(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992174 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.17

(22) Дата подачи заявки
2018.03.13

(51) Int. Cl. ***C07K 14/705*** (2006.01)

(54) ВАРИАНТЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ CD80 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

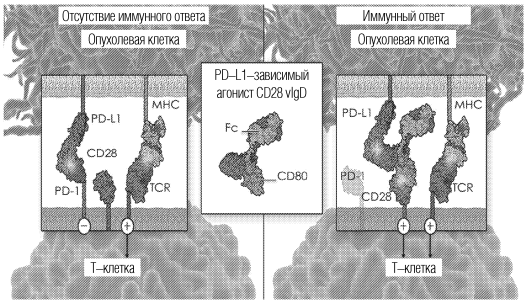
(31) **62/472,554; 62/472,558; 62/472,569; 62/472,572; 62/472,573; 62/475,204; 62/537,939; 62/574,165; 62/582,266**
(32) **2017.03.16; 2017.03.16; 2017.03.16; 2017.03.16; 2017.03.17; 2017.03.22; 2017.07.27; 2017.10.18; 2017.11.06**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/022270**
(87) **WO 2018/170026 2018.09.20**
(88) **2018.10.18**

(71) Заявитель:
ЭЛПАЙН ИММЬЮН САЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Свонсон Райан, Корнакер Майкл, Маурер Марк Ф., Ардурел Дэн, Демонт Дэниэл Уилльям, Куийпер Джозеф Л. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к вариантам полипептидов CD80, иммуномодулирующим белкам, содержащим варианты полипептидов CD80, и нуклеиновым кислотам, кодирующим такие белки. Иммуномодулирующие белки обладают терапевтической применимостью в отношении различных иммунологических и онкологических заболеваний. Настоящее изобретение относится к композициям и способам для получения и применения таких белков.



201992174 A1

201992174 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–558557EA/032

ВАРИАНТЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ CD80 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной патентной заявке США № 62/472558, поданной 16 марта 2017 года, временной патентной заявке США № 62/472569, поданной 16 марта 2017 года, временной патентной заявке США № 62/472554, поданной 16 марта 2017 года, временной патентной заявке США № 62/472572, поданной 16 марта 2017 года, временной патентной заявке США № 62/472573, поданной 17 марта 2017 года, временной патентной заявке США № 62/475204, поданной 22 марта 2017 года, временной патентной заявке США № 62/537939, поданной 27 июля 2017 года, временной патентной заявке США № 62/574165, поданной 18 октября 2017 года, и временной патентной заявке США № 62/582266, поданной 6 ноября 2017 года, содержание каждой из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка подана вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в виде файла, названного 761612001640SeqList.txt, созданного 12 марта 2018 года и имеющего размер 4888576 байт. Информация в электронном формате списка последовательностей включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям для модуляции иммунного ответа при лечении злокачественных новообразований и иммунологических заболеваний. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конкретным вариантам CD80, демонстрирующим измененное связывание, например, аффинность или селективность связывания, с когнатным партнером по связыванию, такую как повышенная аффинность к CTLA–4 и/или PD–L1 и/или сниженная аффинность к CD28.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Модуляция иммунного ответа посредством вмешательства в процессы, происходящие в иммунологическом синапсе (IS), образованном антигенпрезентирующими клетками (АПК) или клетками–мишенями и лимфоцитами, вызывает все возрастающий интерес в области медицины. С механистической точки зрения, белки поверхности клетки в IS могут вызывать координированное и зачастую одновременное взаимодействие множества белковых мишеней с одним белком, с которым они связываются. Взаимодействия в IS происходит в области тесного соединения двух клеток, и отдельный белок в этой структуре может взаимодействовать и с белком на той же клетке (цис), и с белком на связанной клетке (транс), вероятно, одновременно. Хотя известно, что терапевтические средства могут модулировать IS, необходимы улучшенные

терапевтические средства. Настоящее изобретение относится к иммуномодулирующим белкам, включая растворимые белки или трансмембранные иммуномодулирующие белки, способным экспрессироваться на клетках и удовлетворяющим эту потребность.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту полипептида CD80, содержащему IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте соответствуют положениям 26, 35, 46, 57 и/или 71 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В любом из вариантов осуществления модификация аминокислоты является заменой, инсерцией или делецией аминокислоты.

[0006] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, E23D, E23G, A26E, A26P, A26S, A26T, I30F, I30T, I30V, K34E, E35D, E35G, D46E, D46V, P51A, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, L65P, A71D, A71G, R73H, R73S, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, C82R, V84A и V84I, где положения модификаций аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0007] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 по изобретению содержит одну или более дополнительных модификаций в одном или более положениях, соответствующих положениям 7, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительные модификации включают одну или более замен аминокислот в CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30F, I30T, I30V, Y31S, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N48H, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, K54E, K54N, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, L65P, I67L, I67V, V68E, V68L, I69F, L70M, L70P, L70Q, A71D, A71G, L72V, R73H, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, E88V, F92S, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0008] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот выбраны из: I30F/L70P, Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, A71D, T13A/I61N/A71D, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, Q33R/K54N/T57I/I67V/A71D, E35D/T57I/L70Q/A71D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, V22A/E35D/V68E/A71D, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G,

R29H/E35D/M43V/M47I/I49V, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, I30V/Y31C/E35D/M47V/A71G/L85M, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, T13R/H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/E35D/M47L/V68M, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, H18Y/A26E/E35D/M47L, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/A71G, H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/D90G, H18Y/A26E/M47L/A71G, H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/M47L/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G, H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/V68M/D90G, H18Y/A26E/A71G/D90G, H18Y/E35D, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V,

H18Y/E35D/M47L/V68M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/A71G, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/D90G, H18Y/E35D/M47V/N48K, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G, H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/D90G, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/E35D/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G, H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/D90G, H18Y/M47L/A71G/D90G, H18Y/V68M/A71G/D90G, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, V22A/E35D/M47L/A71G, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, A26E/E35D/M47L/V68M, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, A26E/E35D/M47L/A71G, A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G, A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/D90G, A26E/E35D/A71G/D90G, A26E/M47L/V68M/A71G, A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, A26E/M47L/V68M/D90G, A26E/M47L/A71G/D90G, A26E/V68M/A71G/D90G, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q27H/E35D/M47I, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, Q33R/M47V/T62N/A71G, E35D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, E35D/T41S/N48T, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/D46E, E35D/D46E/M47I, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46V, E35D/D46V/M47L, E35D/D46V/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/V68M/E88D, E35D/D46V/M47L/V68M/K89N, E35D/D46V/M47L/V68M/D90G, E35D/D46V/M47L/L70M, E35D/D46V/M47L/L70M/L85Q, E35D/D46V/M47L/L85Q, E35D/D46V/M47V/N48K/V68M, E35D/D46V/M47V/V68M/K89N, E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q, E35D/D46V/V68M, E35D/D46V/V68M/L85Q, E35D/D46V/L85Q, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47L/V68M, E35D/M47L/V68M/A71G, E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, E35D/M47L/V68M/D90G, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/V68M/L85Q, E35D/M47L/L70M,

E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G/L85M, E35D/M47L/A71G/D90G, E35D/M47L/L85Q, E35D/M47V, E35D/M47V/N48K, E35D/M47V/N48K/V68M, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/L85M, E35D/M47V/N48K/K89N, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/T62S/L85Q, E35D/M47V/V68M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N, E35D/M47V/V68M/K89N, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/K89N, E35D/N48K, E35D/N48K/V68M, E35D/N48K/V68M/K89N, E35D/N48K/L72V, E35D/N48K/K89N, E35D/V68M, E35D/V68M/A71G/D90G, E35D/V68M/L85Q, E35D/V68M/K89N, E35D/L85Q, E35D/K89N, E35D/L97R, M43I/M47L/A71G, D46V, D46V/M47I/A71G, D46V/M47L, D46V/M47L/V68M, D46V/M47L/V68M/L85Q, D46V/M47L/L85Q, D46V/V68M, D46V/V68M/L85Q, D46V/L85Q, M47I/A71G, M47L, M47L/V68M, M47L/V68M/A71G/D90G, M47L/V68M/L85Q, M47L/L85Q, M47V, M47V/N48K, M47V/N48K/V68M, M47V/N48K/V68M/K89N, M47V/N48K/K89N, M47V/V68M, M47V/V68M/K89N, M47V/K89N, N48K, N48K/V68M, N48K/V68M/K89N, N48K/K89N, V68M, V68M/L85Q, V68M/K89N, L85Q, K89N и delE10–A98, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0009] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту полипептида CD80, содержащему IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, T28Y, I30F, I30T, I30V, Y31C, Y31S, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54E, K54N, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61V, T62A, T62N, N63D, L65P, I67L, I67V, V68E, V68L, I69F, L70M, L70P, L70Q, A71D, A71G, L72V, R73H, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87Q, E88V, F92S, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0010] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 по изобретению содержит одну или более дополнительных модификаций в одном или более положениях, соответствующим положениям 7, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительные модификации включают одну или более замен

аминокислот в CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, A12T, A12V, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18L, H18Y, V20A, V20I, V22A, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, T28Y, R29H, I30F, I30T, I30V, Y31C, Y31H, Y31S, Q33E, Q33H, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, K37E, M38T, M38V, T41A, T41S, M42I, M42V, M43I, M43L, M43T, M43V, S44P, D46E, D46V, M47I, M47L, M47T, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, K54E, Y53F, Y53H, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61N, I61V, T62A, T62N, T62S, N63D, L65P, I67L, I67T, V68A, V68L, V68M, I69F, I69T, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73S, P74S, D76H, E77GE77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V83A, V83I, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86E, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87N, Y87Q, E88D, E88V, E88G, K89E, K89N, D90G, D90N, A91S, A91T, A91V, F92L, F92S, F92V, F92Y, K93E, K93R, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97M, L97Q, E95V и L97R, где положения замен аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0011] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислоты выбраны из: I30F/L70P, Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, A71D, E81K/A91S, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q,

S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, V22A/E35D/V68E/A71D, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, R29H/E35D/M43V/M47I/I49V, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, I30V/Y31C/E35D/M47V/A71G/L85M, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L,

E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E35D/M47L/L70M, E35D/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V68M/E88D, E35D/D46V/M47L/V68M/D90G, E35D/D46V/M47L/V68M/K89N, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V70M, E35D/D46V/M47L/V70M/L85Q, E35D/M47V/N48K/V68M, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, E35D/D46V, E35D/V68M, E35D/L85Q, D46V/M47L, D46V/V68M, D46V/L85Q, M47L/V68M, M47L/L85Q, V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L, E35D/D46V/V68M, E35D/D46V/L85Q, E35D/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M, D46V/M47L/L85Q, D46V/V68M/L85Q, M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/L85Q, E35D/D46V/V68M/L85Q, E35D/M47L/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/N48K, E35D/K89N, M47V/N48K, M47V/V68M, M47V/K89N, N48K/V68M, N48K/K89N, E35D/M47V/N48K, E35D/M47V/V68M, E35D/M47V/K89N, E35D/N48K/V68M, E35D/N48K/K89N,

E35D/V68M/K89N, M47V/N48K/V68M, M47V/N48K/K89N, M47V/V68M/K89N, N48K/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/K89N, E35D/M47V/V68M/K89N, E35D/N48K/V68M/K89N, M47V/N48K/V68M/K89N, E35D/D46V/M47V/N48K/V68M, E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47V/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q, E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M, A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G, M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L, E35D/V68M/A71G/D90G, E35D/M47L/A71G/D90G, E35D/M47L/V68M/D90G, E35D/M47L/V68M/A71G, A26E/V68M/A71G/D90G, A26E/M47L/A71G/D90G, A26E/M47L/V68M/D90G, A26E/M47L/V68M/A71G, A26E/E35D/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G, A26E/E35D/M47L/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M, H18Y/M47L/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/A71G/D90G, H18Y/E35D/V68M/D90G, H18Y/E35D/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G, H18Y/E35D/M47L/V68M, H18Y/A26E/V68M/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/D90G, H18Y/A26E/M47L/A71G, H18Y/A26E/M47L/V68M, H18Y/A26E/E35D/A71G и H18Y/A26E/E35D/V68M, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0012] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот выбраны из V20I, V22I, V22L, A26E, Q27H, Q33L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M43L, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N55D, T57I, I61V, L70M, A71D, A71G, L72V и L85M, L85Q, R94W и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот выбраны из V20I, V22L, A26E, Q27H, Q33L, Q33R, E35D, E35G, M47I, D46E, D46V, M47L, M47V, T57I, L70M, A71D, A71G, L72V и L85M, L85Q, L97Q, или одна или более модификаций аминокислот выбраны из A26E, Q33L, E35D, M47I, M47L,

M47V, T57I, L70M, A71D, A71G и L85Q; или одна или более модификаций аминокислот выбраны из A26E, E35D, D46V, M47L, M47V, L70M, A71G и L85Q; или одна или более модификаций аминокислот включают A26E; или одна или более модификаций аминокислот включают E35D; или одна или более модификаций аминокислот включают D46V; или одна или более модификаций аминокислот включают M47L; или одна или более модификаций аминокислот включают M47V; или одна или более модификаций аминокислот включают A71G, где положения замен аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот выбраны из A26E, Q33L, E35D, M47I, M47L, M47V, T57I, L70M, A71D, A71G и L85Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0013] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту полипептида CD80, содержащему IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, где модификации аминокислот включают E35D/D46E, E35D/D46V, E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/M47V, E35D/V68M, E35D/A71G или E35D/D90G; D46E/M47I, D46E/M47L, D46E/M47V, D46E/V68M, D46E/A71G или D46E/D90G; M47I/V68M, M47I/A71G, M48I/D90G; M47L/V68M, M47L/A71G, M47L/D90G; M47V/V68M, M47V/A71G, M47V/D90G; V68M/A71G или V68M/D90G; A71G/D90G; или E35D/M47I/V68M, E35D/M47L/V68M, E35D/M47V/V68M,

где положения модификаций аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0014] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту полипептида CD80, содержащему IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, включающих по меньшей мере замену аминокислоты L70P, но не включающих замены аминокислот V68M, L72P и/или K86E, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот выбраны из: L70P, I30F/L70P, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, N55D/L70P/E77G и L70P/F92S.

[0015] В некоторых вариантах осуществления немодифицированный CD80 является CD80 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления CD80 является CD80 человека.

[0016] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит: IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент и IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

[0017] В некоторых вариантах осуществления немодифицированный CD80

содержит (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2; или (iii) является ее частью, содержащей IgV–домен, или IgC–домен, или их специфически связывающиеся фрагменты. В некоторых вариантах осуществления специфически связывающийся фрагмент IgV–домена или IgC–домена имеет длину по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более аминокислот; специфически связывающийся фрагмент IgV–домена имеет длину, составляющую по меньшей мере 80% длины IgV–домена, приведенного как аминокислоты 35–135, 35–138, 37–138 или 35–141 SEQ ID NO: 1; или специфически связывающийся фрагмент IgC–домена имеет длину, составляющую по меньшей мере 80% длины IgC–домена, приведенного как аминокислоты 145–230, 154–232 или 142–232 SEQ ID NO: 1.

[0018] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот, необязательно, замен, инсерций и/или делеций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит последовательность аминокислот, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2 или его специфически связывающемуся фрагменту.

[0019] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует измененное связывание с эктодоменом CTLA–4, PD–L1 и/или CD28 по сравнению со связыванием немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4, PD–L1 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления измененное связывание представляет собой измененную аффинность связывания и/или измененную селективность связывания.

[0020] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его конкретный фрагмент и IgC–домен или его конкретный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507 и 2930–2960, или ее специфически связывающегося фрагмента, или аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507 и 2930–2960 или ее специфически связывающемуся фрагменту, содержащему одну или более замен аминокислот.

[0021] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент. В некоторых вариантах осуществления IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

[0022] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929 и 2961–3022 или ее специфически связывающийся

фрагмент, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929 и 2961–3022, или ее специфически связывающемуся фрагменту, содержащему одну или более замен аминокислот.

[0023] В некоторых вариантах осуществления IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

[0024] В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 демонстрирует измененную аффинность связывания и/или измененную селективность связывания с эктодоменом CTLA4, PD–L1 или CD28, по сравнению со специфичностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA4, PD–L1 или CD28. В некоторых вариантах осуществления CTLA–4 является CTLA–4 человека. В некоторых вариантах осуществления CD28 является CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления PD–L1 является PD–L1 человека.

[0025] В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом CTLA4 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA4. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность к эктодомену CTLA–4 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4.

[0026] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 35, 46, 57, 58, 71, 73, 79 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15T, C16R, V20I, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30V, Q33L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M42V, M43L, M43T, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, Y53F, K54E, K54R, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, I67L, V68E, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73H, P74S, T79I, T79M, E81G, E81K, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, E88V, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0027] В любом из представленных вариантов осуществления полипептид CD80 может демонстрировать повышенную аффинность связывания с эктодоменом CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28. В некоторых из таких вариантов осуществления повышенная аффинность к эктодомену CD28 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8

раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз или 200 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28. В некоторых из таких вариантов осуществления полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 23, 26, 35, 46, 55, 57, 58, 71, 79 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых из таких вариантов осуществления полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из T13R, S15T, V20I, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M42V, M43L, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N48K, N48Y, Y53F, K54E, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, I67L, V68E, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, T79I, T79M, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, E88V, R94Q, R94W, E95V и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0028] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1. В некоторых из таких вариантов осуществления повышенная аффинность к эктодомену PD–L1 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или 450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1. В некоторых из таких вариантов осуществления полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15T, C16R, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30T, I30V, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, L65P, I67L, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73S, P74S, D76H, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, F92S, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0029] В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 демонстрирует сниженную аффинность связывания с эктодоменом CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28. В некоторых вариантах

осуществления сниженная аффинность к эктодомену CD28 снижена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

[0030] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 специфически связывается с эктодоменом CTLA–4 с повышенной селективностью в отношении эктодомена CTLA–4 по сравнению с немодифицированным CD80. В некоторых из таких вариантов осуществления повышенная селективность включает более высокое соотношение связывания варианта полипептида с CTLA–4 и CD28 по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида CD80 с CTLA–4 и CD28. В некоторых из таких вариантов осуществления соотношение связывания CTLA–4 и CD28 выше по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более.

[0031] В любом из представленных вариантов осуществления вариант полипептида CD80 специфически связывается с эктодоменом PD–L1 с повышенной селективность в отношении эктодомена PD–L1 по сравнению с немодифицированным CD80. В некоторых из таких вариантов осуществления повышенная селективность включает более высокое соотношение связывания варианта полипептида с PD–L1 и CD28 по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида CD80 с PD–L1 и CD28. В некоторых из таких вариантов осуществления соотношение выше по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более.

[0032] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 является растворимым белком. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 соединяют с доменом мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 является мультимерным полипептидом, необязательно, димерным полипептидом, содержащим первый вариант полипептида CD80, соединенный с доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80, соединенный с доменом мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 отличаются.

[0033] В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации является Fc–доменом или его вариантом со сниженной эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 соединяют с функциональным фрагментом, повышающим биологическое время полужизни полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 соединяют с Fc–доменом или его вариантом со сниженной эффекторной функцией.

[0034] В некоторых вариантах осуществления Fc–домен принадлежит млекопитающему, необязательно, человеку; или вариант Fc–домена содержит одну или

более модификаций аминокислот по сравнению с немодифицированным Fc–доменом, принадлежащим млекопитающему, необязательно, человеку. В некоторых вариантах осуществления Fc–домен или его вариант содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 359 или SEQ ID NO: 1712, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 359 или SEQ ID NO: 1712. В некоторых вариантах осуществления Fc–домен содержит одну или более модификаций аминокислот, выбранных из E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, N297G, V302C и K447del, каждая из которых соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления Fc–область не является Fc IgG1 человека, содержащей мутации R292C, N297G и V302C (соответствующие R77C, N82G и V87C относительно Fc IgG1 человека дикого типа, приведенной в SEQ ID NO: 277). В некоторых вариантах осуществления Fc не является Fc, приведенной в SEQ ID NO: 356. В некоторых вариантах осуществления Fc–домен содержит модификацию аминокислоты C220S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления Fc–домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 356–358, 376 и 1713–1715, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 356–358, 376 и 1713–1715 и демонстрирующую сниженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 соединяют с доменом мультимеризации или Fc косвенно через линкер, необязательно, линкер GSG_4S (SEQ ID NO: 1716). В некоторых вариантах осуществления линкер не состоит из трех остатков аланина (AAA).

[0035] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, и увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент содержит домен мультимеризации, альбумин, альбумин–связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), C–концевой пептид (CTP) бета–субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные аминокислотные последовательности (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), альбумин–связывающее низкомолекулярное соединение или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент представляет собой или содержит Pro/Ala/Ser (PAS), и вариант полипептида CD80 является ПАСилированным. В некоторых вариантах осуществления увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент представляет собой или содержит домен мультимеризации. В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации выбран из Fc–области иммуноглобулина, лейциновой молнии, изолейциновой молнии или цинкового пальца.

[0036] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является мультимером, содержащим первый вариант полипептида CD80, соединенный с первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80, соединенный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй вариант полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления мультимер является димером. В некоторых вариантах осуществления первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления димер является гомодимером. В некоторых вариантах осуществления димер является гетеродимером.

[0037] В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc–область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc–область получают из белка иммуноглобулина G1 (IgG1) или иммуноглобулина G2 (IgG2). В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновый белок принадлежит человеку, и/или Fc–область принадлежит человеку. В некоторых вариантах осуществления Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 278, или ее вариант, демонстрирующий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 278. В некоторых вариантах осуществления Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 277, или ее вариант, демонстрирующий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 277.

[0038] В некоторых вариантах осуществления Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок демонстрирует Fc–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, в анализе стимуляции Т–клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток, необязательно, где Т–клетки включают клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2. В некоторых вариантах осуществления Fc–область демонстрирует одну или более сниженных эффекторных функций по сравнению с Fc–область дикого типа, необязательно, где Fc–область дикого типа является Fc человека из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления одна или более эффекторных функций выбрана из антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), обусловленной комплементом цитотоксичности, программируемой гибели клеток и клеточного фагоцитоза.

[0039] В некоторых вариантах осуществления Fc–область является вариантом Fc–области, содержащим одну или более замен аминокислот по сравнению с Fc–областью дикого типа. В некоторых из таких вариантов осуществления одна или более замен аминокислот в варианте Fc–области выбраны из Fc N297G, R292C/N297G/V302C, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K или L234A/L235E/G237A, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых вариантах

осуществления вариант Fc–области дополнительно содержит замену аминокислоты C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 356–358, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 356–358 и содержащую замены аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Fc–область содержит K447del, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1713–1715, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 1713–1715 и содержащую замены аминокислот.

[0040] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит любой из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании и демонстрирующих повышенную аффинность к PD–L1.

[0041] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок демонстрирует PD–L1–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, в анализе стимуляции Т–клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих PD–L1, необязательно, где Т–клетки включают клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2, или первичные Т–клетки человека, продуцирующие воспалительные цитокины, такие как ИЛ–2.

[0042] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующего белка вариант полипептида CD80 соединяют, прямо или косвенно через линкер, с доменом мультимеризации. В некоторых из таких вариантов осуществления линкер содержит от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из AAA, G4S (SEQ ID NO: 1717) или $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 330).

[0043] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 является трансмембранным иммуномодулирующим белком, дополнительно содержащим трансмембранный домен, соединенный с внеклеточным доменом (ECD) или специфически связывающимся фрагментом варианта полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную как остатки 243–263 SEQ ID NO: 1, или ее функциональный вариант, демонстрирующий по меньшей мере 85% идентичности последовательности по отношению к остаткам 243–263 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит цитоплазматический сигнальный домен, соединенный с трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную как остатки 264–288 SEQ ID NO: 1, или ее функциональный вариант, демонстрирующий по меньшей мере 85% идентичности

последовательности по отношению к остаткам 254–288 SEQ ID NO: 1.

[0044] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления вариант полипептида CD80 модулирует ответ иммунной клетки, такой как Т–клетка. В некоторых вариантах осуществления ответ, например, Т–клеточный ответ, повышают или снижают. В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 повышают экспрессию ИФН–гамма (интерферона гамма) относительно немодифицированного CD80 в анализе первичных Т–клеток in vitro. В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 снижает экспрессию ИФН–гамма (интерферона гамма) относительно немодифицированного CD80 в анализе первичных Т–клеток in vitro. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала в Т–клетках относительно немодифицированного CD80, например, определяемую с использованием репортерного анализа, включающего Т–клетку (например, Jurkat), сконструированную с использованием репортера (например, люциферазы), функционально связанного с промотором ИЛ–2. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала в Т–клетках относительно немодифицированного CD80, например, определяемую с использованием репортерного анализа, включающего Т–клетку (например, Jurkat), сконструированную с использованием репортера (например, люциферазы), функционально связанного с промотором ИЛ–2. В некоторых из любых таких вариантов осуществления вариант полипептида CD80 представлен в любом из множества форматов, например, является растворимым или иммобилизованным (например, связанным с планшетом).

[0045] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 является дегликозилированным.

[0046] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептида CD80 по изобретению, соединенный со вторым полипептидом, содержащим домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). В некоторых вариантах осуществления домен IgSF является аффинно–модифицированным и демонстрирует измененное связывание с одним или более из его когнатных партнеров по связыванию по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления домен IgSF демонстрирует повышенное связывание с одним или более из его когнатных партнеров по связыванию по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа.

[0047] В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 является первым вариантом полипептида CD80, и домен IgSF второго полипептида является доменом IgSF из второго варианта полипептида CD80, являющегося любым из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, где первый и второй варианты CD80 являются одинаковыми или отличаются. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 может специфически связываться с CTLA–4, и домен IgSF второго

полипептида может связываться с когнатным партнером по связыванию, иным, чем партнер, специфически связанный вариантом полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления домен IgSF второго полипептида является локализующим в опухоли функциональным фрагментом, связывающимся с лигандом, экспрессирующимся на опухоли. В некоторых вариантах осуществления лиганд, экспрессирующийся на опухоли, является B7H6.

[0048] В некоторых вариантах осуществления домен IgSF получают из NKp30.

[0049] В некоторых вариантах осуществления домен IgSF второго полипептида является доменом IgSF лиганда, связывающегося с ингибиторным рецептором, или его аффинно–модифицированным доменом IgSF. В некоторых вариантах осуществления аффинно–модифицированный домен IgSF демонстрирует повышенную аффинность связывания и/или селективность связывания с ингибиторным рецептором по сравнению со связыванием немодифицированного домена IgSF с ингибиторным рецептором. В некоторых вариантах осуществления ингибиторный рецептор является TIGIT или PD–1; или лиганд ингибиторного рецептора является CD155, CD112, PD–L1 или PD–L2.

[0050] В некоторых вариантах осуществления домен IgSF второго полипептида является аффинно–модифицированным доменом IgSF, содержащим: (i) CD112 дикого типа, содержащий домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 269, 734 или 829, или вариант полипептида CD112, содержащий домен IgSF из любой из SEQ ID NO, приведенных в таблице 3, необязательно, любой из SEQ ID NO: 735–828, 830–917, 918–999, 1430–1501; (ii) CD155 дикого типа, содержащий IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO:268, 378 или 421, или вариант полипептида CD155, содержащий домен IgSF из любой из SEQ ID NO, приведенных в таблице 4, необязательно, любой из SEQ ID NO: 379–420, 422–539, 540–733, 1502–1573, 1548–1711, (iii) PD–L1 дикого типа, содержащий IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 251, 1000, 1721 или 1196, или вариант полипептида PD–L1, содержащий IgSF из любой из SEQ ID NO, приведенных в таблице 5, необязательно, любой из SEQ ID NO: 1001–1065, 1718–1900, 1931–1996; (iv) PD–L2 дикого типа, содержащий IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 252, 1197 или 1257, или вариант полипептида PD–L2, содержащий домен IgSF из любой из SEQ ID NO, приведенных в таблице 6, необязательно, любой из SEQ ID NO: 1198–1248, 1250–1325, 1327–1401, 1403–1426 1719, 1720, 1901–1930, (v) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO в (i)–(iv) и содержащую замену аминокислоты; или (vi) специфически связывающийся фрагмент любого из (i)–(v). В некоторых вариантах осуществления домен IgSF представляет собой или содержит IgV–домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит IgV–домен.

[0051] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит домен мультимеризации, соединенный с одним или обоими из варианта полипептида CD80 и домена IgSF второго полипептида. В некоторых вариантах

осуществления домен мультимеризации является Fc–доменом или его вариантам со сниженной эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является димерным. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является гомодимерным. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является гетеродимерным.

[0052] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, или иммуномодулирующий полипептид, представленный в настоящем описании, соединенный с функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является направляющим функциональным фрагментом, специфически связывающимся с молекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления направляющий функциональный фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки, необязательно, где иммунная клетка является антигенпрезентирующей клеткой или лимфоцитом. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является антигенпрезентирующей клеткой или лимфоцитом. В некоторых вариантах осуществления направляющий функциональный фрагмент является локализующим в опухоли функциональным фрагментом, связывающимся с молекулой на поверхности опухоли. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является белком, пептидом, нуклеиновой кислотой, низкомолекулярным соединением или наночастицей. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления конъюгат является бивалентным, тетравалентным, гексавалентным или октавалентным. Примеры показаний таких конъюгатов представлены на фиг. 6A и 6B. В некоторых вариантах осуществления конъюгат является слитым белком.

[0053] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, иммуномодулирующий полипептид, представленный в настоящем описании, или конъюгат, являющийся слитым белком, содержащим любой из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты является синтетической нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты является кДНК.

[0054] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вектор является экспрессирующим вектором. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой экспрессирующий вектор млекопитающего или вирусный вектор.

[0055] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клетке, содержащей вектор, представленный в настоящем описании. В некоторых

вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой человека.

[0056] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка, включающему встраивание молекулы нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем описании, или вектора, представленного в настоящем описании, в клетку–хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение или очистку варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка из клетки.

[0057] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу конструирования клетки, экспрессирующей вариант полипептида CD80, включающему встраивание молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, в клетку–хозяина в условиях, в которых полипептид экспрессируется в клетке.

[0058] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированной клетке, экспрессирующей вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, конъюгат, представленный в настоящем описании, молекулу нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем описании, или вектор, представленный в настоящем описании.

[0059] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок не содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок секретируется из сконструированной клетки.

[0060] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит вариант полипептида CD80, содержащий трансмембранный домен и/или являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка является иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является антигенпрезентирующей клеткой (АПК) или лимфоцитом.

[0061] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка является первичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка является лимфоцитом, являющимся Т–клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является АПК, являющейся искусственной АПК. В некоторых вариантах осуществления

сконструированная клетка дополнительно содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т–клеточный рецептор.

[0062] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к возбудителю инфекции, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, иммуномодулирующий полипептид, представленный в настоящем описании, или слитый конъюгат варианта CD80, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления кодируемый вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий полипептид не содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется. В некоторых вариантах осуществления кодируемый вариант полипептида CD80, иммуномодулирующий полипептид или конъюгат секретируется из клетки, в которой он экспрессируется.

[0063] В некоторых вариантах осуществления кодируемый вариант полипептида CD80, содержащийся в возбудителе инфекции, содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления кодируемый вариант полипептида CD80 экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется.

[0064] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является бактерией или вирусом. В некоторых вариантах осуществления вирус является лентивирусной или ретровирусной конструкцией или их гибридом. В некоторых вариантах осуществления вирус является онколитическим вирусом. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус является аденовирусом, аденоассоциированным вирусом, вирусом герпеса, вирусом простого герпеса, реовирусом, вирусом псевдочумы птиц, парвовирусом, вирусом кори, вирусом везикулярного стоматита (VSV), вирусом Коксаки или вирусом осповакцины.

[0065] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является вирусом, специфически направлено воздействующим на дендритные клетки (DC) и/или являющимся тропным к дендритным клеткам. В некоторых вариантах осуществления вирус является лентивирусным вектором, псевдотипированным с использованием модифицированного оболочечного продукта вируса Синдбис.

[0066] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую дополнительный продукт гена, приводящий к гибели клетки–мишени или увеличивающий или усиливающий иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления дополнительный продукт гена выбран из противоопухолевого средства, антиметастатического средства, антиангиогенного средства, иммуномодулирующей молекулы, ингибитора иммунных контрольных точек, антитела, цитокина, фактора роста, антигена, цитотоксического продукта гена, проапоптотического продукта гена, антиапоптотического продукта гена, гена дегенерации клеточного матрикса, генов регенерации ткани и перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные.

[0067] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

фармацевтической композиции, содержащей вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, конъюгат, представленный в настоящем описании, сконструированную клетку, представленную в настоящем описании, или возбудитель инфекции, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной.

[0068] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к промышленному изделию, содержащему фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, во флаконе. В некоторых вариантах осуществления флакон является запаянным.

[0069] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, и инструкции по использованию. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору, содержащему промышленное изделие, представленное в настоящем описании, и инструкции по использованию.

[0070] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу модуляции иммунного ответа у индивидуума, такой как повышение или снижение иммунного ответа, включающему введение индивидууму фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании.

[0071] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающему введение иммуномодулирующего белка, представленного в настоящем описании, такого как иммуномодулирующий белок, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с PD–L1. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ повышают. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком, представленным в настоящем описании, демонстрирующим Fc–зависимую костимуляцию CD28. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком, представленным в настоящем описании, демонстрирующим PD–L1–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, где иммуномодулирующий белок содержит вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании.

[0072] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающему введение сконструированных клеток, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются аутологичными для индивидуума. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются аллогенными для индивидуума.

[0073] Кроме того, настоящее изобретение относится к способу модуляции иммунного ответа у индивидуума, например, повышения или снижения иммунного

ответа, включающему введение индивидууму варианта полипептида CD80, или иммуномодулирующего белка, или конъюгата, содержащего вариант полипептида CD80, или сконструированной клетки или возбудителя инфекции, секретирующего или экспрессирующего вариант полипептида CD80, где вариант полипептида CD80 связывается с CTLA–4 с повышенной аффинностью или селективно по сравнению со связыванием немодифицированного CD80 с CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CTLA–4 содержит одну или более модификаций, как представлено в настоящем описании.

[0074] В некоторых вариантах осуществления способа вариант полипептида CTLA–4 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном полипептиде CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям, выбранным из 12, 13, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94 и/или 95 относительно положений, приведенных в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

[0075] В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из A12T, A12V, T13R, C16R, H18Y, V20I, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q27L, 30F, I30T, I30V, Y31H, Q33E, K34E, E35D, E35G, K36R, M38V, T41A, T41S, M42I, M42V, M43I, M43L, S44P, D46E, D46V, M47I, M47L, M47T, M47V, N48H, P51A, K54E, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61V, T62N, L65P, I67L, V68A, V68L, V68M, I69F, I69T, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73S, D76H, E77G, G78A, T79I, T79P, E81K, C82R, V83I, V84A, V84I, L85M, L85Q, K86M, E88D, E88V, D90N, A91S, A91T, F92S, K93R, R94W, E95K и E95V. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E23D, E23G, A26E, A26P, A26S, A26T, I30F, I30T, I30V, K34E, E35D, E35G, D46E, D46V, P51A, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, L65P, A71D, A71G, R73S, G78A, T79I, T79P, C82R, V84A, V84I, где положения замен аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0076] В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций выбраны из L70P, I30F/L70P, Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K/A91S, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D,

Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D и Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W.

[0077] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму растворимого варианта полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании, иммуномодулирующего белка по любому из описанных вариантов осуществления или конъюгата по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму возбудителя инфекции, кодирующего вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании.

[0078] В некоторых вариантах осуществления модуляция иммунного ответа позволяет лечить заболевание или состояние у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ повышают. Предусмотрены различные форматы варианта полипептида CD80 для введения индивидууму для повышения иммунного ответа, такие как антагонистические форматы варианта CD80. В некоторых случаях такие способы осуществляют в условиях, в которых посредством введения блокируют или уменьшают передачу сигнала ингибиторным рецептором CTLA–4.

[0079] В некоторых вариантах осуществления в способах модуляции иммунного ответа по изобретению индивидууму вводят вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, являющийся растворимым. В некоторых вариантах осуществления растворимый иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим Fc–слитым белком.

[0080] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают введение индивидууму варианта полипептида CD80, представленного в настоящем описании, или иммуномодулирующего белка, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят сконструированную клетку, содержащую секретируемый вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят сконструированную клетку, представленную в настоящем описании.

[0081] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению

индивидууму вводят возбудитель инфекции, кодирующий вариант полипептида CD80, являющийся секретируемым иммуномодулирующим белком, необязательно, в условиях, в которых возбудитель инфекции инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку, и секретируемый иммуномодулирующий белок секретируется из инфицированной клетки.

[0082] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению заболевание или состояние представляет собой опухоль или злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из меланомы, рака легких, рака мочевого пузыря, гемобластоза, рака печени, злокачественного новообразования головного мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичка, рака яичников, рака матки, карциномы желудка, скелетно–мышечного злокачественного новообразования, рака головы и шеи, злокачественного новообразования желудочно–кишечного тракта, рака половых клеток или эндокринного или нейроэндокринного злокачественного новообразования. В некоторых из любых таких вариантов осуществления вариант CD80 вводят в формате, повышающем иммунный ответ у индивидуума.

[0083] Предусмотрены различные форматы варианта полипептида CD80 для введения индивидууму для снижения иммунного ответа, такие как агонистические форматы варианта CD80. В некоторых случаях такие способы осуществляют в условиях, в которых посредством введения активируют, или стимулируют, или индуцируют передачу сигнала ингибиторным рецептором CTLA–4.

[0084] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению иммунный ответ снижают. В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению индивидууму вводят иммуномодулирующий белок или конъюгат, содержащий вариант полипептида CD80, соединенный с функциональным фрагментом, локализующим в клетку или ткань воспалительного окружения. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или содержит второй полипептид, содержащий домен IgSF дикого типа или его вариант.

[0085] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению индивидууму вводят иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, или конъюгат, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению индивидууму вводят вариант полипептида CD80, являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком. В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению индивидууму вводят сконструированную клетку, содержащую вариант полипептида CD80, являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком, представленным в настоящем описании.

[0086] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению индивидууму вводят возбудитель инфекции, кодирующий вариант полипептида CD80, являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком, необязательно, в

условиях, в которых возбудитель инфекции инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку, и трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности инфицированной клетки.

[0087] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению заболевание или состояние является воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние является ассоциированным с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA) васкулитом, васкулитом, аутоиммунным заболеванием кожи, трансплантацией, ревматизмом, воспалительным заболеванием желудочно–кишечного тракта, воспалительным заболеванием глаза, воспалительным неврологическим заболеванием, воспалительным заболеванием легких, воспалительным эндокринным заболеванием или аутоиммунным гематологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из воспалительного заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита или псориаза. В некоторых из любых таких вариантов осуществления вариант CD80 вводят индивидууму в формате, снижающем иммунный ответ.

[0088] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, включающему введение иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене или IgC–домене или их специфически связывающемся фрагменте в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, где иммуномодулирующий белок демонстрирует PD–L1–зависимую костимуляцию CD28. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу опосредования агонизма CD28 посредством PD–L1–зависимой костимуляции CD28 у индивидуума, включающему введение иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1. В любом из вариантов осуществления повышенная аффинность к эктодомену PD–L1 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

[0089] В некоторых вариантах осуществления способ предназначен для применения в лечении заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления PD–L1–зависимую костимуляцию CD28 оценивают посредством анализа стимуляции Т–клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих PD–L1, необязательно, где анализ стимуляции Т–клеток является анализом in vitro, необязательно, где Т–клетки включают клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2, или первичные Т–клетки человека, продуцирующие воспалительные цитокины, такие как ИЛ–2.

[0090] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению перед введением для лечения выбирают индивидуума, имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный PD–L1, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; или индивидуума выбирают как имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный PD–L1, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками.

[0091] В некоторых вариантах осуществления выбор индивидуума включает (a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с эктодоменом PD–L1; (b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; и (c) если образец опухолевой ткани содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный PD–L1, выбор индивидуума для лечения.

[0092] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению перед введением для лечения выбирают индивидуума, имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный CD28, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками; или индивидуума выбирают как имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный CD28, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками.

[0093] В некоторых вариантах осуществления выбор индивидуума включает (a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с эктодоменом CD28; (b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками; и (c) если образец опухолевой ткани содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный CD28, выбор индивидуума для лечения.

[0094] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам выбора индивидуума для лечения, включающим: (a) приведение образца

опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с PD–L1; и (b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; и (c) если образец опухоли содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный PD–L1, выбор индивидуума для лечения с использованием иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

[0095] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение образца опухолевой ткани в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с CD28, где индивидуума выбирают, если образец опухолевой ткани дополнительно содержит детектируемый уровень инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, положительных на CD28, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками.

[0096] В некоторых вариантах осуществления образец опухолевой ткани содержит инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, опухолевые клетки, стромальные клетки или любую их комбинацию.

[0097] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом, белковым лигандом или партнером по связыванию, аптамером, аффимером, пептидом или гаптеном. В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент является антителом против PD–L1 или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент является вариантом полипептида CD80, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент. В некоторых вариантах осуществления IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью связывающего реагента.

[0098] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80.

[0099] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент соединяют, прямо или косвенно, с функциональным фрагментом, являющимся детектируемым функциональным фрагментом или функциональным фрагментом, который можно подвергать детекции. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является Fc–областью. В некоторых вариантах осуществления Fc–область не принадлежит

человеку, но, необязательно, принадлежит мыши или кролику.

[0100] В некоторых вариантах осуществления определение наличия связанного связывающего реагента осуществляют посредством иммуногистохимии, псевдоиммуногистохимии, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии, ELISA или иммуноблоттинга.

[0101] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение индивидууму иммуномодулирующего белка. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

[0102] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является мультимером, содержащим первый вариант полипептида CD80, соединенным с первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80, соединенный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй варианты полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления мультимер является димером. В некоторых вариантах осуществления первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми.

[0103] В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc–область, необязательно, вариант Fc–области, содержащий одну или более замен аминокислот по сравнению с Fc–областью дикого типа, где Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций, сниженных по сравнению с Fc–областью дикого типа, необязательно, где Fc дикого типа получают из IgG1 человека.

[0104] В некоторых из таких вариантов осуществления полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97, относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых из таких вариантов осуществления полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, A12V, T13A, T13R, S15P, C16R, H18L, H18Y, V20A, V20I, V22A, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, T28Y, R29H, I30T, I30V, Y31H, Y31S, Q33E, Q33H, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, K37E, M38T, M38V, T41A, T41S, M42I, M42V, M43I, M43L, M43T, M43V, S44P, D46E, D46V, M47I, M47L, M47T, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, P51A, Y53F, Y53H, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61N, I61V, T62A, T62N, T62S, N63D, L65P, I67L, I67T, V68A, V68L, V68M, I69F, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79P, E81G, E81K, C82R, V83A, V83I, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86E, K86M, Y87H, Y87N, Y87Q, E88D, E88G, K89E, K89N, D90G, D90N, A91T, A91V, F92L, F92S, F92V, F92Y, K93E,

K93R, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97M, L97Q и L97R, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

[0105] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 сохраняет связывание с CD28. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 сохраняет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8,%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 75%, 80%, 85%, 90% или 95% аффинности к эктодомену CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного полипептида CD80 с эктодоменом CD28. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28. В некоторых из таких вариантов осуществления повышенная аффинность к эктодомену CD28 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

[0106] В некоторых вариантах осуществления с помощью повышенного иммунного ответа лечат заболевание или состояние у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль или злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из меланомы, рака легких, рака мочевого пузыря, гемобластоза, рака печени, злокачественного новообразования головного мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичка, рака яичников, рака матки, карциномы желудка, скелетно–мышечного злокачественного новообразования, рака головы и шеи, злокачественного новообразования желудочно–кишечного тракта, рака половых клеток, или эндокринного или нейроэндокринного злокачественного новообразования.

[0107] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу детекции партнера по связыванию CD80 в биологическом образце, включающему: (a) приведение биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим любой из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании; и (b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления партнер по связыванию является PD–L1, CD28, CTLA–4 или их комбинациями.

[0108] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

[0109] В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой или содержит образец физиологической жидкости, клетки или ткани, такой как физиологическая жидкость, являющаяся сывороткой, плазмой или мочой, или образец ткани, являющийся образцом опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления образец опухолевой ткани содержит инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, опухолевые клетки, стромальные клетки или любую их комбинацию.

[0110] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент. В некоторых вариантах осуществления IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью связывающего реагента.

[0111] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент соединяют, прямо или косвенно, с меткой, являющейся детектируемым функциональным фрагментом, или функциональным фрагментом, который можно подвергать детекции. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является Fc–областью, необязательно, не принадлежащей человеку, такой как Fc–область мыши или кролика. В некоторых вариантах осуществления определение наличия связанного связывающего реагента осуществляют посредством иммуногистохимии, псевдоиммуногистохимии, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии, ELISA или иммуноблоттинга.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0112] На фиг. 1A–1C показаны различные форматы варианты молекул домена IgSF по изобретению. На фиг. 1A показаны растворимые молекулы, включая: (1) вариант домена IgSF (vIgD), слитый с Fc–цепью; (2) составную молекулу, содержащую первый вариант домена IgSF (первый vIgD) и второй домен IgSF, такой как второй вариант домена IgSF (второй vIgD); (3) молекулу IgSF, направленно воздействующую на опухоль и содержащую первый вариант домена IgSF (vIgD) и домен IgSF, направленно воздействующий на опухолевый антиген, такой как домен IgSF против NKP30; и (4) вариант домена IgSF (vIgD), соединенный с антителом (V–mAb). На фиг. 1B показан трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP), содержащий вариант домена IgSF (vIgD), экспрессирующийся на поверхности клетки. В примере варианта осуществления когнатный партнер по связыванию трансмембранного связанного vIgD является ингибиторным рецептором (например, CTLA–4), и TIP, содержащий vIgD (например, vIgD CD80), антагонистически действует или блокирует отрицательную передачу сигнала ингибиторного рецептора, что, таким образом, приводит к активации Т–клетки или эффекторной Т–клетки. В некоторых случаях, если кластеризация ингибиторного рецептора (CTLA–4) происходит проксимально к активирующему рецептору (например, CD28), то TIP может осуществлять агонистическую активность. На фиг. 1C показан секретируемый иммуномодулирующий белок (SIP), в котором вариант домена IgSF (vIgD) секретируется из клетки, такой как первая Т–клетка (например, CAR Т–клетка). В примере варианта осуществления когнатный партнер по связыванию секретируемого vIgD является ингибиторным рецептором (например, CTLA–4), который может экспрессироваться

первой клеткой (например, Т–клеткой, такой как CAR Т–клетка) и/или на второй клетке (например, Т–клетке, эндогенной или сконструированной, такой как CAR Т–клетка). После связывания SIP с его когнатным партнером по связыванию, SIP антагонистически действует или блокирует отрицательную передачу сигнала ингибиторного рецептора, что, таким образом, приводит к активации Т–клетки или эффекторной Т–клетки. Во всех случаях vIgD может являться только V–доменом (IgV), комбинацией V–домена (IgV) и C–домена (IgC), включающей целый внеклеточный домен (ECD), или любой комбинацией доменов Ig из члена суперсемейства IgSF.

[0113] На фиг. 2 показан пример схемы активности варианта домена IgSF (vIgD), слитого с Fc (vIgD–Fc), в котором vIgD является вариантом домена IgSF CD80. Как показано, растворимый vIgD CD80 взаимодействует со своими когнатными партнерами по связыванию для блокирования взаимодействия CD80 с CTLA–4, таким образом, блокируя ингибиторный рецептор CTLA–4 и в некоторых случаях позволяя Т–клетке дифференцироваться в эффекторный фенотип.

[0114] На фиг. 3A показан пример схемы активности варианта домена IgSF (vIgD), конъюгированного с Fc, в котором CD80–Fc осуществляет PD–L1–зависимую CD28–агонистическую активность. Как показано, связывание CD80–Fc с PD–L1, экспрессирующимся на поверхности опухолевой клетки, может предотвращать связывание PD–L1 на опухолевой клетке и ингибиторного рецептора PD–1, экспрессирующегося на поверхности Т–клетки. Кроме того, CD80–Fc доступен для связывания костимуляторного рецептора CD28 на поверхности Т–клетки, таким образом, локализуя Т–клетку к опухоли, одновременно способствуя активации Т–клетки посредством костимуляции CD28 сигнала TCR.

[0115] На фиг. 3B показан пример схемы активности варианта домена IgSF (vIgD) CD80, конъюгированного с Fc, в котором CD80–Fc блокирует ингибиторную активность CTLA–4. Как показано, связывание vIgD CD80–Fc с CTLA–4, экспрессирующимся на поверхности Т–клеток (например, клеток T_{reg} и T_{eff}), таким образом, антагонистически действует в отношении связывания CTLA–4 с его когнатными партнерами по связыванию CD80 (B7–1) и CD86 (B7–2), указанными как B7, и блокирует ингибиторную передачу сигнала CTLA–4, снижая порог передачи сигнала TCR и способствуя активации Т–клеток.

[0116] На фиг. 4 показан пример схемы составной молекулы, являющейся многоцелевым антагонистом контрольных точек, содержащим первый вариант домена IgSF (перв vIgD), являющийся vIgD против PD–L1 или PD–L2, и второй домен IgSF (например, второй vIgD), связывающийся со вторым ингибиторным рецептором. На примере схемы второй домен IgSF (например, второй vIgD) является vIgD CD80. Как показано, первый vIgD и второй vIgD взаимодействуют со своими когнатными партнерами по связыванию, блокируя взаимодействия PD–L1 или PD–L2 с PD–1 и CD80 с ингибиторными рецепторами CTLA–4, соответственно.

[0117] На фиг. 5 показан пример схемы составной молекулы для локализации варианта IgSF (vIgD) к опухолевой клетке. В этом формате составная молекула содержит

первый вариант домена IgSF (первый vIgD) и второй домен IgSF (например, второй vIgD), в котором второй домен IgSF (например, второй vIgD) является доменом IgSF, направленно воздействующим на опухоль, связывающимся с опухолевым антигеном. Примером домена IgSF, направленно воздействующего на опухоль, является домен IgSF NKp30, связывающийся с опухолевым антигеном B7–H6. На этом изображении первый вариант домена IgSF (vIgD) является вариантом домена IgSF CD80. Как показано, связывание домена IgSF, направленно воздействующего на опухоль, с поверхностью опухолевой клетки локализует первый вариант домена IgSF на поверхности опухолевой клетки, где он может взаимодействовать с одним или более из его когнатных партнеров по связыванию, экспрессирующихся на поверхности смежной иммунной клетки (например, Т–клетки), антагонистически действуя на когнатный ингибиторный рецептор CTLA–4.

[0118] На фиг. 6A показаны различные примеры конфигураций составной молекулы, содержащей первый вариант домена IgSF (первый vIgD) и второй домен IgSF, такой как второй вариант домена IgSF (второй vIgD). Как показано, первый домен vIgD и второй домен IgSF независимо соединены, прямо или косвенно, с N– или C–концом Fc–области. В случае получения гомодимерной молекулы Fc Fc–область является Fc–областью, способной образовывать гомодимер с соответствующей Fc–областью при коэкспрессии отдельных Fc–областей в клетке. В случае получения гетеродимерной молекулы Fc отдельные Fc–области содержат мутации (например, мутации "выступ–во–впадину" в домене CH3), таким образом, что образование гетеродимера является благоприятным по сравнению с гомодимерами, когда отдельные Fc–области коэкспрессируются в клетке.

[0119] На фиг. 6B показаны различные примеры конфигураций составной молекулы, содержащей первый вариант домена IgSF (первый vIgD), второй домен IgSF, такой как второй вариант домена IgSF (второй vIgD), и третий домен IgSF, такой как третий вариант домена IgSF (третий vIgD). Как показано, первый домен vIgD, второй домен IgSF и третий домен IgSF независимо соединены, прямо или косвенно, с N– или C–концом Fc–области. В случае получения гомодимерной молекулы Fc Fc–область является Fc–областью, способной образовывать гомодимер с соответствующей Fc–областью при коэкспрессии отдельных Fc–областей в клетке.

[0120] На фиг. 7 показан пример схемы активности варианта домена IgSF (vIgD), конъюгированного с антителом (V–Mab), где антитело (например, антитело против HER2) связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки, локализуя vIgD к клетке. Как показано, связывание антитела с поверхностью опухолевой клетки локализует vIgD на поверхности опухолевой клетки, где он может взаимодействовать с одним или более из его когнатных партнеров по связыванию, экспрессирующихся на поверхности смежной иммунной клетки (например, Т–клетки), агонистически или антагонистически действуя на передачу сигнала рецептора. Как показано в примере варианта осуществления, вариант домена IgSF (vIgD) является вариантом домена IgSF CD80, связывающимся с ингибиторным рецептором CTLA–4, например, имеющим повышенную аффинность к

нему. Связывание vIgD CD80 с ингибиторным рецептором CTLA–4 антагонистически действует или блокирует отрицательную передачу сигнала ингибиторного рецептора, что, таким образом, приводит к активации Т–клетки или эффекторной Т–клетки. В некоторых случаях, если кластеризация ингибиторного рецептора (CTLA–4) происходит проксимально к активирующему рецептору (например, CD28), TIP может агонистически действовать на активность ингибиторного рецептора.

[0121] На фиг. 8A–8C показаны различные примеры конфигураций конъюгата вариант IgSF–антитело (V–Mab). На фиг. 8A показаны различные конфигурации, в которых вариант домена IgSF соединен, прямо или косвенно, с N– и/или C–концом легкой цепи антитела. На фиг. 8B показаны различные конфигурации, в которых вариант домена IgSF соединен, прямо или косвенно, с N– и/или C–концом тяжелой цепи антитела. На фиг. 8C показаны полученные конфигурации V–Mab, когда легкую цепь с фиг. 8A и тяжелую цепь с фиг. 8B коэкспрессируют в клетке.

[0122] На фиг. 9A показано связывание примеров вариантов IgV CD80–Fc с экспрессирующимися на поверхности клетки лигандами PD–L1, CD28 и CTL44.

[0123] На фиг. 9B показана дозозависимая PD–L1–зависимая костимуляция CD28 в репортерной линии Jurkat/ИЛ–2, индуцируемая с помощью примеров вариантов IgV CD80–Fc.

[0124] На фиг. 9C показана продукция цитокинов первичными Т–клетками человека после PD–L1–зависмой костимуляции, индуцируемой с помощью примеров вариантов IgV CD80–Fc.

[0125] На фиг. 9D показана способность примеров кандидатов IgV CD80–Fc связываться с PD–L1 и блокировать связывание флуоресцентно конъюгированного PD–1.

[0126] На фиг. 9E показано взаимодействие PD–1/PD–L1 и последующая функциональная антагонистическая активность примеров вариантов CD80–Fc.

[0127] На фиг. 10 показана противоопухолевая активность in vivo примеров вариантов полипептидов CD80, слитых с Fc IgG1 дикого типа (WT Fc) или неактивной Fc IgG1 (неактивной Fc).

[0128] На фиг. 11 показаны медианные (левая панель) и средние (правая панель) объемы опухолей в модели мыши после введения 50 мкг, 100 мкг и 500 мкг примера варианта IgV CD80–Fc (неактивного) и 100 мкг антитела против PD–L1 (дурвалумаба).

[0129] На фиг. 12 показана концентрация ИФНγ в лизатах опухолей hPD–L1MC38 после обработки in vivo с использованием 50 мкг, 100 мкг и 500 мкг примера варианта IgV CD80–Fc (неактивного) и 100 мкг антитела против PD–L1 (дурвалумаба).

[0130] На фиг. 13 показаны медианные (левая панель) и средние (правая панель) объемы опухолей в модели мыши после введения множества примеров вариантов IgV CD80–Fc (неактивных) и антитела против PD–L1 (дурвалумаба).

[0131] На фиг. 14 показаны медианные (левая панель) и средние (правая панель) объемы опухолей у мышей, определенных как неимеющие опухоли после введения примеров вариантов IgV CD80–Fc (неактивных) и антитела против PD–L1 (дурвалумаба)

после повторного введения опухолевых клеток huPD–L1/MC38.

[0132] На фиг. 15 показана детекция связанного Fc отрицательного контроля, варианта CD80–Fc и антитела против PD–L1 посредством проточной цитометрии суспензий отдельных живых CD45–отрицательных (CD45 neg.; CD45–) опухолевых клеток.

[0133] На фиг. 16 показаны медианные (левая панель) и средние (правая панель) объемы опухолей в модели мыши после введения примера варианта IgV CD80–Fc (неактивного) и антитела против PD–L1 (дурвалумаба).

[0134] На фиг. 17A и 17B показана процентная доля CD8 клеток, определяемых посредством проточной цитометрии в дренирующем опухоль лимфоузле (A) и опухоли (B) у мышей, которым вводили Fc отрицательного контроля, вариант CD80–Fc и антитело против PD–L1.

[0135] На фиг. 17C показана процентная доля определяемых реагентов против Fc человека на CD45–отрицательных опухолях, обработанных in vivo Fc отрицательного контроля, IgV CD80–Fc и антителом человека против PD–L1.

[0136] На фиг. 18 показана специфическая цитотоксическая активность вариантов IgV CD80–Fc против huPD–L1–трансдуцированных опухолевых клеток MC38, но не нетрансдуцированных родительских клеток MC38, что свидетельствует о специфическом цитолизе huPD–L1.

[0137] На фиг. 19A и B показано связывание вариантов IgV CD80–Fc с первичными T–клетками человека (A) и первичными моноцитами человека (B).

[0138] На фиг. 20 показан антагонизм варианта IgV CD80–Fc PD–L1–опосредованному рекрутированию SHP–2 к PD–1 с использованием анализа ферментативной комплементации.

[0139] На фиг. 21 показан антагонизм варианта IgV CD80–Fc связыванию CD80/CTLA–4.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0140] Настоящее изобретение относится к иммуномодулирующим белкам, представляющим собой или содержащим варианты или мутанты CD80 и его специфически связывающихся фрагментов, демонстрирующих измененную активность или аффинность связывания с по меньшей мере одним лигандом–мишенью, когнатным партнером по связыванию (также названным противоструктурным белком–лигандом). В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 содержат одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций аминокислот) по сравнению с немодифицированным полипептидом CD80 или полипептидом CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 содержат одну или более модификаций аминокислот (например, замен) по сравнению с немодифицированным полипептидом CD80 или полипептидом CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот находятся в домене IgSF (например, IgV) немодифицированного полипептида CD80 или полипептида

CD80 дикого типа.

[0141] В некоторых вариантах осуществления измененную активность связывания, такую как аффинность связывания и/или селективность связывания, например, повышенная или сниженная аффинность связывания или селективность, наблюдают для по меньшей мере одного белкового партнера по связыванию из CD28, PD–L1 или CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 демонстрируют измененную, такую как повышенная или сниженная, активность или аффинность связывания с одним или более из CD28, PD–L1 или CTLA–4 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, несодержащим одну или более модификаций.

[0142] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 демонстрируют повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и/или PD–L1 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, несодержащим одну или более модификаций. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 демонстрируют сниженную аффинность связывания с CD28 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, несодержащим одну или более модификаций. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 демонстрируют повышенную аффинность связывания с одним или обоими из CTLA–4 и PD–L1 и сниженную аффинность связывания с CD28 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, несодержащим одну или более модификаций.

[0143] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, демонстрируют повышенную селективность связывания с CTLA–4 относительно CD28 по сравнению с селективностью немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа, несодержащим одну или более модификаций, для связывания с CTLA–4 относительную CD28. Повышенную селективность можно охарактеризовать как более высокое соотношение связывания, например, аффинности связывания, варианта полипептида CD80 с CTLA–4 относительно CD28 по сравнению с соотношением связывания, например, аффинности связывания, немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа для связывания с CTLA–4 относительно CD28. В некоторых вариантах осуществления соотношение повышено более чем приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз, 15,0 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 100 раз или более.

[0144] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, демонстрируют повышенную селективность связывания с PD–L1 относительно CD28 по сравнению с селективностью немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа, несодержащим одну или более модификаций, для связывания с PD–L1 относительно CD28. Повышенную селективность можно охарактеризовать как более высокое соотношение связывания, например, аффинность связывания, варианта полипептида CD80 с PD–L1 относительно CD28 по

сравнению с соотношением связывания, например, аффинностью связывания, немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа для связывания с PD–L1 относительно CD28. В некоторых вариантах осуществления соотношение повышено более чем приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз, 15,0 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 100 раз или более.

[0145] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки являются растворимыми. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки являются трансмембранными иммуномодулирующими белками, которые могут экспрессироваться на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки являются секретируемыми иммуномодулирующими белками, которые могут секретироваться из клетки, в которой они экспрессируются. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к одному или более другим иммуномодулирующим белкам, являющимся конъюгатами или слитыми белками, содержащими вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, и один или более других функциональных фрагментов или полипептидов. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к сконструированным клеткам, содержащим трансмембранные иммуномодулирующие белки или секретируемые иммуномодулирующие белки. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к возбудителям инфекции, которые можно доставлять для экспрессии трансмембранных иммуномодулирующих белков или секретируемых иммуномодулирующих белков в клетку, которую инфицирует возбудитель инфекции. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к одному или более другим иммуномодулирующим белкам, являющимся конъюгатами или слитыми белками, содержащими вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, и один или более других функциональных фрагментов или полипептидов.

[0146] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 и иммуномодулирующие белки модулируют иммунный ответ, например, повышают или снижают иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 и иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с дисрегулированным иммунным ответом.

[0147] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 по изобретению модулируют активацию, экспансию, дифференцировку и выживание Т–клеток посредством взаимодействий с костимуляторными сигнальными молекулами. В основном, для активации антигенспецифических Т–клеток, как правило, необходимо два разных сигналов. Первый сигнал получают посредством взаимодействия Т–клеточного рецептора (TCR) с антигенами, ассоциированными с главным комплексом гистосовместимости (MHC), присутствующими на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Второй сигнал является костимуляторным, например, CD28–костимуляторным

сигналом, для вовлечения TCR, и он необходим для избегания апоптоза или анергии Т–клеток.

[0148] В некоторых вариантах осуществления в нормальных физиологических условиях опосредуемый Т–клетками иммунный ответ инициируется распознаванием антигена Т–клеточным рецептором (TCR) и регулируется балансом костимуляторных и ингибиторных сигналов (например, белков иммунных контрольных точек). В иммунной системе иммунные контрольные точки используют для предотвращения аутоиммунности (т.е. для аутотолерантности) и для защиты тканей от избыточного повреждения во время иммунного ответа, например, во время атаки против патогенной инфекции. Однако, в некоторых случаях эти иммуномодулирующие белки могут подвергаться дисрегуляции при заболеваниях и состояниях, включая опухоли, в качестве механизма ускользания от иммунного надзора.

[0149] В некоторых вариантах осуществления известные костимуляторные рецепторы Т–клеток включают CD28, являющийся костимуляторным рецептором Т–клеток для лигандов B7–1 (CD80) и B7–2 (CD86), оба из которых присутствуют на АПК. Эти же лиганды также могут связываться с ингибиторным рецептором Т–клеток CTLA4 (антигеном цитотоксических Т–лимфоцитов 4) с более высокой аффинностью, чем с CD28; связывание с CTLA4 отрицательно модулирует иммунный ответ.

[0150] В некоторых вариантах осуществления CD80 может связываться с лигандом программируемой гибели клеток 1 (PD–L1). CD80 имеет схожую аффинность к PD–L1 и к CD28. PD–L1 является одним из двух лигандов ингибиторного иммунного рецептора, белка программируемой гибели клеток 1 (PD–1). Взаимодействие PD–L1 с PD–1 отрицательно регулирует иммунную активность, стимулируя инактивацию Т–клеток и отрицательно модулируя активность Т–клеток. Экспрессия PD–1 на Т–клетках может индуцироваться после активации Т–клеток в качестве стратегии предотвращения избыточной активности Т–клеток. Многие опухолевые клетки экспрессируют PD–L1 на своей поверхности, что потенциально приводит к взаимодействиям PD–1/PD–L1 и ингибированию Т–клеточных ответов против опухоли. Связывание CD80 с PD–L1 может блокировать взаимодействие между PD–L1 и PD–1 и, таким образом, предотвращать ингибирование Т–клеточных ответов, например, в очаге опухоли, и эффективно потенцировать или повышать иммунный ответ. Однако, в то же время, CD80 также может связываться с рецепторами CD28 или CTLA4 и участвовать в индуцировании или ингибировании Т–клеточных ответов. Таким образом, в некоторых случаях взаимодействия CD80 с PD–L1, CD28 и CTLA–4 могут приводить к перекрывающимся и комплементарным эффектам. В некоторых вариантах осуществления CD28 и PD–L1 могут играть комплементарные роли в моделировании иммунного ответа.

[0151] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 по изобретению или иммуномодулирующие белки модулируют (например, повышают или снижают) иммунологическую активность, индуцируемую или ассоциированную с ингибиторным рецептором CTLA–4, отрицательно регулирующим комплексом PD–

L1/PD–1 и/или костимуляторным рецептором CD28. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептиды CD80 по изобретению, например, растворимые формы вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, связываются с ингибиторным рецептором CTLA–4, блокируя их взаимодействие с CD80, экспрессирующимся на АПК, таким образом, предотвращая отрицательную регуляторную передачу сигнала связанного с CD80 рецептора CTLA–4, как показано на фиг. 2. В некоторых вариантах осуществления полипептиды CD80 по изобретению, например, растворимые формы вариантов полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, могут связываться с PD–L1 на опухолевой клетке или АПК, таким образом, блокируя взаимодействие PD–L1 и ингибиторного рецептора PD–1, таким образом, предотвращая отрицательную регуляторную передачу сигнала, которая в ином случае будет результатом взаимодействия PD–L1/PD–1. В некоторых вариантах осуществления полипептиды CD80 по изобретению, например, растворимые формы вариантов полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, могут блокировать взаимодействие PD–L1/PD–1 при одновременном связывании и костимуляции рецептора CD28 на локализованной Т–клетке, таким образом, стимулируя иммунный ответ (фиг. 3A). В некоторых вариантах осуществления полипептиды CD80 по изобретению, например, растворимые формы вариантов полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, могут противодействовать связыванию B7/CTLA–4, предотвращая ингибиторную передачу сигнала CTLA–4, снижая порог передачи сигнала TCR, таким образом, стимулируя активацию Т–клеток и иммунный ответ (фиг. 3B). В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 по изобретению можно соединять или конъюгировать с другими иммуномодулирующими полипептидами для дополнительной модуляции иммунной активности (фиг. 4) или соединять или конъюгировать с направляющими молекулами для локализации иммунной активности (фиг. 5 и фиг. 7). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению позволяют преодолевать эти ограничения благодаря получению вариантов CD80 с независимыми аффинностями связывания с CTLA–4 и/или PD–L1 и, в некоторых случаях, CD28, таким образом, агонистическими или антагонистическими в отношении комплементарных эффектов костимуляции с помощью рецепторов. Настоящее изобретение также относится к способам получения и применения этих вариантов CD80.

[0152] Настоящее изобретение также относится к различным форматам вариантов полипептидов по изобретению. Как показано в настоящем описании, альтернативные форматы могут облегчать воздействие на иммунный ответ и, таким образом, терапевтическое применение. Возможность форматирования вариантов полипептидов в различных конфигурациях, чтобы в зависимости от контекста они выступали в качестве антагонистов или агонистов иммунного ответа, придает гибкость терапевтическому применению с учетом повышенного связывания и активности варианта CD80 в отношении партнеров по связыванию. Например, прикрепление вариантов белков CD80 к поверхности может приводить к локализованному костимуляторному сигналу, в то время

как в других случаях презентирование CD80 в нелокализованной растворимой форме придает антагонистическую активность. Например, доставка усиленного белка CD80 в растворимых форматах с повышенной аффинностью к CTLA–4 и/или PD–L1 может антагонистически действовать на передачу сигнала ингибиторного рецептора, например, блокировать ингибиторный сигнал в клетке, что может снижать ответ на активирующий стимул, например, костимуляторный сигнал CD3 и/или CD28 или митогенный сигнал. В некоторых случаях результатом этого может быть повышение иммунного ответа.

[0153] Кроме того, в некоторых случаях некоторые форматы также могут опосредовать агонизм CD28. В некоторых случаях агонизм CD28 опосредован некоторыми вариантами полипептидов CD80, демонстрирующими повышенное связывание с PD–L1, таким образом, облегчая прикрепление или перекрестную сшивку молекулы варианта CD80 с поверхностью в иммунном синапсе для взаимодействия с CD28, таким образом, облегчая активацию Т–клеток посредством обеспечения костимуляторного сигнала. Эта активность, обозначаемая в настоящем описании как PD–L1–зависимая костимуляция CD28, в некоторых аспектах является результатом способности варианта полипептида CD80 связываться и с PD–L1, и с CD80 неконкурентным образом и/или получения димерного формата варианта полипептида CD80 (см., например, фиг. 3). В некоторых случаях для такой PD–L1–зависимой костимуляции не требуется Fc с эффекторной функцией, и она может быть опосредована Fc–слитым белком, содержащим менее эффекторную или неактивную молекулу Fc. В некоторых аспектах, дополнительно или альтернативно, прикрепления или перекрестной сшивки также можно достигать с помощью Fc–рецептора, если вариант полипептида CD80 получают в виде слитого белка с Fc–областью иммуноглобулина дикого типа, сохраняющей или демонстрирующей эффекторную функцию, обозначаемую в настоящем описании как Fc–рецептор–зависимая костимуляция CD28. В некоторых аспектах перекрестная сшивка Fc–рецептора может инициировать эффекторные функции, опосредованные антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) и, таким образом, вызывать истощение клеток–мишеней, экспрессирующих когнатного партнера по связыванию, таких как CTLA–4–экспрессирующие клетки (например, CTLA–4–экспрессирующие регуляторные Т клетки) или PD–L1–экспрессирующие клетки (например, PD–L1^{hi} опухоли).

