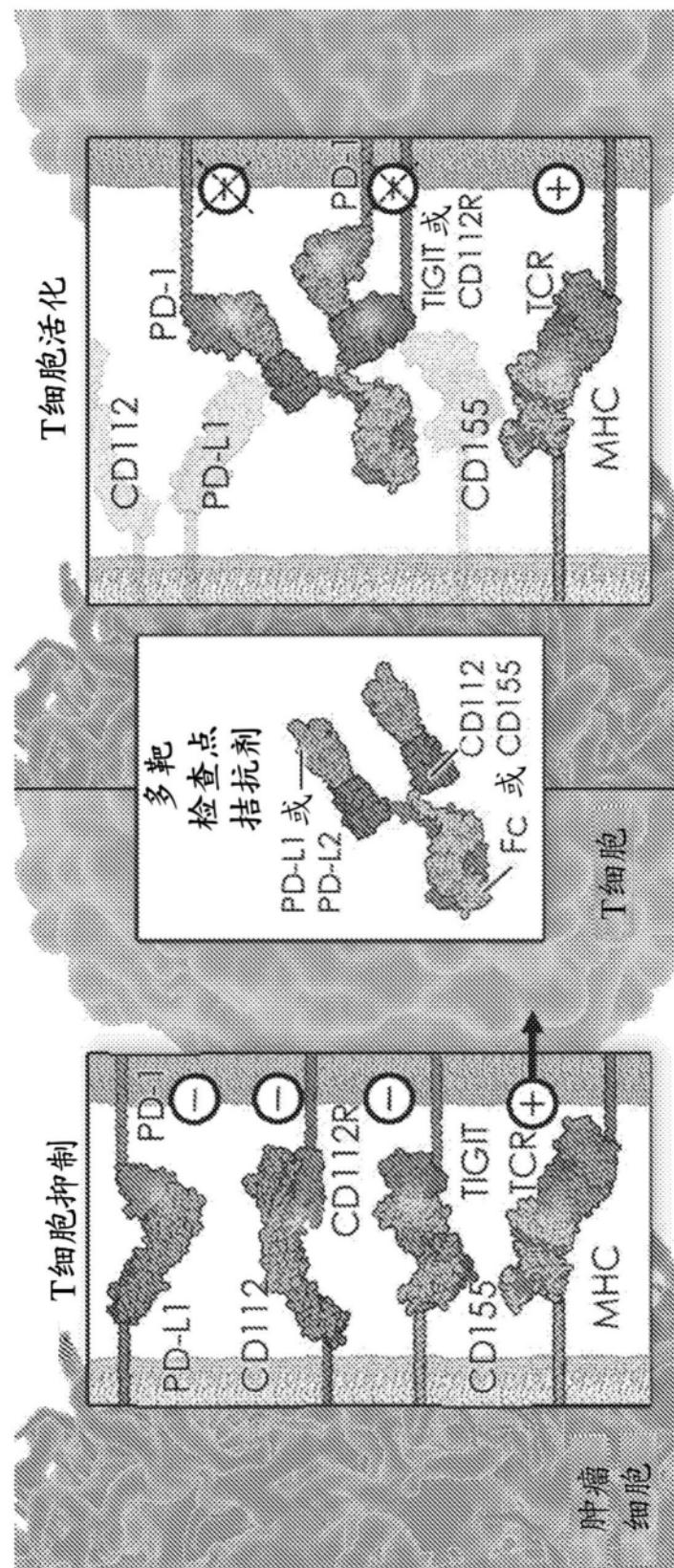


图3

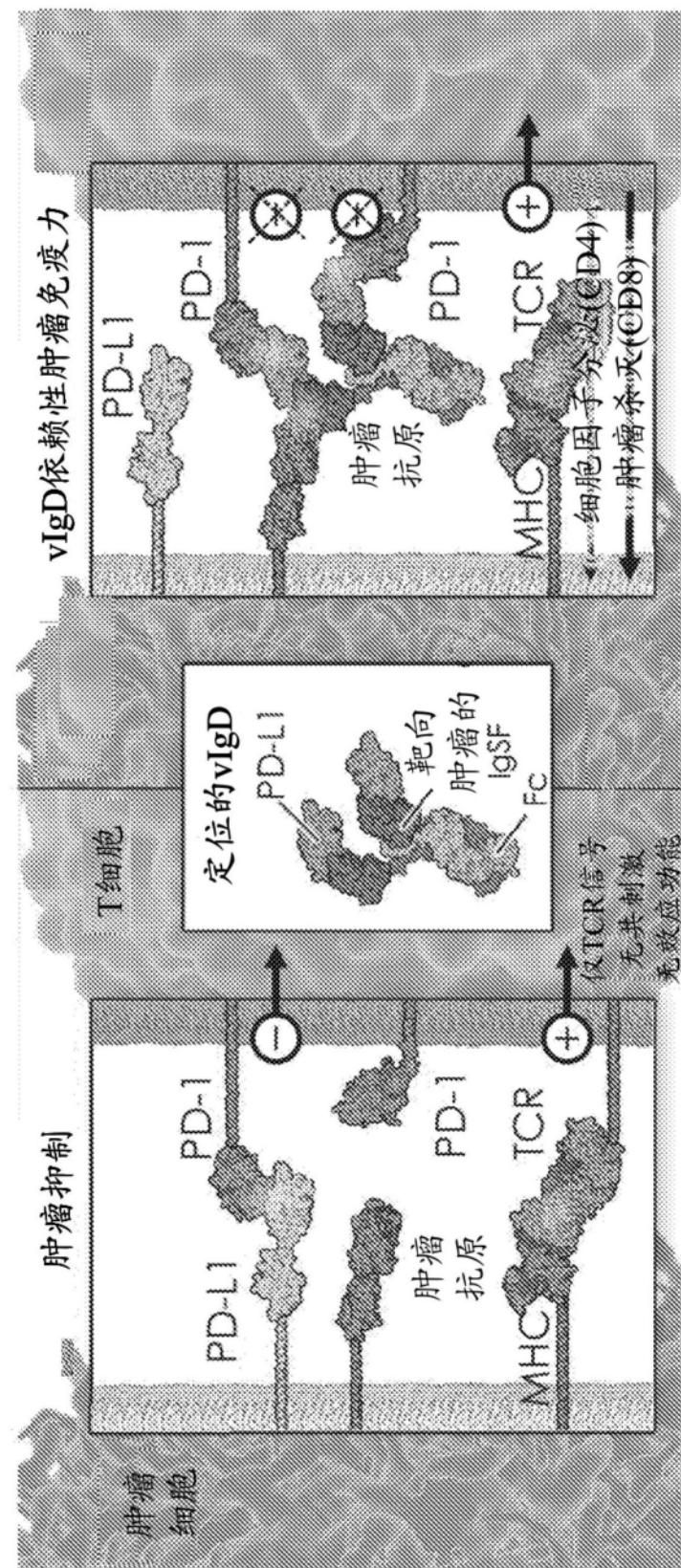


