



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689096 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780038822.0

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

(22)申请日 2017.05.17

代理人 赵萌

(30)优先权数据

62/338,128 2016.05.18 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/705(2006.01)

2018.12.21

C07K 16/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/033042 2017.05.17

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/201131 EN 2017.11.23

(71)申请人 阿尔伯特爱因斯坦医学院公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 莎拉·C·加勒特-汤姆森

史蒂文·C·阿尔莫

罗纳德·D·赛德尔

权利要求书8页 说明书70页

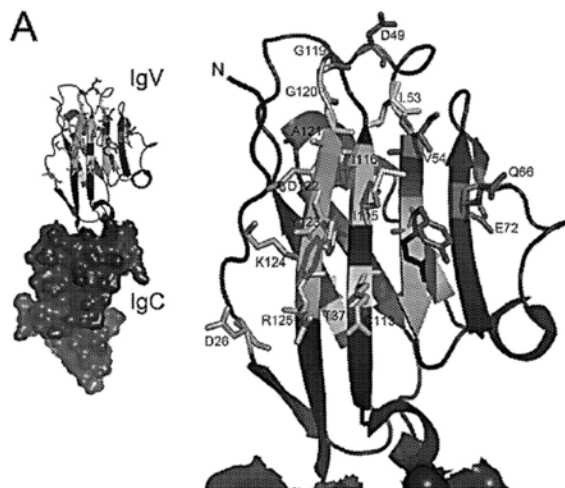
序列表46页 附图19页

(54)发明名称

变体PD-L1多肽、T细胞调节性多聚体多肽及其使用方法

(57)摘要

本公开提供了变体PD-L1免疫调节多肽,以及包含所述变体免疫调节肽的融合多肽。本公开提供了T细胞调节性多聚体多肽,以及包含所述T细胞调节性多聚体多肽的组合物,其中所述T细胞调节性多聚体多肽包含本公开的变体免疫调节多肽。本公开提供了包含编码所述T细胞调节性多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,以及包含所述核酸的宿主细胞。本公开提供了调节T细胞的活性的方法;所述方法包括使所述T细胞与本公开的T细胞调节性多聚体多肽接触。



1. 一种变体PD-L1免疫调节多肽,其包含与图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列或与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,

其中所述变体PD-L1免疫调节多肽相对于图2A中描绘的PD-L1氨基酸序列或SEQ ID NO:1中列出的PD-L1氨基酸序列具有一个或多个氨基酸取代;并且

其中所述变体PD-L1免疫调节多肽表现出:

a) 对具有图3A或3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力与图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列对所述PD1多肽的结合亲和力相比或与如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列对所述PD1多肽的结合亲和力相比降低;和/或

b) 对具有图3C或3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽的结合亲和力与图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列对所述B7-1多肽的结合亲和力相比或与如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列对所述B7-1多肽的结合亲和力相比降低。

2. 如权利要求1所述的变体免疫调节多肽,其中所述多肽包含基于图2A中列出的氨基酸编号的氨基酸D26、T37、V54、Q66或E72的取代,或其中所述多肽包含基于图2B中列出的氨基酸编号的氨基酸D26、T37、I54、Q66或E72的取代。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的变体免疫调节多肽,其中所述变体免疫调节多肽表现出由包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列的PD-L1多肽对所述PD1多肽表现出的结合亲和力的小于10%至小于75%。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的变体免疫调节多肽,其中所述变体免疫调节多肽表现出由包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列的PD-L1多肽对所述B7-1多肽表现出的结合亲和力的小于10%至小于75%。

5. 如权利要求1、2或4中任一项所述的变体免疫调节多肽,其中所述变体免疫调节多肽表现出由包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列的PD-L1多肽对所述PD1多肽表现出的结合亲和力的75%至大于95%。

6. 如权利要求1-3或5中任一项所述的变体免疫调节多肽,其中所述变体免疫调节多肽表现出由包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列的PD-L1多肽对所述B7-1多肽表现出的结合亲和力的75%至大于95%。

7. 一种多聚体多肽,其包含:

a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 表位;

ii) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;以及

b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 第二MHC多肽;以及

ii) 任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架,

其中所述多聚体多肽包含一个或多个免疫调节结构域,其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个:

A) 在所述第一多肽的C-末端;

B) 在所述第二多肽的N-末端;

C) 在所述第二多肽的C-末端;或

D) 在所述第一多肽的C-末端且在所述第二多肽的N-末端，
其中所述免疫调节结构域包含与图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列、与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，
其中所述变体PD-L1免疫调节多肽相对于图2A中描绘的PD-L1氨基酸序列或SEQ ID NO:1中列出的PD-L1氨基酸序列具有一个或多个氨基酸取代；并且

其中所述变体PD-L1免疫调节多肽表现出：

a) 对具有图3A或3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力与图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列对所述PD1多肽的结合亲和力相比或与如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列对所述PD1多肽的结合亲和力相比降低；和/或

b) 对具有图3C或3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽的结合亲和力与图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列对所述B7-1多肽的结合亲和力相比或与如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列对所述B7-1多肽的结合亲和力相比降低。

8. 如权利要求7所述的多聚体多肽，其中所述多聚体多肽对具有图3A或3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽表现出的结合亲和力与包含含有图2A或2B中描绘的PD-L1氨基酸序列的免疫调节结构域的对照多聚体多肽对所述PD1多肽的结合亲和力相比或与包含含有如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列的免疫调节结构域的对照多聚体多肽对所述PD1多肽的结合亲和力相比降低。

9. 如权利要求7所述的多聚体多肽，其中所述多聚体多肽包含：

a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：

i) 所述表位；

ii) 所述第一MHC多肽；以及

iii) 所述免疫调节结构域；以及

b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：

i) 所述第二MHC多肽；以及

ii) 所述Ig Fc多肽。

10. 如权利要求7所述的多聚体多肽，其中所述多聚体多肽包含：

a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：

i) 所述表位；以及

ii) 所述第一MHC多肽；以及

b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：

i) 所述免疫调节结构域；

iii) 所述第二MHC多肽；以及

ii) 所述Ig Fc多肽。

11. 如权利要求7所述的多聚体多肽，其中所述多聚体多肽包含：

a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：

i) 所述表位；以及

ii) 所述第一MHC多肽；以及

b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：

i) 所述第二MHC多肽；以及

- ii) 所述Ig Fc多肽;以及
- iii) 所述免疫调节结构域。

12. 如权利要求7所述的多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含:

- a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:
 - i) 所述表位;以及
 - ii) 所述第一MHC多肽;以及
- b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
 - i) 所述第二MHC多肽;以及
 - ii) 所述免疫调节结构域。

13. 如权利要求7所述的多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含:

- a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:
 - i) 所述表位;以及
 - ii) 所述第一MHC多肽;以及
- b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
 - i) 所述免疫调节结构域;以及
 - ii) 所述第二MHC多肽。

14. 如权利要求7所述的多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含:

- a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:
 - i) 所述表位;
 - ii) 所述第一MHC多肽;以及
 - iii) 所述免疫调节结构域;以及
- b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
 - i) 所述第二MHC多肽。

15. 如权利要求7所述的多聚体多肽,其中所述非Ig支架是XTEN多肽、转铁蛋白多肽、弹性蛋白样多肽、丝状多肽或丝-弹性蛋白样多肽。

16. 如权利要求7-15中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽是 β 2-微球蛋白多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC I类重链多肽。

17. 如权利要求16所述的多聚体多肽,其中所述 β 2-微球蛋白多肽包含与图6中列出的氨基酸序列之一具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

18. 如权利要求16所述的多聚体多肽,其中所述MHC I类重链多肽是HLA-A、HLA-B或HLA-C重链。

19. 如权利要求18所述的多聚体多肽,其中所述MHC I类重链多肽包含与图5A-5C之一中列出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

20. 如权利要求7-16中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽是MHC II类 α 链多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC II类 β 链多肽。

21. 如权利要求7-20中任一项所述的多聚体多肽,其中所述表位是T细胞表位。

21. 如权利要求7-11和15-18中任一项所述的多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含Fc多肽,并且其中所述Ig Fc多肽是IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG3 Fc多肽、IgG4 Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。

22. 如权利要求21所述的多聚体多肽,其中所述Ig Fc多肽包含与图4A-4C中描绘的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

23. 如权利要求7-22中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一多肽和所述第二多肽是非共价缔合的。

24. 如权利要求7-22中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一多肽和所述第二多肽是共价连接的。

25. 如权利要求24所述的多聚体多肽,其中所述共价键联是经由二硫键。

26. 如权利要求25所述的多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽或所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含氨基酸取代以提供第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,并且其中所述二硫键联位于所述第一Cys残基与所述第二Cys残基之间。

27. 如权利要求7-14中任一项所述的多聚体多肽,其包含插入在所述表位与所述第一MHC多肽之间的第一接头。

28. 如权利要求7-14中任一项所述的多聚体多肽,其中所述变体PD-L1免疫调节多肽包含基于图2B中描绘的PD-L1氨基酸序列的氨基酸编号选自D26、T37、I54、Y56、Q66、E72、I115、G119或G120的氨基酸的取代。

29. 如权利要求7-28中任一项所述的多聚体多肽,其包含2种或更多种变体PD-L1免疫调节多肽。

30. 如权利要求29所述的多聚体多肽,其中所述2种或更多种免疫调节多肽是呈串联形式。

31. 如权利要求7-28中任一项所述的多聚体多肽,其中所述免疫调节多肽是根据权利要求1-6中任一项所述的免疫调节多肽。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含第三多肽,其中所述第三多肽包含免疫调节多肽,所述免疫调节多肽包含与所述第一多肽或所述第二多肽的所述免疫调节多肽具有至少90%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

33. 如权利要求32所述的多聚体多肽,其中所述第三多肽共价连接至所述第一多肽。

34. 如权利要求7-13和15-33中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 所述第二MHC多肽;

ii) 所述Ig Fc多肽;以及

iii) 亲和标签。

35. 一种核酸,其包含编码重组多肽的核苷酸序列,

i) 其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

a) 表位;

b) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;

c) 免疫调节多肽;

d) 蛋白水解可裂解的接头或核糖体跳过信号;

e) 第二MHC多肽;以及

f) 免疫球蛋白(Ig)Fc多肽;

其中所述免疫调节多肽是如权利要求1-6中任一项所述的变体免疫调节多肽;或

ii) 其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

- a) 表位;
- b) 第一MHC多肽;
- c) 蛋白水解可裂解的接头或核糖体跳过信号;
- d) 免疫调节多肽
- e) 第二MHC多肽;以及
- f) Ig Fc多肽,

其中所述免疫调节多肽是如权利要求1-6中任一项所述的变体免疫调节多肽。

36. 如权利要求35所述的核酸,其中所述第一MHC多肽是 β 2-微球蛋白多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC I类重链多肽。

37. 如权利要求36所述的核酸,其中所述 β 2-微球蛋白多肽包含与图6中列出的氨基酸序列之一具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

38. 如权利要求35所述的核酸,其中所述MHC I类重链多肽是HLA-A、HLA-B或HLA-C重链。

39. 如权利要求38所述的核酸,其中所述MHC I类重链多肽包含与图5A-图5C中的任一个中列出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

40. 如权利要求35所述的核酸,其中所述第一MHC多肽是MHC II类 α 链多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC II类 β 链多肽。

41. 如权利要求35所述的核酸,其中所述表位是T细胞表位。

42. 如权利要求35所述的核酸,其中所述Ig Fc多肽是IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG3 Fc多肽、IgG4 Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。

43. 如权利要求42所述的核酸,其中所述Ig Fc多肽包含与图4A-图4C中描绘的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

44. 如权利要求35所述的核酸,其中所述变体PD-L1多肽包含基于图2A中列出的氨基酸编号的氨基酸D26、T37、V54、Q66或E72的取代,或其中所述多肽包含基于图2B中列出的氨基酸编号的氨基酸D26、T37、I54、Q66或E72的取代。

45. 如权利要求35所述的核酸,其中所述多聚体多肽包含两种或更多种变体PD-L1免疫调节多肽。

46. 如权利要求35所述的核酸,其中所述蛋白水解可裂解的接头或核糖体跳过信号包含选自以下的氨基酸序列:

- a) LEVLFQGP (SEQ ID NO:34);
- b) ENLYTQS (SEQ ID NO:35);
- c) 弗林蛋白酶裂解位点;
- d) LVPR (SEQ ID NO:37);
- e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:38);
- f) GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:39);
- g) GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:40);以及
- h) GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:41)。

47. 如权利要求35所述的核酸,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

- a) 第一前导肽;
- b) 所述表位;
- c) 所述第一MHC多肽;
- d) 所述免疫调节多肽;
- e) 所述蛋白水解可裂解的接头或核糖体跳过信号;
- f) 第二前导肽;
- g) 所述第二MHC多肽;以及
- h) 所述免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。

48. 如权利要求47所述的核酸,其中所述第一前导肽和所述第二前导肽是 β 2-M前导肽。

49. 如权利要求35所述的核酸,其中所述核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。

50. 如权利要求49所述的核酸,其中所述转录控制元件是在真核细胞中有功能的启动子。

51. 如权利要求35所述的核酸,其中所述第一MHC多肽或所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含氨基酸取代以提供第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,并且其中所述第一Cys残基和所述第二Cys残基提供在所述第一MHC多肽与所述第二MHC多肽之间的二硫键联。

52. 一种重组表达载体,其包含如权利要求35-51中任一项所述的核酸。

53. 如权利要求52所述的重组表达载体,其中所述载体是病毒载体或非病毒载体。

54. 一种用如权利要求52所述的重组表达载体进行遗传修饰的宿主细胞。

55. 如权利要求54所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是在体外。

56. 如权利要求54所述的宿主细胞,其中对所述宿主细胞进行遗传修饰以使得所述细胞不产生内源性MHC β 2-微球蛋白多肽。

57. 如权利要求54所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是T淋巴细胞。

58. 一种组合物,其包含:

a) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第一多肽的核苷酸序列,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

- i) 表位;
- i) 第一MHC多肽;以及
- iii) 免疫调节结构域,

其中所述免疫调节结构域是如权利要求1-6中任一项所述的变体免疫调节多肽;以及

b) 第二核酸,所述第二核酸包含编码第二多肽的核苷酸序列,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

- i) 第二MHC多肽;以及
- ii) Ig Fc多肽。

59. 一种组合物,其包含:

a) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第一多肽的核苷酸序列,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

- i) 表位;以及

ii) 第一MHC多肽;以及

b) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第二多肽的核苷酸序列,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 免疫调节结构域,其中所述免疫调节结构域是如权利要求1-6中任一项所述的变体免疫调节多肽;

ii) 第二MHC多肽;以及

iii) Ig Fc多肽。

60. 如权利要求58或59所述的组合物,其中所述第一核酸和/或所述第二核酸存在于重组表达载体中。

61. 一种用如权利要求58-60中任一项所述的组合物进行遗传修饰的宿主细胞。

62. 一种产生如权利要求7-34中任一项所述的多聚体多肽的方法,所述方法包括:

a) 在培养基中在使得如权利要求54-57和61中任一项所述的宿主细胞合成所述多聚体多肽的条件下在体外培养所述宿主细胞;以及

b) 从所述宿主细胞和/或从所述培养基中分离所述多聚体多肽。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述第二多肽包含亲和标签,并且其中所述分离包括使由所述细胞产生的所述多聚体多肽与所述亲和标签的结合配偶体接触,其中所述结合配偶体被固定,从而固定所述多聚体多肽。

64. 如权利要求62所述的方法,其包括洗脱所述固定的多聚体多肽。

65. 一种选择性地调节表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括使所述T细胞与如权利要求7-34中任一项所述的多聚体多肽接触,其中所述接触选择性地调节所述表位特异性T细胞的活性。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述免疫调节多肽是抑制性多肽,并且其中所述多聚体多肽抑制所述表位特异性T细胞。

67. 如权利要求65所述的方法,其中所述接触是在体外。

68. 如权利要求65所述的方法,其中所述接触是在体内。

69. 如权利要求65所述的方法,其中所述接触是离体。

70. 一种选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如权利要求7-34中任一项所述的多聚体多肽,所述多聚体多肽可有效选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性。

71. 如权利要求70所述的方法,其中所述免疫调节多肽是抑制性多肽,并且其中所述多聚体多肽抑制所述表位特异性T细胞的活性。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述表位是自身表位,并且其中所述施用选择性地抑制对所述自身表位具有特异性的T细胞的活性。

73. 如权利要求71所述的方法,其中所述表位是同种异体移植物上存在的表位,其中所述施用选择性地抑制对所述同种异体移植物具有特异性的T细胞的活性。

74. 一种治疗个体的自身免疫性病症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如权利要求7-34中任一项所述的多聚体多肽,所述多聚体多肽可有效选择性地抑制对所述个体中的自身表位具有特异性的T细胞的活性,从而治疗所述自身免疫性病症。

75. 如权利要求74所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症、系统性红斑

狼疮或自身免疫性关节炎。

76. 一种抑制个体中的同种异体移植物排斥的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如权利要求7-34中任一项所述的多聚体多肽,所述多聚体多肽可有效选择性地抑制对所述个体中存在的同种异体移植物上的表位具有特异性的T细胞的活性,从而抑制同种异体移植物排斥。

77. 如权利要求76所述的方法,其中所述同种异体移植物是肾、肺、皮肤、肝、骨、软骨或心脏。

78. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是皮下。

79. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是静脉内。

80. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是肌内。

81. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是全身。

82. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是在治疗部位的远端。

83. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是局部。

84. 如权利要求70-77中任一项所述的方法,其中所述施用是在治疗部位处或附近。

85. 一种组合物,其包含:

a) 如权利要求7-34中任一项所述的多聚体多肽;以及

b) 药学上可接受的赋形剂。

86. 一种组合物,其包含:

a) 如权利要求35-51中任一项所述的核酸或如权利要求52或53所述的重组表达载体;
以及

b) 药学上可接受的赋形剂。

变体PD-L1多肽、T细胞调节性多聚体多肽及其使用方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2016年5月18日提交的美国临时专利申请号62/338,128的权益,所述临时专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 引言

[0004] 适应性免疫应答涉及存在于T细胞表面上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)表面上非共价呈递的小肽抗原通过主要组织相容性复合物(MHC;在人类中也称为人白细胞抗原(HLA)复合物)接合。这种接合代表了免疫系统靶向机制,并且是T细胞调节(活化或抑制)和效应子功能的必需分子相互作用。在表位特异性细胞靶向后,通过APC上发现的共刺激蛋白与T细胞的对应物共刺激蛋白的接合而活化靶向的T细胞。两种信号-表位/TCR结合和APC共刺激蛋白与T细胞共刺激蛋白的接合-均是驱动T细胞特异性和活化或抑制所必需的。TCR对给定表位具有特异性;然而,共刺激蛋白不是表位特异性的,而是通常在所有T细胞或大T细胞亚群上表达。

发明内容

[0005] 本公开提供了变体PD-L1免疫调节多肽,以及包含所述变体免疫调节肽的融合多肽。本公开提供了T细胞调节性多聚体多肽,以及包含所述T细胞调节性多聚体多肽的组合物,其中所述T细胞调节性多聚体多肽包含本公开的变体免疫调节多肽。本公开提供了包含编码所述T细胞调节性多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,以及包含所述核酸的宿主细胞。本公开提供了调节T细胞的活性的方法;所述方法包括使所述T细胞与本公开的T细胞调节性多聚体多肽接触。

附图说明

[0006] 图1A-1D示意性地描绘本公开的T细胞调节性多聚体多肽的各种实施方案。在这些实施方案中,二硫键在单独的多肽中存在的MHC(例如,HLA)多肽之间形成。

[0007] 图2A-2M提供野生型小鼠PD-L1多肽的氨基酸序列(图2A);野生型人PD-L1多肽的氨基酸序列(图2B);小鼠和人PD-L1氨基酸序列的序列比对(图2C);以及变体PD-L1多肽的实例(图2D-2M)。

[0008] 图3A-3D提供小鼠PD-1(图3A)、人PD-1(图3B)、小鼠B7-1(图3C)和人B7-1(图3D)的氨基酸序列。

[0009] 图4A-4C提供免疫球蛋白Fc多肽的氨基酸序列。

[0010] 图5A-5C提供人白细胞抗原(HLA) I类重链多肽的氨基酸序列。信号序列加下划线。

[0011] 图6提供来自智人(NP_004039.1;SEQ ID NO:3)、黑猩猩(NP_001009066.1;SEQ ID NO:4)、猕猴(NP_001040602.1;SEQ ID NO:5)、黄牛(NP_776318.1;SEQ ID NO:6)以及小家鼠(NP_033865.2;SEQ ID NO:7)的 β -2微球蛋白(β 2M)前体(即,包括前导序列)的多重氨基酸序列比对。氨基酸1-20是信号肽。

[0012] 图7A-7C描绘使用高通量微珠结合FACS测定筛选PD-L1突变体(图7A和7B);和PD-

L1突变体的FACS微珠结合数据(图7C)。

[0013] 图8A-8D描绘具有与PD-1或B7-1的改变的结合的PD-L1突变体的表征。

[0014] 图9A-9B描绘与B7-1竞争结合PD-L1的PD-1。

[0015] 图10提供表1。

[0016] 图11提供表2。

[0017] 图12描绘PD-L1/synTac对体内致病表位特异性CD8⁺T细胞的影响。

[0018] 定义

[0019] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体、或包含嘌呤碱基和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0020] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且是指具有任何长度的氨基酸的聚合形式,其可包括编码和非编码的氨基酸、化学或生物化学修饰的或衍生的氨基酸以及具有修饰的肽主链的多肽。

[0021] 多核苷酸或多肽与另一多核苷酸或多肽具有一定的“序列同一性”百分比,这意味着当比对时碱基或氨基酸的百分数为相同的,并且当比较两个序列时在相同的相对位置上。可以许多不同的方式来确定序列同一性。为了确定序列同一性,可使用在包括 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST、ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/、ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/、mafft.cbrc.jp/alignment/software/的万维网网址上可获得的各种方便的方法和计算机程序(例如,BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFT等)来比对序列。参见,例如Altschul等人(1990),*J.Mol.Biol.* 215:403-10。

[0022] 术语“保守氨基酸取代”是指具有类似侧链的氨基酸残基的蛋白质中的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸由甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸组成;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸由丝氨酸和苏氨酸组成;具有含酰胺侧链的一组氨基酸由天冬酰胺和谷氨酰胺组成;具有芳香族侧链的一组氨基酸由苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸组成;具有碱性侧链的一组氨基酸由赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成;具有酸性侧链的一组氨基酸由谷氨酸酯和天冬氨酸酯组成;并且具有含硫侧链的一组氨基酸由半胱氨酸和甲硫氨酸组成。示例性保守氨基酸取代基团是: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-甘氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0023] 如本文所用的“结合”(例如参考本公开的T细胞调节性多聚体多肽与T细胞上的多肽(例如,T细胞受体)的结合)是指之间的非共价相互作用。结合相互作用的特征通常在于小于 10^{-3} 的解离常数(K_D)。优选的 K_D 值是 10^{-6} M、小于 10^{-7} M、小于 10^{-8} M、小于 10^{-9} M、小于 10^{-10} M、小于 10^{-11} M、小于 10^{-12} M、小于 10^{-13} M、小于 10^{-14} M或小于 10^{-15} M。“亲和力”是指结合强度,增加的结合亲和力与较低的 K_D 相关。

[0024] 如本文所用的术语“免疫突触”或“免疫突触”通常是指适应性免疫应答的两种相互作用免疫细胞之间的天然界面,包括例如抗原呈递细胞(APC)或靶细胞与效应细胞,例如淋巴细胞、效应T细胞、天然杀伤细胞等之间的界面。APC与T细胞之间的免疫突触通常由T细胞抗原受体与主要组织相容性复合物分子的相互作用引发,例如,如Bromley等人,*Annu Rev Immunol.* 2001;19:375-96中所描述;所述参考文献的公开内容以引用的方式整体并入

本文。

[0025] “T细胞”包括所有类型的表达CD3的免疫细胞,包括T-辅助细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T-细胞(CD8⁺细胞)、T-调控细胞(Treg)以及NK-T细胞。

[0026] “共刺激多肽”(如所述术语在本文中使用的)包括特异性结合T细胞上的同源共刺激多肽的抗原呈递细胞(APC)(例如,树突细胞、B细胞等)上的多肽,从而提供除了由例如TCR/CD3复合物与负载有肽的主要组织相容性复合物(MHC)多肽的结合提供的主要信号之外的信号,所述信号介导T细胞应答,包括但不限于增殖、活化、分化等。