[0154] Усиление или супрессия активности этих рецепторов обладают клинической значимостью при лечении воспалительных и аутоиммунных нарушений, злокачественных новообразований и вирусных инфекций. Однако в некоторых случаях терапия для воздействия и изменения костимуляторных эффектов обоих рецепторов ограничена требованиями к пространственной ориентации, а также ограничениями размера, вызванными пределами иммунологического синапса. В некоторых аспектах существующие терапевтические лекарственные средства, включая лекарственные средства–антитела, могут не быть способными взаимодействовать одновременно с множеством белков–мишеней, участвующих в модуляции этих взаимодействий. Кроме

того, в некоторых случаях существующие терапевтические лекарственные средства могут обладать лишь антагонистической, но не агонистической способностью в отношении иммунного ответа. Кроме того, фармакокинетические различия между лекарственными средствами, независимо направленно воздействующими на тот или иной из этих двух рецепторов, могут создавать трудности для правильного поддержания желаемой концентрации таких комбинаций лекарственных средств в крови на всем протяжении лечения. Описываемые варианты полипептидов CD80 и иммуномодулирующие белки по изобретению и другие форматы предназначены для решения таких проблем.

[0155] Все публикации, включая патенты, патентные заявки, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей до той степени, как если бы каждая отдельная публикация, включая патент, патентную заявку, научную статью или базу данных, была конкретно и отдельно указана как включенная в качестве ссылки. Если определение, приведенное в настоящем описании, отличается или иным образом противоречит определению, приведенному в патентах, патентных заявках, опубликованных патентных заявках и других публикациях, включенных в настоящее описание в качестве ссылки, определение, приведенное в настоящем описании, обладает приоритетом относительно определения, включенного в настоящее описание в качестве ссылки.

[0156] Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, предназначены исключительно для организационных целей, и не следует истолковывать их как ограничение объекта изобретения.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0157] Если не указано иначе, все специальные термины, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем описании, должны иметь значение, общепринято понятное специалисту в области, к которой относится изобретение. В некоторых случаях термины с общепринято понятным значением определены в настоящем описании для ясности и/или для справки, и включение таких определений в настоящее описание не следует обязательно истолковывать как существенное отличие от значения, как правило, общепринято понятного в этой области.

[0158] Термины, используемые на всем протяжении настоящего описания, определены следующим образом, если иное не указано в конкретных случаях. В рамках изобретения формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное. Если не указано иначе, все технические и научные термины, акронимы и сокращения, используемые в настоящем описании, обладают значением, общепринято понятным специалисту в области, к которой принадлежит изобретение. Если не указано иначе, сокращения и символы для химических и биохимических названий соответствуют номенклатуре IUPAC–IUB. Если не указано иначе, все числовые диапазоны включают значения, определяющие диапазон, а также все целые числа между ними.

[0159] Термин "аффинно–модифицированный" в отношении домена суперсемейства иммуноглобулинов означает домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) млекопитающих, имеющий измененную аминокислотную последовательность (относительно соответствующего родительского домена IgSF дикого типа или немодифицированного домена IgSF) таким образом, что он имеет повышенную или сниженную аффинность или авидность связывания с по меньшей мере одним из его когнатных партнеров по связыванию (альтернативно обозначаемых как "противоструктуры") по сравнению с родительским контрольным доменом IgSF дикого типа или немодифицированным (т.е. не–аффинно–модифицированным) контрольным доменом IgSF. Этот контекст включает аффинно–модифицированный CD80–домен IgSF. В некоторых вариантах осуществления аффинно–модифицированный домен IgSF может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более отличий аминокислот, таких как замены аминокислот, в домене IgSF дикого типа или немодифицированном домене IgSF. Повышение или снижение аффинности или авидности связывания можно определять с использованием хорошо известных анализов связывания, таких как проточная цитометрия. Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443–453 (2005). Также см. Linsley et al., Immunity, Vol 1(9: 793–801 (1994). Повышение аффинности или авидности связывания белка с его когнатными партнерами по связыванию соответствует значению по меньшей мере на 10% выше, чем у контрольного домена IgSF дикого типа и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 5000% или 10000% выше, чем контрольное значение для домена IgSF дикого типа. Снижение аффинности или авидность связывания белка с по меньшей мере одним из его когнатных партнеров по связыванию соответствует значению не более 90% от контрольного, но не менее 10% от контрольного значения для домена IgSF дикого типа и в некоторых вариантах осуществления не более 80%, 70% 60%, 50%, 40%, 30% или 20%, но не менее 10% от контрольного значения домена IgSF дикого типа. Аффинно–модифицированный белок имеет первичную аминокислотную последовательность, измененную посредством замены, инсерции или делеции аминокислотных остатков. Термин "аффинно–модифицированный домен IgSF" не следует истолковывать как предписывание каких–либо условий для любой конкретной начальной композиции или способа, которым получают аффинно–модифицированный домен IgSF. Таким образом, аффинно–модифицированные домены IgSF по изобретению не ограничены доменами IgSF дикого типа, которые затем преобразуют в аффинно–модифицированный домен IgSF любым конкретным способом модификации аффинности. Полипептид с аффинно–модифицированным доменом IgSF можно получать, например, начиная с информации о последовательности домена IgSF млекопитающего дикого типа, затем моделируя in silico связывание с его когнатным партнером по связыванию и в конечном итоге рекомбинантно или химически синтезируя его для получения композиции аффинно–модифицированного домена IgSF. В одном альтернативном примере аффинно–модифицированный домен IgSF

можно получать посредством сайт–специфического мутагенеза домена IgSF дикого типа. Таким образом, термин "аффинно–модифицированный домен IgSF" означает продукт, но не обязательно продукт, получаемый любым указанным способом. Можно использовать различные способы, включая рекомбинантные способы, химический синтез или их комбинации.

[0160] В рамках изобретения термин "аллогенный" означает клетку или ткань, удаленную из одного организма, а затем подвергнутую инфузии или адоптивному переносу в генетически отличающийся организм того же вида. В некоторых вариантах осуществления изобретения вид представляет собой мышь или человека.

[0161] В рамках изобретения термин "аутологичный" означает клетку или ткань, удаленную из того же организма, в который позднее осуществляют инфузию или адоптивный перенос. Аутологичную клетку или ткань можно изменять, например, способами рекомбинантной ДНК, таким образом, что она более не является генетически идентичной нативной клетке или нативной ткани, удаленной из организма. Например, нативную аутологичную Т–клетку можно генетически конструировать способами рекомбинантной ДНК, чтобы она стала аутологичной сконструированной клеткой, экспрессирующей трансмембранный иммуномодулирующий белок и/или химерный антигенный рецептор (CAR), что в некоторых случаях включает конструирование Т–клетки или TIL (инфильтрирующего опухоль лимфоцита). Затем сконструированные клетки подвергают инфузии пациенту, из которого выделяют нативную Т–клетку. В некоторых вариантах осуществления организм представляет собой человека или мышь.

[0162] В рамках изобретения термины "аффинность связывания" и "авидность связывания" означает аффинность специфического связывания и авидность связывания, соответственно, белка с его противоструктурой в специфических условиях связывания. В биохимической кинетике термин "авидность" относится к суммарной силе множества аффинностей отдельных нековалентных связывающих взаимодействий, например, между CD80 и его противоструктурами PD–L1, CD28 и/или CTLA–4. В связи с этим, авидность отличается от аффинности, соответствующей силе отдельного взаимодействия. Повышение или снижение аффинности связывания варианта CD80, содержащего аффинно–модифицированный CD80–домен IgSF, с его противоструктурой определяют относительно аффинности связывания немодифицированного CD80, такого как немодифицированный CD80, содержащий нативный домен IgSF или домен IgSF дикого типа, такой как IgV–домен. В этой области известны способы определения аффинности или авидности связывания. См., например, Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol. 5: 443–453 (2005). В некоторых вариантах осуществления вариант CD80, такой как вариант, содержащий аффинно–модифицированный домен IgSF, специфически связывается с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4, что измеряют посредством проточной цитометрии, с аффинностью связывания, соответствующей значению средней интенсивности флуоресценции (MFI), по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% превышающему значение для контрольного

немодифицированного CD80 а анализе связывания, как описано в примере 6.

[0163] Термин "биологическое время полужизни" относится к времени, за которое вещество, такое как иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант полипептида CD80 по изобретению, теряет половину своей фармакологической или физиологической активности или концентрации. На биологическое время полужизни могут влиять выведение, экскреция, деградация (например, ферментативная) вещества или абсорбция и концентрация в некоторых органах или тканях организма. В некоторых вариантах осуществления биологическое время полужизни можно оценивать посредством определения времени, за которое концентрация вещества в плазме крови достигает половины своего равновесного уровня ("период полувыведения из плазмы"). Конъюгаты, которые можно использовать для дериватизации и повышения биологического времени полужизни полипептидов по изобретению, известны в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксиэтилкрахмал (HES), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды; см. WO2013130683), сывороточный альбумин человека (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), липиды (ацилирование) и поли–Pro–Ala–Ser (PAS), полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

[0164] В рамках изобретения термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" относится к искусственному (т.е. сделанному человеком) трансмембранному белку, экспрессирующемуся на клетке млекопитающего и содержащему по меньшей мере эктодомен, трансмембранный домен и эндодомен. Необязательно, белок CAR включает "спейсер", ковалентно соединяющий эктодомен с трансмембранным доменом. Зачастую спейсер является полипептидом, соединяющим эктодомен с трансмембранным доменом с помощью пептидных связей. CAR, как правило, экспрессируется на лимфоците млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется на клетке млекопитающего, такой как Т–клетка или инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL). CAR, экспрессирующийся на Т–клетке, обозначают в настоящем описании как "CAR Т–клетку" или "CAR–Т". В некоторых вариантах осуществления CAR–Т является Т–хелперной клеткой, цитотоксической Т–клеткой, NKT–клеткой, Т–клеткой памяти, регуляторной Т–клеткой или гамма–дельта–Т–клеткой. При клиническом использовании, например, в адоптивном переносе клеток, CAR–Т с антигенной специфичностью связывания с опухолью пациента, как правило, конструируют для экспрессии на нативной Т–клетке, полученной из пациента. Затем сконструированную Т–клетку, экспрессирующую CAR, подвергают инфузии обратно пациенту. Таким образом, CAR–Т зачастую является аутологичной CAR–Т, хотя в объем изобретения входят аллогенные CAR–Т. Эктодомен CAR содержит антигенсвязывающую область, такую как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), специфически связывающийся в физиологических условиях с антигеном–мишенью, такой как опухолеспецифический антиген. После специфического связывания цепь биохимических событий (т.е. передача сигнала) приводит к модуляции иммунологической активности CAR–Т. Таким образом, например, специфическое связывание антигенсвязывающей области CAR–Т с ее

антигеном–мишенью может приводить к изменениям иммунологической активности Т–клетки, что отражают изменения цитотоксичности, пролиферации или продукции цитокинов. Передачи сигнала после активации CAR–T в некоторых вариантах осуществления достигают с помощью цепи CD3–дзета ("CD3–z"), участвующей в передаче сигнала в нативных Т–клетках млекопитающего. CAR–T дополнительно могут содержать множество сигнальных доменов, таких как CD28, 41BB или OX40, для дополнительной модуляции иммуномодулирующего ответа Т–клетки. CD3–z содержит консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), участвующий в передаче сигнала Т–клеточного рецептора.

[0165] Термин "совокупно" или "совокупный" при использовании по отношению к продукции цитокинов, индуцируемой присутствием двух или более вариантов полипептидов CD80 в анализе in vitro, означает общий уровень экспрессии цитокинов, независимо от продукции цитокинов, индуцируемой отдельными вариантами полипептидов CD80. В некоторых вариантах осуществления анализируемым цитокином является ИФН–гамма в анализе первичных Т–клеток in vitro, как описано в примере 7.

[0166] Термин "когнатный партнер по связыванию" (используемый взаимозаменяемо с термином "противоструктура") по отношению к полипептиду, например, по отношению к домену IgSF варианта CD80, относится по меньшей мере к одной молекуле (как правило, нативному белку млекопитающего), с которой упоминаемый полипептид специфически связывается в условиях специфического связывания. В некоторых аспектах вариант CD80, содержащий аффинно–модифицированный домен IgSF, специфически связывается с противоструктурой соответствующего нативного CD80 или CD80 дикого типа, но с повышенной или сниженной аффинностью. Тип лиганда, распознаваемого и специфически связывающегося с его когнатным рецептором в условиях специфического связывания, является примером противоструктуры или когнатного партнера по связыванию этого рецептора. "Когнатный партнер по связыванию на поверхности клетки" является когнатным партнером по связыванию, экспрессирующимся на поверхности клетки млекопитающего. "Молекула на поверхности клетки" является когнатным партнером по связыванию лигандов иммунологического синапса (IS), экспрессирующимся клетками и на клетках, таких как клетки млекопитающих, образуя иммунологический синапс.

[0167] В рамках изобретения термины "конъюгат", "конъюгация" или их грамматические варианты относятся к соединению или связыванию двух или более соединений, приводящему к образованию другого соединения, любыми способами соединения или связывания, известными в этой области. Они также могут относиться к соединению, получаемому посредством соединения или связывания двух или более соединений. Например, вариант полипептида CD80, связанный, прямо или косвенно, с одним или более химическими функциональными фрагментами или полипептидами, является примером конъюгата. Такие конъюгаты включают слитые белки, конъюгаты, получаемые посредством химической конъюгации, и конъюгаты, получаемые любыми

другими способами.

[0168] В рамках изобретения термин "конкурентное связывание" означает, что белок может специфически связываться по меньшей мере с двумя когнатными партнерами по связыванию, но специфическое связывание одного когнатного партнера по связыванию ингибирует, например, предотвращает или препятствует, одновременное связывание второго когнатного партнера по связыванию. Таким образом, в некоторых случаях белок не может связываться с двумя когнатными партнерами по связыванию одновременно. В основном, конкурентные связывающие средства содержат одинаковый или перекрывающийся участок связывания для специфического связывания, но это не является обязательным. В некоторых вариантах осуществления конкурентное связывание вызывает измеримое ингибирование (частичное или полное) специфического связывания белка с одним из его когнатных партнеров по связыванию по причине специфического связывания второго когнатного партнера по связыванию. Известно множество способов количественного анализа конкурентного связывания, таких как ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

[0169] В рамках изобретения термин "консервативная замена аминокислоты" означает замену аминокислоты, при которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, содержащим R–группу боковой цепи со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи, содержащие гидроксил: серин и треонин; 3) амид–содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин, и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин, и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Группы консервативных замен аминокислот представляют собой: валин–лейцин–изолейцин, фенилаланин–тирозин, лизин–аргинин, аланин–валин, глутамат–аспартат и аспарагин–глутамин.

[0170] Термин "соответствующий" в отношении положений в белке, например, перечисления положений нуклеотидов или аминокислота, "соответствующих" положениям нуклеотидов или аминокислот в описанной последовательности, например, приведенной в списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированных после выравнивания с описанной последовательностью с учетом структурного выравнивания последовательностей или с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Например, соответствующие остатки можно определять посредством выравнивания референсной последовательности с последовательностью CD80 дикого типа, приведенной в SEQ ID NO: 2 (домен ECD) или приведенной в SEQ ID NO: 76, 3030 или 3031 (IgV–домен), способами структурного выравнивания, как представлено в настоящем описании. С помощью выравнивания последовательностей специалист в этой области может

идентифицировать соответствующие остатки, например, с использованием консервативных и идентичных аминокислотных остатков в качестве руководства.

[0171] В рамках изобретения термины "снижение", или "уменьшение", или "супрессия" означают снижение на статистически значимое количество. Снижение может быть снижением по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%.

[0172] Термины "производные" или "дериватизированный" относятся к модификации белка посредством его ковалентного соединения, прямо или косвенно, с композицией таким образом, чтобы изменять такие характеристики, как биологическое время полужизни, биодоступность, иммуногенность, растворимость, токсичность, активность или эффективность, одновременно сохраняя или увеличивая его терапевтическую пользу. Производные иммуномодулирующих полипептидов по изобретению входят в объем изобретения, и их можно получать посредством, например, гликозилирования, пегилирования, липидирования или слияния с Fc.

[0173] В рамках изобретения детекция включает способы, позволяющие визуализировать (визуально или с помощью оборудования) белок. Белок можно визуализировать с использованием специфического антитела против белка. Детекцию белка также можно облегчать посредством слияния белка с меткой, включая детектируемую метку, или посредством приведения в контакт со вторым реагентом, специфичным для белка, таким как вторичное антитело, включающее детектируемую метку.

[0174] В рамках изобретения термин "домен" (как правило, последовательность из трех или более, как правило, 5 или 7 или более аминокислот, например, от 10 до 200 аминокислотных остатков) относится к части молекулы, такой как белок или кодирующая нуклеиновая кислота, структурно и/или функционально отличающейся от других частей молекулы и являющейся определимой. Например, домены включают части полипептидной цепи, которые могут образовывать независимо свернутую структуру в белке, состоящую из одного или более структурных мотивов и/или отличающуюся функциональной активностью, такой как активность связывания. Белок может содержать один или более отдельных доменов. Например, домен можно идентифицировать, определять или отличать благодаря гомологии первичной последовательности или структуры в отношении других членов семейства, такой как гомология в отношении мотивов. В другом примере домен может отличаться своей функцией, такой как способность взаимодействовать с биомолекулой, такой как когнатный партнер по связыванию. Домен независимо может демонстрировать биологическую функцию или активность таким образом, что домен независимо или в слиянии с другой молекулой может осуществлять активность, такую как, например, связывание. Домен может являться линейной аминокислотной последовательностью или нелинейной аминокислотной последовательностью. Многие полипептиды содержат множество доменов. Такие домены известны, и специалисты в этой области могут идентифицировать их. В настоящем

описании определения представлены в качестве примеров, но следует понимать, что специалист в этой области может определять конкретные домены по их названию. При необходимости, для идентификации доменов можно использовать соответствующее программное обеспечение.

[0175] В рамках изобретения термин "эктодомен" относится к области мембранного белка, такого как трансмембранный белок, находящегося вне везикулярной мембраны. Эктодомены зачастую содержат связывающие домены, специфически связывающиеся с лигандами или рецепторами поверхности клетки, например, с помощью связывающегося домена, специфически связывающегося с лигандом или рецептором поверхности клетки. Эктодомен клеточного трансмембранного белка альтернативно обозначают как внеклеточный домен.

[0176] Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству и/или концентрации терапевтической композиции по изобретению, включая белковую композицию или клеточную композицию, которое при введении ex vivo (посредством контакта с клеткой из пациента) или in vivo (посредством введения пациенту) в отдельности (т.е. в качестве монотерапии) или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами приводит к статистически значимому снижению прогрессирования заболевания, например, посредством улучшения или устранения симптомов и/или причины заболевания. Эффективное количество может являться количеством, облегчающим или уменьшающим по меньшей мере один симптом, или биологический ответ, или эффект, ассоциированный с заболеванием или нарушением, предотвращающим прогрессирование заболевания или нарушения или улучшающим физическое функционирование пациента. В случае клеточной терапии эффективное количество является эффективной дозой или количеством клеток, вводимых пациенту посредством адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления пациент является млекопитающим, таким как не являющийся человеком примат или человек.

[0177] В рамках изобретения термин "эндодомен" относится к области, обнаруживаемой в некоторых мембранных белках, таких как трансмембранные белки, продолжающейся во внутреннее пространство, определяемое поверхностной мембраной клетки. В клетках млекопитающих эндодомен является цитоплазматической областью мембранного белка. В клетках эндодомен взаимодействует с внутриклеточными компонентами, может играть роль в передаче сигнала и, таким образом, в некоторых случаях может являться внутриклеточным сигнальным доменом. Эндодомен клеточного трансмембранного белка альтернативно обозначают как цитоплазматический домен, который в некоторых случаях может являться цитоплазматическим сигнальным доменом.

[0178] В рамках изобретения термины "усиленный" или "повышенный" в отношении повышения иммунологической активности лимфоцита млекопитающего означает повышение одной или более активностей лимфоцита. Повышенная активность может представлять собой одно или более из повышения выживания клеток,

пролиферации клеток, продукции цитокинов или Т–клеточной цитотоксичности, например, на статистически значимое количество. В некоторых вариантах осуществления ссылка на повышенную иммунологическую активность означает повышение продукции интерферона гамма (ИФН–гамма), например, на статистически значимое количество. В некоторых вариантах осуществления иммунологическую активность можно анализировать в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). Способы осуществления анализов MLR известны в этой области. Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846–56. В этой области известны другие способы анализа активностей лимфоциты, включая любой анализ, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления повышение может являться повышением на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%,100%, 200%, 300%, 400% или 500% относительно ненулевого контрольного значения.

[0179] В рамках изобретения термин "сконструированная клетка" относится к клетке млекопитающего, генетически модифицированной человеком, например, способами рекомбинантной ДНК или вирусной трансдукции. В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой, такой как лимфоцит (например, Т–клетка, В–клетка, NK–клетка) или антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка). Клетка может являться первичной клеткой из пациента или линией клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка по изобретению содержит вариант CD80 по изобретению, сконструированный для модуляции иммунологической активности Т–клетки, экспрессирующей CD28, PD–L1 и/или CTLA–4, или АПК, экспрессирующей PD–L1, с которым вариант полипептида CD80 специфически связывается. В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 является трансмембранным иммуномодулирующим белком (далее в настоящем описании обозначаемом как "TIP"), содержащим внеклеточный домен или его часть, содержащую IgV–домен, соединенный с трансмембранным доменом (например, трансмембранным доменом CD80) и, необязательно, внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых случаях TIP получают в формате химерного рецептора, содержащего гетерологичный цитоплазматический сигнальный домен или эндодомен. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка может экспрессировать и секретировать иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании. Сконструированные клетки по изобретению также включают клетки, дополнительно содержащие сконструированный Т–клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR).

[0180] В рамках изобретения термин "сконструированная Т–клетка" относится к Т–клетке, такой как Т–хелперная клетка, цитотоксическая Т–клетка (альтернативно, цитотоксический Т–лимфоцит или CTL), NKT–клетка, регуляторная Т–клетка, Т–клетка памяти или гамма–дельта–Т–клетка, генетически модифицированная человеком, например, способами рекомбинантной ДНК или вирусной трансдукции. Сконструированная Т–клетка содержит вариант трансмембранного

иммуномодулирующего белка (TIP) или секретируемого иммуномодулирующего белка (SIP) CD80 по изобретению, экспрессирующийся на Т–клетке и сконструированный для модуляции иммунологической активности самой сконструированной Т–клетки или клетки млекопитающего, с которой вариант CD80, экспрессирующийся на Т–клетке, специфически связывается.

[0181] Термин "сконструированный Т–клеточный рецептор" или "сконструированный TCR" относится к Т–клеточному рецептору (TCR), сконструированному для специфического связывания с желаемой аффинностью с главным комплексом гистосовместимости (MHC)/пептидным антигеном–мишенью, подвергнутому селекции, клонированию и/или последующему встраиванию в популяцию Т–клеток, зачастую используемую для адоптивной иммунотерапии. В отличие от сконструированных TCR, CAR конструируют для связывания антигенов–мишеней MHC–зависимым образом.

[0182] В рамках изобретения термин "экспрессирующийся на" используют по отношению к белку, экспрессирующемуся на поверхности клетки, такой как клетка млекопитающего. Таким образом, белок экспрессируется как мембранный белок. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующийся белок является трансмембранным белком. В некоторых вариантах осуществления белок конъюгируют с низкомолекулярным функциональным фрагментом, таким как лекарственное средство или детектируемая метка. Белки, экспрессирующиеся на поверхности клетки, могут включать белки поверхности клетки, такие как рецепторы поверхности клетки, экспрессирующиеся на клетках млекопитающих.

[0183] Термин "увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент" относится к функциональному фрагменту слитого полипептида или химического конъюгата, увеличивающему время полужизни белка, циркулирующего в сыворотке крови млекопитающего по сравнению со временем полужизни белка, неконъюгированного с функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления время полужизни увеличено более чем приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз или 6,0 раз. В некоторых вариантах осуществления время полужизни увеличено более чем на 6 часов, более чем на 12 часов, более чем на 24 часа, более чем на 48 часов, более чем на 72 часа, более чем на 96 часов или более чем на 1 неделю после введения in vivo по сравнению с белком без увеличивающего время полужизни функционального фрагмента. Термин "время полужизни" относится к времени, за которое белок теряет половину своей концентрации, количества или активности. Время полужизни можно определять, например, с использованием анализа ELISA или анализа активности. Примеры увеличивающих время полужизни функциональных фрагментов включают Fc–домен, домен мультимеризации, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксиэтилкрахмал (HES), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды; см. WO2013130683), сывороточный альбумин человека (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), липиды (ацилирование), поли–Pro–Ala–Ser (PAS) и

полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

[0184] В рамках изобретения термин "иммунологический синапс" или "иммунный синапс" означает поверхность контакта между клеткой млекопитающего, экспрессирующей MHC I (главный комплекс гистосовместимости) или MHC II, такой как антигенпрезентирующая клетка или опухолевая клетка, и лимфоцитом млекопитающего, таким как эффекторная Т–клетка или естественный киллер (NK).

[0185] Область или домен Fc (кристаллизующийся фрагмент) молекулы иммуноглобулина (также обозначаемый как Fc–полипептид) соответствует, главным образом, константной области тяжелой цепи иммуноглобулина и отвечает за различные функции, включая эффекторные функции антитела. Fc–домен содержит весь шарнирный домен молекулы иммуноглобулина или его часть и домен CH2 и CH3. Fc–домен может образовывать димер из двух полипептидных цепей, соединенных одной или более дисульфидными связями. Примеры димеризованных полипептидов показаны на фиг. 6A и 6B. В некоторых вариантах осуществления Fc является вариантом Fc, демонстрирующим сниженную (например, сниженную более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более) активность, облегчающим эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления ссылка на замены аминокислот в Fc–области соответствует нумерации по системе EU, если не представлена ссылка на конкретную SEQ ID NO. Нумерация EU известна в этой области и соответствует последнему обновлению IMGT Scientific Chart (IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (созданный: 17 мая 2001 года, последнее обновление: 10 января 2013 года) и индексу EU, как описано в Kabat, E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91–3242 (1991).

[0186] Иммуноглобулиновый Fc–слитый белок ("Fc–слитый белок"), такой как иммуномодулирующий Fc–слитый белок, представляет собой молекулу, содержащую один или более полипептидов (или одно или более низкомолекулярных соединений), функционально связанных с Fc–областью иммуноглобулина. Fc–слитый белок может содержать, например, Fc–область антитела (что улучшает фармакокинетику) и вариант полипептида CD80. Fc–область иммуноглобулина можно соединять, прямо или косвенно, с одним или более вариантами полипептидов CD80 или низкомолекулярными соединениями (партнерами по слиянию). В этой области известны различные линкеры, и их, необязательно, можно использовать для соединения Fc с партнером по слиянию для получения Fc–слитого белка. Fc–слитые белки одинакового типа могут димеризоваться с образованием Fc–слитых гомодимеров или, при использовании неидентичных типов, с образованием Fc–слитых гетеродимеров. В некоторых вариантах осуществления Fc является Fc млекопитающего, таким как Fc мыши, кролика или человека.

[0187] Термин "клетка–хозяин" относится к клетке, которую можно использовать для экспрессии белка, кодируемого рекомбинантным экспрессирующим вектором. Клетка–хозяин может являться прокариотической, например, E. coli, или

эукариотической, например, одноклеточными эукариотами (например, дрожжами или другими грибами), растительной клеткой (например, клеткой растения табака или томата), клеткой животного (например, клеткой человека, клеткой обезьяны, клеткой хомяка, клеткой крысы, клеткой мыши или клеткой насекомого) или гибридомой. Примеры клеток–хозяев включают клетки яичника китайского хомяка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO, DG44, Expi CHO или CHOZN, и родственные линии клеток, выращиваемых в бессывороточных средах, или линия CHO DX–B11, в которой отсутствует DHFR. В некоторых вариантах осуществления клетка–хозяин может являться клеткой млекопитающего (например, клеткой человека, клеткой обезьяны, клеткой хомяка, клеткой крысы, клеткой мыши или клеткой насекомого).

[0188] В рамках изобретения термин "иммуноглобулин" (сокращенно обозначаемый как "Ig") относится к иммуноглобулиновому белку млекопитающего, включая любой из пяти классов антител человека: IgA (включающий подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включающий подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Термин также включает иммуноглобулины, меньше полноразмерных, являются ли они полностью или частично синтетическими (например, рекомбинантными или химически синтезированными) или природно продуцируемыми, такими как антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv), содержащий V_H и V_L, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий V_H и V_L соединенные в одну цепь, а также другие фрагменты V–области антитела, такие как Fab′, $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, dsFv, диатело, полипептидные фрагменты Fc и Fd. Биспецифические антитела, гомобиспецифические и гетеробиспецифические, входят в значение этого термина.

[0189] В рамках изобретения термин "суперсемейство иммуноглобулинов" или "IgSF" означает группу белков поверхности клетки и растворимых белков, участвующих в процессах распознавания, связывания или адгезии клеток. Молекулы классифицируют как членов суперсемейства с учетом структурных признаков, общих с иммуноглобулинами (т.е. антителами); все они содержат домен, известный как иммуноглобулиновый домен или укладка. Члены IgSF включают антигенные рецепторы поверхности клетки, корецепторы и костимуляторные молекулы иммунной системы, молекулы, участвующие в презентировании антигена лимфоцитам, молекулы клеточной адгезии, некоторые цитокиновые рецепторы и внутриклеточные мышечные белки. Как правило, они ассоциированы с ролью, которую они исполняют в иммунной системе. Белки в иммунологическом синапсе зачастую являются членами IgSF. IgSF также можно классифицировать на "подсемейства" с учетом общих свойств, таких как функция. Такие подсемейства, как правило, состоят из 4–30 членов IgSF.

[0190] В рамках изобретения термины "домен IgSF", или "иммуноглобулиновый домен", или "Ig–домен" относится к структурному домену белков IgSF. Ig–домены называют по молекулам иммуноглобулинов. Они содержат приблизительно 70–110 аминокислот, и их классифицируют по их размеру и функции. Ig–домены содержат характерную Ig–укладку, имеющую сэндвич–подобную структуру, образованную двумя

складками антипараллельных бета–тяжей. Взаимодействия между гидрофобными аминокислотами на внутренней стороне сэндвича и высококонсервативные дисульфидные связи, образующиеся между остатками цистеина в B– и F–тяжах, стабилизируют Ig–укладку. Один конец Ig–домена содержит секцию, названную определяющей комплементарность областью, важной для специфичности антител по отношению к их лигандам. Ig–подобные домены можно разделять (на классы) как: IgV, IgC1, IgC2 или IgI. Большинство Ig–доменов являются вариабельными (IgV) или константными (IgC). IgV–домены с 9 бета–тяжами, как правило, длиннее IgC–доменов с 7 бета–тяжами. Ig–домены некоторых членов IgSF напоминают IgV–домены по своей аминокислотной последовательности, хотя по размеру схожи с IgC–доменами. Их называют доменами IgC2, в то время как стандартные IgC–домены называют доменами IgC1. Цепи T–клеточного рецептора (TCR) содержат два Ig–домена во внеклеточной части; один IgV–домен на N–конце и один домен IgC1, смежный с мембраной клетки. CD80 содержит два Ig–домена: IgV и IgC.

[0191] В рамках изобретения термин "тип IgSF" означает совокупность белков–членов IgSF с идентичной или, по существу, идентичной первичной аминокислотной последовательностью. Каждый член суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) млекопитающего определяет уникальную идентичность всех типов IgSF, принадлежащих этому члену IgSF. Таким образом, каждый член семейства IgSF является уникальным по отношению к другим членам семейства IgSF, и, таким образом, каждый тип конкретного члена семейства IgSF является уникальным по отношению к типам другого члена семейства IgSF. Несмотря на это, могут иметь место различия между молекулами, принадлежащими к одному типу IgSF, являющиеся результатом различий посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидирование. Кроме того, минорные различия последовательностей в пределах одного типа IgSF, являющиеся результатом полиморфизмов генов, представляют собой другую форму различий в пределах одного типа IgSF, например, как укороченные формы типов IgSF дикого типа, являющиеся результатом, например, протеолитического расщепления. "Тип IgSF поверхности клетки" является типом IgSF, экспрессирующимся на поверхности клетки, как правило, клетки млекопитающего.

[0192] В рамках изобретения термин "иммунологическая активность" в отношении лимфоцитов млекопитающего, таких как T–клетки, относится к одному или более из выживания клеток, пролиферации клеток, продукции цитокинов (например, интерферона гамма) или цитотоксичности T–клеток. В некоторых случаях термин "иммунологическая активность" может означать экспрессию ими цитокинов, таких как хемокины или интерлейкины. Анализы для определения повышения или супрессии иммунологической активности включают анализы MLR (реакции смешанной культуры лимфоцитов), в которых измеряют уровни цитокина интерферона гамма в супернатантах культур (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846–56), анализ стимуляции T–клеток SEB

(стафилококковым энтеротоксином B) (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846–56), и анализы стимуляции Т–клеток антителами против CD3 (Li and Kurlander, J Transl Med. 2010: 8: 104). Т.к. активация Т–клеток ассоциирована с секрецией цитокина ИФН–гамма, определение уровней ИФН–гамма в супернатантах культур в этих анализах Т–клеток человека in vitro можно осуществлять с использованием коммерческих наборов для ELISA (Wu et al, Immunol Lett 2008 Apr 15; 117(1): 57–62). Индукция иммунного ответа приводит к повышению иммунологической активности относительно покоящихся клеток. Иммуномодулирующий белок, такой как вариант полипептида CD80, содержащий аффинно–модифицированный домен IgSF, как представлено в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления может повышать, или в альтернативных вариантах осуществления может снижать, экспрессию ИФН–гамма (интерферона гамма) в анализе первичных Т–клеток относительно члена IgSF дикого типа или контрольного домена IgSF. Специалистам будет понятно, что формат анализа первичных Т–клеток, используемого для определения повышения экспрессии ИФН–гамма, будет отличаться от формата, используемого для анализа на снижение экспрессии ИФН–гамма. При анализе на способность иммуномодулирующего белка или аффинно–модифицированного домена IgSF по изобретению снижать экспрессию ИФН–гамма в анализе первичных Т–клеток можно использовать анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), как описано в примере 6. Для удобства, растворимую форму аффинно–модифицированного домена IgSF по изобретению можно использовать для определения ее способности противодействовать и, таким образом, снижать экспрессию ИФН–гамма в MLR, как описано в примере 6. Альтернативно, при анализе на способность иммуномодулирующего белка или аффинно–модифицированного домена IgSF по изобретению повышать экспрессию ИФН–гамма в анализе первичных Т–клеток можно использовать анализ соиммобилизации. При анализе соиммобилизации сигнал Т–клеточного рецептора, в некоторых вариантах осуществления обеспечиваемый с помощью антитела против CD3, используют в комбинации с соиммобилизованным аффинно–модифицированным доменом IgSF, таким как вариант CD80, для определения способности повышать экспрессию ИФН–гамма относительно контрольного домена IgSF дикого типа. Способы анализа иммунологической активности сконструированных клеток, включающие оценку активности варианта трансмембранного иммуномодулирующего белка CD80, известны в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, анализы способности вызывать экспансию Т–клеток после стимуляции антигеном, поддерживать экспансию Т–клеток в отсутствие повторной стимуляции и анализы противоопухолевой активности в соответствующих моделях на животных. Анализы также включают анализы для оценки цитотоксичности, включая стандартный анализ высвобождения ^{51}Cr (см. например, Milone et al., (2009) Molecular Therapy 17: 1453–1464), или анализы цитотоксичности на основе проточной цитометрии, или импедансный анализ цитотоксичности (Peper et al. (2014) Journal of Immunological Methods, 405:192–198).

[0193] "Иммуномодулирующий полипептид" или "иммуномодулирующий белок"

является молекулой полипептида или белка, модулирующей иммунологическую активность. Термины "модуляция" или "модулирующий" иммунный ответ означают, что иммунологическая активность повышена или снижена. Иммуномодулирующий белок может представлять собой одну полипептидную цепь или мультимер (димеры или мультимеры более высокого порядка) из по меньшей мере двух полипептидных цепей, ковалентно связанных друг с другом посредством, например, межцепочечных дисульфидных связей. Таким образом, полипептиды–мономеры, –димеры и –мультимеры более высокого порядка входят в объем определенного термина. Мультимерные полипептиды могут являться гомомультимерными (из идентичных полипептидных цепей) или гетеромультимерными (из неидентичных полипептидных цепей). Иммуномодулирующий белок может содержать вариант полипептида CD80.

[0194] В рамках изобретения термин "повышение" означает повышение на статистически значимое количество. Повышение может являться повышением по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100% или более относительно ненулевого контрольного значения.

[0195] "Изоформа" CD80 является одним из множества природных полипептидов CD80, отличающихся аминокислотной последовательностью. Изоформы могут являться продуктами вариантов сплайсинга транскрипта РНК, экспрессируемого одним геном, или продуктами экспрессии очень схожих, но отличающихся генов, что приводит к образованию функционально схожих белков, например, что может происходить при дупликации генов. В рамках изобретения термин "изоформа" CD80 также относится к продуктам различных аллелей гена CD80.

[0196] Термин "метка" относится к соединению или композиции, которую можно присоединять или связывать, прямо или косвенно, для получения детектируемого сигнала, или которая может взаимодействовать со второй меткой для модификации детектируемого сигнала. Метку можно конъюгировать, прямо или косвенно, с полипептидом для получения меченого полипептида. Метка сама может являться детектируемой (например, радиоактивные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализовать химическое изменение композиции соединения–субстрата, являющееся детектируемым. Неограничивающие примеры меток включают флуорогенные функциональные фрагменты, зеленый флуоресцентный белок или люциферазу.

[0197] В рамках изобретения термин "лимфоцит" означает любой из трех подтипов лейкоцитов в иммунной системе млекопитающего. Они включают естественные киллеры (NK–клетки) (функционирующие в клеточно–опосредованном, цитотоксическом врожденном иммунитете), Т–клетки (для клеточно–опосредованного, цитотоксического адаптивного иммунитета) и В–клетки (для гуморального, антителозависимого адаптивного иммунитета). Т–клетки включают: Т–хелперные клетки, цитотоксические Т–клетки, NKT–клетки, Т–клетки памяти, регуляторные Т–клетки или гамма–дельта–Т–клетки. Лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILC) также входят в определение

лимфоцита.

[0198] Термины "млекопитающее" или "пациент" конкретно включают ссылку на по меньшей мере одного из: человека, шимпанзе, макака–резуса, яванского макака, собаки, кошки, мыши или крысы.

[0199] В рамках изобретения термин "мембранный белок" означает белок, который в физиологических условиях присоединен, прямо или косвенно, к липидному бислою. Липидный бислой, образующий мембрану, может являться биологической мембраной, такой как мембрана эукариотической клетки (например, млекопитающего) или искусственная (т.е. сделанная человеком) мембрана, такая как в липосоме. Присоединение мембранного белка к липидному бислою может происходить посредством ковалентного присоединения или нековалентных взаимодействий, таких как гидрофобные или электростатические взаимодействия. Мембранный белок может являться интегральным мембранным белком или периферическим мембранным белком. Мембранные белки, являющиеся периферическими мембранными белками, нековалентно присоединены к липидному бислою или интегральному мембранному белку. Периферический мембранный белок образует временное соединение с липидным бислоем таким образом, что в диапазоне условий, являющихся физиологическими для млекопитающего, периферический мембранный белок может ассоциировать и/или диссоциировать от липидного бислоя. В отличие от периферических мембранных белков, интегральные мембранные белки образуют, по существу, постоянное соединение с липидным бислоем мембраны таким образом, что в диапазоне условий, являющихся физиологическими для млекопитающего, интегральные мембранные белки не диссоциируют из их соединения с липидным бислоем. Мембранный белок может образовывать соединение с мембраной с помощью одного слоя из липидного бислоя (монотопное), или может присоединяться к обоим слоям мембраны (политопное). Интегральный мембранный белок, взаимодействующий только с одним липидным бислоем, является "интегральным монотопным белком". Интегральный мембранный белок, взаимодействующий с обоими липидными бислоями, является "интегральным политопным белком", альтернативно обозначаемым в настоящем описании как "трансмембранный белок".

[0200] В рамках изобретения термины "модулирующий" или "модулировать" в отношении иммунного ответа, такого как иммунный ответ млекопитающего, относятся к любому изменению, такому как повышение или снижение, существующих или потенциальных иммунных ответов, возникающему в результате введения иммуномодулирующего полипептида, содержащего вариант CD80 по изобретению, или в результате введения сконструированных клеток, экспрессирующих иммуномодулирующий белок, такой как вариант трансмембранного иммуномодулирующего белка CD80 по изобретению. Таким образом, они относятся к изменению, такому как повышение или снижение, иммунного ответа по сравнению с иммунным ответом, возникающим или имеющим место в отсутствие введения иммуномодулирующего белка, содержащего вариант CD80. Такая модуляция включает

любую индукцию, активацию, супрессию или изменение степени иммунологической активности иммунной клетки. Иммунные клетки включают В–клетки, Т–клетки, NK–клетки (естественные киллеры), NKT–клетки, профессиональные антигенпрезентирующие клетки (АПК), непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки и воспалительные клетки (нейтрофилы, макрофаги, моноциты, эозинофилы и базофилы). Модуляция включает любое изменение существующего иммунного ответа, развивающегося иммунного ответа, потенциального иммунного ответа или возможность индукции, регуляции, влияния или ответа на иммунный ответ. Модуляция включает любое изменение экспрессии и/или функции генов, белков и/или других молекул в иммунных клетках как часть иммунного ответа. Модуляция иммунного ответа или модуляция иммунологической активности включает, например, следующее: устранение, уничтожение или секвестрацию иммунных клеток; индукцию или образование иммунных клеток, которые могут модулировать функциональную способность других клеток, таких как аутореактивные лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки или воспалительные клетки; индукцию состояния неотвечаемости иммунных клеток (т.е. анергии); повышение или супрессию активности или функции иммунных клеток, включая, в качестве неограничивающих примеров, изменения профиля белков, экспрессируемых этими клетками. Примеры включают измененную продукцию и/или секрецию некоторых классов молекул, таких как цитокины, хемокины, факторы роста, факторы транскрипции, киназы, костимуляторные молекулы или другие рецепторы поверхности клетки, или любую комбинацию этих модулирующих событий. Модуляцию можно оценивать, например, по изменению экспрессии ИФН–гамма (интерферона гамма) относительно CD80 дикого типа или контрольного немодифицированного CD80 в анализе первичных Т–клеток (см. Zhao and Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan1; 340(1): 132–138). Модуляцию можно оценивать, например, по изменению иммунологической активности сконструированных клеток, такому как изменение цитотоксической активности сконструированных клеток или изменение секреции цитокинов сконструированными клетками относительно клеток, сконструированных с использованием трансмембранного белка CD80 дикого типа.

[0201] Термин "домен мультимеризации" относится к аминокислотной последовательности, способствующей стабильному взаимодействию полипептидной молекулы с одним или более дополнительными полипептидными молекулами, каждая из которых содержит комплементарный домен мультимеризации (например, первый домен мультимеризации и второй домен мультимеризации), который может являться тем же или другим доменом мультимеризации. Взаимодействия между комплементарными доменами мультимеризации, например, взаимодействие между первым доменом мультимеризации и вторым доменом мультимеризации, приводит к стабильному белок–белковому взаимодействию с образованием мультимера полипептидной молекулы с дополнительной полипептидной молекулой. В некоторых случаях домен мультимеризации является тем же и взаимодействует с самим собой с образованием белок–белкового взаимодействия между двумя полипептидными цепями. Как правило, полипептид соединяют, прямо или

косвенно, с доменом мультимеризации. Примеры доменов мультимеризации включают иммуноглобулиновые последовательности или их части, лейциновые молнии, гидрофобные области, гидрофильные области и совместимые домены белок–белковых взаимодействий. Домен мультимеризации, например, может являться константной областью или доменом иммуноглобулина, таким как, например, Fc–домен или его части из IgG, включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA, IgE, IgD и IgM и их модифицированные формы.

[0202] Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" используют взаимозаменяемо для обозначения полимера остатков нуклеиновой кислоты (например, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов) в одно– или двухцепочечной форме. Если нет конкретных ограничений, термины включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, имеющие схожие с ними свойства связывания и метаболизируемые аналогично природным нуклеотидам. Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные нуклеотидные последовательности, а также конкретно указанную последовательность ("референсную последовательность"). В частности, замены вырожденных кодонов можно получать посредством получения последовательностей, в которых третью часть одного или более выбранных (или всех) кодонов заменяют неоднозначными основаниями и/или остатками дезоксиинозина. Термины "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" включают кДНК или мРНК, кодируемую геном.

[0203] В рамках изобретения термин "тип молекул" означает совокупность белков с идентичной или, по существу, идентичной первичной аминокислотной последовательностью. Каждый член суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающего (IgSF) определяет совокупность идентичных или, по существу, идентичных типов молекул. Таким образом, например, CD80 человека является членом IgSF, и каждая молекула CD80 человека является типом молекул CD80. Различия между молекулами, принадлежащему к одному типу молекул, могут возникать в результате различий посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидирование. Кроме того, минорные различия последовательности в одном типе молекул в результате полиморфизмов генов представляют собой другую форму различий в одном типе молекул, например, как укороченные формы дикого типа одного типа молекул в результате, например, протеолитического расщепления. "Тип молекул поверхности клетки" является типом молекул, экспрессирующимся на поверхности клетки млекопитающего. Два или более различных типа белка, каждый из которых присутствует исключительно на одной или исключительно на другой (но не обоих) из двух клеток млекопитающих, образующих IS, указывают как находящиеся в "цис" или "цис–конфигурации" друг относительно друга. Два разных типа белка, первый из которых присутствует исключительно на одной из двух клеток млекопитающих, образующих IS, и

второй из которых присутствует исключительно на второй из двух клеток млекопитающих, образующих IS, указывают как находящиеся в "транс" или "транс–конфигурации". Два разных типа белка, каждый из которых присутствует на обоих из двух клеток млекопитающих, образующих IS, находятся в цис– и транс–конфигурации на этих клетках.

[0204] В рамках изобретения термин "неконкурентное связывание" означает способность белка специфически связываться одновременно по меньшей мере с двумя когнатными партнерами по связыванию. Таким образом, белок может связываться с по меньшей мере двумя разными когнатными партнерами по связыванию одновременно, хотя связывающее взаимодействие может не иметь одинаковую длительность таким образом, что в некоторых случаях белок специфически связан только с одним из когнатных партнеров по связыванию. В некоторых вариантах осуществления связывание происходит в условиях специфического связывания. В некоторых вариантах осуществления одновременное связывание является таким, что связывание одного когнатного партнера по связыванию, по существу, не ингибирует одновременное связывание со вторым когнатным партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления термин "неконкурентное связывание" означает, что связывание второго когнатного партнера по связыванию с его участком связывания на белке не мешает связыванию первого когнатного партнера по связыванию с его участком связывания на белке. Способы анализа неконкурентного связывания хорошо известны в этой области, такие как способ, описываемый в Perez de La Lastra et al., Immunology, 1999 Apr: 96(4): 663–670. В некоторых случаях при неконкурентном взаимодействии первый когнатный партнер по связыванию специфически связывается в участке взаимодействия, не перекрывающимся с участком взаимодействия второго когнатного партнера по связыванию таким образом, что связывание второго когнатного партнера по связыванию не мешает напрямую связыванию первого когнатного партнера по связыванию. Таким образом, любой эффект связывания второго когнатного партнера по связыванию в отношении связывания когнатного партнера по связыванию осуществляется посредством иного механизма, чем прямое противодействие связыванию первого когнатного партнера по связыванию. Например, в контексте взаимодействий фермент–субстрат, неконкурентный ингибитор связывается с иным участком, чем активный центр фермента. Неконкурентное связывание включает неконкурентные связывающие взаимодействия, при которых второй когнатный партнер по связыванию специфически связывается в участке взаимодействия, не перекрывающимся с участком связывания первого когнатного партнера по связыванию, но связывается со вторым участком взаимодействия, только когда первый участок взаимодействия занят первым когнатным партнером по связыванию.

[0205] Термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения в отношении у млекопитающего, зачастую человека. Фармацевтическая композиция, как правило, содержит эффективное

количество активного средства (например, иммуномодулирующего полипептида, содержащего вариант CD80, или сконструированные клетки, экспрессирующие вариант трансмембранного иммуномодулирующего белка CD80) и носитель, эксципиент или дилюент. Носитель, эксципиент или дилюент, как правило, являются фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или дилюентом, соответственно.

[0206] Термины "полипептид" и "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к молекулярной цепи из двух или более аминокислот, соединенных пептидными связями. Термины не относятся к конкретной длине продукта. Таким образом, "пептиды" и "олигопептиды" входят в определение полипептида. Термины включают посттрансляционные модификации полипептида, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Термины также включают молекулы, в которые включены один или более аналогов аминокислот или неканонических или неприродных аминокислот, которые можно синтезировать или экспрессировать рекомбинантно с использованием известных способов белковой инженерии. Кроме того, белки можно дериватизировать.

[0207] В рамках изобретения термин "анализ первичных Т–клеток" относится к анализу in vitro для измерения экспрессии интерферона гамма ("ИФН–гамма"). В этой области известно множество таких анализов первичных Т–клеток, таких как описываемые в примере 6. В предпочтительном варианте осуществления используемый анализ является анализом соиммобилизации с использованием антител против CD3. В этом анализе первичные Т–клетки стимулируют антителом против CD3, иммобилизованным с дополнительными рекомбинантными белками или без них. Супернатанты культур собирают в различные моменты времени, как правило, через 24–72 часа. В другом варианте осуществления используемый анализ является реакцией смешанной культуры лимфоцитов (MLR). В этом анализе первичные Т–клетки стимулируют аллогенными АПК. Супернатанты культур собирают в различные моменты времени, как правило, через 24–72 часа. Уровни ИФН–гамма человека измеряют в супернатантах культур стандартными способами ELISA. Коммерческие наборы доступны у поставщиков, и анализ осуществляют по инструкциям производителя.

[0208] Термин "очищенный" в отношении нуклеиновых кислот, таких как нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуномодулирующие белки по изобретению, как правило, означает нуклеиновую кислоту или полипептид, по существу, не содержащие другие компоненты, что определяют аналитическими способами, хорошо известными в этой области (например, очищенный полипептид или полинуклеотид образует отдельную полосу в геле для электрофореза, хроматографическом элюате и/или средах, подвергнутых центрифугированию в градиенте плотности). Например, нуклеиновая кислота или полипептид, образующие, по существу, одну полосу в геле для электрофореза, является "очищенным". Очищенная нуклеиновая кислота или белок по изобретению является по меньшей мере на приблизительно 50% чистым, как правило, по меньшей мере на приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 99% или более чистым

(например, в процентах по массе или в пересчете на моли).

[0209] Термин "рекомбинантный" означает, что материал (например, нуклеиновая кислота или полипептид) подвергнут искусственному (т.е. неприродному) изменению человеком. Изменение можно осуществлять в отношении материала, находящегося в природной среде или состоянии или удаленного из него. Например, "рекомбинантная нуклеиновая кислота" является нуклеиновой кислотой, полученной посредством рекомбинации нуклеиновых кислот, например, во время клонирования, аффинной модификации, перестановки ДНК или других хорошо известных способов молекулярной биологии. "Рекомбинантная молекула ДНК" состоит из сегментов ДНК, соединенных такими способами молекулярной биологии. В рамках изобретения термин "рекомбинантный белок" или "рекомбинантный полипептид" относится к молекуле белка, экспрессируемой с использованием рекомбинантной молекулы ДНК. "Рекомбинантная клетка–хозяин" является клеткой, содержащей и/или экспрессирующей рекомбинантную нуклеиновую кислот или иным образом измененной посредством генетической инженерии, например, посредством встраивания в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, такой как трансмембранный иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании. Сигналы транскрипционного контроля у эукариот включают "промоторные" и "энхансерные" элементы. Промоторы и энхансеры состоят из коротких наборов последовательностей ДНК, специфически взаимодействующих с клеточными белками, участвующими в транскрипции. Промоторные и энхансерные элементы выделены из множества эукариотических источников, включая гены дрожжей, клеток насекомых и млекопитающих, и вирусов (аналогичные контрольные элементы, т.е. промоторы, также обнаруживают у прокариот). Выбор конкретного промотор и энхансера зависит от того, какой тип клеток будут использовать для экспрессии интересующего белка. В рамках изобретения термин "функционально связанный" относится к связи последовательностей нуклеиновой кислоты таким образом или в такой ориентации, что продуцируется молекула нуклеиновой кислоты, способная регулировать транскрипцию указанного гена и/или синтез желаемой молекулы белка.

[0210] В рамках изобретения термин "рекомбинантный экспрессирующий вектор" относится к молекуле ДНК, содержащей желаемую кодирующую последовательность и соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке–хозяине. Последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии у прокариот, включают промотор, необязательно, последовательность оператора, участок связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы терминации и полиаденилирования. Последовательность секреторного сигнального пептида также, необязательно, может кодироваться рекомбинантным экспрессирующим вектором, функционально связанным с кодирующей последовательностью для рекомбинантного

белка, такого как рекомбинантный слитый белок, таким образом, что экспрессируемый слитый белок может секретировать рекомбинантной клеткой–хозяином, при желании, для облегчения выделения слитого белка из клетки. Термин включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки–хозяина, в которую его вводили. Векторы включают вирусные векторы, такие как лентивирусные векторы.

[0211] Термин "селективность" относится к предпочтительности для указанного белка или полипептида специфического связывания одного субстрата, такого как один когнатный партнер по связыванию, по сравнению со специфическим связыванием с другим субстратом, таким как другой когнатный партнер по связыванию указанного белка. Селективность можно выражать как соотношение активности связывания (например, аффинности связывания) указанного белка и первого субстрата, такого как первый когнатный партнер по связыванию, (например, K_{d1}), и активности связывания (например, аффинности связывания) того же указанного белка со вторым когнатным партнером по связыванию (например, K_{d2}).

[0212] В рамках изобретения термин "идентичность последовательности" относится к идентичности последовательности между генами или белками на уровне нуклеотидов или аминокислот, соответственно. "Идентичность последовательности" является мерой идентичности между белками на уровне аминокислот и мерой идентичности между нуклеиновыми кислотами на уровне нуклеотидов. Идентичность последовательностей белков можно определять посредством сравнения аминокислотной последовательности в указанном положении в каждой последовательности при выравнивании последовательностей. Аналогично, идентичность последовательностей нуклеиновой кислоты можно определять посредством сравнения нуклеотидной последовательности в указанном положении в каждой последовательности при выравнивании последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в этой области, такие способы включают GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. С помощью алгоритма BLAST вычисляют процент идентичности последовательности и осуществляют статистический анализ сходства между двумя последовательностями. Программное обеспечение для осуществления анализа BLAST является общедоступным на веб–сайте National Center for Biotechnology Information (NCBI).

[0213] В рамках изобретения термин "растворимый" по отношению к белкам означает, что белок не является мембранным белком. В основном, растворимый белок содержит только внеклеточный домен рецептора–члена семейства IgSF или его часть, содержащую домен или домены IgSF или их специфически связывающиеся фрагменты, но не содержащую трансмембранный домен. В некоторых случаях растворимость белка можно улучшать посредством связывания или соединения, прямо или косвенно через линкер, с Fc–доменом, который в некоторых случаях также может улучшать стабильность и/или время полужизни белка. В некоторых аспектах растворимый белок является Fc–

слитым белком.

[0214] В рамках изобретения термин "тип" в отношении полипептидов или нуклеиновых кислот означает совокупность молекул с идентичными или, по существу, идентичными последовательностями. Различия между полипептидами, принадлежащими к одному типу, могут возникать в результате различий посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидирование. Немного укороченные последовательности полипептидов, отличающиеся (или кодирующие отличие) от полноразмерного типа на амино–конце или карбокси–конце не более чем на 1, 2 или 3 аминокислотных остатка, считают принадлежащими к одному типу. Такая микрогетерогенность является общим признаком производимых белков.

[0215] В рамках изобретения термин "специфически связывающийся фрагмент" по отношению к полноразмерному полипептиду CD80 млекопитающего дикого типа или его IgV– или IgC–домену означает полипептид, содержащий подпоследовательность IgV– и/или IgC–домена и специфически связывающийся in vitro и/или in vivo с CD28 млекопитающего, PD–L1 млекопитающего и/или CTLA–4 млекопитающего, таким как CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления специфически связывающийся фрагмент IgV CD80 или IgC CD80 имеет по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% длины последовательности полноразмерной последовательности дикого типа. Можно изменять последовательность специфически связывающегося фрагмента для получения варианта CD80.

[0216] В рамках изобретения термин "специфически связывается" означает способность белка в условиях специфического связывания связываться с белком–мишенью таким образом, что его аффинность или авидность по меньшей мере в 5 раз выше, но, необязательно, по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250 или 500 раз или даже по меньшей мере 1000 раз выше средней аффинности или авидности того же белка в отношении совокупности случайных пептидов или полипептидов достаточного статистического размера. Специфически связывающийся белок может не связываться исключительно с одной молекулой–мишенью, но может специфически связываться с нецелевой молекулой благодаря сходству структурной конформации между целевым и нецелевым белком (например, паралогами или ортологами). Специалистам будет понятно, что возможным является специфическое связывание с молекулой, имеющей ту же функцию у разных видов животных (т.е. ортологом), или нецелевой молекулой, имеющей, по существу, схожий эпитоп, что и молекула–мишень (например, паралог), и оно не уменьшает специфичность связывания, определяемую относительно статистически достоверной совокупности уникальных нецелевых белков (например, случайных полипептидов). Таким образом, полипептид по изобретению может специфически связываться с несколькими отдельными типами молекулы–мишени в результате перекрестно реактивности. Для определения специфического связывания между двумя белками можно использовать твердофазные иммунологические анализы ELISA или

поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore). Как правило, взаимодействия между двумя связывающими белками имеют константы диссоциации (K_d) менее 1×10^{-5} М и зачастую всего 1×10^{-12} М. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения взаимодействия между двумя связывающимися белками имеют константы диссоциации 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М или 1×10^{-11} М.

[0217] Термины "экспрессируется на поверхности" или "поверхностная экспрессия" по отношению к клетке млекопитающего, экспрессирующей полипептид, означает, что полипептид экспрессируется как мембранный белок. В некоторых вариантах осуществления мембранный белок является трансмембранным белком.

[0218] В рамках изобретения термин "синтетический" в отношении, например, синтетической молекулы нуклеиновой кислоты, или синтетического гена, или синтетического пептида, относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептидной молекуле, получаемой рекомбинантными способами и/или способами химического синтеза.

[0219] В рамках изобретения термин "направляющий функциональный фрагмент" относится к композиции, ковалентно или нековалентно присоединенной или физически инкапсулирующей полипептид, содержащий вариант CD80. Направляющий функциональный фрагмент имеет аффинность специфического связывания с желаемой противоструктурой, такой как рецептор поверхности клетки (например, член семейства B7 PD–L1) или опухолевый антиген, такой как опухолеспецифический антиген (TSA) или опухоле–ассоциированный антиген (TAA), такой как B7–H6. Как правило, желаемая противоструктура локализуется на конкретном типе ткани или клеток. Направляющие функциональные фрагменты включают: антитела, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv) содержащий V_H и V_L, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержащий V_H и V_L, соединенные в одну цепь, а также другие фрагменты V–области антитела, такие как Fab′, $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, dsFv диатело, нанотела, растворимые рецепторы, лиганды рецепторов, аффинно зрелые рецепторы или лиганды, а также низкомолекулярные (<500 Да) композиции (например, композиции специфически связывающегося рецептора). Направляющие функциональные фрагменты также можно соединять ковалентно или нековалентно с липидной мембраной липосом, инкапсулирующей полипептид по изобретению.

[0220] В рамках изобретения термин "трансмембранный белок" означает мембранный белок, по существу или полностью пересекающий липидный бислой, такой как липидные бислои, обнаруживаемые в биологической мембране, например, в клетке млекопитающего, или в искусственной конструкции, такой как липосома. Трансмембранный белок содержит трансмембранный домен, с помощью которого он интегрируется в липидный бислой и благодаря которому интеграция является термодинамически стабильной в физиологических условиях. Трансмембранные домены, как правило, можно прогнозировать из их аминокислотной последовательности с помощью ряда коммерчески доступных биоинформатических программных приложений с

учетом их повышенной гидрофобности относительно областей белка, взаимодействующих с водной средой (например, цитозолем, внеклеточной жидкостью). Трансмембранный домен зачастую представляет собой гидрофобную альфа–спираль, пересекающую мембрану. Трансмембранный белок может проходить через оба слоя липидного бислоя один или множество раз. Трансмембранный белок включает трансмембранные иммуномодулирующие белки по изобретению, представленные в настоящем описании. В дополнение к трансмембранному домену, трансмембранный иммуномодулирующий белок по изобретению дополнительно содержит эктодомен и, в некоторых вариантах осуществления, эндодомен.

[0221] В рамках изобретения термины "лечение" или "терапия" заболевания или нарушения означает замедление, прекращение или реверсирование прогрессирования заболевания или нарушения, о чем свидетельствует снижение, прекращение или устранение клинических или диагностических симптомов, посредством введения терапевтической композиции (например, содержащей иммуномодулирующий белок или сконструированные клетки) по изобретению в отдельности или в комбинации с другим соединением, как представлено в настоящем описании. Термины "лечение" или "терапия" также означают снижение тяжести симптомов острого или хронического заболевания или нарушения или снижение частоты рецидивирования, например, как в случае рецидива или ремиссии аутоиммунного заболевания, или снижение воспаления в случае воспалительного аспекта аутоиммунного заболевания. В рамках изобретения в отношении злокачественного новообразования термины "лечение" или "ингибирование" злокачественного новообразования относятся по меньшей мере к одному из: статистически значимого снижения скорости роста опухоли, прекращения роста опухоли или уменьшения размера, массы, метаболической активности или объема опухоли, что измеряют с помощью стандартных критериев, в качестве неограничивающих примеров, таких как Критерии оценки ответа солидных опухолей (RECIST), или статистически значимого повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) или общей выживаемости (OS). В рамках изобретения термин "профилактика" заболевания или нарушения относится к введению иммуномодулирующего полипептида или сконструированных клеток по изобретению в отдельности или в комбинации с другим соединением для профилактики возникновения или дебюта заболевания, или нарушения, или некоторых или всех симптомов заболевания или нарушения или уменьшения вероятности дебюта заболевания или нарушения.

[0222] В рамках изобретения термин "опухолеспецифический антиген" или "TSA" относится к противоструктуре, присутствующей, главным образом, на опухолевых клетках млекопитающего, но, как правило, необнаруживаемой на нормальных клетках млекопитающего. Опухолеспецифический антиген может не принадлежать исключительно опухолевым клеткам, но доля клеток конкретного млекопитающего, содержащих опухолеспецифический антиген, является достаточно высокой, или уровни опухолеспецифического антигена на поверхности опухоли являются достаточно

высокими таким образом, что на них можно направленно воздействовать с помощью противоопухолевых терапевтических средств, таких как иммуномодулирующие полипептиды по изобретению, и обеспечивать профилактику или лечение млекопитающего в отношении эффектов опухоли. В некоторых вариантах осуществления в случайной статистической выборке клеток млекопитающего с опухолью по меньшей мере 50% клеток, имеющих TSA, являются злокачественными. В других вариантах осуществления по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% клеток, имеющих TSA, являются злокачественными.

[0223] Термин "вариант" (также "модифицированный" или "мутант") при использовании по отношению к варианту CD80 означает CD80, такой как CD80 млекопитающего (например, человека или мыши), созданный человеком. Вариант CD80 является полипептидом, имеющим измененную аминокислотную последовательность относительно немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа. Вариант CD80 является полипептидом, отличающимся от последовательности изоформы CD80 дикого типа на одну или более замен, делеций, инсерций аминокислот или их комбинаций. В целях по изобретению, вариант CD80 содержит по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен, в связи с чем в домене IgSF (например, IgV–домене) есть одно или более отличий аминокислот. Вариант CD80 может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более отличий аминокислот, таких как замены аминокислот. Вариант полипептида CD80, как правило, демонстрирует по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к соответствующему CD80 дикого типа или немодифицированному CD80, такому как последовательность SEQ ID NO: 1, его зрелая последовательность или ее часть, содержащая внеклеточный домен или его домен IgSF. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к соответствующему CD80 дикого типа или немодифицированному CD80, содержащему последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 3030 или SEQ ID NO: 3031.

[0224] В объем допустимых замен или инсерций входят неприродные аминокислоты, а также природные аминокислоты. Вариант CD80 не ограничен каким–либо конкретным способом получения, включающим, например, химический синтез de novo, способы рекомбинантной ДНК de novo или их комбинации. Вариант CD80 по изобретению специфически связывается по меньшей мере с одним или более из: CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 вида млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления измененная аминокислотная последовательность приводит к измененной (т.е. повышенной или сниженной) аффинности или авидности связывания ч CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 по сравнению с немодифицированным белком CD80 или белком CD80

дикого типа. Повышение или снижение аффинности или авидность связывания можно определять с использованием хорошо известных анализов связывания, таких как проточная цитометрия. Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443–453 (2005). См. также, Linsley et al., Immunity, Vol1(9): 793–801 (1994). Повышение аффинности или авидности связывания варианта CD80 с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 может составлять по меньшей мере на 5% больше аффинности или авидности связывания немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100% больше контрольного значения немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа. Снижение аффинности или авидности связывания CD80 с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 составляет не более 95% контрольных значений немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа и, в некоторых вариантах осуществления, не более 80%, 70% 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или может представлять собой отсутствие детектируемой аффинности или авидности связывания относительно контрольных значений немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа. Первичную аминокислотную последовательность варианта полипептида CD80 изменяют посредством замены, инсерции или делеции аминокислотных остатков. Термин "вариант" в отношении варианта полипептида CD80 не следует истолковывать как предписание любых условий для любой конкретной начальной композиции или способа, с помощью которых получают вариант CD80. Вариант CD80 можно получать, например, начиная с информации о последовательности CD80 млекопитающего дикого типа, затем посредством моделирования in silico связывания с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 и в конечном итоге рекомбинантного получения или химического синтеза для получения варианта CD80. В одном альтернативном примере вариант CD80 можно получать посредством сайт–специфического мутагенеза немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа. Таким образом, термин "вариант CD80" означает композицию, а не обязательно продукт, получаемый любым указанным способом. Можно использовать различные способы, включающие рекомбинантные способы, химический синтез или их комбинации.

[0225] В рамках изобретения термины "дикий тип", или "природный", или "нативный" используют в отношении биологических материалов, таких как молекулы нуклеиновой кислоты, белки (например, CD80), члены IgSF, клетки–хозяева и т.п., и они относятся к материалам, обнаруживаемым в природе, а не модифицированным человеком.

II. ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДОВ CD80

[0226] Настоящее изобретение относится к вариантам полипептидов CD80, демонстрирующим измененную (повышенную или сниженную) активность или аффинность связывания с одним или более партнерами CD80 по связыванию. В некоторых вариантах осуществления CD80 партнер по связыванию является CD28, PD–L1 или CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот, такую как одна или более замен (альтернативно "мутаций"), делеций или инсерций в домене (IgD) суперсемейства

иммуноглобулинов (IgSF) относительно полипептида CD80 дикого типа, или немодифицированного полипептида CD80, или части CD80 дикого типа или немодифицированного CD80, содержащей IgD или его специфически связывающийся фрагмент. Таким образом, вариант полипептида CD80 по изобретению представляет собой или содержит вариант IgD (далее в настоящем описании обозначаемый как "vIgD"), в котором одна или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgD.

[0227] В некоторых вариантах осуществления IgD содержит IgV–домен или IgC–домен (например, IgC2), или специфически связывающийся фрагмент IgV–домена или IgC–домена (например, IgC2), или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления IgD может являться только IgV, комбинацией IgV и IgC, включающей целый внеклеточный домен (ECD), или любой комбинацией Ig–доменов CD80. В таблице 2 представлены примеры остатков, соответствующих областям IgV или IgC CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен, или IgC–домен, или их специфически связывающиеся фрагменты, в которых по меньшей мере одна модификация аминокислоты (например, замена) находится в IgV–домене, или IgC–домене, или его специфически связывающемся фрагменте. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающиеся фрагменты, в которых по меньшей мере одна из модификаций аминокислот (например, замен) находится в IgV–домене или его специфически связывающемся фрагменте. В некоторых вариантах осуществления в силу измененной активности или аффинности связывания измененный IgV–домен или IgC–домен является аффинно–модифицированным доменом IgSF.

[0228] В некоторых вариантах осуществления вариант модифицирован в одном или более доменах IgSF относительно последовательности немодифицированного CD80. В некоторых вариантах осуществления последовательность немодифицированного CD80 является CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления немодифицированный CD80 или дикого типа CD80 имеет последовательность нативного CD80 или его ортолога. В некоторых вариантах осуществления немодифицированный CD80 представляет собой или содержит внеклеточный домен (ECD) CD80 или его часть, содержащую один или более доменов IgSF (см. таблицу 2). Например, немодифицированный полипептид CD80 представляет собой или содержит IgV–домен, приведенный как аминокислоты 35–135 SEQ ID NO: 1, аминокислоты 35–138 SEQ ID NO: 1 (см. SEQ ID NO: 3030) или аминокислоты 35–141 SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях немодифицированный полипептид CD80 представляет собой или содержит IgC–домен, приведенный как аминокислоты 145–230 SEQ ID NO: 1 или аминокислоты 142–232 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен немодифицированного полипептида CD80 или полипептида CD80 дикого типа содержит IgV–домен и IgC–домен или домены. Однако вариант полипептида CD80 может не содержать оба из IgV–домена и IgC–домена или доменов. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит или, по существу, состоит из IgV–домена или его специфически

связывающегося фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит или, по существу, состоит из IgC–домена или его специфически связывающихся фрагментов. В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 является растворимым, и в нем отсутствует трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 дополнительно содержит трансмембранный домен и, в некоторых случаях, также цитоплазматический домен.

[0229] В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 является полипептидом CD80 млекопитающего, в качестве неограничивающих примеров, таким как полипептид CD80 человека, мыши, яванского макака или крысы. В некоторых вариантах осуществления последовательность CD80 дикого типа или немодифицированного CD80 принадлежит человеку.

[0230] В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, или последовательность его зрелой формы, в которой отсутствует сигнальная последовательность, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1 или ее зрелой форме, или (iii) является частью (i) или (ii), содержащей IgV–домен, или IgC–домен, или их специфически связывающиеся фрагменты.