图4

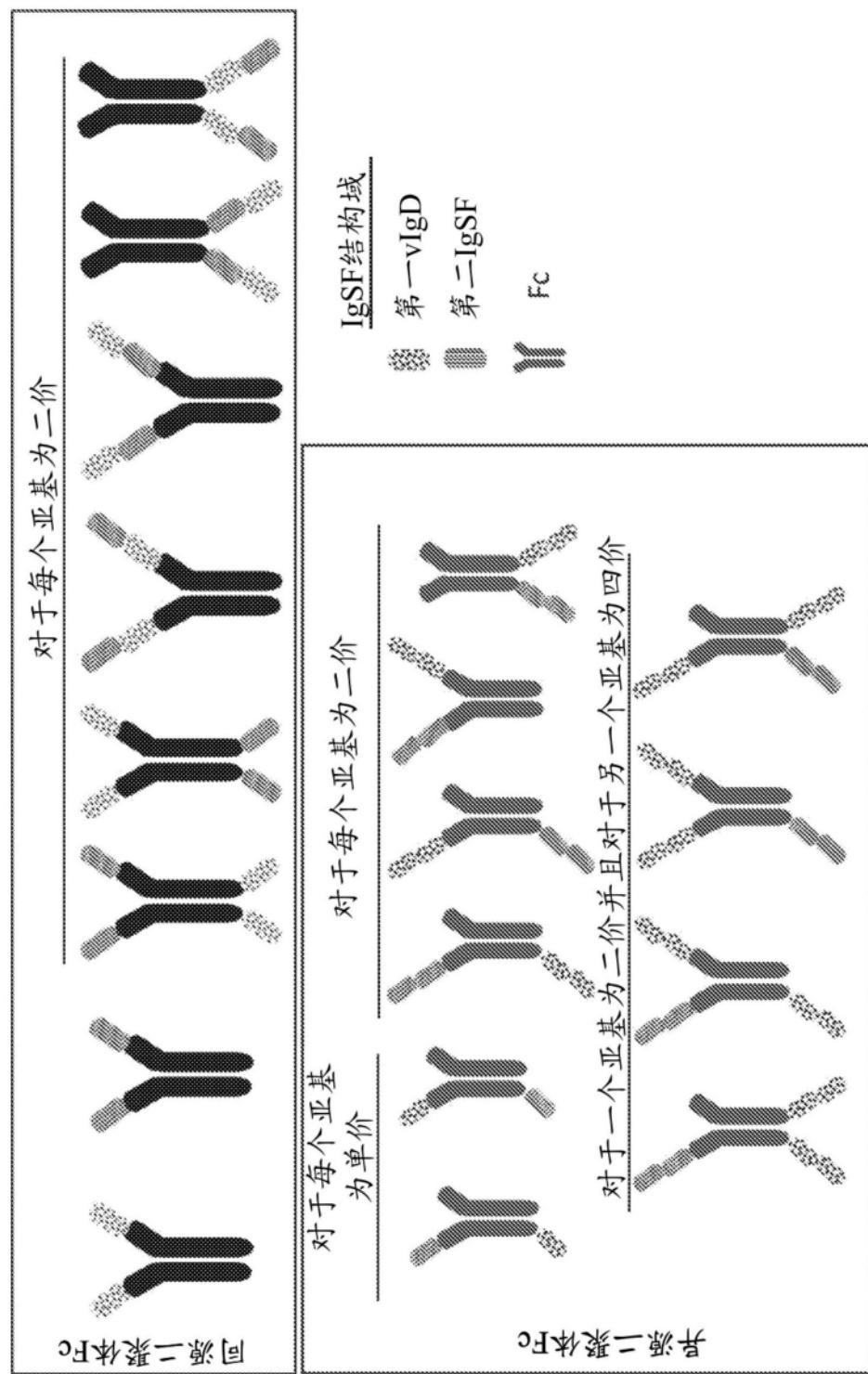


图5A

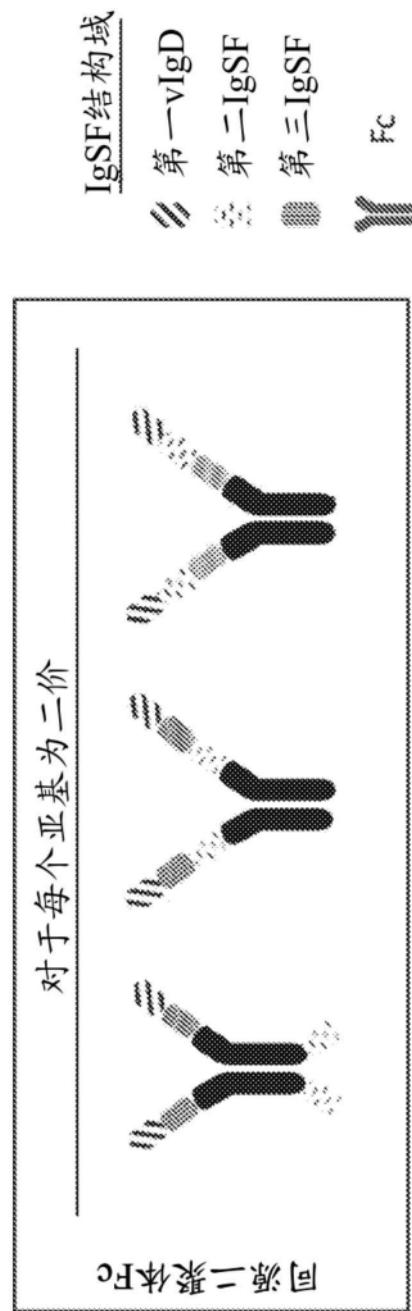