[0027] 本公开的T细胞调节性多聚体多肽的“调节结构域”包含共刺激多肽。

[0028] 如本文所用的“异源的”是指分别不存在于天然核酸或蛋白质中的核苷酸或多肽。

[0029] 如本文所使用的“重组”意指具体核酸(DNA或RNA)为克隆、限制、聚合酶链反应(PCR)和/或连接步骤的各种组合的产物,所述步骤产生具有可与天然系统中发现的内源核酸区别开的结构编码或非编码序列的构建体。编码多肽的DNA序列可由cDNA片段或由一系列合成寡核苷酸组装以提供能够由包含在细胞中或无细胞转录和翻译系统中的重组转录单元表达的合成核酸。

[0030] 术语“重组表达载体”或“DNA构建体”在本文中可互换用于指包含载体和一种插入物的DNA分子。通常出于表达和/或繁殖插入物的目的或出于构建其他重组核苷酸序列而产生重组表达载体。插入物可以或可以不可操作地连接至启动子序列并且可以或可以不可操作地连接至DNA调节序列。

[0031] 当此类DNA引入到细胞内部时,细胞被外源DNA例如重组表达载体“遗传修饰”或“转化”或“转染”。外源DNA的存在导致永久或瞬时的遗传变化。转化DNA可以或可以不整合(共价连接)到细胞基因组中。在例如原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,转化DNA可维持在游离元件如质粒上。相对于真核细胞,稳定转化的细胞为其中转化DNA逐渐整合到染色体中使得通过染色体复制遗传给子细胞的一种细胞。

[0032] 如本文所用的“宿主细胞”指代体内或体外真核细胞或作为单细胞实体培养的来自多细胞生物的细胞(例如,细胞系),所述真核细胞可用作或已用作核酸的受体(例如,包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列的表达载体),并且包括已经通过核酸遗传修饰的原始细胞的子代。应该理解由于天然、偶然或有意突变,单细胞的子代可不必在形态或在基因组或总DNA互补序列上与原始亲本完全相同。“重组宿主细胞”(又称为“遗传修饰的宿主细胞”)是已将异源核酸例如表达载体引入到其中的宿主细胞。例如,遗传修饰的真核宿主细胞通过将异源核酸(例如,对真核宿主细胞来说外来的外源性核酸,或通常不存在于真核宿主细胞中的重组核酸)引入到合适的真核宿主细胞中而进行遗传修饰。

[0033] 本文使用术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等一般意指获得希望的药理作用和/或生理作用。所述作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可为预防性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的副作用而言可为治疗性的。如本文所使用的“治疗”涵盖哺乳动物体内疾病或症状的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病或症状在可易于获得疾病或症状但尚未诊断为患有所述疾病或症状的受试者体内发生;(b)抑制疾病或症状,即阻止其发展;或(c)减轻疾病,即引起疾病消退。可在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂。其中治疗使患者的不良临床症状稳定或减轻的持续疾病的治疗特别令人感兴趣。此种治疗希望在受影响组织功能完全失去之前进行。本发明疗法将希望在疾病的症

状阶段过程中施用,并且在一些情况下在疾病的症状阶段之后施用。

[0034] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用并且是指希望诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者。哺乳动物包括例如人、非人灵长类动物、啮齿类动物(例如,大鼠;小鼠)、兔类动物(例如兔)、有蹄类动物(例如,牛、绵羊、猪、马、山羊等)等。

[0035] 在进一步描述本发明之前,应当理解本发明不限于所描述的特定实施方案,因而,当然也可有所变化。还应理解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,且并不意图是限制性的,因为本发明的范围将仅受所附权利要求限制。

[0036] 在提供一个范围的值时,应当理解的是每个中间值到下限的第十个单位(除非上下文另外清晰地指示)、该范围的上限与下限之间以及任何其他陈述的或在陈述范围内的中间值都被涵盖在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在所陈述的较小范围内,并且也包括在本发明内,服从所陈述范围中任何特别排除的限值。在所陈述的范围包括一个或两个限制时,排除了那些被包括的限制的任一个或两者的范围也被包括在本发明之内。

[0037] 除非另外定义,在此使用的所有技术性和科学性术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。虽然在实践或检测本发明时也可使用与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但是现在描述优选的方法和材料。为了公开和描述公布在引用时所涉及的方法和/或材料,本文中提到的所有公布均以引用的方式并入本文。

[0038] 必须指出,如本文和在所附权利要求书中所使用,单数形式“一个(a)/一种(an)”和“所述(the)”包括复数对象,除非上下文另外清楚地指出。因此,例如,提及“PD-L1变体”包括多种此类变体并且提及“HLA多肽”包括提及一种或多种HLA多肽及其本领域技术人员已知的等效物,等等。进一步指出,权利要求书可经拟订以排除任何任选的要素。因此,这样的陈述旨在用作使用与权利要求要素的叙述有关的排他性术语如“单独”、“仅”等或使用“否定型”限定的前提基础。

[0039] 应理解,出于清晰目的而在分开的实施方案的上下文中所描述的本发明的某些特征也可在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见而在单个实施例的背景下描述的本发明的不同特征也可以单独地或以任何适合的子组合形式提供。属于本发明的实施方案的所有组合确切地涵盖在本发明中并且在本文中公开如同每个和每一种组合均单独地和明确地公开一样。另外,各种实施方案及其元件的所有子组合也确切地涵盖在本发明中并且在本文中公开如同每个和每一种这样的子组合均单独地和明确地在本文中公开一样。

[0040] 本文中讨论的公布仅提供它们在本申请的提交日期之前的公开内容。本文没有任何内容被解释为承认本发明不能由于现有发明而有权先于此种公布。此外,所提供的公布日期可不同于可能需要独立确认的实际公布日期。

具体实施方式

[0041] 本公开提供了变体免疫调节多肽,以及包含所述变体免疫调节肽的融合多肽。本公开提供了T细胞调节性多聚体多肽,以及包含所述T细胞调节性多聚体多肽的组合物,其中所述T细胞调节性多聚体多肽包含本公开的变体免疫调节多肽。本公开提供了包含编码所述T细胞调节性多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,以及包含所述核酸的宿主细胞。本公开

提供了调节T细胞的活性的方法；所述方法包括使所述T细胞与本公开的T细胞调节性多聚体多肽接触。

[0042] 本公开的T细胞调节性多聚体多肽也称为“synTac多肽”。本公开的synTac多肽包含变体调节结构域，其中所述变体调节结构域对免疫调节多肽（例如，T细胞上存在的免疫调节多肽）表现出的结合亲和力与野生型PD-L1调节结构域对所述免疫调节多肽（例如，PD-1或B7-1）的亲和力相比降低。本公开的synTac多肽可调节（例如抑制）靶T细胞的活性。本公开的synTac多肽提供增强的靶细胞特异性。

[0043] 变体免疫调节多肽

[0044] 本公开提供了变体PD-L1调节多肽。人PD-L1的野生型氨基酸序列提供于图2A中。

[0045] 野生型PD-L1结合至PD1和B7-1。小鼠PD-1的氨基酸序列提供于图3A中；并且人PD-1的氨基酸序列提供于图3B中。小鼠B7-1的氨基酸序列提供于图3C中；人B7-1的氨基酸序列提供于图3D中。在一些情况下，与野生型PD-L1与PD1的结合相比，本公开的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力降低。在一些情况下，与野生型PD-L1与B7-1的结合相比，本公开的变体PD-L1多肽结合至B7-1的亲和力降低。在一些情况下，本公开的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力与野生型PD-L1与PD-1的结合亲和力基本上相同；并且与野生型PD-L1与B7-1的结合相比，结合至B7-1的亲和力降低。在一些情况下，与野生型PD-L1与PD1的结合相比，本公开的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力降低；并且与野生型PD-L1与B7-1的结合相比，结合至B7-1的亲和力降低。在一些情况下，与野生型PD-L1与PD-1的结合相比，本公开的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力降低；并且结合至B7-1的亲和力与野生型PD-L1与B7-1的结合亲和力基本上相同。

[0046] 在一些情况下，与包含图2A中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1（例如，包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽）的结合亲和力相比，本公开的变体PD-L1多肽对PD-1表现出降低的结合亲和力。例如，在一些情况下，本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力小于包含图2A中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽的结合亲和力。例如，在一些情况下，本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力比包含图2A中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1（例如，包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽）的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0047] 在一些情况下，与包含图2B中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1（例如，包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽）的结合亲和力相比，本公开的变体PD-L1多肽对PD-1表现出降低的结合亲和力。例如，在一些情况下，本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力小于包含图2B中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽的结合亲和力。例如，在一些情况下，本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力比包含图2B中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1（例如，包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽）的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超

过95%。

[0048] 在一些情况下,野生型小鼠PD-L1胞外结构域包含以下氨基酸序列:FT ITAPKDLYVV EYGSNVTMEC RFPVERELDL LALVVYWEKE DEQVIQFVAG EEDLKPQHSN FRGRASLPKD QLLKGNAAALQ ITDVKLQDAG VYCCIISYGG ADYKRITLKV NAPYRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEGYP EAEVIWTNSD HQPVSGKRSV TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIPELPA THPPQNR (SEQ ID NO:1)。

[0049] 在一些情况下,野生型人PD-L1胞外结构域包含以下氨基酸序列:FT VTPKDLVYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:2)。

[0050] 在一些情况下,与包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1(例如,包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力相比,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力小于包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力比包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1(例如,包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0051] 在一些情况下,与包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1(例如,包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力相比,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力小于包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1的结合亲和力比包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1(例如,包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0052] 在一些情况下,如上所述,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1表现出降低的结合亲和力;并且保留野生型PD-L1多肽对野生型B7-1多肽的结合亲和力的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。例如,在一些情况下,与包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1(例如,包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力相比,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1表现出降低的结合亲和力;并且保留野生型PD-L1多肽(例如,包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0053] 在一些情况下,与包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽的结合亲和力相比,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出降低约40%至约60%的结合亲和力;并且保留野生型PD-L1多肽(例如,包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0054] 在一些情况下,与包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽的结合亲和力相比,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出降低约40%至约60%的结合亲和力;并且保留野生型PD-L1多肽(例如,包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0055] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1具有1nM至1mM的结合亲和力。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1具有100nM至100μM的结合亲和力。作为另一个实例,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽对PD1(例如,包含图3中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM、约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15μM、约15μM至约20μM、约20μM至约25μM、约25μM至约50μM、约50μM至约75μM或约75μM至约100μM的结合亲和力。

[0056] 本公开的变体PD-L1多肽可相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有单个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有2个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有3个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有4个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有5个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有6个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有7个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有8个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽

(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有9个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有10个氨基酸取代。

[0057] 本公开的变体PD-L1多肽可具有200个氨基酸至240个氨基酸的长度。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽具有200个氨基酸至220个氨基酸或220个氨基酸至240个氨基酸的长度。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽具有200个氨基酸至219个氨基酸的长度。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽具有219个氨基酸的长度。

[0058] D26取代

[0059] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu、Ile或Arg。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Gly。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Leu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸26是Arg。在一些情况下,与包含图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽的结合亲和力相比,所述变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出降低约40%至约60%的结合亲和力;并且保留野生型PD-L1多肽(例如,包含图2B或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0060] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在D26处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在D8处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸26可以是

Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu、Ile或Arg。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Val而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Leu而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Gly而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ile而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Arg而不是Asp。

[0061] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在D8处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸8可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ala、Gly、Val、Leu或Ile而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ala、Gly、Val、Leu、Ile或Arg而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ala而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Val而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Leu而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Gly而不是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Arg而不是Asp。

[0062] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2D中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2E中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2F中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2G中描绘的氨基酸序列。

[0063] T37取代

[0064] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg、Lys或His。在一

些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Lys。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是His。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ala。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Leu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ile。在一些情况下,所述变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约15%至约35%;并且与野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约70%至约90%的结合亲和力)。

[0065] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在T37处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在T19处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸37可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu或Ile而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是His而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ala而不是Thr。在

一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Val而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Leu而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ile而不是Thr。

[0066] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在T19处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu或Ile而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Arg而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是His而不是19。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Gly而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Ala而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Val而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Leu而不是Thr。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Ile而不是Thr。

[0067] I54取代

[0068] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨

氨酸54是Gly。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu。在一些情况下,所述变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图2B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约70%至约100%;并且与野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0069] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除缬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu。在一些情况下,所述变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含图2A中列出(或SEQ ID NO:1中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约70%至约100%;并且与野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A中或SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0070] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在I54处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在I36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu或Asp而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp而不是Ile。

[0071] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,在V54处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,在V36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu或Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu而不是Val。

[0072] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在I1e-36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除异亮氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Ala、

Gly、Leu或Asp而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Ala而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Leu而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Gly而不是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Asp而不是Ile。

[0073] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,在V36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Glu或Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Ala而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Leu而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Gly而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Glu而不是Val。

[0074] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2H中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2I中描绘的氨基酸序列。

[0075] Q66取代

[0076] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸66是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如,其中氨基酸66是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸66是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸66是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸66是Asp。在一些情况下,所述变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约80%至约100%;并且与野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲

和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0077] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在Q66处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在Q48处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是除谷氨酰胺以外的任何氨基酸;例如,氨基酸66可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Ala而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Leu而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Gly而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Glu而不是Gln。

[0078] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在Q48处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是除谷氨酰胺以外的任何氨基酸;例如,氨基酸48可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Ala而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Leu而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Gly而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Glu而不是Gln。

[0079] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2J中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2K中描绘的氨基酸序列。

[0080] E72取代

[0081] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是除谷氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸72是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的变体PD-L1

多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp、Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Lys。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是His。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp。在一些情况下,所述变体PD-L1多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约30%至约60%;并且与野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0082] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在E72处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在E54处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是除谷氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸72可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp、Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是His而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp而不是Glu。

[0083] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在E54处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除谷氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp、Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列

出的氨基酸序列,其中氨基酸54是His而不是Glu。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp而不是Glu。

[0084] 在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2L中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含图2M中描绘的氨基酸序列。

[0085] 融合多肽

[0086] 本公开提供了PD-L1融合多肽。本公开的融合多肽包含:a)本公开的变体PD-L1多肽;以及b)异源融合配偶体。在一些情况下,所述异源融合配偶体融合至变体PD-L1多肽的N-末端。在一些情况下,所述异源融合配偶体融合至变体PD-L1多肽的C-末端。在一些情况下,本公开的PD-L1融合多肽包含与变体PD-L1多肽的N-末端融合的第一异源融合配偶体,以及与变体PD-L1多肽的C-末端融合的第二异源融合配偶体。

[0087] 本公开的PD-L1融合多肽的总长度可在245个氨基酸至2000个氨基酸的范围内。例如,本公开的PD-L1融合多肽可在245个氨基酸至250个氨基酸、250个氨基酸至275个氨基酸、275个氨基酸至300个氨基酸、300个氨基酸至350个氨基酸、350个氨基酸、350个氨基酸至400个氨基酸、400个氨基酸、400个氨基酸至450个氨基酸、450个氨基酸至500个氨基酸、500个氨基酸至600个氨基酸、600个氨基酸至700个氨基酸、700个氨基酸至800个氨基酸、800个氨基酸至900个氨基酸、900个氨基酸至1000个氨基酸、1000个氨基酸至1250个氨基酸、1250个氨基酸至1500个氨基酸、1500个氨基酸至1750个氨基酸或1750个氨基酸至2000个氨基酸的范围内。

[0088] 合适的融合配偶体包括但不限于,跨膜结构域;免疫球蛋白Fc区(例如,IgG Fc区);抗体的抗原结合区;细胞因子;免疫调节结构域;细胞内信号传导结构域;等。

[0089] T细胞调节性多聚体多肽

[0090] 本公开提供了多聚体(例如,异二聚体、异三聚体)多肽。所述多聚体多肽是T细胞调节性多肽,并且在本文中也称为“T细胞调节性多聚体多肽”或“synTac”(对于“T细胞活化的免疫突触”而言)。图1A-1D提供本公开的各种T细胞调节性多聚体多肽的示意性描述。本公开的T细胞调节性多聚体多肽也称为“synTac多肽”或“多聚体多肽”。当本公开的T细胞调节性多聚体多肽包含PD-L1免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1免疫调节多肽)时,这种T细胞调节性多聚体多肽在本文中也称为“PD-L1/synTac”。

[0091] 在一些情况下,本公开的synTac多肽包含本公开的变体PD-L1免疫调节多肽。在一些情况下,本公开的synTac多肽包含变体PD-L1免疫调节多肽,所述变体PD-L1免疫调节多肽包含如图10或图11中描绘的氨基酸取代。因此,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的D26的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的D8的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的T37的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的T19的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的D49的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的D31的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的L53的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的L35的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的I54(小鼠PD-L1中的V54)的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的I36的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体

PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Y56的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Y38的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Y56的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Y38的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Q66的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Q48的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Q66的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Q48的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的E72的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的E54的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的M115(小鼠PD-L1的I115)的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的M97的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的I116的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的I98的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的G119的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的G101的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的G120的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的G102的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的G120的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的G102的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的A121的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的A103的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的D122的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的D104的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Y123的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Y105的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的K124的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的K106的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的R125的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的K107的取代。

[0092] 如上所述,在一些情况下,与野生型PD-L1与PD1的结合亲和力相比,存在于本公开的多聚体多肽中的变体PD-L1多肽对PD1表现出降低的结合亲和力。在一些情况下,与包含野生型PD-L1(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽相比,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对PD1也表现出降低的结合亲和力。

[0093] 在一些情况下,与野生型PD-L1对B7-1的结合亲和力相比,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽结合至B7-1的亲和力降低。在一些情况下,与包含野生型PD-L1(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽相比,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对B7-1也表现出降低的结合亲和力。

[0094] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力与野生型PD-L1与PD-1的结合亲和力基本上相同;并且与野生型PD-L1与B7-1的结合相比,结合至B7-1的亲和力降低。在一些情况下,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多

聚体多肽对PD-1也表现出与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽基本上相同的亲和力;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽相比,还以对B7-1降低的结合亲和力结合B7-1。

[0095] 在一些情况下,与野生型PD-L1与PD1的结合相比,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力降低;并且与野生型PD-L1与B7-1的结合相比,结合至B7-1的亲和力降低。在一些情况下,与包含野生型PD-L1(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽相比,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对B7-1也表现出降低的结合亲和力;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽相比,还以对B7-1降低的结合亲和力结合B7-1。

[0096] 在一些情况下,与野生型PD-L1与PD-1的结合相比,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽结合至PD-1的亲和力降低;并且结合至B7-1的亲和力与野生型PD-L1与B7-1的结合亲和力基本上相同。在一些情况下,与包含野生型PD-L1(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽相比,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对B7-1也表现出降低的结合亲和力;并且还对B7-1表现出与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽基本上相同的亲和力。

[0097] 在一些情况下,与包含PD-L1多肽(其包含图2A或图2B或SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对PD1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含图2A中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含图2A中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1(例如,包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。作为另一个实例,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含图2B中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含图2B中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1(例如,包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0098] 在一些情况下,与包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对PD1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1(例如,包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0099] 在一些情况下,与包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对PD1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合PD1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对PD1(例如,包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0100] 在一些情况下,与包含PD-L1多肽(其包含图2A或图2B或SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对B7-1的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对B7-1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含图2A中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含图2A中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对B7-1(例如,包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。作为另一个实例,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含图2B中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3D中描绘的氨基酸序列的PD1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含图2B中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对B7-1(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0101] 在一些情况下,与包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列)的对

照synTac多肽对B7-1的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对B7-1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:1中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对B7-1(例如,包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0102] 在一些情况下,与包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对B7-1的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对B7-1表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力小于包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合B7-1的结合亲和力比包含PD-L1多肽(其包含SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列)的对照synTac多肽对B7-1(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0103] 如上所述,在一些情况下,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对B7-1(例如,包含图3C或图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)表现出与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽基本上相同的亲和力。例如,在一些情况下,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对B7-1(例如,包含图3C或图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)表现出包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对B7-1的亲合力的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0104] 如上所述,在一些情况下,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)表现出与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽基本上相同的亲和力。例如,在一些情况下,包含本公开的变体PD-L1多肽的本公开的多聚体多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)表现出包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或2B中描绘的氨基酸序列或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对PD1的亲合力的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0105] 在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1具有1nM至约1mM的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1具有100nM至约100 μ M的结合亲和力。在一些情况下,本

公开的synTac多肽对PD1具有约100nM至500nM的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约100nM至约150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约450nM或约450nM至约500nM的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约500nM至1 μ M的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM或约900nM至约1 μ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约1 μ M至10 μ M的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约1 μ M至2 μ M、约2 μ M至约3 μ M、约3 μ M至约4 μ M、约4 μ M至约5 μ M、约5 μ M至约6 μ M、约6 μ M至约7 μ M、约7 μ M至约8 μ M、约8 μ M至约9 μ M或约9 μ M至约10 μ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约10 μ M至100 μ M的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对PD1(例如,包含图3A或图3B中描绘的氨基酸序列的PD1多肽)具有约10 μ M至约20 μ M、约20 μ M至约30 μ M、约30 μ M至约40 μ M、约40 μ M至约50 μ M、约50 μ M至约60 μ M、约60 μ M至约70 μ M、约70 μ M至约80 μ M、约80 μ M至约90 μ M或约90 μ M至约100 μ M的结合亲和力。

[0106] 本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽可相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有单个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有2个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有3个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有4个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有5个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有6个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有7个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有8个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ

ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有9个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的synTac多肽中存在的变体PD-L1多肽相对于野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A或图2B中描绘或如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)具有10个氨基酸取代。

[0107] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽从氨基末端(N-末端)至羧基末端(C-末端)依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽和c)免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);并且其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)第二MHC多肽;和b)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。在其他情况下,本公开的多聚体多肽包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);和b)第一MHC多肽;并且其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);b)第二MHC多肽;和c)Ig Fc多肽。在一些情况下,所述第一和第二MHC多肽是I类MHC多肽;例如,在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC I类 β 2-微球蛋白(B2M或 β 2M)多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC I类重链(H链);或所述第一MHC多肽是MHC I类H链,并且所述第二MHC多肽是MHC I类 β 2M多肽。在其他情况下,所述第一和第二MHC多肽是II类MHC多肽;例如,在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC II类 α 链多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC II类 β 链多肽。在其他情况下,所述第一多肽是MHC II类 β 链多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC II类 α 链多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含本公开的两种或更多种变体PD-L1免疫调节多肽。在本公开的多聚体多肽包含两种或更多种免疫调节多肽的情况下,在一些情况下,所述两种或更多种免疫调节多肽存在于同一多肽链中,并且可处于串联形式。在本公开的多聚体多肽包含两种或更多种免疫调节多肽的情况下,在一些情况下,所述两种或更多种变体PD-L1免疫调节多肽包含彼此相同的氨基酸序列。在本公开的多聚体多肽包含两种或更多种变体PD-L1免疫调节多肽的情况下,在一些情况下,所述两种或更多种变体PD-L1免疫调节多肽存在于单独多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽是异二聚体。在一些情况下,本公开的多聚体多肽是三聚体多肽。

[0108] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)第一MHC多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)第二MHC多肽;和ii)Ig Fc多肽;以及iii)免疫调节结构域(例如,本公开的变体PD-L1多肽)。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)第一MHC多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)第二MHC多肽;和ii)免疫调节结构域(例如,本公开的变体PD-L1多肽)。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)第一MHC多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)免疫调节结构域(例如,本公开的变体PD-L1多肽);和ii)第二MHC多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;ii)第一MHC多肽;和iii)免疫调节结构域(例如,本公开的变体PD-L1多肽);以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)第二MHC多肽。在一些情况下,在本公开的多聚体多肽包含非Ig支架的情况下,所述非Ig支架是XTEN肽、转铁蛋白多肽、Fc受体多肽、弹性蛋白样多肽、丝状多肽或丝-弹性蛋白样多肽。

[0109] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽是单价的。在一些情况下,本公开的多聚体多肽是多价的。在一些情况下,本公开的多价多聚体多肽在所述第一或第二多肽中的一个上包含免疫球蛋白Fc多肽。例如,取决于本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽,所述多聚体多肽可以是同二聚体,其中所述多聚体多肽的两个分子存在于所述同二聚体中,其中所述多聚体多肽的两个分子可彼此例如二硫键连接,例如经由所述两个分子中存在的Fc多肽。作为另一个实例,本公开的多聚体多肽可包含多聚体多肽的三个、四个或五个分子,其中所述多聚体多肽的分子可彼此二硫键连接,例如,经由所述分子中存在的Fc多肽。

[0110] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii) β 2M多肽;和iii) 本公开的变体PD-L1多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) β 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 本公开的变体PD-L1多肽;ii) I类MHC重链;和iii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii) β 2M多肽;iii) 本公开的第一变体PD-L1多肽;iv) 本公开的第二变体PD-L1多肽;和v) 本公开的第三变体PD-L1多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽具有相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽在氨基酸序列上彼此不同。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) β 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 本公开的第一变体PD-L1多肽;ii) 本公开的第二变体PD-L1多肽;和iii) 本公开的第三变体PD-L1多肽;iv) I类MHC重链;和v) Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽具有相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽在氨基酸序列上彼此不同。