[0231] В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 представляет собой или содержит внеклеточный домен CD80 или его часть. Например, в некоторых вариантах осуществления немодифицированный полипептид CD80 или полипептид CD80 дикого типа содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, или ее ортолог. Например, немодифицированный полипептид CD80 или полипептид CD80 дикого типа может содержать (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2, или (iii) является специфически связывающимся фрагментом (i) или (ii), содержащим IgV–домен или IgC–домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен дикого типа или немодифицированный внеклеточный домен CD80 может связываться с одним или более CD80–связывающими белками, такими как один или более из CTLA–4, PD–L1 или CD28.

[0232] В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 содержит IgV–домен, или IgC–домен, или их специфически связывающийся фрагмент. В некоторых вариантах осуществления IgV–домен полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76, 150, 3030

или 3031, или ее ортолог. Например, IgV–домен немодифицированного полипептида CD80 или полипептида CD80 дикого типа может содержать (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76, 150, 3030 или 3031, (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 76, 150, 3030 или 3031, или (iii) является специфически связывающимся фрагментом (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления IgV–домен дикого типа или немодифицированный IgV–домен может связываться с одним или более CD80–связывающими белками, такими как один или более из CTLA–4, PD–L1 или CD28.

[0233] В некоторых вариантах осуществления IgC–домен полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 содержит аминокислотную последовательность, приведенную как остатки 145–230, 154–232 или 142–232 SEQ ID NO: 1, или ее ортолог. Например, IgC–домен немодифицированного полипептида CD80 или полипептида CD80 дикого типа может содержать (i) аминокислотную последовательность, приведенную как остатки 145–230, 154–232 или 142–232 SEQ ID NO: 1, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности по отношению к остаткам 145–230, 154–232 или 142–232 SEQ ID NO: 1, или (iii) является специфически связывающимся фрагментом (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления IgC–домен дикого типа или немодифицированный IgC–домен может связываться с одним или более CD80–связывающими белками.

[0234] В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент CD80, такой как специфически связывающийся фрагмент IgV–домена или IgC–домена. В некоторых вариантах осуществления специфически связывающийся фрагмент может связываться с CTLA–4, PD–L1 и/или CD28. Специфически связывающийся фрагмент может иметь длину по меньшей мере 50 аминокислот, такую как по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 100 или 110 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления специфически связывающийся фрагмент IgV–домена содержит аминокислотную последовательность, составляющую по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% длины IgV–домена, приведенного как аминокислоты 35–135, 35–138, 37–138 или 35–141 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления специфически связывающийся фрагмент IgC–домена содержит аминокислотную последовательность, составляющую по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% длины IgC–домена, приведенного как аминокислоты 145–230, 154–232, 142–232 SEQ ID NO: 1.

[0235] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80

содержит домен ECD или его часть, содержащую один или более аффинно–модифицированных доменов IgSF. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 могут содержать IgV–домен, или IgC–домен, или специфически связывающийся фрагмент IgV–домена, или специфически связывающийся фрагмент IgC–домена, где по меньшей мере один из IgV– или IgC–домена содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен). В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 могут содержать IgV–домен и IgC–домен или специфически связывающийся фрагмент IgV–домена и специфически связывающийся фрагмент IgC–домена. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит полноразмерный IgV–домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит полноразмерный IgC–домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент IgV–домена. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент IgC–домена. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит полноразмерный IgV–домен и полноразмерный IgC–домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит полноразмерный IgV–домен и специфически связывающийся фрагмент IgC–домена. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент IgV–домена и полноразмерный IgC–домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент IgV–домена и специфически связывающийся фрагмент IgC–домена.

[0236] В любом из таких вариантов осуществления одна или более модификаций аминокислот (например, замен) в вариантах полипептидов CD80 может находиться в любом одном или более из доменов полипептида CD80. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся во внеклеточном домене варианта полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgV–домене или специфически связывающемся фрагменте IgV–домена. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgC–домене или специфически связывающемся фрагменте IgC–домена.

[0237] В целом, каждый из различных признаков полипептидов отдельно описан ниже (например, растворимые и мембраносвязанные полипептиды, аффинность CD80 к CTLA–4, PD–L1 и CD28, количество различий на полипептидную цепь, количество соединенных полипептидных цепей, количество и природа изменений аминокислот на вариант CD80 и т.д.). Однако, как будет очевидно специалистам в этой области, любой конкретный полипептид может содержать комбинацию этих независимых признаков. Следует понимать, что ссылка на аминокислоты, включая конкретную последовательность, приведенную как SEQ ID NO и используемую для описания организации домена IgSF, представлена для иллюстративных целей и не предназначена

для ограничения объема вариантов осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что полипептиды и описание их доменов теоретически получают с учетом анализа гомологии и выравнивания схожих молекул. Таким образом, конкретный локус может варьироваться и не обязательно является одним и тем же для каждого белка. Таким образом, конкретный домен IgSF, такой как конкретный IgV–домен или IgC–домен, может быть на несколько аминокислот (например, одну, две, три или четыре) длиннее или короче.

[0238] Кроме того, различные варианты осуществления изобретения, описанные ниже, часто представляют в рамках значения определенного термина, описанного выше. Таким образом, варианты осуществления, описанные в конкретном определении, следует интерпретировать как включенные в качестве ссылки, если определенный термин используют в обсуждении различных аспектов и признаков, представленных в настоящем описании. Таким образом, заголовки, порядок презентации различных аспектов и вариантов осуществления и отдельное описание каждого независимого признака не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

A. ПРИМЕРЫ МОДИФИКАЦИЙ

[0239] Настоящее изобретение относится к вариантам полипептидов CD80, содержащим по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV или IgC) или его специфически связывающийся фрагмент относительно домена IgSF, содержащегося в полипептиде CD80 дикого типа или немодифицированном полипептиде CD80 таким образом, что вариант полипептида CD80 демонстрирует измененную (повышенную или сниженную) активность или аффинность связывания с одним или более когнатными партнерами по связыванию, CTLA–4, PD–L1 или CD28, по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет аффинность связывания с CTLA–4, PD–L1 или CD28, отличающуюся от аффинности контрольной последовательности полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80, определяемой, например, посредством твердофазных иммунологических анализов ELISA, проточной цитометрии или анализа поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4, PD–L1 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 может являться белком млекопитающего, таким как белок человека или белок мыши.

[0240] Измененной, например, повышенной или сниженной, активности или аффинности связывания с CTLA–4, PD–L1 и/или CD28 достигают посредством одной или более модификаций аминокислот в домене IgSF дикого типа или немодифицированном домене IgSF. Последовательность CD80 дикого типа или немодифицированного CD80 не

обязательно использовать в качестве исходной композиции для получения вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании. Таким образом, использование термина "замена" не означает, что варианты осуществления настоящего изобретения ограничены конкретным способом получения вариантов полипептидов CD80. Варианты полипептиды CD80 можно получать, например, посредством пептидного синтеза de novo, и, таким образом, в этом случае не требуется "замена" в смысле изменения кодона для кодирования замены. Этот принцип также распространяется на термины "инсерция" и "делеция" аминокислотного остатка, которые аналогичным образом не означают конкретный способ получения. Способы, которыми создают или получают варианты полипептидов CD80, не ограничены каким–либо конкретным способом. Однако, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CD80 дикого типа или немодифицированного CD80, подвергают мутагенезу относительно генетического материала CD80 дикого типа или немодифицированного CD80 и скринингу на желаемую аффинность специфического связывания, и/или индукцию экспрессии ИФН–гамма, или другую функциональную активность способами, описанными в примерах, или другими способами, известными специалистам в этой области. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 синтезируют de novo с использованием последовательностей белка или нуклеиновой кислоты, доступных в любых общедоступных базах данных, а затем подвергают скринингу. National Center for Biotechnology Information предоставляет такую информацию, и его веб–сайт является общедоступным в сети интернет, как и база данных UniProtKB, как описано ранее.

[0241] Если не указано иначе, как указано на всем протяжении настоящего описания, модификации аминокислот обозначены по номеру положения аминокислоты, соответствующему нумерации положений последовательности немодифицированного ECD, приведенной в SEQ ID NO: 2 или, в соответствующих случаях, последовательности немодифицированного IgV, приведенного в SEQ ID NO: 76, 150, 3030 или 3031, следующим образом:

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPE YKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSIS DFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTT NHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN (SEQ ID NO: 2)

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPE YKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT (SEQ ID NO: 76)

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPE YKNRTIFDITNNLSIVIQALRPSDEGTYECVVLKYEKDGFKREHLAEVTLSVKAD (SEQ ID NO: 150)

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPE YKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSV (SEQ ID NO: 3030)

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPE YKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKAD (SEQ ID NO: 3031)

[0242] Специалисты в этой области могут идентифицировать соответствующее положение модификации, например, замены аминокислоты, в полипептиде CD80, включая его часть, содержащую его домен IgSF (например, IgV), например, посредством выравнивания референсной последовательности с SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 76, или SEQ ID NO: 150, или SEQ ID NO: 3030, или SEQ ID NO: 3031. При указании модификаций на всем протяжении настоящего описания положение аминокислоты указано в середине, при этом соответствующая немодифицированная аминокислота (например, дикого типа) указана перед числом, а указанный вариант замены аминокислоты указан после числа. Если модификация является делецией положения, указывают "del", и если модификация является инсерцией в положении, указывают "ins". В некоторых случаях инсерцию указывают с использованием положения аминокислоты, указанного в середине, при этом соответствующая немодифицированная аминокислота (например, дикого типа) указана до и после числа, а идентифицированный вариант инсерции аминокислоты указывают после немодифицированной аминокислоты (например, дикого типа).

[0243] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен) в последовательности CD80 дикого типа или немодифицированного CD80. Одна или более модификаций аминокислот (например, замен) могут находиться в эктодомене (внеклеточном домене) последовательности CD80 дикого типа или немодифицированного CD80, таком как внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgV–домене или его специфически связывающемся фрагменте. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgC–домене или его специфически связывающемся фрагменте. В некоторых вариантах осуществления варианта полипептида CD80 некоторые из одной или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgV–домене или его специфически связывающемся фрагменте, и некоторые из одной или более модификаций аминокислот (например, замен) находятся в IgC–домене или его специфически связывающемся фрагменте.

[0244] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот (например, замен). Модификации (например, замены) могут находиться в IgV–домене или IgC–домене. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот (например, замен) в IgV–домене или его специфически связывающемся фрагменте. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот (например, замен) в IgC–домене или его специфически

связывающемся фрагменте. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении полипептида CD80 дикого типа, или немодифицированного полипептида CD80, или их специфически связывающегося фрагмента, таких как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031.

[0245] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен) в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 13, 15, 16, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 65, 67,68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76,77, 78, 79, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 92, 94, 95 и/или 97 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен) в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию, например, замену аминокислоты, в любых 2 или более из указанных выше положений, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более положениях.

[0246] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, T28Y, I30F, I30T, I30V, Y31C, Y31S, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54E, K54N, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, N63D, L65P, I67L, I67V, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, L70P, L70Q, A71D, A71G, L72V, R73H, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87Q, E88V, D90P, F92S, F92V, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из E7D, E23D, E23G, A26E, A26P, A26S, A26T, I30F, I30T, I30V, K34E, E35D, E35G, D46E, D46V, P51A, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, L65P, A71D, A71G, R73S, G78A, T79A, T79I, T79L, T79P, C82R, V84A, V84I, L85Q или их консервативной замены аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит любые 2 или более из указанных выше замен аминокислот, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 содержат только одно отличие аминокислоты по сравнению с немодифицированным полипептидом CD80 или полипептидом CD80 дикого типа,

включающее только одну из указанных выше замен аминокислот.

[0247] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более дополнительных модификаций аминокислот (например, замен) в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 12, 18, 29, 31, 37, 38, 41, 43, 44, 47, 61, 67, 68, 69, 70, 72, 77, 83, 88, 89, 90, 91 или 93 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более дополнительных замен аминокислот, выбранных из A12T, A12V, H18L, H18Y, R29H, Y31H, K37E, M38T, T41A, M43I, S44P, M47L, M47T, I67T, V68A, V68M, I69T, L70P, L70R, L70Q, L72P, E77G, V83A, V83I, E88D, K89E, K89N, D90G, D90N, A91T, K93R.

[0248] Консервативная замена аминокислоты представляет собой любую аминокислоту, входящую в тот же класс аминокислот, что и замененные аминокислоты, но иную, чем аминокислота дикого типа или немодифицированная аминокислота. Классы аминокислот представляют собой алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксил– или серосодержащие (серин, цистеин, треонин и метионин), циклические (пролин), ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан), основные (гистидин, лизин и аргинин), и кислые/амидные (аспартат, глутамат, аспарагин и глутамин) аминокислоты. Таким образом, например, консервативная замена аминокислоты A26E включает замены аминокислот A26D, A26N и A26Q.

[0249] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 18 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты H18Y или ее консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 26, 35, 46, 47, 68, 71, 85 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более замен аминокислот A26E, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, A71G, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/A26E, H18Y/E35D, H18Y/D46E, H18Y/D46V, H18Y/M47I, H18Y/M47L, H18Y/V68M, H18Y/A71G, H18Y/L85Q, H18Y/D90G. Вариант полипептида CD80 может содержать дополнительные модификации аминокислот в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0250] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 26 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых

вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты A26E или ее консервативной заменой аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 35, 46, 47, 68, 71, 85 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, A71G, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/A26E, A26E/E35D, A26E/D46E, A26E/D46V, A26E/M47I, A26E/M47L, A26E/V68M, A26E/A71G, A26E/L85Q, A26E/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0251] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 35 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты E35D или ее консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 26, 46, 47, 68, 71, 85 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, A71G, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/E35D, A26E/E35D, E35D/D46E, E35D/D46V, E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/V68M, E35D/A71G, E35D/L85Q, E35D/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 46 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты D46E или D46V или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 26, 35, 47, 68, 71, 85 или 90. В

некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, E35D, M47I, M47L, V68M, A71G, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/D46E, A26E/D46E, E35D/D46E, D46E/M47I, D46E/M47L, D46E/V68M, D46E/A71G, D46E/L85Q, D46E/D90G. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/D46V, A26E/D46V, E35D/D46V, D46V/M47I, D46V/M47L, D46V/V68M, D46V/A71G, D46V/L85Q, D46V/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0252] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 47 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты M47I или M47L или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 26, 35, 46, 68, 71, 85 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, E35D, D46E, D46V, V68M, A71G, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/M47I, A26E/M47I, E35D/M47I, M47I/D46E, M47I/D46V, M47I/V68M, M47I/A71G, M47I/L85Q или M47I/D90G. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/M47L, A26E/M47L, E35D/M47L, M47L/D46E, M47L/D46V, M47L/V68M, M47L/A71G, M47L/L85Q или M47L/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0253] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 68 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты V68M или ее консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот,

например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 26, 35, 46, 47, 71, 85 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, A71G, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/V68M, A26E/V68M, E35D/V68M, D46E/V68M, D46V/D68M, M47I/V68M, M47L/V68M, V68M/A71G, V68M/L85Q, V68M/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0254] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 71 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты A71G или ее консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 26, 35, 46, 47, 68, 85 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, L85Q или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/A71G, A26E/A71G, E35D/A71G, D46E/A71G, D46V/D68M, M47I/A71G, M47L/A71G, V68M/A71G, A71G/L85Q, A71G/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0255] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 85 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты L85Q или ее консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более положениях 18, 26, 35, 46, 47, 68, 71 или 90. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, A71G или D90G или их консервативной заменой. В некоторых вариантах

осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/L85Q, A26E/L85Q, E35D/L85Q, D46E/L85Q, D46V/D68M, M47I/L85Q, M47L/L85Q, V68M/L85Q, A71G/L85Q, L85Q/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0256] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификацию аминокислоты в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем положению 90 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления модификация аминокислоты является заменой аминокислоты D90G или ее консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 дополнительно содержит одну или более модификаций аминокислот, например, замен аминокислот, в одном или более из положений 18, 26, 35, 46, 47, 68, 71 или 85. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислоты являются одной или более заменами аминокислот H18Y, A26E, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, A71G или L85Q или их консервативной заменой. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/D90G, A26E/D90G, E35D/D90G, D46E/D90G, D46V/D68M, M47I/D90G, M47L/D90G, V68M/D90G, A71G/D90G, L85Q/D90G. Вариант полипептида CD80 может включать дополнительные модификации аминокислот, такие как любые модификации, представленные в настоящем описании, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В таблице 1 приведены примеры модификаций аминокислот и описанных вариантов полипептидов CD80.

[0257] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются H18Y/M47I/T57I/A71G, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q или H18Y/A71D/L72P/E88V. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 41, 59, 66, 115, 133, 140, 189, 207 или 214.

[0258] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде, CD80 приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются A26E/E35D/M47L/L85Q. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 73, 147 или 221.

[0259] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80,

приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, E35D/A71D, E35D/M47I, E35D/T57I/L70Q/A71D, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D. E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E35D/M43I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, A26E/E35D/M47L/L85Q, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 19, 20, 28, 29, 37, 46, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 64, 68, 69,70, 73, 75, 93, 94, 102, 103, 111, 120, 121, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 138, 142, 143, 144, 147, 149, 167, 168, 176, 177, 185, 194, 195, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 206, 207, 208, 212, 216, 217, 218, 221 или 223.

[0260] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются E35D/D46V/L85Q, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V или D46E/A71D. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 55, 69, 74, 129, 143, 148, 203, 217 или 222.

[0261] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, E35D/M47I, M47L/V68A, M47I/E88D, H18Y/M47I/T57I/A71G, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D/M47I/L70M, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, E35D/M47L, A26E/E35D/M47L/L85Q. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 19, 20, 29, 33, 38, 41, 49, 51, 56, 60, 73, 93, 94, 103, 107, 112, 115, 123, 125, 130, 134, 147, 167, 168, 177, 181, 186, 189, 197, 199, 204, 208, 221.

[0262] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются A26E/E35D/M47L/L85Q. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 62, 136, 210.

[0263] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями

аминокислот являются H18Y/M47I/T57I/A71G или V22L/E35D/M43L/A71G/D76H. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 41, 70, 115, 144, 189 или 218.

[0264] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q или A26E/E35D/M47L/L85Q. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 54, 55, 58, 59, 73, 128, 129, 132, 133, 147, 202, 203, 206, 207 или 221.

[0265] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте в положении, соответствующем E35D и M47L. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D и M47I. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D и A71G. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D и M47V. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D и V68M. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие H18Y и E35D.

[0266] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит по меньшей мере три модификации аминокислот, где по меньшей мере три модификации включают модификацию в трех или более положениях, соответствующих положениям 18, 26, 35, 46, 47, 68, 71, 85 или 90 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере три модификация аминокислоты включают модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие H18Y, A26E, E35D, D46E, D46V, M47I, M47L, V68M, A71G, L85Q или D90G или их консервативной замене аминокислоты.

[0267] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D/M47L/V68M.

[0268] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80

содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D/M47V/V68M.

[0269] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие E35D/M47L/L85Q.

[0270] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующие H18Y/E35D/M47I.

[0271] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит любые из замен (мутаций), указанных в таблице 1. В таблице 1 также представлены примеры последовательностей со ссылкой на SEQ ID NO для внеклеточного домена (ECD) или IgV–домена CD80 дикого типа или примеров вариантов полипептидов CD80. Как указано, конкретный локус или остатки, соответствующие указанному домену, могут варьироваться, например, в зависимости от способов, используемых для идентификации или классификации домена. Кроме того, в некоторых случаях смежные N– и/или C–концевые аминокислоты указанного домена (например, IgV) также можно включать в последовательность варианта полипептида IgSF, например, для обеспечения правильного фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, следует понимать, что приведение примеров SEQ ID NO в таблице 1 не следует истолковывать как ограничение. Например, конкретный домен, такой как IgV–домен, варианта полипептида CD80 может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, например, на 1–10, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот длиннее или короче, чем аминокислотная последовательность, приведенная в соответствующей SEQ ID NO.

[0272] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), указанных в таблице 1 (т.е. любую из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507, 2930–2960). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит последовательность полипептида, демонстрирующую по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, например, по меньшей мере 96% идентичности 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности по отношению к любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), указанных в таблице 1 (т.е. любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507, 2930–2960), и содержит модификации аминокислот, например, замены, отсутствующие в CD80 дикого типа или немодифицированном CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), указанных в таблице 1 (т.е. любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507, 2930–2960) и содержит модификации аминокислот, например, замены, отсутствующие в CD80 дикого типа или немодифицированном CD80. В

некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит любую из последовательностей IgV, указанных в таблице 1 (т.е. любую из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929, 2961–3022). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит последовательность полипептида, демонстрирующую по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 91% идентичности, по меньшей мере 92% идентичности, по меньшей мере 93% идентичности, по меньшей мере 94% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, например, по меньшей мере 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности по отношению к любой из последовательностей IgV, указанных в таблице 1 (т.е. любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929, 2961–3022), и содержит модификации аминокислот, например, замены, отсутствующие в CD80 дикого типа или немодифицированном CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит специфически связывающийся фрагмент любой из последовательностей IgV, указанных в таблице 1 (т.е. любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929, 2961–3022), и содержит модификации аминокислот, например, замены, отсутствующие в CD80 дикого типа или немодифицированном CD80.

[0273] В таблице 1 также представлены примеры последовательностей со ссылкой на SEQ ID NO для внеклеточного домена (ECD) или IgV–домена CD80 дикого типа или примеры вариантов полипептидов CD80. Как указано, конкретный локус или остатки, соответствующие указанному домену, могут варьироваться, например, в зависимости от способов, используемых для идентификации или классификации домена. Кроме того, в некоторых случаях смежные N– и/или C–концевые аминокислоты указанного домена (например, ECD) также можно включать в последовательность варианта полипептида IgSF, например, для обеспечения правильного фолдинга домена при экспрессии. Таким образом, следует понимать, что приведение примеров SEQ ID NO в таблице 1 не следует истолковывать в качестве ограничения. Например, конкретный домен, такой как IgV–домен, варианта полипептида CD80 может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, например, на 1–10, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот длиннее или короче, чем аминокислотная последовательность, приведенная в соответствующей SEQ ID NO.

ТАБЛИЦА 1: Примеры вариантов полипептидов CD80

Мутации CD80	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**	
Дикий тип	2	76	3031
L70P	3	77	151
I30F/L70P	4	78	152
Q27H/T41S/A71D	5	79	153
I30T/L70R	6	80	154

T13R/C16R/L70Q/A71D	7	81	155
T57I	8	82	156
M43I/C82R	9	83	157
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	10	84	158
I30V/T57I/L70P/A71D/A91T	11	85	159
V22I/L70M/A71D	12	86	160
N55D/L70P/E77G	13	87	161
T57A/I69T	14	88	162
N55D/K86M	15	89	163
L72P/T79I	16	90	164
L70P/F92S	17	91	165
T79P	18	92	166
E35D/M47I/L65P/D90N	19	93	167
L25S/E35D/M47I/D90N	20	94	168
A71D	22	96	170
E81K/A91S	24	98	172
A12V/M47V/L70M	25	99	173
K34E/T41A/L72V	26	100	174
T41S/A71D/V84A	27	101	175
E35D/A71D	28	102	176
E35D/M47I	29	103	177
K36R/G78A	30	104	178
Q33E/T41A	31	105	179
M47V/N48H	32	106	180
M47L/V68A	33	107	181
S44P/A71D	34	108	182
Q27H/M43I/A71D/R73S	35	109	183
E35D/T57I/L70Q/A71D	37	111	185
M47I/E88D	38	112	186
M42I/I61V/A71D	39	113	187
P51A/A71D	40	114	188
H18Y/M47I/T57I/A71G	41	115	189
V20I/M47V/T57I/V84I	42	116	190
V20I/M47V/A71D	43	117	191

A71D/L72V/E95K	44	118	192
V22L/E35G/A71D/L72P	45	119	193
E35D/A71D	46	120	194
E35D/I67L/A71D	47	121	195
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	48	122	196
T13R/M42V/M47I/A71D	49	123	197
E35D	50	124	198
E35D/M47I/L70M	51	125	199
E35D/A71D/L72V	52	126	200
E35D/M43L/L70M	53	127	201
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	54	128	202
E35D/D46V/L85Q	55	129	203
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D	56	130	204
M47V/I69F/A71D/V83I	57	131	205
E35D/T57A/A71D/L85Q	58	132	206
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	59	133	207
E35D/M47L	60	134	208
E23D/M42V/M43I/I58V/L70R	61	135	209
V68M/L70M/A71D/E95K	62	136	210
N55I/T57I/I69F	63	137	211
E35D/M43I/A71D	64	138	212
T41S/T57I/L70R	65	139	213
H18Y/A71D/L72P/E88V	66	140	214
V20I/A71D	67	141	215
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	68	142	216
A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V	69	143	217
V22L/E35D/M43L/A71G/D76H	70	144	218
E35G/K54E/A71D/L72P	71	145	219
L70Q/A71D	72	146	220
A26E/E35D/M47L/L85Q	73	147	221
D46E/A71D	74	148	222
Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W	75	149	223
A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E	2009	2105	2201
A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q	2010	2106	2202

E35D/M47L/L85Q	2011	2107	2203
A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2012	2108	2204
A26E/Q33L/E35D/M47L	2013	2109	2205
H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2014	2110	2206
Q33L/E35D/M47I	2015	2111	2207
H18Y/Q33L/E35D/M47I	2016	2112	2208
Q33L/E35D/D46E/M47I	2017	2113	2209
Q33R/E35D/D46E/M47I	2018	2114	2210
H18Y/E35D/M47L	2019	2115	2211
Q33L/E35D/M47V	2020	2116	2212
Q33L/E35D/M47V/T79A	2021	2117	2213
Q33L/E35D/T41S/M47V	2022	2118	2214
Q33L/E35D/M47I/L85Q	2023	2119	2215
Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q	2024	2120	2216
Q33L/E35D/M47V/L85Q	2025	2121	2217
A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q	2026	2122	2218
Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q	2027	2123	2219
V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V	2028	2124	2220
E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q	2029	2125	2221
S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2030	2126	2222
E7D/E35D/M47I/L97Q	2031	2127	2223
Q33L/E35D/T41S/M43I	2032	2128	2224
E35D/M47I/K54R/L85E	2033	2129	2225
Q33K/E35D/D46V/L85Q	2034	2130	2226
Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G	2035	2131	2227
H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q	2036	2132	2228
Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K	2037	2133	2229
Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R	2038	2134	2230
E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W	2039	2135	2231
A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W	2040	2136	2232
Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N	2041	2137	2233
H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F	2042	2138	2234
V22A/E35D/V68E/A71D	2043	2139	2235
Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S	2044	2140	2236

V22A/R29H/E35D/D46E/M47I	2045	2141	2237
Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W	2046	2142	2238
H18Y/E35D/V68M/L97Q	2047	2143	2239
Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D	2048	2144	2240
Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G	2049	2145	2241
E35D/M47L/A71G/L97Q	2050	2146	2242
E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q	2051	2147	2243
H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q	2052	2148	2244
E35D/D46E/M47V/L97Q	2053	2149	2245
E35D/D46V/M47I/A71G/F92V	2054	2150	2246
E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M	2055	2151	2247
Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q	2056	2152	2248
E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q	2057	2153	2249
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	2058	2154	2250
Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G	2059	2155	2251
R29H/E35D/M43V/M47I/I49V	2060	2156	2252
Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G	2061	2157	2253
E35D/M47I/L85Q/D90G	2062	2158	2254
E35D/M47I/T62S/L85Q	2063	2159	2255
A26E/E35D/M47L/A71G	2064	2160	2256
E35D/M47I/Y87Q/K89E	2065	2161	2257
V22A/E35D/M47I/Y87N	2066	2162	2258
H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G	2067	2163	2259
E35D/M47L/A71G/L85Q	2068	2164	2260
E35D/M47V/A71G/E88D	2069	2165	2261
E35D/A71G	2070	2166	2262
E35D/M47V/A71G	2071	2167	2263
I30V/E35D/M47V/A71G/A91V	2072	2168	2264
I30V/Y31C/E35D/M47V/A71G/L85M	2073	2169	2265
V22D/E35D/M47L/L85Q	2074	2170	2266
H18Y/E35D/N48K	2075	2171	2267
E35D/T41S/M47V/A71G/K89N	2076	2172	2268
E35D/M47V/N48T/L85Q	2077	2173	2269
E35D/D46E/M47V/A71D/D90G	2078	2174	2270

E35D/D46E/M47V/A71D	2079	2175	2271
E35D/T41S/M43I/A71G/D90G	2080	2176	2272
E35D/T41S/M43I/M47V/A71G	2081	2177	2273
E35D/T41S/M43I/M47L/A71G	2082	2178	2274
H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G	2083	2179	2275
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2084	2180	2276
E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N	2085	2181	2277
Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G	2086	2182	2278
V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G	2087	2183	2279
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D	2088	2184	2280
E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G	2089	2185	2281
E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q	2090	2186	2282
E35D/M47V/T62A/A71D/K93E	2091	2187	2283
E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E	2092	2188	2284
E35D/M43I/M47V/K89N	2093	2189	2285
E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y	2094	2190	2286
E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q	2095	2191	2287
V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q	2096	2192	2288
E35D/T41S/M47V/L97Q	2097	2193	2289
E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R	2098	2194	2290
E35D/A71D/L72V/R73H/E81K	2099	2195	2291
Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q	2100	2196	2292
E35D/M38T/D46E/M47V/N48S	2101	2197	2293
Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L	2102	2198	2294
E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q	2103	2199	2295
T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G	2104	2200	2296
E35D/N48K/L72V	2297	2508	2719
E35D/T41S/N48T	2298	2509	2720
D46V/M47I/A71G	2299	2510	2721
M47I/A71G	2300	2511	2722
E35D/M43I/M47L/L85M	2301	2512	2723
E35D/M43I/D46E/A71G/L85M	2302	2513	2724
H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S	2303	2514	2725
E35D/M47I/N48K/I61F	2304	2515	2726

E35D/M47V/T62S/L85Q	2305	2516	2727
M43I/M47L/A71G	2306	2517	2728
E35D/M47V	2307	2518	2729
E35D/M47L/A71G/L85M	2308	2519	2730
V22A/E35D/M47L/A71G	2309	2520	2731
E35D/M47L/A71G	2310	2521	2732
E35D/D46E/M47I	2311	2522	2733
Q27H/E35D/M47I	2312	2523	2734
E35D/D46E/L85M	2313	2524	2735
E35D/D46E/A91G	2314	2525	2736
E35D/D46E	2315	2526	2737
E35D/L97R	2316	2527	2738
H18Y/E35D	2317	2528	2739
Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M	2318	2529	2740
E35D/M47V/I61V/L85M	2319	2530	2741
E35D/M47V/L85M/R94Q	2320	2531	2742
E35D/M47V/N48K/L85M	2321	2532	2743
H18Y/E35D/M47V/N48K	2322	2533	2744
A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q	2323	2534	2745
E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L	2324	2535	2746
E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D	2325	2536	2747
E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q	2326	2537	2748
S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N	2327	2538	2749
E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G	2328	2539	2750
H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L	2329	2540	2751
deltaE10–A98	2330	2541	2752
Q33R/M47V/T62N/A71G	2331	2542	2753
H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G	2332	2543	2754
E35D/M47L/L70M	2333	2544	2755
E35D/M47L/V68M	2334	2545	2756
E35D/D46V/M47L/V68M/E88D	2335	2546	2757
E35D/D46V/M47L/V68M/D90G	2336	2547	2758

E35D/D46V/M47L/V68M/K89N	2337	2548	2759
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q	2338	2549	2760
E35D/D46V/M47L/V68M	2339	2550	2761
E35D/D46V/M47L/V70M	2340	2551	2762
E35D/D46V/M47L/V70M/L85Q	2341	2552	2763
E35D/M47V/N48K/V68M	2342	2553	2764
E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2343	2554	2765
E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C	2344	2555	2766
E35D/D46E/M47I/V68M/L85M	2345	2556	2767
E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R	2346	2557	2768
E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M	2347	2558	2769
E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q	2348	2559	2770
E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q	2349	2560	2771
E35D/M43I/M47L/V68M	2350	2561	2772
E35D/M47I/V68M/Y87N	2351	2562	2773
E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2352	2563	2774
E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2353	2564	2775
E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M	2354	2565	2776
E35D/M47V/N48K/V68M/L85M	2355	2566	2777
E35D/M47V/V68M/L85M	2356	2567	2778
E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D	2357	2568	2779
E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V	2358	2569	2780
H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L	2359	2570	2781
H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M	2360	2571	2782
H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N	2361	2572	2783
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2362	2573	2784
H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2363	2574	2785
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G	2364	2575	2786
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2365	2576	2787
H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M	2366	2577	2788
H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V	2367	2578	2789
H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q	2368	2579	2790
H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M	2369	2580	2791

H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M	2370	2581	2792
Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M	2371	2582	2793
Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M	2372	2583	2794
Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M	2373	2584	2795
R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2374	2585	2796
S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M	2375	2586	2797
S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L	2376	2587	2798
T13R/E35D/M47L/V68M	2377	2588	2799
T13R/H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q	2378	2589	2800
T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M	2379	2590	2801
T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M	2380	2591	2802
T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M	2381	2592	2803
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M	2382	2593	2804
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q	2383	2594	2805
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M	2384	2595	2806
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q	2385	2596	2807
T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M	2386	2597	2808
T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M	2387	2598	2809
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M	2388	2599	2810
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G	2389	2600	2811
V22D/E24D/E35D/M47V/V68M	2390	2601	2812
D46V	2391	2602	2813
M47L	2392	2603	2814
V68M	2393	2604	2815
L85Q	2394	2605	2816
E35D/D46V	2395	2606	2817
E35D/V68M	2396	2607	2818
E35D/L85Q	2397	2608	2819
D46V/M47L	2398	2609	2820
D46V/V68M	2399	2610	2821

D46V/L85Q	2400	2611	2822
M47L/V68M	2401	2612	2823
M47L/L85Q	2402	2613	2824
V68M/L85Q	2403	2614	2825
E35D/D46V/M47L	2404	2615	2826
E35D/D46V/V68M	2405	2616	2827
E35D/D46V/L85Q	2406	2617	2828
E35D/V68M/L85Q	2407	2618	2829
D46V/M47L/V68M	2408	2619	2830
D46V/M47L/L85Q	2409	2620	2831
D46V/V68M/L85Q	2410	2621	2832
M47L/V68M/L85Q	2411	2622	2833
E35D/D46V/M47L/L85Q	2412	2623	2834
E35D/D46V/V68M/L85Q	2413	2624	2835
E35D/M47L/V68M/L85Q	2414	2625	2836
D46V/M47L/V68M/L85Q	2415	2626	2837
M47V	2416	2627	2838
N48K	2417	2628	2839
K89N	2418	2629	2840
E35D/N48K	2419	2630	2841
E35D/K89N	2420	2631	2842
M47V/N48K	2421	2632	2843
M47V/V68M	2422	2633	2844
M47V/K89N	2423	2634	2845
N48K/V68M	2424	2635	2846
N48K/K89N	2425	2636	2847
V68M/K89N	2426	2637	2848
E35D/M47V/N48K	2427	2638	2849
E35D/M47V/V68M	2428	2639	2850
E35D/M47V/K89N	2429	2640	2851
E35D/N48K/V68M	2430	2641	2852
E35D/N48K/K89N	2431	2642	2853
E35D/V68M/K89N	2432	2643	2854
M47V/N48K/V68M	2433	2644	2855

M47V/N48K/K89N	2434	2645	2856
M47V/V68M/K89N	2435	2646	2857
N48K/V68M/K89N	2436	2647	2858
E35D/M47V/N48K/K89N	2437	2648	2859
E35D/M47V/V68M/K89N	2438	2649	2860
E35D/N48K/V68M/K89N	2439	2650	2861
M47V/N48K/V68M/K89N	2440	2651	2862
E35D/D46V/M47V/N48K/V68M	2441	2652	2863
E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q	2442	2653	2864
E35D/D46V/M47V/V68M/K89N	2443	2654	2865
E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q	2444	2655	2866
E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N	2445	2656	2867
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2446	2657	2868
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2447	2658	2869
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2448	2659	2870
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2449	2660	2871
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2450	2661	2872
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2451	2662	2873
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2452	2663	2874
E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2453	2664	2875
H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G	2454	2665	2876
H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G	2455	2666	2877
H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G	2456	2667	2878
H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G	2457	2668	2879
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M	2458	2669	2880
A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2459	2670	2881
A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2460	2671	2882
A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2461	2672	2883
A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2462	2673	2884
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2463	2674	2885
H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G	2464	2675	2886
H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G	2465	2676	2887
H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G	2466	2677	2888
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G	2467	2678	2889

H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G	2468	2679	2890
H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G	2469	2680	2891
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G	2470	2681	2892
H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G	2471	2682	2893
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G	2472	2683	2894
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G	2473	2684	2895
M47L/V68M/A71G/D90G	2474	2685	2896
H18Y/V68M/A71G/D90G	2475	2686	2897
H18Y/A26E/A71G/D90G	2476	2687	2898
H18Y/A26E/E35D/D90G	2477	2688	2899
H18Y/A26E/E35D/M47L	2478	2689	2900
E35D/V68M/A71G/D90G	2479	2690	2901
E35D/M47L/A71G/D90G	2480	2691	2902
E35D/M47L/V68M/D90G	2481	2692	2903
E35D/M47L/V68M/A71G	2482	2693	2904
A26E/V68M/A71G/D90G	2483	2694	2905
A26E/M47L/A71G/D90G	2484	2695	2906
A26E/M47L/V68M/D90G	2485	2696	2907
A26E/M47L/V68M/A71G	2486	2697	2908
A26E/E35D/A71G/D90G	2487	2698	2909
A26E/E35D/V68M/D90G	2488	2699	2910
A26E/E35D/V68M/A71G	2489	2700	2911
A26E/E35D/M47L/D90G	2490	2701	2912
A26E/E35D/M47L/V68M	2491	2702	2913
H18Y/M47L/A71G/D90G	2492	2703	2914
H18Y/M47L/V68M/D90G	2493	2704	2915
H18Y/M47L/V68M/A71G	2494	2705	2916
H18Y/E35D/A71G/D90G	2495	2706	2917
H18Y/E35D/V68M/D90G	2496	2707	2918
H18Y/E35D/V68M/A71G	2497	2708	2919
H18Y/E35D/M47L/D90G	2498	2709	2920
H18Y/E35D/M47L/A71G	2499	2710	2921
H18Y/E35D/M47L/V68M	2500	2711	2922
H18Y/A26E/V68M/D90G	2501	2712	2923

H18Y/A26E/V68M/A71G	2502	2713	2924
H18Y/A26E/M47L/D90G	2503	2714	2925
H18Y/A26E/M47L/A71G	2504	2715	2926
H18Y/A26E/M47L/V68M	2505	2716	2927
H18Y/A26E/E35D/A71G	2506	2717	2928
H18Y/A26E/E35D/V68M	2507	2718	2929
H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G	2930	2961	2992
H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G	2931	2962	2993
H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G	2932	2963	2994
H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G	2933	2964	2995
H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2934	2965	2996
H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G	2935	2966	2997
H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G	2936	2967	2998
H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G	2937	2968	2999
H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G	2938	2969	3000
H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G	2939	2970	3001
H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2940	2971	3002
H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G	2941	2972	3003
H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G	2942	2973	3004
H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G	2943	2974	3005
H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2944	2975	3006
A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G	2945	2976	3007
H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2946	2977	3008
H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2947	2978	3009
H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2948	2979	3010
H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2949	2980	3011
H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G	2950	2981	3012
H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2951	2982	3013
H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2952	2983	3014
H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G	2953	2984	3015
H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2954	2985	3016
H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K	2955	2986	3017
H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G	2956	2987	3018
H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G	2957	2988	3019

H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G	2958	2989	3020
H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P	2959	2990	3021
H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G	2960	2991	3022

[0274] В некоторых вариантах осуществления с помощью одной или более модификаций аминокислот в вариантах полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, получают по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV или IgC) или его специфически связывающийся фрагмент относительно домена IgSF, содержащегося в полипептиде CD80 дикого типа или немодифицированном полипептиде CD80 таким образом, что вариант полипептида CD80 демонстрирует измененную (повышенную или сниженную) активность или аффинность связывания с одним или более партнерами по связыванию, CTLA–4, PD–L1 или CD28, по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет аффинность связывания с CTLA–4, PD–L1 или CD28, отличающуюся от аффинности контрольной последовательности полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80, что определяют посредством, например, твердофазных иммунологических анализов ELISA, проточной цитометрии или анализа поверхностного плазмонного резонанса (Biacore). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4, PD–L1 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 может являться белком млекопитающего, таким как белок человека или белок мыши.

[0275] Аффинности связывания с каждым из партнеров по связыванию являются независимыми, т.е. в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с одним, двумя или тремя из CD28, PD–L1 и CTLA–4 и/или сниженную аффинность связывания с одним, двумя или тремя из CD28, PD–L1 и CTLA–4 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[02776] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CD28 относительно полипептида CD80

дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0277] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и сниженную аффинность связывания с PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 и PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 и повышенную аффинность связывания с PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0278] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и сниженную аффинность связывания с CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В этих вариантах осуществления

[0279] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с PD–L1 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с PD–L1 и сниженную аффинность связывания с CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с PD–L1 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с PD–L1 и повышенную аффинность

связывания с CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0280] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует аффинность связывания с эктодоменом CTLA–4 человека, не превышающую аффинность связывания немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа с эктодоменом CTLA–4 человека.

[0281] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4, PD–L1 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и PD–L1 и сниженную аффинность связывания с CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и CD28 и сниженную аффинность связывания с PD–L1 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 и PD–L1 и повышенную аффинность связывания с CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 и повышенную аффинность связывания с PD–L1 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет повышенную аффинность связывания с CTLA–4 и сниженную аффинность связывания с PD–L1 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4, PD–L1 и CD28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет сниженную аффинность связывания с CTLA–4 и повышенную аффинность связывания с PD–L1 и CD–28 относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0282] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 с повышенной или более высокой аффинностью связывания с CD28, PD–L1 и/или CTLA–4 будет демонстрировать повышение аффинности связывания относительно контрольного полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 по меньшей мере на приблизительно 5%, например, по меньшей мере на приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 35% или 50%, для партнеров по связыванию CTLA–4, PD–L1 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления повышение аффинности связывания относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 является повышением более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6

раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или более. В таких примерах полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0283] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 со сниженной аффинностью связывания с CTLA–4, PD–L1 и/или CD28 будет иметь снижение аффинности связывания относительно контрольного полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 по меньшей мере на 5%, например, по меньшей мере на приблизительно 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более для CTLA–4, PD–L1 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления снижение аффинности связывания относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 является снижением более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз 40 раз или 50 раз. В таких примерах полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0284] В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) любого из указанных выше вариантов осуществления в отношении CTLA–4, PD–L1 и/или CD28 может составлять по меньшей мере 1×10^{-5} М, 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М или 1×10^{-12} М.

[0285] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80 по изобретению, содержащие по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV или IgC) или его специфически связывающийся фрагмент относительно домена IgSF, содержащегося в полипептиде CD80 дикого типа или немодифицированном полипептиде CD80, демонстрирует измененную (повышает/стимулирует или снижает/ингибирует) передачу сигнала, индуцируемую одним или более функциональными партнерами по связыванию, такими как CTLA–4 или CD28, экспрессирующимися на поверхности клетки, способной передавать сигнал, такой как Т–клетка, способная высвобождать цитокины в ответ на внутриклеточный сигнал, по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80 после связывания с одним или более партнерами по связыванию. В некоторых вариантах осуществления измененная передача сигнала отличается от передачи сигнала, осуществляемой контрольной последовательностью полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80 в том же формате, что определяют посредством, например, анализа, в котором измеряют высвобождение цитокинов (например, высвобождение ИЛ–2), после инкубации с конкретным вариантом полипептида CD80, и/или полипептидом CD80 дикого типа, или немодифицированным полипептидом CD80. Пример анализа описан в примерах 8–10. В примерах анализов

высвобождение цитокинов является функцией суммы сигнальных активностей функциональных партнеров по связыванию, экспрессирующихся на поверхности высвобождающей цитокины клетки. Как обсуждалось в другом месте настоящего описания, в некоторых вариантах осуществления формат вариантов полипептидов CD80 по изобретению может влиять на тип активности, например, агонистический или антагонистический.

[0286] Т.к. CTLA–4 индуцирует ингибиторную передачу сигнала, повышенная передача сигнала CTLA–4 приводит к снижению высвобождения цитокинов в некоторых примерах анализов. Напротив, сниженная передача сигнала CTLA–4 приводит к сниженной ингибиторной передаче сигнала, которая не снижает высвобождение цитокинов и может приводить к повышенному высвобождению цитокинов в некоторых анализах. Т.к. передача сигнала CD28 стимулирует высвобождение цитокинов, повышенная передача сигнала CD28 приводит к повышенному высвобождению цитокинов в примерах анализов. Напротив, сниженная передача сигнала CD28 приводит к сниженному высвобождению цитокинов в примерах анализов.

[0287] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает CTLA–4–, PD–L1– и/или CD28–опосредованную передачу сигнала. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает CD28–, PD–L1– и/или CTLA–4–опосредованную передачу сигнала относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0288] Аффинности связывания для каждого из когнатных партнеров по связыванию являются независимыми; таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 может повышать передачу сигнала, индуцируемую одним, двумя или тремя из CD28, PD–L1 и CTLA–4, и/или снижать передачу сигнала, индуцируемую одним, двумя или тремя из CD28, PD–L1 и CTLA–4, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0289] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую PD–L1/PD–1, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CD28, после связывания относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую CD28, после связывания относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую PD–L1/PD–1, относительно полипептида CD80 дикого типа или

немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0290] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4 и CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, и снижает передачу сигнала, индуцируемую CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4 и CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0291] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4 и CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, и снижает передачу сигнала, индуцируемую CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 повышает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4 и CD28. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, и повышает передачу сигнала, индуцируемую CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, и повышает передачу сигнала, индуцируемую CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 снижает передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4 и CD28, относительно полипептида CD80 дикого типа или немодифицированного полипептида CD80.

[0292] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80, стимулирующий или повышающий ингибиторную передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, будет приводить к сигналу, на 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или меньшему, чем сигнал, индуцируемый полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких примерах, полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0293] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80, стимулирующий или повышающий передачу сигнала, индуцируемую CD28, будет

приводить к сигналу, составляющему по меньшей мере 105%, 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% или более от сигнала, индуцируемого полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких примерах, полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0294] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80, ингибирующий или снижающий ингибиторную передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, будет приводить к сигналу, составляющему по меньшей мере 105%, 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500%, или более от сигнала, индуцируемого полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких примерах, полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0295] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80, ингибирующий или снижающий ингибиторную передачу сигнала, индуцируемую CD28, будет приводить к сигналу, составляющему 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или менее от сигнала, индуцируемого полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких примерах, полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0296] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80, влияющий на ингибиторную передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, и/или влияющий на передачу сигнала CD28 будет приводить к сумме передачи сигнала CTLA–4 и CD28, меньшей, чем сумма передачи сигнала CTLA–4 и CD28, обеспечиваемой соответствующим полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких вариантах осуществления сумма передачи сигнала CTLA–4 и CD28 составляет 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или менее от сигнала, обеспечиваемого соответствующим полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких примерах соответствующий полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

[0297] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80, влияющий на ингибиторную передачу сигнала, индуцируемую CTLA–4, и/или влияющий на передачу сигнала CD28, будет приводить к сумме передачи сигнала CTLA–4 и CD28, большей, чем сумма передачи сигнала CTLA–4 и CD28, обеспечиваемой соответствующим полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным

полипептидом CD80. В таких вариантах осуществления сумма передачи сигнала CTLA–4 и CD28 составляет по меньшей мере 105%, 110%, 120%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% или более от сигнала, обеспечиваемого соответствующим полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В таких примерах соответствующий полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80 имеет ту же последовательность, что и вариант полипептида CD80, за исключением того, что он не содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен).

1. CTLA4

[0298] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид CD80 дикого типа или немодифицированный полипептид CD80, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CTLA–4 и сниженную аффинность к эктодомену CD28 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность к эктодомену CTLA–4 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4.

[0299] В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 7, 12, 13, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 57, 58, 61, 62, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 77, 79, 81, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 35, 46, 57, 58, 71, 73, 79 и/или 84 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031.

[0300] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из E7D, A12T, T13A, T13R, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18L, H18T, H18V, H18Y, V20I, S21P, V22A, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q27R, I30V, Q33L, Q33R, E35D, E35G, K37E, M38I, M38T, M38V, T41S, M42V, M43I, M43L, M43T, M43V, S44P, D46E, D46N,

D46V, M47I, M47L, M47T, M47V, M47Y, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, E52D, Y53F, Y53H, K54E, K54R, T57A, T57I, I58V, I61F, I61N, I61V, T62A, T62N, T62S, N63D, N64S, I67L, I67T, V68E, V68I, V68L, V68M, I69F, L70M, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73H, P74S, E77A, T79I, T79M, E81G, E81K, V83I, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, Y87N, E88D, E88V, K89N, D90G, D90N, D90P, A91G, A91S, A91V, F92V, F92Y, K93E, K93R, K93T, R94L, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97Q и L97R. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из E7D, T13A, T13R, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20I, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30V, Q33L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, Y53F, K54E, K54R, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, I67L, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73H, P74S, T79I, T79M, E81G, E81K, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, E88V, D90P, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V и L97Q.

[0301] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислоты представляют собой Q27H/T41S/A71D, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E35D/M47I, M47V/N48H, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/M47L, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, V22A/E35D/V68E/A71D, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,

E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G,

H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P или H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G.

[0302] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную селективность для CTLA–4 относительно CD28 по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида CD80 (например, приведенного в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031) с CTLA–4 относительно CD28, таким как соотношение связывания CTLA–4 и связывания CD28 (соотношения связывания CTLA4:CD28), составляющего более 1. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 имеет соотношение связывания CTLA–4 относительно CD28, составляющее более, или более приблизительно, или 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или более. В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 30, 35, 57, 71, или 84 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из T13A, T13R, S15T, V22I, V22L, Q27H, I30V, Q33R, E35D, E35G, T41S, M47I, M47L, M47V, N48Y, Y53F, T57I, I61F, I61V, I67L, L70M, A71D, A71G, L72V, T79M, E81G, E81K, V84A, V84I и L85M, Y87C, Y87D. В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот представляют собой Q27H/T41S/A71D, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, L72P/T79I, L25S/E35D/M47I/D90N, A71D, E81K/A91S, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/M47I, M47V/N48H, Q27H/M43I/A71D/R73S, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/I67L/A71D, E35D, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/T57A/A71D/L85Q, E35G/K54E/A71D/L72P, A26E/E35D/M47L/L85Q, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M,

H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G,

H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P или H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G.

2. CD28

[0303] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CD28 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CD28 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность к эктодомену CD28 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз или 200 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

[0304] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CD28 и эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CD28, эктодомену PD–L1 и эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность к эктодомену CD28 и одному или обоим из CTLA–4 и PD–L1 независимо повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или 450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4 или PD–L1.

[0305] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену CD28 и сниженную аффинность к эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную

аффинность к эктодомену CD28 и эктодомену PD–L1 и сниженную аффинность к эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления сниженная аффинность к эктодомену CTLA–4 снижена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4.

[0306] В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CD28 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 12, 13, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 31, 35, 41, 42, 43, 46, 47, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 79, 83, 84, 85, 88, 90, 93, 94 и/или 95 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CD28 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 23, 26, 35, 46, 55, 57, 58, 71, 79 и/или 84 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031.

[0307] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из A12T, T13R, S15T, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, H18Y, V20I, S21P, V22A, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q27R, Y31H, Q33R, E35D, E35G, K37E, M38I, T41S, M42V, M43I, M43L, D46E, D46N, D46V, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48K, N48Y, Y53F, K54E, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, T62S, N64S, I67L, V68E, V68I, V68L, V68M, I69F, L70M, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, T79I, T79M, V83I, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, Y87N, E88D, E88V, D90G, D90N, D90P, A91G, A91S, K93E, K93R, R94L, R94Q, R94W, E95K, E95V и L97Q. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из T13R, S15T, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20I, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M42V, M43L, D46E, D46N, D46V, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48K, N48Y, Y53F, K54E, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, I67L, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, T79I, T79M, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, E88V, D90P, R94Q, R94W, E95V, L97Q.

[0308] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислоты представляют собой Q27H/T41S/A71D, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M,

E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, V22A/E35D/V68E/A71D, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/N48K/L72V, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G,

H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P или H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G.

3. PD–L1

[0309] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену PD–L1 и эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления повышенная аффинность к эктодомену PD–L1 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или 450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

[0310] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену PD–L1 и сниженную аффинность к эктодомену CTLA–4 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность к эктодомену PD–L1 и сниженную аффинность к эктодомену CD28 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, таким как полипептид, содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых вариантах осуществления сниженная аффинность к эктодомену CTLA–4 или CD28 снижена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с

эктодоменом CTLA–4 или CD28.

[0311] В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 7, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031. В некоторых из этих вариантов осуществления вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен), соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 и/или 84 SEQ ID NO: 2, 76, 150, 3030 или 3031.

[0312] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из E7D, A12V, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, H18L, H18Y, V20A, V20I, S21P, V22A, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q27R, R29C, T28Y, R29H, I30T, I30V, Y31H, Y31S, Q33E, Q33H, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, K37E, M38I, M38T, M38V, T41A, T41S, M42I, M42V, M43I, M43L, M43T, M43V, S44P, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47T, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61F, I61N, I61V, T62A, T62N, T62S, N63D, N64S, L65P, I67L, I67T, V68A, V68I, V68L, V68M, I69F, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V83A, V83I, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86E, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87N, Y87Q, E88D, E88G, K89E, K89N, D90G, D90N, D90P, A91G, A91S, A91T, A91V, F92L, F92S, F92V, F92Y, K93E, K93R, K93T, R94L, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97M, L97Q и L97R. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из группы, состоящей из E7D, T13A, T13R, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30T, I30V, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, L65P, I67L, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73S, P74S, D76H, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, D90P, F92S, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q.

[0313] В некоторых вариантах осуществления одна или более замен аминокислот

представляют собой Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, M47V/I69F/A71D/V83I, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q,

H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V,

H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P или H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G.

[0314] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, демонстрирующие повышенную аффинность к эктодомену PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80, могут демонстрировать PD–L1–зависимую костимуляцию CD28 или осуществлять PD–L1–зависимую CD28–костимуляторную активность. В некоторых вариантах осуществления, в которых вариант полипептида CD80 опосредует или осуществляет PD–L1–зависимую CD28–костимуляторную активность, аффинность варианта полипептида CD80 повышена по меньшей мере в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или

450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

[0315] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, демонстрирующие, опосредующие или осуществляющие PD–L1–зависимую CD28–костимуляторную активность, сохраняют связывание с эктодоменом CD28 по сравнению с CD80 дикого типа или немодифицированным CD80. Например, вариант полипептида CD80 может сохранять по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8,%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 75%, 80%, 85%, 90% или 95% аффинности к эктодомену CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного полипептида CD80 с эктодоменом CD28.

[0316] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80, представленные в настоящем описании, демонстрирующие, опосредующие или осуществляющие PD–L1–зависимую CD28–костимуляторную активность, демонстрируют повышенную аффинность к эктодомену CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28. Например, вариант полипептида CD80 может демонстрировать аффинность к эктодомену CD28, повышенную более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз или 200 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

III. ФОРМАТ ВАРИАНТОВ ПОЛИПЕПТИДОВ

[0317] Иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, представленный в настоящем описании, содержащий vIgD, можно получать в различных форматах, включая растворимый белок, мембраносвязанный белок или секретируемый белок. В некоторых вариантах осуществления можно выбирать конкретный формат для желаемого терапевтического применения. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант полипептида CD80, получают в формате, антагонистически действующем или блокирующем активность его партнера по связыванию, например, CTLA–4, CD28 и/или PD–L1. В некоторых вариантах осуществления антагонизм CTLA–4 или PD–L1/PD–1 можно использовать для стимуляции иммунитета в онкологии. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант полипептида CD80, получают в формате, агонистически действующем или стимулирующем активность его партнера по связыванию, например, CTLA–4 и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления агонизм CD28 можно использовать для стимуляции иммунитета в онкологии. В некоторых вариантах осуществления агонизм CD28 может зависеть от связывания CD80 с PD–L1 или повышаться при связывании CD80 с PD–L1. Такой PD–L1–зависимый агонизм CD28 можно использовать для стимуляции иммунитета в онкологии. В некоторых вариантах осуществления агонизм CTLA–4 можно использовать для лечения воспаления или аутоиммунитета. Специалисты в этой области легко могут определять активность

конкретного формата, такую как антагонистическая или агонистическая активность в отношении одного или более специфических партнеров по связыванию. Примеры способов анализа таких активностей представлены в настоящем описании, включая примеры.

[0318] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к иммуномодулирующим белкам, содержащим vIgD CD80, где такие белки являются растворимыми, например, слитыми с Fc–цепью. В некоторых аспектах один или более дополнительных доменов IgSF, таких как один или более дополнительных vIgD, можно соединять с vIgD CD80, как представлено в настоящем описании (что далее в настоящем описании обозначают как "составной" иммуномодулирующий белок). В некоторых вариантах осуществления модульный формат иммуномодулирующих белков по изобретению обеспечивает гибкость при конструировании или получении иммуномодулирующих белков для модуляции активности множества противоструктур (множества когнатных партнеров по связыванию). В некоторых вариантах осуществления такие "составные" молекулы можно получать в растворимом формате или, в некоторых случаях, в виде мембраносвязанных или секретируемых белков. В некоторых вариантах осуществления вариант иммуномодулирующего белка CD80 получают в виде конъюгата, содержащего vIgD CD80, соединенный, прямо или косвенно, с направляющим средством или функциональным фрагментом, например, с антителом или другими связывающими молекулами, специфически связывающимися с лигандом, например, антигеном, например, для направления или локализации vIgD к конкретному окружению или клетке, например, при введении индивидууму. В некоторых вариантах осуществления направляющее средство, например, антитело или другая связывающая молекула, связывается с опухолевым антигеном, таким образом, локализуя вариант CD80, содержащий vIgD, к микроокружению опухоли, например, для модуляции активности инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), специфических для микроокружения опухоли.

[0319] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки по изобретению экспрессируются в клетках, и их получают как часть терапии сконструированными клетками (ECT). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 экспрессируется в клетке, такой как иммунная клетка (например, Т–клетка или антигенпрезентирующая клетка), в мембраносвязанной форме, таким образом, образуя трансмембранный иммуномодулирующий белок (далее в настоящем описании также обозначаемый как "TIP"). В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от когнатного партнера по связыванию, распознаваемого TIP, сконструированные клетки, экспрессирующие TIP, могут агонистически действовать на когнатного партнера по связыванию, обеспечивая костимуляторный сигнал, положительный или отрицательный, для других сконструированных клеток и/или эндогенных Т–клеток. В некоторых аспектах вариант полипептида CD80 экспрессируется в клетке, такой как иммунная клетка (например, Т–клетка или антигенпрезентирующая клетка), в секретируемой форме, таким образом, образуя секретируемую или растворимую форму варианта полипептида CD80

(далее в настоящем описании также обозначаемую как "SIP"), например, когда клетки вводят индивидууму. В некоторых аспектах SIP может антагонистически действовать на когнатного партнера по связыванию в окружении (например, микроокружении опухоли), в котором он секретируется. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 экспрессируется в возбудителе инфекции (например, вирусном или бактериальном возбудителе), который после введения индивидууму может инфицировать клетку in vivo, такую как иммунная клетка (например, Т–клетка или антигенпрезентирующая клетка), для доставки или экспрессии варианта полипептид в виде TIP или SIP в клетке.

[0320] В некоторых вариантах осуществления растворимый иммуномодулирующий полипептид, такой как вариант CD80, содержащий vIgD, можно инкапсулировать в липосоме, которую можно конъюгировать с любой или любыми комбинациями конъюгатов по изобретению (например, направляющим функциональным фрагментом). В некоторых вариантах осуществления растворимые или мембраносвязанные иммуномодулирующие полипептиды по изобретению являются дегликозилированными. В более конкретных вариантах осуществления последовательность варианта CD80 является дегликозилированной. В даже более конкретных вариантах осуществления домен или домены IgV и/или IgC (например, IgC2) варианта CD80 являются дегликозилированными.

[0321] Неограничивающие примеры форматов по изобретению показаны на фиг. 1A–1C и дополнительно описаны ниже.

A. РАСТВОРИМЫЙ БЕЛОК

[0322] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, содержащий вариант полипептида CD80, является растворимым белком. Специалистам будет понятно, что белки поверхности клетки, как правило, содержат внутриклеточный, трансмембранный и внеклеточный домены (ECD), и что растворимую форму таких белков можно получать с использованием внеклеточного домена или его иммунологически активной подпоследовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в иммуномодулирующем белке, содержащем вариант полипептида CD80, отсутствует трансмембранный домен или часть трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления в иммуномодулирующем белке, содержащем вариант CD80, отсутствует внутриклеточный (цитоплазматический) домен или часть внутриклеточного домена. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, содержащий вариант полипептида CD80, содержит лишь часть vIgD, содержащую домен ECD или его часть, содержащий IgV–домен и/или IgC–домен (например, IgC2) или домены или их специфически связывающиеся фрагменты, содержащие модификации аминокислот.

[0323] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, может включать один или более вариантов полипептидов CD80 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению будет содержать точно 1, 2, 3, 4, 5 последовательностей варианта CD80. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две последовательности варианта CD80 являются идентичными последовательностями варианта CD80.

[0324] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий полипептид по изобретению содержит две или более последовательностей vIgD CD80. Множество вариантов полипептидов CD80 в полипептидной цепи могут являться идентичными (т.е. одним и тем же типом) или неидентичными (т.е. разными типами) последовательностями варианта CD80. В дополнение к вариантам осуществления с одной полипептидной цепью, в некоторых вариантах осуществления два, три, четыре или более полипептидов по изобретению можно ковалентно или нековалентно соединять друг с другом. Таким образом, в настоящем описании представлены мономерные, димерные и мультимерные белки более высокого порядка (например, 3, 4, 5 или более). Например, в некоторых вариантах осуществления ровно два полипептида по изобретению можно ковалентно или нековалентно соединять друг с другом для получения димера. В некоторых вариантах осуществления присоединение осуществляют посредством межцепочечных дисульфидных связей между остатками цистеина. Композиции, содержащие два или более полипептидов по изобретению, могут состоять из идентичных типом или, по существу, идентичных типов полипептида (например, гомодимер) или неидентичных типов полипептидов (например, гетеродимер). Композиция, содержащая множество соединенных полипептидов по изобретению, может содержать, как указано выше, один или более идентичных или неидентичных вариантов полипептидов CD80 по изобретению в каждой полипептидной цепи.

[0325] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок представляет собой или содержит вариант полипептида CD80, находящийся в мономерной форме и/или демонстрирующий моновалентное связывание со своим партнером по связыванию. В некоторых аспектах описываемый вариант полипептида CD80, такой как вариант CD80, являющийся растворимым, и/или в котором отсутствует трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, соединяют, прямо или косвенно, с дополнительным функциональным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления дополнительный функциональный фрагмент является белком, пептидом, низкомолекулярным соединением или нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления моновалентный иммуномодулирующий белок является слитым белком. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является увеличивающей время полужизни молекулой. Неограничивающие примеры таких увеличивающих время полужизни молекул включают альбумин, альбумин–связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), С–концевой пептид (CTP) бета–субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), альбумин–связывающее низкомолекулярное соединение или их комбинацию.

[0326] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, можно соединять с функциональным фрагментом, включающим конформационно нарушенные полипептидные последовательности, состоящие из аминокислот Pro, Ala и Ser (см., например, WO2008/155134, SEQ ID NO:

904). В некоторых случаях аминокислотный повтор составляет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислотных остатков, где каждый повтор содержит остатки Ala, Ser и Pro. Таким образом, настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, являющемуся ПАСилированным белком, где вариант полипептида CD80 соединяют, прямо или косвенно через линкер, с Pro/Ala/Ser (PAS). В некоторых вариантах осуществления можно использовать одну или более дополнительных линкерных структур.

[0327] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент облегчает детекцию или очистку варианта полипептида CD80. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид содержит метку или слитый домен, например, аффинную метку или метку для очистки, соединенную, прямо или косвенно, с N– и/или C–концом полипептида CD80. Известны различные подходящие полипептидные метки и/или слитые домены, и они включают, в качестве неограничивающих примеров, полигистидиновую (His) метку, метку FLAG (SEQ ID NO: 3037), метку Myc и флуоресцентную белковую метку (например, EGFP, приведенный в SEQ ID NO: 3033–3035). В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, содержит по меньшей мере шесть остатков гистидина (приведенных в SEQ ID NO: 3038). В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, дополнительно содержит различные комбинации функциональных фрагментов. Например, иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, дополнительно содержит одну или более полигистидиновых меток и меток FLAG.

[0328] В некоторых вариантах осуществления полипептид CD80 соединяют с модифицированной константной областью (Fc) тяжелой цепи иммуноглобулина, остающейся в моновалентной форме, например, приведенной в SEQ ID NO: 374.

[0329] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит вариант полипептида CD80, соединенный, прямо или косвенно через линкер, с доменом мультимеризации. В некоторых аспектах домен мультимеризации повышает время полужизни молекулы. Взаимодействие двух или более вариантов полипептидов CD80 можно облегчать посредством их соединения, прямо или косвенно, с любым функциональным фрагментом или другим полипептидом, который сам по себе может взаимодействовать с образованием стабильной структуры. Например, отдельно кодируемые полипептидные цепи варианта CD80 можно соединять посредством мультимеризации, где мультимеризация полипептидов опосредована доменом мультимеризации. Как правило, домен мультимеризации обеспечивает образование стабильных белок–белковых взаимодействий между первым вариантом полипептида CD80 и вторым вариантом полипептида CD80.

[0330] Гомо– или гетеромультимерные полипептиды можно получать посредством коэкспрессии отдельных вариантов полипептидов CD80. Первые и вторые варианты полипептидов CD80 могут быть одинаковыми или отличаться. В конкретных вариантах осуществления первые и вторые варианты полипептидов CD80 являются одинаковыми в

гомодимере, и каждый из них соединяют с одинаковыми доменами мультимеризации. В других вариантах осуществления гетеродимеры можно получать посредством соединения первых и вторых вариантов полипептидов CD80, которые отличаются. В некоторых из таких вариантов осуществления первый и второй вариант полипептида CD80 соединяют с разными доменами мультимеризации, которые могут способствовать образованию гетеродимера.

[0331] В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации включает любой домен мультимеризации, который может образовывать стабильное белок–белковое взаимодействие. Домены мультимеризации могут взаимодействовать с помощью иммуноглобулиновой последовательности (например, Fc–домена; см., например, международные патентные публикации №№ WO 93/10151 и WO 2005/063816; патентную публикацию США № 2006/0024298; патент США № 5457035), лейциновой молнии (например, из ядерных трансформирующих белков fos и jun, или фотоонкогена c–myc, или из гена General Control of Nitrogen (GCN4)) (см. например, Busch and Sassone–Corsi (1990) Trends Genetics, 6:36–40; Gentz et al., (1989) Science, 243:1695–1699), гидрофобной области, гидрофильной области или свободного тиола, образующего межмолекулярную дисульфидную связь между химерными молекулами гомо– или гетеромультимера. Кроме того, домен мультимеризации может включать аминокислотную последовательность, содержащую выступ, комплементарный аминокислотной последовательности, содержащей впадину, такой, как описано, например, в патенте США № 5731168; международных патентных публикациях №№ WO 98/50431 и WO 2005/063816; Ridgway et al. (1996) Protein Engineering, 9:617–621. Такую область мультимеризации можно конструировать таким образом, что стерические взаимодействия способствуют не только стабильному взаимодействию, но также и преобладанию образования гетеродимеров из смеси химерных мономеров относительно гомодимеров. Как правило, выступы конструируют посредством замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности первого полипептида аминокислотами с более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсаторные впадины размера, идентичного или схожего с размером выступов, необязательно, создают на поверхности второго полипептида посредством замены аминокислот с крупными боковыми цепями аминокислотами с меньшими боковыми цепями (например, аланином или треонином). Примеры доменов мультимеризации описаны ниже.

[0332] Для получения химерного полипептида вариант полипептида CD80 можно соединять с N– или C–концом домена мультимеризации в любом месте, но, как правило, через его N– или C–конец. Соединение может быть прямым или косвенным через линкер. Химерный полипептид может являться слитым белком, или его можно получать посредством химического соединения, такого как ковалентные или нековалентные взаимодействия. Например, при получении химерного полипептида, содержащего домен мультимеризации нуклеиновую кислоту, кодирующую весь вариант полипептида CD80 или его часть, можно функционально связывать с нуклеиновой кислотой, кодирующей

последовательность домена мультимеризации прямо, или косвенно, или, необязательно, через линкерный домен. В некоторых случаях конструкция кодирует химерный белок, в котором С–конец варианта полипептида CD80 соединяют с N–концом домена мультимеризации. В некоторых случаях конструкция может кодировать химерный белок, в котором N–конец варианта полипептида CD80, соединяют с С–концом домена мультимеризации.

[0333] Полипептидный мультимер содержит множество, например, два, химерных белка, полученных посредством соединения, прямого или косвенного, двух одинаковых или разных вариантов полипептидов CD80 с доменом мультимеризации. В некоторых примерах, в которых домен мультимеризации является полипептидом, слитый ген, кодирующий вариант полипептида CD80 и домен мультимеризации, встраивают в подходящий экспрессирующий вектор. Полученный химерный или слитый белок можно экспрессировать в клетках–хозяевах, трансформированных с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, и позволять ему собираться в мультимеры, в которых домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультивалентных полипептидов. Химическое присоединение доменов мультимеризации с вариантами полипептидов CD80 можно осуществлять с использованием гетерофункциональных линкеров.

[0334] Получаемые химерные полипептиды, такие как слитые белки, и получаемые из них мультимеры можно очищать любым подходящим способом, таким как, например, аффинная хроматография на колонках с протеином А или протеином G. Когда клетки трансформируют с использованием двух молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих разные полипептиды, будет происходить образование гомо– и гетеродимеров. Условия экспрессии можно корректировать таким образом, что образование гетеродимеров является предпочтительным относительно образования гомодимеров.