图5B

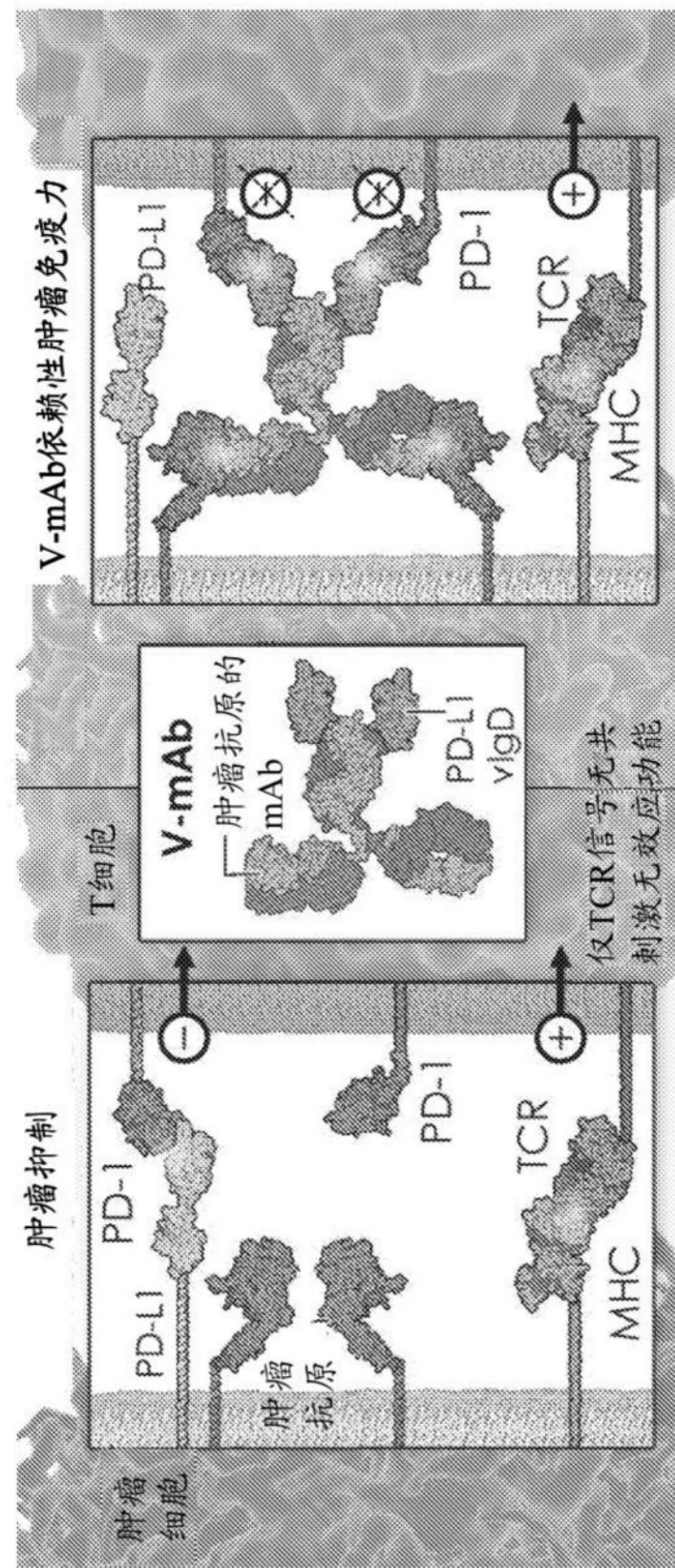


图6

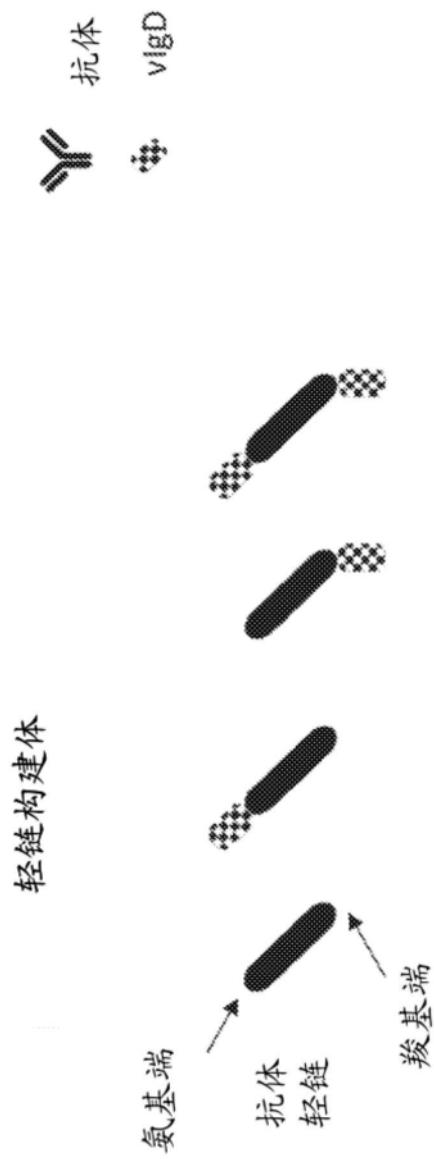