[0111] 接头

[0112] 本公开的多聚体多肽可包含插入在例如表位与MHC多肽之间;在MHC多肽与免疫调节多肽之间;在MHC多肽与Ig Fc多肽之间;在第一变体PD-L1多肽与第二变体PD-L1多肽之间;或在第二变体PD-L1多肽与第三变体PD-L1多肽之间的接头肽。

[0113] 合适的接头(也称为“间隔物”)可容易地选择,并且可具有许多合适长度中的任一种,如1个氨基酸至25个氨基酸、3个氨基酸至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸。合适的接头的长度可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0114] 示例性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如,(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:8)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:9),其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及本领域中已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser两者均是相对非结构化的,并且因此可充当组分之间的中性系链。可使用甘氨酸聚合物;甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基限制少的多(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142

(1992))。示例性接头可包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:10)、GGSGG (SEQ ID NO:11)、GSGSG (SEQ ID NO:12)、GSGGG (SEQ ID NO:13)、GGGSG (SEQ ID NO:14)、GSSSG (SEQ ID NO:15)等。示例性接头可包括例如Gly (Ser)₄n,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GSSSS)_n,其中n是4。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GSSSS)_n,其中n是5。示例性接头可包括,例如((Gly)₄Ser)_n(SEQ ID NO:45),其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。例如,在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n,其中n是4。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n,其中n是5。

[0115] 在一些情况下,在本公开的多聚体多肽的第一多肽中存在的接头多肽包含半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基可与本公开的多聚体多肽的第二多肽中存在的半胱氨酸残基形成二硫键。在一些情况下,例如,合适的接头包含氨基酸序列GCGASGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16)。

[0116] 表位

[0117] 在本公开的多聚体多肽中存在的表位可具有约4个氨基酸至约25个氨基酸的长度,例如,所述表位可具有4个氨基酸(aa)至10aa、10aa至15aa、15aa至20aa或20aa至25aa的长度。例如,在本公开的多聚体多肽中存在的表位可具有4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa或25aa的长度。在一些情况下,在本公开的多聚体多肽中存在的表位具有5个氨基酸至10个氨基酸,例如,5aa、6aa、7aa、8aa、9aa或10aa的长度。

[0118] 在本公开的多聚体多肽中存在的表位被T细胞特异性结合,即所述表位被表位特异性T细胞特异性结合。表位特异性T细胞结合具有参考氨基酸序列的表位,但基本上不结合不同于参考氨基酸序列的表位。例如,表位特异性T细胞结合具有参考氨基酸序列的表位,并且结合与参考氨基酸序列不同的表位(如果发生的话)的亲和力小于 10^{-6} M、小于 10^{-5} M或小于 10^{-4} M。表位特异性T细胞可结合对其具有特异性的表位的亲和力是至少 10^{-7} M、至少 10^{-8} M、至少 10^{-9} M或至少 10^{-10} M。

[0119] 合适的表位包括但不限于存在于自身免疫相关抗原中的表位。自身免疫抗原包括但不限于髓鞘碱性蛋白(MBP);蛋白脂质蛋白(PLP);髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG),髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白心肌肌球蛋白;外表面蛋白(OSP);髓鞘相关糖蛋白(MAG);神经丝;干扰素 ω ;转谷氨酰胺酶;芳香酸羧化酶;17-羟化酶;21-羟化酶,心磷脂;丙酮酸脱氢酶; β 2糖蛋白I;磷脂酰丝氨酸;apoH;膜联蛋白A5;LKM-1;可溶性肝抗原;碳酸酐酶;gpIIb-IIIa或Ib-IX;XVII型胶原;组织转谷氨酰胺酶;醇溶蛋白;GD1a;GQ1b;BP-1;BP-2;表皮转谷氨酰胺酶;组氨酸-tRNA;信号识别肽;Mi-2;Jo1;谷氨酸脱羧酶,HSP60;HSP70;HSP90;IGRP;胰岛素;羧肽酶H;胰岛素瘤抗原-2;IA-2 β ;ICA69;ZnT8;嗜铬粒蛋白A;IAPP;sc170;拓扑异构酶;组蛋白;基底膜IV型胶原;烯醇酶;甲状腺过氧化物酶;甲状腺球蛋白;补体组分3;电压门控钙通道;Q型钙通道,突触结合蛋白,毒蕈碱乙酰胆碱受体M1;SMA;LKM-1;LKM-2;LKM-3;可溶性肝抗原;SLA;LP;主要外周髓鞘蛋白P0;髓过氧化物酶;GQ1b;U1-RNP;Kir4.1;烟碱乙酰胆碱受体;MuSK蛋白;下视丘分泌素;食欲肽;角蛋白;AQP4;Yo;Hu;谷氨酸受体;桥粒芯蛋白3;p62;sp100,Ro;LA;糖蛋白IIb-IIIa或Ib-IX;ADAMTS13;心磷脂; β 2糖蛋白I;HPA-1a;HPA-5b;IFN- γ ,IL-1,TNF- α ;以及GMCSF。自身免疫抗原还包括在1型糖尿病、多发性硬化或系统性红斑狼疮中相关的自身抗原。称为IGRP₂₀₆₋₂₁₄的胰腺 β 细胞抗原胰岛特异性葡萄糖-

6-磷酸酶催化亚基相关蛋白 (IGRP) 肽可用作自身免疫表位, 例如, 在1型糖尿病的背景下; IGRP₂₀₆₋₂₁₄的氨基酸序列是VYLKTNVFL (SEQ ID NO:43//) (参见例如, Krishnamurthy等人 (2008) J. Immunol. 180:4458; 和Han等人 (2005) J. Clin. Invest. 115:1879)。其他合适的IGRP肽公开于例如Jarchum等人 (2008) Clin. Immunol. 127:359中。在1型糖尿病的背景下, 合适的自身抗原表位包括前胰岛素原的肽表位; 例如ALWGPDPAAA (SEQ ID NO:44//) (参见例如, Skowera等人 (2008) J. Clin. Invest. 118:3390)。

[0120] 自身免疫抗原和相关的自身免疫病症包括, 例如, 髓鞘碱性蛋白 (MBP)、蛋白质脂蛋白 (PLP) 和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG), 在每种情况下与多发性硬化 (MS) 相关; CD44、前胰岛素原、胰岛素原、胰岛素、谷氨酸脱氧酶 (GAD65)、酪氨酸磷酸酶样胰岛素瘤抗原2 (IA2)、锌转运蛋白 (ZnT8) 和热休克蛋白60 (HSP60), 在每种情况下与I型糖尿病相关; 与自身免疫性葡萄膜炎相关的光感受器维甲酸结合蛋白 (IRBP); 乙酰胆碱受体AChR和胰岛素样生长因子-1受体 (IGF-1R), 在每种情况下与重症肌无力相关; 与风湿热相关的来自 β -溶血性链球菌的M蛋白 (假自身抗原); 与关节炎相关的巨噬细胞移动抑制因子; Ro/La RNP复合物; α -和 β -胞衬蛋白; 胰岛细胞自身抗原; 聚 (ADP) 核糖聚合酶 (PARP); NuMA; NOR-90; Ro60自身抗原和p27抗原, 在每种情况下与斯耶格伦综合征相关; Ro60自身抗原、低密度脂蛋白、U-1小核核糖核蛋白复合物的Sm抗原 (B/B', D1、D2、D3、E、F、G) 和RNP核糖核蛋白, 在每种情况下与红斑狼疮相关; oxLDL、 β (2) GPI、HSP60/65和oxLDL/ β (2) GPI, 在每种情况下与动脉粥样硬化相关; 与特发性扩张型心肌病 (DCM) 相关的心脏 β (1)-肾上腺素能受体; 与肌炎相关的组氨酰-tRNA合成酶 (HisRS); 与硬皮病相关的拓扑异构酶I; IL-17; 或热休克蛋白。

[0121] MHC多肽

[0122] 如上所述, 本公开的多聚体多肽包含MHC多肽。出于本公开的目的, 术语“主要组织相容性复合物 (MHC) 多肽”是指包括各种物种的MHC多肽, 包括人MHC (也称为人白细胞抗原 (HLA)) 多肽、啮齿动物 (例如, 小鼠、大鼠等)、MHC多肽和其他哺乳动物物种 (例如, 兔类动物 (例如, 兔)、非人灵长类动物、犬科动物 (例如, 狗)、猫科动物 (例如, 猫)、有蹄类动物 (例如, 马科动物、牛科动物、绵羊科动物、山羊科动物、骆驼等) 的MHC多肽等。术语“MHC多肽”是指包括I类MHC多肽 (例如, β -2微球蛋白和MHC I类重链) 和MHC II类多肽 (例如, MHC II类 α 多肽和MHC II类 β 多肽)。

[0123] 如上所述, 在本公开的多聚体多肽的一些实施方案中, 所述第一和第二MHC多肽是I类MHC多肽; 例如, 在一些情况下, 所述第一MHC多肽是MHC I类 β 2-微球蛋白 (β 2M) 多肽, 并且所述第二MHC多肽是MHC I类重链 (H链)。在其他情况下, 所述第一和第二MHC多肽是II类MHC多肽; 例如, 在一些情况下, 所述第一MHC多肽是MHC II类 α 链多肽, 并且所述第二MHC多肽是MHC II类 β 链多肽。在其他情况下, 所述第一多肽是MHC II类 β 链多肽, 并且所述第二MHC多肽是MHC II类 α 链多肽。

[0124] 在一些情况下, 本公开的多聚体多肽的MHC多肽是人MHC多肽, 其中人MHC多肽也称为“人白细胞抗原” (“HLA”) 多肽。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽的MHC多肽是I类HLA多肽, 例如 β 2-微球蛋白多肽, 或I类HLA重链多肽。I类HLA重链多肽包括HLA-A重链多肽、HLA-B重链多肽、HLA-C重链多肽、HLA-E重链多肽、HLA-F重链多肽和HLA-G重链多肽。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽的MHC多肽是II类HLA多肽, 例如II类HLA α 链或II类HLA β 链。MHC II类多肽包括MHC II类DPA和 β 多肽、DMA和 β 多肽、DOA α 和 β 多肽、DOBA和 β 多肽、DQA和 β

多肽以及DR α 和 β 多肽。

[0125] 作为实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与图5A中描绘的人HLA-A重链多肽的氨基酸序列的氨基酸25-365具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0126] 作为实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与以下人HLA-A重链氨基酸序列的氨基酸序列的氨基酸25-365具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA
AAVVVPSGQEQRVYCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:17)。

[0127] 作为另一个实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与图5B中描绘的人HLA-B重链多肽的氨基酸序列的氨基酸25-362具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0128] 作为另一个实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与图5C中描绘的人HLA-C重链多肽的氨基酸序列的氨基酸25-362具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0129] 作为另一个实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0130] GPHSLRYFVTAVSRPGLGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDADNPRFEPRAPWMEQEGPEYWEEQTQRAK
SDEQWFRVSLRTAQRYYNQSKGGSHTFQRMFGCDVGSWDRLLRGYQQFAYDGRDYIALNEDLKTWTAADTAALITR
RKWEQAGDAEYYRAYLEGECEVWLRRYLELGNETLLRTDSPKAHVITYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLN
GEDLTQDMELVETRPAGDGTQKWA
AAVVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRW (SEQ ID NO:18)。

[0131] 本公开的多聚体多肽的 β 2-微球蛋白(β 2M)多肽可以是人 β 2M多肽、非人灵长类动物 β 2M多肽、鼠 β 2M多肽等。在一些情况下, β 2M多肽包含与图6中描绘的 β 2M氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下, β 2M多肽包含与图6中描绘的 β 2M氨基酸序列的氨基酸21至119具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0132] 在一些情况下,MHC多肽相对于参考MHC多肽(其中参考MHC多肽可以是野生型MHC多肽)包含单个氨基酸取代,其中所述单个氨基酸取代用半胱氨酸(Cys)残基取代氨基酸。当在本公开的多聚体多肽的第一多肽的MHC多肽中存在时,此类半胱氨酸残基可与本公开的多聚体多肽的第二多肽链中存在的半胱氨酸残基形成二硫键。

[0133] 在一些情况下,在本公开的多聚体多肽的第一多肽中存在的第一MHC多肽和/或在本公开的多聚体多肽的第二多肽中存在的第二MHC多肽包含氨基酸取代以用半胱氨酸取代氨基酸,其中所述第一MHC多肽中的取代的半胱氨酸与所述第二MHC多肽中的半胱氨酸形成二硫键,其中所述第一MHC多肽中的半胱氨酸与所述第二MHC多肽中的取代的半胱氨酸形成二硫键,或其中所述第一MHC多肽中的取代的半胱氨酸与所述第二MHC多肽中的取代的半胱

氨酸形成二硫键。

[0134] 例如,在一些情况下,HLA β 2-微球蛋白和HLA I类重链中的以下残基对中的一个被半胱氨酸取代(其中残基数是成熟多肽的残基数):1) β 2M残基12,HLA I类重链残基236;2) β 2M残基12,HLA I类重链残基237;3) β 2M残基8,HLA I类重链残基234;4) β 2M残基10,HLA I类重链残基235;5) β 2M残基24,HLA I类重链残基236;6) β 2M残基28,HLA I类重链残基232;7) β 2M残基98,HLA I类重链残基192;8) β 2M残基99,HLA I类重链残基234;9) β 2M残基3,HLA I类重链残基120;10) β 2M残基31,HLA I类重链残基96;11) β 2M残基53,HLA I类重链残基35;12) β 2M残基60,HLA I类重链残基96;13) β 2M残基60,HLA I类重链残基122;14) β 2M残基63,HLA I类重链残基27;15) β 2M残基Arg3,HLA I类重链残基Gly120;16) β 2M残基His31,HLA I类重链残基Gln96;17) β 2M残基Asp53,HLA I类重链残基Arg35;18) β 2M残基Trp60,HLA I类重链残基Gln96;19) β 2M残基Trp60,HLA I类重链残基Asp122;20) β 2M残基Tyr63,HLA I类重链残基Tyr27;21) β 2M残基Lys6,HLA I类重链残基Glu232;22) β 2M残基Gln8,HLA I类重链残基Arg234;23) β 2M残基Tyr10,HLA I类重链残基Pro235;24) β 2M残基Ser11,HLA I类重链残基Gln242;25) β 2M残基Asn24,HLA I类重链残基Ala236;26) β 2M残基Ser28,HLA I类重链残基Glu232;27) β 2M残基Asp98,HLA I类重链残基His192;以及28) β 2M残基Met99,HLA I类重链残基Arg234。MHC/HLA I类重链的氨基酸编号是参考无信号肽的成熟MHC/HLA I类重链。例如,在图5A中描绘的包含信号肽的氨基酸序列中,Gly120是Gly144;Gln96是Gln120;等。在一些情况下,所述 β 2M多肽包含R12C取代,并且所述HLA I类重链包含A236C取代;在此类情况下,在 β 2M多肽的Cys-12与HLA I类重链的Cys-236之间形成二硫键。例如,在一些情况下,成熟HLA-A氨基酸序列的残基236(即图5A中描绘的氨基酸序列的残基260)被Cys取代。在一些情况下,成熟HLA-B氨基酸序列的残基236(即图5B中描绘的氨基酸序列的残基260)被Cys取代。在一些情况下,成熟HLA-C氨基酸序列的残基236(即图5C中描绘的氨基酸序列的残基260)被Cys取代。在一些情况下,图6中描绘的氨基酸序列的残基32(对应于成熟 β 2M的Arg-12)被Cys取代。

[0135] 在一些情况下, β 2M多肽包含氨基酸序列:IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM。在一些情况下, β 2M多肽包含氨基酸序列:IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRDM。

[0136] 在一些情况下,HLA I类重链多肽包含氨基酸序列:

[0137] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVG YVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVK AHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQ RMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR SWTAADMAAQTTK HKWEAAHVAEQ LRAYLEGTCVEW LRRYLENGKETLQ RTDAPKTHMTHH AVSDHEATLRCW ALSFYPAEITLTWQRD GEDQTQDTELVET RPAGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHVQHEGLPK PLTLRWEP (SEQ ID NO:19)。

[0138] 在一些情况下,HLA I类重链多肽包含氨基酸序列:

[0139] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVG YVDDTQFVRFDS DAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR KVK AHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQ RMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR SWTAADMAAQTTK HKWEAAHVAEQ LRAYLEGTCVEW LRRYLENGKETLQ RTDAPKTHMTHH AVSDHEATLRCW ALSFYPAEITLTWQRD GEDQTQDTELVET RCPGDGT FQKWA AVVVPSGQEQR YTCHVQHEGLPK PLTLRWEP (SEQ ID NO:20)。

[0140] 在一些情况下,所述 β 2M多肽包含以下氨基酸序列:

[0141] IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTLSP KIVKWDRDM (SEQ ID NO:42); 并且本公开的多聚体多肽的HLA I类重链多肽包含以下氨基酸序列:

[0142] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVK AHSQTHRVDLGLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTK HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRD GEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:21), 其中加下划线且呈粗体的Cys残基在所述多聚体多肽中与彼此形成二硫键。

[0143] 免疫调节多肽

[0144] 本公开的多聚体多肽包含如上所述的变体PD-L1多肽。因此, 本公开的多聚体多肽包含本公开的多聚体多肽的第一多肽或第二多肽中存在的变体PD-L1多肽。

[0145] D26取代

[0146] 在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸, 例如, 其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu、Ile或Arg。在一些情况下, 本公开的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Ala。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Gly。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Val。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Leu。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Ile。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是Arg。在一些情况下, 与包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽的结合亲和力相比, 本公

开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出降低约40%至约60%的结合亲和力;并且保留包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2B或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0147] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在D26处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在D8处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸26可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu或Ile而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala、Gly、Val、Leu、Ile或Arg而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ala而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Val而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Leu而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Gly而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Ile而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸26是Arg而不是Asp。

[0148] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在D8处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸8不是天冬氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸8可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ala、Gly、Val、Leu或Ile而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ala、Gly、Val、Leu、Ile或Arg而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ala而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Val而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Leu而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Gly而不是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变

体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Ile。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸8是Arg而不是Asp。

[0149] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2D中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2E中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2F中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2G中描绘的氨基酸序列。

[0150] T37取代

[0151] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Lys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨

氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Leu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约15%至约35%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约70%至约90%的结合亲和力)。

[0152] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在T37处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在T19处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸37可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu或Ile而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Arg而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是His而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Gly而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ala而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Val而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Leu而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸37是Ile而不是Thr。

[0153] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在T19处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸19不是苏氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、

Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu或Ile而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Arg、His或Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Arg而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Lys而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是His而不是19。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Gly而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Ala而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Val而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Leu而不是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸19是Ile而不是Thr。

[0154] I54取代

[0155] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Glu、Arg或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽

中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图2B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约70%至约100%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0156] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除缬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸54是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Glu、Arg或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序

列,其中氨基酸54是Leu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2A中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3A中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2A中列出(或SEQ ID NO:1中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约70%至约100%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图2A中或SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3C中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0157] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在I54处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在I36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Arg或Asp而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg而不是Ile。

[0158] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,在V54处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,在V36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开

的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala、Gly、Leu、Glu、Arg或Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu或Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Ala而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Leu而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Gly而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Glu而不是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2A中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg而不是Val。

[0159] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在Ile-36处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸36不是异亮氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除异亮氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Ala、Gly、Leu、Arg或Asp而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Ala而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Leu而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Gly而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Asp而不是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是Arg而不是Ile。

[0160] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在V36处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,其中氨基酸36是除缬氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸36可以是Gly、Ala、Leu、

Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是除异亮氨酸或缬氨酸以外的任何氨基酸；例如，氨基酸36可以是Gly、Ala、Leu、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Val。在一些情况下，本公开的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Glu或Asp而不是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Ala而不是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Leu而不是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Gly而不是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Asp而不是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Glu而不是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列，其中氨基酸36是Arg而不是Val。

[0161] 在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2H中描绘的氨基酸序列。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2I中描绘的氨基酸序列。

[0162] Q66取代

[0163] 在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸66是除谷氨酰胺以外的氨基酸，例如，其中氨基酸66是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸66是Glu或Asp。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸66是Glu。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸66是Asp。在一些情况下，本公开的多聚体多肽对PD-1（例如，对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽）表现出由包含含有图2B中列出（或SEQ ID NO:2中列出）的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约80%至约100%；并且与包含野生型PD-L1多肽（例如，包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽）的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽（例如，包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽）的结合亲和力相比，对B7-1表现出降低的结合亲和力（例如，对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力）。

[0164] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在Q66处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在Q48处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是除谷氨酰胺以外的任何氨基酸;例如,氨基酸66可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Ala而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Leu而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Gly而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸66是Glu而不是Gln。

[0165] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在Q48处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸48不是谷氨酰胺。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是除谷氨酰胺以外的任何氨基酸;例如,氨基酸48可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Ala、Gly、Leu、Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Glu或Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Ala而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Leu而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Gly而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Asp而不是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸48是Glu而不是Gln。

[0166] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2J中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2K中描绘的氨基酸序列。

[0167] E72取代

[0168] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少

98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是除谷氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸72是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp、Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Lys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约30%至约60%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约40%至约90%的结合亲和力)。

[0169] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在E72处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在E54处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是除谷氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸72可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Asp、Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Arg而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸72是His而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序

列,其中氨基酸72是Asp而不是Glu。

[0170] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在E54处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸54不是谷氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是除谷氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸54可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp、Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg、His或Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Arg而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Lys而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是His而不是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸54是Asp而不是Glu。

[0171] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2L中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2M中描绘的氨基酸序列。

[0172] Y56

[0173] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是Arg、His或Lys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是Ala、Asp或Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其

中氨基酸56是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约50%至约100%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约60%至约95%的结合亲和力)。

[0174] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在Y56处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在Y38处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸56可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是Ala、Val、Gly、Leu或Ile而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是Arg、His或Lys而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是Asp或Glu而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是Arg而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是Asp而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸56是Ala而不是Tyr。

[0175] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在Y38处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸38不是酪氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸38是除酪氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸38可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸38是Arg、His或Lys而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸38是Asp或Glu而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸38是Ala、Gly、Val、Leu或Ile而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出

的氨基酸序列,其中氨基酸38是Arg而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸38是Ala而不是Tyr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸38是Asp而不是Tyr。

[0176] G119

[0177] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是Arg、His或Lys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约20%至约50%或约50%至100%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约60%至约95%的结合亲和力)。

[0178] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在G119处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在G101处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸119可以是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开

的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是Arg、His或Lys而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是Asp或Glu而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是Arg而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是Asp而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸119是Ala而不是Gly。

[0179] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在G101处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸101不是甘氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是除甘氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸101可以是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是Arg、His或Lys而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是Asp或Glu而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu或Ile而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是Arg而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是Ala而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸101是Asp而不是Gly。

[0180] G120

[0181] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸120是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是Ala、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是Arg、His或Lys。在一些情况下,本公开的多

聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸120是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽对PD-1(例如,对包含图3B中描绘的氨基酸序列的PD-1多肽)表现出由包含含有图2B中列出(或SEQ ID NO:2中列出)的氨基酸序列的PD-L1多肽的对照多聚体多肽对PD-1多肽表现出的结合亲和力的约20%至约50%或约50%至100%;并且与包含野生型PD-L1多肽(例如,包含图3B中或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽)的对照多聚体多肽对野生型B7-1多肽(例如,包含图3D中描绘的氨基酸序列的B7-1多肽)的结合亲和力相比,对B7-1表现出降低的结合亲和力(例如,对B7-1表现出降低约60%至约95%的结合亲和力)。

[0182] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,在G120处具有氨基酸取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,在G102处具有氨基酸取代。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是除甘氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸120可以是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是Ala、Val、Leu或Ile而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是Arg、His或Lys而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是Asp或Glu而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是Arg而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是Asp而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中列出的氨基酸序列,其中氨基酸120是Ala而不是Gly。

[0183] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,在G102处具有氨基酸取代;即,其中氨基酸102不是甘氨酸。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸102是除甘氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸101可以是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸102是Arg、His或Lys而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,

其中氨基酸102是Asp或Glu而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸102是Ala、Val、Leu或Ile而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸102是Arg而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸102是Ala而不是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中氨基酸102是Asp而不是Gly。

[0184] 多个变体PD-L1免疫调节结构域

[0185] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含单一变体PD-L1免疫调节多肽。

[0186] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含两种变体PD-L1免疫调节多肽。在一些情况下,所述两种变体PD-L1免疫调节多肽在多肽链中串联。在一些情况下,所述两种变体PD-L1免疫调节多肽位于单独的多肽链中。在一些情况下,所述两种变体PD-L1免疫调节多肽位于多聚体多肽的单独多肽链中。在一些情况下,所述两种变体PD-L1多肽具有彼此相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述两种变体PD-L1多肽具有不同的氨基酸序列(例如,两者彼此因至少一个氨基酸而不同)。