[0335] В некоторых вариантах осуществления домен мультимеризации является Fc–доменом иммуноглобулина или его частями. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит вариант полипептида CD80, соединенный с Fc иммуноглобулина (что приводит к получению "иммуномодулирующего Fc–слитого белка", такого как "слитый белок вариант CD80–Fc", также обозначаемого как "слитый белок vIgD CD80–Fc"). В некоторых вариантах осуществления присоединение варианта полипептида CD80 осуществляют через N–конец Fc. В некоторых вариантах осуществления присоединение варианта полипептида CD80 осуществляют через С–конец Fc. В некоторых вариантах осуществления два или более вариантов полипептидов CD80 (одинаковых или разных) независимо присоединяют к N–концу и С–концу.

[0336] В некоторых вариантах осуществления Fc является Fc мыши или человека. В некоторых вариантах осуществления Fc является Fc–областями IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 млекопитающего или человека. В некоторых вариантах осуществления Fc получают из IgG1, такого как IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 277, 359 или 1712, или

аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 277, 359 или 1712.

[0337] В некоторых вариантах осуществления Fc–область содержит одну или более модификаций для изменения (например, снижения) одной или более из ее нормальных функций. В основном, Fc–область отвечает за эффекторные функции, такие как комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), в дополнение к антигенсвязывающей способности, являющейся основной функцией иммуноглобулинов. Кроме того, последовательность FcRn, находящаяся в Fc–области, играет роль в регуляции уровня IgG в сыворотке, повышая время полужизни in vivo посредством конъюгации in vivo с рецептором FcRn. В некоторых вариантах осуществления такие функции можно снижать или изменять в Fc для использования с Fc–слитыми белками по изобретению.

[0338] В некоторых вариантах осуществления в Fc–область варианта CD80–Fc–слитого белка, представленного в настоящем описании, можно вносить одну или более модификаций аминокислот, таким образом, получая вариант Fc–области. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc–области имеет сниженную эффекторную функцию. Существует множество примеров изменений или мутаций в последовательностях Fc, которые могут изменять эффекторную функцию. Например, в WO 00/42072, WO2006019447, WO2012125850, WO2015/107026, US2016/0017041 и Shields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591–6604 (2001) описывают примеры вариантов Fc с улучшенным или сниженным связыванием FcR. Содержание этих публикаций конкретно включено в настоящее описание в качестве ссылки.

[0339] В некоторых вариантах осуществления слитые белки вариант CD80–Fc по изобретению содержат Fc–область, демонстрирующую сниженные эффекторные функции, что делает ее желаемым кандидатом для применения, при котором важно время полужизни варианта CD80–Fc–слитого белка in vivo, но некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) являются ненужными или вредными. Для подтверждения снижения/истощения активности CDC и/или ADCC можно осуществлять анализы цитотоксичности in vitro и/или in vivo. Например, можно осуществлять анализы связывания Fc–рецептора (FcR) для обеспечения того, что у варианта CD80–Fc–слитого белка отсутствует связывание FcγR (таким образом, вероятно, отсутствует активность ADCC), но он сохраняет способность связывать FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK–клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках представлена в таблице 3 на стр. 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457–492 (1991). Неограничивающие примеры анализов in vitro для оценки активности ADCC интересующей молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al.Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059–7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499–1502 (1985); патенте США № 5821337 (см. Bruggemann, M. et

al., J. Exp. Med. 166:1351–1361 (1987)). Альтернативно, можно использовать нерадиоактивные способы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности ACTI™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.) и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96™ (Promega, Madison, Wis.). Эффекторные клетки, которые можно использовать для таких анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, активность ADCC интересующей молекулы можно оценивать in vivo, например, в модели на животных, такой как описываемая в Clynes et al.Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652–656 (1998). Также можно осуществлять анализы связывания C1q для подтверждения того, что вариант CD80–Fc–слитого белка не может связываться с C1q и, таким образом, у него отсутствует активность CDC. См., например, ELISA связывания C1q и C3c с WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano–Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045–1052 (2003); и Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738–2743 (2004)). Определение связывания FcRn и выведения/времени полужизни in vivo также можно осуществлять известными в этой области способами (см., например, Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759–1769 (2006)).

[0340] Варианты CD80–Fc–слитых белков со сниженной эффекторной функцией включают варианты с заменой одного или более остатков в Fc–области 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 в соответствии с нумерацией EU (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают мутантов Fc с заменами в двух или более положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327 в соответствии с нумерацией EU, включая так называемого мутанта Fc "DANA" с заменой остатков 265 и 297 аланином (патент США № 7332581).

[0341] В некоторых вариантах осуществления Fc–область вариантов CD80–Fv–слитых белков содержат Fc–область, в которой любые одну или более аминокислот в положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325 и 329 (указанных в соответствии с нумерацией EU) заменяют другими аминокислотами относительно нативной Fc–области. Такие изменения Fc–области не ограничены описанными выше изменениями и включают, например, такие изменения, как дегликозилированные цепи (N297A и N297Q), IgG1–N297G, IgG1–L234A/L235A, IgG1–L234A/L235E/G237A, IgG1–A325A/A330S/P331S, IgG1–C226S/C229S, IgG1–C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1–E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, IgG1–L234F/L235E/P331S, IgG1–S267E/L328F, IgG2–V234A/G237A, IgG2–H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4–L235A/G237A/E318A и IgG4–L236E, описанные в Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685–691; такие изменения, как G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R и N325LL328R, описанные в WO 2008/092117; инсерции аминокислот в положениях 233, 234, 235 и 237 (указанные в соответствии с нумерацией EU); и изменения в участках, описанных в WO 2000/042072.

[0342] Описаны некоторые варианты Fc с улучшенным или сниженным связыванием с FcR (см., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312,

WO2006019447 и Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591–6604 (2001)).

[0343] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту CD80–Fc–слитого белка, содержащему вариант Fc–области, содержащий одну или более замен аминокислот, повышающих время полужизни и/или улучшающих связывание с неонатальным Fc–рецептором (FcRn). Антитела с повышенным временем полужизни и улучшенным связыванием с FcRn описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.) или WO2015107026. Эти антитела содержат Fc–область с одной или более заменами в ней, улучшающими связывание Fc–области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более остатках Fc–области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 в соответствии с нумерацией EU, например, заменой в остатке 434 Fc–области (патент США № 7371826).

[0344] В некоторых вариантах осуществления Fc–область варианта CD80–Fc–слитого белка содержит одну или более из замен аминокислот E356D и M358L в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления Fc–область варианта CD80–Fc–слитого белка содержит одну или более из замен аминокислот C220S, C226S и/или C229S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления Fc–область варианта слитого белка CD80 содержит одну или более из замен аминокислот R292C и V302C. См. также Duncan & Winter, Nature 322:738–40 (1988), патент США № 5648260, патент США № 5624821 и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc–области.

[0345] В некоторых вариантах осуществления осуществляют изменения в Fc–области, приводящие к снижению связывания C1q и/или обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178–4184 (2000).

[0346] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту CD80–Fc–слитого белка, содержащему вариант Fc–области, содержащий одну или более модификаций аминокислот, где вариант Fc–области получают из IgG1, такого как IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc–области получают из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 277. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит по меньшей мере один замену аминокислоты, являющуюся N82G в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 277 (соответствующую N297G в соответствии с нумерацией EU). В некоторых вариантах осуществления Fc дополнительно содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты, являющуюся R77C или V87C в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 277 (соответствующую R292C или V302C в соответствии с нумерацией EU). В некоторых вариантах осуществления вариант Fc–область дополнительно содержит модификацию аминокислоты C5S в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 277 (соответствующую C220S в соответствии с нумерацией EU), такой как Fc–область, приведенная в SEQ ID NO: 1429. Например, в некоторых вариантах осуществления вариант Fc–области содержит следующие

модификации аминокислот: V297G и одну или более из следующих модификаций аминокислот C220S, R292C или V302C в соответствии с нумерацией EU (соответствующих N82G и одной или более из следующих модификаций аминокислот C5S, R77C или V87C в соответствии с нумерацией SEQ ID NO: 277), например, Fc–область содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 356. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc–области содержит одну или более из модификаций аминокислот C220S, L234A, L235E или G237A, например, Fc–область содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 357. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc–области содержит одну или более из модификаций аминокислот C220S, L235P, L234V, L235A, G236del или S267K, например, Fc–область содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 358. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc содержит одну или более из модификаций аминокислот C220S, L234A, L235E, G237A, E356D или M358L, например, Fc–область содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 376.

[0347] В некоторых вариантах осуществления вариант CD80–Fc–слитого белка, представленного в настоящем описании, содержит вариант полипептида CD80 в соответствии с описанием, приведенным в разделе II выше. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту CD80–Fc–слитого белка, содержащему любой из описанных вариантов полипептида CD80, соединенный с вариантом Fc–области, где вариант Fc–область не является Fc IgG1 человека, содержащей мутации R292C, N297G и V302C (соответствующие R77C, N82G и V87C относительно Fc IgG1 человека дикого типа, приведенной в SEQ ID NO: xxx). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту CD80–Fc–слитого белка, содержащему любой из вариантов полипептида CD80, соединенный с Fc–областью или вариантом Fc–области, где вариант полипептида CD80 не соединяют с Fc с использованием линкера, состоящего из трех аланинов.

[0348] В некоторых вариантах осуществления в Fc–области отсутствует C–концевой лизин, соответствующий положению 232 Fc дикого типа или немодифицированной Fc, приведенной в SEQ ID NO: 277 (соответствующий K447del в соответствии с нумерацией EU). В некоторых аспектах такая Fc–область может дополнительно включать одну или более дополнительных модификаций, например, замен аминокислот, таких как любые из описанных модификаций. Примеры такой Fc–области приведены в SEQ ID NO: 356–358, 376 или 1713–1715.

[0349] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к варианту CD80–Fc–слитого белка, содержащему вариант Fc–области, в котором вариант Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 376, 356, 357, 358, 1429 или 1713–1715, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 376, 356, 357, 358, 1429 или 1713–1715.

[0350] В некоторых вариантах осуществления Fc получают из IgG2, такого как IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 278, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 278.

[0351] В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1427, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1427. В некоторых вариантах осуществления Fc IgG4 является стабилизированной Fc, в которой домен CH3 IgG4 человека заменяют доменом CH3 IgG1 человека, у которого ингибировано образование агрегатов, антитела, в котором домены CH3 и CH2 IgG4 человека заменяют доменами CH3 и CH2 IgG1 человека, соответственно, или антитела, в котором аргинин в положении 409, указанном в соответствии с индексом EU по Kabat et al., IgG4 человека заменяют лизином, и у которого ингибировано образование агрегатов (см. например, патент США № 8911726). В некоторых вариантах осуществления Fc принадлежит IgG4, содержащему мутацию S228P, которая, как показано, предотвращает рекомбинацию между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 посредством обмена Fab–фрагментами (см. например, Labrijin et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27(8): 767–71). В некоторых вариантах осуществления Fc содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1428, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1428.

[0352] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 косвенно соединяют с последовательностью Fc, например, через линкер. В некоторых вариантах осуществления с помощью одного или более "пептидных линкеров" соединяют вариант полипептида CD80 и Fc–домен. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой один аминокислотный остаток или быть более длинным. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер является гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (при использовании однобуквенного аминокислотного кода): GGGGS ("4GS" или "G_4S"; SEQ ID NO: 1717) или мультимеры линкера 4GS, такие как повторы из 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS, такие как приведенные в SEQ ID NO: 330 (2×GGGGS; $(G_4S)_2$) или SEQ ID NO: 329 (3×GGGGS; $(G_4S)_3$). В некоторых вариантах осуществления линкер может включать серию остатков аланина в отдельности или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых вариантах

осуществления количество остатков аланина в каждой серии составляет 2, 3, 4, 5 или 6 аланинов. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой три аланина (AAA). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 косвенно соединяют с последовательностью Fc через линкер, где линкер не состоит из трех аланинов. В некоторых примерах линкер представляет собой 2×GGGGS с последующими тремя аланинами (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 331). В некоторых вариантах осуществления линкер может дополнительно включать аминокислоты, встраиваемые посредством клонирования и/или получаемые из участка рестрикции, например, линкер может включать аминокислоты GS (при использовании однобуквенного аминокислотного кода), встраиваемые с использованием участка рестрикции BamHI. Например, в некоторых вариантах осуществления линкер (при использовании однобуквенного аминокислотного кода) представляет собой GSGGGGS (SEQ ID NO: 1716), $GS(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 3028) или $GS(G_4S)_5$ (SEQ ID NO: 3029). В некоторых вариантах осуществления линкер является жестким линкером. Например, линкер является α–спиральным линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (при использовании однобуквенного аминокислотного кода): EAAAK или мультимеры линкера EAAAK, такие как повторы из 2, 3, 4 или 5 линкеров EAAAK, такие как приведенные в SEQ ID NO: 3026 (1×EAAAK), SEQ ID NO: 3027 (3×EAAAK) или SEQ ID NO: 3036 (5×EAAAK). В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, содержит различные комбинации пептидных линкеров.

[0353] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 напрямую соединяют с последовательностью Fc. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 напрямую соединяют с Fc, такой как неактивная Fc, в которой дополнительно отсутствует вся шарнирная область или ее часть. Пример Fc, в которой отсутствует часть (6 аминокислот) шарнирной области, приведена в SEQ ID NO: 3025. В некоторых вариантах осуществления, в которых полипептид CD80 напрямую соединяют с последовательностью Fc, полипептид CD80 может быть укороченным на С–конце на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 укорачивают для удаления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот, соединяющих IgV–область с IgC–областью. Например, варианты полипептидов CD80 могут содержать модификации в примере остова CD80 дикого типа, приведенном в SEQ ID NO: 3030.

[0354] В некоторых вариантах осуществления вариант CD80–Fc–слитого белка является димером, образованным двумя вариантами полипептидов CD80–Fc, соединенных с Fc–доменом. В некоторых конкретных вариантах осуществления идентичные или, по существу, идентичные типы (предусматривающие 3 или менее N–концевых или С–концевых отличий аминокислотной последовательности) вариантов CD80–Fc–слитых полипептидов будут димеризоваться с образованием гомодимера. В некоторых вариантах осуществления димер является гомодимером, в котором два варианта полипептидов CD80–Fc являются одинаковыми. Альтернативно, разные типы вариантов CD80–Fc–

слитых полипептидов могут димеризоваться с образованием гетеродимера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления димер является гетеродимером, в котором два варианта полипептидов CD80–Fc отличаются.

[0355] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим вариант CD80–Fc–слитого белка. В некоторых вариантах осуществления для получения Fc–слитого белка молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант CD80–Fc–слитого белка, встраивают в соответствующий экспрессирующий вектор. Получаемый вариант CD80–Fc–слитого белка можно экспрессировать в клетках–хозяевах, трансформированных с использованием экспрессирующего вектора, при этом сборка Fc–доменов происходит с помощью межцепочечных дисульфидных связей, образующихся между функциональными фрагментами Fc, с образованием димерных, например, бивалентных, вариантов CD80–Fc–слитых белков.

[0356] Получаемые Fc–слитые белки легко можно очищать посредством аффинной хроматографии на колонках с протеином A или протеином G. Для получения гетеродимеров могут потребоваться дополнительные стадии очистки. Например, если клетки трансформируют с использованием двух нуклеиновых кислот, кодирующих разные варианты полипептидов CD80, необходимо биохимически достигать образования гетеродимеров, т.к. варианты молекул CD80, содержащие Fc–домен, будут также экспрессироваться в виде гомодимеров, соединенных дисульфидными связями. Таким образом, гомодимеры можно восстанавливать в условиях, способствующих разрушению межцепочечных дисульфидных связей, но не влияющих на внутрицепочечные дисульфидные связи. В некоторых случаях различные мономеры вариант CD80–Fc смешивают в эквимолярных количествах и окисляют для получения смеси гомо– и гетеродимеров. Компоненты этой смеси разделяют способами хроматографии. Альтернативно, можно способствовать образованию этого типа гетеродимеров посредством генетической инженерии и экспрессии Fc–слитых молекул, содержащих вариант полипептида CD80, с использованием способов "выступ–во–впадину", описанных ниже.

B. Составные молекулы с дополнительными доменами IgSF

[0357] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки могут содержать любые из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, соединенных, прямо или косвенно, с одним или более другими доменами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) ("составная" конструкция иммуномодулирующего белка, также называемая иммуномодулирующим белком "типа II"). В некоторых аспектах таким образом можно получать уникальные мультидоменные иммуномодулирующие белки, связывающиеся с двумя или более, например, тремя или более, когнатными партнерами по связыванию, таким образом, обеспечивая многоцелевую модуляцию иммунного синапса.

[0358] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит комбинацию ("комбинацию не–дикого типа") и/или сборку ("сборку не–дикого

типа" или "пермутацию не–дикого типа") домена варианта CD80 с одной или более другими последовательностями аффинно–модифицированных и/или не–аффинно–модифицированных доменов IgSF другого члена семейства IgSF (например, члена семейства IgSF млекопитающего), необнаруживаемых в членах семейства IgSF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит 2, 3, 4, 5 или 6 доменов суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), где по меньшей мере один из доменов IgSF является доменом IgSF варианта CD80 (vIgD CD80), соответствующим представленному описанию.

[0359] В некоторых вариантах осуществления последовательности дополнительных доменов IgSF могут представлять собой модифицированный домен IgSF, содержащий одну или более модификаций аминокислот, например, замен, по сравнению с доменом IgSF дикого типа или немодифицированным доменом IgSF. В некоторых вариантах осуществления домен IgSF может являться не–аффинно–модифицированным (например, дикого типа) или аффинно–модифицированным. В некоторых вариантах осуществления немодифицированный домен IgSF или домен IgSF дикого типа можно получать из мыши, крысы, яванского макака или человека или иметь комбинированное происхождение. В некоторых вариантах осуществления дополнительные домены IgSF может являться доменом IgSF члена семейства IgSF, приведенного в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF может являться аффинно–модифицированным доменом IgSF, содержащим одну или более модификаций аминокислот, например, замен, по сравнению с доменом IgSF, содержащимся в члене семейства IgSF, приведенного в таблице 2.

[0360] В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF является аффинно–модифицированным или не–аффинно–модифицированным доменом IgSF, содержащимся в члене семейства IgSF, из семейства, выбранного из семейства сигнал–регуляторных белков (SIRP), семейства белков, подобных запускающим рецепторам, экспрессирующимся на миелоидных клетках (TREML), семейства молекул клеточной адгезии, родственных карциноэмбриональному антигену (CEACAM), семейства связывающих сиаловую кислоту Ig–подобных лектинов (SIGLEC), семейства бутирофилинов, семейства B7, семейства CD28, семейства белков, содержащих домены V–set и домены иммуноглобулинов (VSIG), семейства белков, содержащих трансмембранный домен V–set (VSTM), семейства главного комплекса гистосовместимости (MHC), семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов (SLAM), семейства лейкоцитарных иммуноглобулин–подобных рецепторов (LIR), семейства нектинов (Nec), семейства нектин–подобных белков (NECL), семейства белков, родственных рецептору полиовируса (PVR), семейства рецепторов естественной цитотоксичности (NCR), семейства белков, содержащих T–клеточный иммуноглобулин и муциновый домен (TIM), или семейства иммуноглобулин–подобных рецепторов киллерных клеток (KIR). В некоторых вариантах осуществления дополнительные домены IgSF независимо получают из белка IgSF, выбранного из группы, состоящей из CD80 (B7–

1), CD86 (B7–2), CD274 (PD–L1, B7–H1), PDCD1LG2 (PD–L2, CD273), ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7–H2), CD276 (B7–H3), VTCN1 (B7–H4), CD28, CTLA4, PDCD1 (PD–1), ICOS, BTLA (CD272), CD4, CD8A (CD8–альфа), CD8B (CD8–бета), LAG3, HAVCR2 (TIM–3), CEACAM1, TIGIT, PVR (CD155), PVRL2 (CD112), CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R1 (CD200R) и NC R3 (NKp30).

[0361] В первой колонке таблицы 2 представлено название конкретного члена IgSF и, необязательно, его некоторые возможные синонимы. Во второй колонке представлен идентификатор белка в базе данных UniProtKB, общедоступной базе данных, доступных в сети интернет по адресу uniprot.org, или, в некоторых случаях, номер в GenBank. Universal Protein Resource (UniProt) является всеобъемлющим ресурсом данных о последовательностях белков и их аннотации. Базы данных UniProt включают UniProt Knowledgebase (UniProtKB). UniProt представляет собой продукт сотрудничества European Bioinformatics Institute (EMBL–EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics и Protein Information Resource (PIR) и поддерживается, в основном, грантом U.S. National Institutes of Health (NIH). GenBank является базой данных генетических последовательностей NIH, аннотированным собранием всех общедоступных последовательностей ДНК (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41(D1):D36–42). В третьей колонке представлена область, в которой локализуется указанный домен IgSF. Область определяют как диапазон, в котором находится домен, включая остатки, определяющие диапазон. В колонке 3 также указан класс домена IgSF для определенной области IgSF. В колонке 4 представлена область, в которой локализованы указанные дополнительные домены (сигнальный пептид, S; внеклеточный домен, E; трансмембранный домен, T; цитоплазматический домен, C). Следует понимать, что описание доменов может варьироваться в зависимости от способов, используемых для идентификации или классификации домена, и их можно идентифицировать по–разному при использовании разных источников. Описание остатков, соответствующих домену в таблице 2, представлено исключительно в качестве примера, и последовательность может быть на несколько аминокислот (например одну, две, три или четыре) длиннее или короче. В колонке 5 для некоторых из указанных членов IgSF указаны некоторые из его когнатных партнеров по связыванию на поверхности клетки.

ТАБЛИЦА 2. Члены IgSF по изобретению.

Член IgSF (синоним)	Регистрационный номер белка в NCBI/идентификатор белка в UniProtKB	Область IgSF и класс домена	Другие домены	Когнатные партнеры по связыванию на поверхности клетки	Аминокислотная последовательность члена IgSF (SEQ ID NO)		
					Предшественник (остатки зрелой последовательности)	Зрелая последовательность	ECD
CD80 (B7–1)	NP_005182.1 P33681	35–135, 35–138, 37–138 или 35–141 IgV, 145–230, 154–232, или 142–232 IgC	S: 1–34, E: 35–242, T: 243–263, C: 264–288	CD28, CTLA4, PD–L1	1 (35–288)	279	2
CD86 (B7–2)	P42081.2	33–131 IgV, 150–225 IgC2	S: 1–23, E: 24–247, T: 248–268, C: 269–329	CD28, CTLA4	224 (24–329)	280	250
CD274 (PD–L1, B7–H1)	Q9NZQ7.1	19–127, 24–130 IgV, 133–225 IgC2	S: 1–18, E: 19–238, T: 239–259, C: 260–290	PD–1, B7–1	225 (19–290)	281	251
PDCD1LG2 (PD–L2, CD273)	Q9BQ51.2	21–118 IgV, 122–203 IgC2	S: 1–19, E: 20–220, T: 221–241, C: 242–273	PD–1, RGMb	226 (20–273)	282	252

ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7–H2)	O75144.2	19–129 IgV, 141–227 IgC2	S: 1–18, E: 19–256, T: 257–277, C: 278–302	ICOS, CD28, CTLA4	227 (19–302)	283	253
CD276 (B7–H3)	Q5ZPR3.1	29–139 IgV, 145–238 IgC2, 243–357 IgV2, 363–456, 367–453 IgC2	S: 1–28, E: 29–466, T: 467–487, C: 488–534		228 (29–534)	284	254
VTCN1 (B7–H4)	Q7Z7D3.1	35–146 IgV, 153–241 IgV	S: 1–24, E: 25–259, T: 260–280, C: 281–282		229 (25–282)	285	255
CD28	P10747.1	28–137 IgV	S: 1–18, E: 19–152, T: 153–179, C: 180–220	B7–1, B7–2, B7RP1	230 (19–220)	286	256
CTLA4	P16410.3	39–140 IgV	S: 1–35, E: 36–161, T: 162–182, C: 183–223	B7–1, B7–2, B7RP1	231 (36–223)	287	257
PDCD1 (PD–1)	Q15116.3	35–145 IgV	S: 1–20, E: 21–170, T: 171–191, C: 192–288	PD–L1, PD–L2	232 (21–288)	288	258
ICOS	Q9Y6W8.1	30–132 IgV	S: 1–20, E: 21–140, T: 141–161, C: 162–199	B7RP1	233 (21–199)	289	259

BTLA (CD272)	Q7Z6A9.3	31–132 IgV	S: 1–30, E: 31–157, T: 158–178, C: 179–289	HVEM	234 (31–289)	290	260
CD4	P01730.1	26–125 IgV, 126–203 IgC2, 204–317 IgC2, 317–389, 318–374IgC2	S: 1–25, E: 26–396, T: 397–418, C: 419–458	MHC класса II	235 (26–458)	291	261
CD8A (CD8–альфа)	P01732.1	22–135 IgV	S: 1–21, E: 22–182, T: 183–203, C: 204–235	MHC класса I	236 (22–235)	292	262
CD8B (CD8–бета)	P10966.1	22–132 IgV	S: 1–21, E: 22–170, T: 171–191, C: 192–210	MHC класса I	237 (22–210)	293	263
LAG3	P18627.5	37–167 IgV, 168–252 IgC2, 265–343 IgC2, 349–419 IgC2	S: 1–28, E: 29–450, T: 451–471, C: 472–525	MHC класса II	238 (29–525)	294	264
HAVCR2 (TIM–3)	Q8TDQ0.3	22–124 IgV	S: 1–21, E: 22–202, T: 203–223, C: 224–301	CEACAM–1, фосфатидилсерин, галектин–9, HMGB1	239 (22–301)	295	265
CEACAM1	P13688.2	35–142 IgV, 145–232 IgC2, 237–317 IgC2, 323–413 IgC2	S: 1–34, E: 35–428, T: 429–452, C: 453–526	TIM–3	240 (35–526)	296	266

TIGIT	Q495A1.1	22–124 IgV	S: 1–21, E: 22–141, T: 142–162, C: 163–244	CD155, CD112	241 (22–244)	297	267
PVR (CD155)	P15151.2	24–139 IgV, 145–237 IgC2, 244–328 IgC2	S: 1–20, E: 21–343, T: 344–367, C: 368–417	TIGIT, CD226, CD96, полиовирус	242 (21–417)	298	268
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32–156 IgV, 162–256 IgC2, 261–345 IgC2	S: 1–31, E: 32–360, T: 361–381, C: 382–538	TIGIT, CD226, CD112R	243 (32–538)	299	269
CD226	Q15762.2	19–126 IgC2, 135–239 IgC2	S: 1–18, E: 19–254, T: 255–275, C: 276–336	CD155, CD112	244 (19–336)	300	270
CD2	P06729.2	25–128 IgV, 129–209 IgC2	S: 1–24, E: 25–209, T: 210–235, C: 236–351	CD58	245 (25–351)	301	271
CD160	O95971.1	27–122 IgV	N/A	HVEM, семейство белков MHC	246 (27–159)	302	272
CD200	P41217.4	31–141 IgV, 142–232 IgC2	S: 1–30, E: 31–232, T: 233–259, C: 260–278	CD200R	247 (31–278)	303	273

CD200 R1 (CD200 R)	Q8TD46.2	53–139 IgV, 140–228 IgC2	S: 1–28, E: 29–243, T: 244–264, C: 265–325	CD200	248 (29–325)	304	274
NCR3 (NKp30)	O14931.1	19–126 IgC–подобного домена	S: 1–18, E: 19–135, T: 136–156, C: 157–201	B7–H6	249 (19–201)	305	275
VSIG8	Q5VU13	22–141 IgV1, 146–257 IgV2	S: 1–21, E: 22–263, T: 264–284, C: 285–414	VISTA	306 (22–414)	307	308

[0362] Количество таких не–аффинно–модифицированных или аффинно–модифицированных доменов IgSF, присутствующих в "составной" конструкции иммуномодулирующего белка (является ли она комбинацией не–дикого типа или сборкой не–дикого типа), составляет по меньшей мере 2, 3, 4, или 5, а в некоторых вариантах осуществления точно 2, 3, 4 или 5 домена IgSF (при этом при определении количества аффинно–модифицированных доменов IgSF не учитывают какие–либо их неспецифически связывающиеся частичные последовательности и/или, по существу, иммунологически неактивные частичные последовательности).

[0363] В некоторых вариантах осуществления составного иммуномодулирующего белка, представленного в настоящем описании, количество доменов IgSF составляет по меньшей мере 2, где каждое из количества аффинно–модифицированных доменов и количества не–аффинно–модифицированных доменов IgSF независимо составляет по меньшей мере 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Таким образом, количество аффинно–модифицированных доменов IgSF и количество не–аффинно–модифицированных доменов IgSF, соответственно, (аффинно–модифицированный домен IgSF:не–аффинно–модифицированный домен IgSF) может составлять точно или по меньшей мере 2:0 (аффинно–модифицированный: дикого типа), 0:2, 2:1, 1:2, 2:2, 2:3, 3:2, 2:4, 4:2, 1:1, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 1:5 или 5:1.

[0364] В некоторых вариантах осуществления составного иммуномодулирующего белка по меньшей мере два из не–аффинно–модифицированных и/или аффинно–модифицированных доменов IgSF являются идентичными доменами IgSF.

[0365] В некоторых вариантах осуществления составной иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, содержит по меньшей мере два аффинно–модифицированных и/или не–аффинно–модифицированных домена IgSF из одного члена IgSF, но в сборке не–дикого типа (альтернативно, "пермутации"). Одним из

иллюстративных примеров сборки не–дикого типа или пермутации является иммуномодулирующий белок, содержащий порядок не–дикого типа последовательностей аффинно–модифицированных и/или не–аффинно–модифицированных доменов IgSF относительно порядка, обнаруживаемого в CD80 дикого типа, последовательности доменов IgSF которого служат в качестве источника вариантов доменов IgSF, как представлено в настоящем описании. Таким образом, в одном из примеров иммуномодулирующий белок может содержать IgV, проксимальный к трансмембранному домену, и IgC, дистальный к трансмембранному домену, хоть и в не–аффинно–модифицированной и/или аффинно–модифицированной форме. Наличие в иммуномодулирующем белке, представленном в настоящем описании, обоих комбинаций не–дикого типа и вариантов сборки не–дикого типа не–аффинно–модифицированных и/или аффинно–модифицированных доменов IgSF также входит в объем объекта изобретения.

[0366] В некоторых вариантах осуществления составного иммуномодулирующего белка не–аффинно–модифицированные и/или аффинно–модифицированные домены IgSF являются неидентичными (т.е. разными) доменами IgSF. Неидентичные аффинно–модифицированные домены IgSF в условиях специфического связывания специфически связываются с разными когнатными партнерами по связыванию и являются "неидентичными" независимо от того, являются ли домены IgSF дикого типа или немодифицированные домены IgSF, из которых их конструируют, одинаковыми или нет. Таким образом, например, комбинация не–дикого типа по меньшей мере двух неидентичных доменов IgSF в иммуномодулирующем белке может содержать по меньшей мере одну последовательность домена IgSF, полученного из CD80 и уникального для одного из CD80, и по меньшей мере одну последовательность второго домена IgSF, полученного из другого члена семейства IgSF, не являющегося CD80, и уникального для него, где домены IgSF иммуномодулирующего белка находятся в не–аффинно–модифицированной и/или аффинно–модифицированной форме. Однако в альтернативных вариантах осуществления два неидентичных домена IgSF получают из одной и той же последовательности домена IgSF, но по меньшей мере один из них является аффинно–модифицированным таким образом, что они специфически связываются с разными когнатными партнерами по связыванию.

[0367] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки по изобретению, в дополнение варианту полипептида CD80, также содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных доменов суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), таких как IgD–домен члена семейства IgSF, приведенного в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере один дополнительный домен IgSF (например, второй домен IgSF). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере два дополнительных домена IgSF (например, второй и третий домен IgSF). В некоторых вариантах осуществления

иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере три дополнительных домена IgSF (например, второй, третий и четвертый). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере четыре дополнительных домена IgSF (например, второй, третий, четвертый и пятый). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере пять дополнительных доменов IgSF (например, второй, третий, четвертый, пятый и шестой). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере шесть дополнительных доменов IgSF (например, второй, третий, четвертый, пятый, шестой и седьмой). В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов IgSF в иммуномодулирующем белке отличается. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из дополнительных доменов IgSF является тем же, что и по меньшей мере один другой домен IgSF в иммуномодулирующем белке. В некоторых вариантах осуществления каждый из доменов IgSF получают из разных членов семейства IgSF. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из доменов IgSF получают из одного члена семейства IgSF.

[0368] В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF содержит IgV–домен или IgC–домен (например, IgC2) или домены, или специфически связывающийся фрагмент IgV–домена, или специфически связывающийся фрагмент IgC–домена (например, IgC2) или доменов. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит полноразмерный IgV–домен. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит полноразмерный IgC–домен (например, IgC2) или домены. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит специфически связывающийся фрагмент IgV–домена. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит специфически связывающийся фрагмент IgC–домена (например, IgC2) или доменов. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит по меньшей мере два дополнительных домена IgSF из одного (одного и того же) члена IgSF. Например, в некоторых аспектах иммуномодулирующий белок содержит ECD или его часть из члена IgSF, содержащий полноразмерный IgV–домен и полноразмерный IgC–домен (например, IgC2) или домены или их специфически связывающиеся фрагменты.

[0369] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки по изобретению содержат по меньшей мере один дополнительный домен IgSF (например, второй или, в некоторых случаях, также третий домен IgSF и т.д.), где по меньшей мере один дополнительный или второй домен IgSF является доменом IgSF, приведенном в домене IgSF дикого типа, или немодифицированном домене IgSF, или его специфически связывающемся фрагменте, содержащемся в аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 224–249 и 306. В некоторых вариантах осуществления домен IgSF дикого типа или немодифицированный домен IgSF является

IgV–доменом или IgC–доменом, таким как домен IgC1 или IgC2.

[0370] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие белки по изобретению, в дополнение варианту полипептида CD80, также содержат по меньшей мере один дополнительный аффинно–модифицированный домен IgSF (например, второй или, в некоторых случаях, также третий аффинно–модифицированный домен IgSF и т.д.), где по меньшей мере один дополнительный домен IgSF является vIgD, содержащим одну или более модификаций аминокислот (например, замену, делецию или мутацию) по сравнению с доменом IgSF в домене IgSF дикого типа или немодифицированном домене IgSF, таком как домен IgSF в члене семейства IgSF, приведенном в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный, например, второй или третий, аффинно–модифицированный домен IgSF имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к домену IgSF дикого типа или немодифицированному домену IgSF или его специфически связывающемуся фрагменту, содержащемуся в аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 224–249 и 306. В некоторых вариантах осуществления домен IgSF дикого типа или немодифицированный домен IgSF является IgV–доменом или IgC–доменом, таким как домен IgC1 или IgC2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный, например, второй или третий, домен IgSF является аффинно–модифицированным IgV–доменом и/или IgC–доменом. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных доменов IgSF являются аффинно–модифицированными доменами IgSF, содержащими IgV–домен и/или IgC–домен (например, IgC2) или домены, или специфически связывающийся фрагмент IgV–домена, и/или специфически связывающийся фрагмент IgC–домена (например, IgC2) или доменов, где IgV– и/или IgC–домен содержит модификации аминокислот (например, замены). В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных аффинно–модифицированных доменов IgSF содержат IgV–домен, содержащий модификации аминокислот (например, замены). В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных аффинно–модифицированных доменов IgSF включают домены IgSF, присутствующие в ECD или части ECD соответствующего немодифицированного члена семейства IgSF, такие как полноразмерный IgV–домен и полноразмерный IgC–домен (например, IgC2) или домены или их специфически связывающиеся фрагменты, где один или оба из IgV и IgC содержат модификации аминокислот (например, замены).

[0371] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению содержит по меньшей мере один дополнительный или второй домен IgSF, являющийся vIgD, содержащим одну или более замен аминокислот по сравнению с доменом IgSF (например, IgV) дикого типа или немодифицированным доменом IgSF, иного, чем CD80.

[0372] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй или третий IgSF) являются доменом IgSF (например, IgV)

другого члена семейства IgSF, который сам по себе также связывается с ингибиторным рецептором. В некоторых аспектах один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй или третий IgSF) являются аффинно–модифицированным доменом IgSF, являющимся вариантом домена IgSF (vIgD) члена семейства IgSF, связывающимся с ингибиторным рецептором и содержащим одну или более замен аминокислот в домене IgSF (например, IgV), где, в некоторых случаях, одна или более модификаций аминокислот приводят к повышенному связыванию с ингибиторным рецептором. В некоторых вариантах осуществления vIgD содержит одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций) в домене IgSF дикого типа или немодифицированном домене IgSF (например, IgV) члена семейства IgSF, связывающимся с ингибиторным рецептором. В дополнение к CTLA–4, примерами таких ингибиторных рецепторов являются PD–1, LAG3, TIGIT, TIM–3 или BTLA. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных доменов IgSF получают из члена семейства IgSF, выбранного из CD155, CD112, PD–L1, PD–L2 или CEACAM1. Таким образом, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к многоцелевым антагонистам контрольных точек, направленно воздействующим или блокирующим активность нескольких ингибиторных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок является многоцелевым антагонистом контрольных точек, направленно воздействующим или блокирующим активность по меньшей мере двух, трех, четырех или более ингибиторных рецепторов.

[0373] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептидов CD80 и один или более доменов IgSF ингибиторного рецептора, такого как ингибиторный рецептор дикого типа или немодифицированный ингибиторный рецептор. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептидов CD80 и один или более доменов IgSF CD112, например, CD112 дикого типа или немодифицированного CD112, таких как IgV–домен, приведенный в SEQ ID NO: 734 или 829, или ECD или его часть (содержащий IgV– и IgC–домен или их специфически связывающиеся фрагменты), приведенные в SEQ ID NO: 269 или ее части. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептидов CD80 и один или более доменов IgSF CD155, например, CD155 дикого типа или немодифицированного CD155, таких как IgV–домен, приведенный в SEQ ID NO: 378 или 421, или ECD или его часть (содержащий IgV– и IgC–домен или их специфически связывающиеся фрагменты), приведенный в SEQ ID NO: 268 или ее части. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептидов CD80 и один или более доменов IgSF PD–L1, например, PD–L1 дикого типа или немодифицированного PD–L1, таких как IgV–домен, приведенный в SEQ ID NO: 1000 или 1196, или ECD или его часть (содержащий IgV– и IgC–домен или их специфически связывающиеся фрагменты),

приведенный в SEQ ID NO: 251 или 1721 или их части. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любой из вариантов полипептидов CD80 и один или более доменов IgSF PD–L2, например, PD–L2 дикого типа или немодифицированного PD–L2, таких как IgV–домен, приведенный в SEQ ID NO: 1197 или 1257, или ECD или его часть (содержащий IgV– и IgC–домен или их специфически связывающиеся фрагменты), приведенный в SEQ ID NO: 252 или ее части.

[0374] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй или третий IgSF), являющихся vIgD члена семейства IgSF, связывающимся с ингибиторным рецептором, где одна или более модификаций аминокислот в домене IgSF (например, IgV) приводят к повышенной аффинности связывания vIgD или слитого или иммуномодулирующего белка, содержащего vIgD, с его когнатным партнером по связыванию, являющимся ингибиторным рецептором, по сравнению с немодифицированным доменом IgSF, например, аффинность связывания повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз 40 раз или 50 раз. В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот в домене IgSF (например, IgV) приводят к повышенной селективности vIgD или слитого или иммуномодулирующего белка, содержащего vIgD, для его ингибиторного рецептора по сравнению с немодифицированным доменом IgSF. В некоторых вариантах осуществления повышенная селективность представляет собой более высокое соотношение связывания vIgD с ингибиторным рецептором относительно другого когнатного партнера по связыванию, такого как когнатный партнер по связыванию, не являющийся ингибиторным рецептором, по сравнению с соотношением связывания немодифицированного IgSF с ингибиторным рецептором относительно другого когнатного партнера по связыванию. В некоторых вариантах осуществления соотношение выше по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз 40 раз или 50 раз.

[0375] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный (например, второй или третий) vIgD является доменом IgSF (например, IgV) варианта полипептида CD112, содержащего одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций) в домене IgSF (например, IgV) по сравнению с немодифицированным CD112 или CD112 дикого типа, являющимся членом семейства IgSF, связывающимся с ингибиторным рецептором TIGIT. Примеры модификаций аминокислот, таких как замены, делеции или инсерции, в домене IgSF (например, IgV или ECD, содержащем IgV и IgC) варианта полипептида CD112 приведены в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида CD112, содержащий IgV–

домен, включающий любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 3, такой как IgV–домен, приведенный в любой из SEQ ID NO: 782–828, 830–876, 918–999, 1454–1501, или IgV–домен, демонстрирующий по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 782–828, 830–876, 918–999, 1454–1501 и содержащий одну или более модификаций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида CD112, содержащий ECD или его часть, содержащую IgV– и/или IgC–домены, содержащие любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 3, такой как ECD, приведенный в любой из SEQ ID NO: 735–781, 877–917, 1430–1453, или ECD демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 735–781, 877–917, 1430–1453 и содержащий одну или более модификаций аминокислот.

[0376] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный (например, второй или третий) vIgD является доменом IgSF (например, IgV) варианта полипептида CD155, содержащего одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций) в домене IgSF (например, IgV) по сравнению с немодифицированным CD155 или CD155 дикого типа, являющимся членом семейства IgSF, связывающимся с ингибиторным рецептором TIGIT. Примеры модификаций аминокислот, таких как замены, делеции или инсерции, в домене IgSF (например, IgV или ECD, содержащем IgV и IgC) варианта полипептида CD155 приведены в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида CD155, содержащий IgV–домен, включающий любую из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 4, такой как IgV–домен, приведенный в любой из SEQ ID NO: 400–420, 422–442, 540–733, 1502–1547, 1572, 1573, 1620–1711, или IgV–домен, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 400–420, 422–442, 540–733, 1502–1547, 1572, 1573, 1620–1711 и содержащий одну или более модификаций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида CD155, содержащий ECD или его часть, содержащую IgV– и/или IgC–домены, содержащие любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 4, такой как ECD, приведенный в любой из SEQ ID NO: 379–399, 443–539, 1548–1571, 1574–1619 или ECD, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 379–399, 443–539, 1548–1571, 1574–1619 и содержит одну или более модификаций аминокислот.

[0377] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный (например, второй или третий) vIgD является доменом IgSF (например, IgV) варианта полипептида PD–L1, содержащего одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций) в домене IgSF (например, IgV или ECD) по сравнению с немодифицированным PD–L1 или дикого типа PD–L1, что в некоторых аспектах приводит к повышенному связыванию с ингибиторным рецептором PD–1. Примеры модификаций аминокислот, таких как замены, делеции или инсерции, в домене IgSF (например, IgV или ECD, содержащем IgV и IgC) варианта полипептида PD–L1 приведены в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида PD–L1, содержащий IgV–домен, включающий любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 5, такой как IgV–домен, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1066–1195, 1719, 1720, 1901–1930, или IgV–домен, демонстрирующий по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 1066–1195, 1719, 1720, 1901–1930 и содержащий одну или более модификаций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD180 по изобретению и вариант полипептида PD–L1, содержащий ECD или его часть, содержащую IgV– и/или IgC–домены, содержащие любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 5, такой как ECD, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1001–1065, 1718, 1722–1900, 1931–1996 или ECD, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 1001–1065, 1718, 1722–1900, 1931–1996 и содержащий одну или более модификаций аминокислот.

[0378] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный (например, второй или третий) vIgD является доменом IgSF (например, IgV) варианта полипептида PD–L2, содержащего одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций) в домене IgSF (например, IgV) по сравнению с немодифицированным PD–L2 или PD–L2 дикого типа, что, в некоторых аспектах, приводит к повышенному связыванию с ингибиторным рецептором PD–1. Примеры модификаций аминокислот, таких как замены, делеции или инсерции, в домене IgSF (например, IgV или ECD, содержащем IgV и IgC) варианта полипептида PD–L2 приведены в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида PD–L2, содержащий IgV–домен, включающий любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 6, такой как IgV–домен, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1275–1325, 1327–1401, 1403–1426, или IgV–домен, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 1275–1325, 1327–1401, 1403–1426 и содержащий одну или более модификаций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида PD–L2, содержащий ECD или его часть, содержащую IgV– и/или IgC–домены, содержащую любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 6, такой как ECD, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1198–1248, 1250–1256, 1258–1274, или ECD, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 1198–1248, 1250–1256, 1258–1274 и содержит одну или более модификаций аминокислот.

[0379] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, содержащий домен IgSF (например, IgV) CD155, CD112, PD–L1 или PD–L2 или варианта любого из указанных выше, является иммуномодулирующим белком, содержащим вариант полипептида CD80 в соответствии с описанием, приведенным в разделе II выше. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению, содержащий домен IgSF (например, IgV) CD155, CD112, PD–L1 или PD–L2 или варианта любого из указанных выше и домен IgSF варианта полипептида CD80, является иммуномодулирующим белком, в котором вариант полипептида CD80 не содержит модификации аминокислот в немодифицированном полипептиде CD80, приведенном в SEQ ID NO: 2, 76 или 150, в которых единственными модификациями аминокислот являются L70PI30F/L70P, Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K/A91S, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E24X/Q33R/K54N/T57I/I67V/A71D, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D или Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W. В некоторых вариантах осуществления вариант

полипептида CD80 не является полипептидом, приведенным в SEQ ID NO: 3–75, 77–149 или 151–223.

[0380] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению не содержит домен IgSF CD155 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению не содержит домен IgSF CD112 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению не содержит домен IgSF PD–L1 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок по изобретению не содержит домен IgSF PD–L2 или его вариант.

[0381] В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй или третий IgSF) является доменом IgSF (например, IgV) другого члена семейства IgSF, связывающегося с опухолевым антигеном или распознающего его. В таких вариантах осуществления член семейства IgSF служит в качестве локализующего в опухоли функционального фрагмента, таким образом, сближающего vIgD CD80 с иммунными клетками в микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен IgSF (например, второй IgSF) является доменом IgSF NKp30, связывающим или распознающим B7–H6, экспрессирующийся на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный (например, второй) домен IgSF, например, NKp30, является аффинно–модифицированным доменом IgSF или vIgD, содержащим одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций). В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот повышают аффинность связывания и/или селективность в отношении B7–H6 по сравнению с немодифицированным доменом IgSF, например, NKp30, например, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз или 50 раз. Примеры модификаций аминокислот, таких как замены, делеции или инсерции, в домене IgSF (например, IgC–подобном или полном ECD) варианта полипептида NKp30 приведены в таблице 7. Примеры полипептидов включают вариант NKp30, содержащий мутации L30V/A60V/S64P/S86G относительно положений во внеклеточном домене NKp30, соответствующих положениям, приведенным в SEQ ID NO: 275. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида NKp30, содержащие IgC–подобный домен, включающий любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 7, такой как IgC–подобный домен, приведенный в любой из SEQ ID NO: 344–348, или IgV–домен, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 344–348 и содержащий одну или более модификаций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из

вариантов полипептидов CD180 по изобретению и вариант полипептида NKp30, содержащий ECD или его часть, содержащую домен или домены IgSF, содержащие любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 7, такой как ECD, приведенный в любой из SEQ ID NO: 334–338, или ECD, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 334–338 и содержащий одну или более модификаций аминокислот.

[0382] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный (например, второй или третий) vIgD является доменом IgSF (например, IgV) варианта полипептида CD86, содержащим одну или более модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций) в домене IgSF (например, IgV) по сравнению с немодифицированным CD86 или CD86 дикого типа, что, в некоторых аспектах, приводит к повышенному связыванию с его когнатным партнером по связыванию. Примеры модификаций аминокислот, таких как замены, делеции или инсерции, в домене IgSF (например, IgV или ECD, содержащем IgV и IgC) варианта полипептида CD86 приведены в таблице 8. Примеры полипептидов включают варианты CD86, содержащие мутации Q35H/H90L/Q102H относительно положений во внеклеточном домене CD86, соответствующие положениям, приведенным в SEQ ID NO: 250. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида CD86, содержащий IgV–домен, включающий любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 8, такой как IgV–домен, приведенный в любой из SEQ ID NO: 350–353, или IgV–домен, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 350–353 и содержащий одну или более модификаций аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к иммуномодулирующему белку, содержащему любые из вариантов полипептидов CD80 по изобретению и вариант полипептида CD86, содержащий ECD или его часть, содержащую IgV– и/или IgC–домены, содержащие любые из модификаций аминокислот, приведенных в таблице 8, такой как ECD, приведенный в любой из SEQ ID NO: 339–342, или ECD, демонстрирующий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности по отношению к любой из SEQ ID NO: 339–342 и содержащий одну или более модификаций аминокислот.

[0383] В таблицах 3–8 представлены примеры полипептидов, содержащих один или более аффинно–модифицированных доменов IgSF, которые можно использовать в составных конструкциях, представленных в настоящем описании.

ТАБЛИЦА 3:Примеры вариантов полипептидов CD112		
Мутации	**ECD**	**IgV**

	SEQ ID NO	SEQ ID NO	
Дикий тип	269	734	829
Y33H, A112V, G117D	735	782	830
V19A, Y33H, S64G, S80G, G98S, N106Y, A112V	736	783	831
L32P, A112V	737	784	832
A95V, A112I	738	785	833
P28S, A112V	739	786	834
P27A, T38N, V101A, A112V	740	787	835
S118F	741	788	836
R12W, H48Y, F54S, S118F	742	789	837
R12W, Q79R, S118F	743	790	838
T113S, S118Y	744	791	839
S118Y	745	792	840
N106I, S118Y	746	793	841
N106I, S118F	747	794	842
A95T, L96P, S118Y	748	795	843
Y33H, P67S, N106Y, A112V	749	796	844
N106Y, A112V	750	797	845
T18S, Y33H, A112V	751	798	846
P9S, Y33H, N47S, A112V	752	799	847
P42S, P67H, A112V	753	800	848
P27L, L32P, P42S, A112V	754	801	849
G98D, A112V	755	802	850
Y33H, S35P, N106Y, A112V	756	803	851
L32P, P42S, T100A, A112V	757	804	852
P27S, P45S, N106I, A112V	758	805	853
Y33H, N47K, A112V	759	806	854
Y33H, N106Y, A112V	760	807	855
K78R, D84G, A112V, F114S	761	808	856
Y33H, N47K, F54L, A112V	762	809	857
Y33H, A112V	763	810	858
A95V, A112V	764	811	859
R12W, A112V	765	812	860
R12W, P27S, A112V	766	813	861

Y33H, V51M, A112V	767	814	862
Y33H, A112V, S118T	768	815	863
Y33H, V101A, A112V, P115S	769	816	864
H24R, T38N, D43G, A112V	770	817	865
A112V	771	818	866
P27A, A112V	772	819	867
A112V, S118T	773	820	868
R12W, A112V, M122I	774	821	869
Q83K, N106Y, A112V	775	822	870
R12W, P27S, A112V, S118T	776	823	871
P28S, Y33H, A112V	777	824	872
P27S, Q90R, A112V	778	825	873
L15V, P27A, A112V, S118T	779	826	874
Y33H, N106Y, T108I, A112V	780	827	875
Y33H, P56L, V75M, V101M, A112V	781	828	876
N47K, Q79R, S118F	877	918	959
Q40R, P60T, A112V, S118T	878	919	960
F114Y, S118F	879	920	961
Y33H, K78R, S118Y	880	921	962
R12W, A46T, K66M, Q79R, N106I, T113A, S118F	881	922	963
Y33H, A112V, S118F	882	923	964
R12W, Y33H, N106I, S118F	883	924	965
L15V, Q90R, S118F	884	925	966
N47K, D84G, N106I, S118Y	885	926	967
L32P, S118F	886	927	968
Y33H, Q79R, A112V, S118Y	887	928	969
T18A, N106I, S118T	888	929	970
L15V, Y33H, N106Y, A112V, S118F	889	930	971
V37M, S118F	890	931	972
N47K, A112V, S118Y	891	932	973
A46T, A112V	892	933	974
P28S, Y33H, N106I, S118Y	893	934	975
P30S, Y33H, N47K, V75M, Q79R, N106I, S118Y	894	935	976
V19A, N47K, N106Y, K116E, S118Y	895	936	977

Q79R, T85A, A112V, S118Y	896	937	978
V101M, N106I, S118Y	897	938	979
Y33H, Q79R, N106I, A112V, S118T	898	939	980
Q79R, A112V	899	940	981
Y33H, A46T, Q79R, N106I, S118F	900	941	982
A112V, G121S	901	942	983
Y33H, Q79R, N106I, S118Y	902	943	984
Y33H, N106I, A112V	903	944	985
Y33H, A46T, V101M, A112V, S118T	904	945	986
L32P, L99M, N106I, S118F	905	946	987
L32P, T108A, S118F	906	947	988
R12W, Q79R, A112V	907	948	989
Y33H, N106Y, E110G, A112V	908	949	990
Y33H, N106I, S118Y	909	950	991
Q79R, S118F	910	951	992
Y33H, Q79R, G98D, V101M, A112V	911	952	993
N47K, T81S, V101M, A112V, S118F	912	953	994
G82S, S118Y	913	954	995
Y33H, A112V, S118Y	914	955	996
Y33H, N47K, Q79R, N106Y, A112V	915	956	997
Y33H, S118T	916	957	998
R12W, Y33H, Q79R, V101M, A112V	917	958	999
Y33H, Q83K, A112V, S118T	1430	1454	1478
V29M, Y33H, N106I, S118F	1431	1455	1479
Y33H, A46T, A112V	1432	1456	1480
Y33H, Q79R, S118F	1433	1457	1481
Y33H, N47K, F74L, S118F	1434	1458	1482
R12W, V101M, N106I, S118Y	1435	1459	1483
A46T, V101A, N106I, S118Y	1436	1460	1484
N106Y, A112V, S118T	1437	1461	1485
S76P, T81I, V101M, N106Y, A112V, S118F	1438	1462	1486
P9R, L21V, P22L, I34M, S69F, F74L, A87V, A112V, L125A	1439	1463	1487
Y33H, V101M, A112V	1440	1464	1488

V29A, L32P, S118F	1441	1465	1489
Y33H, V101M, N106I, A112V	1442	1466	1490
R12W, Y33H, N47K, Q79R, S118Y	1443	1467	1491
Y33H, A46T, A112V, S118T	1444	1468	1492
Y33H, A112V, F114L, S118T	1445	1469	1493
Y33H, T38A, A46T, V101M, A112V	1446	1470	1494
P28S, Y33H, S69P, N106I, A112V, S118Y	1447	1471	1495
Y33H, P42L, N47K, V101M, A112V	1448	1472	1496
Y33H, N47K, F74S, Q83K, N106I, F111L, A112V, S118T	1449	1473	1497
Y33H, A112V, S118T, V119A	1450	1474	1498
Y33H, N106I, A112V, S118F	1451	1475	1499
Y33H, K66M, S118F, W124L	1452	1476	1500
N106I, A112V	1453	1477	1501

ТАБЛИЦА 4: Примеры вариантов полипептидов CD155

Мутации	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**	
Дикий тип	268	378	421
P18S, P64S, F91S	379	400	422
P18S, F91S, L104P	380	401	423
L44P	381	402	424
A56V	382	403	425
P18L, L79V, F91S	383	404	426
P18S, F91S	384	405	427
P18T, F91S	385	406	428
P18T, S42P, F91S	386	407	429
G7E, P18T, Y30C, F91S	387	408	430
P18T, F91S, G111D	388	409	431
P18S, F91P	389	410	432
P18T, F91S, F108L	390	411	433
P18T, T45A, F91S	391	412	434
P18T, F91S, R94H	392	413	435
P18S, Y30C, F91S	393	414	436
A81V, L83P	394	415	437

L88P	395	416	438
R94H	396	417	439
A13E, P18S, A56V, F91S	397	418	440
P18T, F91S, V115A	398	419	441
P18T, Q60K	399	420	442
S52M	443	540	637
T45Q, S52L, L104E, G111R	444	541	638
S42G	445	542	639
Q62F	446	543	640
S52Q	447	544	641
S42A, L104Q, G111R	448	545	642
S42A, S52Q, L104Q, G111R	449	546	643
S52W, L104E	450	547	644
S42C	451	548	645
S52W	452	549	646
S52M, L104Q	453	550	647
S42L, S52L, Q62F, L104Q	454	551	648
S42W	455	552	649
S42Q	456	553	650
S52L	457	554	651
S52R	458	555	652
L104E	459	556	653
G111R	460	557	654
S52E	461	558	655
Q62Y	462	559	656
T45Q, S52M, L104E	463	560	657
S42N, L104Q, G111R	464	561	658
S52M, V57L	465	562	659
S42N, S52Q, Q62F	466	563	660
S42A, S52L, L104E, G111R	467	564	661
S42W, S52Q, V57L, Q62Y	468	565	662
L104Q	469	566	663
S42L, S52Q, L104E	470	567	664
S42C, S52L	471	568	665

S42W, S52R, Q62Y, L104Q	472	569	666
T45Q, S52R, L104E	473	570	667
S52R, Q62F, L104Q, G111R	474	571	668
T45Q, S52L, V57L, L104E	475	572	669
S52M, Q62Y	476	573	670
Q62F, L104E, G111R	477	574	671
T45Q, S52Q	478	575	672
S52L, L104E	479	576	673
S42V, S52E	480	577	674
T45Q, S52R, G111R	481	578	675
S42G, S52Q, L104E, G111R	482	579	676
S42N, S52E, V57L, L104E	483	580	677
S42C, S52M, Q62F	484	581	678
S42L	485	582	679
S42A	486	583	680
S42G, S52L, Q62F, L104Q	487	584	681
S42N	488	585	682
P18T, S65A, S67V, F91S	489	586	683
P18F, T39A, T45Q, T61R, S65N, S67L, E73G, R78G	490	587	684
P18T, T45Q, T61R, S65N, S67L	491	588	685
P18F, S65A, S67V, F91S	492	589	686
P18F, T45Q, T61R, S65N, S67L, F91S, L104P	493	590	687
P18S, L79P, L104M	494	591	688
P18S, L104M	495	592	689
L79P, L104M	496	593	690
P18T, T45Q, L79P	497	594	691
P18T, T45Q, T61R, S65H, S67H	498	595	692
P18T, A81E	499	596	693
P18S, D23Y, E37P, S52G, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	500	597	694
A13R, D23Y, E37P, S42P, Q62Y, A81E	501	598	695
A13R, D23Y, E37P, G99Y, S112N	502	599	696
A13R, D23Y, E37P, Q62M, A77V, G80S, A81P, G99Y	503	600	697
P18L, E37S, Q62M, G80S, A81P, G99Y, S112N	504	601	698

P18S, L104T	505	602	699
P18S, Q62H, L79Q, F91S	506	603	700
T45Q, S52K, Q62F, L104Q, G111R	507	604	701
T45Q, S52Q, Q62Y, L104Q, G111R	508	605	702
T45Q, S52Q, Q62Y, L104E, G111R	509	606	703
V57A, T61M, S65W, S67A, E96D, L104T	510	607	704
P18L, V57T, T61S, S65Y, S67A, L104T	511	608	705
P18T, T45Q	512	609	706
P18L, V57A, T61M, S65W, S67A, L104T	513	610	707
T61M, S65W, S67A, L104T	514	611	708
P18S, V41A, S42G, T45G, L104N	515	612	709
P18H, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104N	516	613	710
P18S, S42G, T45V, F58L, S67W, L104N	517	614	711
P18S, T45I, L104N	518	615	712
P18S, S42G, T45G, L104N, V106A	519	616	713
P18H, H40R, S42G, T45I, S52T, G53R, S54H, V57L, H59E, T61S, S65D, E68G, L104Y, V106L, F108H	520	617	714
E37V, S42G, T45G, L104N	521	618	715
P18S, T45Q, L79P, L104T	522	619	716
P18L, Q62R	523	620	717
A13R, D23Y, E37P, S42L, S52G, Q62Y, A81E	524	621	718
P18L, H49R, L104T, D116N	525	622	719
A13R, D23Y, E37P, Q62M, G80S, A81P, L104T	526	623	720
S65T, L104T	527	624	721
A13R, D23Y, E37P, S52G, V57A, Q62M, K70E, L104T	528	625	722
P18L, A47V, Q62Y, E73D, L104T	529	626	723
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, D97G, E98S, L104T, D116N	530	627	724
P18L, S42P, T45Q, T61G, S65H, S67E, L104T, D116N	531	628	725
P18S, H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E73R, L104M, V106A	532	629	726
H40T, V41M, A47V, S52Q, Q62L, S65T, E68G, E73R, D97G, E98S, L104T	533	630	727

T45Q, S52E, L104E	534	631	728
T45Q, S52E, Q62F, L104E	535	632	729
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, F91S, L104M, G111D	536	633	730
P18S, T45S, T61K, S65W, S67A, F91S, G111R	537	634	731
P18S, L79P, L104M, T107M	538	635	732
P18S, S65W, S67A, M90V, V95A, L104Q, G111R	539	636	733
P18S, A47G, L79P, F91S, L104M, T107A, R113W	1548	1502	1525
P18T, D23G, S24A, N35D, H49L, L79P, F91S, L104M, G111R	1549	1503	1526
V9L, P18S, Q60R, V75L, L79P, R89K, F91S, L104E, G111R	1550	1504	1527
P18S, H49R, E73D, L79P, N85D, F91S, V95A, L104M, G111R	1551	1505	1528
V11A, P18S, L79P, F91S, L104M, G111R	1552	1506	1529
V11A, P18S, S54R, Q60P, Q62K, L79P, N85D, F91S, T107M	1553	1507	1530
P18T, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, G111R	1554	1508	1531
P18T, M36T, L79P, F91S, G111R	1555	1509	1532
D8G, P18S, M36I, V38A, H49Q, A76E, F91S, L104M, T107A, R113W	1556	1510	1533
P18S, S52P, S65A, S67V, L79P, F91S, L104M, T107S, R113W	1557	1511	1534
T15I, P18T, L79P, F91S, L104M, G111R	1558	1512	1535
P18F, T26M, L44V, Q62K, L79P, E82D, F91S, L104M, G111D	1559	1513	1536
P18T, E37G, G53R, Q62K, L79P, F91S, E98D, L104M, T107M	1560	1514	1537
P18L, K70E, L79P, F91S, V95A, G111R	1561	1515	1538
V9I, Q12K, P18F, S65A, S67V, L79P, L104T, G111R, S112I	1562	1516	1539
P18F, S65A, S67V, F91S, L104M, G111R	1563	1517	1540
V9I, V10I, P18S, F20S, T45A, L79P, F91S, L104M, F108Y, G111R, S112V	1564	1518	1541

V9L, P18L, L79P, M90I, F91S, T102S, L104M, G111R	1565	1519	1542
P18C, T26M, L44V, M55I, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107M	1566	1520	1543
V9I, P18T, D23G, L79P, F91S, G111R	1567	1521	1544
P18F, L79P, M90L, F91S, V95A, L104M, G111R	1568	1522	1545
P18T, M36T, S65A, S67E, L79Q, A81T, F91S, G111R	1569	1523	1546
V9L, P18T, Q62R, L79P, F91S, L104M, G111R	1570	1524	1547
P18S, S65W, S67A, L104Q, G111R	1571	1572	1573
P18T, G19D, M36T, S54N, L79P, L83Q, F91S, T107M, F108Y	1574	1620	1666
V9L, P18L, M55V, S69L, L79P, A81E, F91S, T107M	1575	1621	1667
P18F, H40Q, T61K, Q62K, L79P, F91S, L104M, T107V	1576	1622	1668
P18S, Q32R, Q62K, R78G, L79P, F91S, T107A, R113W	1577	1623	1669
Q12H, P18T, L21S, G22S, V57A, Q62R, L79P, F91S, T107M	1578	1624	1670
V9I, P18S, S24P, H49Q, F58Y, Q60R, Q62K, L79P, F91S, T107M	1579	1625	1671
P18T, W46C, H49R, S65A, S67V, A76T, L79P, S87T, L104M	1580	1626	1672
P18S, S42T, E51G, L79P, F91S, G92W, T107M	1581	1627	1673
V10F, T15S, P18L, R48Q, L79P, F91S, T107M, V115M	1582	1628	1674
P18S, L21M, Y30F, N35D, R84W, F91S, T107M, D116G	1583	1629	1675
P18F, E51V, S54G, Q60R, L79Q, E82G, S87T, M90I, F91S, G92R, T107M	1584	1630	1676
Q16H, P18F, F91S, T107M	1585	1631	1677
P18T, D23G, Q60R, S67L, L79P, F91S, T107M, V115A	1586	1632	1678
D8G, V9I, V11A, P18T, T26M, S52P, L79P, F91S, G92A, T107L, V115A	1587	1633	1679
V9I, P18F, A47E, G50S, E68G, L79P, F91S, T107M	1588	1634	1680
P18S, M55I, Q62K, S69P, L79P, F91S, T107M	1589	1635	1681
P18T, T39S, S52P, S54R, L79P, F91S, T107M	1590	1636	1682

P18S, D23N, L79P, F91S, T107M, S114N	1591	1637	1683
P18S, P34S, E51V, L79P, F91S, G111R	1592	1638	1684
P18S, H59N, V75A, L79P, A81T, F91S, L104M, T107M	1593	1639	1685
P18S, W46R, E68D, L79P, F91S, T107M, R113G	1594	1640	1686
V9L, P18F, T45A, S65A, S67V, R78K, L79V, F91S, T107M, S114T	1595	1641	1687
P18T, M55L, T61R, L79P, F91S, V106I, T107M	1596	1642	1688
T15I, P18S, V33M, N35F, T39S, M55L, R78S, L79P, F91S, T107M	1597	1643	1689
P18S, Q62K, K70E, L79P, F91S, G92E, R113W	1598	1644	1690
P18F, F20I, T26M, A47V, E51K, L79P, F91S	1599	1645	1691
P18T, D23A, Q60H, L79P, M90V, F91S, T107M	1600	1646	1692
P18S, D23G, C29R, N35D, E37G, M55I, Q62K, S65A, S67G, R78G, L79P, F91S, L104M, T107M, Q110R	1601	1647	1693
A13E, P18S, M36R, Q62K, S67T, L79P, N85D, F91S, T107M	1602	1648	1694
V9I, P18T, H49R, L79P, N85D, F91S, L104T, T107M	1603	1649	1695
V9A, P18F, T61S, Q62L, L79P, F91S, G111R	1604	1650	1696
D8E, P18T, T61A, L79P, F91S, T107M	1605	1651	1697
P18S, V41A, H49R, S54C, L79S, N85Y, L88P, F91S, L104M, T107M	1606	1652	1698
V11E, P18H, F20Y, V25E, N35S, H49R, L79P, F91S, T107M, G111R	1607	1653	1699
V11A, P18F, D23A, L79P, G80D, V95A, T107M	1608	1654	1700
P18S, K70R, L79P, F91S, G111R	1609	1655	1701
V9L, V11M, P18S, N35S, S54G, Q62K, L79P, L104M, T107M, V115M	1610	1656	1702
V9L, P18Y, V25A, V38G, M55V, A77T, L79P, M90I, F91S, L104M	1611	1657	1703
V10G, P18T, L72Q, L79P, F91S, T107M	1612	1658	1704
P18S, H59R, A76G, R78S, L79P	1613	1659	1705
V9A, P18S, M36T, S65G, L79P, F91S, L104T, G111R, S112I	1614	1660	1706

P18T, S52A, V57A, Q60R, Q62K, S65C, L79P, F91T, N100Y, T107M	1615	1661	1707
V11A, P18F, N35D, A47E, Q62K, L79P, F91S, G99D, T107M, S114N	1616	1662	1708
V11A, P18T, N35S, L79P, S87T, F91S	1617	1663	1709
V9D, V11M, Q12L, P18S, E37V, M55I, Q60R, K70Q, L79P, F91S, L104M, T107M	1618	1664	1710
T15S, P18S, Y30H, Q32L, Q62R, L79P, F91S, T107M	1619	1665	1711

ТАБЛИЦА 5: Примеры вариантов полипептидов PD–L1

Мутации	**ECD SEQ ID NO**		**IgV SEQID NO**	
Дикий тип	251	1721	1000	1196
K28N/M41V/N45T/H51N/K57E	1001	1931	1066	1131
I20L/I36T/N45D/I47T	1002	1932	1067	1132
I20L/M41K/K44E	1003	1933	1068	1133
P6S/N45T/N78I/I83T	1004	1934	1069	1134
N78I	1005	1935	1070	1135
M41K/N78I	1006	1936	1071	1136
N45T/N78I	1007	1937	1072	1137
I20L/N45T	1008	1938	1073	1138
N45T	1009	1939	1074	1139
M41K	1010	1940	1075	1140
I20L/I36T/N45D	1011	1941	1076	1141
N17D/N45T/V50A/D72G	1012	1942	1077	1142
I20L/F49S	1013	1943	1078	1143
N45T/V50A	1014	1944	1079	1144
I20L/N45T/N78I	1015	1945	1080	1145
I20L/N45T/V50A	1016	1946	1081	1146
M41V/N45T	1017	1947	1082	1147
M41K/N45T	1018	1948	1083	1148
A33D/S75P/D85E	1019	1949	1084	1149
M18I/M41K/D43G/H51R/N78I	1020	1950	1085	1150
V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P	1021	1951	1086	1151
A33D/V50A	1022	1952	1087	1152

S16G/A33D/K71E/S75P	1023	1953	1088	1153
E27G/N45T/M97I	1024	1954	1089	1154
E27G/N45T/K57R	1025	1955	1090	1155
A33D/E53V	1026	1956	1091	1156
D43G/N45D/V58A	1027	1957	1092	1157
E40G/D43V/N45T/V50A	1028	1958	1093	1158
Y14S/K28E/N45T	1029	1959	1094	1159
A33D/N78S	1030	1960	1095	1160
A33D/N78I	1031	1961	1096	1161
A33D/N45T	1032	1962	1097	1162
A33D/N45T/N78I	1033	1963	1098	1163
E27G/N45T/V50A	1034	1964	1099	1164
N45T/V50A/N78S	1035	1965	1100	1165
I20L/N45T/V110M	1036	1966	1101	1166
I20L/I36T/N45T/V50A	1037	1967	1102	1167
N45T/L74P/S75P	1038	1968	1103	1168
N45T/S75P	1039	1969	1104	1169
S75P/K106R	1040	1970	1105	1170
S75P	1041	1971	1106	1171
A33D/S75P	1042	1972	1107	1172
A33D/S75P/D104G	1043	1973	1108	1173
A33D/S75P	1044	1974	1109	1174
I20L/E27G/N45T/V50A	1045	1975	1110	1175
I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I	1046	1976	1111	1176
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I	1047	1977	1112	1177
I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I	1048	1978	1113	1178
I20L/D43G/N45D/N78I	1049	1979	1114	1179
E27G/N45T/V50A/N78I	1050	1980	1115	1180
N45T/V50A/N78I	1051	1981	1116	1181
V11A/I20L/E27G/D43G/N45D/H51Y/S99G	1052	1982	1117	1182
I20L/E27G/D43G/N45T/V50A	1053	1983	1118	1183
I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R	1054	1984	1119	1184
I20L/I36T/N45D	1055	1985	1120	1185
I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I	1056	1986	1121	1186