图7A

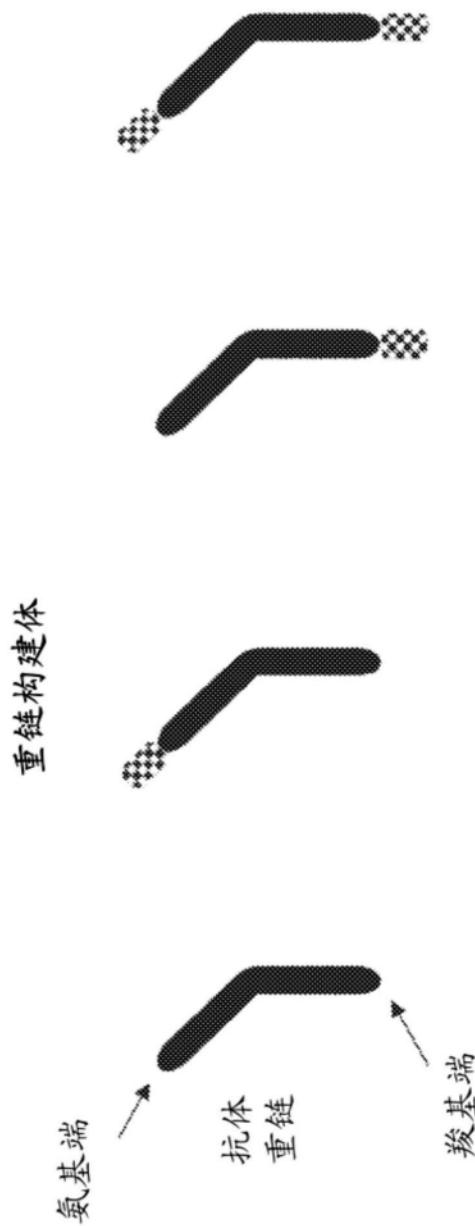


图7B