[0187] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含三种变体PD-L1免疫调节多肽。在一些情况下,所述三种变体PD-L1免疫调节多肽在多肽链中串联。在一些情况下,三种变体PD-L1免疫调节多肽中的一种位于多聚体多肽的与另外两种变体PD-L1免疫调节多肽分开的多肽链上。在一些情况下,所述三种变体PD-L1多肽具有彼此相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述三种变体PD-L1多肽中的每种具有不同的氨基酸序列(例如,各自与彼此因至少一个氨基酸而不同)。

[0188] 支架多肽

[0189] 本公开的T细胞调节性多聚体多肽包含Fc多肽或另一种合适的支架多肽。

[0190] 合适的支架多肽包括基于抗体的支架多肽和基于非抗体的支架。基于非抗体的支架包括例如,白蛋白、XTEN(延伸的重组)多肽、转铁蛋白、Fc受体多肽、弹性蛋白样多肽(参见例如,Hassounh等人(2012) *Methods Enzymol.* 502:215;例如,包含(Val-Pro-Gly-X-Gly)的五肽重复单元的多肽,其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸)、白蛋白结合多肽、丝状多肽(参见例如,Valluzzi等人(2002) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:165)、丝-弹性蛋白样多肽(SELP;参见例如,Megeed等人(2002) *Adv Drug Deliv Rev.* 54:1075)等。合适的XTEN多肽包括例如在WO 2009/023270、WO 2010/091122、WO 2007/103515、US 2010/0189682和US 2009/0092582中公开的那些;还参见Schellenberger等人(2009) *Nat Biotechnol.* 27:1186)。合适的白蛋白多肽包括例如人血清白蛋白。

[0191] 在一些情况下,合适的支架多肽将是延长半衰期的多肽。因此,在一些情况下,与缺乏支架多肽的对照多聚体多肽相比,合适的支架多肽增加多聚体多肽的体内半衰期(例如,血清半衰期)。例如,在一些情况下,与缺乏支架多肽的对照多聚体多肽相比,所述支架多肽使多聚体多肽的体内半衰期(例如,血清半衰期)增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约100倍或超过100倍。作为一个实例,在一些情况下,与缺乏Fc多肽的对照多聚体多肽相比,所述Fc多肽使多聚体多肽的体内半衰期(例如,血清半衰期)增加

至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约100倍或超过100倍。

[0192] Fc多肽

[0193] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽的第一和/或第二多肽链包含Fc多肽。本公开的多聚体多肽的Fc多肽可以是人IgG1Fc、人IgG2Fc、人IgG3Fc、人IgG4Fc等。在一些情况下,所述Fc多肽包含与图4A-4C中描绘的Fc区的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述Fc区包含与图4A中描绘的人IgG1Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述Fc区包含与图4A中描绘的人IgG1Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;并且包含N77的取代;例如,所述Fc多肽包含N77A取代。在一些情况下,所述Fc多肽包含与图4A中描绘的人IgG2Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,所述Fc多肽包含与图4A中描绘的人IgG2Fc多肽的氨基酸99-325具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述Fc多肽包含与图4A中描绘的人IgG3Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,所述Fc多肽包含与图4A中描绘的人IgG3Fc多肽的氨基酸19-246具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述Fc多肽包含与图4B中描绘的人IgM Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,所述Fc多肽包含与图4B中描绘的人IgM Fc多肽的氨基酸1-276具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述Fc多肽包含与图4C中描绘的人IgA Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,所述Fc多肽包含与图4C中描绘的人IgA Fc多肽的氨基酸1-234具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0194] 另外的多肽

[0195] 本公开的多聚体多肽的多肽链可包含一种或多种除上述那些以外的多肽。合适的另外多肽包括表位标签和亲和结构域。所述一种或多种另外的多肽可包含在本公开的多聚体多肽的多肽链的N-末端,本公开的多聚体多肽的多肽链的C-末端,或在本公开的多聚体多肽的多肽链内部。

[0196] 表位标签

[0197] 合适的表位标签包括但不限于,血凝素(HA;例如,YPYDVPDYA(SEQ ID NO:22);

FLAG (例如, DYKDDDDK (SEQ ID NO:23); c-myc (例如, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:24) 等。

[0198] 亲和结构域

[0199] 亲和结构域包括可与结合配偶体相互作用的肽序列, 例如, 如固定在固体载体上的肽序列, 其适用于鉴定或纯化。当与表达的蛋白质融合时, 编码多个连续单一氨基酸 (如组氨酸) 的DNA序列可通过与树脂柱 (如镍琼脂糖凝胶) 的高亲和力结合用于重组蛋白质的一步纯化。示例性亲和结构域包括His5 (HHHHH) (SEQ ID NO:25); HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO:26); C-myc (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:27); Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:28); StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:29); 血凝素, 例如, HA标签 (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO:30); 谷胱甘肽-S-转移酶 (GST); 硫氧还蛋白; 纤维素结合结构域; RYIRS (SEQ ID NO:31); Phe-His-His-Thr (SEQ ID NO:32); 壳多糖结合结构域; S-肽; T7肽; SH2结构域; C-端RNA标签, WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO:33); 金属结合结构域, 例如, 锌结合结构域或钙结合结构域, 如来自钙结合蛋白的那些, 例如, 钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调控蛋白、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙蛋白、聚集蛋白、钙牵蛋白、钙蛋白酶大亚基、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K以及钙网膜蛋白; 内含肽; 生物素; 链霉抗生物素蛋白; MyoD; Id; 亮氨酸拉链序列; 以及麦芽糖结合蛋白。

[0200] 示例性多聚体多肽

[0201] 下文描述本公开的示例性多聚体多肽。

[0202] D26取代

[0203] 在一些情况下, 本公开的多聚体多肽包含: a) 第一多肽, 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含: i) 表位; ii) β 2M多肽; 和iii) 变体PD-L1多肽, 所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸, 例如, 其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu; 例如, 其中氨基酸26是Ala或Arg; 或变体PD-L1多肽, 所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的氨基酸, 例如, 其中氨基酸8是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu; 例如, 其中氨基酸8是Ala或Arg; 以及b) 第二多肽, 所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含: i) I类MHC重链; 和ii) Fc多肽。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽包含: a) 第一多肽, 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含: i) 表位; 和ii) β 2M多肽; 以及b) 第二多肽, 所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含: i) 变体PD-L1多肽, 所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸, 例如, 其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu; 例如, 其中氨基酸26是Ala或Arg; 或变体PD-L1多肽, 所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的氨基酸, 例如, 其中氨基酸8是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、

Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸8是Ala或Arg；和iii) Fc多肽。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含：a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：i) 表位；ii) β 2M多肽；iii) 本公开的第一变体PD-L1多肽；iv) 本公开的第二变体PD-L1多肽；和v) 本公开的第三变体PD-L1多肽；以及b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：i) I类MHC重链；和ii) Fc多肽。在一些情况下，所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含：i) 与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸，例如，其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸26是Ala或Arg；或ii) 与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的氨基酸，例如，其中氨基酸8是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸8是Ala或Arg。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含：a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：i) 表位；和ii) β 2M多肽；以及b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：i) 本公开的第一变体PD-L1多肽；ii) 本公开的第二变体PD-L1多肽；和iii) 本公开的第三变体PD-L1多肽；iv) I类MHC重链；和v) Fc多肽。在一些情况下，所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含：i) 与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸，例如，其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸26是Ala或Arg；或ii) 与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的氨基酸，例如，其中氨基酸8是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸8是Ala或Arg。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含：a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：i) 表位；和ii) β 2M多肽；以及b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：i) 本公开的第一变体PD-L1多肽；ii) 接头；iii) 本公开的第二变体PD-L1多肽；iv) 接头；v) 本公开的第三变体PD-L1多肽；vi) I类MHC重链；和vii) Fc多肽。在一些情况下，所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含：i) 与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸26是除天冬氨酸以外的氨基酸，例如，其中氨基酸26是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸26是Ala或Arg；或ii) 与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸8是除天冬氨酸以外的氨基酸，例如，其中氨基酸8是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；例如，其中氨基酸8是Ala或Arg。在一些情况下，所述接头包含(GSSSS) n 序列，其中 n 是1、2、3、4或5。在一些情况下， n 是4。在一些情况下， n 是5。

[0204] T37取代

[0205] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii) β 2M多肽;和iii) 变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;或变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) β 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;或变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;和iii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii) β 2M多肽;iii) 本公开的第一变体PD-L1多肽;iv) 本公开的第二变体PD-L1多肽;和v) 本公开的第三变体PD-L1多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i) 与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;或ii) 与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) β 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依

次包含:i)本公开的第一变体PD-L1多肽;ii)本公开的第二变体PD-L1多肽;和iii)本公开的第三变体PD-L1多肽;iv)I类MHC重链;和v)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i)与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;或ii)与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii) β 2M多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)本公开的第一变体PD-L1多肽;ii)接头;iii)本公开的第二变体PD-L1多肽;iv)接头;v)本公开的第三变体PD-L1多肽;vi)I类MHC重链;和vii)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i)与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸37是除苏氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸37是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His;或ii)与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸19是除苏氨酸以外的任何氨基酸;例如,氨基酸19可以是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;例如,其中氨基酸19是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Arg、Lys或His。在一些情况下,所述接头包含(GSSSS) n 序列,其中 n 是1、2、3、4或5。在一些情况下, n 是4。在一些情况下, n 是5。

[0206] Y56取代

[0207] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;ii) β 2M多肽;和iii)变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸56是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸56是Asp或Glu,或其中氨基酸56是Arg、His或Lys;或变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸38是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸38是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸38是Asp或Glu,或其中氨基酸38是Arg、His或Lys;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)I类MHC重链;和ii)Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚

体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) β 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸56是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸56是Asp或Glu,或其中氨基酸56是Arg、His或Lys;或变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸38是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸38是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸38是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸38是Asp或Glu,或其中氨基酸38是Arg、His或Lys;和iii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii) β 2M多肽;iii) 本公开的第一变体PD-L1多肽;iv) 本公开的第二变体PD-L1多肽;和v) 本公开的第三变体PD-L1多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i) 与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸56是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸56是Asp或Glu,或其中氨基酸56是Arg、His或Lys;或ii) 变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸38是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸38是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸38是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸38是Asp或Glu,或其中氨基酸38是Arg、His或Lys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) β 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 本公开的第一变体PD-L1多肽;ii) 本公开的第二变体PD-L1多肽;和iii) 本公开的第三变体PD-L1多肽;iv) I类MHC重链;和v) Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i) 与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸56是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸56是Asp或Glu,或其中氨基酸56是Arg、His或Lys;或ii) 与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸38是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸38是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸38是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,

其中氨基酸38是Asp或Glu,或其中氨基酸38是Arg、His或Lys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)β2M多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)本公开的第一变体PD-L1多肽;ii)接头;iii)本公开的第二变体PD-L1多肽;iv)接头;v)本公开的第三变体PD-L1多肽;vi)I类MHC重链;和vii)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i)与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸56是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸56是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸56是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸56是Asp或Glu,或其中氨基酸56是Arg、His或Lys;或ii)与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸38是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸38是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸38是Ala、Gly、Val、Leu或Ile,其中氨基酸38是Asp或Glu,或其中氨基酸38是Arg、His或Lys。在一些情况下,所述接头包含(GSSSS)_n序列,其中n是1、2、3、4或5。在一些情况下,n是4。在一些情况下,n是5。

[0208] G119取代

[0209] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;ii)β2M多肽;和iii)变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸119是Arg、His或Lys,或其中氨基酸119是Glu或Asp;或变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸101是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸101是Arg、His或Lys,或其中氨基酸101是Glu或Asp;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)I类MHC重链;和ii)Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)β2M多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸119是Arg、His或Lys,或其中氨基酸119是Glu或Asp;或变体PD-L1多肽,所述变体PD-L1多肽包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基

酸序列,其中氨基酸101是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸101是Arg、His或Lys,或其中氨基酸101是Glu或Asp;和iii)Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;ii)β2M多肽;iii)本公开的第一变体PD-L1多肽;iv)本公开的第二变体PD-L1多肽;和v)本公开的第三变体PD-L1多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)I类MHC重链;和ii)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i)与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸119是Arg、His或Lys,或其中氨基酸119是Glu或Asp;或ii)与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸101是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸101是Arg、His或Lys,或其中氨基酸101是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)β2M多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)本公开的第一变体PD-L1多肽;ii)本公开的第二变体PD-L1多肽;和iii)本公开的第三变体PD-L1多肽;iv)I类MHC重链;和v)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i)与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸119是Arg、His或Lys,或其中氨基酸119是Glu或Asp;或ii)与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸101是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸101是Arg、His或Lys,或其中氨基酸101是Glu或Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)β2M多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)本公开的第一变体PD-L1多肽;ii)接头;iii)本公开的第二变体PD-L1多肽;iv)接头;v)本公开的第三变体PD-L1多肽;vi)I类MHC重链;和vii)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体PD-L1多肽各自包含:i)与图2B中描绘的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸119是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸119是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸119是Arg、

His或Lys,或其中氨基酸119是Glu或Asp;或ii)与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸101是除甘氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu,其中氨基酸101是Ala、Val、Leu或Ile,其中氨基酸101是Arg、His或Lys,或其中氨基酸101是Glu或Asp。在一些情况下,所述接头包含(GSSSS)_n序列,其中n是1、2、3、4或5。在一些情况下,n是4。在一些情况下,n是5。

[0210] 在任何上述实施方案中,所述多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽可包含如图10或图11中列出的氨基酸的取代。以下是实例。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的D26的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的D8的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的T37的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的T19的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的D49的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的D31的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的L53的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的L35的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的I54(小鼠PD-L1中的V54)的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的I36的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Y56的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Y38的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Y56的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Y38的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Q66的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Q48的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Q66的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Q48的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的E72的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的E54的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的M115(小鼠PD-L1的I115)的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的M97的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的I116的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的I98的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的G119的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的G101的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的G120的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的G102的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的G120的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的G102的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的A121的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的A103的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的D122的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的D104的取代。在一些情况下,本公开的多聚体

多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的Y123的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的Y105的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的K124的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的K106的取代。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体PD-L1多肽包含图2B中描绘的氨基酸序列的R125的取代;或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的K107的取代。

[0211] 核酸

[0212] 本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本公开的变体PD-L1多肽的核苷酸序列。本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本公开的PD-L1融合多肽的核苷酸序列。

[0213] 本公开提供了核酸,所述核酸包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的单独多肽链在单独的核酸中编码。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的所有多肽链都在单一核酸中编码。在一些情况下,第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列;第二核酸包含编码本公开多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列。在一些情况下,单一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列。

[0214] 编码多聚体多肽的单独多肽链的单独核酸

[0215] 本公开提供了核酸,所述核酸包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。如上所述,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的单独多肽链在单独的核酸中编码。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的单独多肽链的核苷酸序列与转录控制元件(例如启动子,如在真核细胞中有功能的启动子)可操作地连接,其中所述启动子可以是组成型启动子或诱导型启动子。因此,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽链的核苷酸序列,并且其中所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽链的核苷酸序列。

[0216] 本公开提供第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列,其中所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一种MHC多肽;和c)免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);并且其中所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列,其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)第二MHC多肽;和b) Ig Fc多肽。在上文描述了合适的T细胞表位、MHC多肽、免疫调节多肽和Ig Fc多肽。在一些情况下,编码第一和第二多肽的核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。在一些情况下,所述转录控制元件是在真核细胞中有功能的启动子。在一些情况下,所述核酸存在于单独的表达载体中。

[0217] 本公开提供第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列,其中所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);和b)第一MHC多肽;并且其中所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列,其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);b)第二MHC多肽;和c) Ig Fc多肽。在上文描述了合适的T细胞表位、MHC多肽、变体PD-L1免疫调节多肽和Ig Fc多肽。在一些情况下,编码第一和第二多肽的核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。在一些情况下,所述转录控制元件是在真核细胞中有功能的启动子。在一些情况下,所述核酸存在于单独的表达载体中。

[0218] 编码多聚体多肽中存在的两种或更多种多肽的核酸

[0219] 本公开提供了一种核酸,所述核酸包含至少编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列。在一些情况下,当本公开的多聚体多肽包含第一、第二和第三多肽时,所述核酸包含编码所述第一、第二和第三多肽的核苷酸序列。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包含插入在编码所述第一多肽的核苷酸序列与编码所述第二多肽的核苷酸序列之间的蛋白水解可裂解的接头。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包含插入在编码所述第一多肽的核苷酸序列与编码所述第二多肽的核苷酸序列之间的内部核糖体进入位点(IRES)。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包含插入在编码所述第一多肽的核苷酸序列与编码所述第二多肽的核苷酸序列之间的核糖体跳过信号(或顺式作用水解酶元件,CHYSEL)。下文描述了核酸的实例,其中蛋白水解可裂解的接头提供在编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列之间;在这些实施方案中的任一个中,可使用IRES或核糖体跳过信号来代替编码蛋白水解可裂解接头的核苷酸序列。

[0220] 在一些情况下,第一核酸(例如,重组表达载体、mRNA、病毒RNA等)包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽链的核苷酸序列;并且第二核酸(例如,重组表达载体、mRNA、病毒RNA等)包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽链的核苷酸序列。在一些情况下,编码第一多肽的核苷酸序列和编码第二多肽的第二核苷酸序列各自可操作地连接至转录控制元件,例如启动子,如在真核细胞中有功能的启动子,其中所述启动子可以是组成型启动子或诱导型启动子。

[0221] 本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一MHC多肽;c)免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);d)蛋白水解可裂解的接头;e)第二MHC多肽;以及f)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)第一前导肽;b)所述表位;c)所述第一MHC多肽;d)所述免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);e)所述蛋白水解可裂解的接头;f)第二前导肽;g)第二MHC多肽;以及h)所述Ig Fc多肽。本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位;b)第一MHC多肽;c)蛋白水解可裂解的接头;d)免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽);e)第二MHC多肽;以及f)Ig Fc多肽。在一些情况下,所述第一前导肽和所述第二前导肽是 β 2-M前导肽。在一些情况下,所述核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。在一些情况下,所述转录控制元件是在真核细胞中有功能的启动子。

[0222] 在上文描述了合适的MHC多肽。在一些情况下,所述第一MHC多肽是 β 2-微球蛋白多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC I类重链多肽。在一些情况下,所述 β 2-微球蛋白多肽包含与图6中描绘的氨基酸序列中的任一个具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述MHC I类重链多肽是HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K或HLA-L重链。在一些情况下,所述MHC I类重链多肽包含与图5A-5C之一中列出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC II类 α 链多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC II类 β 链多肽。

[0223] 在上文描述了合适的Fc多肽。在一些情况下,所述Ig Fc多肽是IgG1Fc多肽、IgG2Fc多肽、IgG3Fc多肽、IgG4Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。在一些情况下,所述Ig Fc多肽包含与图4A-4C中描绘的氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0224] 在上文描述了合适的变体PD-L1免疫调节多肽。

[0225] 在上文描述了合适的蛋白水解可裂解的接头。在一些情况下,所述蛋白水解可裂解的接头包含选自以下的氨基酸序列:a) LEVLFQGP (SEQ ID NO:34); b) ENLYTQS (SEQ ID NO:35); c) DDDDK (SEQ ID NO:36); d) LVPR (SEQ ID NO:37); 以及 e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:38)。

[0226] 在一些情况下,所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,以使得所述第一和第二Cys残基提供在所述接头与所述第二MHC多肽之间的二硫键联。在一些情况下,第一MHC多肽包含氨基酸取代以提供第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,以使得所述第一Cys残基和第二Cys残基提供在所述第一MHC多肽与所述第二MHC多肽之间的二硫键联。

[0227] 重组表达载体

[0228] 本公开提供了一种重组表达载体,所述重组表达载体包含本公开的核酸。在一些情况下,所述重组表达载体是非病毒载体。在一些实施方案中,所述重组表达载体是病毒构建体,例如重组腺伴随病毒构建体(参见,例如美国专利号7,078,387)、重组腺病毒构建体、重组慢病毒构建体、重组逆转录病毒构建体、非整合病毒载体等。

[0229] 合适的表达载体包括但不限于病毒载体(例如基于以下的病毒载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见,例如Li等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994;Borras等人,Gene Ther 6:515 524,1999;Li和Davidson,PNAS 92:7700 7704,1995;Sakamoto等人,H Gene Ther 5:1088 1097,1999;WO 94/12649;WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984以及WO 95/00655));腺伴随病毒(参见,例如Ali等人,Hum Gene Ther 9:81 86,1998;Flannery等人,PNAS 94:6916 6921,1997;Bennett等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863,1997;Jomary等人,Gene Ther 4:683 690, 1997;Rolling等人,Hum Gene Ther 10:641 648,1999;Ali等人,Hum Mol Genet 5:591 594,1996;Srivastava的WO 93/09239;Samulski等人,J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson等人,Virol. (1988) 166:154-165;以及Flotte等人,PNAS (1993) 90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒(参见,例如Miyoshi等,PNAS 94:10319 23, 1997;Takahashi等,J Virol 73:7812 7816,1999);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒和源自如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒的逆转录病毒的载体、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒以及乳腺肿瘤病毒)等。

[0230] 众多适合的表达载体为本领域技术人员已知并且许多为商业上可获得的。通过实例的方式对于真核宿主细胞提供以下载体:pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG以及pSVLSV40 (Pharmacia)。然而,可使用任何其他载体,只要所述载体与宿主细胞相容。

[0231] 取决于所使用的宿主/载体系统,可在表达载体中使用任何许多合适的转录和翻译控制元件,包括组成型和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等(参见,例如

Bitter等人(1987)Methods in Enzymology,153:516-544)。

[0232] 在一些实施方案中,编码靶向DNA的RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列可操作地连接至控制元件,例如转录控制元件,如启动子。转录控制元件可在真核细胞(例如,哺乳动物细胞)或原核细胞(例如,细菌或古细菌细胞)中起作用。在一些实施方案中,编码靶向DNA的RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列可操作地连接至允许编码靶向DNA的RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列在原核细胞和真核细胞中表达的多个控制元件。

[0233] 合适的真核启动子(在真核细胞中起作用的启动子)的非限制性实例包括来自巨细胞病毒(CMV)立即早期、单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶、早期和晚期SV40、逆转录病毒的长末端重复序列(LTR)以及小鼠金属硫蛋白-I的那些启动子。选择适当的载体和启动子在本领域普通技术人员的水平内。表达载体还可含有用于翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体还可包括用于扩增表达的适当序列。

[0234] 遗传修饰的宿主细胞

[0235] 本公开提供了一种遗传修饰的宿主细胞,其中所述宿主细胞用本公开的核酸进行遗传修饰。

[0236] 合适的宿主细胞包括真核细胞,如酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物细胞系的细胞。适合的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如,美国典型培养物保藏所(ATCC)号CCL-2)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,ATCC号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC号CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC号CCL10)、PC12细胞(ATCC号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC号CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC号CRL1573)、HLHepG2细胞等。

[0237] 在一些情况下,所述宿主细胞是已经遗传修饰以使得其不合成内源性MHC B2-M的哺乳动物细胞。

[0238] 产生多聚体多肽的方法

[0239] 本公开提供了产生本公开的多聚体多肽的方法。所述方法通常涉及在培养基中培养用包含编码多聚体多肽的核苷酸序列的重组表达载体进行遗传修饰的宿主细胞;以及从所述遗传修饰的宿主细胞和/或所述培养基中分离所述多聚体多肽。用包含编码多聚体多肽的核苷酸序列的重组表达载体进行遗传修饰的宿主细胞也称为“表达宿主”。如上所述,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的单独多肽链在单独的重组表达载体中编码。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的所有多肽链都在单一重组表达载体中编码。

[0240] 可使用标准蛋白质纯化方法来从表达宿主细胞(例如,从表达宿主细胞的溶解产物)和/或培养所述宿主细胞的培养基中分离多聚体多肽。

[0241] 例如,可由表达宿主制备溶解产物,并且使用高效液相色谱法(HPLC)、排阻色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法或其他纯化技术来纯化溶解产物。或者,当多聚体多肽从表达宿主细胞分泌到培养基中时,可使用HPLC、排阻色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法或其他纯化技术从培养基中纯化多聚体多肽。在一些情况下,所使用的组合物包含相对于与产物制备及其纯化的方法相关的污染物至少80重量%的所需产物、至少约85重量%、至少约95重量%或至少约99.5重量%。所述百分比可基于总蛋白质。