A33D/D43G/N45D/V58A/S75P	1057	1987	1122	1187
K23R/D43G/N45D	1058	1988	1123	1188
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D	1059	1989	1124	1189
D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G–ins	1060	1990	1125	1190
I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I	1061	1991	1126	1191
I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I	1062	1992	1127	1192
T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K	1063	1993	1128	1193
I20L/M41K/D43G/N45D	1064	1994	1129	1194
K23R/N45T/N78I	1065	1995	1130	1195
I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R/G101G–ins (G101GG)	1718	1996	1719	1720
K57R/S99G	1722	1812	1901	1916
K57R/S99G/F189L	1723	1813		
M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q	1724	1814		
I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/H202Q/L206F	1725	1815		
C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/H202Q/T221L	1726			
M18V/I98L/L124S/P198T/L206F	1727	1816		
S99G/N117S/I148V/K171R/R180S	1728	1817		
I36T/M97L/A103V/Q155H	1729	1818		
K28I/S99G	1730	1819	1902	1917
R195S	1731	1820		
A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/L206F	1732	1821		
K57R/S99G/L124S/K144Q	1733	1822		
K57R/S99G/R195G	1734	1823		
D55V/M97L/S99G	1735	1824	1903	1918
E27G/I36T/D55N/M97L/K111E	1736	1825	1904	1919
E54G/M97L/S99G	1737	1826	1905	1920
G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q	1738	1827		
G15A/I36T/V129D	1739	1828		
G15A/I36T/V129D/R195G	1740	1829		
G15A/V129D	1741	1830		
I36S/M97L	1742	1831	1906	1921
I36T/D55N/M97L/K111E/A204T	1743	1832		

I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L	1744	1833		
I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S	1745	1834		
I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P198T	1746	1835		
I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T185A/R195G	1747	1836		
I36T/I83T/M97L/K144E/P198T	1748	1837		
I36T/M97L/K111E	1749	1838	1907	1922
I36T/M97L/K144E/P198T	1750	1839		
I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y	1751	1840		
I36T/M97L/V129D	1752	1841		
L35P/I36S/M97L/K111E	1753	1842	1908	1923
M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A	1754	1843		
M18T/I36T/D55N/M97L/K111E	1755	1844	1909	1924
M18V/M97L/T176N/R195G	1756	1845		
M97L/S99G	1757	1846	1910	1925
N17D/M97L/S99G	1758	1847	1911	1926
S99G/T185A/R195G/P198T	1759	1848		
V129D/H202Q	1760	1849		
V129D/P198T	1761	1850		
V129D/T150A	1762	1851		
V93E/V129D	1763	1852		
Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A	1764	1853		
N45D	1765	1854	1912	1927
K160M/R195G	1766	1855		
N45D/K144E	1767	1856		
N45D/P198S	1768	1857		
N45D/P198T	1769	1858		
N45D/R195G	1770	1859		
N45D/R195S	1771	1860		
N45D/S131F	1772	1861		
N45D/V58D	1773	1862	1913	1928
V129D/R195S	1774	1863		
I98T/F173Y/L196S	1775	1864		
N45D/E134G/L213P	1776	1865		
N45D/F173I/S177C	1777	1866		

N45D/I148V/R195G	1778	1867		
N45D/K111T/R195G	1779	1868		
N45D/N113Y/R195S	1780	1869		
N45D/N165Y/E170G	1781	1870		
N45D/Q89R/I98V	1782	1871	1914	1929
N45D/S131F/P198S	1783	1872		
N45D/S75P/P198S	1784	1873		
N45D/V50A/R195T	1785	1874		
E27D/N45D/T183A/I188V	1786	1875		
F173Y/T183I/L196S/T203A	1787	1876		
K23N/N45D/S75P/N120S	1788	1877		
N45D/G102D/R194W/R195G	1789	1878		
N45D/G52V/Q121L/P198S	1790	1879		
N45D/I148V/R195G/N201D	1791	1880		
N45D/K111T/T183A/I188V	1792	1881		
N45D/Q89R/F189S/P198S	1793	1882		
N45D/S99G/C137R/V207A	1794	1883		
N45D/T163I/K167R/R195G	1795	1884		
N45D/T183A/T192S/R194G	1796	1885		
N45D/V50A/I119T/K144E	1797	1886		
T19A/N45D/K144E/R195G	1798	1887		
V11E/N45D/T130A/P198T	1799	1888		
V26A/N45D/T163I/T185A	1800	1889		
K23N/N45D/L124S/K167T/R195G	1801	1890		
K23N/N45D/Q73R/T163I	1802	1891		
K28E/N45D/W149R/S158G/P198T	1803	1892		
K28R/N45D/K57E/I98V/R195S	1804	1893		
K28R/N45D/V129D/T163N/R195T	1805	1894		
M41K/D43G/N45D/R64S/R195G	1806	1895		
M41K/D43G/N45D/R64S/S99G	1807	1896	1915	1930
N45D/R68L/F173L/D197G/P198S	1808	1897		
N45D/V50A/I148V/R195G/N201D	1809	1898		
M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D	1810	1899		
N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G	1811	1900		

ТАБЛИЦА 6: Примеры вариантов полипептидов PD–L2			
Мутации	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQ ID NO**	
Дикий тип	252	1197	1257
H15Q	1198	1275	1351
N24D	1199	1276	1352
E44D	1200	1277	1353
V89D	1201	1278	1354
Q82R/V89D	1202	1279	1355
E59G/Q82R	1203	1280	1356
S39I/V89D	1204	1281	1357
S67L/V89D	1205	1282	1358
S67L/I85F	1206	1283	1359
S67L/I86T	1207	1284	1360
H15Q/K65R	1208	1285	1361
H15Q/Q72H/V89D	1209	1286	1362
H15Q/S67L/R76G	1210	1287	1363
H15Q/R76G/I85F	1211	1288	1364
H15Q/T47A/Q82R	1212	1289	1365
H15Q/Q82R/V89D	1213	1290	1366
H15Q/C23S/I86T	1214	1291	1367
H15Q/S39I/I86T	1215	1292	1368
H15Q/R76G/I85F	1216	1293	1369
E44D/V89D/W91R	1217	1294	1370
I13V/S67L/V89D	1218	1295	1371
H15Q/S67L/I86T	1219	1296	1372
I13V/H15Q/S67L/I86T	1220	1297	1373
I13V/H15Q/E44D/V89D	1221	1298	1374
I13V/S39I/E44D/Q82R/V89D	1222	1299	1375
I13V/E44D/Q82R/V89D	1223	1300	1376
I13V/Q72H/R76G/I86T	1224	1301	1377
I13V/H15Q/R76G/I85F	1225	1302	1378
H15Q/S39I/R76G/V89D	1226	1303	1379
H15Q/S67L/R76G/I85F	1227	1304	1380
H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T	1228	1305	1381

H15Q/T47A/Q72H/R76G	1229	1306	1382
I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G	1230	1307	1383
H15Q/E44D/R76G/I85F	1231	1308	1384
H15Q/S39I/S67L/V89D	1232	1309	1385
H15Q/N32D/S67L/V89D	1233	1310	1386
N32D/S67L/V89D	1234	1311	1387
H15Q/S67L/Q72H/R76G/V89D	1235	1312	1388
H15Q/Q72H/Q74R/R76G/I86T	1236	1313	1389
G28V/Q72H/R76G/I86T	1237	1314	1390
I13V/H15Q/S39I/E44D/S67L	1238	1315	1391
E44D/S67L/Q72H/Q82R/V89D	1239	1316	1392
H15Q/V89D	1240	1317	1393
H15Q/T47A	1241	1318	1394
I13V/H15Q/Q82R	1242	1319	1395
I13V/H15Q/V89D	1243	1320	1396
I13V/S67L/Q82R/V89D	1244	1321	1397
I13V/H15Q/Q82R/V89D	1245	1322	1398
H15Q/V31M/S67L/Q82R/V89D	1246	1323	1399
I13V/H15Q/T47A/Q82R	1247	1324	1400
I13V/H15Q/V31A/N45S/Q82R/V89D	1248	1325	1401
H15Q/T47A/H69L/Q82R/V89D	1250	1327	1403
I13V/H15Q/T47A/H69L/R76G/V89D	1251	1328	1404
I12V/I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D	1252	1329	1405
I13V/H15Q/R76G/D77N/Q82R/V89D	1253	1330	1406
I13V/H15Q/T47A/R76G/V89D	1254	1331	1407
I13V/H15Q/T47A/Q82R/V89D	1255	1332	1408
I13V/H15Q/N24D/Q82R/V89D	1256	1333	1409
I13V/H15Q/I36V/T47A/S67L/V89D	1258	1334	1410
H15Q/T47A/K65R/S67L/Q82R/V89D	1259	1335	1411
H15Q/L33P/T47A/S67L/P71S/V89D	1260	1336	1412
I13V/H15Q/Q72H/R76G/I86T	1261	1337	1413
H15Q/T47A/S67L/Q82R/V89D	1262	1338	1414
F2L/H15Q/D46E/T47A/Q72H/R76G/Q82R/V89D	1263	1339	1415

I13V/H15Q/L33F/T47A/Q82R/V89D	1264	1340	1416
I13V/H15Q/T47A/E58G/S67L/Q82R/V89D	1265	1341	1417
H15Q/N24S/T47A/Q72H/R76G/V89D	1266	1342	1418
I13V/H15Q/E44V/T47A/Q82R/V89D	1267	1343	1419
H15Q/N18D/T47A/Q72H/V73A/R76G/I86T/V89D	1268	1344	1420
I13V/H15Q/T37A/E44D/S48C/S67L/Q82R/V89D	1269	1345	1421
H15Q/L33H/S67L/R76G/Q82R/V89D	1270	1346	1422
I13V/H15Q/T47A/Q72H/R76G/I86T	1271	1347	1423
H15Q/S39I/E44D/Q72H/V75G/R76G/Q82R/V89D	1272	1348	1424
H15Q/T47A/S67L/R76G/Q82R/V89D	1273	1349	1425
I13V/H15Q/T47A/S67L/Q72H/R76G/Q82R/V89D	1274	1350	1426

ТАБЛИЦА 7: Примеры вариантов полипептидов NKp30

Мутации	**ECD SEQ ID NO**	**IgC SEQID NO**
Дикий тип	275	343
L30V/A60V/S64P/S86G	334	344
L30V	335	345
A60V	336	346
S64P	337	347
S86G	338	348

ТАБЛИЦА 8: Примеры вариантов полипептидов CD86

Мутации	**ECD SEQ ID NO**	**IgV SEQID NO**
Дикий тип	250	349
Q35H/H90L/Q102H	339	350
Q35H	340	351
H90L	341	352
Q102H	342	353

[0384] В некоторых вариантах осуществления два или более домена IgSF, включая vIgD CD80 и один или более дополнительных домена IgSF (например, второй или третий

вариант домена IgSF) другого члена семейства IgSF, являются ковалентно или нековалентно связанными. Множество не–аффинно–модифицированных и/или аффинно–модифицированных доменов IgSF в полипептидной цепи составного иммуномодулирующего белка могут не быть ковалентно связанными друг с другом напрямую. В некоторых вариантах осуществления два или более доменов IgSF соединяют прямо или косвенно, например, через линкер. В некоторых вариантах осуществления промежуточный участок из одного или более аминокислотных остатков косвенно ковалентно связывает домены IgSF друг с другом. Присоединение можно осуществлять через N–концевые и C–концевые остатки. В некоторых вариантах осуществления присоединение можно осуществлять через боковые цепи аминокислотных остатков, нелокализованных на N–конце или C–конце доменов IgSF. Таким образом, присоединение можно осуществлять через концевые или внутренние аминокислотные остатки или их комбинации.

[0385] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит по меньшей мере два домена IgSF, каждый из которых соединен прямо или косвенно через линкер. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок содержит по меньшей мере три иммуномодулирующих белка, каждый из которых соединен прямо или косвенно через линкер. Различные конфигурации показаны на фиг. 5A и 5B.

[0386] В некоторых вариантах осуществления с помощью одного или более "пептидных линкеров" соединяют vIgD CD80 и один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй или третий вариант домена IgSF). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой один аминокислотный остаток или быть более длинным. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, но не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотного остатка. В некоторых вариантах осуществления линкер является гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (при использовании однобуквенного аминокислотного кода): GGGGS ("4GS") или мультимеры линкера 4GS, такие как повторы из 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS. В некоторых вариантах осуществления пептид линкер является $(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 330) или $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 329). В некоторых вариантах осуществления линкер также может включать серию остатков аланина в отдельности или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых вариантах осуществления количество остатков аланина в каждой серии составляет 2, 3, 4, 5 или 6 аланинов. В некоторых вариантах осуществления линкер также может включать серию остатков аланина в отдельности или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых вариантах осуществления количество остатков аланина в каждой серии составляет 2, 3, 4, 5 или 6 аланинов. В некоторых вариантах осуществления линкер является жестким линкером. Например, линкер является α–спиральным линкером. В

некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (при использовании однобуквенного аминокислотного кода): EAAAK или мультимеры линкера EAAAK, такие как повторы из 2, 3, 4 или 5 линкеров EAAAK, такие как приведенные в SEQ ID NO: 3026 (1×EAAAK), SEQ ID NO: 3027 (3×EAAAK) или SEQ ID NO: 3036 (5×EAAAK). В некоторых вариантах осуществления линкер может дополнительно включать аминокислоты, встраиваемые посредством клонирования и/или из участка рестрикции, например, линкер может включать аминокислоты GS (при использовании однобуквенного аминокислотного кода), встраиваемые с использованием участка рестрикции BAMHI. В некоторых примерах линкер представляет собой 2×GGGGS, за которыми следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 331).

[0387] В некоторых вариантах осуществления не–аффинно–модифицированные и/или аффинно–модифицированные домены IgSF соединяют с помощью "пептидных линкеров дикого типа", встроенных на N–конце и/или C–конце не–аффинно–модифицированных и/или аффинно–модифицированных доменов IgSF. Эти линкеры также называют лидирующими последовательностями (N–концевыми относительно не–аффинно–модифицированного или аффинно–модифицированного домена IgSF) или хвостовыми последовательности (C–концевыми относительно не–аффинно–модифицированного или аффинно–модифицированного домена IgSF), и они являются последовательностями, находящимися в белке дикого типа, продолжающимися непосредственно вне прогнозируемой структуры Ig–укладки IgSF. В некоторых вариантах осуществления "линкер дикого типа" является аминокислотной последовательностью, находящейся после сигнальной последовательности, но перед доменом IgSF, таким как определенный IgV–домен, в аминокислотной последовательности белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления линкер "дикого типа" является аминокислотной последовательностью, находящейся непосредственно после домена IgSF, например, непосредственно после определенного IgV–домена, но перед IgC–доменом в аминокислотной последовательности белка дикого типа. Эти линкерные последовательности могут вносить свой вклад в правильный фолдинг и функцию соседних доменов IgSF. В некоторых вариантах осуществления есть лидирующий пептидный линкер, встроенный на N–конце первого домена IgSF, и/или хвостовая последовательность, встроенная на C–конце первого не–аффинно–модифицированного и/или аффинно–модифицированного домена IgSF. В некоторых вариантах осуществления есть второй лидирующий пептидный линкер, встроенный на N–конце второго домена IgSF, и/или вторая хвостовая последовательность, встроенная на C–конце второго не–аффинно–модифицированного и/или аффинно–модифицированного домена IgSF. Если первый и второй не–аффинно–модифицированные и/или аффинно–модифицированные домены IgSF получают из одного родительского белка и соединяют в одной и той же ориентации, пептидные линкеры дикого типа между первым и вторым не–аффинно–модифицированными и/или аффинно–модифицированными доменами IgSF не являются дуплицированными. Например, если первый хвостовой пептидный линкер дикого типа и

второй лидирующий пептидный линкер дикого типа являются одинаковыми, то иммуномодулирующий белок типа II не содержит первый хвостовой пептидный линкер дикого типа или второй лидирующий пептидный линкер дикого типа.

[0388] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок типа II содержит первый лидирующий пептидный линкер дикого типа, встроенный на N–конце первого не–аффинно–модифицированного и/или аффинно–модифицированного домена IgSF, где первый лидирующий пептидный линкер дикого типа содержит по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислот из промежуточной последовательности в белке дикого типа, из которого получают первый не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF). В некоторых вариантах осуществления первый лидирующий пептидный линкер дикого типа содержит всю промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которого получают первый не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF).

[0389] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок типа II дополнительно содержит первый хвостовой пептидный линкер дикого типа, встроенный на C–конце первого не–аффинно–модифицированного и/или аффинно–модифицированного домена IgSF, где первый хвостовой пептидный линкер дикого типа содержит по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислот из промежуточной последовательности в белке дикого типа, из которого получают первый не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен). В некоторых вариантах осуществления первый хвостовой пептидный линкер дикого типа содержит целую промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которого получают первый не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен).

[0390] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок типа II дополнительно содержит второй лидерный пептидный линкер дикого типа, встроенный на N–конце второго не–аффинно–модифицированного и/или аффинно–модифицированного домена IgSF, где второй лидирующий пептидный линкер дикого типа содержит по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислот из промежуточной последовательности в белке дикого типа, из которого получают второй не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF). В некоторых

вариантах осуществления второй лидирующий пептидный линкер дикого типа содержит целую промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которого получают второй не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF).

[0391] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок типа II дополнительно содержит второй хвостовой пептидный линкер дикого типа, встроенный на С–конце второго не–аффинно–модифицированного и/или аффинно–модифицированного домена IgSF, где второй хвостовой пептидный линкер дикого типа содержит по меньшей мере 5 (например, по меньшей мере, приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислоты из промежуточной последовательности в белке дикого типа, из которого получают второй не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен). В некоторых вариантах осуществления второй хвостовой пептидный линкер дикого типа содержит целую промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которого получают второй не–аффинно–модифицированный и/или аффинно–модифицированный домен IgSF, между родительским доменом IgSF и следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен).

[0392] В некоторых вариантах осуществления два или более домена IgSF, включая vIgD CD80 и один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй и/или третий вариант домена IgSF) другого члена семейства IgSF, соединяют с Fc для получения Fc–слитого белка, который, после экспрессии в клетке в некоторых аспектах может образовывать димерный мультидоменный, составной иммуномодулирующий белок. Таким образом, настоящее изобретение также относится к димерным мультидоменным иммуномодулирующим белкам.

[0393] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 и один или более доменов IgSF независимо соединяют, прямо или косвенно, с N– или С–концом Fc–области. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 и по меньшей мере один из одного или более дополнительных доменов IgSF, прямо или косвенно, соединяют с N– или С–концом Fc–области и один из варианта CD80 и одного из одного или более дополнительных доменов IgSF также соединяют, прямо или косвенно, с N– или С–концом Fc–области. В некоторых вариантах осуществления N– или С–конец Fc–области соединяют с вариантом полипептида CD80 или одним или более дополнительными доменами IgSF, а другой из N– или С–конца Fc–области соединяют с другим вариантом CD80 или другим из одного или более дополнительных доменов IgSF. В некоторых вариантах осуществления соединение с Fc осуществляют с помощью пептидного линкера, например, пептидного линкера, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления соединение между вариантом CD80 и одним или более дополнительными доменами IgSF осуществляют с помощью пептидного линкера,

например, пептидного линкера, описанного выше. В некоторых вариантах осуществления vIgD CD80 один или более дополнительных доменов IgSF и Fc–домен можно соединять в любой из многочисленных конфигураций, как показано на фиг. 5A и 5B. Примеры конфигураций описаны в Примерах.

[0394] В некоторых вариантах осуществления составной иммуномодулирующий белок является димером, образованным двумя иммуномодулирующими Fc–слитыми полипептидами. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любой из составных иммуномодулирующих белков. В некоторых вариантах осуществления димерный мультидоменный, составной иммуномодулирующий белок можно получать в клетках посредством экспрессии или, в некоторых случаях, коэкспрессии составных иммуномодулирующих Fc–слитых полипептидов, таких, как описано выше в отношении получения димерных Fc–слитых белков.

[0395] В некоторых вариантах осуществления димерный мультидоменный, составной иммуномодулирующий белок является бивалентным для каждой Fc–области, моновалентным для каждой субъединицы или бивалентным для одной субъединицы и тетравалентной для другой.

[0396] В некоторых вариантах осуществления димерный мультидоменный составной иммуномодулирующий белок является гомодимерным мультидоменным составным Fc–белком. В некоторых вариантах осуществления димерный мультидоменный, составной иммуномодулирующий белок содержит первый составной иммуномодулирующий Fc–слитый полипептид и второй составной иммуномодулирующий Fc–слитый полипептид, где первый и второй полипептиды являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления мультидоменная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий вариант CD80 и второй домен IgSF, и второй Fc–слитый полипептид, содержащий вариант CD80 и второй домен IgSF. В некоторых вариантах осуществления мультидоменная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий вариант CD80, второй домен IgSF и третий домен IgSF, и второй Fc–слитый полипептид, содержащий вариант CD80, второй домен IgSF и третий домен IgSF. В некоторых вариантах осуществления Fc–часть первого и/или второго слитого полипептида может являться любой Fc, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления Fc–часть или –область первого и второго слитого полипептида являются одинаковыми.

[0397] В некоторых вариантах осуществления мультидоменная составная молекула является гетеродимерной и содержит два разных Fc–слитых полипептида, например, первый и второй Fc–слитый полипептид, где по меньшей мере один является Fc–слитым полипептидом, содержащим по меньшей мере один вариант полипептида CD80, и/или по меньшей мере один является Fc–слитым полипептидом, содержащим второй домен IgSF (например, второй вариант домена IgSF). В некоторых вариантах осуществления первый или второй Fc–слитый полипептид дополнительно содержит третий домен IgSF (например, третий вариант домена IgSF). В некоторых вариантах осуществления

мультидоменная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий вариант CD80, и второй Fc–слитый полипептид, содержащий второй домен IgSF, где, в некоторых случаях, первый или второй Fc–слитый полипептид дополнительно содержит третий домен IgSF. В некоторых вариантах осуществления мультидоменная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий вариант CD80, второй домен IgSF и, в некоторых случаях, третий домен IgSF, и второй Fc–слитый полипептид, не соединенный с вариантом полипептида CD80 или дополнительным доменом IgSF. В некоторых вариантах осуществления Fc–часть или –область первого и второго слитого полипептида являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления Fc–часть или –область первого и второго слитого полипептида отличаются.

[0398] В некоторых вариантах осуществления мультидоменная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий 1, 2, 3, 4 или более вариантов полипептидов CD80 и 1, 2, 3, 4 или более дополнительных доменов IgSF, где общее количество доменов IgSF в первом составном Fc–слитом полипептиде составляет более 2, 3, 4, 5, 6 или более. В одном из примеров такого варианта осуществления второй составной Fc–слитый полипептид содержит 1, 2, 3, 4 или более вариантов полипептидов CD80 и 1, 2, 3, 4 или более дополнительных доменов IgSF, где общее количество доменов IgSF в первом составном Fc–слитом полипептиде составляет более 2, 3, 4, 5, 6 или более. В другом примере такого варианта осуществления второй Fc–слитый полипептид не соединяют с вариантом полипептида CD80 или дополнительным доменом IgSF.

[0399] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная составная молекула содержит первый составной иммуномодулирующий Fc–слитый полипептид и второй составной иммуномодулирующий Fc–слитый полипептид, где первый и второй полипептид отличаются. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий Fc–область, первый вариант полипептида CD80 и/или второй домен IgSF (например, второй вариант домена IgSF), и второй Fc–слитый полипептид, содержащий Fc–область и другой из первого варианта полипептида CD80 или второго домена IgSF. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий Fc–область, первый вариант полипептида CD80 и/или второй домен IgSF (например, второй вариант домена IgSF), и второй Fc–слитый полипептид, содержащий Fc–область и оба из первого варианта полипептида CD80 и второго домена IgSF (например, второго варианта домена IgSF), но в другой ориентации или конфигурации относительно первой Fc–области. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй Fc–слитый полипептид также содержит третий домен IgSF (например, третий вариант домена IgSF).

[0400] В некоторых вариантах осуществления Fc–домен одного или обоих из первого и второго составных иммуномодулирующих Fc–слитых полипептидов содержит модификацию (например, замену) таким образом, что поверхность молекулы Fc

модифицируют для облегчения гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления модификации включают встраивание выступа в первый полипептид Fc и впадины во второй полипептид Fc таким образом, что выступ устанавливается во впадину для стимуляции комплексирования первого и второго Fc–содержащих полипептидов. Аминокислоты, намеченные для замены и/или модификации для получения выступов или впадин в полипептиде, как правило, являются поверхностными аминокислотами, взаимодействующими или контактирующими с одной или более аминокислотами на поверхности второго полипептида.

[0401] В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность добавляют перед последовательностью Fc в случае конструкций, в которых последовательность Fc является N–концевой частью последовательности. В некоторых случаях аминокислотную последовательность HMSSVSAQ (SEQ ID NO: 377) добавляют непосредственно перед последовательностью Fc в случае конструкций, в которых последовательность Fc является N–концевой частью последовательности. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная составная молекула содержит первый Fc–слитый полипептид, содержащий Fc–область (выступ; например, последовательность Fc, приведенную в SEQ ID NO: 374) и первый вариант полипептида и/или второй домен IgSF (например, второй вариант домена IgSF), и второй Fc–слитый полипептид, содержащий Fc–область (впадину; например, последовательность Fc, приведенную в SEQ ID NO: 375), и непосредственно перед обеими Fc–областями первого и второго Fc–слитого полипептида добавляют спейсерную последовательность HMSSVSAQ (SEQ ID NO: 377).

[0402] В некоторых вариантах осуществления первый полипептид, модифицированный так, что он содержит аминокислоты выступа (впадины), включает замену нативной или исходной аминокислоты аминокислотой, имеющей по меньшей мере одну боковую цепь, выступающую с поверхности первого полипептида, и которая, таким образом, может располагаться в компенсаторной впадине в смежной поверхности второго полипептида. Чаще всего замещающая аминокислота является аминокислотой, имеющей больший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалисту в этой области известно, как определять и/или оценивать свойства аминокислотных остатков для идентификации остатков, являющихся подходящими замещающими аминокислотами для получения выступа. В некоторых вариантах осуществления замещающие остатки для получения выступа являются природными аминокислотными остатками и включают, например, аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W). В некоторых примерах, исходный остаток, определенный для замены, является аминокислотным остатком, имеющим небольшую боковую цепь, таким как, например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, треонин или валин.

[0403] В некоторых вариантах осуществления второй полипептид, модифицированный так, что он содержит впадину, является полипептидом, включающим замену нативной или исходной аминокислоты аминокислотой, имеющей по меньшей мере

одну боковую цепь, углубленную относительно поверхности второго полипептида, и, таким образом, способной вмещать соответствующий выступ с поверхности первого полипептида. Чаще всего, замещающая аминокислота является аминокислотой, имеющей меньший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалисту в этой области известно, как определять и/или оценивать свойства аминокислотных остатков для идентификации остатков, являющихся подходящими замещающими остатками для получения впадины. Как правило, замещающие остатки для получения впадины являются природными аминокислотами и включают, например, аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V). В некоторых примерах исходная аминокислота, определенная для замены, является аминокислотой, имеющей большую боковую цепь, такой как, например, тирозин, аргинин, фенилаланин или триптофан.

[0404] Поверхность CH3 IgG1 человека, например, включает шестнадцать остатков на каждом домене, локализованных на четырех антипараллельных β–тяжах, углубляющихся на 1090 Å2 относительно каждой поверхности (см. например, Deisenhofer et al. (1981) Biochemistry, 20:2361–2370; Miller et al., (1990) J Mol. Biol., 216, 965–973; Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617–621; патент США № 5731168). Модификации домена CH3 для получения выступов или впадин описывают, например, в патенте США № 5731168; международных патентных заявках №№ WO98/50431 и WO 2005/063816 и Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617–621. В некоторых примерах модификации домена CH3 для получения выступов или впадин, как правило, направлены на остатки, локализованные на двух центральных антипараллельных β–тяжах. Целью является минимизация риска того, что созданные выступы будут размещаться, выдаваясь в окружающий растворитель, а не в компенсаторную впадину в домене–партнере CH3.

[0405] В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутацию T366W в домене CH3 "цепи выступа" и мутации T366S, L368A, Y407V в домене CH3 "цепи впадины". В некоторых случаях также можно использовать дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами CH3 (Merchant, A. M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677–681), например, посредством встраивания мутации Y349C в домен CH3 цепи "выступа" или "впадины" и мутации E356C или мутации S354C в домен другой цепи. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутации S354C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутации E356C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутации Y349C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации E356C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит мутации Y349C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В этой области известны примеры других технологий "выступ–во–впадину", например, как описано в EP 1 870 459 A1.

[0406] В некоторых вариантах осуществления Fc–области гетеродимерной молекулы дополнительно могут содержать одну или более других мутаций Fc, таких как любая из описанных выше. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерная молекула содержит Fc–область с мутацией, снижающей эффекторную функцию.

[0407] В некоторых вариантах осуществления вариант Fc, содержащий модификации выступа или впадины CH3, можно соединять с составным иммуномодулирующим полипептидом в любом месте, но, как правило, через его N– или C–конец, с N– или C–концом первого и/или второго составного иммуномодулирующего полипептида, например, для получения слитого полипептида. Соединение может быть прямым или косвенным через линкер. Как правило, молекулу с выступом и впадиной получают посредством коэкспрессии первого составного иммуномодулирующего полипептида, соединенного с вариантом Fc, содержащим модификации выступа CH3, со вторым составным иммуномодулирующим полипептидом, соединенным с вариантом Fc, содержащим модификации впадины CH3.

[0408] Настоящее изобретение относится к гомодимерной мультидоменной составной молекуле, полученной из составного иммуномодулирующего Fc–слитого полипептида, содержащего домен IgSF, например, IgV–домен, варианта полипептида CD80 и второй домен IgSF, например, IgV, варианта полипептида CD155. В некоторых вариантах осуществления получаемые мультидоменные составные молекулы связываются с CTLA–4 и TIGIT. В некоторых аспектах связывание с TIGIT имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием с TIGIT соответствующего домена IgSF немодифицированного CD155 или CD155 дикого типа. В некоторых аспектах связывание с CTLA–4 имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием с CTLA–4 соответствующего домена IgSF немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления связывание с TIGIT или CTLA–4 составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от связывания несоставной формы варианта IgSF CD80–Fc с TIGIT или CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления связывание с TIGIT составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от связывания несоставной формы варианта IgSF CD155–Fc с TIGIT. В некоторых вариантах осуществления получаемая мультидоменная составная молекула повышает T–клеточные иммунные ответы по сравнению с несоставным вариантом IgSF CD80–Fc и/или вариантом CD155–IgSF–Fc, например, как определяют посредством репортерного анализа. В некоторых вариантах осуществления повышение является повышением более чем в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз или более.

[0409] Настоящее изобретение относится к гомодимерной мультидоменной составной молекуле, получаемой из составного иммуномодулирующего Fc–слитого полипептида, содержащего домен IgSF, например, IgV–домен, варианта полипептида CD80 и второй домен IgSF, например, IgV, варианта полипептида CD112. В некоторых

вариантах осуществления получаемые мультидоменные составные молекулы связываются с CTLA–4 и CD112R. В некоторых аспектах, связывание с CD112R имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного CD112 или CD112 дикого типа с CD112R. В некоторых аспектах связывание с CTLA–4 имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа с CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления связывание с CD112R или CTLA–4 составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или более от связывания несоставной формы варианта IgSF CD80–Fc с CD112R или CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления связывание с CD112R составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от связывания несоставной формы вариант IgSF CD112–Fc с CD112R. В некоторых вариантах осуществления получаемая мультидоменная составная молекула повышает Т–клеточные иммунные ответы по сравнению с несоставным вариантом IgSF CD80–Fc и/или вариантом CD112–IgSF–Fc, например, как определяют посредством репортерного анализа. В некоторых вариантах осуществления повышение является повышением более чем в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз или более.

[0410] Настоящее изобретение относится к гомодимерной мультидоменной составной молекуле, полученной из составного иммуномодулирующего Fc–слитого полипептида, содержащего домен IgSF, например, IgV–домен, варианта полипептида CD80, второй домен IgSF, например, IgV, варианта полипептида CD155 или CD112 и третий домен IgSF, например, IgV, варианта полипептида PD–L1 или PD–L2. В некоторых вариантах осуществления получаемые мультидоменные составные молекулы связываются с CTLA–4, TIGIT, CD112R и PD–1. В некоторых аспектах связывание с CTLA–4 имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа с CTLA–4. В некоторых аспектах связывание с TIGIT имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного CD155 или CD155 дикого типа с TIGIT. В некоторых аспектах связывание с CD112R имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного CD112 или CD112 дикого типа с CD112R. В некоторых аспектах связывание с PD–1 имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного PD–L1 или PD–L1 дикого типа с PD–1. В некоторых аспектах связывание с PD–1 имеет ту же или схожую степень или, в некоторых случаях, повышено по сравнению со связыванием соответствующего домена IgSF немодифицированного PD–L2 или PD–L2 дикого типа с PD–1. В некоторых вариантах осуществления связывание с CTLA–4 составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от

связывания несоставной формы варианта IgSF CD80–Fc с CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления связывание с TIGIT или CD112R составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от связывания несоставной формы варианта IgSF CD112–Fc с TIGIT или CD112R. В некоторых вариантах осуществления связывание с TIGIT составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от связывания несоставной формы варианта IgSF CD155–Fc с TIGIT. В некоторых вариантах осуществления связывание с PD–1 составляет по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от связывания несоставной формы варианта IgSF PD–1–Fc с PD–1. В некоторых вариантах осуществления получаемая мультидоменная составная молекула повышает Т–клеточные иммунные ответы по сравнению с несоставным вариантом IgSF CD80–Fc, вариантом IgSF CD112–Fc, вариантом IgSF CD155–Fc, IgSF PD–L1–Fc и/или вариантом IgSF PD–L2–Fc, например, как определяют посредством репортерного анализа. В некоторых вариантах осуществления повышение является повышением более чем в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз или более.

C. Конъюгаты и слитые пептиды вариантов полипептидов и иммуномодулирующих белков

[0411] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов, представленные в настоящем описании, являющиеся иммуномодулирующими белками, содержащими варианты Ig–домена семейства IgSF (vIgD), можно конъюгировать или подвергать слиянию с функциональным фрагментом, таким как эффекторный функциональный фрагмент, такой как другой белок, прямо или косвенно, для получения конъюгата ("конъюгата IgSF"). В некоторых вариантах осуществления присоединение может являться ковалентным или нековалентным, например, посредством нековалентного взаимодействия биотин–стрептавидин. В некоторых вариантах осуществления варианта CD80–Fc–слитого белка, любой из указанных выше конъюгатов или комбинацию любых двух или более из указанных выше конъюгатов можно присоединять к Fc, или варианту полипептида CD80, или и тому, и другому.

[0412] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент может являться направляющим функциональным фрагментом, низкомолекулярным лекарственным средством (неполипептидным лекарственным средством с молекулярной массой менее 500 Да), токсином, цитостатическим средством, цитотоксическим средством, иммуносупрессорным средством, радиоактивным средством, подходящим для диагностических целей, ионом радиоактивного металла для терапевтических целей, активирующим пролекарство ферментом, средством, повышающим биологическое время полужизни, или диагностическим или детектируемым средством.

[0413] В некоторых вариантах осуществления эффекторный функциональный фрагмент является терапевтическим средством, таким как противоопухолевое терапевтическое средство, являющееся цитотоксическим, цитостатическим или иначе обеспечивающим некоторую терапевтическую пользу. В некоторых вариантах

осуществления эффекторный функциональный фрагмент является направляющим функциональным фрагментом или средством, таким как средство, направленно воздействующее на антиген поверхности клетки, например, антиген на поверхности опухолевой клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторный функциональный фрагмент является меткой, которая может генерировать детектируемый сигнал прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления эффекторный функциональный фрагмент является токсином. В некоторых вариантах осуществления эффекторный функциональный фрагмент является белком, пептидом, нуклеиновой кислотой, низкомолекулярным соединением или наночастицей.

[0414] В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5 или более эффекторных функциональных фрагментов, которые могут быть одинаковыми или отличаться, конъюгируют, соединяют или подвергают слиянию с вариантом полипептида или белком для получения конъюгата IgSF. В некоторых вариантах осуществления такие эффекторные функциональные фрагменты можно соединять с вариантом полипептида или иммуномодулирующим белком с использованием различных молекулярно–биологических или химических способов конъюгации и присоединения, известных в этой области и описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления для связывания или конъюгации эффекторных функциональных фрагментов с вариантом полипептида или иммуномодулирующим белком можно использовать линкеры, такие как пептидные линкеры, расщепляемые линкеры, нерасщепляемые линкеры или линкеры, облегчающие реакцию конъюгации.

[0415] В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF содержит следующие компоненты: (белок или полипептид), $(L)_q$ и (эффекторный функциональный фрагмент)$_m$, где белок или полипептид является любым белком или полипептидом из описанных вариантов полипептидов или иммуномодулирующих белков, которые могут связываться с одним или более когнатными противоструктурами–лигандами, как описано; L является линкером для связывания белка или полипептида с функциональным фрагментом; m составляет по меньшей мере 1; q составляет 0 или более; и получаемый конъюгат IgSF связывается с одной или более противоструктурами–лигандами. В конкретных вариантах осуществления m составляет от 1 до 4, и q составляет от 0 до 8.

[0416] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату IgSF, содержащему вариант полипептида или иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, конъюгированный с направляющим средством, связывающимся с молекулой поверхности клетки, например, для направленной доставки варианта полипептида или иммуномодулирующего белка к конкретной клетке. В некоторых вариантах осуществления направляющее средство представляет собой молекулы, обладающие способностью локализовать и связываться с молекулой, находящейся на нормальной клетке/ткани и/или опухолевой клетке/опухоли у индивидуума. Другими словами, конъюгаты IgSF, содержащие направляющее средство, могут связываться с лигандом (прямо или косвенно), находящимся на клетке, такой как

опухолевая клетка. Направляющие средства по изобретению, предусмотренные для использования, включают антитела, полипептиды, пептиды, аптамеры, другие лиганды или любую их комбинацию, которая может связываться с компонентом клетки–мишени или молекулы.

[0417] В некоторых вариантах осуществления направляющее средство связывается с опухолевыми клетками или может связываться вблизи опухолевых клеток (например, сосудистой сети опухоли или микроокружении опухоли) после введения индивидууму. Направляющее средство может связываться с рецептором или лигандом на поверхности злокачественной клетки. В другом аспекте изобретения выбирают направляющее средство, являющееся специфическим для незлокачественных клеток или ткани. Например, направляющее средство может являться специфическим для молекулы, в норме присутствующей на конкретной клетке или ткани. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления одна и та же молекула может присутствовать на нормальных и злокачественных клетках. Известны различные клеточные компоненты и молекулы. Например, если направляющее средство является специфическим для EGFR, получаемый конъюгат IgSF может направленно воздействовать на злокачественные клетки, экспрессирующие EGFR, а также нормальные эпидермальные клетки кожи, экспрессирующие EGFR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF по изобретению может действовать посредством двух разных механизмов (направленно воздействуя на злокачественные и незлокачественные клетки).

[0418] В различных аспектах представленного в настоящем описании изобретения конъюгат IgSF по изобретению содержит направляющее средство, которые может связываться/направленно воздействовать на клеточный компонент, такой как опухолевый антиген, бактериальный антиген, вирусный антиген, антиген микоплазмы, грибковый антиген, антиген приона, паразитарный антиген. В некоторых аспектах каждый из терминов "клеточный компонент", "антиген" или "молекула" можно использовать для обозначения желаемой мишени для направляющего средства. Например, в различных вариантах осуществления направляющее средство является специфическим или связывается с компонентом, включающим, в качестве неограничивающих примеров, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB–1, HER1), ErbB–2 (HER2/neu), ErbB–3/HER3, ErbB–4/HER4, семейство лигандов EGFR; семейство рецепторов инсулиноподобного фактора роста (IGFR), IGF–связывающие белки (IGFBP), семейство лигандов IGFR; семейство рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGFR), семейство лигандов PDGFR; семейство рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR), семейство лигандов FGFR, семейство рецепторов фактор роста эндотелия сосудов (VEGFR), семейство VEGF; семейство рецепторов HGF; семейство рецепторов TRK; семейство рецепторов эфрина (EPH); семейство рецепторов AXL; семейство рецепторных лейкоцитарных тирозинкиназ (LTK); семейство рецепторов TIE, ангиопоэтин 1,2; семейство рецепторных тирозинкиназ–подобных рецепторов (ROR), например, ROR1; CD171 (L1CAM); B7–H6 (NCR3LG1); CD80, опухолевый гликозилированный антиген,

например, sTn или Tn, такой как sTn Ag MUC1; LHR (LHCGR); фосфатидилсерин, семейство рецепторов с доменом дискоидина (DDR); семейство рецепторов RET; семейство рецепторов KLG; семейство рецепторов RYK; семейство рецепторов MuSK; рецепторы трансформирующего фактора роста–α (TGF–α), TGF–β; цитокиновые рецепторы, рецепторы класса I (семейство гемопоэтина) и класса II (семейство интерферона/ИЛ–10), суперсемейство рецепторов фактор некроза опухоли (TNF) (TNFRSF), семейство рецепторов смерти; раково–тестикулярных антигены (CT), линиеспецифические антигены, антигены дифференцировки, альфа–актинин–4, ARTCl, продукты слияния кластерной области точечного разрыва Абельсона (Bcr–abl), B–RAF, каспазу–5 (CASP–5), каспазу–8 (CASP–8), β–катенин (CTNNBl), белок цикла клеточного деления 27 (CDC27), циклин–зависимую киназу 4 (CDK4), CDKN2A, COA–I, слитый белок dek–can, EFTUD–2, фактор элонгации 2 (ELF2), слитый белок варианта гена Ets 6/гена острого миелолейкоза 1 ETS (ETC6–AML1), фибронектин (FN), например, экстрадомен A (EDA) фибронектина, GPNMB, слитый белок рецептора липидов низкой плотности/2–α–L–фукозилтрансферазы GDP–L фукозы:β–D–галактозы (LDLR/FUT), HLA–A2, замену аргинина изолейцином в остатке 170 α–спирали α2–домена в гене HLA–A2 (HLA–A*201–R170I), HLA–Al 1, мутантный белок теплового шока 70–2 (HSP70–2M), K1AA0205, MART2, убиквитарный мутированный белок меланомы 1, 2, 3 (MUM–I, 2, 3), простатическую кислую фосфатазу (PAP), neo–PAP, миозин класса I, NFYC, OGT, OS–9, слитый белок pml–RARα, PRDX5, PTPRK, K–ras (KRAS2), N–ras (NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, слитый белок SYT–SSX1 или –SSX2, триозофосфатизомеразу, BAGE, BAGK–1, BAGE–2,3,4,5, GAGE–1,2,3,4,5,6,7,8, GnT–V (аберрантную N–ацетилглюкозаминилтрансферазу V, MGAT5), HERV–K–MEL, KK–LC, KM–HN–I, LAGE, LAGE–I, CTL–распознаваемый антиген меланомы (CAMEL), MAGE–A1 (MAGE–I), MAGE–A2, MAGE–A3, MAGE–A4, MAGE–A5, MAGE–A6, MAGE–A8, MAGE–A9, MAGE–A10, MAGE–AI 1, MAGE–A12, MAGE–3, MAGE–B1, MAGE–B2, MAGE–B5, MAGE–B6, MAGE–C1, MAGE–C2, муцин 1 (MUC1), MART–1/мелан–A (MLANA), gp100, gp100/Pmell7 (SILV), тирозиназу (TYR), TRP–I, HAGE, NA–88, NY–ESO–I, NY–ESO–1/LAGE–2, SAGE, Sp17, SSX–1,2,3,4, TRP2–INT2, карциноэмбриональный антиген (CEA), калликреин 4, маммаглобин–A, OA1, простатспецифический антиген (PSA), TRP–1/gp75, TRP–2, адипофилин, интерферон–индуцибельный белок, отсутствующий при меланоме 2 (AIM–2), BING–4, CPSF, циклин Dй, молекула адгезии эпителиальных клеток (Ep–CAM), EphA3, фактор роста фибробластов–5 (FGF–5), гликопротеин 250 (gp250), EGFR (ERBBl), HER–2/neu (ERBB2), α2–цепь рецептора интерлейкина 13 (IL13Rα2), рецептор ИЛ–6, карбоксилэстеразу кишечника (iCE), альфа–фетопротеин (AFP), M–CSF, mdm–2, MUC1, p53 (TP53), PBF, PRAME, PSMA, RAGE–I, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, сурвивин (BIRC5), теломеразную обратную транскриптазу человека (hTERT), теломеразу, ген опухоли Вильмса (WT1), SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE–5, LIP1, CTAGE–I, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM–TES–85, AF15q14, HCA661, LDHC, MORC, SGY–I, SPO11, TPX1, NY–SAR–35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE,

идиотипы иммуноглобулина, белок Бенс–Джонса, рецепторы эстрогена (ER), рецепторы андрогенов (AR), CD40, CD30, CD20, CD 19, CD33, антиген злокачественной опухоли 72–4 (CA 72–4), антиген злокачественной опухоли 15–3 (CA 15–3), антиген злокачественной опухоли 27– 29 (CA 27–29), антиген злокачественной опухоли 125 (CA 125), антиген злокачественной опухоли 19–9 (CA 19–9), β–хорионический гонадотропин человека, β–2 микроглобулин, антиген плоскоклеточной карциномы, нейрон–специфическую енолазу, белок теплового шока gp96, GM2, сарграмостим, CTLA–4, 707 аланин–пролин (707–AP), антиген аденокарциномы, распознаваемый Т–клетками 4 (ART– 4), пептид карциноэмбрионального антигена–1 (CAP–I), кальций–активируемый хлоридный канал–2 (CLCA2), циклофилин B (Cyp–B), белок перстневидноклеточной опухоли человека–2 (HST–2), белки вируса папилломы человека (HPV) (HPV–E6, HPV–E7, основные или минорные антигены капсида и др.), белки вируса Эпштейна–Барр (EBV) (EBV латентные мембранные белки – LMP1, LMP2 и др.), белки вируса гепатита B или C и белки ВИЧ.

[0419] В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF, благодаря своему направляющему средству, будет связываться с клеточным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или микроокружения опухоли, таким образом, способствуя цитолизу клеток–мишеней посредством модуляции иммунного ответа (например, посредством активации костимуляторных молекул или ингибирования молекул отрицательной регуляции активации иммунных клеток), ингибирования сигналов выживания (например, фактора, роста или цитокина или антагонистов рецепторов гормонов), активации сигналов гибели и/или иммуноопосредованной цитотоксичности, например, антителозависимой клеточной цитотоксичности. Такие конъюгаты IgSF могут функционировать посредством нескольких механизмов для предотвращения образования, уменьшения или элиминации опухолевых клеток, например, для облегчения доставки конъюгированных эффекторных функциональных фрагментов к опухолевой мишени, например, посредством рецептор–опосредованного эндоцитоза конъюгата IgSF; или такие конъюгаты могут рекрутировать, связывать и/или активировать иммунные клетки (например, NK–клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, Т–клетки, В–клетки). Кроме того, в некоторых случаях один или более из указанных выше путей может активироваться после введения одного или более конъюгатов IgSF по изобретению.

[0420] В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF, благодаря своему направляющему средству, будет локализоваться, например, связываются, с клеточным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или микроокружения опухоли, таким образом, модулируя клетки иммунный ответ вблизи опухоли. В некоторых вариантах осуществления направляющее средство облегчает доставку конъюгированного IgSF (например, vIgD) к опухолевой мишени, например, для взаимодействия с его когнатным партнером по связыванию для изменения передачи сигнала иммунных клеток (например, NK–клеток, моноцитов/макрофагов, дендритных клеток, Т–клеток, В–клеток), несущих когнатного партнера по связыванию. В некоторых вариантах осуществления локализованная доставка опосредует антагонистическую или блокирующую активность

ингибиторного рецептора CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления локализованная доставка агонистически действует на ингибиторный рецептор CTLA–4, что, в некоторых случаях, может возникать, когда происходит проксимальная кластеризация активирующего рецептора.

[0421] В некоторых вариантах осуществления направляющее средство является иммуноглобулином. В рамках изобретения термин "иммуноглобулин" включает природные или искусственные моно– или поливалентные антитела, включая в качестве неограничивающих примеров, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab–фрагменты, F(ab')–фрагменты, фрагменты, получаемые с помощью экспрессионной библиотеки Fab, одноцепочечные Fv (scFv); антиидиотипические антитела (против Id) (включая, например, антитела против Id против антител по изобретению) и эпитоп–связывающие фрагменты любых из указанных выше антител. В рамках изобретения термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулином и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, например, молекулам, содержащим антигенсвязывающий участок, иммуноспецифически связывающийся с антигеном. Молекулы иммуноглобулинов по изобретению могут принадлежать к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекулы иммуноглобулина.

[0422] В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF, благодаря своему антительному направляющему функциональному фрагменту, будут связываться с клеточным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или микроокружения опухоли, таким образом, способствуя апоптозу клеток–мишеней посредством модуляции иммунного ответа (например, посредством активации костимуляторных молекул или ингибирования молекул отрицательной регуляции активации иммунных клеток), ингибирования сигналов выживания (например, фактора роста, или цитокина, или антагонистов рецепторов гормонов), активации сигналов гибели и/или иммуноопосредованной цитотоксичности, например, антителозависимой клеточной цитотоксичности. Такие конъюгаты IgSF могут функционировать посредством нескольких механизмов для предотвращения образования, уменьшения или элиминации опухолевых клеток, например, для облегчения доставки конъюгированных эффекторных функциональных фрагментов к опухолевой мишени, например, посредством рецептор–опосредованного эндоцитоза конъюгата IgSF; или такие конъюгаты могут рекрутировать, связывать и/или активировать иммунные клетки (например, NK–клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, Т–клетки, В–клетки).

[0423] В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF, благодаря своему антительному направляющему функциональному фрагменту, будет связываться с клеточным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или микроокружения опухоли, таким образом, модулируя иммунный ответ (например, посредством активации костимуляторных молекул или ингибирования молекул

отрицательной регуляции активации иммунных клеток). В некоторых вариантах осуществления такие конъюгаты могут распознавать, связывать и/или модулировать (например, ингибировать или активировать) иммунные клетки (например, NK–клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, Т–клетки, В–клетки).

[0424] Антительные направляющие функциональные фрагменты по изобретению включают фрагменты антител, включающие, в качестве неограничивающих примеров, Fab, Fab' и F(ab')2, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, соединенные дисульфидными связями Fv (sdFv) и фрагменты, содержащие домен VL или VH. Антигенсвязывающие фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельные области в отдельности или в комбинации с целой шарнирной областью и/или доменами CH1, CH2 и CH3 или их частями. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любую комбинацию вариабельных областей с шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Настоящее изобретение также включает Fc–фрагменты, антиген–Fc–слитые белки и конъюгаты или продукты слияния Fc–направляющего функционального фрагмента (Fc–пептид, Fc–аптамер). Антительные направляющие функциональные фрагменты по изобретению можно получать из любого животного, включая птиц и млекопитающих. В одном из аспектов антительные направляющие функциональные фрагменты принадлежат человеку, мыши (например, мыши и крысы), ослу, овце, кролику, козе, морской свинке, верблюду, лошади или курице. Кроме того, такие антитела могут являться гуманизированными версиями антител животных. Антительные направляющие функциональные фрагменты по изобретению могут являться моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или иметь большую мультиспецифичность.

[0425] В различных вариантах осуществления антительный/направляющий функциональный фрагмент рекрутирует, связывает и/или активирует иммунные клетки (например, NK–клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки) посредством взаимодействия между Fc (в антителах) и Fc–рецепторами (на иммунных клетках) и с помощью конъюгированными вариантами полипептидов или иммуномодулирующими белками, представленными в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антительный/направляющий функциональный фрагмент распознает или связывается с опухолевым антигеном с помощью и локализует конъюгированные варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, к опухолевой клетке для облегчения модуляции иммунных клеток вблизи опухоли.

[0426] Примеры антител, которые можно включать в конъюгаты IgSF, включают, в качестве неограничивающих примеров, антитела, такие как цетуксимаб (IMC–C225; Эрбитукс®), трастузумаб (Герцептин®), ритуксимаб (Ритуксан®; MabThera®), бевацизумаб (Авастин®), алемтузумаб (Кэмпас®; Кэмпас–1H®; Mabcampath®), панитумумаб (ABX–EGF; Vectibix®), Ranibizumab (Lucentis®), ибритумомаб, ибритумомаб тиуксетан, (Зевалин®), тозитумомаб, йод–^{131}I–тозитумомаб (Бексар®), катумаксомаб (Removab®), гемтузумаб, гемтузумаб озогамицин (Милотарг®), абатацепт

(CTLA4–Ig; Orencia®), белатацепт (L104EA29YIg; LEA29Y; LEA), ипилимумаб (MDX–010; MDX–101), тремелимумаб (тицилимумаб; CP–675,206), PRS–010, PRS–050, афлиберцепт (VEGF–ловушку, AVE005), волоциксимаб (M200), F200, MORAb–009, SS1P (CAT–5001), циксутумумаб (IMC–A12), матузумаб (EMD72000), нимотузумаб (h–R3), залутумумаб (HuMax–EGFR), нецитумумаб IMC–11F8, mAb806/ch806, Sym004, mAb–425, Panorex® (17–1A) (моноклональное антитело мыши); Panorex® (17–1A) (химерное моноклональное антитело мыши); IDEC–Y2B8 (MAb мыши против CD2O); BEC2 (антиидиотипическое MAb, имитирующее эпитоп GD) (с BCG); онколим (моноклональное антитело Lym–1); SMART MI95 Ab, гуманизированное антитело LYM–I, соединенное с ^{131}I (онколим), оварекс (B43.13, антиидиотипическое MAb мыши); MDX–210 (гуманизированное биспецифическое антитело против HER–2); 3622W94 MAb, связывающееся с панкарциномным антигеном EGP40 (17–1A) на аденокарциномах; антитело против VEGF, зенапакс (SMART, антитело против Tac (рецептора ИЛ–2); Ab SMART MI95, гуманизированное Ab, гуманизированное); MDX–210 (гуманизированное биспецифическое антитело против HER–2); MDX–447 (гуманизированное биспецифическое антитело против рецептора EGF); NovoMAb–G2 (панкарциномно–специфическое Ab); TNT (химерное MAb против гистоновых антигенов); TNT (химерное MAb против гистоновых антигенов); Gliomab–H (гуманизированные Ab Monoclon); Mab GNI–250; EMD–72000 (химерный антагонист EGF); LymphoCide (гуманизированное антитело LL2) и биспецифическое антитело MDX–260, антитело против GD–2, Ab ANA, Ab SMART ID10, Ab SMART ABL 364 или ImmuRAIT–CEA. Как следует из приведенного выше списка, общепринято получать антитела против конкретного эпитопа–мишени.

[0427] В некоторых вариантах осуществления антительный направляющий функциональный фрагмент является полноразмерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим Fc–домен. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида или иммуномодулирующий белок конъюгируют с Fc–частью антительного направляющего функционального фрагмента, например, посредством конъюгации с N–концом Fc–части антитела.

[0428] В некоторых вариантах осуществления vIgD соединяют, прямо или косвенно, с N– или C–концом легкой и/или тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления присоединение можно осуществлять через пептидный линкер, такой как любой пептидный линкер, описанный выше. Можно конструировать различные конфигурации. На фиг. 8A–8C показаны примеры конфигураций. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела можно получать посредством коэкспрессии тяжелой и легкой цепи антитела в клетке.

[0429] В одном аспектов изобретения направляющее средство является аптамерной молекулой. Например, в некоторых вариантах осуществления аптамер состоит из нуклеиновых кислот, действующих в качестве направляющего средства. В различных вариантах осуществления конъюгат IgSF по изобретению содержит аптамер, являющийся специфическим для молекулы на опухолевой клетке, сосудистой сети опухоли и/или

микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления сам аптамер, в дополнение к направляющему модулю (последовательности), может содержать биологически активную последовательность, где биологическая активная последовательность может индуцировать иммунный ответ на клетку–мишень. Другими словами, такая аптамерная молекула является средством двойного использования. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF по изобретению включает конъюгацию аптамера с антителом, где аптамер и антитело являются специфическими в отношении связывания с отдельными молекулами на опухолевой клетке, сосудистой сети опухоли, микроокружении опухоли и/или иммунных клетках.

[0430] Термин "аптамер" включает ДНК, РНК или пептиды, выбранные с учетом свойств специфического связывания с конкретной молекулой. Например, аптамеры можно выбирать по связыванию с конкретным геном или продуктом гена в опухолевой клетке, сосудистой сети опухоли, микроокружении опухоли и/или иммунной клетке, как представлено в настоящем описании, где селекцию осуществляют способами, известными в этой области и известными специалисту в этой области.

[0431] В некоторых аспектах по изобретению направляющее средство является пептидом. Например, варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, можно конъюгировать с пептидом, который может связываться с компонентом злокачественных или опухолевых клеток. Таким образом, такие конъюгаты IgSF по изобретению содержат пептидные направляющие средства, связывающиеся с клеточным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли и/или компонентом микроокружения опухоли. В некоторых вариантах осуществления направляющие пептиды могут являться антагонистами или агонистами интегрина. Интегрины, содержащие альфа– и бета–субъединицу, включают множество типов, известных специалистам в этой области.

[0432] В одном из вариантов осуществления направляющим средством является Vvβ3. Интегрин Vvβ3 экспрессируется на различных клетках, и показано, что он опосредует несколько биологически важных процессов, включая адгезию остеокластов к матриксу кости, миграцию гладкомышечных клеток сосудов и ангиогенез. Подходящие направляющие молекулы для интегринов включают пептиды или пептидомиметики RGD, а также не–RGD пептиды или пептидомиметики (см., например, патенты США №№ 5767071 и 5780426) для других интегринов, таких как V4.βi (VLA–4), V4–P7 (см., например, патент США № 6365619; Chang et al, Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:159–163 (2002); Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:133–136 (2002)), и т.п.

[0433] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату IgSF, содержащему вариант полипептида или иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, конъюгированный с терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство включает, например, дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183–187, 1986). В некоторых вариантах осуществления терапевтическое

средство имеет внутриклеточную активность. В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF интернализуется, и терапевтическое средство является цитотоксином, блокирующим синтез белка в клетке, таким образом, приводящим к гибели клетки. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство является цитотоксином, содержащим полипептид, имеющим инактивирующую рибосомы активность, включая, например, гелонин, буганин, сапорин, рицин, цепь А рицина, бриодин, дифтерийный токсин, рестриктоцин, экзотоксин А синегнойной палочки и их варианты. В некоторых вариантах осуществления, если терапевтическое средство является цитотоксином, содержащим полипептид, имеющий инактивирующую рибосомы активность, конъюгат IgSF должен интернализоваться после связывания с клеткой–мишенью для того, чтобы белок оказывал цитотоксическое действие в отношении клеток.

[0434] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату IgSF, содержащему вариант полипептида или иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, конъюгированный с токсином. В некоторых вариантах осуществления токсин включает, например, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al., J.Nat. Cancer Inst. 92(19):1573–1581 (2000); Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025– 1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786–791 (2002)), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618–8623 (1996)) и калихимицин (Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336–3342 (1993)). Токсины могут осуществлять свои цитотоксические и цитостатические эффекты посредством механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

[0435] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату IgSF, содержащему вариант полипептида или иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, конъюгированный, прямо или косвенно, с меткой, которая может генерировать детектируемый сигнал. Эти конъюгаты IgSF можно использовать в исследовательских или диагностических целях, например, для детекции злокачественного новообразования in vivo. Метка, предпочтительно, может генерировать, прямо или косвенно, детектируемый сигнал. Например, метка может являться рентгеноконтрастным веществом или радиоактивным изотопом, таким как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I; флуоресцентным (флуорофор) или хемилюминесцентным (хромофор) соединением, таким как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β–галактозидаза или пероксидаза хрена; визуализирующим средством или ионом металла. В некоторых вариантах осуществления метка является радиоактивным атомом для сцинтиграфических исследований, например, ^{99}Tc или ^{123}I, или спиновой меткой для ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно–резонансная томография, МРТ), такой как цирконий–89, йод–123, йод–131, индий–111, фтор–19, углерод–13, азот–15, кислород–17, гадолиний, марганец или железо. Цирконий–89 можно комплексировать с различными металл–

хелатирующими средствами и конъюгировать с антителами, например, для ПЭТ (WO 2011/056983). В некоторых вариантах осуществления конъюгат IgSF является косвенно детектируемым. Например, для детекции конъюгата IgSF можно использовать вторичное антитело, специфическое для конъюгата IgSF и содержащее детектируемую метку.

[0436] Конъюгаты IgSF можно получать любыми известными в этой области способами. См., например, WO 2009/067800, WO 2011/133886 и публикацию патентной заявки США № 2014/322129, включенные в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0437] Варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки из конъюгата IgSF можно "соединять с" эффекторным функциональным фрагментом любыми способами, которыми варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки можно связывать или соединять с эффекторным функциональным фрагментом. Например, варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки из конъюгата IgSF можно соединять с эффекторным функциональным фрагментом химическими или рекомбинантными способами. В этой области известны химические способы получения слитых белков или конъюгатов, и их можно использовать для получения конъюгата IgSF. Способ, используемый для конъюгации вариантов полипептидов или иммуномодулирующих белков и эффекторного функционального фрагмента, должен позволять соединять варианты полипептидов или иммуномодулирующих белков с эффекторным функциональным фрагментом, не мешая способности вариантов полипептидов или иммуномодулирующих белков связываться с одной или более противоструктурами–лигандами.

[0438] Варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки из конъюгата IgSF можно косвенно соединять с эффекторным функциональным фрагментом. Например, варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки из конъюгата IgSF можно напрямую соединять с липосомой, содержащей эффекторный функциональный фрагмент одного из нескольких типов. Эффекторные функциональные фрагменты, и/или варианты полипептидов, или иммуномодулирующие белки также можно соединять с твердой поверхностью.

[0439] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки из конъюгата IgSF и эффекторный функциональный фрагмент являются белками, и их можно конъюгировать способами, хорошо известными в этой области. Существует несколько сотен доступных перекрестно–сшивающих средств, с помощью которых можно конъюгировать два белка (см. например "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking," 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor). Перекрестно–сшивающее средство, как правило, выбирают с учетом реакционноспособных функциональных групп, доступных или встроенных в варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки, и/или эффекторный функциональный фрагмент. Кроме того, если нет реакционноспособных групп, можно использовать фотоактивируемое перекрестно–сшивающее средство. В некоторых случаях желательным может являться

включение спейсера между вариантами полипептидов или иммуномодулирующими белками и эффекторным функциональным фрагментом. Известные в этой области перекрестно–сшивающие средства включают гомобифункциональные средства (глутаральдегид, диметиладипимидат и бис(диазобензидин)) и гетерофункциональные средства (m–малеимидобензоил–N–гидроксисукцинимид и сульфо–m–малеимидобензоил–N–гидроксисукцинимид).

[0440] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки из конъюгата IgSF можно конструировать с использованием конкретных остатков для химического присоединения эффекторного функционального фрагмента. Конкретные остатки, используемые для химического присоединения молекулы и известные в этой области, включают лизин и цистеин. Перекрестно–сшивающее средство выбирают с учетом реакционноспособных функциональных групп, встроенных в варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки и доступных на эффекторном функциональном фрагменте.

[0441] Конъюгат IgSF также можно получать способами рекомбинантной ДНК. В таком случае последовательность ДНК, кодирующую варианты полипептидов или иммуномодулирующие белки, подвергают слиянию с последовательностью ДНК, кодирующей эффекторный функциональный фрагмент, что приводит к получению химерной молекулы ДНК. Клетку–хозяина, экспрессирующую слитый белок, трансфицируют с использованием химерной последовательности ДНК. Слитый белок можно выделять из культуры клеток и очищать известными в этой области способами.

[0442] Примеры присоединения эффекторного функционального фрагмента, являющегося меткой, к вариантам полипептидов или иммуномодулирующим белкам включают способы, описанные в Hunter, et al., Nature 144:945 (1962); David, et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982); Wensel and Meares, Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983); и Colcher et al., "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", Meth. Enzymol., 121:802–16 (1986).

[0443] Радиоактивные или другие метки можно встраивать в конъюгат известными способами. Например, пептид можно получать посредством биосинтеза или можно синтезировать посредством химического синтеза аминокислот с использованием подходящих предшественников аминокислот, включающих, например, фтор–19 вместо водорода. Метки, такие как ^{99}Tc или ^{123}I, ^{186}Re, ^{188}Re и ^{111}In можно присоединять через остаток цистеина в пептиде. Иттрий–90 можно присоединять через остаток лизина. Для встраивания йода–123 можно использовать способ IODOGEN (Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49–57 (1978)). Другие способы подробно описаны в "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989).

[0444] Конъюгаты вариантов полипептидов или иммуномодулирующих белков и цитотоксического средства можно получать с использованием различных

бифункциональных средств для соединения белков, таких как N–сукцинимидил–3–(2–пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил–4–(N–малеимидометил)циклогексан–1–карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (тако как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), биазидо–соединения (такие как бис(р–азидобензоил)гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис–(р–диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол–2,6–диизоцианат) и бис–активные соединения фтора (такие как 1,5–дифтор–2,4–динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Меченая углеродом–14 1–р–изотиоцианатобензил–3–метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX–DTPA) является примером хелатирующего средства для конъюгации радионуклеотида с антителом. См., например, WO94/11026. Линкер может являться "расщепляемым линкером", облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислото–неустойчивый линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фотолабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфид–содержащий линкер (Chari et al., Cancer Research 52:127–131 (1992); патент США № 5208020).

[0445] Конъюгаты IgSF по изобретению конкретно включают, в качестве неограничивающих примеров, конъюгаты лекарственных средств, полученные с использованием перекрестно–сшивающих реагентов: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC–SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо–EMCS, сульфо–GMBS, сульфо–KMUS, сульфо–MBS, сульфо–SIAB, сульфо–SMCC, сульфо–SMPB и SVSB (сукцинимидил–(4–винилсульфон)бензоат), являющиеся коммерчески доступными (например, в Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A). См. стр. 467–498, 2003–2004 Applications Handbook and Catalog.

D. Трансмембранные и секретируемые иммуномодулирующие белки и сконструированные клетки

[0446] Настоящее изобретение относится к сконструированным клеткам, экспрессирующим иммуномодулирующие варианты полипептидов CD80 (альтернативно, "сконструированным клеткам"). В некоторых вариантах осуществления экспрессируемый иммуномодулирующий вариант полипептида CD80 является трансмембранным белком и экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления экспрессируемый иммуномодулирующий вариант полипептида CD80 экспрессируется и секретируется из клетки.

1. Трансмембранные иммуномодулирующие белки

[0447] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант CD80, может являться мембраносвязанным белком. Как более подробно описано ниже, иммуномодулирующий полипептид может являться трансмембранным иммуномодулирующим полипептидом, содержащим вариант CD80, содержащий: эктодомен, содержащий по меньшей мере один аффинно–

модифицированный домен IgSF (IgV или IgC), трансмембранный домен и, необязательно, цитоплазматический домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок может экспрессироваться на поверхности иммунной клетки, такой как клетка млекопитающего, в том числе, на поверхности лимфоцита (например, Т–клетки или NK–клетки) или антигенпрезентирующей клетки. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности Т–клетки млекопитающего, включая такие Т–клетки, как: Т–хелперная клетка, цитотоксическая Т–клетка (альтернативно, цитотоксический Т–лимфоцит или CTL), NKT–клетка, регуляторная Т–клетка, Т–клетка памяти или гамма–дельта–Т–клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего является антигенпрезентирующей клеткой (АПК). Как правило, но не исключительно, эктодомен (альтернативно, "внеклеточный домен") содержит один или более вариантов аминокислот (например, замен аминокислот) из варианта CD80 по изобретению. Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный белок будет содержать эктодомен, содержащий одну или более замен аминокислот из варианта CD80 по изобретению.

[0448] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют варианты полипептидов CD80, являющиеся трансмембранными иммуномодулирующими полипептидами (TIP), которые могут являться мембранными белками, такими как трансмембранный белок. В типичных вариантах осуществления эктодомен мембранного белка содержит внеклеточный домен или его домен IgSF из варианта CD80, представленного в настоящем описании, содержащего одну или более замен аминокислот в по меньшей мере одном домене IgSF, как описано. Трансмембранные иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, дополнительно содержат трансмембранный домен, соединенный с эктодоменом. В некоторых вариантах осуществления с помощью трансмембранного домена получают кодируемый белок для экспрессии на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен напрямую соединяют с эктодоменом. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен косвенно соединяют с эктодоменом через один или более линкеров или спейсеров. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит, главным образом, гидрофобные аминокислотные остатки, такие как лейцин и валин.

[0449] В некоторых вариантах осуществления для обеспечения того, что TIP будут экспрессироваться на поверхности сконструированной клетки, такой как сконструированная Т–клетка, можно использовать полноразмерный трансмембранный якорный домен. Для удобства, его можно получать из конкретного нативного белка, являющегося аффинно–модифицированным (например, CD80 или другого нативного белка IgSF), и просто подвергать слиянию с последовательностью первого мембранного проксимального домена таким же образом, как нативный белок IgSF (например, CD80). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок

содержит трансмембранный домен соответствующего члена IgSF дикого типа или немодифицированного члена IgSF, такой как трансмембранный домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 (таблица 3). В некоторых вариантах осуществления мембраносвязанная форма содержит трансмембранный домен соответствующего полипептида дикого типа или немодифицированного полипептида, такого как полипептид, соответствующий остаткам 243–263 SEQ ID NO: 1.