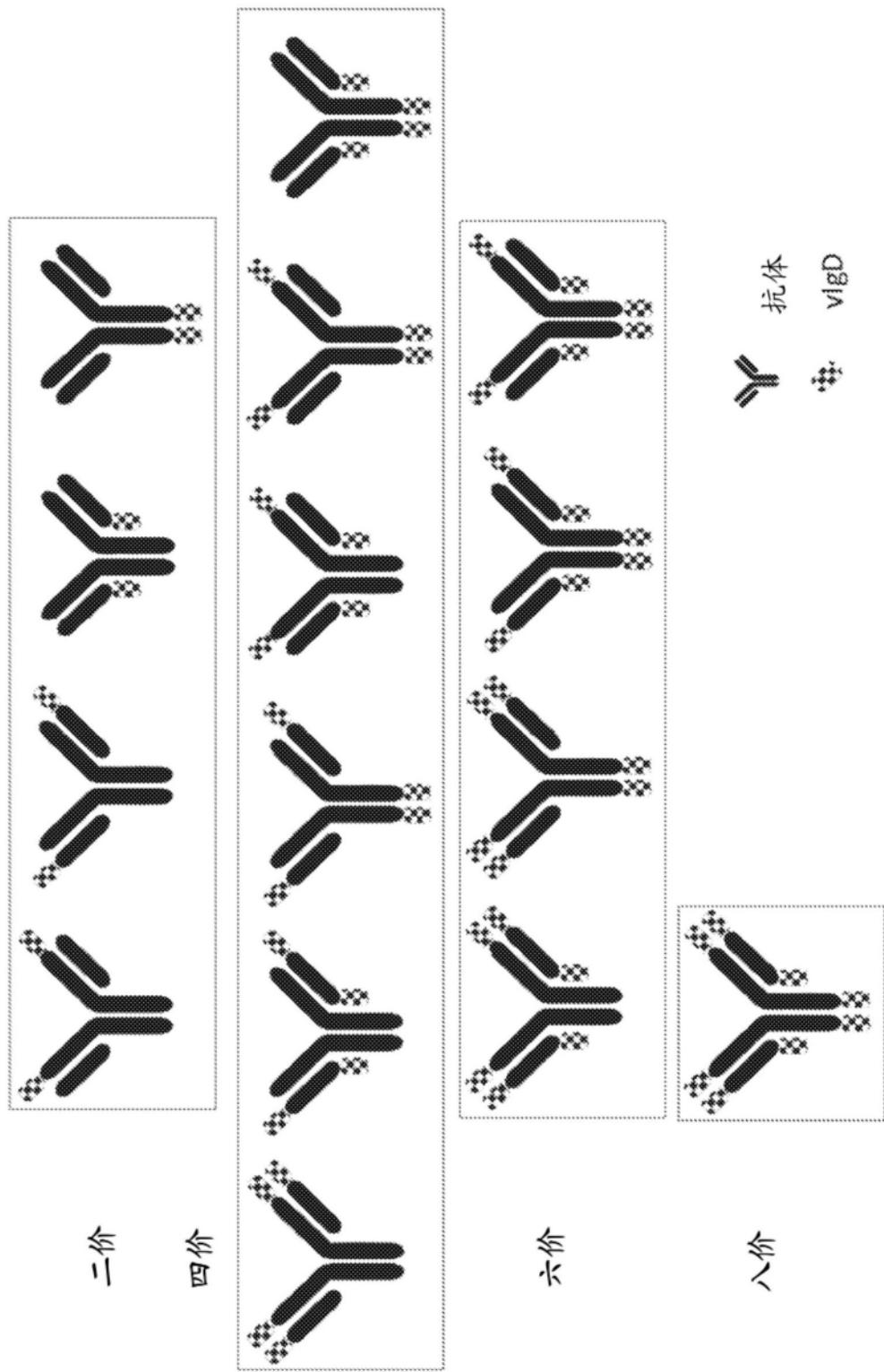


图7C

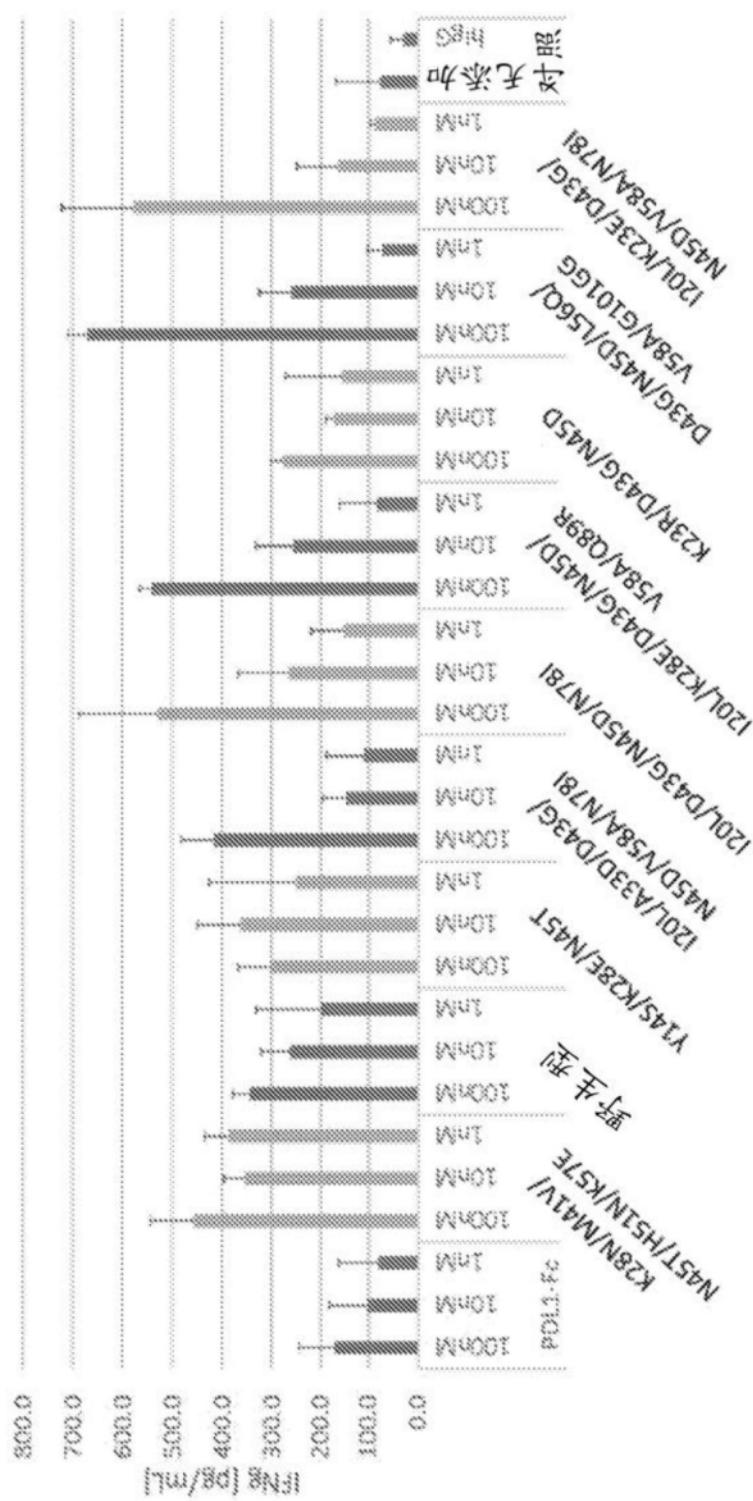


图8