[0242] 在一些情况下,例如,在多聚体多肽包含亲和标签的情况下,可使用所述亲和标签的固定化结合配偶体来纯化多聚体多肽。

[0243] 组合物

[0244] 本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的变体PD-L1多肽。本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的多聚体多肽。本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的核酸或重组表达载体。

[0245] 包含多聚体多肽的组合物

[0246] 本公开的组合物可包含除了本公开的多聚体多肽以外的以下中的一种或多种:盐,例如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等;缓冲剂,例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等;增溶剂;去污剂,例如非离子型去污剂如吐温-20等;蛋白酶抑制剂;甘油等。

[0247] 所述组合物可包含药学上可接受的赋形剂,各种药学上可接受的赋形剂是本领域已知的并且无需在本文中详细讨论。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多种出版物中,所述出版物包括例如“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,第19版(1995),或最新版本,Mack Publishing Co;A.Gennaro(2000)“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等人编,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;以及Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等人编,第3版Amer.Pharmaceutical Assoc。

[0248] 药物组合物可包含本公开的多聚体多肽和药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,主题药物组合物将适于施用至受试者,例如将是无菌的。例如,在一些实施方案中,例如当主题药物组合物为无菌的并且不含可检测的热原和/或其他毒素时,所述组合物将适于施用至人受试者。

[0249] 蛋白质组合物可包含其他组分,如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、镁、碳酸盐等。所述组合物可含有模拟生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠、盐酸盐、硫酸盐、溶剂化物(例如,混合离子盐、水、有机物)、水合物(例如,水)等。

[0250] 例如,组合物可包括水溶液、粉末形式、颗粒、片剂、丸剂、栓剂、胶囊、悬浮液、喷雾剂等。可根据下文描述的各种施用途径来配制组合物。

[0251] 当本公开的多聚体多肽作为可注射剂(例如皮下、腹膜内、肌肉内和/或静脉内)直接施用到组织中时,制剂可作为可立即使用的剂型提供,或者作为非水性形式(例如可重构的储存稳定的粉末)或水性形式(如由药学上可接受的载体和赋形剂组成的液体)提供。还可提供含蛋白质的制剂,以便在施用后增强主题蛋白质的血清半衰期。例如,蛋白质可以脂质体制剂形式提供,制备成胶体,或用于延长血清半衰期的其他常规技术。多种方法可用于制备脂质体,如在例如Szoka等人1980Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467、美国专利号4,235,871、4,501,728和4,837,028中所描述。所述制剂也可以控释或缓释形式提供。

[0252] 适于肠胃外施用的制剂的其他实例包括等渗无菌注射溶液、抗氧化剂、抑菌剂和

使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质、悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂以及防腐剂。例如,主题药物组合物可存在于容器,例如无菌容器,如注射器中。所述制剂可以单剂量或多剂量密封容器,如安瓿和小瓶形式呈现,并且可储存于冷冻干燥(冻干)的条件下,仅需在使用前即刻添加无菌液体赋形剂(例如水)以供注射。临时注射溶液和悬浮液可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0253] 制剂中本公开的多聚体多肽的浓度可广泛变化(例如,从小于约0.1重量%,通常在或至少约2重量%至多至20重量%至50重量%或更多)并且将通常根据所选择的特定施用方式和患者的需要,主要基于流体体积、粘度和基于患者的因素来选择。

[0254] 本公开提供了一种容器,所述容器包括本公开的组合物,例如液体组合物。所述容器可以是例如注射器、安瓿等。在一些情况下,所述容器是无菌的。在一些情况下,所述容器和组合物两者均是无菌的。

[0255] 本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的变体PD-L1多肽。组合物可包含:a)本公开的变体PD-L1多肽;和b)赋形剂,如上文针对多聚体多肽所描述。在一些情况下,所述赋形剂是药学上可接受的赋形剂。

[0256] 包含核酸或重组表达载体的组合物

[0257] 本公开提供了组合物,例如药物组合物,所述组合物包含本公开的核酸或重组表达载体。多种多样的药学上可接受的赋形剂在本领域中是已知的且无需在本文中详细论述。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多种出版物中,所述出版物包括例如A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 第20版, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel 等编, 第7版, Lippincott, Williams, & Wilkins; 以及 Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe 等编, 第3版 Amer. Pharmaceutical Assoc.

[0258] 本公开的组合物可包含:a)主题核酸或重组表达载体;和b)以下中的一种或多种:缓冲剂、表面活性剂、抗氧化剂、亲水性聚合物、糊精、螯合剂、悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、抑菌剂、润湿剂以及防腐剂。合适的缓冲剂包括但不限于(如N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、双(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-Tris)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'3-丙磺酸(EPPS或HEPPS)、甘氨酸甘氨酸、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、哌嗪-N,N'-双(2-乙烷-磺酸)(PIPES)、碳酸氢钠、3-(N-三(羟甲基)-甲基-氨基)-2-羟基-丙磺酸(TAPSO)、(N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(TES)、N-三(羟甲基)甲基-甘氨酸(Tricine)、三(羟甲基)-氨基甲烷(Tris)等)。合适的盐包括例如,NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等。

[0259] 本公开的药物制剂可包含约0.001%至约90%(w/w)的量的本公开的核酸或重组表达载体。在下文的制剂描述中,“主题核酸或重组表达载体”应理解为包括本公开的核酸或重组表达载体。例如,在一些实施方案中,主题制剂包含本公开的核酸或重组表达载体。

[0260] 可将主题核酸或重组表达载体与其他化合物或化合物的混合物混合、包封、缀合或以其他方式缔合;此类化合物可包括例如脂质体或受体靶向分子。主题核酸或重组表达载体可与一种或多种有助于摄取、分布和/或吸收的组分组合在制剂中。

[0261] 主题核酸或重组表达载体组合物可被配制成任何许多可能的剂型,如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂以及灌肠剂。主题核酸或重组表达载体组合

物也可被配制成水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液还可包含增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。所述悬浮液还可含有稳定剂。

[0262] 包含主题核酸或重组表达载体的制剂可以是脂质体制剂。如本文所用,术语“脂质体”是指由以一个或多个球形双层形式排列的两性脂质构成的囊泡。脂质体是具有由亲脂性材料形成的膜和含有所欲递送的组合物水性内部的单层或多层囊泡。阳离子脂质体是可与带负电荷的DNA分子相互作用以形成稳定复合物的带正电荷的脂质体。认为pH值敏感性或带负电荷的脂质体囊封DNA而非与其复合。阳离子脂质体和非阳离子脂质体两者均可用于递送主题核酸或重组表达载体。

[0263] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体,其是如本文所用的指包含一种或多种专门化脂质的脂质体的术语,当并入脂质体中时所述脂质导致相对于缺少此类专门化脂质的脂质体而言的增加的循环寿命。空间稳定脂质体的实例是脂质体的囊泡形成脂质部分中的一部分包含一种或多种糖脂或者利用一种或多种亲水性聚合物(如聚乙二醇(PEG)部分)衍生化的脂质体。脂质体及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中,所述美国专利以引用的方式整体并入本文。

[0264] 本公开的制剂和组合物还可包含表面活性剂。表面活性剂在药品、制剂和乳液中的使用在本领域中是熟知的。表面活性剂及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中。

[0265] 在一个实施方案中,包含各种渗透增强剂以实现核酸的有效递送。除帮助非亲脂性药物扩散穿过细胞膜外,渗透增强剂还增强亲脂性药物的渗透性。渗透增强剂可归类为属于以下物种广泛类别中的一种:即,表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂。渗透增强剂及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中,所述美国专利以引用的方式整体并入本文。

[0266] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、于水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或小片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂可为需要的。合适的口服制剂包括其中主题反义核酸与一种或多种渗透增强剂、表面活性剂和螯合剂结合施用的那些。合适的表面活性剂包括但不限于脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。合适的胆汁酸/盐和脂肪酸及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中。同样合适的是渗透增强剂(例如脂肪酸/盐)与胆汁酸/盐组合的组合。一种示例性的合适组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。其他渗透增强剂包括但不限于聚氧乙烯-9-月桂基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。合适的渗透增强剂还包括丙二醇、二甲亚砜、三乙醇胺、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、2-吡咯烷酮及其衍生物、四氢糠醇以及AZONE™。

[0267] 治疗方法

[0268] 本发明提供了一种选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括向所述个体施用可有效选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性的量的本公开的多聚体多肽或一种或多种编码所述多聚体多肽的核酸。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有此需要的个体施用一种或多种重组表达载体,所述重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用一种或多种mRNA分子,所述mRNA分子包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。

在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用本公开的多聚体多肽。

[0269] 本公开提供了一种选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括向个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种核酸(例如,表达载体;mRNA等),所述核酸包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列,其中所述多聚体多肽选择性地调节所述个体中的表位特异性T细胞的活性。选择性地调节表位特异性T细胞的活性可治疗个体的疾病或病症。因此,本公开提供了一种治疗方法,所述治疗方法包括向有需要的个体施用有效量的本公开的多聚体多肽。

[0270] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽)是抑制性多肽,并且包含变体PD-L1多肽的多聚体多肽抑制表位特异性T细胞的活性。在一些情况下,所述表位是自身表位,并且所述多聚体多肽选择性地抑制对所述自身表位具有特异性的T细胞的活性。

[0271] 本公开提供了一种治疗个体中的自身免疫病症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,其中所述多聚体多肽包含为自身表位的T细胞表位,并且其中所述多聚体多肽包含本公开的变体PD-L1多肽。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的自身反应性T细胞的数量和/或活性相比,使自身反应性T细胞的数量和/或活性减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时减少所述个体中的Th2细胞因子的产生的量。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,改善所述个体中与自身免疫疾病相关的一种或多种症状的量。

[0272] 适合于用本公开的方法治疗的自身免疫性病症包括但不限于,斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、肾上腺自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST综合征(也称为系统性硬化症的局限型皮肤形式)、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、格林-巴利、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、肠易激疾病(IBD)、IgA神经病、幼年型关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔氏病、混合性结缔组织病、多发性硬化症、1型糖尿病、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病性关节炎、雷诺氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、类肉状瘤病、硬皮病、斯耶格伦综合征、僵人综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如皮炎型疱疹性血管炎、白癜风和韦格纳氏肉芽肿。

[0273] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的免疫调节多肽(例如,本公开的变体PD-L1多肽)是抑制性多肽,并且包含变体PD-L1多肽的多聚体多肽抑制表位特异性T细胞的活性。在一些情况下,所述表位是同种异体移植物上的表位(例如,皮肤同种异体移植物,肝

同种异体移植物,肾同种异体移植物,心脏同种异体移植物,骨同种异体移植物,软骨同种异体移植物,肺同种异体移植物,细胞同种异体移植物(例如,骨髓同种异体移植物)等);并且所述多聚体多肽选择性地抑制对同种异体移植物上存在的抗原具有特异性的T细胞的活性。

[0274] 本公开提供了一种抑制个体中的同种异体移植物排斥的方法,所述方法包括向个体(例如,同种异体移植物的接受者的个体;或即将成为同种异体移植物接受者的个体)施用有效量的本公开的多聚体多肽,或一种或多种包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,其中所述多聚体多肽包含T细胞表位,所述T细胞表位是同种异体移植物上存在的表位,并且其中所述多聚体多肽包含本公开的变体PD-L1多肽。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的同种异体反应性(同种异体移植物反应性)T细胞的数量和/或活性相比,使同种异体反应性(同种异体移植物反应性)T细胞的数量和/或活性减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与不存在施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的同种异体移植物存活时间相比,使所述个体中的同种异体移植物的存活时间增加;例如所述个体中的同种异体移植物的存活时间增加至少25%、至少50%、至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍或至少100倍的量。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,改善所述个体中与同种异体移植物排斥相关的一种或多种症状的量。

[0275] 如上所述,在一些情况下,在实施主题治疗方法中,将本公开的多聚体多肽作为多肽本身施用至有需要的个体。在其他情况下,在实施主题治疗方法中,将一种或多种包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列的核酸施用至有需要的个体。因此,在其他情况下,将本公开的一种或多种核酸,例如本公开的一种或多种重组表达载体施用至有需要的个体。

[0276] 制剂

[0277] 在上文描述了合适的制剂,其中合适的制剂包含药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)本公开的多聚体多肽;和b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)核酸,所述核酸包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列;和b)药学上可接受的赋形剂;在一些情况下,所述核酸是mRNA。在一些情况下,合适的制剂包含:a)第一核酸,所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列;b)第二核酸,所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列;以及c)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)重组表达载体,所述重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列;和b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)第一重组表达载体,所述第一重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列;b)第二重组表达载体,所述第二重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列;以及c)药学上可接受的赋形剂。

[0278] 在上文描述了合适的药学上可接受的赋形剂。

[0279] 剂量

[0280] 合适的剂量可由主治医师或其他合格的医务人员基于各种临床因素而确定。如在

医学领域中众所周知,用于任一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者的大小、体表面积、年龄、待施用的具体多肽或核酸、患者的性别、施用时间和途径、一般健康状况以及目前正在施用的其他药物。本公开的多聚体多肽可以每个剂量介于1ng/kg体重与20mg/kg体重之间,例如介于0.1mg/kg体重至10mg/kg体重之间,例如介于0.5mg/kg体重至5mg/kg体重之间的量施用;然而,设想低于或高于此示例性范围的剂量,特别是考虑到上述因素。如果方案是连续输注,那么其也可在每分钟每千克体重1 μ g至10mg的范围内。

[0281] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽的合适剂量是0.01 μ g至100g/kg体重、0.1 μ g至10g/kg体重、1 μ g至1g/kg体重、10 μ g至100mg/kg体重、100 μ g至10mg/kg体重或100 μ g至1mg/kg体重。本领域的普通技术人员可基于所测量的施用的药剂在体液或组织中的滞留时间和浓度容易地估算出给药的重复率。在成功治疗后,可能希望使患者进行维持疗法以预防疾病状态的复发,其中本公开的多聚体多肽以维持剂量施用,所述维持剂量在0.01 μ g至100g/kg体重、0.1 μ g至10g/kg体重、1 μ g至1g/kg体重、10 μ g至100mg/kg体重、100 μ g至10mg/kg体重或100 μ g至1mg/kg体重的范围内。

[0282] 技术人员将易于了解剂量水平可随特定多聚体多肽、症状的严重程度和受试者对副作用的敏感性而变。给定化合物的优选剂量可由本领域的技术人员通过多种方式容易地确定。

[0283] 在一些实施方案中,施用多剂量的本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的施用频率可根据多种因素(例如症状的严重程度等)中的任一种而变化。例如,在一些实施方案中,每月一次、每月两次、每月三次、每隔一周(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、每隔一天(qod)、每天(qd)、每天两次(qid)或每天三次(tid)施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

[0284] 本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的施用持续时间,例如,施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的时间段可根据多种因素(例如患者反应等)中的任一种而变化。例如,可在约一天至约一周、约两周至约四周、约一个月至约两个月、约两个月至约四个月、约四个月至约六个月、约六个月至约八个月、约八个月至约一年、约1年至约2年或约2年至约4年或更长范围内的时间段内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

[0285] 施用途径

[0286] 使用适合于药物递送的任何可用的方法和途径(包括体内和离体方法以及全身和局部施用途径)来将活性剂(本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体)施用至个体。

[0287] 常规和药学上可接受的施用途径包括肿瘤内、肿瘤周围、肌内、气管内、颅内、皮下、皮内、局部施加、静脉内、动脉内、直肠、鼻、口服和其他肠内和肠胃外施用途径。如果需要,可将施用途径组合,或根据多聚体多肽和/或所需作用进行调整。可以单剂量或多剂量施用本公开的多聚体多肽或本公开的核酸或重组表达载体。

[0288] 在一些实施方案中,静脉内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,肌内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,局部施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公

开的重组表达载体。在一些实施方案中,肿瘤内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,肿瘤周围施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,颅内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,皮下施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

[0289] 在一些实施方案中,静脉内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,肌肉内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,局部施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,肿瘤内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,肿瘤周围施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,颅内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,皮下施用多聚体多肽。

[0290] 可使用任何可用的常规方法和适于递送常规药物的途径(包括全身或局部途径)将本公开的多聚体多肽,本公开的核酸或本公开的重组表达载体施用至宿主。通常,本发明所考虑的施用途径包括但不必限于肠内、肠胃外或吸入途径。

[0291] 除了吸入施用以外的肠胃外施用途径包括但不必限于局部、透皮、皮下、肌肉、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内、肿瘤内、肿瘤周围和静脉内途径,即除了通过消化道以外的任何施用途径。可进行肠胃外施用以实现本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的全身或局部递送。当希望全身性递送时,施用通常涉及药物制剂的侵入性或全身性吸收的局部或粘膜施用。

[0292] 适于治疗的受试者

[0293] 适于用本公开的方法治疗的受试者包括患有癌症的个体,包括已被诊断为患有癌症的个体、已针对癌症治疗但未能对所述治疗有反应的个体以及已针对癌症治疗并且最初有反应、但随后对所述治疗变得难治的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括具有感染的个体(例如,病原体感染,如细菌、病毒、原生动物等),包括已被诊断为具有感染的个体和已针对感染治疗但未能对所述治疗有反应的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括具有细菌感染的个体,包括已被诊断为具有细菌感染的个体,以及已针对细菌感染治疗但未能对所述治疗有反应的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括具有病毒感染的个体,包括已被诊断为具有病毒感染的个体,以及已针对病毒感染治疗但未能对所述治疗有反应的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括患有自身免疫疾病的个体,包括已被诊断患有自身免疫疾病的个体,以及已针对自身免疫疾病治疗但未能对所述治疗有反应的个体。

[0294] 实施例

[0295] 提出以下实施例以便向本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开和说明,并且不意图限制本发明人看待其发明的范围,也不意图表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。虽然已尽力确保所用数字(例如量、温度等)的准确性,但仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,并且压力是或接近大气压。可使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pL,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内的(肌内地);i.p.,腹膜内的(腹膜内地);s.c.,皮下的(皮下地)等。

[0296] 实施例1:PD-L1变体的产生和表征

[0297] 材料和方法

[0298] PD-L1诱变

[0299] 将全长小鼠PD-L1克隆到Clontech N1 mCherry载体的SacI和BamHI位点中。天然前导肽序列被EPO前导肽序列替代,以改进定位和表达水平。使用高保真KOD聚合酶、2mM dNTP和4mM MgCl₂进行位点特异性诱变。基于由人PD-L1和PD-1形成的复合物(PDB:3BIK)的晶体结构选择诱变的位置。通过与人PD-L1的序列比对来鉴别小鼠PD-L1中的等效表面可及位置(总计36个位置)。尝试诱变以使得每个选择的位置被突变为Ala、Glu或Arg残基。整体诱变成功率是约70%,并且对于一些位置,并非所有取代(A、E和R)都获得。通过瞬时转染1mL悬浮HEK 293细胞对序列验证的突变体进行表达测试。只有那些显示出与野生型PD-L1可媲美的表达和正确膜定位的突变体随后用于微阵列和FACS结合研究中,从而产生用于测定的60个PD-L1突变体的最终集合。

[0300] 微珠FACS结合测定

[0301] 将PD-L1 mCherry突变体构建体瞬时转染到HEK 293S细胞中,并且随后用预先用PD-1Fc-融合体和FITC-Fc蛋白的4:1混合物预饱和的蛋白A微珠(Milltenyi)激发。基于来自Genentech的先前报道(16),使用5ug/10uL微珠的总Fc蛋白质与珠粒比率。FITC-Fc用于使否则非荧光微珠显示绿色荧光。对于每次滴定实验,将500μL蛋白A微珠负载10μg异硫氰酸荧光素(FITC)-Fc和40μg的PD-1-Fc或B7-1-Fc蛋白于总体积5mL 1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的混合物。将珠粒在4°C下孵育过夜(约16小时)。在使用前将负载的珠粒储存达两周。初步实验确定75μL负载的珠粒足以使得用野生型PD-L1转染的150,000个细胞饱和(转染效率始终是60%-70%)。对于滴定实验,将一组野生型和突变体PD-L1构建体转染到含有1mL悬浮HEK-293细胞的24孔组织培养板中。对转染后三天细胞进行计数,用含有2%BSA的1x PBS稀释至1x10⁶个细胞/mL。将150K细胞(150μL)转移至Eppendorf管中,并且添加75μL负载的微珠以及另外的100μL 1xPBS和2%牛血清白蛋白(BSA)。将反应混合物在4°C下翻转混合1小时,添加4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI),并立即通过BD Aria III细胞计数器上的流式细胞术对样品进行分析。通过首先对活细胞(DAPI阴性)进行门控、然后对mCherry阳性细胞(PD-L1表达)进行门控来分析数据。将为FITC阳性(结合的微珠)的mCherry阳性细胞的百分比用作“结合百分比”。对于每个实验,将结合百分比标准化至野生型结合。

[0302] 重组Fc-融合蛋白的纯化

[0303] 为了克隆mPD-L1Fc-融合蛋白,将全长野生型或突变体PD-L1胞外结构域(残基F19-R237)亚克隆到含有C-末端his-标记的Fc结构域(mIgG2a-10xHis)的LIC载体中。将这些构建体和仅同位素对照在1L的HEK 293悬浮细胞中瞬时表达。转染后4天,收获培养基,添加50mM MES以调节pH,并添加100mM Arg-C1(pH 7.6)以改进溶解性。随后使用分批结合方法在Ni²⁺-NTA树脂(GE)上纯化Fc-融合体,然后在具有10mL树脂床体积的600mL容量玻璃柱上重力流动。用100柱体积的洗涤缓冲液(50mM MES pH 6.5,100mM Arg-C1,5mM咪唑,150mM NaCl,10%甘油)洗涤Ni²⁺-次氨基乙酸(NTA)树脂,并用含有500mM咪唑的相同缓冲液洗脱结合的蛋白质。将镍洗脱液浓缩,并在S200sephadex柱(GE)上在50mM MES pH 6.5、100mM Arg-C1、150mM NaCl、10%甘油中通过凝胶过滤进一步纯化。将野生型mPD-1Fc(残基L25-Q167)和mB7-1Fc(残基D37-K245)构建体克隆到也含有mIgG2a-10xHis标签的慢病毒表达LIC载体中。用慢病毒包装质粒共转染所述构建体,并在2天后收集病毒上清液。在具有

20x10⁶个细胞和5-10mL病毒上清液的125mL带挡板的烧瓶中开始大规模转导。在转导后第3天进行完全培养基更换,并从第5天开始,将培养物按比例放大,最终达到1.5L的最终体积。在第12天收集上清液用于纯化。如针对mPD-L1所描述来纯化从慢病毒产生的PD-1和B7-1获得的上清液的纯化。

[0304] FACS滴定测定

[0305] 如上所述,用内部纯化的PD-1Fc和B7-1Fc融合蛋白进行荧光活化细胞分选(FACS)滴定测定。用野生型或突变体PD-L1构建体转染HEK 293悬浮细胞。对转染后三天细胞进行计数并在1x PBS中稀释至1x10⁶个细胞/mL。将含有最终浓度1μM Fc-融合蛋白和1.5μM Alexa488山羊抗小鼠第二抗体的预混合反应物在冰上孵育30分钟。随后,将增加量的预混合反应物添加至96孔板的孔中,并将体积调节至50μL。然后将150μL稀释的细胞(总计150,000个细胞)添加至孔中。结合在4℃下进行1小时,并且通过离心将细胞用PBS洗涤3次,切随后通过FACS进行分析。将门控活细胞针对mCherry进行亚门控并且mCherry阳性细胞针对Alexa-488进行亚门控。结合百分比表示为Alexa-488阳性的mCherry细胞的百分比。数据表示拟合至单一位点结合等式 $Y = B_{max} * X / (EC_{50} + X)$ 的三个独立实验的平均值。

[0306] T细胞活化测定

[0307] 从C57BL/6小鼠收获脾脏,并使用小鼠抗CD4微珠(Milltenyi)分离CD4⁺T细胞。将CD4⁺T细胞收集在补充有10%胎牛血清(FBS)、pen/strep抗生素、2mM L-谷氨酰胺和0.1% BME的完全RPMI培养基中。对细胞进行计数,使用制造商的方案用羧基荧光素N-琥珀酰亚胺酯(CFSE)(Invitrogen)染色并重新计数。在同一天,在完全RPMI培养基中的96孔TC板中每孔接种75,000个细胞,并使其保持灭活,用33.3nM(约5ug/mL)抗CD3活化,或在约5倍摩尔过量(174.3nM)的对照Fc、WT PD-L1-Fc或突变体PD-L1Fc蛋白存在下用33.3nM抗CD3活化。活化后4天,通过FACS通过门控未活化的T细胞分析CFSE稀释度来测定增殖。将来自每个实验的数据标准化至对照Fc群体,并对总计三个独立实验进行平均。

[0308] PD-1/B7-1竞争结合实验

[0309] 克隆了mB7-1 hIgG1Fc融合构建体,其使用与上述原始mIgG2a构建体相同的促红细胞生成素(EPO)前导序列、mB7-1胞外结构域边界和接头序列。这种构建体在HEK 293细胞中瞬时表达,并如上所述纯化用于所用的其他Fc融合蛋白。对于完成实验,用野生型mPD-L1 mCherry瞬时转染HEK 293悬浮细胞。转染后三天,对转染的细胞进行计数并稀释至1x 10⁶个细胞/mL。在不存在或存在递增浓度的PD-1 mIgG2a蛋白(0.01-250nM二聚体)的情况下,将B7-1hIgG1融合蛋白以5nM二聚体的最终浓度添加至100,000个转染细胞中。进行平行实验,其中以等摩尔浓度滴定纯化的mIgG2a同种型对照。蛋白质结合在22℃下在96孔板振荡器上以900rpm振荡进行1小时。在结合后,将板用含有0.2%BSA的1X PBS洗涤两次,并以0.01μg/μL(总共1μg)添加抗人(H+L)Alexa 488标记的第二抗体(Invitrogen)并孵育30分钟。随后用含有0.2%BSA的1X PBS再洗涤细胞两次。通过FACS立即分析样品,并且对mCherry阳性细胞(FL4-PD-L1表达)的百分比进行数据门控,所述阳性细胞也是Alexa488阳性的(FL1-B7-1结合)。将竞争数据标准化至在mPD-1不存在下的5nM B7-1结合,并作为log [mPD-1]的函数作图。使用单位点竞争模型等式 $Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{x - \log EC_{50}})$ 拟合来自三个独立实验的平均数据。

[0310] 结果

[0311] 通过微阵列分析进行机械解剖

[0312] 为了产生选择性PD-1试剂,将PD-1:PD-L1复合物的X射线结构用作鉴别诱变的残基的框架-鉴别PD-L1Ig可变结构域内的36个溶剂暴露的残基(24)。将每种残基改变为丙氨酸、精氨酸和谷氨酸以取样一系列侧链物理化学特征性质。最初使用细胞微阵列平台来用PD-1或B7-1Fc-融合蛋白激发一组野生型和突变体PD-L1构建体。这些实验鉴别了仅影响PD-1结合的突变体(D122A、Y123A、Y123R、K124A、K124D、R125A、R125D)、仅影响B7-1结合的突变体(Y56A、Y56D、E72R、G119D、G120D)或影响两者的突变体(L53R、G119R、A121R)(表1;提供于图10中)。然而,由于以下原因,使用细胞微阵列证明PD-1/B7-1结合的一致定量是困难的:(1)与用PD-1激发的那些相比,B7-1对PD-L1的较低亲和力降低了这些阵列的信噪比;(2)容易地鉴别结合的完全丧失,但结合的适度减少通常更加可变;(3)与独立印刷、转染和处理的载玻片可变地相关的固有载玻片增加了信噪比变化并使直接比较变得更加困难。

[0313] 通过FACS分析验证

[0314] 为了验证和更定量地评价PD-L1突变体的结合特征,实施了高通量荧光活化细胞分选(FACS)测定,其能够每约15分钟询问96个样品。与细胞微阵列相比,这种FAC平台提供增强的动态范围。值得注意的是,查询蛋白质呈现的模式被修改。虽然二价Ig-融合体(如在微阵列平台中所使用)对于鉴别与中度亲和力的相互作用是有效的,但可能错过较弱的相互作用。为了支持检测在PD-L1突变体文库的分析中预期的表观亲和力的广泛范围,利用通过磁性微珠捕获和呈递提供的更高的效价(图7A)。例如,探测呈递PD-L1的微阵列需要比PD-1Fc更高浓度的B7-1Fc,从而导致更大的背景信号。使用FACS微珠测定观察到的动态范围的增加至少部分是由于非特异性结合所致的背景减少。这可能是由于两种原因:(1)在微珠测定中没有使用第二抗体;(2)较高的亲和力意味着较低量的蛋白质可用于激发细胞。微珠测定具有不需要任何洗涤步骤的额外益处,这使得结合样品的损失最小化并且使测定更直接地测量蛋白质结合。另外,对于一些较低亲和力的相互作用,如B7-1与PD-L1之间的相互作用,在FACS测定中难以用可溶性B7-1Fc达到饱和,而B7-1Fc缀合的微珠产生显著改进。

[0315] 简言之,用55种不同的表面展示的突变体PD-L1-mCherry融合体单独瞬时转染HEK293细胞系。通过流式细胞术探测这些细胞结合用野生型PD-1Ig融合体修饰的FITC负载的微珠或野生型B7-1Ig-融合蛋白的能力(图7B)。重要的是,这些突变不太可能引起PD-L1结构或稳定性的全局变化,因为瞬时蛋白质表达水平与用于分析的所有突变体的野生型相似。此外,野生型和突变型PD-L1变体的荧光显微镜显示C-末端mCherry融合蛋白的正确膜定位,从而表明突变蛋白正被正确折叠、加工并插入膜中。这些研究产生PD-L1突变体的鉴定,所述突变体与PD-1特异性结合(D49R、V54D、V54R、Y56A、Y56D、Y56R、Q66D、E72R、G119D、G120D)或B7-1特异性结合(D122A、Y123R、Y123A、K124A、K124D、K124R、R125A、R125D)或不与PD-1或B7-1特异性结合(L53D、L53R、I115D、I116R、G119R、G120A、G120R、A121D、A121R、D122R)。将受影响的残基定位到PD-1:PD-L1复合物的晶体结构上,并显示负责PD-1和B7-1结合的重叠但不同的PD-L1表面。这些结果验证了通过初始细胞微阵列实验获得的结果,并提供了对PD-1和B7-1结合的更定量评估,特别是对于显示与PD-1或B7-1显著减少但未消除的结合的那些突变体(表1(图10),表2(图11))。例如,在细胞微阵列实验中,PD-1和B7-1与V54D和Q66D PD-L1突变体结合的水平相似,而在微珠FACS测定的背景下,这两种相同的突变体显示野生型水平的PD-1结合和显著降低的B7-1结合。

[0316] PD-L1和PD-L2的序列比对分析也暗示了这些残基对PD-1和B7-1结合的相对重要性。一般来说,PD-1结合特异性残基在PD-L1和PD-L2中都是高度保守的,这是预期的,因为两种配体都与PD-1结合。然而,许多鉴别的B7-1特异性结合残基仅在PD-L1而非PD-L2中高度保守,这是合乎逻辑的,因为PD-L2不结合B7-1。这支持突出显示V54和Y56的数据对B7-1结合特别重要。

[0317] T细胞增殖测定中PD-L1突变体的生物活性

[0318] 将HEK 293细胞在24孔悬浮组织培养板中的高通量瞬时转染进行优化,以产生与筛选一致的量的重组分泌的Fc融合蛋白。利用这种方法,纯化了具有改变的结合特征的PD-L1突变体的子集的Fc融合蛋白。在对PD-L1蛋白进行小规模镍纯化后,分析型凝胶过滤证明所选择的突变体与野生型蛋白相似的表现。在T细胞增殖研究中的活性测试之前,通过FACS分析评价每种突变蛋白质的质量,以结合表达表面驻留的PD-1或B7-1(GFP融合体)的HEK细胞,来确认可溶性试剂表现如所预期(即PD-L1_Y56A_Fc与表达PD-1的细胞结合,但不与表达B7-1的细胞结合)。

[0319] 为了表征功能性解剖的PD-L1突变体的生物学活性,使用体外T细胞活化测定。这种广泛使用的测定使用板结合的抗CD3抗体来模拟通过T细胞受体活化T细胞。在IgG对照、野生型PD-L1或PD-L1突变体存在下共同接种抗CD3,并测量CFSE标记的原代CD4⁺小鼠T细胞的活化。在抗CD3介导的CD4⁺T细胞活化的背景下,与同种型对照相比,野生型PD-L1抑制活化(图8D),PD-1结合水平降低的PD-L1突变体显示出显著降低的抑制T细胞活化的能力。相比之下,具有降低的B7-1活性的PD-L1突变体引发与野生型PD-L1相当的作用。这些数据表明,在所采用的体外实验系统中,PD-L1诱导的CD4⁺T细胞活化的抑制主要通过其与PD-1的相互作用发生。这些数据证明了产生具有特定生物活性的突变体的可行性,这些生物活性可帮助限定PD-L1:PD-1和PD-L1:B7-1与哺乳动物免疫的相互作用的独特贡献。

[0320] PD-1可与B7-1竞争结合至PD-L1。

[0321] 诱变数据显示结合PD-1和B7-1的PD-L1上的结合表面重叠但不同,从而表明PD-1和B7-1应竞争结合至PD-L1。使用基于细胞的FACS竞争测定对这种假设进行了测试,所述测试使用B7-1和PD-1Fc-融合蛋白,所述融合蛋白使用两种不同的Fc融合同种型进行纯化。使用这些试剂,滴定递增浓度的PD-1(mIgG2a),同时使用抗人Alexa 488第二抗体选择性地监测与表达野生型PD-L1的HEK细胞结合的B7-1(hIgG1)的丧失(图9A)。结果显示PD-1结合有效地从表达PD-L1的细胞中移位B7-1,这支持基于PD-L1诱变的发现,即结合位点重叠。

[0322] 图7A-7C:使用高通量微珠结合FACS测定筛选PD-L1突变体。A)微珠FACS结合测定的示意图。B)代表性对照微珠实验。用缀合有对照Fc、PD-1Fc或B7-1Fc融合蛋白的微珠激发表达单独mCherry(-对照)或PD-L1 mCherry的细胞。对所有活细胞门控FACS数据,并显示PD-1和B7-1包被的微珠(右上象限)与表达野生型PD-L1的细胞的结合。C)一组54种PD-L1突变体的FACS微珠结合数据。数据显示mCherry阳性细胞(PD-L1表达)与PD-1(蓝色)或B7-1(红色)中包被的微珠结合的部分,其中结合标准化至野生型。PD-1和B7-1结合在平行三次重复实验中进行,并且误差棒表示标准偏差。

[0323] 图8A-8D:具有与PD-1或B7-1的改变的结合的PD-L1突变体的表征。A)PD-1:PD-L1复合物(PDB:3SBW)的晶体结构仅显示PD-L1IgC和IgV结构域。IgV结构域被扩大,并且将在突变时导致结合改变的残基标记并相应着色,绿色=PD-1结合受影响,红色=B7-1结合受

影响,灰色=PD-1和B7-1结合受影响。B)从FACS滴定实验获得的数据,其中用递增浓度的重组PD-1或B7-1Fc-融合蛋白滴定表达野生型PD-L1或突变体的细胞。使用抗小鼠Alexa 488第二抗体检测结合。数据点显示三次独立实验的平均值,其中误差棒显示标准偏差。曲线显示数据与单位点结合模型的拟合。C)从B中的FACS滴定实验获得的 EC_{50} 和 B_{max} 值的表。星号表示结合如此低(基线)以致数据不能拟合的那些滴定。D)数据显示在同种型对照、野生型或突变体PD-L1Fc-融合蛋白存在下用抗CD3刺激4天后从C57BL/6小鼠分离的活化的CSFE标记的 $CD4^+$ T细胞的分数。将活化标准化至同种型对照并代表三个独立实验。

[0324] 图9A-9B:PD-1与B7-1竞争结合至PD-L1。A)竞争测定的草图描述。简言之,在不存在或存在递增浓度的mPD-1mIgG2a的情况下,将用PD-L1 mCherry瞬时转染的HEK 293细胞与mB7-1 hIgG1蛋白一起孵育。然后使用抗人Alexa 488抗体通过FACS分析监测与细胞结合的mB7-1 hIgG1的量。B)显示来自一个代表性实验的结果的热图。在对照mIgG2a存在下,未观察到mB7-1 hIgG1结合的丧失。所述图示来自三个独立实验的数据的平均值和标准偏差。使用软件Prism中的单位点竞争模型等式拟合此数据,并且计算的 EC_{50} 是 8.3 ± 1.5 nM。

[0325] 实施例2:PD-L1/synTac的体内活性

[0326] 在MHC I类等位基因H-2K^d的背景下,1型糖尿病的NY8.3 TCR转基因NOD模型(NOD8.3)发展针对胰腺 β 细胞抗原Igrp₂₀₆₋₂₁₄的侵袭性T细胞自身免疫。NOD 8.3小鼠具有高频率的循环转基因(Igrp特异性)T细胞。将携带Igrp₂₀₆₋₂₁₄/H-2K^d和PD-L1(G119R变体)的PD-L1/synTac施用至NOD 8.3小鼠,以确定对脾脏中致病性转基因T细胞的频率的影响。如图12中所示,PD-L1(G119R)/synTac影响Igrp₂₀₆₋₂₁₄/H-2K^d特异性T细胞的剂量依赖性消减,但不影响非特异性T细胞。

[0327] 虽然本发明已经参考其特定实施方案进行了描述,但是本领域技术人员应理解,可在不脱离本发明的真实精神和范围下进行各种变化且可取代等效物。此外,为了使特定的场合、材料、物质的组合物、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范围,可以进行许多改进。所有此类修改均意图处于所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 莎拉·C·加勒特-汤姆森

史蒂文·C·阿尔莫

罗纳德·D·赛德尔

<120> 变体PD-L1多肽、T细胞调节性多聚体多肽及其使用方法

<130> CUEB-E004W0

<150> 62/338,128

<151> 2016-05-18

<160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1           5           10           15
Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
           20           25           30
Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
           35           40           45
Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
           50           55           60
Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65           70           75           80
Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
           85           90           95
Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
           100          105          110
Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
           115          120          125
Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
           130          135          140
Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
145          150          155          160
Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
           165          170          175
Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe

```


| | | | | | |
|---|-----|--|-----|--|-----|
| | 180 | | 185 | | 190 |
| Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg | | | | | |
| | 210 | | 215 | | |
| <210> 2 | | | | | |
| <211> 219 | | | | | |
| <212> PRT | | | | | |
| <213> Homo sapiens | | | | | |
| <400> 2 | | | | | |
| Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser | | | | | |
| 1 | 5 | | 10 | | 15 |
| Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu | | | | | |
| | 20 | | 25 | | 30 |
| Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala | | | | | |
| 65 | 70 | | 75 | | 80 |
| Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys | | | | | |
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro | | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 |
| Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys | | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 |
| Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys | | | | | |
| 145 | 150 | | 155 | | 160 |
| Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr | | | | | |
| | 165 | | 170 | | 175 |
| Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile | | | | | |
| | 210 | | 215 | | |
| <210> 3 | | | | | |

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
           20           25           30
His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
           35           40           45
Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
           50           55           60
Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65           70           75           80
Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
           85           90           95
Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
           100          105          110
Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
           115

```

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 4

```

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
           20           25           30
His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
           35           40           45
Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
           50           55           60
Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65           70           75           80
Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
           85           90           95
Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
           100          105          110

```

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 5

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Arg | Ser | Val | Ala | Leu | Ala | Val | Leu | Ala | Leu | Leu | Ser | Leu | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Leu | Glu | Ala | Ile | Gln | Arg | Thr | Pro | Lys | Ile | Gln | Val | Tyr | Ser | Arg |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Pro | Pro | Glu | Asn | Gly | Lys | Pro | Asn | Phe | Leu | Asn | Cys | Tyr | Val | Ser |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Phe | His | Pro | Ser | Asp | Ile | Glu | Val | Asp | Leu | Leu | Lys | Asn | Gly | Glu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Lys | Met | Gly | Lys | Val | Glu | His | Ser | Asp | Leu | Ser | Phe | Ser | Lys | Asp | Trp |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Ser | Phe | Tyr | Leu | Leu | Tyr | Tyr | Thr | Glu | Phe | Thr | Pro | Asn | Glu | Lys | Asp |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Glu | Tyr | Ala | Cys | Arg | Val | Asn | His | Val | Thr | Leu | Ser | Gly | Pro | Arg | Thr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Arg | Phe | Val | Ala | Leu | Val | Leu | Leu | Gly | Leu | Leu | Ser | Leu | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Leu | Asp | Ala | Ile | Gln | Arg | Pro | Pro | Lys | Ile | Gln | Val | Tyr | Ser | Arg |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Pro | Pro | Glu | Asp | Gly | Lys | Pro | Asn | Tyr | Leu | Asn | Cys | Tyr | Val | Tyr |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Phe | His | Pro | Pro | Gln | Ile | Glu | Ile | Asp | Leu | Leu | Lys | Asn | Gly | Glu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Lys | Ile | Lys | Ser | Glu | Gln | Ser | Asp | Leu | Ser | Phe | Ser | Lys | Asp | Trp | Ser |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Phe | Tyr | Leu | Leu | Ser | His | Ala | Glu | Phe | Thr | Pro | Asn | Ser | Lys | Asp | Gln |

| | | | | | |
|---|-----|--|-----|--|-----|
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Tyr Ser Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Glu Gln Pro Arg Ile Val | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Lys Trp Asp Arg Asp Leu | | | | | |
| | 115 | | | | |
| <210> 7 | | | | | |
| <211> 119 | | | | | |
| <212> PRT | | | | | |
| <213> Mus musculus | | | | | |
| <400> 7 | | | | | |
| Met Ala Arg Ser Val Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Val Ser Leu Thr | | | | | |
| 1 | 5 | | 10 | | 15 |
| Gly Leu Tyr Ala Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln Val Tyr Ser Arg | | | | | |
| | 20 | | 25 | | 30 |
| His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn Cys Tyr Val Thr | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu Lys Asn Gly Lys | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe Ser Lys Asp Trp | | | | | |
| 65 | 70 | | 75 | | 80 |
| Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Thr Asp | | | | | |
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Ala Ser Met Ala Glu Pro Lys Thr | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met | | | | | |
| | 115 | | | | |
| <210> 8 | | | | | |
| <211> 5 | | | | | |
| <212> PRT | | | | | |
| <213> Artificial sequence | | | | | |
| <220> | | | | | |
| <223> Synthetic Sequence | | | | | |
| <220> | | | | | |
| <221> MISC_feature | | | | | |
| <222> (1) .. (5) | | | | | |
| <223> This stretch of residues may be repeated. | | | | | |
| <400> 8 | | | | | |
| Gly Ser Gly Gly Ser | | | | | |
| 1 | 5 | | | | |

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<220>
<221> Misc_feature
<222> (1) .. (4)
<223> This stretch of residues may be repeated.
<400> 9
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 10
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 11
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 12
Gly Ser Gly Ser Gly

1 5
 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 13
 Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 14
 Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 15
 Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 16
 Gly Cys Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 276

<210> 18
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 18
 Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg
 35 40 45
 Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr
 50 55 60
 Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Ala Gln Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln
 85 90 95
 Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg
 130 135 140
 Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn
 165 170 175
 Glu Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His
 180 185 190
 Pro Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu
 210 215 220
 Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
 225 230 235 240
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn
 245 250 255

Tyr Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu
 260 265 270
 Arg Trp
 <210> 19
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 19
 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
 35 40 45
 Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
 50 55 60
 Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
 85 90 95
 Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
 115 120 125
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
 130 135 140
 His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
 180 185 190
 Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
 210 215 220
 Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Cys Gly Asp Gly Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg | | |
| | 245 | 250 |
| Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu | | |
| | 260 | 270 |
| Arg Trp Glu Pro | | |
| 275 | | |
| <210> 21 | | |
| <211> 276 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial sequence | | |
| <220> | | |
| <223> Synthetic Sequence | | |
| <400> 21 | | |
| Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln | | |
| | 20 | 25 |
| Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg | | |
| | 35 | 40 |
| Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr | | |
| | 50 | 55 |
| Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln | | |
| | 85 | 90 |
| Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly | | |
| | 100 | 105 |
| Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu | | |
| | 115 | 120 |
| Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys | | |
| | 130 | 135 |
| His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys | | |

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 165 | | 170 | | 175 |
| Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 |
| Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Cys Gly Asp Gly Thr | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | 240 |
| Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg | | | | | |
| | 245 | | 250 | | 255 |
| Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu | | | | | |
| | 260 | | 265 | | 270 |
| Arg Trp Glu Pro | | | | | |
| | 275 | | | | |

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 22

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 23

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 24
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 25

His His His His His
1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 26

His His His His His His
1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 27

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 29
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 30
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5
<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 31
Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5
<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic Sequence
<400> 32
Phe His His Thr
1
<210> 33
<211> 17
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 33

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg

1

5

10

15

Ala

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 34

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1

5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 35

Glu Asn Leu Tyr Thr Gln Ser

1

5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 36

Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 37

Leu Val Pro Arg

1

<210> 38

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 38

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 39

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 39

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1

5

10

15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 40

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp

1

5

10

15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 41

<211> 25

<212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 41
 Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20 25
 <210> 42
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 42
 Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Cys His Pro Ala Glu
 1 5 10 15
 Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
 20 25 30
 Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
 35 40 45
 Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
 50 55 60
 Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
 65 70 75 80
 Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
 85 90 95
 Arg Asp Met
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 43
 Val Tyr Leu Lys Thr Asn Val Phe Leu
 1 5
 <210> 44

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 44
 Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> (1) .. (5)
 <223> This stretch of residues may be repeated.
 <400> 45
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 46
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic Sequence
 <400> 46
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Ala Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val | | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 |
| Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val | | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 |
| Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr | | | | | |
| 145 | | 150 | | 155 | 160 |
| Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser | | | | | |
| | 165 | | 170 | | 175 |
| Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 |
| Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | 240 |
| Leu Ser Pro Ser Thr | | | | | |
| | 245 | | | | |
| <210> 47 | | | | | |
| <211> 219 | | | | | |
| <212> PRT | | | | | |
| <213> Artificial sequence | | | | | |
| <220> | | | | | |
| <223> Synthetic Sequence | | | | | |
| <400> 47 | | | | | |
| Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Ala Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser | | | | | |
| 1 | 5 | | 10 | | 15 |
| Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu | | | | | |
| | 20 | | 25 | | 30 |
| Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala | | | | | |
| 65 | | 70 | | 75 | 80 |
| Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys | | | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| | 85 | 90 | 95 |
| Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile | | | |
| | 210 | 215 | |
| <210> 48 | | | |
| <211> 245 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial sequence | | | |
| <220> | | | |
| <223> Synthetic Sequence | | | |
| <400> 48 | | | |
| Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Arg Leu Tyr Val Val Glu Tyr | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val | | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Leu Ser Pro Ser Thr | | |
| 245 | | |