用PD-L1变体进行的PD-1阻断在MLR测定中增加IFNg产生

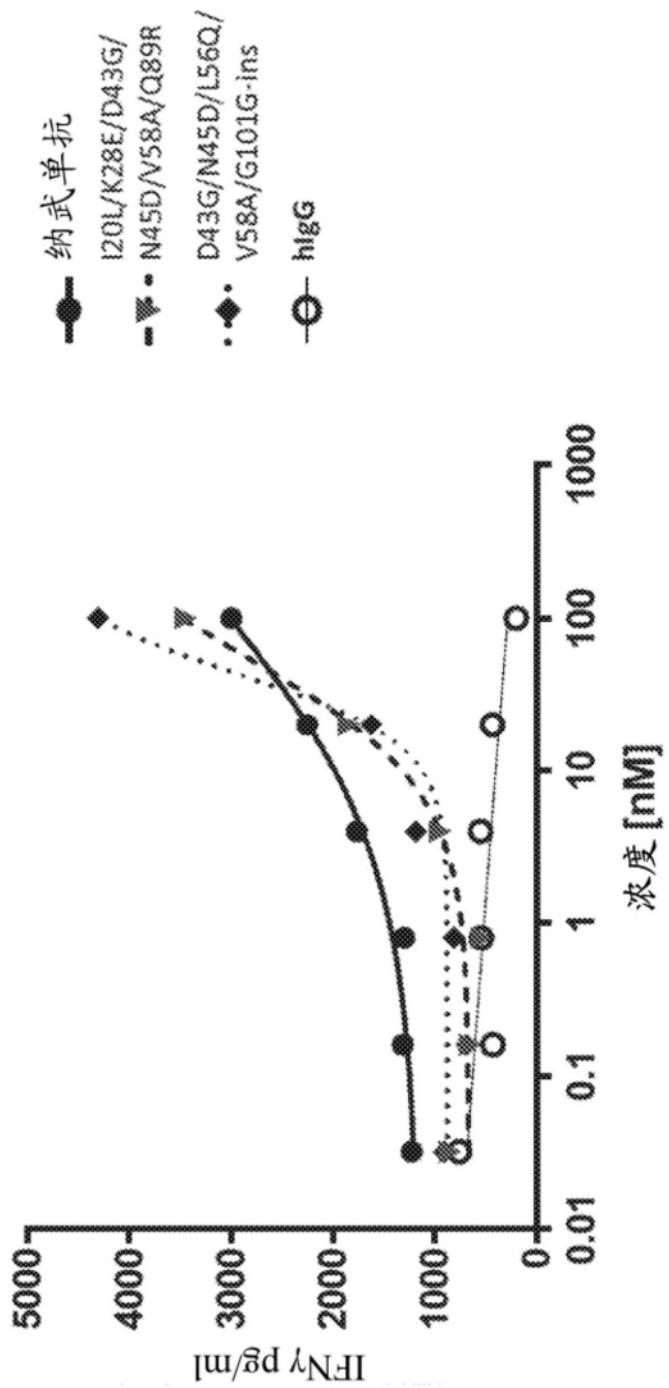


图9

第3天转导T细胞的增殖