<210> 49

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Sequence

<400> 49

| | | |
|---|-----|-----|
| Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Arg Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
| Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile | | |
| 210 | 215 | |
| <210> 50 | | |
| <211> 245 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial sequence | | |
| <220> | | |
| <223> Synthetic Sequence | | |
| <400> 50 | | |
| Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Asp Leu Ala Ala Leu Asp Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Leu Ser Pro Ser Thr | | | |
| | 245 | | |
| <210> 51 | | | |
| <211> 219 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial sequence | | | |
| <220> | | | |
| <223> Synthetic Sequence | | | |
| <400> 51 | | | |
| Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Ala Ala Leu Asp Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys | | | |

| | | | |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr Thr Thr Thr | Asn Ser Lys Arg | Glu Glu Lys Leu | Phe Asn Val Thr |
| | 165 | 170 | 175 |
| Ser Thr Leu Arg | Ile Asn Thr Thr | Thr Asn Glu Ile | Phe Tyr Cys Thr |
| | 180 | 185 | 190 |
| Phe Arg Arg Leu | Asp Pro Glu Glu | Asn His Thr Ala | Glu Leu Val Ile |
| | 195 | 200 | 205 |
| Pro Gly Asn Ile | Leu Asn Val Ser | Ile Lys Ile | |
| | 210 | 215 | |
| <210> | 52 | | |
| <211> | 245 | | |
| <212> | PRT | | |
| <213> | Artificial sequence | | |
| <220> | | | |
| <223> | Synthetic Sequence | | |
| <400> | 52 | | |
| Met Arg Ile Phe | Ala Val Phe Ile | Phe Met Thr Tyr | Trp His Leu Leu |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asn Ala Phe Thr | Val Thr Val Pro | Lys Asp Leu Tyr | Val Val Glu Tyr |
| | 20 | 25 | 30 |
| Gly Ser Asn Met | Thr Ile Glu Cys | Lys Phe Pro Val | Glu Lys Gln Leu |
| | 35 | 40 | 45 |
| Asp Leu Ala Ala | Leu Ile Val Tyr | Trp Glu Met Glu | Asp Lys Asn Ile |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ile Asp Phe Val | His Gly Glu Glu | Asp Leu Lys Val | Gln His Ser Ser |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Tyr Arg Gln Arg | Ala Arg Leu Leu | Lys Asp Gln Leu | Ser Leu Gly Asn |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ala Ala Leu Gln | Ile Thr Asp Val | Lys Leu Gln Asp | Ala Gly Val Tyr |
| | 100 | 105 | 110 |
| Arg Cys Met Ile | Ser Tyr Gly Gly | Ala Asp Tyr Lys | Arg Ile Thr Val |
| | 115 | 120 | 125 |
| Lys Val Asn Ala | Pro Tyr Asn Lys | Ile Asn Gln Arg | Ile Leu Val Val |
| | 130 | 135 | 140 |
| Asp Pro Val Thr | Ser Glu His Glu | Leu Thr Cys Gln | Ala Glu Gly Tyr |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro Lys Ala Glu | Val Ile Trp Thr | Ser Ser Asp His | Gln Val Leu Ser |
| | 165 | 170 | 175 |
| Gly Lys Thr Thr | Thr Thr Asn Ser | Lys Arg Glu Glu | Lys Leu Phe Asn |

| | | | | | | | | |
|-------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| | 180 | | 185 | | 190 | | | |
| Phe | Arg Arg | Leu Asp | Pro Glu | Glu Asn | His Thr | Ala Glu | Leu Val | Ile |
| | 195 | | 200 | | 205 | | | |
| Pro | Gly Asn | Ile Leu | Asn Val | Ser Ile | Lys Ile | | | |
| | 210 | | 215 | | | | | |
| <210> | 54 | | | | | | | |
| <211> | 245 | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | |
| <213> | Artificial sequence | | | | | | | |
| <220> | | | | | | | | |
| <223> | Synthetic Sequence | | | | | | | |
| <400> | 54 | | | | | | | |
| Met | Arg Ile | Phe Ala | Val Phe | Ile Phe | Met Thr | Tyr Trp | His Leu | Leu |
| 1 | | 5 | | 10 | | 15 | | |
| Asn | Ala Phe | Thr Val | Thr Val | Pro Lys | Asp Leu | Tyr Val | Val Glu | Tyr |
| | 20 | | | 25 | | 30 | | |
| Gly | Ser Asn | Met Thr | Ile Glu | Cys Lys | Phe Pro | Val Glu | Lys Gln | Leu |
| | 35 | | | 40 | | 45 | | |
| Asp | Leu Ala | Ala Leu | Ile Val | Tyr Trp | Glu Met | Glu Asp | Lys Asn | Ile |
| | 50 | | | 55 | | 60 | | |
| Ile | Gln Phe | Val His | Gly Glu | Arg Asp | Leu Lys | Val Gln | His Ser | Ser |
| 65 | | | 70 | | 75 | | 80 | |
| Tyr | Arg Gln | Arg Ala | Arg Leu | Leu Lys | Asp Gln | Leu Ser | Leu Gly | Asn |
| | 85 | | | 90 | | 95 | | |
| Ala | Ala Leu | Gln Ile | Thr Asp | Val Lys | Leu Gln | Asp Ala | Gly Val | Tyr |
| | 100 | | | 105 | | 110 | | |
| Arg | Cys Met | Ile Ser | Tyr Gly | Gly Ala | Asp Tyr | Lys Arg | Ile Thr | Val |
| | 115 | | | 120 | | 125 | | |
| Lys | Val Asn | Ala Pro | Tyr Asn | Lys Ile | Asn Gln | Arg Ile | Leu Val | Val |
| | 130 | | | 135 | | 140 | | |
| Asp | Pro Val | Thr Ser | Glu His | Glu Leu | Thr Cys | Gln Ala | Glu Gly | Tyr |
| 145 | | | 150 | | 155 | | 160 | |
| Pro | Lys Ala | Glu Val | Ile Trp | Thr Ser | Ser Asp | His Gln | Val Leu | Ser |
| | 165 | | | 170 | | 175 | | |
| Gly | Lys Thr | Thr Thr | Thr Asn | Ser Lys | Arg Glu | Glu Lys | Leu Phe | Asn |
| | 180 | | | 185 | | 190 | | |
| Val | Thr Ser | Thr Leu | Arg Ile | Asn Thr | Thr Thr | Asn Glu | Ile Phe | Tyr |
| | 195 | | | 200 | | 205 | | |
| Cys | Thr Phe | Arg Arg | Leu Asp | Pro Glu | Glu Asn | His Thr | Ala Glu | Leu |

| | | |
|---|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
| Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Leu Ser Pro Ser Thr | | |
| | 245 | |
| <210> 55 | | |
| <211> 219 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial sequence | | |
| <220> | | |
| <223> Synthetic Sequence | | |
| <400> 55 | | |
| Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu | | |
| | 20 | 25 |
| Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln | | |
| | 35 | 40 |
| Phe Val His Gly Glu Arg Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg | | |
| | 50 | 55 |
| Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys | | |
| | 85 | 90 |
| Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val | | |
| | 100 | 105 |
| Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro | | |
| | 115 | 120 |
| Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys | | |
| | 130 | 135 |
| Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr | | |
| | 165 | 170 |
| Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr | | |
| | 180 | 185 |
| Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile | | |
| | 195 | 200 |
| Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 260 | | 265 | | 270 | | | | | | | | | | |
| Gly | Pro | Arg | Pro | Pro | Arg | His | Glu | Asp | Gly | His | Cys | Ser | Trp | Pro | Leu |
| | 275 | | 280 | | 285 | | | | | | | | | | |
| <210> | 57 | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 288 | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | Homo sapiens | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 57 | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Gln | Ile | Pro | Gln | Ala | Pro | Trp | Pro | Val | Val | Trp | Ala | Val | Leu | Gln |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Leu | Gly | Trp | Arg | Pro | Gly | Trp | Phe | Leu | Asp | Ser | Pro | Asp | Arg | Pro | Trp |
| | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Asn | Pro | Pro | Thr | Phe | Ser | Pro | Ala | Leu | Leu | Val | Val | Thr | Glu | Gly | Asp |
| | | | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 | |
| Asn | Ala | Thr | Phe | Thr | Cys | Ser | Phe | Ser | Asn | Thr | Ser | Glu | Ser | Phe | Val |
| | | | 50 | | | | | | 55 | | | | | 60 | |
| Leu | Asn | Trp | Tyr | Arg | Met | Ser | Pro | Ser | Asn | Gln | Thr | Asp | Lys | Leu | Ala |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | 70 | 80 |
| Ala | Phe | Pro | Glu | Asp | Arg | Ser | Gln | Pro | Gly | Gln | Asp | Cys | Arg | Phe | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | 85 | 95 |
| Val | Thr | Gln | Leu | Pro | Asn | Gly | Arg | Asp | Phe | His | Met | Ser | Val | Val | Arg |
| | | | | | | | | | | | | | | 100 | 110 |
| Ala | Arg | Arg | Asn | Asp | Ser | Gly | Thr | Tyr | Leu | Cys | Gly | Ala | Ile | Ser | Leu |
| | | | | | | | | | | | | | | 115 | 125 |
| Ala | Pro | Lys | Ala | Gln | Ile | Lys | Glu | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Leu | Arg | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | 130 | 140 |
| Thr | Glu | Arg | Arg | Ala | Glu | Val | Pro | Thr | Ala | His | Pro | Ser | Pro | Ser | Pro |
| 145 | | | | | | | | | | | | | | 150 | 160 |
| Arg | Pro | Ala | Gly | Gln | Phe | Gln | Thr | Leu | Val | Val | Gly | Val | Val | Gly | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | 165 | 175 |
| Leu | Leu | Gly | Ser | Leu | Val | Leu | Leu | Val | Trp | Val | Leu | Ala | Val | Ile | Cys |
| | | | | | | | | | | | | | | 180 | 190 |
| Ser | Arg | Ala | Ala | Arg | Gly | Thr | Ile | Gly | Ala | Arg | Arg | Thr | Gly | Gln | Pro |
| | | | | | | | | | | | | | | 195 | 205 |
| Leu | Lys | Glu | Asp | Pro | Ser | Ala | Val | Pro | Val | Phe | Ser | Val | Asp | Tyr | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | 210 | 220 |
| Glu | Leu | Asp | Phe | Gln | Trp | Arg | Glu | Lys | Thr | Pro | Glu | Pro | Pro | Val | Pro |
| 225 | | | | | | | | | | | | | | 230 | 240 |
| Cys | Val | Pro | Glu | Gln | Thr | Glu | Tyr | Ala | Thr | Ile | Val | Phe | Pro | Ser | Gly |

| | | | | | |
|---|-----|--|-----|--|-----|
| | 245 | | 250 | | 255 |
| Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg | | | | | |
| | 260 | | 265 | | 270 |
| Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu | | | | | |
| | 275 | | 280 | | 285 |
| <210> 58 | | | | | |
| <211> 306 | | | | | |
| <212> PRT | | | | | |
| <213> Mus musculus | | | | | |
| <400> 58 | | | | | |
| Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe | | | | | |
| 1 | 5 | | 10 | | 15 |
| Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser | | | | | |
| | 20 | | 25 | | 30 |
| Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val | | | | | |
| 65 | 70 | | 75 | | 80 |
| Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu | | | | | |
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr | | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 |
| Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp | | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 |
| Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr | | | | | |
| 145 | 150 | | 155 | | 160 |
| Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe | | | | | |
| | 165 | | 170 | | 175 |
| Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly | | | | | |
| 210 | 215 | | 220 | | |
| Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|-----|
| | 165 | | 170 | | 175 | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | | | | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | 190 | | | | |
| Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | | | | |
| | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | |
| His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | | | | |
| | | | | 210 | | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | |
| Pro | Gly | Lys | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 225 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <210> | 61 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 325 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | Homo sapiens | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 61 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | |
| Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | | | | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | |
| Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | | | | |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | |
| Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | | | | |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | | | | |
| 65 | | | | | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Thr | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| Val | Glu | Arg | Lys | Cys | Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro | | | | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
| Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | | | | |
| | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | | | | |
| | | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | | | | |
| 145 | | | | | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp | Leu | | | | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ala | | | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Leu Ser Pro Gly Lys | | |
| 325 | | |
| <210> 62 | | |
| <211> 246 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Homo sapiens | | |
| <400> 62 | | |
| His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys Thr | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu | | |

| | | |
|---|---|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Pro Gln Val Tyr Thr Leu | Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile | | 160 |
| | 165 | 170 |
| Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr | | 175 |
| | 180 | 185 |
| Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys | | 190 |
| | 195 | 200 |
| Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys | | 205 |
| 210 | 215 | 220 |
| Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu | | 235 |
| 225 | 230 | 240 |
| Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | |
| | 245 | |

<210> 63

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

| | | |
|---|-----|-----|
| Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg His | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly Tyr | | |
| | 20 | 25 |
| His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser Gln | | |
| | 35 | 40 |
| Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr Met | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly Glu | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu Ile | | |
| | 85 | 90 |
| Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr | | |
| | 100 | 105 |
| Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro | | |
| | 115 | 120 |
| Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys | | |

| | | | |
|---------------------|---------------------|-----------------|---------|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro Ser His Thr Gln | Pro Leu Gly Val Tyr | Leu Leu Thr Pro | Ala Val |
| | 165 | 170 | 175 |
| Gln Asp Leu Trp Leu | Arg Asp Lys Ala Thr | Phe Thr Cys Phe | Val Val |
| | 180 | 185 | 190 |
| Gly Ser Asp Leu Lys | Asp Ala His Leu Thr | Trp Glu Val Ala | Gly Lys |
| | 195 | 200 | 205 |
| Val Pro Thr Gly Gly | Val Glu Glu Gly Leu | Leu Glu Arg His | Ser Asn |
| | 210 | 215 | 220 |
| Gly Ser Gln Ser Gln | His Ser Arg Leu Thr | Leu Pro Arg Ser | Leu Trp |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Asn Ala Gly Thr Ser | Val Thr Cys Thr Leu | Asn His Pro Ser | Leu Pro |
| | 245 | 250 | 255 |
| Pro Gln Arg Leu Met | Ala Leu Arg Glu Pro | Ala Ala Gln Ala | Pro Val |
| | 260 | 265 | 270 |
| Lys Leu Ser Leu Asn | Leu Leu Ala Ser Ser | Asp Pro Pro Glu | Ala Ala |
| | 275 | 280 | 285 |
| Ser Trp Leu Leu Cys | Glu Val Ser Gly Phe | Ser Pro Pro Asn | Ile Leu |
| | 290 | 295 | 300 |
| Leu Met Trp Leu Glu | Asp Gln Arg Glu Val | Asn Thr Ser Gly | Phe Ala |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Pro Ala Arg Pro Pro | Pro Gln Pro Arg Ser | Thr Thr Phe Trp | Ala Trp |
| | 325 | 330 | 335 |
| Ser Val Leu Arg Val | Pro Ala Pro Pro Ser | Pro Gln Pro Ala | Thr Tyr |
| | 340 | 345 | 350 |
| Thr Cys Val Val Ser | His Glu Asp Ser Arg | Thr Leu Leu Asn | Ala Ser |
| | 355 | 360 | 365 |
| Arg Ser Leu Glu Val | Ser Tyr Val Thr Asp | His Gly Pro Met | Lys |
| | 370 | 375 | 380 |
| <210> 64 | | | |
| <211> 276 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Homo sapiens | | | |
| <400> 64 | | | |
| Val Thr Ser Thr Leu | Thr Ile Lys Glx Ser | Asp Trp Leu Gly | Glu Ser |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Met Phe Thr Cys Arg | Val Asp His Arg Gly | Leu Thr Phe Gln | Gln Asn |
| | 20 | 25 | 30 |
| Ala Ser Ser Met Cys | Val Pro Asp Gln Asp | Thr Ala Ile Arg | Val Phe |

Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
 340 345 350
 Tyr
 <210> 66
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 Ala Asp Pro Cys Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser
 1 5 10 15
 Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr
 20 25 30
 Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr
 35 40 45
 Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu
 50 55 60
 Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val
 65 70 75 80
 Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr
 85 90 95
 His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser
 100 105 110
 Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp
 115 120 125
 Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe
 130 135 140
 Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
 145 150 155 160
 Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser
 165 170 175
 Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu
 180 185 190
 Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
 195 200 205
 Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 67
 <211> 327
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Ser | Cys | Pro | Ala | Pro |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys |
| | | | 115 | | | | | | 120 | | | | 125 | | |
| Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val |
| | | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | |
| Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp |
| | | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu |
| | | | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | |
| Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg |
| | | | 210 | | | | | | 215 | | | | 220 | | |
| Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys |
| 225 | | | | | | 230 | | | | 235 | | | | | 240 |
| Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | 255 | |
| Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys |
| | | | 260 | | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser |
| | | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | |
| Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser |

| | | |
|---|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys | | 320 |
| | 325 | |
| <210> 68 | | |
| <211> 365 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Homo sapiens | | |
| <400> 68 | | |
| Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ser Gly Ala | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe | | |
| | 20 | 25 |
| Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala | | |
| | 35 | 40 |
| Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala | | |
| | 50 | 55 |
| Ala Ser Gln Lys Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Pro Glu Tyr Trp Asp Gln Glu Thr Arg Asn Met Lys Ala His Ser Gln | | |
| | 85 | 90 |
| Thr Asp Arg Ala Asn Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser | | |
| | 100 | 105 |
| Glu Asp Gly Ser His Thr Ile Gln Ile Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly | | |
| | 115 | 120 |
| Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly | | |
| | 130 | 135 |
| Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg Lys Trp Glu Ala Val His Ala | | |
| | 165 | 170 |
| Ala Glu Gln Arg Arg Val Tyr Leu Glu Gly Arg Cys Val Asp Gly Leu | | |
| | 180 | 185 |
| Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Pro | | |
| | 195 | 200 |
| Pro Lys Thr His Met Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr | | |
| | 210 | 215 |
| Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Leu Ser Ser Gln Pro | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Gly Ala | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| <210> 69 | | | |
| <211> 362 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Homo sapiens | | | |
| <400> 69 | | | |
| Met Leu Val Met Ala Pro Arg Thr Val Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly | | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 35 | 40 | 45 |
| Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ala Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr Gln Asn Tyr Lys Arg Gln Ala Gln | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ala Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Glu Asp Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Leu Gly | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Asp Gln Ser Ala Tyr Asp Gly | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Leu Glu Ala Ala Arg Ala | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala Glu Pro | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Leu Ser Asp His Glu Ala Thr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Met Gln His Glu | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Gly Leu Gln Glu Pro Leu Thr Leu Ser Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Val Val | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Leu Ala Val Leu Gly Ala Val Val Thr Ala Met Met Cys Arg Arg Lys | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Cys Ser Gln Ala Ala Cys Ser Asn | | |
| 340 | 345 | 350 |

Ser Ala Gln Gly Ser Asp Glu Ser Leu Ile Thr Cys Lys Ala
355 360 365

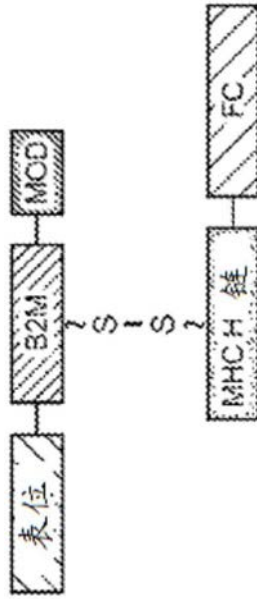


图1A

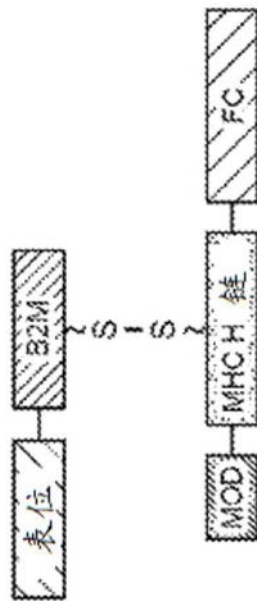


图1B

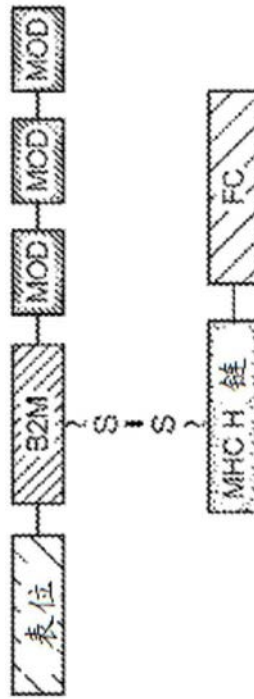


图1C

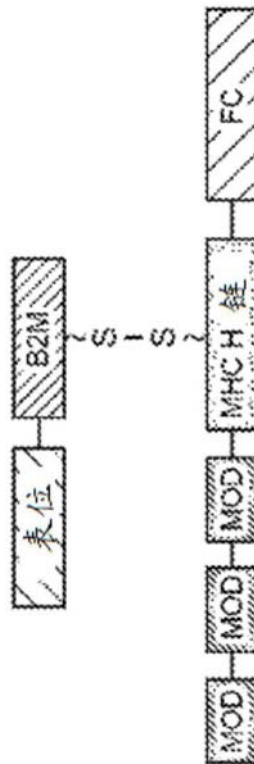


图1D

小家鼠PD-L1

氨基酸1-18= 信号

氨基酸240-260 = 跨膜

```

      1 MRIFAGIIFT ACCHLLRAFT ITAPKDLYVV EYGSNVTMEC RFPVERELDL
LALVVYWEKE
      61 DEQVIQFVAG EEDLKPQHSN FRGRASLPKD QLLKGNAALQ ITDVKLQDAG
VYCCIIISYGG
      121 ADYKRITLKV NAPYRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEGYP EAEVIWTNSD
HQPVSGKRSV
      181 TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIIPELPA
THPPQNRTHW
      241 VLLGSILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDTSSK NRNDTQFEET
(SEQ ID NO:1)

```

图2A

智人PD-L1

```

      1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
      61 dkniiqfvhg eedlvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag
vyrcmisygg
      121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptvse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
      181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frildpeenh taelvipgni
lvsikiclt
      241 lspst (SEQ ID NO:2)

```

图2B

| | | | | | |
|---|----|----|----|----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 60 | | | | | |
| 小鼠 | | | | | |
| MRIFAGIIIFTACCHLLRA FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKE | | | | | 60 |
| MRIFA IF HLL AFT+T PKDLYVVEYGSN+T+EC+FPVE++LDL | | | | | |
| AL+VYWE E | | | | | |
| 人 | | | | | |
| MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME | | | | | 60 |
| 小鼠 | | | | | |
| DEQVIQFVAGEEDLK PQHSNFRGRASLPKDQLLKGNALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGG | | | | | 120 |
| D+ +IQFV GEEDLK QHS++R RA L KDQL GNAALQITDVKLQDAGV | | | | | |
| C+ISYGG | | | | | |
| 人 | | | | | |
| DKNIIQFVHGEEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG | | | | | 120 |
| 小鼠 | | | | | |
| ADYKRITLKV NAPYRKINQRI- SVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRS | | | | | 179 |
| ADYKRIT+KVNAPY KINQRI VDP TSEHEL CQAEGYP+AEVIWT+SDHQ | | | | | |
| +SGK + | | | | | |
| 人 | | | | | |
| ADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT | | | | | 180 |
| 小鼠 | | | | | |
| VTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNR | | | | | 237 |
| T S+ E L NVTS+LR+N T N++FYCTF R P +NHTAEL+IP | | | | | |
| 人 | | | | | |
| TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPGNILNVSIKI- | | | | | 237 |

图2C

```

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkalyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag
vyrcmisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdvptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrl dpeenh taelvipgni
lnvsikiclt
241 lspst (SEQ ID NO:46)

```

图2D

```

FT VTVPKALYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYNKINQR ILVVDVPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:47)

```

图2E

```

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkrlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag
vyrcmisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrlldpeenh taelvipgni
lnvsikiclt
241 lspst (SEQ ID NO:48)

```

图2F

```

FT VTPKRLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:48)

```

图2G

```

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aaldvyweme
61 dkniiqfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag
vyrcmisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrlldpeenh taelvipgni
lnvsikiclt
241 lspst (SEQ ID NO:50)

```

图2H

```

FT VTPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALDVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:50)

```

图2I

```

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
aalivyweme
61 dkniidfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag
vyrcmisygg
121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
dhqvlsgktt
181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrlldpeenh taelvipgni
lnvsikiclt
241 lspst (SEQ ID NO:52)

```

图2J

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIDVFVHG
 EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
 NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
 FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:53)

图2K

1 mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl
 aalivyweme
 61 dkniiqfvhg erdlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag
 vyrcmisyyg
 121 adykritvkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts
 dhqvlsgktt
 181 ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldpeenh taelvipgni
 lnvsikiclt
 241 lspst (SEQ ID NO:54)

图2L

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
ERD LKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
 NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL
 FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:55)

图2M

小家鼠 PD-1 (SEQ ID NO:56)

1 mwvrqvpwsf twavlqlswq sgwllevpng pwrsltfypa wltvsegana
 tftcslsnws
 61 edlmlnwnrl spsnqtekqa afcnglsqpv qdarfqiiql pnrhdfhmni
 ldtrrndsgi
 121 ylcgaislhp kakieespga elvvterile tstrypspsp kpegrfqgm
 igimsalvgi
 181 pvllllawal avfcstsmse argagskddt lkeepsaapv psvayeeldf
 qgrektelp
 241 tacvhteyat ivfteglgas amgrrgsadg lggprpprhe dghcswpl

图3A

智人 PD-1 (SEQ ID NO:57)

```

1  mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvttegna
tftcsfsnts
61  esfvlnwurm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv
vrarrndsgt
121 ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqlv
vgvvgllgs
181 lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw
rektpeppvp
241 cvpeqteyat ivfpsgmgtS sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl

```

图3B

小家鼠 B7-1 (SEQ ID NO:58)

```

1  macncqlmqd tpllkfpcpr lillfvllir lsqvssdvde qlsksvkdkv
llpcrynsph
61  edesedriyw qkhdkvvlsv iagklkvwpe yknrtlydnt tysliilglv
lsdrgtyscv
121 vqkkergtye vkhllalvklS ikadfstpni tesgnpsadt kritcfasgg
fpkprfswle
181 ngrelpgint tisqdpesel ytissqldfn ttrnhtikcl ikygdahvse
dftwekpped
241 ppdskntlvl fgagfgavit vvvivviikc fckhrscfrr neasretnns
ltfgpeeala
301 eqtvfl

```

图3C

智人 B7-1 (CD80) (SEQ ID NO:59)

```

1  mghtrrqgts pskcpylnff qlllvlaglsh fcsgvihvtk evkevatlsc
ghnvsveela
61  qtريwqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnls ivilalrpsd
egtyecvvlk
121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe
phlswlengE
181 elnainttvs qdpetelyav sskldfnmtt nhsfmcliky ghlrvnqtfn
wnttkqehfp
241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv

```

图3D

GenBank 3S7G_A智人 **IgG1 Fc** (SEQ ID NO:60)

227 aa

```
1 dkthtcppcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
pevkfnwyvd
61 gvevhnaktk preeqynsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkalka
piektiskak
121 gqprepqvvt lpsrdeltn nqvsiltclvk gfypsdiave wesngqpenn
ykttppvlds
181 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk
```