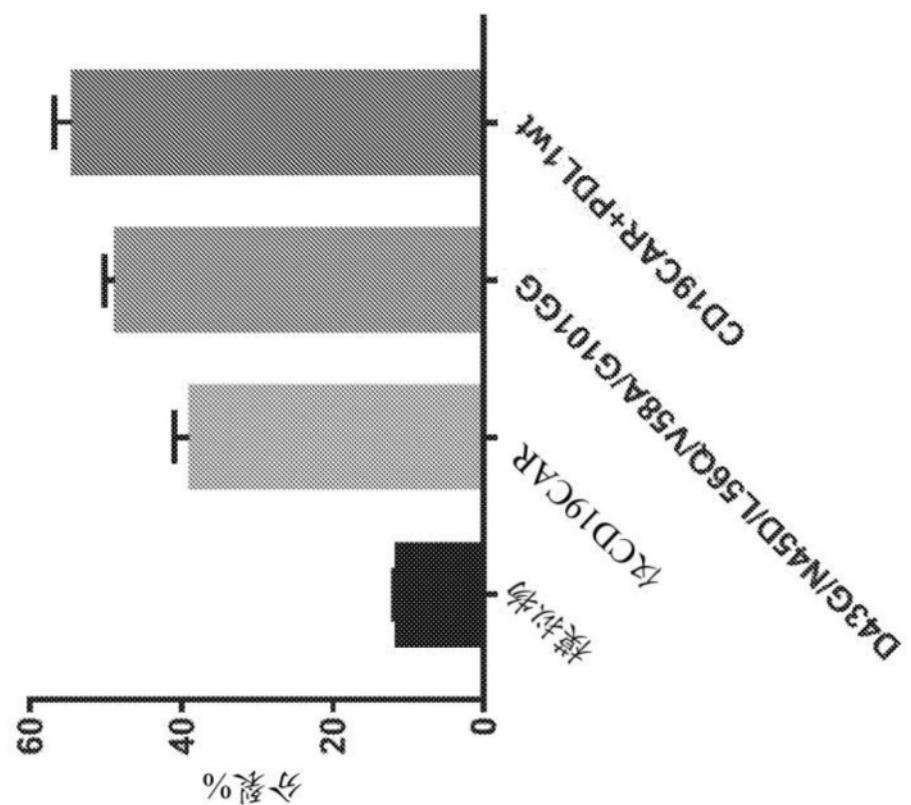


图10

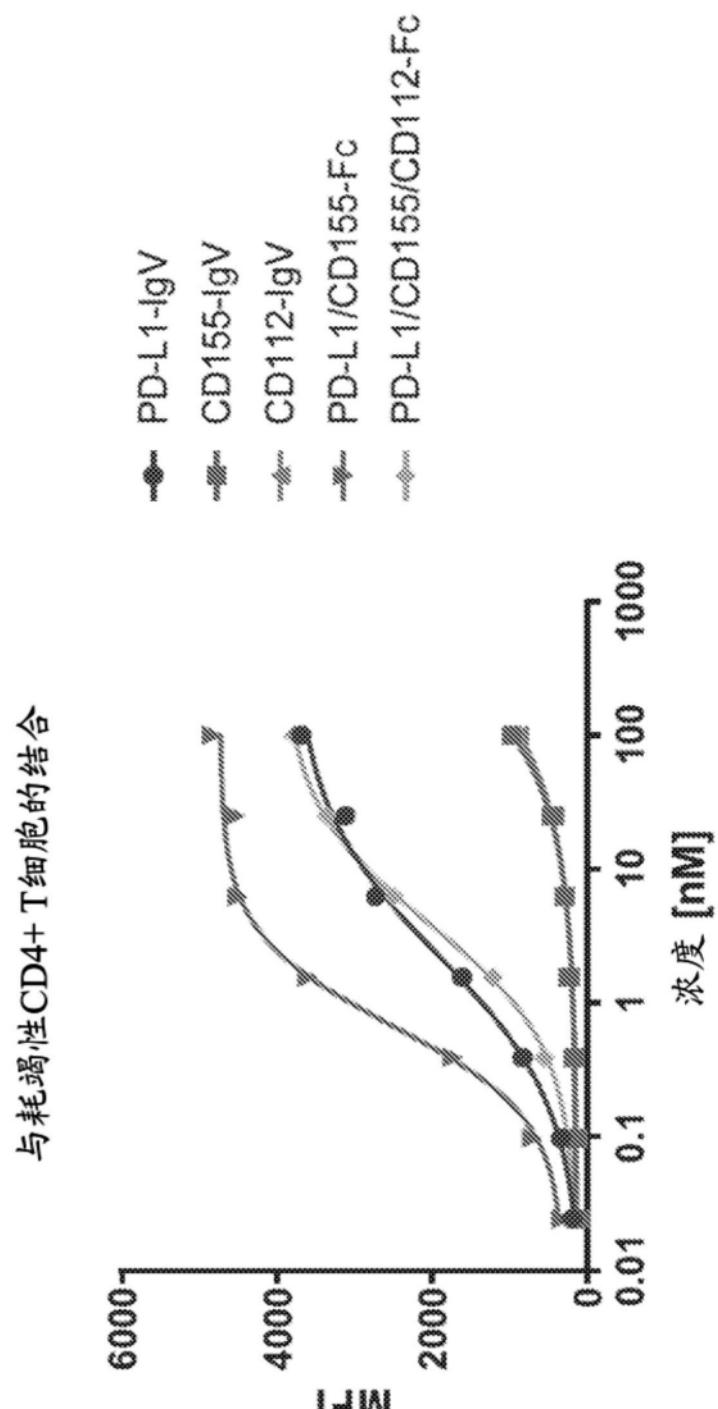


图11

多结构域vlgD增加耗竭性T细胞进行的IFNg产生

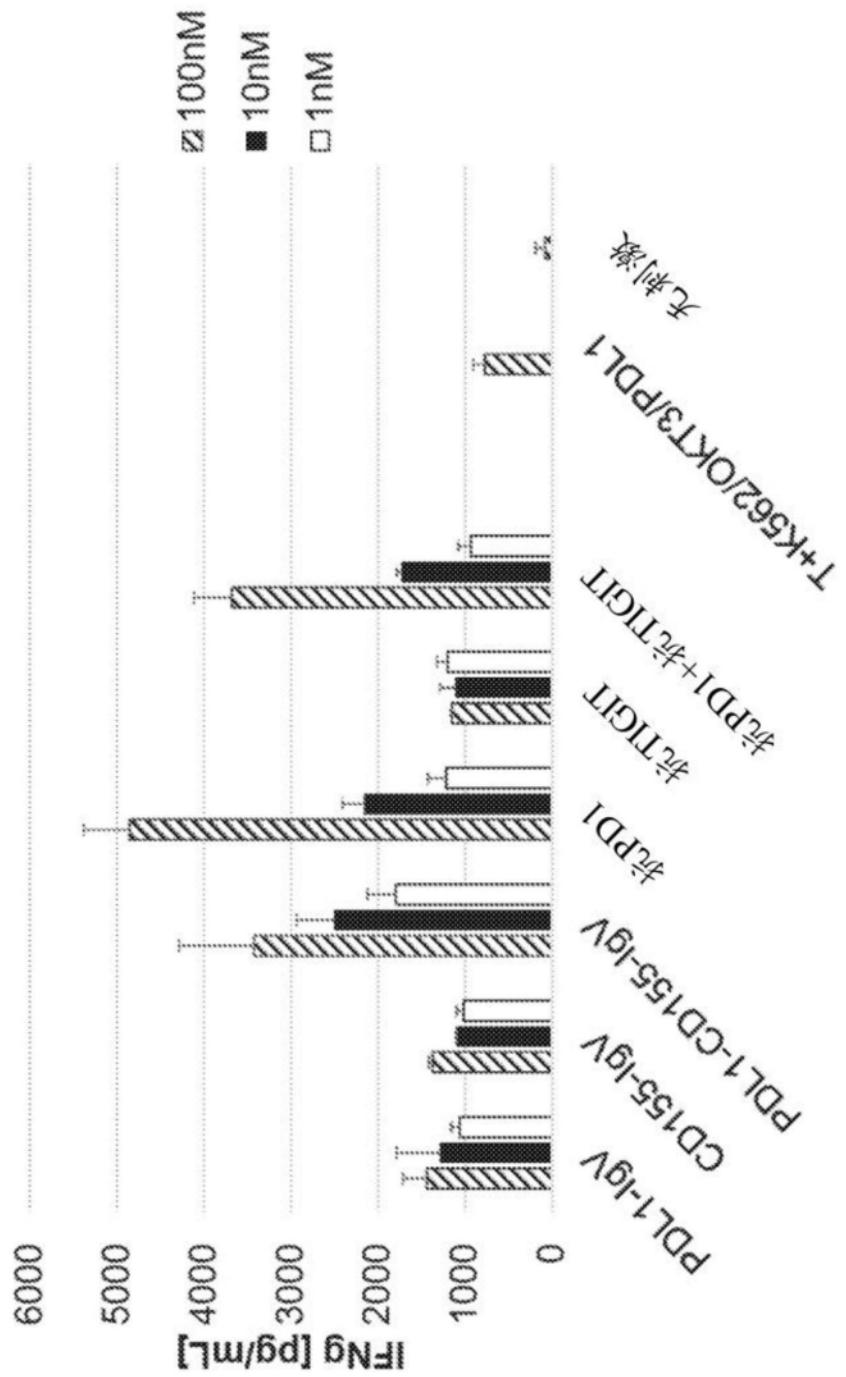


图12