GenBank AAN76044智人 **IgG2 Fc** (氨基酸 99-325) (SEQ ID NO:61)

227 aa

```
1 stkgpsvfpl apcsrsts taalgclvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh
tfpavlgssg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpsn tkvdktkverk ccvecppcpa
ppvagpsvfl
121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vqfnwyvdgv evhnaktkpr
eeqfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisktkgq prepqvlytlp
psreemtknq
241 vsiltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk ttpmldsdg sfflyskltv
dksrwqqgnv
301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk
```

GenBank AAW65947智人 **IgG3 Fc** (氨基酸 19-246) (SEQ ID NO:62)

238 aa

```
1 hkpsntkvdk rvelktplgd tthtcpcpa pellggpsvf lfppkpkdtl
misrtpevtc
61 vvvdvshedp evkfnwyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vsvltvlhq
dwlngkeykc
121 kvsnkalkap iektiskakg qprepqvlytl ppsrdeltn qvsiltclvkg
fypsdiavew
181 esngqpenny kttppvldsd gsfflysklt vdksrwqqgn vfscsvmhea
lhnhytqksl
241 slspgk
```

图4A

GenBank AAA52770

智人 **IgD** Fc (氨基酸 162-383) (SEQ ID NO:63)

222 aa

```
1 ptkapdvfpi isgcrhpkdn spvvlaclit gyhptsvtvt wymgtqsqpq
rtfpeiqrdd
61 syymtssqls tplqqwrqge ykcvvghtas kskkeifrwp espkaqassv
ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkkekekeeq eeretktpec pshtqplgvy
lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgSDLkdah ltwevagkvp tggveeglle rhsngsqsqh
srllprslw
241 nagtsvtctl nhpslppqrl malrepaaqa pvklslnlla ssdppeaasw
llcevsgfsp
301 pnillmwled qrevntsgfa parppppqprs ttfwawsvlr vpappspgpa
tytcvvhshed
361 srlllnasrs levsyvtdhg pmk
```

GenBank 0308221A

智人 **IgM** Fc (SEQ ID NO:64)

276 aa

```
1 vtstltikzs dwlgesmftc rvdhrglftq qnassmcvdpd qdtairvfai
ppsfasiflt
61 kstklclvt dltybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavge
asicedbdws
121 gerftctvth tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbvylppa rzzlnlresa
titclvtgfs
181 padvfvevmq rgeplspqky vtsapmpepq apgryfahsi ltvseeewnt
ggtytcvvhah
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvslvmsd tagtcy
```

图4B

GenBank P01876

智人 **IgA** Fc (氨基酸 120-353) (SEQ ID NO:65)

234 aa

```

1 asptspkvfp lslcstqpdg nvviaclvqg ffpqeplsvt wsesgqgvta
rnfppsqqdas
61 gdlyttssql tlpatqclag ksvtchvkhy tnpsqdvtp cpvpstpptp
spstpptpsp
121 scchprlslh rpaledlllg seanltctlt glrdasgvtf twtpssgksa
vqgpperdlc
181 gcysvssvlp gcaepwnhgk tftctaaype sktpltatls ksgntfrpev
hllpppseel
241 alnelvtltc largfspkdv lvrwlqgsqe lprekyltwa srqepsqgtt
tfavtsilrv
301 aaedwkkgt fscmvgheal plaftqktid rlagkpthvn vsvmaevdg
tcy

```

GenBank 1F6A_B

智人 **IgE** Fc (氨基酸 6-222) (SEQ ID NO:66)

212 aa

```

1 adpcdsnprg vsaylsrsp fdlfirkspt itclvvdlap skgtvnltws
rasgkpvnhs
61 trkeekqrng tltvtstlpv gtrdwieget yqcrvthphl pralmrsttk
tsgpraapev
121 yafatpewpg srdkrtlacl ignfmpedis vqwlhnevql pdarhsttqp
rktkgsqgffv
181 fsrlevtrae weqkdeficr avheaaspsq tvqravsvnp gk

```

GenBank P01861

智人 **IgG4** Fc (氨基酸 100-327) (SEQ ID NO:67)

228 aa

```

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsqaltsgv
htfpavllqss
61 glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdkhps ntkvdkrves kygpccpccp
apeflggpsv
121 flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed pevqfnwyvd gvevhnaktk
preeqfnsty
181 rvvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkglps siektiskak gqprepqvvt
lpssqeemtk
241 nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysrl
tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alnhnytqks lsllslgk

```

图4C

智人
GenBank NP_001229687
HLA-A
氨基酸 25-365 (SEQ ID NO:68)

```
1 mavmaprtll lllsgalalt qtwagshsmr yfftsvsrpg rgeprfiavg
yvddtqfvrf
61 dsdaasqkme prapwieqeg peywdqetrn mkahsqtdra nlgtlrgyyn
qsedgshtiq
121 imygcdvgpd grflrgyrqd aydgkdyial nedlrswwta dmaaqitkrk
weavhaaeqr
181 rvylegrcvd glrrylengk etlqrtdppk thmthhpisd heatlrcwal
gfypaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdgtfkwaa vvvpsgeeqr ytchvqhegl
pkpltlrwel
301 ssqptipivg iiaglvllga vitgavvaav mwrrkssdrk ggsytqaass
dsaqgsdvs1
361 tackv
```

图5A

智人
GenBank NP_005505
HLA-B
氨基酸 25-362 (SEQ ID NO:69)

```
1 mlvmaprtvl lllsaalalt etwagshsmr yfytsvsrpg rgeprfisvg
yvddtqfvrf
61 dsdaaspree prapwieqeg peywdrntqi ykaqaqtdre slrnlrgyyn
qseagshtlq
121 smygcdvgpd grllrghdqy aydgkdyial nedlrswwta dtaaaitqrk
weaareaeqr
181 raylegecve wlrrylengk dkleradppk thvthhpisd heatlrcwal
gfypaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdrtfkwaa vvvpsgeeqr ytchvqhegl
pkpltlrwep
301 ssqstvipivg ivaglavlav vvigavvaav mcrkssggk ggsysqaacs
dsaqgsdvs1
361 ta
```

图5B

智人
GenBank NP_001229971
HLA-C
氨基酸 25-366 (SEQ ID NO:70)

```
1 mrvmaprall lllsgglalt etwacshsmr yfdtavsrpg rgeprfisvg  
yvddtqfvrf  
61 dsdaasprge prapwveqeg peywdretqn ykrqaqadv slrnlrgyyn  
qsedgshtlq  
121 rmygcdlgpd grllrgydqs aydgkdyial nedlrswtaa dtaaquitqrk  
leaaraaeql  
181 raylegtcve wlrrylengk etlqraepk thvthhplsd heatlrcwal  
gfypaeitlt  
241 wqrdgedqtq dtelvetra gdgtfkwaa vvpvsgqeqr ytchmqhegl  
qepltlswep  
301 ssqptipimg ivaglavlvv lavlgavvta mmcrrkssgg kggscsqaac  
snsaggsdes  
361 litcka
```

图5C

```

NP_004039.1      MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGHFPSDIEVDLL 60
NP_001009066.1  MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGHFPSDIEVDLL 60
NP_001040602.1  MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGHFPSDIEVDLL 60
NP_776318.1     MARFVALVLLGLLSLSGLDAIQRPKIQVYSRHPPEDEGKPNYLNCYVGFHPPQIEIDLL 60
NP_033865.2     MARSVTLVFLVLSLTGLYAIQKTPQIQVYSRHPPEDEGKPNILNCYVTFHPPHIEIQML 60
*:* *:* * *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:*
*:* *:* * *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:*

NP_004039.1      KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYTEFTTEKDEYACRVNHVTLTSLQPKIVKWRDRM 119
NP_001009066.1  KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYTEFTTEKDEYACRVNHVTLTSLQPKIVKWRDRM 119
NP_001040602.1  KNGEKMGKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYTEFTNEKDEYACRVNHVTLTSLGERTVKNWRDRM 119
NP_776318.1     KNGEKI-KSEQDLSFSKDWSEFYLLSHAEFTPNKQYSCRKVKHVTLTSLQPKIVKWRDRDL 118
NP_033865.2     KNGKKIKVEMSDMSFSKDWSEFYLLAHTTEFTTETDTYACRVKHASMAEPTVYWRDRM 119
***::: * * *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:*

```

图6

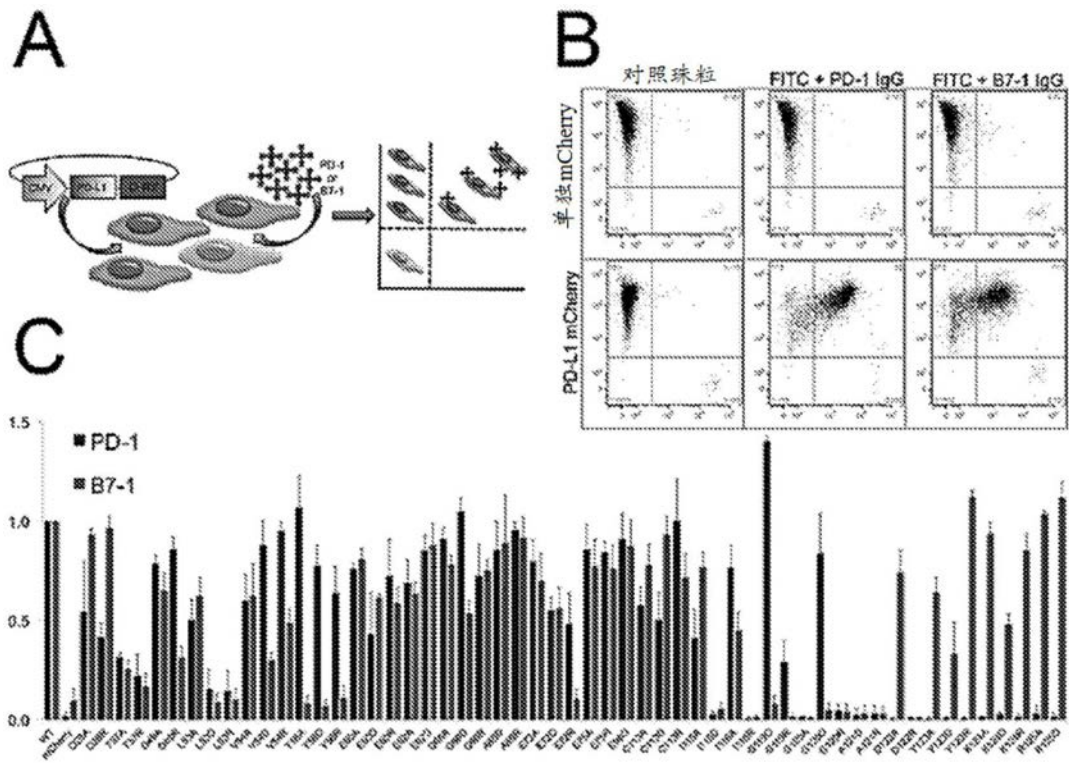


图7

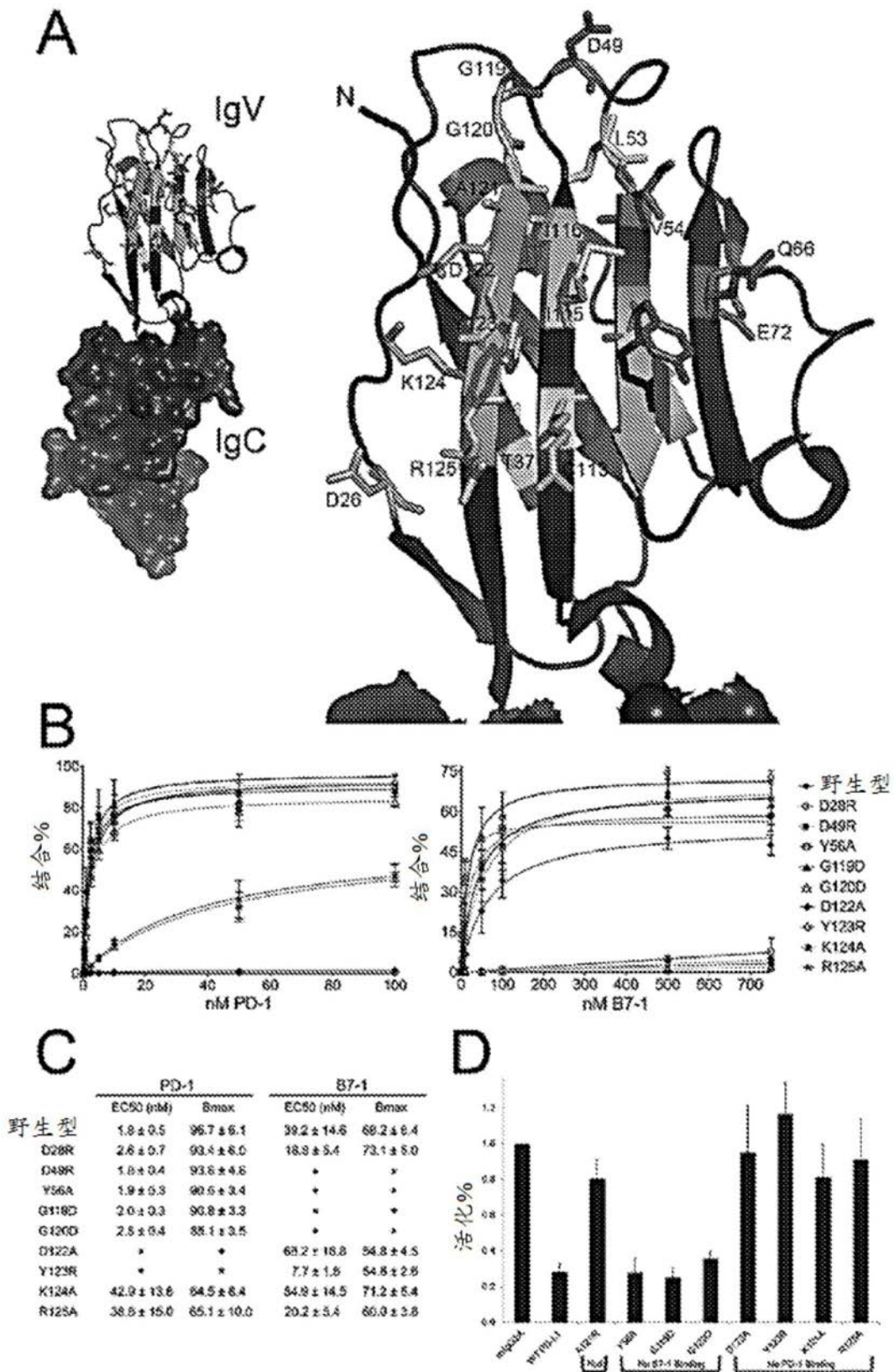


图8

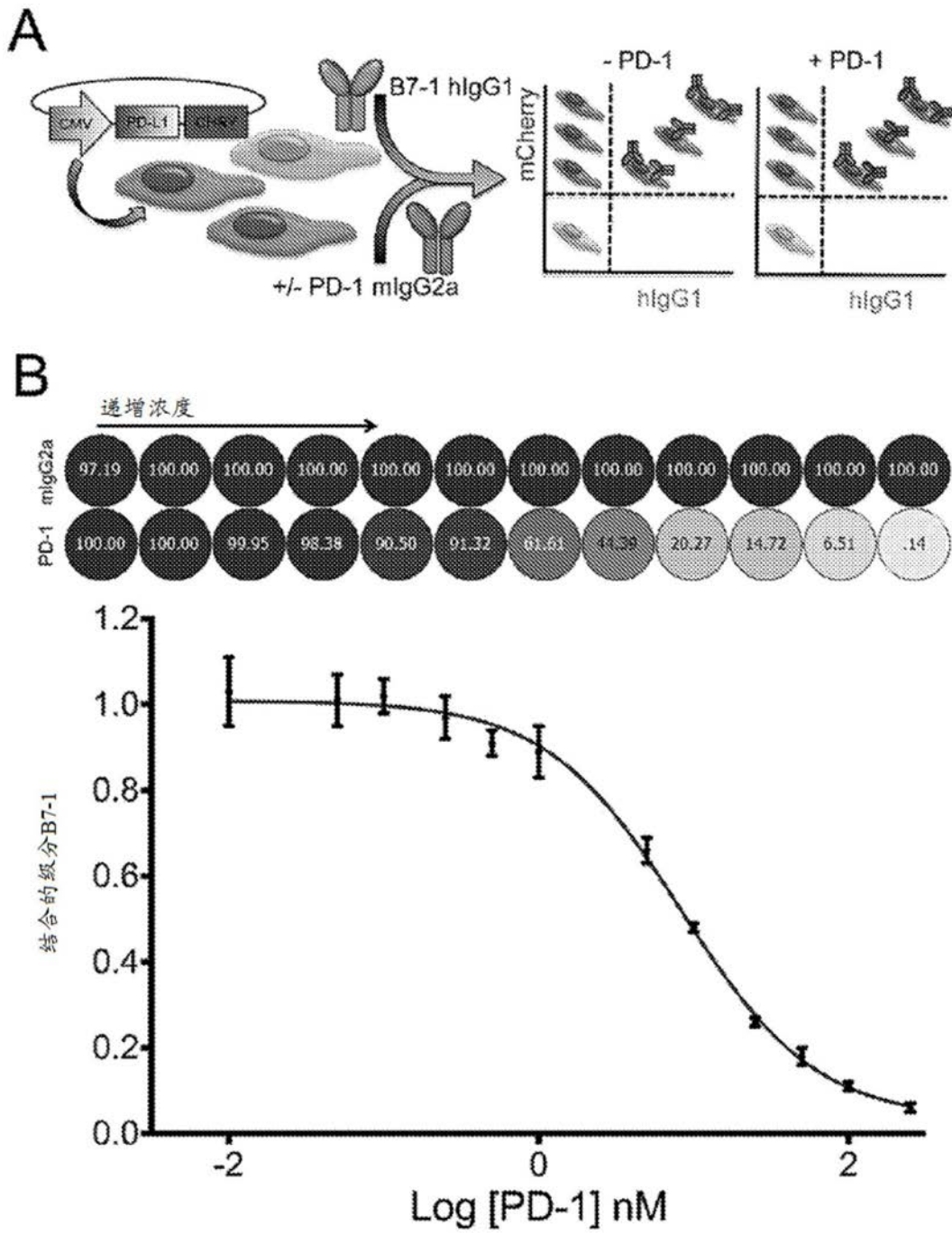


图9

| | PD-1 | B7-1 |
|---------|-------------|-------------|
| WT | + | + |
| mCherry | - | - |
| D49A | + | + |
| D49R | + | R |
| L53R | - | - |
| V54D | R | R |
| V54A | + | + |
| Y56A | + | - |
| Y56D | + | - |
| Q66A | + | + |
| Q66D | + | R |
| E72A | + | + |
| E72R | + | - |
| G119D | + | - |
| G119R | - | - |
| G120D | + | - |
| A121R | - | - |
| D122A | - | + |
| Y123A | - | + |
| Y123R | - | + |
| K124A | - | + |
| K124D | - | + |
| R125A | R | + |
| R125D | - | + |

图10

| | PD-1 | B7-1 |
|---------|-------------|-------------|
| WT | 1.00 | 1.00 |
| mCherry | 0.02 ± 0.02 | 0.10 ± 0.06 |
| D26A | 0.54 ± 0.26 | 0.93 ± 0.03 |
| D26R | 0.42 ± 0.07 | 0.96 ± 0.06 |
| T37A | 0.31 ± 0.03 | 0.26 ± 0.04 |
| T37R | 0.22 ± 0.11 | 0.17 ± 0.07 |
| D49R | 0.86 ± 0.06 | 0.31 ± 0.06 |
| L53D | 0.16 ± 0.10 | 0.09 ± 0.04 |
| L53R | 0.14 ± 0.10 | 0.10 ± 0.05 |
| V54D | 0.88 ± 0.12 | 0.30 ± 0.04 |
| V54R | 0.95 ± 0.04 | 0.49 ± 0.07 |
| Y56A | 1.07 ± 0.16 | 0.08 ± 0.04 |
| Y56D | 0.77 ± 0.10 | 0.07 ± 0.03 |
| Y56R | 0.64 ± 0.13 | 0.11 ± 0.06 |
| Q66D | 1.05 ± 0.07 | 0.54 ± 0.06 |
| E72D | 0.55 ± 0.07 | 0.56 ± 0.10 |
| E72R | 0.48 ± 0.15 | 0.11 ± 0.05 |
| I115D | 0.02 ± 0.01 | 0.05 ± 0.03 |
| I116R | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| G119D | 1.40 ± 0.20 | 0.08 ± 0.04 |
| G119R | 0.29 ± 0.10 | 0.02 ± 0.01 |
| G120A | 0.02 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| G120D | 0.84 ± 0.20 | 0.05 ± 0.04 |
| G120R | 0.05 ± 0.03 | 0.04 ± 0.04 |
| A121D | 0.03 ± 0.03 | 0.03 ± 0.03 |
| A121R | 0.03 ± 0.03 | 0.03 ± 0.03 |
| D122A | 0.01 ± 0.01 | 0.74 ± 0.12 |
| D122R | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| Y123A | 0.01 ± 0.01 | 0.65 ± 0.08 |
| Y123D | 0.01 ± 0.01 | 0.33 ± 0.16 |
| Y123R | 0.01 ± 0.01 | 1.12 ± 0.04 |
| K124A | 0.02 ± 0.01 | 0.94 ± 0.06 |
| K124D | 0.03 ± 0.01 | 0.48 ± 0.05 |
| K124R | 0.02 ± 0.01 | 0.85 ± 0.08 |
| R125A | 0.03 ± 0.04 | 1.03 ± 0.02 |
| R125D | 0.02 ± 0.01 | 1.12 ± 0.08 |

图11

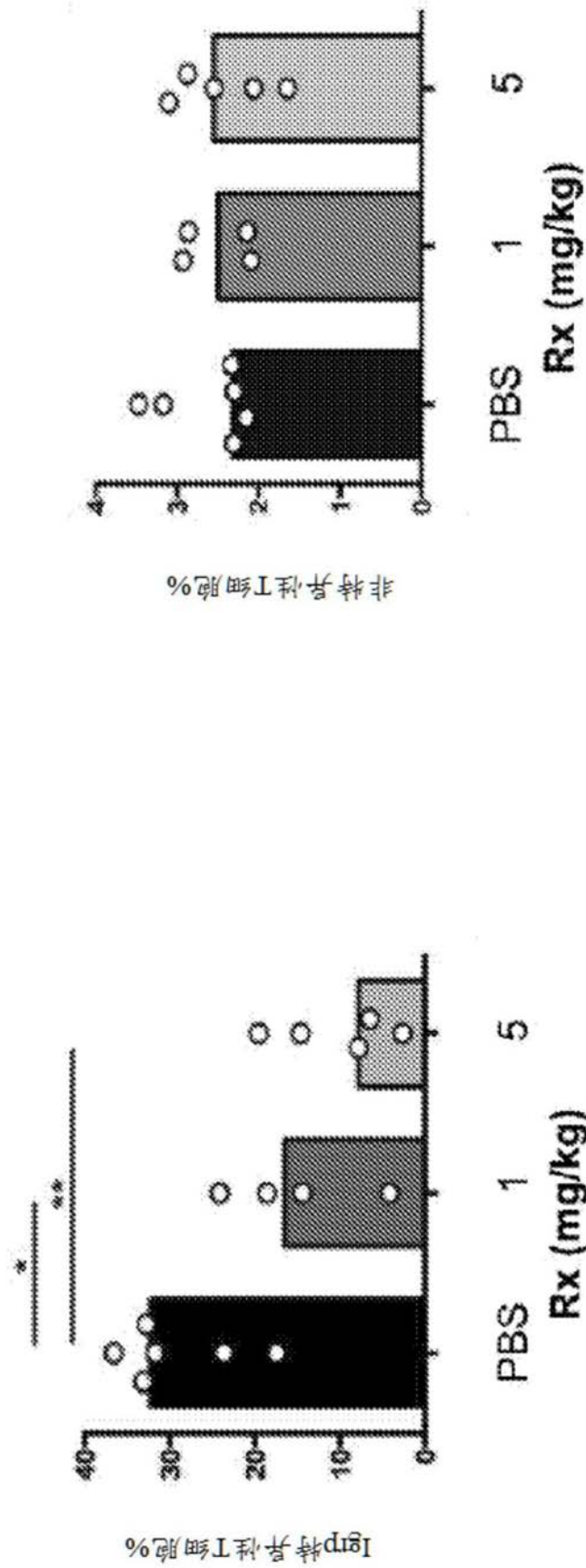


图12