[0450] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является ненативным трансмембранным доменом, не являющимся трансмембранным доменом нативного CD80. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получают из трансмембранного домена другого полипептида, являющегося членом семейства, но не являющегося CD80, являющегося мембраносвязанным или трансмембранным белком. В некоторых вариантах осуществления можно использовать трансмембранный якорный домен другого белка на Т–клетках. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получают из CD8. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может дополнительно содержать внеклеточную часть CD8, служащую в качестве спейсерного домена. Пример трансмембранного домена, полученного из CD8, приведен в SEQ ID NO: 332, 364 или 1997 или ее части, содержащей трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим трансмембранным доменом.

[0451] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок дополнительно содержит эндодомен, такой как цитоплазматический сигнальный домен, соединенный с трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен индуцирует передачу сигнала в клетке. В некоторых вариантах осуществления эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка содержит цитоплазматический домен соответствующего полипептида дикого типа или немодифицированного полипептида, такой как цитоплазматический домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 (см. таблицу 3).

[0452] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок по изобретению, представляющий собой или содержащий вариант CD80, содержит аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 279 и содержащую эктодомен, содержащий по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен IgSF CD80, как описано, и трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок содержит любую одну или более замен аминокислот в домене IgSF (например, IgV–домене), как описано, включая любые замены, приведенные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок может

дополнительно содержать цитоплазматический домен, как описано. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок может дополнительно содержать сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является нативным сигнальным пептидом члена IgSF дикого типа, таким как сигнальный пептид, содержащийся в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 (см. например, таблицу 3).

[0453] Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей такие трансмембранные иммуномодулирующие белки. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный иммуномодулирующий белок, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 279 и содержащую эктодомен, содержащий по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен IgSF, как описано, трансмембранный домен и, необязательно, цитоплазматический домен. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является нативным сигнальным пептидом соответствующего члена IgSF дикого типа (см. например, таблицу 3).

[0454] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к CAR–родственным трансмембранным иммуномодулирующим белкам, в которых эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка содержит цитоплазматический сигнальный домен, содержащий по меньшей мере один ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив)–содержащий сигнальный домен. ITAM является консервативным доменом, обнаруживаемым в ряде белковых сигнальных доменов, участвующих в передаче сигнала в иммунных клетках, включая CD3–дзета–цепь ("CD3–z"), участвующую в передаче сигнала Т–клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления эндодомен содержит сигнальный домен CD3–дзета. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3–дзета содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 333, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению к SEQ ID NO: 333 и сохраняющую активность при передаче сигнала в Т–клетках. В некоторых вариантах осуществления эндодомен CAR–родственного трансмембранного иммуномодулирующего белка дополнительно может содержать костимуляторный сигнальный домен для дополнительно модуляции иммуномодулирующих ответов Т–клетки. В некоторых вариантах осуществления костимуляторный сигнальный домен получают из CD28, ICOS, 41BB или OX40. В некоторых вариантах осуществления костимуляторный сигнальный домен получают из

CD28 или 4–1BB, и он содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 365–368, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению к SEQ ID NO: 365–368 и сохраняющую активность при костимуляторной передаче сигнала в Т–клетках. В некоторых вариантах осуществления CAR–родственные трансмембранные иммуномодулирующие белки по изобретению имеют признаки CAR для стимуляции передачи сигнала в Т–клетках после связывания аффинно–модифицированного домена IgSF с когнатным партнером по связыванию или противоструктурой. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание аффинно–модифицированного домена IgSF и его противоструктуры может приводить к изменениям иммунологической активности Т–клеток, что отражают изменения цитотоксичности, пролиферации или продукции цитокинов.

[0455] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок не содержит эндодомен, который может опосредовать цитоплазматическую передачу сигнала. В некоторых вариантах осуществления в трансмембранном иммуномодулирующем белке отсутствует механизм передачи сигнала полипептида дикого типа или немодифицированного полипептида, и, таким образом, он сам не индуцирует передачу сигнала в клетке. В некоторых вариантах осуществления в трансмембранном иммуномодулирующем белке отсутствует внутриклеточный (цитоплазматический) домен или часть внутриклеточного домена соответствующего полипептида дикого типа или немодифицированного полипептида, такой как цитоплазматический сигнальный домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 (см. таблицу 2). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок не содержит ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив), например, содержащийся в некоторых ингибиторных рецепторах, включая ингибиторные рецепторы семейства IgSF (например, PD–1 или TIGIT). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный иммуномодулирующий белок содержит только эктодомен и трансмембранный домен, такой как любой из описанных эктодоменов и трансмембранных доменов.

2. Секретируемые иммуномодулирующие белки и сконструированные клетки

[0456] В некоторых вариантах осуществления вариант иммуномодулирующего полипептида CD80, содержащий любые одну или более мутаций аминокислот, как представлено в настоящем описании, является секретируемым, например, при экспрессии в клетке. Такой вариант иммуномодулирующего белка CD80 не содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления вариант иммуномодулирующего белка CD80 не конъюгируют с увеличивающим время полужизни функциональным фрагментом (таким как Fc–домен или домен мультимеризации). В

некоторых вариантах осуществления вариант иммуномодулирующего белка CD80 содержит сигнальный пептид, например, сигнальный пептид антитела или другую эффективную сигнальную последовательность, для выведения доменов из клетки. Если иммуномодулирующий белок содержит сигнальный пептид и экспрессируется сконструированной клеткой, сигнальный пептид приводит к тому, что сконструированная клетка секретирует иммуномодулирующий белок. Как правило, сигнальный пептид или часть сигнального пептида отщепляется от иммуномодулирующего белка при секреции. Иммуномодулирующий белок может кодироваться нуклеиновой кислотой (которая может являться частью экспрессирующего вектора). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок экспрессируется и секретируется клеткой (такой как иммунная клетка, например, первичная иммунная клетка).

[0457] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вариантам иммуномодулирующих белков CD80, дополнительно содержащим сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант иммуномодулирующего белка CD80, функционально связанный с секреторной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид.

[0458] Сигнальный пептид является последовательностью на N–конце иммуномодулирующего белка, представляющей собой сигнал секреции иммуномодулирующего белка из клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид составляет от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислот в длину (например, от приблизительно 5 до приблизительно 7, от приблизительно 7 до приблизительно 10, от приблизительно 10 до приблизительно 15, от приблизительно 15 до приблизительно 20, от приблизительно 20 до приблизительно 25 или от приблизительно 25 до приблизительно 30, от приблизительно 30 до приблизительно 35 или от приблизительно 35 до приблизительно 40 аминокислот в длину).

[0459] В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является нативным сигнальным пептидом из соответствующего CD80 дикого типа (см. таблицу 2). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является ненативным сигнальным пептидом. Например, в некоторых вариантах осуществления ненативный сигнальный пептид является мутантным нативным сигнальным пептидом из соответствующего CD80 дикого типа и может включать одну или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более) замен, инсерций или делеций. В некоторых вариантах осуществления ненативный сигнальный пептид является сигнальным пептидом или его мутантом из члена того же семейства IgSF, что и член семейства IgSF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления ненативный сигнальный пептид является сигнальным пептидом или его мутантом из члена семейства IgSF из иного семейства IgSF, чем член семейства IgSF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является сигнальным пептидом или его мутантом из семейства белков, не являющегося IgSF, таким как сигнальный пептид иммуноглобулина (такого как тяжелая

цепь IgG или легкая каппа–цепь IgG), цитокина (такого как интерлейкин–2 (ИЛ–2) или CD33), сывороточного альбумина (например, HSA или альбумина), сигнальной последовательности белка–предшественника азуроцидина человека, люциферазы, трипсиногена (например, химотрипсиногена или трипсиногена) или другой сигнальный пептид, который эффективно может приводить к секреции белка из клетки. Примеры сигнальных пептидов включают любые пептиды, описанные в таблице 9.

ТАБЛИЦА 9. Примеры сигнальных пептидов

SEQ ID NO	**Сигнальный пептид**	**Последовательность пептида**
SEQ ID NO: 311	Сигнальный пептид HSA	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 312	Легкая каппа–цепь Ig	MDMRAPAGIFGFLLVLFPGY RS
SEQ ID NO: 313	Сигнальная последовательность белка–предшественника азуроцидина человека	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 314	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 315	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 316	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 317	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 318	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRFLFVVAAATGVQS
SEQ ID NO: 319	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 310	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 311	Сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDLLHKNMKHLWFFLLLVA APRWVLS
SEQ ID NO: 312	Сигнальные последовательности легкой каппа–цепи IgG	MDMRVPAQLLGLLLLWLSG ARC
SEQ ID NO: 313	Сигнальные последовательности легкой	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPA MA

	каппа–цепи IgG	
SEQ ID NO: 314	Люцифераза Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 315	Альбумин человека	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 316	Химотрипсиноген человека	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 317	Интерлейкин–2 человека	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO: 318	Трипсиноген–2 человека	MNLLLILTFVAAAVA

[0460] В некоторых вариантах осуществления секретируемого варианта иммуномодулирующего белка CD80 иммуномодулирующий белок при экспрессии содержит сигнальный пептид, и сигнальный пептид (или его часть) отщепляется от иммуномодулирующего белка после секреции.

[0461] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют варианты полипептидов CD80, секретирующиеся из клетки. В некоторых вариантах осуществления такой вариант полипептида CD80 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуномодулирующий белок под функциональным контролем сигнальной последовательности для секреции. В некоторых вариантах осуществления кодируемый иммуномодулирующий белок секретируется при экспрессии из клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, не содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, не содержит увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент (такой как Fc–домен или домен мультимеризации). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота по изобретению дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую секреторный или сигнальный пептид, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей иммуномодулирующий белок, таким образом, делая возможной секрецию иммуномодулирующего белка.

3. КЛЕТКИ И КОНСТРУИРОВАНИЕ КЛЕТОК

[0462] Настоящее изобретение относится к сконструированным клеткам, экспрессирующим любой из иммуномодулирующих полипептидов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют на своей поверхности любой из трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки экспрессируют и могут секретировать иммуномодулирующий белок в условиях, подходящих для секреции белка. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок экспрессируется на лимфоците, таком как инфильтрирующие опухоль лимфоцит (TIL), Т–клетка или NK–клетка, или на миелоидной клетке. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются антигенпрезентирующими клетками (АПК). В некоторых вариантах осуществления

сконструированные клетки являются сконструированными Т–клетками млекопитающего или сконструированными антигенпрезентирующими клетками (АПК) млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т–клетки или АПК являются клетками человека или мыши.

[0463] В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т–клетки включают, в качестве неограничивающих примеров, Т–хелперную клетку, цитотоксическую Т–клетку (альтернативно, цитотоксический Т–лимфоцит или CTL), NKT–клетку, регуляторную Т–клетку, Т–клетку памяти или гамма–дельта–Т–клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т–клетки являются CD4+ или CD8+. В дополнение к сигналу МНС, сконструированным Т–клеткам также необходим костимуляторный сигнал. В некоторых вариантах осуществления сконструированные Т–клетки также можно модулировать посредством ингибиторных сигналов, в некоторых случаях, обеспечиваемых вариантом трансмембранного иммуномодулирующего полипептида CD80, экспрессирующимся в мембраносвязанной форме, как описано выше.

[0464] В некоторых вариантах осуществления сконструированные АПК включают, например, АПК, экспрессирующие МНС II, такие как макрофаги, В–клетки и дендритные клетки, а также искусственные АПК (aAPC), включая клеточные и бесклеточные (например, биодеградируемые полимерные микрочастицы) aAPC. Искусственные АПК (aAPC) являются синтетическими версиями АПК, которые могут действовать аналогично АПК в том, что они презентируют антигены Т–клеткам, а также активируют их. Презентирование антигенов осуществляет МНС (класса I или класса II). В некоторых вариантах осуществления в сконструированных АПК, таких как aAPC, антиген, нагруженный на МНС, в некоторых вариантах осуществления является опухолеспецифическим антигеном или опухоле–ассоциированным антигеном. Антиген, нагруженный на МНС, распознается Т–клеточным рецептором (TCR) Т–клетки, которая в некоторых случаях может экспрессировать CTLA–4, CD28, PD–L1 или другие молекулы, распознаваемые вариантами полипептидов CD80, представленными в настоящем описании. Материалы, которые можно использовать для конструирования aAPC, включают поли(гликолевую кислоту), сополимер молочной и гликолевой кислот, оксид железа, липосомы, липидные бислои, сефарозу и полистирол.

[0465] В некоторых вариантах осуществления клеточные aAPC можно конструировать так, чтобы они содержали агониста TIP и TCR, которого используют в адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления клеточные aAPC можно конструировать так, чтобы они содержали агониста TIP и TCR, которого используют в экспансии ex vivo Т–клеток человека, например, перед введением, например, для обратного введения пациенту. В некоторых аспектах aAPC могут включать экспрессию по меньшей мере одного клона антитела против CD3, например, OKT3 и/или UCHT1. В некоторых аспектах aAPC можно инактивировать (например, облучать). В некоторых вариантах осуществления TIP может включать любой вариант домена IgSF, демонстрирующий аффинность связывания с когнатным партнером по связыванию на Т–

клетке.

[0466] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, такой как трансмембранный иммуномодулирующий белок или секретируемый иммуномодулирующий белок, коэкспрессируют или конструируют в клетке, экспрессирующей антигенсвязывающий рецептор, такой как рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т–клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, такая как сконструированная Т–клетка, распознает желаемый антиген, ассоциированный со злокачественным новообразованием, воспалительными и аутоиммунными нарушениями или вирусной инфекцией. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий рецептор содержит антигенсвязывающий функциональный фрагмент, специфически связывающийся с опухолеспецифическим антигеном или опухоле–ассоциированным антигеном. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т–клетка является CAR (химерный антигенный рецептор) Т–клеткой, содержащей антигенсвязывающий домен (например, scFv), специфически связывающийся с антигеном, таким как опухолеспецифический антиген или опухоле–ассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления белок TIP экспрессируется в сконструированной клетке с Т–клеточным рецептором или сконструированной клетке с химерным антигенным рецептором. В таких вариантах осуществления сконструированная клетка коэкспрессирует TIP и CAR или TCR. В некоторых вариантах осуществления белок SIP экспрессируется в сконструированной клетке с Т–клеточным рецептором или сконструированной клетке с химерным антигенным рецептором. В таких вариантах осуществления сконструированная клетка коэкспрессирует SIP и CAR или TCR.

[0467] Химерные антигенные рецепторы (CAR) являются рекомбинантными рецепторами, включающими антигенсвязывающий домен (эктодомен), трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область (эндодомен), которая может индуцировать или опосредовать сигнал активации для Т–клетки после связывания антигена. В некоторых примерах CAR–экспрессирующие клетки конструируют так, чтобы они экспрессировали внеклеточный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) со специфичностью к конкретному опухолевому антигену, соединенный с внутриклеточной сигнальной частью, содержащей активирующий домен и, в некоторых случаях костимуляторный домен. Костимуляторный домен можно получать из, например, CD28, OX–40, 4–1BB/CD137, индуцибельного Т–клеточного костимулятора (ICOS). Активирующий домен можно получать из, например, CD3, такого как CD3–дзета, –эпсилон, –дельта, –гамма или т.п. В определенных вариантах осуществления CAR конструируют так, чтобы он содержал два, три, четыре или более костимуляторных домена. scFv CAR можно конструировать так, чтобы он направленно воздействовал на антиген, экспрессирующийся на клетке, ассоциированной с заболеванием или состоянием, например, опухолевый антиген, такой как, например, CD19, являющийся

трансмембранным белком, экспрессируемым клетками линии В–клеток, включая все нормальные В–клетки и В–клеточные злокачественные новообразования, включая, в качестве неограничивающих примеров NHL, CLL и не–Т–клеточный ALL. Примеры способов терапии и конструкций CAR+ Т–клеток описаны в патентных публикациях США №№ 2013/0287748, 2014/0227237, 2014/0099309 и 2014/0050708, включенных в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

[0468] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, таким как одноцепочечный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антиген экспрессируется на опухолевой или злокачественной клетке. Примером антигена является CD19. Примером CAR является CAR против CD19, такой как CAR, содержащий scFv против CD19, приведенный в SEQ ID NO: 363. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен или область содержащий сигнальный домен ITAM, такой как сигнальный домен CD3–дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает костимуляторный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления спейсер и трансмембранный домен представляют собой шарнирный и трансмембранный домен, полученный из CD8, например, содержащий пример последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 332, 364, 1997, или аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 332, 364, 1997. В некоторых вариантах осуществления эндодомен содержит сигнальный домен CD3–дзета. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3–дзета содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 333, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 333 и сохраняющую активность передачи сигнала в Т–клетке. В некоторых вариантах осуществления эндодомен CAR может дополнительно содержать костимуляторный сигнальный домен или область для дополнительной модуляции иммуномодулирующих ответов Т–клетки. В некоторых вариантах осуществления костимуляторный сигнальный домен представляет собой или содержит костимуляторную область CD28, ICOS, 41BB или OX40, или его получают из костимуляторной области CD28, ICOS, 41BB или OX40. В некоторых вариантах осуществления костимуляторный сигнальный домен получают из CD28 или 4–1BB, и он содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 365–368, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 365–368 и сохраняющую активность костимуляторной передачи сигнала в Т–клетке.

[0469] В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая CAR,

дополнительно кодирует второй белок, такой как маркер, например, детектируемый белок, отделенный от CAR саморасщепляющейся пептидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющаяся пептидная последовательность представляет собой саморасщепляющийся пептид F2A, T2A, E2A или P2A. Примеры последовательностей саморасщепляющегося пептида T2A приведены в любой из SEQ ID NO: 369, 2004, 2008 или являются аминокислотной последовательностью, демонстрирующей по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 369, 2004, 2008. В некоторых вариантах осуществления T2A кодирует нуклеотидная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 2008, или последовательность, демонстрирующая по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 2008. Пример последовательности саморасщепляющегося пептида P2A приведен в SEQ ID NO: 2038 или является аминокислотной последовательностью, демонстрирующей по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 3032. В некоторых случаях, если конструкция нуклеиновой кислоты кодирует несколько саморасщепляющихся пептидов P2A (таких как P2A1 и P2A2), в которых каждая из нуклеотидных последовательностей P2A1 и P2A2 кодирует P2A, приведенный в SEQ ID NO: 3032, их нуклеотидные последовательности могут отличаться во избежание рекомбинации между последовательностями.

[0470] В некоторых вариантах осуществления маркер является детектируемым белком, таким как флуоресцентный белок, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP) или синий флуоресцентный белок (BFP). Примеры последовательностей флуоресцентного белкового маркера приведены в SEQ ID NO: 370, 2003, 3033–3035 или являются аминокислотной последовательностью, демонстрирующей по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 370, 2003, 3033–3035.

[0471] В некоторых вариантах осуществления CAR имеет аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 360, 371, 372, 373, 1998, 1999, 2001, 2002, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 360, 371, 372, 373, 1998, 1999, 2001, 2002. В некоторых вариантах осуществления CAR кодирует нуклеотидная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 2000 или 2006, или аминокислотная последовательность, демонстрирующая по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 2000 или 2006.

[0472] В другом варианте осуществления сконструированная Т–клетка содержит

TCR, включая рекомбинантный или сконструированный TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR может являться нативным TCR. Специалистам в этой области будет понятно, что, как правило, нативные Т–клеточные рецепторы млекопитающего содержат альфа– и бета–цепь (или гамма– и дельта–цепь), участвующие в специфическом распознавании и связывании антигена. В некоторых вариантах осуществления TCR является сконструированным TCR, подвергнутым модификации. В некоторых вариантах осуществления TCR сконструированной Т–клетки специфически связывается с опухоле–ассоциированным или опухолеспецифическим антигеном, презентируемым на АПК.

[0473] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие полипептиды, такие как трансмембранные иммуномодулирующие полипептиды или секретируемые иммуномодулирующие полипептиды, можно встраивать в сконструированные клетки, такие как сконструированные Т–клетки или сконструированные АПК, с помощью различных стратегий, таких как стратегии, используемые для рекомбинантных клеток–хозяев. В этой области известны различные способы встраивания конструкции ДНК в первичные Т–клетки. В некоторых вариантах осуществления используют вирусную трансдукцию или электропорацию с плазмидами. В типичных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующий белок, или экспрессирующий вектор содержит сигнальный пептид, локализующий экспрессирующиеся трансмембранные иммуномодулирующие белки к клеточной мембране или для секреции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок по изобретению, субклонируют в вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, делающий возможной экспрессию в клетке–хозяине млекопитающего. Экспрессирующий вектор можно встраивать в клетку–хозяина млекопитающего, и в условиях культивирования клетки–хозяина иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности или секретируется.

[0474] В одном из примеров первичные Т–клетки можно очищать ex vivo (CD4 клетки, или CD8 клетки, или и те, и другие) и стимулировать способом активации, состоящим из различных агонистов TCR/CD28, таких как бусы, покрытые антителами против CD3/против CD28. Через 2 или 3 дня активации рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий иммуномодулирующий полипептид, можно стабильно встраивать в первичные Т–клетки известными в этой области способами лентивирусной или ретровирусной трансдукции или электропорации с плазмидами. Клетки можно подвергать мониторингу на экспрессию иммуномодулирующего полипептида посредством, например, проточной цитометрии с использованием антиэпитопной метки или антител, перекрестно реагирующих с нативной родительской молекулой и полипептидами, содержащими вариант CD80. Т–клетки, экспрессирующие иммуномодулирующий полипептид, можно обогащать посредством сортировки с использованием антиэпитопной метки и антител или обогащать по высокой или низкой экспрессии в зависимости от применения.

[0475] После экспрессии иммуномодулирующего полипептида сконструированную Т–клетку можно оценивать на соответствующую функцию различными способами. Можно валидировать коэкспрессию сконструированных CAR или TCR для демонстрации того, что эта часть сконструированной Т–клетки не подвергнута значительному влиянию при экспрессии иммуномодулирующего белка. После валидации для оценки функции сконструированных Т–клеток можно использовать стандартные анализы in vitro цитотоксичности, пролиферации или цитокинов (например, экспрессии ИФН–гамма). Примерами стандартных конечных точек являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферации сконструированных Т–клеток или экспрессии белка ИФН–гамма в супернатантах культур. Можно выбирать конструкцию, приводящую к статистически значимому повышению лизиса опухолевой линии, повышению пролиферации сконструированных Т–клеток или повышению экспрессии ИФН–гамма по сравнению с контрольной конструкцией. Кроме того, несконструированные Т–клетки, такие как нативные первичные или эндогенные Т–клетки, также можно включать в тот же анализ in vitro для измерения способности конструкции иммуномодулирующего полипептида экспрессироваться на сконструированных клетках, таких как сконструированные Т–клетки, для модуляции активности, включая, в некоторых случаях, активацию и осуществление эффекторной функции в фоновых, нативных Т–клетках. Можно осуществлять мониторинг повышенной экспрессии маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD62L, на эндогенных Т–клетках, и повышенная пролиферация и/или продукция цитокинов может свидетельствовать о желаемой активности иммуномодулирующего белка, экспрессирующегося на сконструированных Т–клетках.

[0476] В некоторых вариантах осуществления схожие анализы можно использовать для сравнения функции сконструированных Т–клеток, содержащих CAR или TCR в отдельности, с клетками, содержащими конструкцию CAR или TCR и TIP. Как правило, эти анализы in vitro осуществляют посредством высевания сконструированных Т–клеток и линии "опухолевых" клеток, содержащих когнатный антиген CAR или TCR, в различных соотношениях вместе в культуре. Стандартными конечными точками являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферация сконструированных Т–клеток или продукция ИФН–гамма в супернатантах культур. Можно выбирать сконструированный иммуномодулирующий белок, приводящий к статистически значимому повышению лизиса опухолевой линии, повышенной пролиферации сконструированных Т–клеток или повышению продукции ИФН–гамма по сравнению с той же конструкцией TCR или CAR в отдельности. Сконструированные Т–клетки человека можно анализировать с использованием иммунокомпрометированных мышей, подобных линии NSG, у которой отсутствуют Т–, NK– и В–клетки мыши. Сконструированные Т–клетки человека, в которых CAR или TCR связывается с противоструктурой–мишенью на ксенотрансплантате и коэкспрессируются с аффинно–модифицированным доменом IgSF TIP, можно подвергать адоптивному переносу in vivo с использованием иных количеств и соотношений клеток по сравнению с ксенотрансплантатом. Например, можно

осуществлять мониторинг приживления линий CD19+ лейкозных опухолей, содержащих вектор с люциферазой/GFP, посредством биолюминесценции или ex vivo посредством проточной цитометрии. В типичном варианте осуществления в модель на мыши вводят ксенотрансплантат, а через несколько дней сконструированные Т–клетки. Сконструированные Т–клетки, содержащие иммуномодулирующий белок, можно анализировать на повышенное выживание, клиренс опухоли или повышение количества сконструированных Т–клеток относительно сконструированных Т–клеток, содержащих CAR или TCR в отдельности. Как и в анализе in vitro, эндогенные, нативные (т.е. несконструированные) Т–клетки человека можно подвергать адоптивному переносу для поиска подходящего эпитопа, распространенного в популяции, что приводит к лучшему выживанию или клиренсу опухоли.

E. Возбудители инфекции, экспрессирующие варианты полипептидов и иммуномодулирующие белки

[0477] Настоящее изобретение также относится к возбудителям инфекции, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие любые из вариантов полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления с помощью таких возбудителей инфекции можно доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты иммуномодулирующих полипептидов, представленные в настоящем описании, такие как полипептиды vIgD CD80, в клетку–мишень индивидуума, например, иммунную клетку, и/или антигенпрезентирующую клетку (АПК), или опухолевую клетку индивидуума. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, содержащимся в таких возбудителях инфекции, и/или нуклеиновым кислотам для получения или модификации таких возбудителей инфекции, таким как векторы и/или плазмиды, и композициям, содержащим такие возбудители инфекции.

[0478] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является микроорганизмом. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является вирусом или бактерией. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является вирусом. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является бактерией. В некоторых вариантах осуществления с помощью таких возбудителей инфекции можно доставлять последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие любые из вариантов полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетку индивидуума, инфицированную или приведенную в контакт с возбудителями инфекции, можно делать экспрессирующей варианты иммуномодулирующих полипептидов на поверхности клетки или секретирующей их. В некоторых вариантах осуществления с помощью возбудителя инфекции также можно доставлять одно или более других терапевтических средств или нуклеиновых кислот, кодирующих другие терапевтические

средства, в клетку и/или окружение в организме индивидуума. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические средства, которые можно доставлять с помощью возбудителей инфекции, включают цитокины или другие иммуномодулирующие молекулы.

[0479] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции, например, вирус или бактерии, содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие любые из вариантов полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, и в результате контакта с клеткой и/или ее инфицирования в организме индивидуума клетка экспрессирует варианты полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты, содержащимися в возбудителе инфекции. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции можно вводить индивидууму. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции можно приводить в контакт с клетками индивидуума ex vivo.

[0480] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая трансмембранные иммуномодулирующие белки, экспрессируемые клеткой, инфицированной возбудителем инфекции, является трансмембранным белком и экспрессируется на поверхности. В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая секретируемые иммуномодулирующие белки, экспрессируемые клеткой, инфицированной возбудителем инфекции, экспрессируется и секретируется клеткой. Трансмембранный иммуномодулирующий белок или секретируемый иммуномодулирующий белок может являться любым из представленных в настоящем описании.

[0481] В некоторых вариантах осуществления клетки в организме индивидуума, на которые направленно воздействуют с помощью возбудителя инфекции, включают опухолевую клетку, иммунную клетку и/или антигенпрезентирующую клетку (АПК). В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции направленно воздействуют на клетку в микроокружении опухоли (TME). В некоторых вариантах осуществления с помощью возбудителя инфекции доставляют нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты полипептидов, такие как полипептиды vIgD CD80, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, в соответствующую клетку (например, АПК, такую как клетка, экспонирующая комплекс пептид/MHC на своей поверхности, такая как дендритная клетка), или ткань (например, лимфоидную ткань), что будет индуцировать и/или повышать желаемый эффект, например, иммуномодуляцию и/или специфический клеточно–опосредованный иммунный ответ, например, CD4 и/или CD8 Т–клеточный ответ, где CD8 Т–клеточный ответ может включать ответ цитотоксических Т–клеток (CTL). В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции направленно действует на АПК, такую как дендритная клетка (DC). В некоторых вариантах

осуществления молекула нуклеиновой кислоты, доставляемая с помощью возбудителей инфекции, представленных в настоящем описании, включает соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанных кодирующих последовательностей, кодирующих варианты иммуномодулирующих полипептидов, в конкретной клетке–мишени, например, регуляторных элементах, таких как промоторы.

[0482] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции, содержащий последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие иммуномодулирующие полипептиды, также могут содержать последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие один или более дополнительных продуктов генов, например, цитокинов, преобразующих пролекарство ферментов, цитотоксинов и/или детектируемых продуктов генов. Например, в некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является онколитическим вирусом, и вирус может включать последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие дополнительные терапевтические продукты генов (см., например, Kirn et al., (2009) Nat Rev Cancer 9:64–71; Garcia–Aragoncillo et al., (2010) Curr Opin Mol Ther 12:403–411; см. патенты США №№ 7588767, 7588771, 7662398 и 7754221 и патентные публикации США №№ 2007/0202572, 2007/0212727, 2010/0062016, 2009/0098529, 2009/0053244, 2009/0155287, 2009/0117034, 2010/0233078, 2009/0162288, 2010/0196325, 2009/0136917 и 2011/0064650. В некоторых вариантах осуществления дополнительный продукт гена может являться терапевтическим продуктом гена, который может приводить к гибели клетки–мишени (например, опухолевой клетки), или продуктами генов, которые могут повышать, или усиливать, или регулировать иммунный ответ (например, цитокин). Примеры продуктов генов также включают противоопухолевое средство, антиметастатическое средство, антиангиогенное средство, иммуномодулирующую молекулу, ингибитор иммунных контрольных точек, антитело, цитокин, фактор роста, антиген, цитотоксический продукт гена, проапоптотический продукт гена, антиапоптотический продукт гена, ген дегенерации клеточного матрикса, гены регенерации ткани или перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные и другие гены, представленные в настоящем описании или известные специалисту в этой области. В некоторых вариантах осуществления дополнительный продукт гена является гранулоцитарно–макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ–КСФ).

1. Вирусы

[0483] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является вирусом. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является онколитическим вирусом или вирусом, направленно воздействующим на конкретные клетки, например, иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции направленно воздействует на опухолевую клетку и/или злокачественную клетку индивидуума. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции направленно воздействует на иммунную клетку или антигенпрезентирующую клетку (АПК).

[0484] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является онколитическим вирусом. Онколитические вирусы являются вирусами, накапливающимися в опухолевых клетках и реплицирующимися в опухолевых клетках. Благодаря репликации в клетках и необязательной доставке нуклеиновых кислот, кодирующих варианты иммуномодулирующих вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующих белков, представленных в настоящем описании, опухолевые клетки лизируются, и опухоль уменьшается и может подвергаться элиминации. Онколитические вирусы также могут иметь широкий диапазон типов хозяев и клеток. Например, онколитические вирусы могут накапливаться в иммунопривилегированных клетках или иммунопривилегированных тканях, включая опухоли и/или метастазы, также включая поврежденные ткани и клетки, что, таким образом, делает возможной доставку и экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих варианты иммуномодулирующих полипептидов, представленные в настоящем описании, в широком диапазоне типов клеток. Онколитические вирусы также могут реплицироваться в опухолевой клетке специфическим образом, что приводит к лизису опухолевых клеток и эффективной регрессии опухоли.

[0485] Примеры онколитических вирусов включают аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус простого герпеса, реовирус, вирус псевдочумы птиц, парвовирус, вирус кори, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус Коксаки и вирус осповакцины. В некоторых вариантах осуществления онколитические вирусы могут специфически колонизировать солидные опухоли, не инфицируя другие органы, и их можно использовать в качестве возбудителя инфекции для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих варианты иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящем описании, в такие солидные опухоли.

[0486] Онколитические вирусы для использования в доставке нуклеиновых кислот, кодирующих варианты полипептидов CD80 или иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, могут являться любыми из онколитических вирусов, известных специалисту в этой области, и включают, например, вирус везикулярного стоматита, см., например, патенты США №№ 7731974, 7153510, 6653103 и патентные публикации США №№ 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 20050260601, 20050220818 и европейские патенты №№ 1385466, 1606411 и 1520175; вирус простого герпеса, см., например, патенты США №№ 7897146, 7731952, 7550296, 7537924, 6723316, 6428968 и патентные публикации США. №№ 2014/0154216, 2011/0177032, 2011/0158948, 2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894, 2004/0009604, 2004/0063094, международные патентные публикации №№ WO 2007/052029, WO 1999/038955; ретровирусы, см., например, патенты США №№ 6689871, 6635472, 5851529, 5716826, 5716613 и патентную публикацию США. № 2011/0212530; вирусы осповакцины, см., например, 2016/0339066, и аденоассоциированные вирусы, см., например, патенты США №№ 8007780, 7968340, 7943374, 7906111, 7927585, 7811814, 7662627, 7241447, 7238526, 7172893, 7033826,

7001765, 6897045 и 6632670.

[0487] Онколитические вирусы также включают вирусы, подвергнутые генетическому изменению для аттенуации их вирулентности, для улучшения их профиля безопасности, повышения опухолевой эффективности, и в них также включают дополнительные гены, например цитотоксины, цитокины, преобразующие пролекарства ферменты для улучшения общей эффективности вирусов (см., например, Kirn et al., (2009) Nat Rev Cancer 9:64–71; Garcia–Aragoncillo et al., (2010) Curr Opin Mol Ther 12:403–411; см. патенты США №№ 7588767, 7588771, 7662398 и 7754221 и патентные публикации США №№ 2007/0202572, 2007/0212727, 2010/0062016, 2009/0098529, 2009/0053244, 2009/0155287, 2009/0117034, 2010/0233078, 2009/0162288, 2010/0196325, 2009/0136917 и 2011/0064650. В некоторых вариантах осуществления онколитические вирусы могут являться вирусами, модифицированными таким образом, что они селективно реплицируются в злокачественных клетках и, таким образом, являются онколитическими. Например, онколитический вирус является аденовирусом, сконструированным так, чтобы иметь модифицированный тропизм для опухолевой терапии, и также в качестве векторов для генной терапии. Их примерами являются ONYX–015, H101 и Ad5ΔCR (Hallden and Portella (2012) Expert Opin Ther Targets, 16:945–58) и TNFerade (McLoughlin et al. (2005) Ann. Surg. Oncol., 12:825–30) или условно–репликативный аденовирус Oncorine®.

[0488] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является модифицированным вирусом простого герпеса. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является модифицированной версией Talimogene laherparepvec (также известного как T–Vec, Imlygic или OncoVex GM–CSF), модифицированной так, что она содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие любые из вариантов иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящем описании, таких как любые из вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующих белков, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является модифицированным вирусом простого герпеса, описанным, например, в WO 2007/052029, WO 1999/038955, US 2004/0063094, US 2014/0154216, или его вариантами.

[0489] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является вирусом, направленно воздействующим на конкретный тип клеток индивидуума, которому вводят вирус, например, вирус, направленно воздействующий на иммунные клетки или антигенпрезентирующие клетки (АПК). Дендритные клетки (DC) являются основными АПК для инициации и контроля иммунного ответа. DC могут захватывать и процессировать антигены, мигрировать с периферии в лимфоидные органы и презентировать антигены покоящимся Т–клеткам с рестрикцией по главному комплексу гистосовместимости (MHC). В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является вирусом, который может специфически направленно воздействовать на DC для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих варианты полипептидов CD80 или иммуномодулирующие белки для экспрессии в DC. В некоторых вариантах

осуществления вирус является лентивирусом или его вариантом или производным, таким как лентивирусные векторы, неспособные к интеграции в геном. В некоторых вариантах осуществления вирус является лентивирусом, псевдотипированным для эффективного связывания и продуктивного инфицирования клеток, экспрессирующих поверхностный клеточный маркер, молекулу межклеточной адгезии дендритных клеток 3–захватывающего не–интегрина (DC–SIGN), таких как DC. В некоторых вариантах осуществления вирус является лентивирусом, псевдотипированным с использованием гликопротеина E2 вируса Синдбис или его модифицированной формы, такой, как описано в WO 2013/149167. В некоторых вариантах осуществления вирус делает возможной доставку и экспрессию интересующей последовательности (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей любые из вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующих белков, представленных в настоящем описании) в DC. В некоторых вариантах осуществления вирус включает вирусы, описанные в WO 2008/011636 или US 2011/0064763, Tareen et al. (2014) Mol. Ther., 22:575–587, или их варианты. Примером платформы вектора, тропного к дендритным клеткам, является ZVex™.

2. Бактерии

[0490] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является бактерией. Например, в некоторых вариантах осуществления с помощью бактерий можно доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие любые из вариантов иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящем описании, например, вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, в клетку–мишень в организме индивидуума, такую как опухолевая клетка, иммунная клетка, антигенпрезентирующая клетка и/или фагоцитирующая клетка. В некоторых вариантах осуществления бактерия может быть преимущественно нацелена на специфическое окружение в организме индивидуума, такое как микроокружение опухоли (TME), для экспрессии и/или секреции вариантов иммуномодулирующих полипептидов и/или для направленного воздействия на конкретные клетки в окружении для экспрессии вариантов иммуномодулирующих полипептидов.

[0491] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты в клетки доставляют с помощью бактерии посредством бактериально–опосредованного переноса плазмидной ДНК в клетки млекопитающих (также обозначаемый как "бактофекция"). Например, в некоторых вариантах осуществления доставки генетического материала достигают посредством введения целой бактерии в клетки–мишени. В некоторых вариантах осуществления спонтанный или индуцированный лизис бактерий может приводить к высвобождению плазмиды с последующей экспрессией в эукариотических клетках. В некоторых вариантах осуществления с помощью бактерии можно доставлять нуклеиновые кислоты в нефагоцитирующие клетки млекопитающих (например, опухолевые клетки) и/или фагоцитирующие клетки, например, некоторые иммунные клетки и/или АПК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты,

доставляемые с помощью бактерии, могут транспортироваться в ядро клетки индивидуума для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты также включают соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для экспрессии функционально связанных последовательностей, кодирующих варианты иммуномодулирующих полипептидов, в конкретной клетке–хозяине, например, регуляторные элементы, такие как промоторы или энхансеры. В некоторых вариантах осуществления с помощью возбудителя инфекции, являющегося бактерией, можно доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуномодулирующие белки, в форме РНК, такой как готовая трансляционно–компетентная РНК, доставляемая в цитоплазму клетки–мишени для трансляции клеточным аппаратом клетки–мишени.

[0492] В некоторых вариантах осуществления бактерия может размножаться и лизировать клетки–мишени, например, опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления бактерия может содержать и/или высвобождать последовательности нуклеиновой кислоты и/или продукты генов в цитоплазме клеток–мишеней, таким образом, уничтожая клетку–мишень, например, опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является бактерией, которая может размножаться специфически в конкретном окружении в организме индивидуума, например, микроокружении опухоли (TME). Например, в некоторых вариантах осуществления бактерия может размножаться специфически в анаэробном или гипоксическом микроокружении. В некоторых вариантах осуществления условия или факторы, присутствующие в конкретном окружении, например, аспартат, серин, цитрат, рибоза или галактоза, продуцируемые клетками в TME, могут действовать в качестве хемоаттрактантов для привлечения бактерии к окружению. В некоторых вариантах осуществления бактерия может экспрессировать и/или секретировать иммуномодулирующие белки, представленные в настоящем описании, в окружении, например, TME.

[0493] В некоторых вариантах осуществления возбудитель инфекции является бактерией, являющейся Listeria sp., Bifidobacterium sp., Escherichia sp., Clostridium sp., Salmonella sp., Shigella sp., Vibrio sp. или Yersinia sp. В некоторых вариантах осуществления бактерия выбрана из одной или более из Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Salmonella choleraesuis, Escherichia coli, Vibrio cholera, Clostridium perfringens, Clostridium butyricum, Clostridium novyi, Clostridium acetobutylicum, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum и Bifidobacterium adolescentis. В некоторых вариантах осуществления бактерия является сконструированной бактерией. В некоторых вариантах осуществления бактерия является сконструированной бактерией, такой как бактерии, описанные, например, в Seow and Wood (2009) Molecular Therapy 17(5):767–777; Baban et al. (2010) Bioengineered Bugs 1:6, 385–394; Patyar et al. (2010) J Biomed Sci 17:21; Tangney et al. (2010) Bioengineered Bugs 1:4, 284–287; van Pijkeren et al. (2010) Hum Gene Ther. 21(4):405–416; WO 2012/149364; WO 2014/198002; US 9103831; US 9453227; US 2014/0186401; US 2004/0146488; US 2011/0293705; US 2015/0359909 и EP 3020816.

Бактерию можно модифицировать для доставки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих любые из вариантов иммуномодулирующих полипептидов, конъюгатов и/или слитых белков, представленных в настоящем описании, и/или для экспрессии таких вариантов иммуномодулирующих полипептидов в организме индивидуума.

F. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЛИ КЛЕТОК

[0494] Настоящее изобретение относится к выделенным или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, в совокупности обозначаемым как "нуклеиновые кислоты", кодирующие любые из различных вариантов осуществления вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующих полипептидов по изобретению, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, включая все нуклеиновые кислоты, описанные ниже, можно использовать в рекомбинантном получении (например, экспрессии) вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, включая все нуклеиновые кислоты, описанные ниже, можно использовать в экспрессии вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящем описании, в клетках, таких как сконструированные клетки, например, иммунные клетки, или клетках возбудителя инфекции. Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме РНК или ДНК, и включают мРНК, кРНК, рекомбинантную или синтетическую РНК и ДНК и кДНК. Нуклеиновые кислоты по изобретению, как правило, являются молекулами ДНК и, как правило, двухцепочечными молекулами ДНК. Однако изобретение также относится к одноцепочечной ДНК, одноцепочечной РНК, двухцепочечной РНК и гибридным нуклеиновым кислотам ДНК/РНК или их комбинациям, содержащим любые из нуклеотидных последовательностей по изобретению.

[0495] Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам и рекомбинантным клеткам–хозяевам, которые можно использовать в получении вариантов полипептидов CD80 или иммуномодулирующим полипептидам, представленным в настоящем описании.

[0496] Настоящее изобретение также относится к сконструированным клеткам, таким как сконструированные иммунные клетки, содержащие любые из иммуномодулирующих полипептидов по изобретению, таких как любые из трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов или секретируемых иммуномодулирующих полипептидов.

[0497] Настоящее изобретение также относится к возбудителям инфекции, таким как бактериальные или вирусные клетки, содержащие любые из иммуномодулирующих полипептидов по изобретению, таким как любые из трансмембранных

иммуномодулирующих полипептидов или секретируемых иммуномодулирующих полипептидов.

[0498] В любом из указанных выше вариантов осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуномодулирующие полипептиды, представленные в настоящем описании, можно встраивать в клетки с использованием способов рекомбинантной ДНК и клонирования. Для этого получают рекомбинантную молекулу ДНК, кодирующую иммуномодулирующий полипептид. Способы получения таких молекул ДНК хорошо известны в этой области. Например, последовательности, кодирующие пептиды, можно вырезать из ДНК с использованием подходящих ферментов рестрикции. Альтернативно, молекулу ДНК можно синтезировать способами химического синтеза, такими как фосфорамидитный способ. Также можно использовать комбинацию этих способов. В некоторых случаях рекомбинантную или синтетическую нуклеиновую кислоту можно получать посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления можно получать вставку ДНК, кодирующую один или более вариантов полипептидов CD80, содержащих по меньшей мере один аффинно–модифицированный домен IgSF и, в некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид, трансмембранный домен и/или эндодомен по изобретению. Эту вставку ДНК можно клонировать в соответствующий вектор для трансдукции/трансфекции, как известно специалистам в этой области. Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты.

[0499] В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы могут экспрессировать иммуномодулирующие белки в соответствующей клетке в условиях, подходящих для экспрессии белка. В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты или экспрессирующий вектор содержит молекулу ДНК, кодирующую иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями для контроля экспрессии. Хорошо известны способы достижения этой функциональной связи до или после инсерции молекулы ДНК в вектор. Последовательности для контроля экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, участки связывания рибосомы, инициаторные сигналы, стоп–сигналы, сигналы кэпирования, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, участвующие в контроле транскрипции или трансляции.

[0500] В некоторых вариантах осуществления экспрессию иммуномодулирующего белка контролируют с помощью промотора или энхансера для контроля или регуляции экспрессии. Промотор функционально связан с частью молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида или иммуномодулирующий белок. В некоторых вариантах осуществления промотор является конститутивно активным промотором (таким как тканеспецифический конститутивно активный промотор или другой конститутивный промотор). В некоторых вариантах осуществления промотор является индуцибельным промотором, который может быть чувствительным к индуцирующему сигналу (такому как сигнал активации Т–клеток).

[0501] В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида или иммуномодулирующий белок. Примеры конститутивных промоторов включают промотор вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина C (UbC) и промотор EF–1 альфа (EF1a). В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор является тканеспецифическим. Например, в некоторых вариантах осуществления промотор делает возможной конститутивную экспрессию иммуномодулирующего белка в конкретных тканях, таких как иммунные клетки, лимфоциты или Т–клетки. Примеры тканеспецифических промоторов описаны в патенте США № 5998205, включая, например, промоторы фетопротеина, DF3, тирозиназы, CEA, белка сурфактанта и ErbB2.

[0502] В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида или иммуномодулирующий белок, таким образом, что экспрессию нуклеиновой кислоты можно контролировать посредством контроля наличия или отсутствия соответствующего индуктора транскрипции. Например, промотор может являться регулируемой экспрессионной системой промотора и фактора транскрипции, такой как описанные тетрациклин–регулируемые системы или другие регулируемые системы (см., например, опубликованную международную заявку PCT № WO 01/30843), делающей возможной регулируемую экспрессию кодируемого полипептида. Примером регулируемой промоторной системы является система Tet–On (и Tet–Off), доступная, например, в Clontech (Palo Alto, CA). Эта промоторная система делает возможной регулируемую экспрессию трансгена, контролируемую с помощью тетрациклина или его производных, таких как доксициклин. Известны другие регулируемые промоторные системы (см., например, опубликованную патентную заявку США № 2002–0168714, названную "Regulation of Gene Expression Using Single–Chain, Monomeric, Ligand Dependent Polypeptide Switches", в которой описывают переключатели генов, содержащие лиганд–связывающие домены и домены регуляции транскрипции, например, из рецепторов гормонов).

[0503] В некоторых вариантах осуществления промотор является чувствительным к элементу, чувствительному к передаче сигнала активации Т–клеток. Исключительно в качестве примера, в некоторых вариантах осуществления сконструированная Т–клетка содержит экспрессирующий вектор, кодирующий иммуномодулирующий белок, и промотор, функционально связанный с контролем экспрессии иммуномодулирующего белка. Сконструированную Т–клетку можно активировать, например, посредством передачи сигнала через сконструированный Т–клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), и, таким образом, запускать экспрессию и секрецию иммуномодулирующего белка с помощью чувствительного промотора.

[0504] В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей

иммуномодулирующий белок таким образом, что иммуномодулирующий белок экспрессируется в ответ на ядерный фактор активированных Т–клеток (NFAT) или ядерный фактор "каппа–би" (NF–κB). Например, в некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор содержит участок связывания для NFAT или NF–κB. Например, в некоторых вариантах осуществления промотор является промотором NFAT или NF–κB или его функциональным вариантом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты позволяют контролировать экспрессию иммуномодулирующего белка, одновременно также снижая или устраняя токсичность иммуномодулирующего белка. В частности, сконструированные иммунные клетки, содержащие нуклеиновые кислоты по изобретению, экспрессируют и секретируют иммуномодулирующий белок, только когда клетку (например, Т–клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), экспрессируемый клеткой) специфически стимулируют антигеном и/или клетку (например, кальциевый путь передачи сигнала в клетке) неспецифически стимулируют, например, форболмиристатацетатом (PMA)/иономицином. Таким образом, экспрессию и, в некоторых случаях, секрецию иммуномодулирующего белка можно контролировать так, чтобы она происходила только когда и где это необходимо (например, в присутствии возбудителя инфекции, злокачественного новообразования или в очаге опухоли), что может помочь снижать или избегать нежелательных взаимодействий иммуномодулирующего белка.

[0505] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, содержит подходящую нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор NFAT, промотор NF–κB или его функциональный вариант. В рамках изобретения термин "промотор NFAT" означает один или более NFAT–чувствительных элементов, соединенных с минимальным промотором. Термин "промотор NF–κB" относится к одному или более NF–κB–чувствительным элементам, соединенным с минимальным промотором. В некоторых вариантах осуществления минимальный промотор гена является минимальным промотором ИЛ–2 человека или промотором CMV. NFAT–чувствительные элементы могут содержать, например, NFAT1–, NFAT2–, NFAT3– и/или NFAT4– чувствительные элементы. Промотор NFAT, промотор NFκB или его функциональный вариант могут содержать любое количество связывающих мотивов, например, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере одиннадцать или до двенадцати связывающих мотивов.

[0506] Получаемый рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий молекулу ДНК, используют для трансформации соответствующего хозяина. Эту трансформацию можно осуществлять способами, хорошо известными в этой области. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, представленная в настоящем

описании, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую секреторный или сигнальный пептид, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей иммуномодулирующий полипептид, таким образом, что получаемый растворимый иммуномодулирующий полипептид выделяют из среды для культивирования, клетки–хозяина или периплазмы клетки–хозяина. В других вариантах осуществления соответствующие сигналы контроля экспрессии выбирают для мембранной экспрессии иммуномодулирующего полипептида. Кроме того, для получения сконструированных клеток или рекомбинантных клеток–хозяев, представленных в настоящем описании, также можно использовать коммерчески доступные наборы и компании, осуществляющие их производство по контракту.

[0507] В некоторых вариантах осуществления получаемый экспрессирующий вектор, содержащий молекулу ДНК, используют для трансформации, такой как трансдукция, соответствующей клетки. Встраивание можно осуществлять способами, хорошо известными в этой области. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, включая вирусную, например, ретровирусную или лентивирусную, трансдукцию, транспозоны и электропорацию. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор является вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту переносят в клетки способами лентивирусной или ретровирусной трансдукции.

[0508] В получении полипептидов или сконструированных клеток можно использовать любые из большого количества общедоступных и хорошо известных клеток–хозяев млекопитающего, включая Т–клетки или АПК млекопитающего. Выбор клетки зависит от ряда факторов, известных в этой области. Они включают, например, совместимость с выбранным экспрессирующим вектором, токсичность пептидов, кодируемых молекулой ДНК, показатель трансформации, простоту выделения пептидов, характеристики экспрессии, биологическую безопасность и затраты. Баланса этих факторов необходимо достигать с пониманием того, что не все клетки могут быть в равной степени эффективными для экспрессии конкретной последовательности ДНК.

[0509] В некоторых вариантах осуществления клетки–хозяева могут представлять собой широкий спектр эукариотических клеток, таких как дрожжевые клетки или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO) или клетки HEK293. В некоторых вариантах осуществления клетка–хозяин представляет собой суспензию клеток, и полипептид конструируют или получают в культивируемой суспензии, такой как культивируемая суспензия клеток CHO, например, клеток CHO–S. В некоторых примерах линия клеток является линией клеток CHO, в которой отсутствует DHFR (DHFR–), такой как DG44 и DUXB11. В некоторых вариантах осуществления в клетке отсутствует глутаминсинтаза (GS), например, клетки CHO–S, клетки CHOK1 SV и клетки CHOZN((R)) GS–/–. В некоторых вариантах осуществления клетки CHO, такие как суспензия клеток CHO, могут являться клетками CHO–S–2H2, клетками CHO–S клона 14 или клетками ExpiCHO–S.

[0510] В некоторых вариантах осуществления клетки–хозяева также могут являться прокариотическими клетками, такими как E. coli. Трансформированные рекомбинантные клетки–хозяева культивируют в условиях экспрессии полипептида, а затем очищают для получения растворимого белка. Рекомбинантные клетки–хозяева можно культивировать в общепринятых условиях ферментации таким образом, что экспрессируются желаемые полипептиды. Такие условия ферментации хорошо известны в этой области. и наконец, полипептиды, представленные в настоящем описании, можно выделять из культуры рекомбинантных клеток и очищать любым из ряда способов, хорошо известных в этой области, включая осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионо– или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию гидрофобных взаимодействий и аффинную хроматографию. Для завершения конфигурации зрелого белка, при желании, можно использовать стадии рефолдинга белка. И наконец, на конечных стадиях очистки можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

[0511] В некоторых вариантах осуществления клетка является иммунной клеткой, такой как любая из иммунных клеток, описанных выше в контексте получения сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления такие сконструированные клетки являются первичными клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются аутологичными для индивидуума. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются аллогенными для индивидуума. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки получают из индивидуума, например, посредством лейкафереза, и трансформируют ex vivo для экспрессии иммуномодулирующего полипептида, например, трансмембранного иммуномодулирующего полипептида или секретируемого иммуномодулирующего полипептида.

[0512] Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любые из вариантов иммуномодулирующих полипептидов, содержащимся в возбудителях инфекции, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления с помощью возбудителей инфекции доставляют нуклеиновые кислоты в клетку в организме индивидуума и/или осуществляют экспрессию кодируемых вариантов полипептидов в клетке. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, используемым для получения или модификации таких возбудителей инфекции. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к векторам и/или плазмидам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты иммуномодулирующих полипептидов, для получения возбудителей инфекции, доставки в клетки в организме индивидуума и/или экспрессии вариантов иммуномодулирующих полипептидов в клетках в организме индивидуума.

[0513] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению являются рекомбинантными вирусными или бактериальными векторами, содержащими последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты

иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы можно использовать для получения возбудителя инфекции, содержащего последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты иммуномодулирующих полипептидов, и/или для доставки в клетку–мишень в организме индивидуума для экспрессии клеткой–мишенью. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор является экспрессирующим вектором. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор включает соответствующие последовательности, необходимые для получения возбудителя инфекции и экспрессии в клетки–мишени.

[0514] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор является плазмидой или космидой. Плазмиду или космиду, содержащую последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты иммуномодулирующих полипептидов, как представлено в настоящем описании, легко конструируют стандартными способами, хорошо известными в этой области. Для получения возбудителя инфекции вектор или геном можно конструировать в плазмидной форме, которой затем можно трансфицировать линию упаковывающих или продуцирующих клеток или бактерию–хозяина. Рекомбинантные векторы можно получать с использованием любых из рекомбинантных способов, известных в этой области. В некоторых вариантах осуществления векторы могут включать прокариотический участок начала репликации и/или ген, экспрессия которого приводит к образованию детектируемого или селективного маркера, такого как маркер резистентности к лекарственному средству, для размножения и/или селекции в прокариотических системах.

[0515] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор является вирусным вектором. Примеры рекомбинантных вирусных векторов включают геном лентивирусного вектора, геном поксвирусного вектора, геном вектора вируса осповакцины, геном аденовирусного вектора, геном вектора аденоассоциированного вируса, геном вектора вируса герпеса и геном вектора альфа–вируса. Вирусные векторы могут быть живыми, аттенуированными, зависимыми от условий репликации или дефектными по репликации, непатогенными (дефектными), репликационно–компетентными вирусными векторами, и/или их можно модифицировать для экспрессии гетерологичного продукта гена, например, вариантов иммуномодулирующих полипептидов, представленных в настоящем описании. Векторы для получения вирусов также можно модифицировать для изменения аттенуации вируса, что включает любой способ повышения или снижения транскрипционной или трансляционной нагрузки.

[0516] Примеры вирусных векторов, которые можно использовать, включают модифицированные векторы вируса осповакцины (см., например, Guerra et al., J. Virol. 80:985–98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8: 1445–47 (1992); Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86:2925–36 (2005); Mayr et al., Infection 3:6–14 (1975); Hu et al., J. Virol. 75: 10300–308 (2001); патенты США №№ 5698530, 6998252, 5443964, 7247615 и 7368116); аденовирусный вектор или векторы аденоассоциированных вирусов (см., например, Molin et al., J. Virol. 72:8358–61 (1998); Narumi et al., Am J. Respir. Cell Mol.

Biol. 19:936–41 (1998); Mercier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188–93 (2004); патенты США №№ 6143290; 6596535; 6855317; 6936257; 7125717; 7378087; 7550296); ретровирусные векторы, включая векторы на основе вирус лейкоза мышей (MuLV), вируса лейкоза гиббонов (GaLV), экотропных ретровирусов, вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и их комбинаций (см., например, Buchscher et al., J. Virol. 66:2731–39 (1992); Johann et al., J. Virol. 66: 1635–40 (1992); Sommerfelt et al., Virology 176:58–59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374–78 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220–24 (1991); Miller et al., Mol. Клетка Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2:215 (1991)); лентивирусные векторы, включая векторы на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ–1), ВИЧ–2, вируса иммунодефицита кошек (FIV), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и вируса меди–висна (см., например, Pfeifer et al., Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177–211 (2001); Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150, 1998; Philpott и Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman et al., J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale et al., Mol. Therapy, 13: 1121, 2006; Brown et al., J. Virol. 73:9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams et al., J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell et al., J. Virol. 70:5288, 1996) или любые их варианты и/или векторы, которые можно использовать для получения любых из вирусов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор может включать регуляторные последовательности, такие как промоторные или энхансерные последовательности, которые могут регулировать экспрессию вирусного генома, например, как в случае РНК–вирусов, в линии упаковывающих клеток (см., например, патенты США №№5385839 и 5168062).

[0517] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор является экспрессирующим вектором, например, экспрессирующим вектором, делающим возможной экспрессию кодируемого продукта гена при доставке в клетку–мишень, например, клетку в организме индивидуума, например, опухолевую клетку, иммунную клетку и/или АПК. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащиеся в возбудителе инфекции, могут экспрессировать иммуномодулирующие белки в клетке–мишени в организме индивидуума в условиях, подходящих для экспрессии белка.

[0518] В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или экспрессирующий вектор содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями контроля экспрессии. Хорошо известны способы влияния на эту функциональную связь до или после инсерции последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуномодулирующий белок, в вектор. Последовательности контроля экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, участки связывания рибосомы, инициаторные сигналы, стоп–сигналы, сигналы кэпирования, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, участвующие в контроле транскрипции или

трансляции. Промотор может быть функционально связан с частью последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуномодулирующий белок. В некоторых вариантах осуществления промотор является конститутивно активным промотором в клетке–мишени (такой как тканеспецифический конститутивно активный промотор или другой конститутивный промотор). Например, рекомбинантный экспрессирующий вектор также может включать лимфоидные тканеспецифические транскрипционные регуляторные элементы (TRE) такие как TRE, специфические для В–лимфоцитов, Т–лимфоцитов или дендритных клеток. Лимфоидные тканеспецифические TRE известны в этой области (см., например, Thompson et al., Mol. Cell. Biol. 12:1043–53 (1992); Todd et al., J. Exp. Med. 177:1663–74 (1993); Penix et al., J. Exp. Med. 178:1483–96 (1993)). В некоторых вариантах осуществления промотор является индуцибельным промотором, который может быть чувствительным к индуцирующему средству (такому как сигнал активации Т–клеток). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, доставляемые в клетку–мишень в организме индивидуума, например, опухолевую клетку, иммунную клетку и/или АПК, можно функционально связывать с любыми из регуляторных элементов, описанных выше.

[0519] В некоторых вариантах осуществления вектор является бактериальным вектором, например, бактериальной плазмидой или космидой. В некоторых вариантах осуществления бактериальный вектор доставляют в клетку–мишень, например, опухолевые клетки, иммунные клетки и/или АПК, с помощью бактериально–опосредованного переноса плазмидной ДНК в клетки млекопитающих (также обозначаемого как "бактофекция"). В некоторых вариантах осуществления доставляемый бактериальный вектор также содержит соответствующие последовательности контроля экспрессии для экспрессии в клетках–мишенях, такие как промоторная последовательность и/или энхансерные последовательности, или любые регуляторные или контрольные последовательности, описанные выше. В некоторых вариантах осуществления бактериальный вектор содержит соответствующие последовательности контроля экспрессии для экспрессии и/или секреции кодируемых вариантов полипептидов в возбудителе инфекции, например, бактерии.

[0520] В некоторых вариантах осуществления полипептиды, представленные в настоящем описании, также можно получать способами синтеза. Твердофазный синтез является предпочтительным способом получения отдельных пептидов, т.к. он является наиболее экономичным способом получения небольших пептидов. Например, хорошо известные способы твердофазного синтеза включают использование защитных групп, линкеров и твердофазных подложек, а также конкретные условия реакций присоединения и снятия защитных групп, условия расщепления линкеров, использование скавенджеров и другие аспекты твердофазного пептидного синтеза. Затем пептиды можно собирать в полипептиды, представленные в настоящем описании.

IV. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ВАРИАНТОВ ПОЛИПЕПТИДОВ CD80 И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

[0521] В некоторых вариантах осуществления варианты полипептидов CD80, представленные в настоящем описании (полноразмерные и/или специфически связывающиеся фрагменты или конъюгаты, составные конструкции или их слитые белки или сконструированные клетки) демонстрируют иммуномодулирующую активность в отношении модуляции активации Т–клеток. В некоторых вариантах осуществления полипептиды CD80 модулируют экспрессию ИФН–гамма в анализе Т–клеток относительно контрольного CD80 дикого типа или немодифицированного CD80. В некоторых случаях модуляция экспрессии ИФН–гамма может повышать или снижать экспрессию ИФН–гамма относительно контроля. Анализы для определения специфического связывания и экспрессии ИФН–гамма хорошо известны в этой области и включают анализы MLR (реакции смешанной культуры лимфоцитов), в которых измеряют уровни цитокина интерферона гамма в супернатантах культур (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846–56), анализ стимуляции Т–клеток SEB (стафилококковым энтеротоксином В) (Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846–56) и анализ стимуляции Т–клеток антителами против CD3 (Li and Kurlander, J Transl Med. 2010: 8: 104).

[0522] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 может повышать или, в альтернативных вариантах осуществления, снижать экспрессию ИФН–гамма (интерферона гамма) в анализе первичных Т–клеток относительно контрольного CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления такая активность может зависеть от того, получают ли вариант полипептида CD80 в форме для антагонистической активности или для агонистической активности. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок является антагонистом ингибиторного рецептора, например, блокирует ингибиторный сигнал в клетке, который может снижать ответ на активирующий стимул, например, костимуляторный сигнал CD3 и/или CD28 или митогенный сигнал. Специалистам будет понятно, что существуют различные форматы анализа первичных Т–клеток, используемого для определения повышения или снижения экспрессии ИФН–гамма.

[0523] При анализе на способность варианта CD80 повышать или снижать экспрессию ИФН–гамма в анализе первичных Т–клеток, можно использовать анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, полученный в антагонистической форме, такой как растворимая форма, например, вариант CD80–Fc или секретируемый иммуномодулирующий белок, блокирует активность ингибиторного рецептора CTLA–4 или PD–L1 и, таким образом, повышает активность MLR в анализе, например, что наблюдают по повышенной продукции ИФН–гамма в анализе. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, полученный в агонистической форме, такой как локализующий составной полипептид vIgD или конъюгат, содержащий локализующий в опухоли функциональный фрагмент, или сконструированная клетка, экспрессирующая трансмембранный

иммуномодулирующий белок по изобретению, могут стимулировать активность ингибиторного рецептора CTLA–4 и, таким образом, снижать активность MLR, например, о чем свидетельствует сниженная продукция ИФН–гамма. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, полученный в агонистической форме, такой как локализующий составной полипептид vIgD или конъюгат, содержащий локализующий в опухоли функциональный фрагмент, или сконструированная клетка, экспрессирующая трансмембранный иммуномодулирующий белок по изобретению могут блокировать активность ингибиторного рецептора CTLA–4 и, таким образом, повышать активность MLR, например, повышать продукцию ИФН–гамма.

[0524] Альтернативно, при анализе на способность варианта CD80 модулировать повышение или снижение экспрессии ИФН–гамма в анализе первичных Т–клеток можно использовать анализ соиммобилизации. В анализе соиммобилизации сигнал TCR, в некоторых вариантах осуществления обеспечиваемый антителом против CD3, используют в комбинации с соиммобилизованным вариантом CD80 для определения способности повышать или снижать экспрессию ИФН–гамма относительно контрольного немодифицированного CD80 или CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, например, соиммобилизованный вариант CD80 (например, CD80–Fc), повышает продукцию ИФН–гамма в анализе соиммобилизации.

[0525] В некоторых вариантах осуществления в анализе на способность варианта CD80 модулировать повышение или снижение экспрессии ИФН–гамма можно использовать репортерный анализ Т–клеток. В некоторых вариантах осуществления Т–клетка является линией Т–клеток Jurkat, или ее получают из линий Т–клеток Jurkat. В репортерных анализах репортерную линию клеток (например, репортерную клетку Jurkat) также получают для гиперэкспрессии ингибиторного рецептора, являющегося когнатным партнером по связыванию варианта полипептида с доменом IgSF. Например, в случае варианта CD80 репортерную линию клеток (например, репортерную клетку Jurkat) получают для экспрессии CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления репортерные Т–клетки также содержат репортерную конструкцию, содержащую индуцибельный промотор, чувствительный к активации Т–клеток, функционально связанный с репортером. В некоторых вариантах осуществления репортер является флуоресцентным или люминесцентным репортером. В некоторых вариантах осуществления репортер является люциферазой. В некоторых вариантах осуществления промотор чувствителен к передаче сигнала CD3. В некоторых вариантах осуществления промотор является промотором NFAT. В некоторых вариантах осуществления промотор чувствителен к костимуляторной передаче сигнала, например, костимуляторной передаче сигнала CD28. В некоторых вариантах осуществления промотор является промотором ИЛ–2.

[0526] В аспектах репортерного анализа репортерную линию клеток стимулируют, например, посредством совместной инкубации с антигенпрезентирующими клетками

(АПК), экспрессирующими лиганд дикого типа ингибиторного рецептора, например, CD80. В некоторых вариантах осуществления АПК являются искусственными АПК. Искусственные АПК хорошо известны специалистам в этой области. В некоторых вариантах осуществления искусственные АПК получают из одной или более линии клеток млекопитающего, таких как клетки K562, CHO или 293. В некоторых вариантах осуществления искусственные АПК конструируют для экспрессии антитела против CD3 и, в некоторых случаях, костимуляторного лиганда. В некоторых вариантах осуществления искусственные АПК получают для гиперэкспрессии когнатного партнера по связыванию варианта полипептида с доменом IgSF. Например, в случае варианта CD80 репортерную линию клеток (например, репортерных клеток Jurkat) получают для гиперэкспрессии ингибиторного лиганда PD–L1.

[0527] В некоторых вариантах осуществления репортерные клетки Jurkat инкубируют совместно с искусственными АПК, гиперэкспрессирующими ингибиторный лиганд в присутствии варианта молекулы с доменом IgSF или иммуномодулирующего белка, например, варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка. В некоторых вариантах осуществления экспрессию репортера подвергают мониторингу, например, посредством определения люминесценции или флуоресценции клеток. В некоторых вариантах осуществления нормальные взаимодействия между ингибиторным рецептором и лигандом приводят к репрессии или снижению репортерного сигнала по сравнению с контролем, например, репортерной экспрессией при совместной инкубации контрольных Т–клеток и АПК, в которых взаимодействие ингибиторного рецептора и лиганда отсутствует, например, АПК, которые не гиперэкспрессируют CD80. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, представленный в настоящем описании, антагонистически действует на взаимодействие, например, при получении в растворимой форме в виде варианта CD80–Fc или при экспрессии в АПК в виде секретируемого иммуномодулирующего белка, что, таким образом, приводит к повышению репортерного сигнала по сравнению с отсутствием варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка. В определенных вариантах осуществления, представленных в настоящем описании, вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок опосредует агонизм CD28, такой как PD–L1–зависимая костимуляция CD28, например, при получении в растворимой форме в виде варианта CD80–Fc, что, таким образом, приводит к повышению репортерного сигнала по сравнению с отсутствием варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка. В некоторых случаях некоторые форматы варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка, представленные в настоящем описании, могут осуществлять агонистическую активность в отношении ингибиторного рецептора, таким образом, снижая экспрессию репортера по сравнению с отсутствием варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка.

[0528] Специалистам в этой области известно использование подходящих контролей, однако, в указанных выше вариантах осуществления контроль, как правило,

включает использование немодифицированного CD80, такого как нативная изоформа CD80 дикого типа того же вида млекопитающего, из которого получают вариант CD80. В некоторых вариантах осуществления CD80 дикого типа или нативный CD80 имеют одну и ту же форму или форму, соответствующую варианту. Например, если вариант CD80 представляет собой растворимую форму, содержащую вариант ECD, слитый с белком Fc, контроль представляет собой растворимую форму, содержащую ECD CD80 дикого типа или нативный ECD CD80, слитый с белком Fc. Независимо от того, повышена или снижена аффинность и/или селективность связывания с одним или более из CTLA–4 и CD80, в некоторых вариантах осуществления вариант CD80 будет повышать экспрессию ИФН–гамма и, в альтернативных вариантах осуществления, снижать экспрессию ИФН–гамма в анализе Т–клеток относительно контрольного CD80 дикого типа.

[0529] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок повышает экспрессию ИФН–гамма (т.е. экспрессию белка) относительно контрольного CD80 дикого типа или немодифицированного CD80 по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более. В других вариантах осуществления вариант CD80 или иммуномодулирующий белок снижает экспрессию ИФН–гамма (т.е. экспрессию белка) относительно контрольного CD80 дикого типа или немодифицированного CD80 по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более. В некоторых вариантах осуществления контрольный CD80 дикого типа является CD80 мыши, таким, который, как правило, будут использовать для варианта CD80 с измененной последовательностью относительно последовательности CD80 мыши дикого типа. В некоторых вариантах осуществления контрольный CD80 дикого типа является CD80 человека, таким, который, как правило, будут использовать для варианта CD80 с измененной последовательностью относительно соответствующей последовательности CD80 человека дикого типа, такой как последовательность CD80, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 76, или SEQ ID NO: 150, или SEQ ID NO: 3030, или SEQ ID NO: 3031.

V. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ

[0530] Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим любые из вариантов полипептидов CD80, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток или возбудителей инфекции, представленных в настоящем описании. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент. Например, фармацевтическая композиция может содержать один или более эксципиентов для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В некоторых аспектах специалистам в этой области будет понятно, что фармацевтическая композиция, содержащая клетки, может отличаться от фармацевтической композиции, содержащей белок.

[0531] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является твердой, такой как порошок, капсула или таблетка. Например, компоненты фармацевтической композиции можно лиофилизировать. В некоторых вариантах осуществления твердую фармацевтическую композицию восстанавливают или разводят в жидкости перед введением.

[0532] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является жидкой, например варианты полипептидов CD80, растворенные в водном растворе (таком как физиологический раствор или раствор Рингера). В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции составляет от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,5 (например, от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,0, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5, от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,0 до приблизительно 8,0 или от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,5).

[0533] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый эксципиент, например наполнитель, связывающее средство, покрытие, консервант, смазочное средство, ароматизатор, подсластитель, краситель, растворитель, буферное средство, хелатирующее средство или стабилизатор. Примеры фармацевтически приемлемых наполнителей включают целлюлозу, двухосновный фосфат кальция, карбонат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, маннит, сорбит, мальтол, пептизированный крахмал, кукурузный крахмал или картофельный крахмал. Примеры фармацевтически приемлемых связывающих средств включают поливинилпирролидон, крахмал, лактозу, ксилит, сорбит, мальтит, желатин, сахарозу, полиэтиленгликоль, метилцеллюлозу или целлюлозу. Примеры фармацевтически приемлемых покрытий включают гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), шеллак, кукурузный белок зеин или желатин. Примеры фармацевтически приемлемых разрыхлителей включают поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу или крахмалгликолят натрия. Примеры фармацевтически приемлемых смазочных средств включают полиэтиленгликоль, стеарат магния или стеариновую кислоту. Примеры фармацевтически приемлемых консервантов включают метилпарабены, этилпарабены, пропилпарабен, бензойную кислоту или сорбиновую кислоту. Примеры фармацевтически приемлемых подсластителей включают сахарозу, сахарин, аспартам или сорбит. Примеры фармацевтически приемлемых буферных средств включают карбонаты, цитраты, глюконаты, ацетаты, фосфаты или тартраты.

[0534] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит средство для контролируемого или замедленного высвобождения продукта, такое как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (полимолочную кислоту, полигликолевую кислоту), бусы или липосомы.

[0535] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является стерильной. Стерилизацию можно осуществлять посредством фильтрации через мембраны для стерилизации фильтрацией или облучения. Если композицию лиофилизируют, стерилизацию с использованием этого способа можно осуществлять до или после лиофилизации и восстановления. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или растворе. Кроме того, парентеральные композиции, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие, например, мешок для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, протыкаемую иглой для подкожных инъекций.

[0536] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим трансмембранные иммуномодулирующие белки, включая сконструированные клетки, экспрессирующие такие трансмембранные иммуномодулирующие белки. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и составы включают один или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно–солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по изобретению, предпочтительно, составляют для внутривенного введения.

[0537]

[0538] Такой состав, например, может находиться в форме, подходящей для внутривенной инфузии. Фармацевтически приемлемый носитель может являться фармацевтически приемлемым материалом, композицией или носителем, участвующим в переносе или транспорте интересующих клеток из одной ткани, органа или части тела в другую ткань, орган или часть тела. Например, носитель может являться жидким или твердым наполнителем, дилюентом, эксципиентом, растворителем, инкапсулирующим материалом или некоторой их комбинацией. Каждый компонент носителя должен быть "фармацевтически приемлемым" в том, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава. Он также должен подходить для контакта с любой тканью, органом или частью тела, с которыми он может столкнуться, что означает, что он должен не нести риск токсичности, раздражения, аллергического ответа, иммуногенности или любого другого осложнения, значительно перевешивающего его терапевтическую пользу.

[0539] В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят фармацевтическую композицию. Как правило, дозы и пути введения фармацевтической композиции определяют с учетом размеров и состояния индивидуума в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Например, терапевтически эффективную дозу можно исходно оценивать в анализах культур клеток или в моделях на животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или обезьяны. Модель на животных также

можно использовать для определения соответствующего диапазона концентрации и пути введения. Затем такую информацию можно использовать для определения доз, которые можно использовать, и путей введения для людей. Точную дозировку будут определять с учетом факторов, связанных с индивидуумом, которому необходимо лечение. Дозу и введение корректируют для обеспечения достаточных уровней активного соединения или для поддержания желаемого эффекта. Факторы, которые можно принимать во внимание, включают тяжесть заболевания, общее состояние здоровья индивидуума, возраст, массу тела и пол индивидуума, время и частоту введения, комбинации лекарственных средств, аллергические реакции и ответ на терапию.

[0540] Фармацевтические композиции длительного действия можно вводить каждые 3–4 дня, каждую неделю или раз в две недели в зависимости от времени полужизни и скорости выведения конкретного состава. Частота введения доз будет зависеть от фармакокинетических параметров молекулы в используемом составе. Как правило, композицию вводят до достижения дозы, при которой достигают желаемого эффекта. Таким образом, композицию можно вводить в виде однократной дозы или множества доз (с одинаковыми или разными концентрациями/дозами) в течение периода времени или в виде непрерывной инфузии. Дополнительную коррекцию соответствующих доз осуществляют общепринятым образом. Соответствующие дозы можно определять с использованием соответствующих данных о зависимости дозы и эффекта. Можно осуществлять мониторинг ряда биомаркеров или физиологических маркеров терапевтического эффекта, включая активацию или пролиферацию Т–клеток, синтез или продукцию цитокинов (например, продукцию ФНОα, ИФНγ, ИЛ–2), индукцию различных маркеров активации (например, CD25, рецептора ИЛ–2), воспаления, отека или чувствительности суставов, уровень С–реактивного белка в сыворотке, продукцию антител против коллагена и/или Т–клеточно–зависимые гуморальные ответы.

[0541] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят индивидууму любым путем, включая пероральный, трансдермальный, ингаляцию, внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, нанесение непосредственно на участок повреждения, нанесение на участок хирургической операции, интраперитонеальный, введение суппозиториев, подкожный, внутрикожный, чрезкожный, небулизацию, внутриплевральный, внутрижелудочковый, внутрисуставной, внутриглазной или интраспинальный.

[0542] В некоторых вариантах осуществления доза фармацевтической композиции является однократной дозой или повторной дозой. В некоторых вариантах осуществления дозы вводят индивидууму раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки или четыре или более раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления вводят приблизительно 1 или более (например, приблизительно 2 или более, приблизительно 3 или более, приблизительно 4 или более, приблизительно 5 или более, приблизительно 6 или более или приблизительно 7 или более) доз в неделю. В некоторых вариантах осуществления множество доз вводят в течение дней, недель, месяцев или лет. В некоторых вариантах

осуществления курс лечения составляет приблизительно 1 или более доз (например, приблизительно 2 или более доз, приблизительно 3 или более доз, приблизительно 4 или более доз, приблизительно 5 или более доз, приблизительно 7 или более доз, приблизительно 10 или более доз, приблизительно 15 или более доз, приблизительно 25 или более доз, приблизительно 40 или более доз, приблизительно 50 или более доз или приблизительно 100 или более доз).

[0543] В некоторых вариантах осуществления вводимая доза фармацевтической композиции составляет приблизительно 1 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более (например, приблизительно 2 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 5 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 10 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 25 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 50 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 100 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 250 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 500 мкг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 1 мг белка на кг массы тела индивидуума или более, приблизительно 2 мг белка на кг массы тела индивидуума или более или приблизительно 5 мг белка на кг массы тела индивидуума или более).

[0544] В некоторых вариантах осуществления вводят терапевтическое количество композиции клеток. Как правило, точное количество композиций по изобретению, подлежащих введению, может определять лечащий врач с учетом индивидуальных отличий возраста, массы тела, размера опухоли, объема инфекции или метастазирования и состояния пациента (индивидуума). В целом, можно отметить, что фармацевтическую композицию, содержащую сконструированные клетки, например, Т–клетки, как представлено в настоящем описании, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, например, от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые числа в этих диапазонах. Композиции сконструированных клеток, такие как композиции Т–клеток, также можно вводить множество раз в этих дозах. Клетки можно вводить способами инфузии, общеизвестными в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Специалист в области медицины легко может определять оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента посредством мониторинга признаков заболевания у пациента и, таким образом, коррекции лечения.

[0545] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит возбудители инфекции, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие иммуномодулирующие варианты полипептидов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит дозу возбудителей инфекции, подходящую для введения индивидууму, подходящему для лечения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит возбудитель инфекции, являющийся вирусом, в количестве однократной дозы или многократных доз от приблизительно 1×10^5 до приблизительно 1×10^{12} бляшкообразующих единиц (БОЕ), от

1×10^6 до 1×10^{10} БОЕ или от 1×10^7 до 1×10^{10} БОЕ, включительно, например, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9 БОЕ или приблизительно 1×10^{10} БОЕ. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать концентрацию вируса от или от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} БОЕ /мл, например, от 5×10^6 до 5×10^9 или от 1×10^7 до 1×10^9 БОЕ /мл, например, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 10^6 БОЕ/мл, 10^7 БОЕ/мл, 10^8 БОЕ/мл или 10^9 БОЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит возбудитель инфекции, являющийся бактерией, в количестве однократной дозы или многократных доз, от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ), от 1×10^4 и 1×10^9 КОЕ или от 1×10^5 до 1×10^7 КОЕ, включительно, например, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 1×10^4, 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 или 1×10^9 КОЕ. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать концентрацию бактерий от или от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^8 КОЕ/мл, например, от 5×10^5 до 5×10^7 или от 1×10^6 до 1×10^7 КОЕ/мл, например, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 10^5 КОЕ/мл, 10^6 КОЕ/мл, 10^7 КОЕ/мл или 10^8 КОЕ/мл.

[0546] Известны различные способы определения того, модулирует ли введение терапевтической композиции по изобретению иммунологическую активность в достаточной степени посредством элиминации, секвестрации или инактивации иммунных клеток, опосредующих или способных опосредовать нежелательный иммунный ответ; индуцирования, образования или активации иммунных клеток, опосредующих или способных опосредовать протективный иммунный ответ; изменения физических или функциональных свойств иммунных клеток или комбинации этих эффектов. Неограничивающие примеры измерений модуляции иммунологической активности включают исследование наличия или отсутствия популяций иммунных клеток (с использованием проточной цитометрии, иммуногистохимии, гистологии, электронной микроскопии, полимеразной цепной реакции (ПЦР)); измерение функциональной способности иммунных клеток, включая способность или резистентность к пролиферации или делению в ответ на сигнал (например, с использованием анализов пролиферации Т–клеток и пептидного сканирования на основе включения ^{3}H–тимидина после стимуляции антителом против CD3, антителом против Т–клеточного рецептора, антителом против CD28, ионофоров кальция, PMA (форбол–12–миристат–13–ацетата), антигенпрезентирующих клеток, нагруженных пептидным или белковым антигеном; анализов пролиферации В–клеток); измерение способности уничтожать или лизировать другие клетки (такое как анализы цитотоксических Т–клеток); измерения цитокинов, хемокинов, молекул поверхности клетки, антител и других продуктов клеток (например, посредством проточной цитометрии, твердофазных иммуноферментных анализов, анализа вестерн–блоттинга, белкового микрочипа, анализа иммунопреципитации); измерение

биохимических маркеров активации иммунных клеток или пути передачи сигнала в иммунных клетках (например, анализ вестерн–блоттинга и иммунопреципитации на фосфорилирование тирозина, серина или треонина, расщепление полипептида и образование или диссоциацию белковых комплексов; анализ с помощью белковых чипов; транскрипционное профилирование ДНК с использованием ДНК–чипов или вычитающей гибридизации); измерения гибели клеток посредством апоптоза, некроза или других механизмов (например, окрашивание аннексином V, анализы TUNEL, электрофорез в геле для измерения электрофоретического расщепления ДНК, гистологический анализ; флуорогенные анализы каспаз, анализ вестерн–блоттинга субстратов каспаза); измерение генов, белков и других молекул, продуцируемых иммунными клетками (например, анализ нозерн–блоттинга, полимеразная цепная реакция, ДНК–микрочипы, белковые микрочипы, двухмерный электрофорез в геле, анализ вестерн–блоттинга, твердофазные иммуноферментные анализы, проточная цитометрия); и измерение клинических симптомов или исходов, таких как улучшение аутоиммунных, нейродегенеративных и других заболеваний, затрагивающих собственные белки или полипептиды (клинические баллы, требования по использованию дополнительной терапии, функциональный статус, визуализирующие исследования), например, посредством измерения частоты рецидивирования или тяжести заболевания (с использованием клинических баллов, как правило, известных специалистам в этой области) в случае рассеянного склероза, измерения глюкозы крови в случае диабета I типа или воспаления суставов в случае ревматоидного артрита.

VI. ПРОМЫШЛЕННЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

[0547] Настоящее изобретение также относится к промышленным изделиям, содержащим фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, в подходящей упаковке. Подходящая упаковка для композиций (таких как офтальмологические композиции), представленных в настоящем описании, известны в этой области и включают, например, флаконы (такие как запаянные флаконы), сосуды, ампулы, бутыли, банки, гибкую упаковку (например, запаянную майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Эти промышленные изделия дополнительно можно стерилизовать и/или запаивать.

[0548] Настоящее изобретение дополнительно относится к наборам, содержащим фармацевтические композиции (или промышленные изделия), представленные в настоящем описании, которые дополнительно могут содержать инструкции в отношении способов применения композиции, такого как применение, представленное в настоящем описании. Наборы, представленные в настоящем описании, также могут включать другие материалы, желаемые с коммерческой точки зрения и точки зрения потребителя, включая другие буферы, дилюенты, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по осуществлению любых способов, представленных в настоящем описании.

VII. ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

[0549] Настоящее изобретение относится к способам применения фармацевтических композиций по изобретению, содержащих варианты полипептидов CD80 и иммуномодулирующих белков, сконструированных клеток или возбудителей инфекции, представленных в настоящем описании, для модуляции иммунного ответа, в том числе, в отношении лечения заболевания или состояния у индивидуума, такого как пациент–человек. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании (включая фармацевтическую композицию, содержащую варианты полипептидов CD80, иммуномодулирующие белки, конъюгаты и сконструированные клетки, представленные в настоящем описании), можно использовать для множества терапевтических целей, таких как лечение заболевания. Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию используют для лечения воспалительных или аутоиммунных нарушений, злокачественного новообразования, при трансплантации органов, вирусных инфекциях, и/или бактериальных инфекциях у млекопитающего. С помощью фармацевтической композиции можно модулировать (например, повышать или снижать) иммунный ответ для лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют с использованием вариантов полипептидов CD80 в формате, предназначенном для повышения иммунного ответа у индивидуума. В некоторых таких аспектах с помощью повышения иммунного ответа лечат заболевание или состояние у индивидуума, такое как опухоль или злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют с использованием вариантов полипептидов CD80 в формате, предназначенном для снижения иммунного ответа у индивидуума. В некоторых таких аспектах с помощью снижения иммунного ответа лечат заболевание или состояние у индивидуума, такое как воспалительное заболевание или состояние, например, аутоиммунное заболевание.

[0550] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению можно использовать для терапевтического введения вариантов полипептидов CD80, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток и возбудителей инфекции, представленных в настоящем описании. В свете представленного описания, специалисты в этой области могут выбирать формат для показания в зависимости от типа модуляции иммунного ответа, например, желаемого повышения или снижения.

[0551] В некоторых вариантах осуществления вводят фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, стимулирующую или повышающую иммунный ответ, которую можно применять, например, в лечении злокачественного новообразования, вирусных инфекций или бактериальных инфекций. Способы по изобретению включают способы, включающие доставку вариантов полипептидов CD80, например, в растворимых форматах, с повышенной аффинностью к CTLA–4 и/или PD–L1, которые могут антагонистически действовать на передачу сигнала ингибиторного рецептора, например, блокировать ингибиторный сигнал в клетке, который может снижать ответ на активирующий стимул, например, костимуляторный сигнал CD3 и/или CD28 или митогенный сигнал. В некоторых случаях результатом этого может являться

повышение иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления антагонизм CTLA–4 или PD–L1/PD–1 можно использовать для стимуляции иммунитета в онкологии, например, для лечения опухолей или злокачественных новообразований. В некоторых вариантах осуществления агонизм CD28, которые может зависеть от связывания CD80 PD–L1 или повышаться при нем, можно использовать для стимуляции иммунитета в онкологии, например, для лечения опухолей или злокачественных новообразований.

[0552] Настоящее изобретение относится к способам повышения иммунного ответа посредством доставки варианта полипептида CD80, связывающегося с CTLA–4, например, связывающегося с CTLA–4 с повышенной аффинностью по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит вариант полипептида CD80 в формате, демонстрирующем антагонистическую активность в отношении его когнатного партнера по связыванию CTLA–4 и/или ингибирующем передачу сигнала через CTLA–4. Примеры форматов полипептидов CD80 для использования в связи с таким терапевтическим применением включают, например, вариант полипептида CD80, являющийся растворимым (например, слитый белок вариант CD80–Fc), иммуномодулирующий белок или "составной" белок из варианта полипептида CD80 и другого домена IgSF, включая их растворимые формы, являющиеся Fc–слитыми белками, сконструированную клетку, экспрессирующую секретируемый иммуномодулирующий белок, или возбудитель инфекции, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую секретируемый иммуномодулирующий белок, например, для экспрессии и секреции секретируемого иммуномодулирующего белка в инфицированной клетке (например, опухолевой клетке или АПК, например, дендритной клетке). Такие способы включают способы, осуществляемые посредством доставки варианта полипептида CD80 в растворимом формате, который может антагонистически действовать на передачу сигнала ингибиторного рецептора CTLA–4 посредством связывания ингибиторного рецептора CTLA–4, блокируя его взаимодействие с CD80 или CD86, экспрессирующимися на АПК, таким образом, предотвращая отрицательную регуляторную передачу сигнала CD80/CD86–связанного рецептора CTLA–4. В некоторых случаях результатом этого может являться повышение иммунного ответа, с помощью которого в некоторых аспектах можно лечить заболевание или состояние у индивидуума, например, лечить опухоль или злокачественное новообразование. Примеры растворимых форматов включают любые из описанных форматов. Такие терапевтические средства включают форматы, в которых внеклеточную часть варианта полипептида CD80, содержащего аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV), соединяют, прямо или косвенно, с доменом мультимеризации, например, Fc–доменом или –областью. В некоторых вариантах осуществления такое терапевтическое средство является слитым белком вариант CD80–Fc.

[0553] Настоящее изобретение относится к способам повышения иммунного ответа посредством доставки варианта полипептида CD80, связывающегося с PD–L1, например,

связывающегося с PD–L1 с повышенной аффинностью по сравнению с немодифицированным полипептидом CD80 или полипептидом CD80 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептиды CD80 по изобретению, например, растворимые формы вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, могут связываться с PD–L1 на опухолевой клетке или АПК, таким образом, блокируя взаимодействие PD–L1 и ингибиторного рецептора PD–1 для предотвращения отрицательной регуляторной передачи сигнала, которая в ином случае является результатом взаимодействия PD–L1/PD–1. В некоторых случаях результатом этого может являться повышение иммунного ответа, с помощью которого в некоторых аспектах можно лечить заболевание или состояние у индивидуума, например, лечить опухоль или злокачественное новообразование. Примеры растворимых форматов включают любые из описанных форматов. Такие терапевтические средства включают форматы, в которых внеклеточную часть варианта полипептида CD80, содержащего аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV), соединяют, прямо или косвенно, с доменом мультимеризации, например, Fc–доменом или –областью. В некоторых вариантах осуществления такое терапевтическое средство является слитым белком вариант CD80–Fc.

[0554] Варианты осуществления по изобретению также включают способы опосредования агонизма CD28 посредством PD–L1–зависимой костимуляции CD28 с использованием вариантов полипептидов CD80, демонстрирующих повышенное связывание с PD–L1 по сравнению с немодифицированным полипептидом CD80 или полипептидом CD80 дикого типа. В некоторых аспектах такие способы можно использовать для повышения иммунного ответа у индивидуума, которому вводят молекулы, с помощью которых в некоторых аспектах можно лечить заболевание или состояние у индивидуума, например, лечить опухоль или злокачественное новообразование. Такие способы включают способы, осуществляемые посредством доставки варианта полипептида CD80 в растворимом формате. В настоящем описании представлены примеры растворимых форматов, включая форматы, в которых внеклеточную часть варианта полипептида CD80, содержащего аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV), соединяют, прямо или косвенно, с доменом мультимеризации, например, Fc–доменом или –областью. В некоторых вариантах осуществления такое терапевтическое средство является слитым белком вариант CD80–Fc. Для такой PD–L1–зависимой костимуляции не требуется Fc с эффекторной функцией, и ее может опосредовать Fc–слитый белок, содержащий менее эффекторную или неактивную молекулу Fc. В некоторых случаях такие варианты полипептидов CD80, например растворимые формы, также могут облегчать стимуляцию иммунного ответа в контексте терапевтических способов по изобретению посредством блокирования взаимодействия PD–L1/PD–1, в то же время связывая и костимулируя рецептор CD28 на локализованной Т–клетке.

[0555] В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80,

соединенный, прямо или косвенно, с Fc, сохраняющим или демонстрирующим эффекторную функцию, вводят индивидууму для опосредования агонизма CD28. Настоящее изобретение относится к способам опосредования агонизма CD28 посредством рецептор–опосредованной костимуляции CD28 с использованием вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании, связывающихся с CD28. В некоторых вариантах осуществления такой агонизм CD28 можно использовать для стимуляции иммунитета в онкологии, например, для лечения опухолей или злокачественного новообразования. В некоторых случаях варианты полипептидов CD80 также связываются с CTLA–4 или PD–L1, например, демонстрируют повышенное связывание с CTLA–4 или PD–L1. В некоторых аспектах перекрестная сшивка Fc–рецептора может инициировать опосредованные антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) эффекторные функции и, таким образом, вызывать истощение клеток–мишеней, экспрессирующих когнатного партнера по связыванию, таких как CTLA–4–экспрессирующие клетки (например, CTLA–4–экспрессирующие Т–регуляторные клетки) или PD–L1–экспрессирующие клетки (например, PD–$L1^{hi}$ опухоли). Способы модуляции иммунного ответа по изобретению можно использовать для лечения заболевания или состояния, такого как опухоль или злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно использовать для ингибирования роста злокачественных клеток млекопитающего (таких как злокачественные клетки человека). Способ лечения злокачественного новообразования может включать введение эффективного количества любой из фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании, индивидууму со злокачественным новообразованием. Эффективное количество фармацевтической композиции можно вводить для ингибирования, прекращения или реверсирования прогрессирования злокачественных новообразований. Злокачественные клетки человека можно обрабатывать in vivo или ex vivo. При лечении пациента–человека ex vivo, ткань или жидкости, содержащие злокачественные клетки, обрабатывают вне организма, а затем ткань или жидкости вводят обратно пациенту. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование у пациента–человека лечат in vivo посредством введения пациенту терапевтической композиции. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам ex vivo и in vivo для ингибирования, прекращения или реверсирования прогрессирования опухоли или способам, иным образом приводящим к статистически значимому повышению выживаемости без прогрессирования (т.е. длительности времени во время лечения и после него, в течение которого пациент живет со злокачественным новообразованием, которое не ухудшается) или общей выживаемости (также называемой "коэффициентом выживаемости", т.е. процентной доли людей в исследуемой группе или группе лечения, остающихся живыми в течение некоторого периода времени после того, как у них диагностируют злокачественное новообразование или лечат его) относительно лечения с использованием контроля.

[0556] Злокачественные новообразования, которые можно лечить посредством

фармацевтических композиций и способов лечения, представленных в настоящем описании, включают, в качестве неограничивающих примеров, меланому, рак мочевого пузыря, гемобластозы (лейкоз, лимфому, миелому), рак печени, злокачественное новообразование головного мозга, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы (аденокарциному), колоректальный рак, рак легких (мелкоклеточный рак легких и немелкоклеточный рак легких), рак селезенки, рак тимуса или гемобластоз (т.е. лейкоз), рак предстательной железы, рак яичка, рак яичников, рак матки, карциному желудка, скелетно–мышечное злокачественное новообразование, рак головы и шеи, злокачественное новообразование желудочно–кишечного тракта, рак половых клеток, или эндокринное или нейроэндокринное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является саркомой Юинга. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из меланомы, рака легких, рака мочевого пузыря и гемобластоза. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является лимфомой, лимфоидным лейкозом, миелолейкозом, раком шейки матки, нейробластомой или множественной миеломой.

[0557] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в качестве монотерапии (т.е. как единственное средство) или комбинированного лечения (т.е. в комбинации с одним или более дополнительными противоопухолевыми средствами, такими как химиотерапевтическое лекарственное средство, противоопухолевая вакцина или ингибитор иммунных контрольных точек). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию также можно вводить вместе с лучевой терапией. В некоторых аспектах настоящего изобретения ингибитор иммунных контрольных точек является ниволумабом, тремелимумабом, пембролизумабом, ипилимумабом или т.п.

[0558] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция супрессирует иммунный ответ, который может быть полезным в лечении воспалительных или аутоиммунных нарушений или при трансплантации органов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит вариант полипептида CD80 в формате, демонстрирующем агонистическую активность в отношении его когнатного партнера по связыванию CTLA–4 и/или стимулирующем ингибиторную передачу сигнала через CTLA–4. Примеры форматов полипептида CD80 для использования в контексте такого терапевтического применения включают, например, иммуномодулирующий белок или "составной" белок из варианта полипептида CD80 и домена IgSF или его вариант, локализующий в клетку или ткань воспалительного окружения, конъюгат, содержащий вариант полипептида CD80, соединенный с функциональным фрагментом, локализующим в клетку или ткань воспалительного окружения, сконструированную клетку, экспрессирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок, или возбудитель инфекции, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок, например, для экспрессии трансмембранного

иммуномодулирующего белка в инфицированной клетке.

[0559] В некоторых вариантах осуществления воспалительное или аутоиммунное нарушение является васкулитом, ассоциированным с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулитом, аутоиммунным заболеванием кожи, трансплантацией, ревматизмом, воспалительным заболеванием желудочно–кишечного тракта, воспалительным заболеванием глаза, воспалительным неврологическим заболеванием, воспалительным заболеванием легких, воспалительным эндокринным заболеванием или аутоиммунным гематологическим заболеванием.

[0560] В некоторых вариантах осуществления воспалительными и аутоиммунными нарушениями, которые можно лечить с помощью фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, являются болезнь Аддисона, аллергия, очаговая алопеция, болезнь Альцгеймера, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром (синдром Хьюза), астма, атеросклероз, ревматоидный артрит, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, азооспермия, болезнь Бехчета, болезнь Бергера, буллезный пемфигоид, кардиомиопатия, сердечно–сосудистое заболевание, целиакия, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хронический идиопатический полиневрит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (CIDP), хроническая рецидивирующая полинейропатия (синдром Гийена–Барре), Синдром Чарга–Стросса (CSS), рубцующийся пемфигоид, болезнь холодовых агглютининов (CAD), COPD (хроническая обструктивная болезнь легких), синдром CREST, болезнь Крона, герпетиформный дерматоз, дерматомиозит, диабет, дискоидная волчанка, экзема, приобретенный буллезный эпидермолиз, первичная криоглобулинемия смешанного типа, синдром Эвана, экзофтальм, фибромиалгия, синдром Гудпасчера, болезнь Гревса, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), IgA–нефропатия, иммунопролиферативное заболевание или нарушение, воспалительное заболевание кишечника (IBD), интерстициальная болезнь легких, ювенильный артрит, ювенильный идиопатический артрит (JIA), болезнь Кавасаки, миастенический синдром Ламберта–Итона, плоский лишай, волчаночный нефрит, лимфоцитарный гипофизит, синдром Меньера, синдром Миллера–Фишера/острая диссеминированная энцефаломиелорадикулопатия (EMR), смешанная болезнь соединительной ткани, рассеянный склероз (MS), фиброзит, миалгический энцефаломиелит (ME), миастения гравис, воспалительное заболевание глаз, листовидная пузырчатка, обыкновенная пузырчатка, пернициозная анемия, нодозный полиартериит, полихондрит, полигландулярные синдромы (синдром Уитакера), ревматическая полимиалгия, полимиозит, первичная агаммаглобулинемия, первичный биллиарный цирроз/аутоиммунная холангиопатия, псориаз, псориатический артрит,

феномен Рейно, синдром Рейтера/реактивный артрит, рестеноз, ревматическая лихорадка, ревматизм, саркоидоз, синдром Шмидта, склеродермия, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, системная красная волчанка (SLE), системная склеродермия, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тиреоидит, диабет 1 типа, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, интерстициальная болезнь кишечника или гранулематоз Вегенера. В некоторых вариантах осуществления воспалительное или аутоиммунное нарушение выбрано из интерстициальной болезни кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита и псориаза.

[0561] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят для модуляции аутоиммунного состояния. Например, супрессия иммунного ответа в рамках способов может быть благоприятной для ингибирования отторжения реципиентом трансплантата ткани, клеток или органа от донора. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, используют для ограничения или профилактики связанных с трансплантацией заболеваний или нарушений, таких как реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции используют для супрессии аутоиммунного отторжения трансплантированного костного мозга, органов, кожи, мышц, нейронов, островков Лангерганса или паренхиматозных клеток.

[0562] Фармацевтические композиции, содержащие сконструированные клетки, и способы, представленные в настоящем описании, можно использовать в адоптивном переносе клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции клеток, содержащие сконструированные клетки, можно использовать в соответствующих способах, например, для модуляции иммунологической активности в иммунотерапевтическом подходе для лечения, например, злокачественного новообразования у млекопитающего или, в других вариантах осуществления, лечения аутоиммунных нарушений. Используемые способы, как правило, включают способ приведения TIP по изобретению в контакт с клеткой млекопитающего в условиях, делающих возможным специфическое связывание аффинно–модифицированного домена IgSF и модуляцию иммунологической активности клетки млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки (такие как инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), Т–клетки (включая CD8+ или CD4+ Т–клетки) или АПК) конструируют для экспрессии в виде мембранного белка и/или растворимого варианта полипептида CD80, иммуномодулирующего белка или конъюгата, как представлено в настоящем описании. Затем сконструированные клетки можно приводить в контакт с клеткой млекопитающего, такой как АПК, второй лимфоцит или опухолевая клетка, в которых желательна модуляция иммунологической активности, в условиях, делающих возможным специфическое связывание аффинно–модифицированного домена IgSF с противоструктурой на клетке млекопитающего таким образом, что можно модулировать иммунологическую активность в клетке

млекопитающего. Клетки можно приводить в контакт in vivo или ex vivo.

[0563] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки являются аутологичными клетками. В других вариантах осуществления клетки являются аллогенными. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными сконструированными клетками, подвергаемыми инфузии обратно млекопитающему, из которого их выделяли. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аллогенными сконструированными клетки, подвергаемыми инфузии млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления клетки собирают из крови или опухоли пациента, конструируют для экспрессии полипептида (такого как вариант полипептида CD80, иммуномодулирующий белок или конъюгат, как представлено в настоящем описании), выращивают в культуральной системе in vitro (например, посредством стимуляции клеток) и подвергают инфузии обратно пациенту для опосредования деструкции опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют посредством адоптивного переноса клеток, где клетки, экспрессирующие TIP (например, Т–клетки), подвергают инфузии обратно пациенту. В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции и способы по изобретению используют в лечении злокачественных новообразований у млекопитающего, таких как лимфома, лимфоидный лейкоз, миелолейкоз, рак шейки матки, нейробластома или множественная миелома.

Индивидуумы для лечения

[0564] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению предназначены для лечения индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего заболевание или состояние, на которое нацелено терапевтическое применение. В некоторых случаях индивидуума для лечения можно выбирать до лечения с учетом одного или более признаков или параметров, например, для определения пригодности для терапии или для идентификации или выбора индивидуумов для лечения в соответствии с любым из вариантов осуществления настоящего изобретения, включая лечение с использованием любых из вариантов полипептидов CD80, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток или возбудителей инфекции по изобретению.

[0565] В некоторых аспектах индивидуума выбирают для лечения, если во время введения или непосредственно перед временем введения фармацевтической композиции, содержащей вариант полипептида CD80, как описано, индивидуум перенес рецидив после ремиссии после лечения или стал рефрактерным или неотвечающим на лечение антагонистом PD–1/PD–L1 или PD–1/PD–L2. В некоторых вариантах осуществления антагонист является антагонистом, не конкурирующим за связывание с PD–L1 с вариантом полипептида CD80 по изобретению, предназначенным для использования в способах лечения. В некоторых вариантах осуществления антагонист является антителом против PD–1. Неограничивающие примеры антител против PD–1 известны и включают ниволумаб или пембролизумаб или их антигенсвязывающие фрагменты.

[0566] В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают диагностические, прогностические способы или способы мониторинга с использованием

анализов связывания в отношении различных биологических образцов от пациентов, имеющих заболевание или состояние, которые, как известно или как предполагают, могут являться кандидатами для лечения в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют с использованием реагентов, с помощью которых можно определять CD28, PD–L1 и/или CTLA–4, для выбора индивидуумов, имеющих опухоли или инфильтраты опухолевых клеток, экспрессирующие один или более партнеров по связыванию для варианта полипептида CD80, предназначенного для использования в терапевтических способах. Такие реагенты можно использовать в качестве сопутствующих диагностических средств для выбора индивидуумов, которые вероятнее всего получат пользу от лечения молекулами или фармацевтическими композициями по изобретению, и/или для прогнозирования эффективности лечения.

[0567] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам выбора индивидуумов и/или прогнозирования эффективности лечения с использованием терапии по изобретению с учетом антагонистической активности в отношении взаимодействия PD–L1/PD–1 и/или с учетом агонизма CD28, такого как PD–L1–зависимая костимуляция CD28, включая способы повышения иммунного ответа для лечения заболевания или состояния и/или для лечения опухоли или злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления реагент является PD–L1–связывающим реагентом, специфически связывающимся с PD–L1 на поверхности клетки, такой как поверхность опухолевой клетки или миелоидной клетки, присутствующей в окружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления реагент является CD28–связывающим реагентом, специфически связывающимся с CD28 на поверхности клетки, такой как поверхность инфильтрирующей иммунной клетки, такой как лимфоцит, например, Т–клетка. В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент может являться антитело или антигенсвязывающий фрагмент, белковый лиганд или партнер по связыванию, аптамер, аффимер, пептид или гаптен. В некоторых вариантах осуществления такие реагенты можно использовать в качестве сопутствующих диагностических средств для выбора или идентификации индивидуумов для лечения с использованием терапевтического средства или фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, содержащей вариант полипептида CD80, представляющий собой или содержащий домен IgSF (например, IgV), демонстрирующий повышенное связывание с PD–L1 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, включая иммуномодулирующие белки или конъюгаты. Такие терапевтические средства включают форматы, в которых внеклеточную часть варианта полипептида CD80, содержащую аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV) соединяют, прямо или косвенно, с доменом мультимеризации, например, Fc–доменом или –областью. В некоторых вариантах осуществления такое терапевтическое средство является слитым белком вариант CD80–Fc.

[0568] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент является

антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с PD–L1. Известны различные реагенты для сопутствующей диагностики для детекции PD–L1, включая внутриклеточный или внеклеточный PD–L1, например, Roach et al. (2016) Appl. Immunohistochem., Mol. Morphol., 24:392–397; Cogswell et al. (2017) Mol. Diagn. Ther. 21:85–93; опубликованные международные патентные заявки №№ WO2015/181343 или WO2017/085307, или опубликованные патентные заявки США №№ US2016/0009805 или US2017/0285037. Неограничивающие примеры антител против PD–L1 включают клон антитела мыши против PD–L1 22C3 (Merck & Co.), клон антитела кролика против PD–L1 28–8 (Bristol–Myers Squibb), клоны антитела кролика против PD–L1 SP263 или SP142 (Spring Biosciences) и клон антитела кролика против PD–L1 E1L3N. Такие связывающие реагенты можно использовать в способах гистохимии, включая такие доступные реагенты, как анализ Dako PD–L1 IHC 22C3 pharmDx, анализ PD–L1 IHC 28–8 pharmDx, анализ Ventana PD–L1 (SP263) или анализ Ventana PD–L1 (SP142).

[0569] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент представляет собой или содержит вариант полипептида CD80, представленный в настоящем описании, включая любой вариант полипептида CD80, демонстрирующий измененную (например, повышенную) аффинность связывания с PD–L1, CD28 и/или CTLA–4 по сравнению с немодифицированным полипептидом CD80 или полипептидом CD80 дикого типа. Таким образом, настоящее изобретение также относится к связывающим реагентам для использования в качестве сопутствующих диагностических средств, содержащих любые из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к способу детекции PD–L1, CD28 и/или CTLA–4 в биологическом образце посредством приведения биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим любой из вариантов полипептидов CD80, представленных в настоящем описании. В некоторых аспектах связывающие реагенты, содержащие вариант полипептида CD80, включая иммуномодулирующие белки или конъюгаты, представленные в настоящем описании, можно использовать по отдельности или в комбинации в диагностических, прогностических способах или способах мониторинга с использованием анализов связывания в различных биологических образцах от пациентов, имеющих заболевание или состояние, которые, как известно или как предполагают, могут являться кандидатами для лечения в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления связывающие реагенты на основе варианта CD80 и способы с использованием связывающих реагентов на основе варианта CD80 можно использовать для выбора индивидуумов для лечения с использованием любых из вариантов полипептидов CD80, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток или возбудителей инфекции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 в связывающем реагенте является тем же или содержит тот же аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV–домен), что и вариант полипептида CD80, используемый для лечения. В других вариантах осуществления вариант полипептида

CD80 в связывающем реагенте отличается или содержит иной аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV–домен), чем вариант полипептида CD80 для лечения.

[0570] Связывающий реагент, представляющий собой или содержащий вариант полипептида CD80, может содержать любую одну или более из модификаций аминокислот (например, замен, делеций или инсерций аминокислот), представленных в настоящем описании, включая любые модификации, описанные в разделе II. В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент на основе варианта CD80 можно выбирать с учетом любой желаемой активности связывания, включая, в некоторых случаях, возможность специфического связывания или детекции одного, двух или, в некоторых случаях, каждого из эктодоменов PD–L1, CD28 и CTLA–4 на поверхности клетки в биологическом образце.

[0571] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент, представляющий собой или содержащий вариант полипептида CD80, специфически связывается с эктодоменом CTLA–4 на поверхности клетки, такой как поверхность клетки Treg. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV), демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CTLA–4 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, таким как любой CD80, представленный в настоящем описании. Примеры таких вариантов полипептидов CD80 включают любые варианты полипептидов CD80, содержащие модификации аминокислот в домене IgSF (например, IgV), как описано в разделе II.A.1.

[0572] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент, представляющий собой или содержащий вариант полипептида CD80, специфически связывается с эктодоменом CD28 на поверхности клетки, такой как поверхность инфильтрирующей опухоль клетки. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV), демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CD28 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, таким как любой CD80, представленный в настоящем описании. Примеры таких вариантов полипептидов CD80 включают любые варианты полипептидов CD80, содержащие модификации аминокислот в домене IgSF (например, IgV), как описано в разделе II.A.2.

[0573] В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент, представляющий собой или содержащий вариант полипептида CD80, специфически связывается с эктодоменом PD–L1 на поверхности клетки, такой как поверхность опухолевой клетки или миелоидной клетки, присутствующей в окружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV), демонстрирующий повышенную аффинность связывания с PD–L1 по сравнению с немодифицированным CD80 или CD80 дикого типа, таким как любой CD80, представленный в настоящем

описании. Примеры таких вариантов полипептидов CD80 включают любые варианты полипептидов CD80, содержащие модификации аминокислот в домене IgSF (например, IgV), как описано в разделе II.A.3.

[0574] Связывающий реагент на основе варианта CD80 можно получать в любом формате, включая любой формат, представленный в настоящем описании, подходящий для использования в анализах связывания и способах детекции. В некоторых вариантах осуществления связывающий реагент содержит вариант полипептида CD80, представляющий собой или содержащий домен IgSF (например, IgV), включая иммуномодулирующие белки или конъюгаты. Такие терапевтические средства включают форматы, в которых внеклеточную часть варианта полипептида CD80, содержащую аффинно–модифицированный домен IgSF (например, IgV) соединяют, прямо или косвенно, с доменом мультимеризации, например, Fc–доменом или –областью. В некоторых вариантах осуществления такой связывающий реагент является слитым белком вариант CD80–Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc–домен является не принадлежащим человеку Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc является Fc мыши, таким как Fc из IgG мыши, например, IgG1 мыши, IgG2a мыши или IgG2b мыши или другого изотипа мыши. В некоторых вариантах осуществления Fc мыши представляет собой или содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3040, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 3040. В некоторых вариантах осуществления Fc мыши можно подвергать детекции с использованием вторичного антитела против IgG мыши (например, антитела козы против IgG мыши). В некоторых вариантах осуществления Fc является Fc кролика, таким как Fc из IgG кролика. В некоторых вариантах осуществления Fc кролика представляет собой или содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3039, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 3039. В некоторых вариантах осуществления Fc кролика можно подвергать детекции с использованием вторичного антитела против IgG кролика (например, антитела козы против IgG кролика). Вариант полипептида CD80 из связывающих реагентов по изобретению можно, прямо или косвенно, соединять с доменом мультимеризации, таким как Fc–домен. В некоторых аспектах вариант полипептида CD80 из связывающих реагентов по изобретению косвенно соединяют с последовательностью Fc, например, через линкер, включая любой линкер, описанный в разделе II.

[0575] Связывающий реагент можно конъюгировать, например, подвергать слиянию, прямо или косвенно, с детектируемой меткой для детекции. В некоторых случаях связывающий реагент связывают или присоединяют к функциональному фрагменту, делающему возможной прямую детекцию или детекцию с помощью

вторичных средств, таких как антитела, связывающиеся с реагентом или частью реагента и соединенные с детектируемой меткой. Примеры детектируемых меток включают, например, хемилюминесцентные функциональные фрагменты, биолюминесцентные функциональные фрагменты, флуоресцентные функциональные фрагменты, радионуклиды и металлы. Способы детекции меток хорошо известны в этой области. Такую метку можно определять, например, посредством визуального осмотра, флуоресцентной спектроскопии, измерения коэффициента отражения, проточной цитометрии, рентгенографии, различных способов магнитного резонанса, таких как магнитно–резонансная томография (MPT) и магнитно–резонансная спектроскопия (MRS). Способы детекции также включают любые из способов томографии, включая компьютерную томографию (КТ), компьютерную аксиальную томографию (CAT), электронно–лучевую компьютерную томографию (EBCT), компьютерную томографию высокого разрешения (HRCT), гипоциклоидную томографию, позитронно–эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT), спиральную компьютерную томографию и ультразвуковую томографию. Примеры детектируемых меток включают, например, хемилюминесцентные функциональные фрагменты, биолюминесцентные функциональные фрагменты, флуоресцентные функциональные фрагменты, радионуклиды и металлы. Детектируемые метки включают флуоресцентные зонды или детектируемые ферменты, например, пероксидазу хрена.

[0576] С помощью связывающих реагентов можно определять партнера по связыванию, например, PD–L1, CD28 или CTLA–4, с использованием любого анализа связывания, известного специалисту в этой области, включая анализы in vitro или in vivo. Неограничивающие примеры анализов связывания, которые можно использовать для анализа, оценки, определения, количественного анализа и/или иной специфической детекции экспрессии или уровней партнера по связыванию, например, PD–L1, CD28 или CTLA–4, в образце, включают твердофазные анализы связывания (например твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)), радиоиммунологический анализ (RIA), иммунорадиометрический анализ, анализ флуоресценции, хемилюминесцентный анализ, биолюминесцентный анализ, вестерн–блоттинг и способы гистохимии, такие как иммуногистохимия (IHC) или псевдоиммуногистохимия с использованием неантительного связывающего средства. В способах твердофазного анализа связывания, таких как способы ELISA, например, анализ может иметь сэндвич–формат или формат конкурентного ингибирования. В других примерах можно использовать способы визуализации in vivo. Анализ связывания можно осуществлять на образцах, полученных из образца физиологической жидкости, клетки или ткани пациента любого типа, включая плазму, мочу, опухолевые или предполагаемые опухолевые ткани (включая свежую, замороженную и фиксированную или залитую в парафин ткань), лимфоузел или костный мозг. В примерах способов выбора индивидуума для лечения в соответствии с терапевтическими способами, представленными в настоящем описании, получение образца, например, опухолевой ткани, осуществляют перед лечением индивидуума.

[0577] В некоторых вариантах осуществления анализ связывания является анализом окрашивания ткани для детекции экспрессии или уровней партнера по связыванию в образце ткани или клеток. Способы окрашивания ткани включают, в качестве неограничивающих примеров, цитохимические или гистохимические способы, такие как иммуногистохимия (IHC) или гистохимия с использованием неантительного связывающего средства (например, псевдоиммуногистохимия). Такие гистохимические способы делают возможной количественную или полуколичественную детекцию количества партнера по связыванию в образце, таком как образец опухолевой ткани. В таких способах образец ткани можно приводить в контакт со связывающим реагентом, например PD–L1–связывающим реагентом, и, в частности, связывающим реагентом, детектируемо меченым, или который можно подвергать детекции в условиях, делающих возможным связывание с ассоциированным с тканью или клеткой партнером по связыванию.

[0578] Образец для использования в способах, представленных в настоящем описании, например, гистохимии, может являться любым биологическим образцом, ассоциированным с заболеванием или состоянием, таким как образец ткани или клеток. Например, образец ткани может являться солидной тканью, включая свежий, замороженный и/или консервированный образец органа или ткани, или биоптат, или аспират, или клетки. В некоторых примерах образец ткани представляет собой ткань или клетки, полученные из солидной опухоли, такой как первичные и метастазирующие опухоли, включая, в качестве неограничивающих примеров, злокачественные опухоли молочной железы, толстого кишечника, прямой кишки, легких, желудка, яичников, шейки матки, матки, яичек, мочевого пузыря, предстательной железы, щитовидной железы и легких. В конкретных примерах образец представляет собой образец ткани из злокачественного новообразования, являющегося злокачественным новообразованием на поздней стадии, метастазирующим злокачественным новообразованием, недифференцированным злокачественным новообразованием, раком яичников, карциномой in situ (ISC), плоскоклеточной карциномой (SCC), раком предстательной железы, раком поджелудочной железы, немелкоклеточным раком легких, раком молочной железы, раком толстого кишечника.

[0579] В некоторых аспектах, если опухоль является солидной опухолью, выделение опухолевых клеток можно осуществлять посредством хирургической биопсии. Способы биопсии, которые можно использовать для получения опухолевых клеток индивидуума, включают, в качестве неограничивающих примеров, пункционную биопсию, пункционную биопсию под контролем КТ, аспирационную биопсию, эндоскопическую биопсию, бронхоскопическую биопсию, бронхиальный лаваж, инцизионную биопсию, эксцизионную биопсию, трепанобиопсию, бритвенную биопсию, биопсию кожи, биопсию костного мозга и электрохирургическое петлевое иссечение (LEEP). Как правило, получают ненекротический, стерильный биоптат или образец, масса которого составляет более 100 мг, но может быть меньше, например, менее 100 мг, 50 мг

или менее, 10 мг или менее или 5 мг или менее; или больше, например, более 100 мг, 200 мг или более, или 500 мг или более, 1 г или более, 2 г или более, 3 г или более, 4 г или более или 5 г или более. Размер образца, выделяемого для анализа, может зависеть от ряда факторов, включая, в качестве неограничивающих примеров, количество анализов, которые необходимо осуществить, состояние образца ткани, тип злокачественного новообразования и состояние индивидуума. Опухолевую ткань помещают в стерильный сосуд, такой как стерильная пробирка или планшет для культивирования, и его, необязательно, можно погружать в соответствующую среду.

[0580] В некоторых вариантах осуществления ткань, полученную из пациента, после биопсии фиксируют, например, формалином (формальдегидом) или глутаральдегидом или посредством погружения в спирт. В случае гистохимических способов образец опухоли можно обрабатывать известными способами, такими как дегидратация и заливка опухолевой ткани парафином или другими твердыми средами, известными специалистам в этой области (см. Plenat et ah, (2001) Ann Pathol. January 21(l):29–47), получение срезов ткани, подходящих для окрашивания, и обработка срезов для окрашивания в соответствии с выбранным гистохимическим способом окрашивания, включая удаление твердых сред для заливки с помощью органических растворителей, например, и регидратация консервированной ткани.

[0581] В некоторых вариантах осуществления используют способы гистохимии. В некоторых случаях связывающий реагент напрямую присоединяют или связывают с детектируемой меткой или другим функциональным фрагментом для прямой или непрямой детекции. Неограничивающие примеры детектируемых реагентов включают биотин, флуоресцентный белок, биолюминесцентный белок или фермент. В других примерах связывающие реагенты конъюгируют, например, подвергают слиянию, с пептидами или белками, которые можно определять с помощью меченого партнера по связыванию или антитела. В некоторых примерах партнера по связыванию можно определять способами НС с использованием меченого вторичного реагента, такого как меченые антитела, распознающие одну или более областей, например, эпитопов, связывающего реагента.

[0582] В некоторых вариантах осуществления каждый из получаемых окрашенных образцов, например, полученных способами гистохимии, визуализируют с использованием системы для наблюдения за детектируемым сигналом и получения изображения, такого как цифровое изображение окрашивания. Способы получения изображений хорошо известны специалисту в этой области. Например, после окрашивания образца можно использовать любое оптическое или неоптическое устройство для визуализации для детекции красителя или метки биомаркера, такое как, например, прямые или инвертированные световые микроскопы, сканирующие конфокальные микроскопы, камеры, сканирующие или туннельные электронные микроскопы, сканирующие зондовые микроскопы и тепловизионный детектор. В некоторых примерах изображение можно получать цифровым способом. Затем

полученные изображения можно использовать для количественного или полуколичественного определения количества партнера по связыванию, например PD–L1, в образце. В этой области доступны различные автоматизированные системы пробоподготовки, сканирования и анализа, подходящие для использования в иммуногистохимии. Такие системы могут включать автоматизирование окрашивание и микроскопическое сканирование, компьютеризированный анализ изображений, сравнение серийных срезов (для контроля отклонений ориентации и размера образца), генерирование цифровых отчетов и архивирование и отслеживание образцов (таких как стекла, на которые помещают тканевые срезы). Коммерчески доступными являются системы визуализации клеток, в которых комбинируют общепринятые световые микроскопы с системами обработки цифровых изображений для осуществления количественного анализа с использованием клеток и тканей, включая подвергнутые иммуноокрашиванию образцы. См., например, систему CAS–200 (Becton, Dickinson & Co.). В частности, детекцию можно осуществлять вручную или способами обработки изображений, включающих использование компьютерных процессоров и программного обеспечения. Используя такое программное обеспечение, например, изображения можно конфигурировать, калибровать, стандартизировать и/или валидировать с учетом факторов, включающих, например, качество красителя или интенсивность красителя, с использованием способов, известных специалисту в этой области (см., например, опубликованную патентную заявку США № US20100136549).

[0583] В некоторых вариантах осуществления определяют, что поверхность клеток в биологическом образце является положительной по партнеру по связыванию, например PD–L1, CD28 или CTLA–4, если есть детектируемый уровень экспрессии партнера по связыванию (например, после приведения в контакт со связывающим реагентом и детекции связанного связывающего реагента) в по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 1% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 5% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 10% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 20% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 40% клеток или более.

[0584] В некоторых вариантах осуществления биологический образец является образцом опухолевой ткани, содержащим стромальные клетки, опухолевые клетки или инфильтрирующие опухоль клетки, такие как инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, например инфильтрирующие опухоль лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления в образце опухолевой ткани определяют клетки, положительные на поверхностный PD–L1, если есть детектируемый уровень экспрессии партнера по связыванию (например, после приведения в контакт со связывающим реагентом и детекции связанного связывающего реагента) в по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 1% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 5% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере

приблизительно, или приблизительно 10% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 20% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 40% клеток или более. В некоторых вариантах осуществления клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления в образце опухолевой ткани определяют клетки, положительные на поверхностный CD28, если есть детектируемый уровень экспрессии партнера по связыванию (например, после приведения в контакт со связывающим реагентом и детекции связанного связывающего реагента) в по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 1% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 5% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 10% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 20% клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или приблизительно 40% клеток или более. В некоторых вариантах осуществления клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами.

VIII. ПРИМЕРЫ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0585] Варианты осуществления настоящего изобретения включают:

1. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

2. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 1, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 26, 35, 46, 57 или 71 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

3. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где одна или более модификаций аминокислот являются заменой, инсерцией или делецией аминокислоты.

4. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–3, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, E23D, E23G, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, I30F, I30T, I30V, K34E, E35D, E35G, D46E, D46N, D46V, P51A, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, L65P, A71D, A71G, R73H, R73S, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, C82R, V84A и V84I, где положения модификаций аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

5. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–4, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из: I30F/L70P, Q27H/T41S/A71D,

I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, A71D, T13A/I61N/A71D, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, Q33R/K54N/T57I/I67V/A71D, E35D/T57I/L70Q/A71D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, V22A/E35D/V68E/A71D, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, R29H/E35D/M43V/M47I/I49V, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E,

V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, I30V/Y31C/E35D/M47V/A71G/L85M, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E35D/M47L/L70M, E35D/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V68M/E88D, E35D/D46V/M47L/V68M/D90G, E35D/D46V/M47L/V68M/K89N, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V70M, E35D/D46V/M47L/V70M/L85Q, E35D/M47V/N48K/V68M, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L,

H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, E35D/D46V, E35D/V68M, E35D/L85Q, D46V/M47L, D46V/V68M, D46V/L85Q, E35D/D46V/M47L, E35D/D46V/V68M, E35D/D46V/L85Q, E35D/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M, D46V/M47L/L85Q, D46V/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/L85Q, E35D/D46V/V68M/L85Q, E35D/M47L/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/N48K, E35D/K89N, E35D/M47V/N48K, E35D/M47V/V68M, E35D/M47V/K89N, E35D/N48K/V68M, E35D/N48K/K89N, E35D/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/K89N, E35D/M47V/V68M/K89N, E35D/N48K/V68M/K89N, E35D/D46V/M47V/N48K/V68M, E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47V/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q, E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M, A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G, M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/V68M/A71G/D90G,

H18Y/A26E/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L, E35D/V68M/A71G/D90G, E35D/M47L/A71G/D90G, E35D/M47L/V68M/D90G, E35D/M47L/V68M/A71G, A26E/V68M/A71G/D90G, A26E/M47L/A71G/D90G, A26E/M47L/V68M/D90G, A26E/M47L/V68M/A71G, A26E/E35D/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G, A26E/E35D/M47L/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M, H18Y/M47L/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/A71G/D90G, H18Y/E35D/V68M/D90G, H18Y/E35D/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G, H18Y/E35D/M47L/V68M, H18Y/A26E/V68M/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/D90G, H18Y/A26E/M47L/A71G, H18Y/A26E/M47L/V68M, H18Y/A26E/E35D/A71G H18Y/A26E/E35D/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

6. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, T28Y, I30F, I30T, Y31C, Y31S, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54E, K54N, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, N63D, L65P, I67L, I67V, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73H, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L,

T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87Q, E88V, D90P, F92S, F92V, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

7. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 6, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из: I30F/L70P, Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, A71D, E81K/A91S, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, V22A/E35D/V68E/A71D, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G,

E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, R29H/E35D/M43V/M47I/I49V, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, I30V/Y31C/E35D/M47V/A71G/L85M, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E35D/M47L/L70M, E35D/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V68M/E88D, E35D/D46V/M47L/V68M/D90G, E35D/D46V/M47L/V68M/K89N, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V70M, E35D/D46V/M47L/V70M/L85Q, E35D/M47V/N48K/V68M, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C,

E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, E35D/D46V, E35D/V68M, E35D/L85Q, D46V/M47L, D46V/V68M, D46V/L85Q, M47L/V68M, M47L/L85Q, V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L, E35D/D46V/V68M, E35D/D46V/L85Q, E35D/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M, D46V/M47L/L85Q, D46V/V68M/L85Q, M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/L85Q, E35D/D46V/V68M/L85Q, E35D/M47L/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/N48K, E35D/K89N, M47V/N48K, M47V/V68M, M47V/K89N, N48K/V68M, N48K/K89N, E35D/M47V/N48K, E35D/M47V/V68M, E35D/M47V/K89N, E35D/N48K/V68M, E35D/N48K/K89N, E35D/V68M/K89N, M47V/N48K/V68M, M47V/N48K/K89N, M47V/V68M/K89N, N48K/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/K89N, E35D/M47V/V68M/K89N, E35D/N48K/V68M/K89N, M47V/N48K/V68M/K89N, E35D/D46V/M47V/N48K/V68M, E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47V/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q, E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,

H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M, A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G, M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L, E35D/V68M/A71G/D90G, E35D/M47L/A71G/D90G, E35D/M47L/V68M/D90G, E35D/M47L/V68M/A71G, A26E/V68M/A71G/D90G, A26E/M47L/A71G/D90G, A26E/M47L/V68M/D90G, A26E/M47L/V68M/A71G, A26E/E35D/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G, A26E/E35D/M47L/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M, H18Y/M47L/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/A71G/D90G, H18Y/E35D/V68M/D90G, H18Y/E35D/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G, H18Y/E35D/M47L/V68M, H18Y/A26E/V68M/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/D90G, H18Y/A26E/M47L/A71G, H18Y/A26E/M47L/V68M, H18Y/A26E/E35D/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

8. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 6 или варианту

осуществления 7, где:

одна или более модификаций аминокислот выбраны из V20I, V22I, V22L, A26E, Q27H, Q33L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M43L, D46E, D46V, M47I, M47L, M47V, N55D, T57I, I61V, L70M, A71D, A71G, L72V, L85M, L85Q, R94W и L97Q;

необязательно, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из V20I, V22L, A26E, Q27H, Q33L, Q33R, E35D, E35G, M47I, D46E, D46V, M47L, M47V, T57I, L70M, A71D, A71G, L72V, L85M, L85Q и L97Q;

необязательно, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из A26E, Q33L, E35D, M47I, M47L, M47V, T57I, L70M, A71D, A71G и L85Q;

необязательно, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из A26E, E35D, D46V, M47L, M47V, L70M, A71G и L85Q.

где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

9. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 6–8, где:

одна или более модификаций аминокислот включают A26E;

одна или более модификаций аминокислот включают E35D;

одна или более модификаций аминокислот включают D46V;

одна или более модификаций аминокислот включают M47L;

одна или более модификаций аминокислот включают M47V; и/или

одна или более модификаций аминокислот включают A71G,

где положения модификаций аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

10. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 6–9, где модификации аминокислот выбраны из E35D/D46E, E35D/D46V, E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/M47V, E35D/V68M, E35D/A71G, E35D/D90G; D46E/M47I, D46E/M47L, D46E/M47V, D46E/V68M, D46E/A71G или D46E/D90G; M47I/V68M, M47I/A71G, M48I/D90G; M47L/V68M, M47L/A71G, M47L/D90G; M47V/V68M, M47V/A71G, M47V/D90G; V68M/A71G или V68M/D90G, A71G/D90G, необязательно, где модификации аминокислот представляют собой E35D/M47I/V68M, E35D/M47L/V68M, E35D/M47V/V68M,

где положения модификаций аминокислот соответствуют нумерации положений CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2.

11. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более замен аминокислот, включающих по меньшей мере замену аминокислоты L70P, но не включающих замены аминокислот V68M, L72P и/или K86E, где положения модификаций аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

12. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 11, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из: L70P, I30F/L70P, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T,

N55D/L70P/E77G и L70P/F92S.

13. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–12, где немодифицированный CD80 является CD80 млекопитающего.

14. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–13, где CD80 является CD80 человека.

15. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–14, где вариант полипептида CD80 содержит:

IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент; и

IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

16. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–15, где немодифицированный CD80 содержит (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2; или (iii) является его частью, содержащей IgV–домен, или IgC–домен, или их специфически связывающиеся фрагменты.

17. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–15, где:

специфически связывающийся фрагмент IgV–домена или IgC–домена имеет длину по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более аминокислот;

специфически связывающийся фрагмент IgV–домена имеет длину, составляющую по меньшей мере 80% длины IgV–домена, приведенного как аминокислоты 35–135, 35–138, 37–138 или 35–141 SEQ ID NO: 1; или

специфически связывающийся фрагмент IgC–домена имеет длину, составляющую по меньшей мере 80% длины IgC–домена, приведенного как аминокислоты 145–230, 154–232 или 142–232 SEQ ID NO: 1.

18. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–17, где вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот, необязательно, замен, инсерций и/или делеций аминокислот.

19. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–18, где вариант полипептида CD80 содержит аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2 или ее специфически связывающемуся фрагменту.

20. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–19, где вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его конкретный фрагмент и IgC–домен или его конкретный фрагмент.

21. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–20, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507 и 2930–2960 или их специфически связывающемся фрагменте, или аминокислотной последовательности, демонстрирующей

по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507 и 2930–2960 или их специфически связывающемся фрагменте и содержащей одну или более модификаций аминокислот.

22. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–19, где вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

23. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–19 и 22, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

24. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–19, 22 и 23, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929 и 2961–3022 или их специфически связывающемся фрагменте, аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929 и 2961–3022 или их специфически связывающемуся фрагменту и содержащей одну или более модификаций аминокислот.

25. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–19, где IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

26. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–25, где вариант полипептида CD80 демонстрирует измененное связывание с эктодоменом CTLA–4, PD–L1 и/или CD28 по сравнению со связыванием немодифицированного CD80 с эктодоменом.

27. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 26, где измененное связывание представляет собой измененную аффинность связывания и/или измененную селективность связывания.

28. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 26 или варианту осуществления 27, где CTLA–4 является CTLA–4 человека.

29. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 26–28, где CD28 является CD28 человека.

30. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 26–29, где PD–L1 является PD–L1 человека.

31. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–30, где вариант CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом CTLA4 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA4.

32. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте,

соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 35, 46, 57, 58, 71, 73, 79 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

33. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20I, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30V, Q33L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, Y53F, K54E, K54R, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, I67L, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73H, P74S, T79I, T79M, E81G, E81K, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, E88V, D90P, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V и L97Q, где положения модификаций аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

34. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–33, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из:

Q27H/T41S/A71D, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E35D/M47I, M47V/N48H, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/M47L, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, V22A/E35D/V68E/A71D, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,

E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G,

H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

35. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 31–34, где повышенная аффинность к эктодомену CTLA–4 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4.

36. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–35, где вариант полипептид специфически связывается с эктодоменом CTLA–4 с повышенной селективностью по сравнению со связыванием немодифицированного CD80 с эктодоменом CTLA–4.

37. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 36, где повышенная селективность включает более высокое соотношение связывания варианта полипептид с CTLA–4 относительно CD28 по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида CD80 с CTLA–4 относительно CD28.

38. Вариант полипептида CD80 вариант осуществления 37, где соотношение выше по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более.

39. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31, где вариант CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

40. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31 и 39, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 23, 26, 35, 46, 55, 57, 58, 71, 79 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

41. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31, 39 и 40, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из T13R, S15T, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20I, V22D, V22L, E23D, E23G, E24D, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q33R, E35D, E35G, T41S, M42V, M43L, D46E, D46N, D46V, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48K, N48Y, Y53F, K54E, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, I67L, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, T79I, T79M, V84I, L85M, L85Q, Y87C, Y87D, E88V, D90P, R94Q, R94W, E95V и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

42. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31 и 39–41, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из:

Q27H/T41S/A71D, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, V22A/E35D/V68E/A71D, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/N48K/L72V, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L,

H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N,
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M,
H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G,
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V,
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M,
H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V,
H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M,
H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M,
S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L,
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M,
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G,
V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G,
H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G,
H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G,
H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G,
H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G,
H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G,
H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G,
H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G,
A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G,
H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,
H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G,
H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,
H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,
H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G,
H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G,
H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и
H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

43. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 39–42, где повышенная аффинность к эктодомену CD28 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз или 200 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

44. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31, где вариант CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

45. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31 и 44, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в

немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 23, 26, 30, 34, 35, 46, 51, 55, 57, 58, 65, 71, 73, 78, 79, 82 и/или 84 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

46. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31 и 44, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, T13A, T13R, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, I30T, I30V, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, L65P, I67L, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73S, P74S, D76H, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, D90P, F92S, F92V, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M и L97Q, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

47. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–31 и 44–46, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из:

Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, M47V/I69F/A71D/V83I, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q,

V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N,

E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G,

H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

48. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 44–47, где повышенная аффинность к эктодомену PD–L1 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или 450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

49. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–38 и 44–48, где вариант CD80 демонстрирует сниженную аффинность связывания с эктодоменом CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

50. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–38 и 44–49, где сниженная аффинность к эктодомену CD28 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

51. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–50, где вариант полипептид специфически связывается с эктодоменом PD–L1 с повышенной селективностью по сравнению со связыванием немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

52. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 51, где повышенная селективность включает более высокое соотношение связывания варианта полипептида с PD–L1 относительно CD28 по сравнению с соотношением связывания немодифицированного полипептида CD80 с PD–L1 относительно CD28.

53. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 52, где соотношение выше по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более.

54. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–53, являющийся растворимым белком.

55. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–54, где:

в варианте полипептида CD80 отсутствует трансмембранный домен CD80 и внутриклеточный сигнальный домен; и/или

вариант полипептида CD80 не может экспрессироваться на поверхности клетки.

56. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–55, где вариант полипептида CD80 соединяют с функциональным фрагментом, повышающим биологическое время полужизни полипептида.

57. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–56, где вариант полипептида CD80 соединяют с доменом мультимеризации.

58. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 57, где домен мультимеризации является Fc–доменом или вариантом Fc–домена со сниженной эффекторной функцией.

59. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 58, где:

Fc–домен принадлежит млекопитающему, необязательно, человеку, мыши или кролику; или

вариант Fc–домена содержит одну или более модификаций аминокислот по сравнению с немодифицированным Fc–доменом, принадлежащим млекопитающему, необязательно, человеку.

60. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 58 или варианту осуществления 59, где:

Fc–домен или его вариант содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 359 или SEQ ID NO: 1712, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 359 или SEQ ID NO: 1712; или

Fc–домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3039 или 3040, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 3039 или 3040.

61. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 58–60, где Fc–домен содержит одну или более модификаций аминокислот, выбранных из E233P, L234A, L234V, L235A, L235E, G236del, G237A, S267K, N297G, V302C и K447del, каждая из которых соответствует нумерации EU, необязательно, где одна или более модификаций аминокислот находятся в IgG1 человека.

62. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 58–60, где Fc–домен содержит модификацию аминокислоты C220S в соответствии с нумерацией EU.

63. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 58–62, где Fc–домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 356–358, 376 и 1712–1715, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 356–358, 376 и 1712–1715 и демонстрирующую сниженную

эффекторную функцию.

64. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 57–63, где вариант полипептида CD80 соединяют с доменом мультимеризации или Fc косвенно через линкер, необязательно, линкер G4S.

65. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–53, где вариант полипептида CD80 является трансмембранным иммуномодулирующим белком, дополнительно содержащим трансмембранный домен, необязательно, где трансмембранный домен соединяют, прямо или косвенно, с внеклеточным доменом (ECD) или его специфически связывающимся фрагментом из варианта полипептида CD80.

66. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 65, где трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную как остатки 243–263 SEQ ID NO: 1, или ее функциональный вариант, демонстрирующий по меньшей мере 85% идентичности последовательности по отношению к остаткам 243–263 SEQ ID NO: 1.

67. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 65 или варианту осуществления 66, дополнительно содержащий цитоплазматический сигнальный домен, необязательно, где цитоплазматический сигнальный домен соединяют, прямо или косвенно, с трансмембранным доменом.

68. Вариант полипептида CD80 по варианту осуществления 67, где цитоплазматический сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, приведенную как остатки 264–288 SEQ ID NO: 1, или ее функциональный вариант, демонстрирующий по меньшей мере 85% идентичности последовательности по отношению к остаткам 254–288 SEQ ID NO: 1.

69. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–68, где вариант CD80 повышает экспрессию ИФН–гамма (интерферона гамма) относительно немодифицированного CD80 в анализе первичных Т–клеток in vitro.

70. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–68, где вариант CD80 снижает экспрессию ИФН–гамма (интерферона гамма) относительно немодифицированного CD80 в анализе первичных Т–клеток in vitro.

71. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–70, являющийся дегликозилированным.

72. Иммуномодулирующий белок, содержащий вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71 и увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент.

73. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 72, где увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент содержит домен мультимеризации, альбумин, альбумин–связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), С–концевой пептид (CTP) бета–субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксиэтилкрахмал (HES), альбумин–

связывающее низкомолекулярное соединение или их комбинацию.

74. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 72 или варианту осуществления 73, где увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент представляет собой или содержит Pro/Ala/Ser (PAS), и вариант полипептида CD80 является ПАСилированным.

75. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 72 или варианту осуществления 73, где увеличивающий время полужизни функциональный фрагмент представляет собой или содержит домен мультимеризации.

76. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 75, где домен мультимеризации выбран из Fc–области иммуноглобулина, лейциновой молнии, изолейциновой молнии или цинкового пальца.

77. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 75 или варианту осуществления 76, где иммуномодулирующий белок является мультимером, содержащим первый вариант полипептида CD80, соединенный с первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80, соединенный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй варианты полипептида CD80.

78. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 77, где мультимер является димером.

79. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 77 или варианту осуществления 78, где первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми.

80. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 78 или варианту осуществления 79, где димер является гомодимером.

81. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 78, где димер является гетеродимером.

82. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 75–81, где домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc–область иммуноглобулина.

83. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 82, где Fc–область получают из белка иммуноглобулина G1 (IgG1) или иммуноглобулина G2 (IgG2).

84. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 82 или варианту осуществления 83, где иммуноглобулиновый белок принадлежит человеку, и/или Fc–область принадлежит человеку.

85. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 82–84, где Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 278, или ее вариант, демонстрирующий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 278.

86. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 82–85,

где Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 277, или ее вариант, демонстрирующий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 277.

87. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 82–86, где Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций.

88. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 82–87, где иммуномодулирующий белок демонстрирует Fc–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, в анализе стимуляции Т–клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток, необязательно, где Т–клетки включают клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2, или первичные Т–клетки человека, продуцирующие воспалительные цитокины, такие как ИЛ–2.

89. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 82–86, где Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций, сниженных по сравнению с Fc–областью дикого типа, необязательно, где Fc–область дикого типа является Fc IgG1 человека.

90. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 87–89, где одна или более эффекторных функций выбраны из антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), обусловленной комплементом цитотоксичности, программируемой гибели клеток и клеточного фагоцитоза.

91. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 89 или варианту осуществления 90, где Fc–область является вариантом Fc–области, содержащим одну или более замен аминокислот по сравнению с Fc–областью дикого типа.

92. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 91, где одна или более замен аминокислот в варианте Fc–области выбраны из N297G, R292C/N297G/V302C, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K или L234A/L235E/G237A, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

93. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 92, где вариант Fc–области дополнительно содержит замену аминокислоты C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

94. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 89–93, где Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 356–358, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 356–358 и содержащую замены аминокислот.

95. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 89–94, где Fc–область содержит K447del, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

96. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 89–93 и

95, где Fc–область содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1713–1715, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 1713–1715 и содержащую замены аминокислот.

97. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 82–96, где вариант полипептида CD80 является вариантом полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 44–48.

98. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–97, где иммуномодулирующий белок демонстрирует PD–L1–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, в анализе стимуляции Т–клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих PD–L1, необязательно, где Т–клетки включают клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2, или первичные Т–клетки человека, продуцирующие воспалительные цитокины, такие как ИЛ–2.

99. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–98, где вариант полипептида CD80 соединяют, прямо или косвенно через линкер, с увеличивающим время полужизни функциональным фрагментом, необязательно, доменом мультимеризации.

100. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 99, где линкер содержит от 1 до 10 аминокислот.

101. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 100, где линкер выбран из AAA, G4S (SEQ ID NO: 1717) или $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 330).

102. Иммуномодулирующий белок, содержащий вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, соединенный, прямо или косвенно через линкер, со вторым полипептидом, содержащим домен члена суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF).

103. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 102, где домен IgSF является аффинно–модифицированным доменом IgSF, содержащим одну или более модификаций аминокислот по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа члена семейства IgSF.

104. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 103, где домен IgSF является аффинно–модифицированным доменом IgSF, демонстрирующим измененное связывание с одним или более из его когнатных партнеров по связыванию по сравнению со связыванием немодифицированного домена IgSF или домена IgSF дикого типа члена семейства IgSF с теми же одним или более когнатными партнерами по связыванию.

105. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 104, где домен IgSF демонстрирует повышенное связывание с одним или более из его когнатных партнеров по связыванию по сравнению со связыванием немодифицированного домена IgSF или домена IgSF дикого типа члена семейства IgSF с теми же одним или более когнатными партнерами по связыванию.

106. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–105, где вариант полипептида CD80 является первым вариантом полипептида CD80, и домен IgSF второго полипептида является доменом IgSF из второго варианта полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, где первый и второй варианты полипептидов CD80 являются одинаковыми или отличаются.

107. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–106, где вариант полипептида CD80 может специфически связываться с CTLA–4, и домен IgSF второго полипептида может связываться с когнатным партнером по связыванию, иным, чем партнер по связыванию, специфически связанный вариантом полипептида CD80.

108. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–107, где домен IgSF второго полипептида является локализующим в опухоли функциональным фрагментом, связывающимся с лигандом, экспрессирующимся на опухоли, или связывающимся с лигандом, экспрессирующимся на опухоли, или являющимся воспалительно–локализующим функциональным фрагментом, связывающимся с клеткой или тканью, ассоциированными с воспалительным окружением.

109. Иммуномодулирующий полипептид по варианту осуществления 108, где лиганд является B7H6.

110. Иммуномодулирующий полипептид по варианту осуществления 108 или варианту осуществления 109, где домен IgSF получают из NKp30.

111. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–107, где домен IgSF второго полипептида является доменом IgSF лиганда, связывающегося с ингибиторным рецептором, или его аффинно–модифицированным доменом IgSF.

112. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 111, где аффинно–модифицированный домен IgSF демонстрирует повышенную аффинность связывания и/или селективность связывания с ингибиторным рецептором по сравнению со связыванием немодифицированного домена IgSF с тем же ингибиторным рецептором.

113. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 111 или 112, где:

ингибиторный рецептор является TIGIT или PD–1; или

лиганд ингибиторного рецептора является CD155, CD112, PD–L1 или PD–L2.

114. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–107 и 111–113, где второй полипептид выбран из:

(i) CD112 дикого типа, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 269, 734 или 829, или варианта полипептида CD112, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 735–828, 830–999, 1430–1501;

(ii) CD155 дикого типа, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 268, 378 или 421, или варианта полипептида CD155, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 379–420, 422–733, 1502–1711;

(iii) PD–L1 дикого типа, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 251, 1000, 1721 или 1196, или варианта полипептида PD–L1, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1001–1195, 1718–1720, 1722–1996;

(iv) PD–L2 дикого типа, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 252, 1197 или 1257, или варианта полипептида PD–L2, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1198–1248, 1250–1256, 1258–1325, 1327–1401, 1403–1426;

(v) аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO в (i)–(iv) и содержащей замену аминокислоты; или

(vi) специфически связывающегося фрагмента любого из (i)–(v).

115. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–114, дополнительный содержащий третий полипептид, содержащий домен IgSF члена семейства IgSF или его аффинно–модифицированный домен IgSF, содержащий одну или более модификаций аминокислот по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа члена семейства IgSF.

116. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 115, где:

третий полипептид является тем же, что и первый и/или второй полипептид; или

третий полипептид отличается от первого и/или второго полипептида.

117. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 115 и варианту осуществления 116, где третий полипептид выбран из:

(i) CD112 дикого типа, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 269, 734 или 829, или варианта полипептида CD112, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 735–828, 830–999, 1430–1501;

(ii) CD155 дикого типа, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO:268, 378 или 421, или варианта полипептида CD155, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 379–420, 422–733, 1502–1711;

(iii) PD–L1 дикого типа, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 251, 1000, 1721 или 1196, или варианта полипептида PD–L1, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1001–1195, 1718–1720, 1722–1996;

(iv) PD–L2 дикого типа, содержащего IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 252, 1197 или 1257, или варианта полипептида PD–L2, содержащего домен IgSF, приведенный в любой из SEQ ID NO: 1198–1248, 1250–1256, 1258–1325, 1327–1401, 1403–1426;

(v) аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO в (i)–(iv) и содержащей замену аминокислоты; или

(vi) специфически связывающегося фрагмента любого из (i)–(v).

118. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–117, где домен IgSF или аффинно–модифицированный домен IgSF, необязательно, из второго или третьего полипептида представляет собой или содержит IgV–домен.

119. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–118, где вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит IgV–домен.

120. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 115–119, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный полипептид, содержащий домен IgSF члена семейства IgSF или его аффинно–модифицированный домен IgSF, содержащий одну или более модификаций аминокислот по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа члена семейства IgSF.

121. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 102–120, где иммуномодулирующий белок дополнительно содержит домен мультимеризации, соединенный по меньшей мере с одним из варианта полипептида CD80 или второго полипептида.

122. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 115–120, где иммуномодулирующий белок дополнительно содержит домен мультимеризации, соединенный по меньшей мере с одним из варианта полипептида CD80, второго полипептида и/или третьего полипептида.

123. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 121 или 122, где домен мультимеризации является Fc–доменом или его вариантом со сниженной эффекторной функцией.

124. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 121–123, где домен мультимеризации способствует образованию гетеродимера.

125. Иммуномодулирующий белок, содержащий первый вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 57–64, в котором домен мультимеризации является первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 57–64, в котором домен мультимеризации является вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй варианты полипептида CD80.

126. Иммуномодулирующий белок, содержащий иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 77–81, где домен мультимеризации является первым доменом мультимеризации и взаимодействует со вторым доменом мультимеризации с образованием мультимера, содержащего иммуномодулирующий белок.

127. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 126, где иммуномодулирующий белок является первым иммуномодулирующим белком, и второй иммуномодулирующий белок соединяют, прямо или косвенно через линкер, со вторым доменом мультимеризации, где мультимер содержит первый и второй иммуномодулирующие белки.

128. Иммуномодулирующий белок по варианту осуществления 127, где второй

иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком по любому из вариантов осуществления 77–81, где домен мультимеризации является вторым доменом мультимеризации.

129. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 125–128, где мультимер является димером.

130. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 125–129, являющийся гомодимером.

131. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 125–129, являющийся гетеродимером.

132. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 125–131, где первый и/или второй домены мультимеризации являются Fc–доменом или его вариантом со сниженной эффекторной функцией.

133. Иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 125–132, где первый и второй домены мультимеризации являются одинаковыми или отличаются.

134. Конъюгат, содержащий вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71 или иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–133, соединенный с функциональным фрагментом, необязательно, где конъюгат является слитым белком.

135. Конъюгат по варианту осуществления 134, где функциональный фрагмент является направляющим функциональным фрагментом, специфически связывающимся с молекулой на поверхности клетки.

136. Конъюгат по варианту осуществления 135, где направляющий функциональный фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки, необязательно, где иммунная клетка является антигенпрезентирующей клеткой или лимфоцитом.

137. Конъюгат по варианту осуществления 135, где направляющий функциональный фрагмент является локализующим в опухоли функциональным фрагментом, связывающимся с молекулой на поверхности опухоли.

138. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 134–137, где функциональный фрагмент является белком, пептидом, нуклеиновой кислотой, низкомолекулярным соединением или наночастицей.

139. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 134–138, где функциональный фрагмент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

140. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 134–139, где конъюгат является бивалентным, тетравалентным, гексавалентным или октавалентным.

141. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 134–139, являющийся слитым белком.

142. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, иммуномодулирующий белок по любому из

вариантов осуществления 72–133 или конъюгат, являющийся слитым белком по любому из вариантов осуществления 134–141.

143. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 142, являющаяся синтетической нуклеиновой кислотой.

144. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 142 или варианту осуществления 143, являющаяся кДНК.

145. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 142–144.

146. Вектор по варианту осуществления 145, являющийся экспрессирующим вектором.

147. Вектор по варианту осуществления 145 или варианту осуществления 146, где вектор является экспрессирующим вектором млекопитающего или вирусным вектором.

148. Клетка, содержащая вектор по варианту осуществления 146 или варианту осуществления 147.

149. Клетка по варианту осуществления 148, являющаяся клеткой млекопитающего.

150. Клетка по варианту осуществления 148 или варианту осуществления 149, являющаяся клеткой человека.

151. Способ получения варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка, включающий встраивание молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 142–144 или вектора по любому из вариантов осуществления 145–147 в клетку–хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

152. Способ по варианту осуществления 151, дополнительно включающий выделение или очистку варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка из клетки.

153. Способ конструирования клетки, экспрессирующей вариант полипептида CD80, включающий встраивание молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, в клетку–хозяина в условиях, в которых полипептид экспрессируется в клетке.

154. Сконструированная клетка, экспрессирующая вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–133, конъюгат, являющийся слитым белком по любому из вариантов осуществления 134–141, молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 142–145 или вектор по любому из вариантов осуществления 145–147.

155. Сконструированная клетка по варианту осуществления 154, где вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид.

156. Сконструированная клетка по варианту осуществления 154 или варианту осуществления 155, где вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок не

содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки.

157. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 154–156, где вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок секретируется или может секретироваться сконструированной клеткой.

158. Сконструированная клетка по варианту осуществления 154 или варианту осуществления 155, где сконструированная клетка содержит вариант полипептида CD80, содержащий трансмембранный домен и/или являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком по любому из вариантов осуществления 65–71.

159. Сконструированная клетка по варианту осуществления 154, варианту осуществления 155 или варианту осуществления 158, где вариант полипептида CD80 экспрессируется на поверхности клетки.

160. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 154–159, где клетка является иммунной клеткой.

161. Сконструированная клетка по варианту осуществления 160, где иммунная клетка является антигенпрезентирующей клеткой (АПК) или лимфоцитом.

162. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 159–161, являющаяся первичной клеткой.

163. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 159–162, где клетка является клеткой млекопитающего.

164. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 159–163, где клетка является клеткой человека.

165. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 159–164, где клетка является лимфоцитом, лимфоцит является Т–клеткой.

166. Сконструированная клетка по варианту осуществления 161, где клетка является АПК, и АПК является искусственной АПК.

167. Сконструированная клетка по любому из вариантов осуществления 154–166, дополнительно содержащая химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т–клеточный рецептор.

168. Возбудитель инфекции, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–133 или конъюгат, являющийся слитым белком, по любому из вариантов осуществления 134–141.

169. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 168, где кодируемый вариант полипептида CD80, иммуномодулирующий белок или конъюгат не содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки, в которой экспрессируется.

170. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 168 или варианту осуществления 169, где кодируемый вариант полипептида CD80, иммуномодулирующий полипептид или конъюгат секретируется или может секретироваться клеткой, в которой экспрессируется.

171. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 168, где кодируемый вариант полипептида CD80 содержит трансмембранный домен.

172. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 168 или варианту осуществления 171, где кодируемый вариант полипептида CD80 экспрессируется на поверхности клетки, в которой экспрессируется.

173. Возбудитель инфекции по любому из вариантов осуществления 168–172, где возбудитель инфекции является бактерией или вирусом.

174. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 173, где возбудитель инфекции является вирусом, и вирус является онколитическим вирусом.

175. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 174, где онколитический вирус является аденовирусом, аденоассоциированным вирусом, вирусом герпеса, вирусом простого герпеса, реовирусом, вирусом псевдочумы птиц, парвовирусом, вирусом кори, вирусом везикулярного стоматита (VSV), вирусом Коксаки или вирусом осповакцины.

176. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 175, где вирус специфически направленно воздействует на дендритные клетки (DC) и/или является тропным к дендритным клеткам.

177. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 176, где вирус представляет собой лентивирусный вектор, псевдотипированный с использованием модифицированного оболочечного продукта вируса Синдбис.

178. Возбудитель инфекции по любому из вариантов осуществления 168–177, дополнительно содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую дополнительный продукт гена, приводящий к гибели клетки–мишени, или который может повышать или усиливать иммунный ответ.

179. Возбудитель инфекции по варианту осуществления 178, где дополнительный продукт гена выбран из противоопухолевого средства, антиметастатического средства, антиангиогенного средства, иммуномодулирующей молекулы, ингибитора иммунных контрольных точек, антитела, цитокина, фактора роста, антигена, цитотоксического продукта гена, проапоптотического продукта гена, антиапоптотического продукта гена, гена дегенерации клеточного матрикса, генов регенерации ткани или перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные.

180. Фармацевтическая композиция, содержащая вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71, иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–133, конъюгат по любому из вариантов осуществления 134–141, сконструированную клетку по любому из вариантов осуществления 154–167 или возбудитель инфекции по любому из вариантов осуществления 168–179.

181. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 180, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

182. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 179 или 180, где фармацевтическая композиция является стерильной.

183. Промышленное изделие, содержащее фармацевтическую композицию по

любому из вариантов осуществления 179–182 во флаконе.

184. Промышленное изделие по варианту осуществления 183, где флакон запаян.

185. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 179–182 и инструкции по использованию.

186. Набор, содержащий промышленное изделие по варианту осуществления 183 и 184 и инструкции по использованию.

187. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 180–182.

188. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из вариантов осуществления 72–101.

189. Способ по варианту осуществления 187 или 188, где иммунный ответ повышен.

190. Способ по варианту осуществления 188 или варианту осуществления 189, где иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком по варианту осуществления 88, демонстрирующим Fc–зависимую костимуляцию CD28.

191. Способ по любому из вариантов осуществления 186–188, где иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком по варианту осуществления 98, демонстрирующим PD–L1–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, где иммуномодулирующий белок содержит вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления.

192. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение сконструированных клеток по любому из вариантов осуществления 154–167.

193. Способ по варианту осуществления 192, где сконструированные клетки являются аутологичными для индивидуума.

194. Способ по варианту осуществления 192, где сконструированные клетки являются аллогенными для индивидуума.

195. Способ по любому из вариантов осуществления 187–194, где с помощью модуляции иммунного ответа лечат заболевание или состояние у индивидуума.

196. Способ по любому из вариантов осуществления 187–195, где иммунный ответ повышен.

197. Способ по любому из вариантов осуществления 187–191, 195 или 196, где индивидууму вводят вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок, являющийся растворимым, необязательно, в котором отсутствует трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены CD80.

198. Способ по варианту осуществления 197, где вариант полипептида CD80 или иммуномодулирующий белок является Fc–слитым белком.

199. Способ по любому из вариантов осуществления 187–198, где индивидууму вводят вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–68 и 71 или иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–133.

200. Способ по любому из вариантов осуществления 192–196, где индивидууму вводят сконструированную клетку, содержащую секретируемый вариант полипептида CD80.

201. Способ по любому из вариантов осуществления 192–196 и 200, где индивидууму вводят сконструированную клетку по любому из вариантов осуществления 154–167.

202. Способ по любому из вариантов осуществления 187–191, 195 и 196, где индивидууму вводят возбудитель инфекции, кодирующий вариант полипептида CD80, являющийся секретируемым иммуномодулирующим белком, необязательно, в условиях, в которых возбудитель инфекции инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку и секретируемый иммуномодулирующий белок секретируется инфицированной клеткой.

203. Способ по любому из вариантов осуществления 187–202, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или злокачественное новообразование.

204. Способ по любому из вариантов осуществления 187–203, где заболевание или состояние выбрано из меланомы, рака легких, рака мочевого пузыря, гемобластоза, рака печени, злокачественного новообразования головного мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичка, рака яичников, рака матки, карциномы желудка, скелетно–мышечного злокачественного новообразования, рака головы и шеи, злокачественного новообразования желудочно–кишечного тракта, рака половых клеток или эндокринного или нейроэндокринного злокачественного новообразования.

205. Способ по любому из вариантов осуществления 187, 188 и 192–195, где иммунный ответ снижен.

206. Способ по любому из вариантов осуществления 187, 188, 192–195 и 205, где индивидууму вводят иммуномодулирующий белок или конъюгат, содержащий вариант полипептида CD80, соединенный с функциональным фрагментом, локализующим в клетку или ткань воспалительного окружения.

207. Способ по варианту осуществления 206, где функциональный фрагмент содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или содержит второй полипептид, содержащий домен IgSF дикого типа или его вариант.

208. Способ по любому из вариантов осуществления 187–191, 195 и 205–207, где индивидууму вводят иммуномодулирующий белок по любому из вариантов осуществления 72–133 или конъюгат по любому из вариантов осуществления 134–141, необязательно, где иммуномодулирующий белок или конъюгат содержит вариант полипептида CD80, демонстрирующий повышенную аффинность связывания с CTLA–4.

209. Способ по любому из вариантов осуществления 187–195 и 205, где индивидууму вводят вариант полипептида CD80, содержащий трансмембранный домен.

210. Способ по любому из вариантов осуществления 192–195, 205 и 209, где индивидууму вводят сконструированную клетку, содержащую вариант полипептида CD80, являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком по любому из

вариантов осуществления 158–167.

211. Способ по любому из вариантов осуществления 187, 195 и 205, где индивидууму вводят возбудитель инфекции, кодирующий вариант полипептида CD80, являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком, необязательно, в условиях, в которых возбудитель инфекции инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку, и трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности инфицированной клетки.

212. Способ по любому из вариантов осуществления 195 и 205–211, где заболевание или состояние является воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием.

213. Способ по любому из вариантов осуществления 195 и 205–212, где заболевание или состояние является васкулитом, ассоциированным с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулитом, аутоиммунным заболеванием кожи, трансплантацией, ревматизмом, воспалительным заболеванием желудочно–кишечного тракта, воспалительным заболеванием глаза, воспалительным неврологическим заболеванием, воспалительным заболеванием легких, воспалительным эндокринным заболеванием или аутоиммунным гематологическим заболеванием.

214. Способ по любому из вариантов осуществления 195 и 205–213, где заболевание или состояние выбрано из воспалительного заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита или псориаза.

215. Способ повышения иммунного ответа у индивидуума, включающий введение иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене или IgC–домене или его специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где иммуномодулирующий белок демонстрирует PD–L1–зависимую костимуляцию CD28.

216. Способ по варианту осуществления 215, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

217. Способ опосредования агонизма CD28 посредством PD–L1–зависимой костимуляции CD28 у индивидуума, включающий введение иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене или IgC–домене или его специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

218. Способ по варианту осуществления 216 или варианту осуществления 217, где повышенная аффинность к эктодомену PD–L1 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз, 400 раз или 450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

219. Способ по любому из вариантов осуществления 215–219, предназначенный для применения в лечении заболевания или состояния.

220. Способ по любому из вариантов осуществления 217–219, где PD–L1–зависимую костимуляцию CD28 оценивают в анализе стимуляции Т–клеток в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих PD–L1, необязательно, где анализ стимуляции Т–клеток является анализом in vitro, необязательно, где Т–клетки включают клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2.

221. Способ по любому из вариантов осуществления 187–220, где:

перед введением для лечения выбирают индивидуума, имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные по поверхностному PD–L1, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; или

индивидуума выбирают как имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный PD–L1, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками.

222. Способ по варианту осуществления 221, где выбор индивидуума включает:

(a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с эктодоменом PD–L1;

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; и

(c) если образец опухолевой ткани содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный PD–L1, выбор индивидуума для лечения.

223. Способ по любому из вариантов осуществления 187–222, где:

перед введением для лечения выбирают индивидуума, имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный CD28, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками; или

индивидуума выбирают как имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный CD28, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками.

224. Способ по варианту осуществления 223, где выбор индивидуума включает:

(a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим

реагентом, способным специфически связываться с эктодоменом CD28;

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками; и

(c) если образец опухолевой ткани содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный CD28, выбор индивидуума для лечения.

225. Способ выбора индивидуума для лечения, включающий:

(a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с PD–L1; и

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; и

(c) если образец опухоли содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный PD–L1, выбор индивидуума для лечения с использованием иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

226. Способ по варианту осуществления 225, включающий приведение образца опухолевой ткани в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с CD28, где индивидуума выбирают, если образец опухолевой ткани дополнительно содержит детектируемый уровень инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, положительных на CD28, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками.

227. Способ по любому из вариантов осуществления 222 и 224–226, где образец опухолевой ткани содержит инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, опухолевые клетки, стромальные клетки или любую их комбинацию.

228. Способ по любому из вариантов осуществления 222 и 224–227, где связывающий реагент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом, белковым лигандом или партнером по связыванию, аптамером, аффимером, пептидом или гаптеном.

229. Способ по варианту осуществления 222, 224, 227 или 228, где связывающий реагент является антителом против PD–L1 или антигенсвязывающим фрагментом.

230. Способ по любому из вариантов осуществления 222–229, где связывающий реагент содержит вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71.

231. Способ по варианту осуществления 230, где вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

232. Способ по варианту осуществления 230 или варианту осуществления 231, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью связывающего реагента.

233. Способ по любому из вариантов осуществления 230–232, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80.

234. Способ по любому из вариантов осуществления 222 и 224–233, где связывающий реагент соединяют, прямо или косвенно, с функциональным фрагментом, являющимся детектируемым функциональным фрагментом или функциональным фрагментом, который можно подвергать детекции.

235. Способ по варианту осуществления 234, где функциональный фрагмент является Fc–областью.

236. Способ по варианту осуществления 235, где Fc–область не принадлежит человеку, но, необязательно, принадлежит мыши или кролику.

237. Способ по любому из вариантов осуществления 222 и 224–236, где определение наличия связанного связывающего реагента осуществляют посредством иммуногистохимии, псевдоиммуногистохимии, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии, ELISA или иммуноблоттинга.

238. Способ по любому из вариантов осуществления 225–237, дополнительно включающий введение индивидууму иммуномодулирующего белка.

239. Способ по любому из вариантов осуществления 187–238, где индивидуум является человеком.

240. Способ по любому из вариантов осуществления 215–239, где иммуномодулирующий белок является мультимером, содержащим первый вариант полипептида CD80, соединенный с первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80, соединенный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй варианты полипептидов CD80.

241. Способ по варианту осуществления 240, где мультимер является димером.

242. Способ по варианту осуществления 240 или варианту осуществления 241, где первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми.

243. Способ по любому из вариантов осуществления 240–242, где домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc–область.

244. Способ по варианту осуществления 243, где Fc–область является вариантом Fc–области, содержащим одну или более замен аминокислот по сравнению с Fc–областью дикого типа, где Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций,

сниженных по сравнению с Fc–областью дикого типа, необязательно, где Fc дикого типа принадлежит IgG1 человека.

245. Способ по любому из вариантов осуществления 215–244, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

246. Способ по любому из вариантов осуществления 215–245, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, выбранных из E7D, A12V, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18L, H18T, H18V, H18Y, V20A, V20I, S21P, V22A, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q27R, T28Y, R29C, R29H, I30T, I30V, Y31H, Y31S, Q33E, Q33H, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, K37E, M38I, M38T, M38V, T41A, T41S, M42I, M42V, M43I, M43L, M43T, M43V, S44P, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47T, M47V, M47Y, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61F, I61N, I61V, T62A, T62N, T62S, N63D, N64S, L65P, I67L, I67T, V68A, V68I, V68L, V68M, I69F, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V83A, V83I, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86E, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87N, Y87Q, E88D, E88G, K89E, K89N, D90G, D90K, D90N, D90P, A91G, A91S, A91T, A91V, F92L, F92S, F92V, F92Y, K93E, K93R, K93T, R94L, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97M, L97Q и L97R, где положения замен аминокислот соответствуют положениям CD80, приведенным в SEQ ID NO: 2.

247. Способ по любому из вариантов осуществления 215–245, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из:

Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, M47V/I69F/A71D/V83I, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F,

E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G,

E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M,

V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G.

248. Способ по любому из вариантов осуществления 215–247, где вариант полипептида CD80 сохраняет связывание с CD28.

249. Способ по варианту осуществления 248, где вариант полипептида CD80 сохраняет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8,%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 75%, 80%, 85%, 90% или 95% аффинности к эктодомену CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного полипептида CD80 с эктодоменом CD28.

250. Способ по любому из вариантов осуществления 215–249, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом CD28 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

251. Способ по варианту осуществления 250, где повышенная аффинность к эктодомену CD28 повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 150 раз или 200 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом CD28.

252. Способ по любому из вариантов осуществления 219–251, где с помощью повышения иммунного ответа лечат заболевание или состояние у индивидуума.

253. Способ по любому из вариантов осуществления 219–252, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или злокачественное новообразование.

254. Способ по любому из вариантов осуществления 219–253, где заболевание или состояние выбрано из меланомы, рака легких, рака мочевого пузыря, гемобластоза, рака

печени, злокачественного новообразования головного мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичка, рака яичников, рака матки, карциномы желудка, скелетно–мышечного злокачественного новообразования, рака головы и шеи, злокачественного новообразования желудочно–кишечного тракта, рака половых клеток, или эндокринного или нейроэндокринного злокачественного новообразования.

255. Способ детекции партнера по связыванию CD80 в биологическом образце, включающий:

(a) приведение биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–71; и

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из биологического образца.

256. Способ по варианту осуществления 255, где партнер по связыванию является PD–L1, CD28, CTLA–4 или их комбинациями.

257. Способ по варианту осуществления 255 или варианту осуществления 256, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене или IgC–домене или его специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

258. Способ по любому из вариантов осуществления 255–257, где биологический образец представляет собой или содержит образец физиологической жидкости, клеток или ткани.

259. Способ по варианту осуществления 258, где физиологическая жидкость является сывороткой, плазмой или мочой.

260. Способ по варианту осуществления 258, где образец ткани является образцом опухолевой ткани.

261. Способ по варианту осуществления 260, где образец опухолевой ткани содержит инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, опухолевые клетки, стромальные клетки или любую их комбинацию.

262. Способ по любому из вариантов осуществления 255–261, где вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

263. Способ по варианту осуществления 262, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью связывающего реагента.

264. Способ по любому из вариантов осуществления 255–263, где связывающий реагент соединяют, прямо или косвенно, с меткой, являющейся детектируемым функциональным фрагментом, или функциональным фрагментом, который можно подвергать детекции.

265. Способ по варианту осуществления 264, где функциональный фрагмент

является Fc–областью.

266. Способ по варианту осуществления 265, где Fc–область не принадлежит человеку, но, необязательно, принадлежит мыши или кролику.

267. Способ по любому из вариантов осуществления 255–266, где определение наличия связанного связывающего реагента осуществляют посредством иммуногистохимии, псевдоиммуногистохимии, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии, ELISA или иммуноблоттинга.

IX. ПРИМЕРЫ

[0586] Следующие примеры включены в настоящее описание исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕР 1

Получение мутантных конструкций ДНК доменов IgSF

[0587] В примере 1 описывают получение мутантных конструкций ДНК доменов IgSF CD80 человека для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в виде библиотек дрожжевого дисплея.

A. ВЫРОЖДЕННЫЕ БИБЛИОТЕКИ

[0588] Получали конструкции на основе последовательности CD80 человека дикого типа, приведенной в SEQ ID NO: 3031, содержащей следующий иммуноглобулино–подобный домен V–типа (IgV):

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPE YKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKAD(SEQ ID NO: 3031)

[0589] В случае библиотек, нацеленных на специфические остатки для полной или частичной рандомизации с использованием вырожденных кодонов, вырожденные кодоны, такие как специфические наборы смешанных оснований для кодирования различных замен аминокислот, получали с использованием алгоритма по адресу URL: rosettadesign.med.unc.edu/SwiftLib/. В основном, положения для мутагенеза выбирали с учетом информации о кристаллической структуре CD80, связанного с CTLA4, доступной по адресу URL: rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1I8L, и целевую библиотеку конструировали с учетом области контакта CD80::CTLA4 для выбора улучшенных CTLA4–связывающих средств. Например, информацию о структуре использовали для идентификации контактирующих или неконтактирующих остатков области контакта для мутагенеза с использованием вырожденных кодонов. Этот анализ осуществляли с использованием программы для просмотра структуры, доступной по адресу URL: spdbv.vital–it.ch.

[0590] Следующей стадией дизайна библиотеки являлось выравнивание последовательностей CD80 человека, мыши, крысы и обезьяны для идентификации тех остатков, выбранных для мутагенеза, которые являются консервативными. С учетом этого анализа, консервативные целевые остатки подвергали мутагенезу с использованием вырожденных кодонов, которые определяли только консервативные замены аминокислот

и остаток дикого типа. Остатки, не являвшиеся консервативными, мутировали более активно, но также включали остаток дикого типа. Во избежание избыточного мутагенеза целевого белка использовали вырожденные кодоны, которые также кодировали остаток дикого типа. По той же причине для мутагенеза каждой библиотеки намечали только до 20 положении. Мутационный анализ был сфокусирован на контактирующих и неконтактирующих остатках области контакта, находящихся в пределах 6 Å от связывающей поверхности, при этом их боковые цепи были направлены в сторону лиганда/противоструктуры.

[0591] Для получения ДНК, кодирующей целевую библиотеку, в Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) заказывали перекрывающиеся олигонуклеотиды длиной до 80 нуклеотидов, содержащие вырожденные кодоны в положениях остатков, предназначенных для мутагенеза. Олигонуклеотиды растворяли в стерильной воде, смешивали в эквимолярных соотношениях, нагревали до 95°C в течение пяти минут и медленно охлаждали до комнатной температуры для отжига. Затем специфические для IgV–домена олигонуклеотидные праймеры, отжигающиеся в начале и конце последовательности гена IgV–домена, использовали для получения продукта ПЦР. Затем специфические для IgV–домена олигонуклеотиды, перекрывающиеся на 40 п.н. с клонирующим вектором pBYDS03 (Life Technologies, USA), выходящие за пределы участков клонирования BamHI и KpnI и включающие их, использовали для амплификации 100 нг продукта ПЦР, полученного на предыдущей стадии, для получения всего по меньшей мере 12 мкг ДНК для каждой электропорации. В обеих полимеразных цепных реакциях (ПЦР) использовали 2–кратный мастер–микс для ПЦР OneTaq (New England Biolabs, USA). Продукты второй ПЦР очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР (Qiagen, Germany) и ресуспендировали в стерильной деионизированной воде. Альтернативно, олигонуклеотиды Ultramer® (Integrated DNA Technologies) длиной до 200 п.н. использовали в комбинации с мегапраймерной ПЦР (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146891/pdf/253371.pdf) для получения более крупных фрагментов вырожденных кодонов, которые нельзя так легко встраивать с использованием множества небольших перекрывающихся праймеров. После получения полноразмерного продукта с использованием мегапраймерной ПЦР мутантную библиотеку IgV–доменов снова амплифицировали посредством ПЦР с использованием ДНК–праймеров, содержащих область перекрывания 40 п.н. с клонирующим вариантом pBYDS03 для гомологичной рекомбинации в дрожжах.

[0592] Для подготовки к встраиванию библиотеки вектор pBYDS03 расщепляли ферментами рестрикции BamHI и KpnI (New England Biolabs, USA), большой фрагмент вектора выделяли из геля и растворяли в стерильной деионизированной воде. Готовую для электропорации ДНК для следующей стадии получали посредством смешивания 12 мкг ДНК вставки библиотеки с 4 мкг линеаризованного вектора в общем объеме 50 мкл деионизированной и стерильной воды. Альтернативным способом получения целевых библиотек является осуществление сайт–специфического мутагенеза (набор Multisite,

Agilent, USA) целевого IgV–домена с использованием олигонуклеотидов, содержащих вырожденные кодоны. Этот подход используют для получения подбиблиотек, направленных лишь на некоторые специфические фрагменты ДНК для мутагенеза. В этом случае подбиблиотеки смешивают перед переходом к стадиям селекции. В основном, размеры библиотек находились в диапазоне от 10E7 до 10E8 клонов, за исключением того, что размер подбиблиотек находился в диапазоне лишь от 10E4 до 10E5.

B. РАНДОМИЗИРОВАННЫЕ БИБЛИОТЕКИ

[0593] Рандомизированные библиотеки также конструировали для идентификации вариантов IgV–домена CD80, приведенного в SEQ ID NO: 3031 (содержащей IgV–домен). ДНК, кодирующую IgV–домен CD80 дикого типа, клонировали между участками BamHI и KpnI вектора дрожжевого дисплея pBYDS03, а затем высвобождали с использованием тех же ферментов рестрикции. Затем высвобожденную ДНК подвергали мутагенезу с использованием набора Genemorph II (Agilent Genomics, USA) для получения в среднем от трех до пяти замен аминокислот на вариант библиотеки. Затем подвергнутую мутагенезу ДНК амплифицировали посредством двухстадийной ПЦР, и дополнительно обрабатывали, как описано выше для целевых библиотек.

[0594] После завершения нескольких раундов селекции с использованием бус и повторяющейся FACS совокупность клонов дополнительно подвергали мутагенезу посредством подверженной ошибкам ПЦР. Таким образом, получали мутантную библиотеку второго поколения после описанных выше стадий, но с использованием в качестве матрицы полученной посредством селекции ДНК, а не плазмидной последовательности IgV дикого типа.

ПРИМЕР 2

Встраивание библиотек ДНК в дрожжи

[0595] Для встраивания ДНК вырожденных и рандомизированных библиотек CD80 в дрожжи, получали компетентные для электропорации клетки штамма дрожжей BJ5464 (ATCC.org; ATCC № 208288) и подвергали электропорации с помощью Gene Pulser II (Biorad, USA) с использованием готовой для электропорации ДНК, полученной на описанных выше стадиях (Colby, D.W. et al. 2004 Methods Enzymology 388, 348–358). Единственным исключением являлось то, что трансформированные клетки выращивали в неидуцирующей минимальной селективной среде SCD–Leu для включения селективного маркера LEU2, который несет модифицированная плазмида pBYDS03. Один литр среды SCD–Leu состоит из 14,7 г цитрата натрия, 4,29 г моногидрата лимонной кислоты, 20 г декстрозы, 6,7 г основы азотного агара для дрожжей и 1,6 г синтетической добавки для дрожжевых сред без лейцина. Перед использованием среду подвергали стерилизации фильтрованием с использованием устройства с вакуумным фильтром 0,22 мкм.

[0596] Размер библиотеки определяли, высевая разведения свежевыделенных клеток на чашки с агаром SCD–Leu, а затем экстраполируя размер библиотеки из количества отдельных колоний при высевании, приводящем по меньшей мере к 50 колониям на чашку. Остальную часть подвергнутой электропорации культуры

выращивали до насыщения, клетки из этой культуры еще раз субкультивировали в соотношении 1/100 в той же среде и выращивали до насыщения для минимизации доли нетрансформированных клеток и для отделения плазмиды от клеток, которые могут содержать два или более вариантов библиотек. Для поддержания разнообразия библиотеки эту стадию субкультивирования осуществляли с использованием посевного материала, содержавшего по меньшей мере в 10 раз больше клеток, чем вычисленный размер библиотеки. Клетки из второй насыщенной культуры ресуспендировали в свежей среде, содержащей стерильный 25% (масс./об.) глицерин, до плотности 10E10/мл, замораживали и хранили при –80°C (замороженный сток библиотеки).

ПРИМЕР 3

Селекция дрожжей

[0597] В примере 3 описывают селекцию дрожжевых клеток, экспрессирующих аффинно–модифицированные варианты CD80. Хорошо известно, что связывание CTLA4 с CD80 антагонистически действует на связывание CD28 с CD80 (Schwartz J.C. et al. Nature 410, 604–08, 2001). Для идентификации мутантов CD80, селективно связывающихся с CTLA4 относительно CD28, клетки из библиотек мутантов CD80 подвергали повторяющимся раундам положительной и отрицательной сортировки FACS и мутагенезу.

[0598] Количество клеток, равное по меньшей мере 10–кратному приблизительному размеру библиотеки, размораживали из отдельных стоков библиотек, суспендировали в количестве 1,0×10E6 клеток/мл в неиндукционной среде SCD–Leu и выращивали в течение ночи. На следующий день количество клеток, равное 10–кратному размеру библиотеки, центрифугировали при 2000 об./мин. в течение двух минут и ресуспендировали в количестве 0,5×10E6 клеток/мл в индукционных средах SCDG–Leu. Один литр индукционных сред SCDG–Leu состоит из 5,4 г Na_2HPO_4, 8,56 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 20 г галактозы, 2,0 г декстрозы, 6,7 г основы азотного агара для дрожжей и 1,6 г синтетической добавки для дрожжевых сред без лейцина, растворенных в воде и стерилизованных с помощью устройства с мембранным фильтром 0,22 мкм. Культуры выращивали в индукционной среде в течение 1 дня при комнатной температуре для индукции экспрессии белков библиотеки на поверхности дрожжевых клеток.

[0599] Клетки сортировали дважды с использованием магнитных бус с протеином A (New England Biolabs, USA), нагруженных когнатным лигандом, для снижения несвязывающих средств и обогащения всех вариантов CD80, которые могут связываться со своими экзогенными рекомбинантными белками–противоструктурами. После этого осуществляли многочисленные раунды активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) с использованием окрашивания экзогенного белка–противоструктуры для обогащения фракции дрожжевых клеток, демонстрирующих улучшенное связывание с CTLA4–Fc (R&D Systems, USA). Эту положительную селекцию чередовали с отрицательной селекцией FACS для удаления клонов CD80, связывающихся с CD28–Fc. Обогащение с помощью магнитных бус и селекцию посредством проточной цитометрии

осуществляли, по существу, как описано в Miller K.D., et al., Current Protocols in Cytometry 4,7.1–4,7.30, July 2008.

[0600] Что касается библиотек CD80, использовали следующие целевые белки–лиганды: полученные для собственного пользования rCTLA4–Fc человека, rCD28–Fc человека и rPD–L1 человека (R&D Systems, Minneapolis, USA). Магнитные бусы с протеином A получали в New England Biolabs, USA. Для двухцветной проточно–цитометрической сортировки использовали сортер Bio–Rad S3e. Уровни экспонируемого CD80 подвергали мониторингу с использованием антитела против гемагглютинина (HA), меченого Alexafluor 488 (Life Technologies, USA). Связывание лиганда с Fc–слитыми белками, rCTLA4Fc, rPD–L1 или rCD28Fc, определяли с помощью PE–конъюгированного, специфического к Ig человека Fab козы (Jackson ImmunoResearch, USA). Сдвоенные клетки дрожжей гейтировали с использованием параметров прямого светорассеяния (FSC)/бокового светорассеяния (SSC), и гейтирование зависело от более высокого связывания лиганда, детектируемого с помощью FL2 и имеющего более ограниченное связывание экспрессирующейся метки в случае FL1.

[0601] Определенные при проточно–цитометрической сортировке дрожжи анализировали на более высокую аффинность специфического связывания. Определенные при сортировке дрожжи выращивали и повторно индуцировали для экспрессии конкретных вариантов аффинно–модифицированных доменов IgSF, которые они кодировали. Затем эту популяцию можно сравнивать посредством проточной цитометрии с родительским штаммом дрожжей дикого типа или любыми другими выбранными определенными дрожжами, такими как определенная с помощью бус популяция дрожжей.

[0602] В случае CD80, посредством двойного окрашивания каждой популяции с использованием экспрессии метки против HA (гемагглютинина) и вторичного антитела против Fc человека для детекции связывания лиганда сравнивали результаты второй FACS (F2) с родительскими по CD80 дрожжами в отношении связывания с rCTLA4Fc, rPD–L1 или rCD28Fc.

[0603] Выбранные варианты IgV–доменов CD80 дополнительно форматировали в виде слитых белков и тестировали на связывание и функциональную активность, как описано ниже.

ПРИМЕР 4

Переформатирование полученных посредством селекции вариантов в виде Fc–слитых белков и различных типов иммуномодулирующих белков

[0604] В примере 4 описывают переформатирование полученных посредством селекции вариантов, идентифицированных в примере 3, в виде иммуномодулирующих белков, содержащих аффинно–модифицированный иммуноглобулин–подобный домен V–типа (IgV) (вариант) CD80, слитый с молекулой Fc (молекулы вариантов слитых белков IgV–домен–Fc).

[0605] Полученные при последней проточно–цитометрической сортировке по CD80 совокупности клеток выращивали до конечной плотности в среде SCD–Leu.

Плазмидную ДНК каждой полученной совокупности выделяли с использованием набора для выделения плазмидной ДНК дрожжей (Zymoresearch, USA). В случае Fc–слитых белков праймеры для ПЦР с добавленными участками рестрикции, подходящими для клонирования в выбранный вектор Fc–слитого белка, использовали для массовой амплификации с использованием препаратов плазмидной ДНК, являющейся кодирующей ДНК для мутантных целевых IgV–доменов. После рестрикции продукты ПЦР лигировали в вектор Fc–слитого белка с последующей трансформацией тепловым шоком E. coli штамма XL1 Blue (Agilent, USA) или NEB5alpha (New England Biolabs) по указанию поставщика. Альтернативно, полученные совокупности амплифицировали посредством ПЦР с использованием праймеров, содержащих областей перекрывания 40 п.н. на любом конце, и вектора Fc–слитого белка для осуществления рекомбинации in vitro с использованием мастер–микса Gibson Assembly Mastermix (New England Biolabs), который затем использовали при трансформации тепловым шоком E. coli штамма NEB5alpha. Примером вектора Fc–слитого белка является pFUSE–hIgG1–Fc2 (InvivoGen, USA).

[0606] Разведенные реакционные смеси для трансформации высевали на LB–агар, содержащий 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, USA), для выделения отдельных колоний для селекции. Затем до 96 колоний для каждой трансформации выращивали в 96–луночных планшетах до насыщения в течение ночи при 37°C в бульоне LB с карбенициллином (Teknova, кат. № L8112), и небольшую аликвоту из каждой лунки подвергали секвенированию ДНК вставки IgV–домена для идентификации мутаций во всех клонах. Подготовку образца для секвенирования ДНК осуществляли с использованием протоколов, предоставленных поставщиком услуг (Genewiz; South Plainfield, NJ). После отбора образца для секвенирования ДНК в оставшиеся культуры добавляли глицерин до конечной концентрации 25% и хранили планшеты при –20°C для дальнейшего использования в качестве базовых планшетов (см. ниже). Альтернативно, образцы для секвенирования ДНК получали посредством повторного высевания из выращенных жидких культур на планшеты с твердым агаром с использованием одноразового 96–луночного репликатора (VWR, USA). Эти планшеты инкубировали в течение ночи для получения участков роста и отправляли планшеты в Genewiz, как указано Genewiz.

[0607] После идентификации интересующих клонов посредством анализа полученных в Genewiz данных секвенирования ДНК интересующие клоны выделяли из базовых планшетов и по отдельности выращивали до плотности в жидком бульоне LB, содержащем 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, USA), а затем культуры использовали для получения плазмидной ДНК каждого клона с использованием стандартного набора, такого как система PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) или набор MidiPlus (Qiagen). Идентификация интересующих клонов с помощью данных секвенирования Genewiz, как правило, включает следующие стадии. Сначала файлы данных секвенирования ДНК последовательность загружали с веб–сайта Genewiz. Затем все последовательности вручную организовывали так, чтобы они начинались с начала

кодирующей области IgV–домена. Затем организованные последовательности подвергали пакетному переводу с использованием подходящей программы, доступной по адресу URL: www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/. Затем переведенные последовательности выравнивали с использованием подходящей программы, доступной по адресу URL: multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html. Альтернативно, данные секвенирования Genewiz обрабатывали для получения выравниваний с использованием программного обеспечения Ugene (http://ugene.net).

[0608] Затем интересующие клоны идентифицировали с помощью выравнивания с использованием следующих критериев: 1) идентичные клоны встречаются по меньшей мере два раза на выравнивание, и 2) мутация встречается по меньшей мере два раза на выравнивание, предпочтительно, в разных клонах. Клоны, соответствующие по меньшей мере одному из этих критериев, считали клонами, обогащенными посредством сортировки по причине улучшенного связывания.

[0609] Для получения рекомбинантных иммуномодулирующих белков, являющихся Fc–слитыми белками, содержащими IgV–домен CD80, с по меньшей мере одним аффинно–модифицированным доменом (например вариант IgV CD80–Fc) получали ДНК, кодирующую вариант, для кодирования следующего белка: варианта (мутантного) IgV–домена CD80, за которым следует линкер из трех аланинов (AAA), за которым следует неактивный Fc без эффекторной функции, приведенный в SEQ ID NO: 1713, содержащей мутации C220S, R292C, N297G и V302C в соответствии с нумерацией EU (соответствующие C5S, R77C, N82G и V87C относительно Fc IgG1 человека дикого типа, приведенного в SEQ ID NO: 277); или 1714, содержащей мутации C220S, L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. Альтернативно, IgV–домены CD80 подвергали слиянию аналогичным образом, но с использованием линкера, содержащего аминокислоты (GSGGGGS; SEQ ID NO: 1716), за которым следует неактивный Fc без эффекторной функции, приведенный в SEQ ID NO: 1714. В некоторых случаях IgV–домены CD80 подвергали слиянию аналогичным образом, но с использованием Fc IgG1 человека, способного к эффекторной активности (эффекторного). Т.к. конструкция не включает легкие цепи антитела, которые могут образовывать ковалентную связь с цистеином, такой пример Fc IgG1 человека (приведенный в SEQ ID NO: 1429) содержал замену остатка цистеина остатком серина в положении 220 (C220S) в соответствии с нумерацией EU (соответствующей положению 5 (C5S) относительно Fc дикого типа или немодифицированного Fc, приведенного в SEQ ID NO: 277).

ПРИМЕР 5

Экспрессия и очистка Fc–слитых белков

[0610] В примере 5 описывают высокопроизводительную экспрессию и очистку Fc–слитых белков, содержащих вариант IgV CD80, описанный в представленных выше примерах.

[0611] Рекомбинантные варианты Fc–слитых белков получали из адаптированных к культивированию в суспензии эмбриональных клеток почки человека (HEK) 293 с

использованием системы экспрессии Expi293 (Invitrogen, USA). 4 мкг каждой плазмидной ДНК, полученной на предыдущих стадиях, добавляли к 200 мкл Opti–MEM (Invitrogen, USA) в то же время, что и 10,8 мкл ExpiFectamine, отдельно добавляемого к другим 200 мкл Opti–MEM. Через 5 минут 200 мкл плазмидной ДНК смешивали с 200 мкл ExpiFectamine и инкубировали в течение еще 20 минут перед добавлением этой смеси к клеткам. Десять миллионов клеток Expi293 добавляли в отдельные лунки стерильного глубокого 24–луночного планшета для выращивания с коническим дном емкостью 10 мл (Thomson Instrument Company, USA) в объеме 4 мл среды Expi293 (Invitrogen, USA). Планшеты инкубировали со встряхиванием в течение 5 дней при 120 об./мин. в инкубаторе для культивирования клеток млекопитающего, установленного на 95% влажности и 8% CO_2. После 5–дневной инкубации клетки осаждали и получали супернатанты культур.

[0612] Белки выделяли из супернатантов с использованием высокопроизводительного 96–луночного фильтровального планшета (Thomson, кат. № 931919), при этом каждую лунку нагружали 60 мкл бус Mab SelectSure (GE Healthcare, кат. №17543801). Белок элюировали с использованием четырех последовательных 200 мкл фракций 50 мМ ацетата, pH 3,3. pH каждой фракции доводили до pH выше 5,0 с использованием 4 мкл 2 М Трис, pH 8,0. Фракции объединяли и подвергали количественному анализу с использованием поглощения при 280 нм, измеряемого с помощью устройства Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA), и чистоту белка оценивали посредством нанесения 5 мкг невосстановленного белка на гели Mini–Protean TGX Stain–Free. Затем белки визуализировали с помощью устройства для визуализации гелей Bio Rad Chemi Doc XRS.

ПРИМЕР 6

Анализ связывания подвергнутых аффинному созреванию молекул, содержащих домен IgSF

[0613] В этом примере описывают исследования связывания Fc–слитых белков из очищенных белков, описанных в представленных выше примерах, с экспрессируемыми клетками противоструктурами CTLA4, PD–L1 и CD28 для оценки специфичности и аффинности иммуномодулирующих белков с вариантом домена CD80. Полноразмерные экспрессирующиеся на поверхности конструкции млекопитающего для каждого из CTLA4, PD–L1 и CD28 человека конструировали с использованием экспрессирующего вектора pcDNA3.1 (Life Technologies) и получали из Genscript, USA. Исследования связывания осуществляли на трансфицированных клетках HEK293, полученных для экспрессии полноразмерных поверхностных лигандов млекопитающего с использованием системы транзиторной трансфекции Expi293F (Life Technologies, USA). В качестве контроля также анализировали связывание с ложнотрансфицированными (нетрансфицированными) клетками. Определяли количество клеток, необходимых для эксперимента, и осуществляли соответствующее 30–мл масштабирование трансфекции с использованием предложенного производителем способа. Для каждой из трансфекции с

использованием CTLA4, PD–L1, CD–28 или ложной трансфекции в 30 мл 75 миллионов клеток Expi293F инкубировали с 30 мкг ДНК экспрессирующей конструкции и 1,5 мл разведенного реагента ExpiFectamine 293 в течение 48 часов, когда клетки собирали для окрашивания.

[0614] Для окрашивания и анализа посредством проточной цитометрии 100000 клеток из соответствующей системы транзиторной трансфекции или отрицательного контроля (ложнотрансфицированного) высевали в 96–луночные круглодонные планшеты. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания (PBS (фосфатно–солевой буфер), 1% BSA (бычьего сывороточного альбумина) и 0,1% азида натрия) в течение 20 минут для блокирования неспецифического связывания. Затем клетки центрифугировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания, содержащего от 200 нМ до 91 пМ каждого кандидата вариант CD80–Fc в зависимости от эксперимента в 50 мкл. В качестве контроля также анализировали активности связывания ECD CD80 дикого типа–Fc (R&D Systems), ECD CD80 дикого типа–Fc (неактивного), IgV дикого типа–Fc (неактивного) и/или IgG человека (Sigma). Первичное окрашивание осуществляли на льду в течение 45 минут перед двукратным промыванием клеток в буфере для окрашивания. PE–конъюгированное антитело против Fc человека (Jackson ImmunoResearch, USA) разводили 1:150 в 50 мкл буфере для окрашивания, добавляли к клеткам и инкубировали в течение еще 30 минут на льду. Вторичное антитело дважды вымывали, клетки фиксировали в 4% формальдегиде/PBS и анализировали образцы с помощью проточного цитометра Intellicyt (Intellicyt Corp, USA). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для каждого трансфектанта и ложнотрансфицированных HEK293 вычисляли с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo LLC, USA).

[0615] Результаты двух исследований связывания примеров вариантов CD80 представлены в таблицах 10 и 11. В таблицах примеры замен аминокислот обозначены с помощью номера положения аминокислоты, соответствующего нумерации соответствующей референсной последовательности немодифицированного ECD. Например, референсная последовательность немодифицированного ECD является последовательностью немодифицированного ECD CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2. Положение аминокислоты указано в середине, соответствующая немодифицированная аминокислота (например, дикого типа) указана перед номером, а идентифицированный вариант замены аминокислоты указан после номера. Во второй колонке приведен идентификатор SEQ ID варианта IgV для каждого варианта IgV–Fc–слитой молекулы.

[0616] Также представлена активность связывания, измеряемая по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) каждой слитой молекулы вариант CD80–Fc, с клетками, сконструированными для экспрессии указанного когнатного лиганда–противоструктуры (т.е. CTLA–4, PD–L1, или CD28) и соотношение MFI варианта IgV CD80–Fc по сравнению со связыванием соответствующей немодифицированной слитой молекулы IgV CD80–Fc, несодержащей замены аминокислот, с тем же

экспрессирующимся в клетке лигандом–противоструктурой. В последних колонках таблиц также представлено соотношение связывания варианта IgV CD80–Fc с лигандом–противоструктурой CTLA–4 по сравнению со связыванием варианта IgV CD80–Fc с лигандом–противоструктурой CD28.

[0617] Как показано в таблицах 10 и 11, селекция привела к идентификации ряда вариантов IgV–доменов CD80, являющихся аффинно–модифицированными таким образом, что они демонстрируют повышенное связывание с лигандами–противоструктурами CTLA–4 и/или PD–L1. Кроме того, результаты свидетельствуют о том, что при селекции получали ряд вариантов, демонстрирующих сниженное связывание с CD28, включая несколько вариантов IgV–доменов CD80, демонстрирующих повышенное связывание с лигандом–противоструктурой CTLA–4 по сравнению с лигандом–противоструктурой CD28 (соотношение CTLA4:CD28).

ТАБЛИЦА 10: Связывание вариантов CD80 с клетками HEK293, трансфицированными с использованием CTLA4, CD28 или PD–L1

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		
		MFI при 66,6 нМ	**Кратное изменение относительно WT**	**MFI при 66,6 нМ**	**Кратное изменение относительно WT**	**MFI при 22,2 нМ**	**Кратное изменение относительно WT**	**Соотношение CTLA4:CD28**
L70P	151	Не тестировали						
I30F/L70P	152	Не тестировали						
Q27H/T41S/A71D	153	368176	2,3	25051	1,01	24181	N/A	14,7
I30T/L70R	154	2234	0,0	2596	0,10	5163	N/A	0,9
T13R/C16R/L70Q/A71D	155	197357	1,2	16082	0,65	9516	N/A	12,3
T57I	156	393810	2,4	23569	0,95	3375	N/A	16,7
M43I/C82R	157	3638	0,0	3078	0,12	7405	N/A	1,2
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	158	175235	1,1	3027	0,12	6144	N/A	57,9
I30V/T57I/L70P/A	159	11608	0,7	1012	0,41	5886	N/A	11,5

71D/A91T		5		9				
V22I/L70M/A71D	160	163825	1,0	22843	0,92	33404	N/A	7,2
N55D/L70P/E77G	161	Не тестировали						
T57A/I69T	162	Не тестировали						
N55D/K86M	163	3539	0,0	3119	0,13	5091	N/A	1,1
L72P/T79I	164	50176	0,3	3397	0,14	6023	N/A	14,8
L70P/F92S	165	4035	0,0	2948	0,12	6173	N/A	1,4
T79P	166	2005	0,0	2665	0,11	4412	N/A	0,8
E35D/M47I/L65P/D90N	167	4411	0,0	2526	0,10	4034	N/A	1,7
L25S/E35D/M47I/D90N	168	61265	0,4	4845	0,20	20902	N/A	12,6
A71D	170	220090	1,4	16785	0,68	29642	N/A	13,1
E81K/A91S	172	98467	0,6	3309	0,13	44557	N/A	29,8
A12V/M47V/L70M	173	81616	0,5	7400	0,30	31077	N/A	11,0
K34E/T41A/L72V	174	88982	0,6	3755	0,15	35293	N/A	23,7
T41S/A71D/V84A	175	103010	0,6	5573	0,22	83541	N/A	18,5
E35D/A71D	176	106069	0,7	18206	0,73	40151	N/A	5,8
E35D/M47I	177	353590	2,2	14350	0,58	149916	N/A	24,6
K36R/G78A	178	11937	0,1	2611	0,11	5715	N/A	4,6
Q33E/T41A	179	8292	0,1	2442	0,10	3958	N/A	3,4
M47V/N48H	180	207012	1,3	14623	0,59	145529	N/A	14,2
M47L/V68A	181	74238	0,5	13259	0,53	11223	N/A	5,6
S44P/A71D	182	8839	0,1	2744	0,11	6309	N/A	3,2
Q27H/M43I/A71D/R73S	183	136251	0,8	12391	0,50	8242	N/A	11,0

E35D/T57I/L70Q/A71D	185	121901	0,8	21284	0,86	2419	N/A	5,7
M47I/E88D	186	105192	0,7	7337	0,30	97695	N/A	14,3
M42I/I61V/A71D	187	54478	0,3	6074	0,24	4226	N/A	9,0
P51A/A71D	188	67256	0,4	4262	0,17	5532	N/A	15,8
H18Y/M47I/T57I/A71G	189	136455	0,8	20081	0,81	13749	N/A	6,8
V20I/M47V/T57I/V84I	190	183516	1,1	26922	1,08	3583	N/A	6,8
ECD CD80 WT–Fc	2	161423	1,0	24836	1,00	Не тестировали	N/A	6,5
Только Fc		5962		2592		4740		

ТАБЛИЦА 11: Связывание вариантов CD80 с клетками HEK293, трансфицированными с использованием CTLA4, CD28 или PD–L1

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		
		MFI при 66,6 нМ	**Кратное изменение относительно WT**	**MFI при 66,6 нМ**	**Кратное изменение относительно WT**	**MFI при 22,2 нМ**	**Кратное изменение относительно WT**	**Соотношение CTLA4:CD28**
V20I/M47V/A71D	191	149937	7,23	15090	9,33	9710	5,48	9,9
A71D/L72V/E95K	192	140306	6,77	6314	3,90	8417	4,75	22,2
V22L/E35G/A71D/L72P	193	152588	7,36	8150	5,04	1403	0,79	18,7
E35D/A71D	194	150330	7,25	14982	9,26	13781	7,77	10,0
E35D/I67L/A71D	195	14608	7,04	1117	6,91	9354	5,28	13,1

		7		5				
T13R/M42V/M47I/A71D	197	108900	5,25	16713	10,33	1869	1,05	6,5
E35D	198	116494	5,62	3453	2,13	25492	14,38	33,7
E35D/M47I/L70M	199	116531	5,62	14395	8,90	49131	27,71	8,1
E35D/A71/L72V	200	134252	6,47	11634	7,19	13125	7,40	11,5
E35D/M43L/L70M	201	102499	4,94	3112	1,92	40632	22,92	32,9
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	202	83139	4,01	5406	3,34	9506	5,36	15,4
E35D/D46V/L85Q	203	85989	4,15	7510	4,64	38133	21,51	11,4
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D	204	59793	2,88	14011	8,66	1050	0,59	4,3
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	196	85117	4,10	10317	6,38	1452	0,82	8,3
M47V/I69F/A71D/V83I	205	76944	3,71	15906	9,83	3399	1,92	4,8
E35D/T57A/A71D/L85Q	206	85724	4,13	3383	2,09	1764	0,99	25,3
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	207	70878	3,42	6487	4,01	8026	4,53	10,9
E35D/M47L	208	82410	3,97	11508	7,11	58645	33,08	7,2
E23D/M42V/M43I/I58V/L70R	209	37331	1,80	10910	6,74	2251	1,27	3,4
V68M/L70M/A71D/E95K	210	56479	2,72	10541	6,51	38182	21,53	5,4
N55I/T57I/I69F	211	2855	0,14	1901	1,17	14759	8,32	1,5
E35D/M43I/A71D	212	63789	3,08	6369	3,94	27290	15,39	10,0
T41S/T57I/L70R	213	59844	2,89	4902	3,03	19527	11,01	12,2
H18Y/A71D/L72P/	214	68391	3,30	8862	5,48	1085	0,61	7,7

E88V								
V20I/A71D	215	60323	2,91	10500	6,49	3551	2,00	5,7
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	216	59025	2,85	5484	3,39	10662	6,01	10,8
A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V	217	63738	3,07	7411	4,58	1221	0,69	8,6
V22L/E35D/M43L/A71G/D76H	218	2970	0,14	1498	0,93	1851	1,04	2,0
E35G/K54E/A71D/L72P	219	71899	3,47	3697	2,29	1575	0,89	19,4
L70Q/A71D	220	45012	2,17	18615	11,50	1692	0,95	2,4
A26E/E35D/M47L/L85Q	221	40325	1,94	2266	1,40	55548	31,33	17,8
D46E/A71D	222	69674	3,36	16770	10,36	22777	12,85	4,2
Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W	223	3379	0,16	2446	1,51	18863	10,64	1,4
IgV CD80 WT–Fc (неактивный)	3031	20739	1,00	1618	1,00	1773	1,00	12,8
ECD CD80 WT–Fc (неактивный)	2	72506	3,50	3072	1,90	4418	2,49	23,6

ПРИМЕР 7

Селекция дополнительных вариантов IgV–доменов CD80 и оценка активности связывания

[0618] Для уточнения аффинности и функциональной мощности взаимодействий вариантов IgV CD80 с противоструктурами CTLA4, CD28 и PD–L1 осуществляли вторую и третью очереди (Gen) случайного мутагенеза и селекции с использованием способов, по существу, описанных в примерах 1–3. В кратком изложении, плазмидную ДНК дрожжей выделяли из переросших дрожжей после селекции посредством FACS и использовали ее в качестве матрицы для мутагенной ПЦР. Для максимизации разнообразия оба охарактеризованных отдельных варианта и совокупность выбранных посредством FACS вариантов использовали в качестве матрицы. Полученную библиотеку подвергали

повторяющимся раундам селекции посредством FACS и перерастанию. Для повышения аффинности PD–L1 при сохранении аффинности CD28 использовали множество путей прогрессирующей сортировки FASC. Мутагенную библиотеку второго поколения подвергали четырем селекциям посредством FACS, чередующихся между селекцией CD28– и CTLA4+, получая выходные результаты, которые, при титровании против противоструктур, выбирали для переформатирования в векторы Fc. Для мутагенной библиотеки третьего поколения использовали следующие пути селекции посредством FACS для получения дрожжей, которые, при титровании против противоструктур, выбирали для переформатирования в векторы Fc: 1. 50 нМ PD–L1+, 2a. 1 нМ CTLA4+, 2b. 20 нМ CTLA4–, 2a3. 10 нМ PD–L1+, 2b3. 10 нМ PD–L1+, 2b34. 25 нМ CD28+. После селекции дрожжей, экспрессирующих аффинно–модифицированные варианты CD80, выбранные варианты переформатировали в виде Fc–слитого белка для получения дополнительных Fc–слитых белков, содержащих варианты IgV CD80. После анализа последовательностей отдельные варианты выбирали для получения белка, анализа связывания и функционального анализа. Варианты поколения 1, полученные посредством мутагенеза, представлены в таблице 10, поколение 2 представлено в таблице 11, поколение 3 представлено в таблицах 12 и 13.

[0619] Анализировали связывание выбранных иммуномодулирующих слитых белков с когнатными партнерами по связыванию. Для получения клеток, экспрессирующих когнатных партнеров по связыванию CD80, huCTLA4 и huPD–L1, получали полноразмерные экспрессирующиеся на поверхности конструкции млекопитающего, встроенные в лентивирус, с помощью которого трансдуцировали клетки CHO. Клетки сортировали с помощью клеточного сортера Bio–Rad S3 (Bio–Rad Corp., USA) до чистоты >98%. Для детекции связывания с CD28 использовали репортерные клетки Jurkat/ИЛ–2, эндогенно экспрессирующие CD28.

[0620] Для окрашивания и анализа посредством проточной цитометрии 100000 клеток из соответствующих трансфицированных клеток высевали в 96–луночные круглодонные планшеты. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания (фосфатно–солевом буфере (PBS), 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0,1% азида натрия) в течение 20 минут для блокирования неспецифического связывания. Затем клетки центрифугировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания, содержащего шеститочечное серийное разведение (концентрации в диапазоне от 100 нМ до 41 пМ) каждого белка–кандидата вариант CD80–Fc, в 50 мкл. Первичное окрашивание осуществляли на льду в течение 45 минут перед двукратным промыванием клеток в буфере для окрашивания. Конъюгированное с фикоэритрином (PE) антитело против Fc человека (Jackson ImmunoResearch, USA) разводили 1:150, добавляли к клеткам и инкубировали еще в течение 30 минут на льду. Затем клетки дважды промывали 150 мкл/лунку буфера для окрашивания, фиксировали в 2% формальдегида/PBS и анализировали с помощью проточного цитометра Intellicyt (Intellicyt Corp., USA). Для каждого типа клеток среднюю интенсивность флуоресценции

(MFI) PE вычисляли с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10 (FlowJo LLC, USA).

[0621] Результаты двух исследований связывания примеров вариантов CD80 представлены в таблицах 12 и 13. В таблицах примеры замен аминокислот обозначены по номеру положения аминокислоты, соответствующему нумерации соответствующей референсной последовательности немодифицированного IgV. Например, референсная последовательность немодифицированного ECD является последовательностью немодифицированного ECD CD80, приведенной в SEQ ID NO: 2. Положение аминокислоты указано в середине, соответствующая немодифицированная аминокислота (например, дикого типа) указана перед номером, а идентифицированный вариант замены аминокислоты указан после номера. Во второй колонке представлен идентификатор SEQ ID NO для варианта IgV для каждой слитой молекулы варианта IgV–Fc.

[0622] Также представлена активность связывания, измеряемая по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания 33 нМ каждой слитой молекулы варианта CD80 Fc с клетками, сконструированными для экспрессии указанного когнатного лиганда–противоструктуры (т.е. CTLA–4, PD–L1 или CD28), и соотношение MFI варианта IgV CD80–Fc по сравнению со связыванием немодифицированной слитой молекулы ECD CD80–Fc (R&D Systems, USA), несодержащей замены аминокислоты, с тем же экспрессируемым клетками лигандом–противоструктурой. В последних колонках таблиц также представлено соотношение связывания варианта IgV CD80–Fc с противоструктурой PD–L1 по сравнению со связыванием варианта IgV CD80–Fc с противоструктурой CD28.

[0623] Как показано, селекция приводила к идентификации нескольких вариантов IgV–доменов CD80, являющихся аффинно–модифицированными таким образом, что они демонстрируют повышенное связывание с противоструктурами PD–L1 и/или CD28. Несколько вариантов также сохраняли или проявляли повышенное связывание с CTLA–4, в то время как другие проявляли сниженное связывание с CTLA–4. Кроме того, результаты свидетельствуют о том, что при селекции получали ряд вариантов, демонстрирующих сниженное связывание с CD28, включая несколько вариантов IgV–доменов CD80, демонстрирующих повышенное связывание с лигандом–противоструктурой PD–L1 по сравнению с лигандом–противоструктурой CD28 (соотношение PD–L1:CD28). Таким образом, варианты имеют уникальные профили связывания с CTLA4, CD28 и PD–L1 на поверхности клетки, измеряемые посредством проточной цитометрии.

ТАБЛИЦА 12: Связывание вариантов CD80 с клетками Jurkat (CD28) и клетками CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации CD80	**SEQ ID NO**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношен**
		MFI	**Кратн**	**MFI**	**Кратн**	**MFI**	**Кратн**	

	(IgV)	**при 33,3 нМ**	**ое изменение относительно WT CD80**	**при 33,3 нМ**	**ое изменение относительно WT**	**при 33,3 нМ**	**ое изменение относительно WT**	**ие PD–L1:CD28**
A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E	2201	1275	0,01	275	0,04	75974	9,56	276
A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q	2202	1280	0,01	264	0,03	81533	10,26	309
E35D/M47L/L85Q	2203	336179	1,88	646	0,08	33200	4,18	51
A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2204	1172	0,01	274	0,04	62680	7,89	229
A26E/Q33L/E35D/M47L	2205	1316	0,01	271	0,04	60903	7,67	225
H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2206	2088	0,01	272	0,04	76591	9,64	282
Q33L/E35D/M47I	2207	15919	0,09	282	0,04	37353	4,70	132
H18Y/Q33L/E35D/M47I	2208	5539	0,03	295	0,04	47793	6,02	162
Q33L/E35D/D46E/M47I	2209	23328	0,13	281	0,04	42137	5,30	150
Q33R/E35D/D46E/M47I	2210	3562	0,02	303	0,04	53345	6,72	176
H18Y/E35D/M47L	2211	284445	1,59	5068	0,66	44161	5,56	9
Q33L/E35D/M47V	2212	47648	0,27	281	0,04	47911	6,03	170
Q33L/E35D/M47V/T79A	2213	28899	0,16	285	0,04	62078	7,82	218
Q33L/E35D/T41S/M47V	2214	14515	0,08	287	0,04	43850	5,52	153

Q33L/E35D/M47I/L85Q	2215	20548	0,11	287	0,04	63930	8,05	222
Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q	2216	1658	0,01	284	0,04	72578	9,14	256
Q33L/E35D/M47V/L85Q	2217	75368	0,42	268	0,04	47438	5,97	177
A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q	2218	278021	1,56	260	0,03	68089	8,57	262
Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q	2219	22701	0,13	258	0,03	44438	5,59	172
V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V	2220	3636	0,02	274	0,04	75513	9,51	275
E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q	2221	310964	1,74	3180	0,42	67066	8,44	21
S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2222	22377	0,13	266	0,03	51558	6,49	194
E7D/E35D/M47I/L97Q	2223	270798	1,52	273	0,04	14643	1,84	54
Q33L/E35D/T41S/M43I	2224	6388	0,04	433	0,06	44935	5,66	104
E35D/M47I/K54R/L85E	2225	8665	0,05	285	0,04	36917	4,65	130
Q33K/E35D/D46V/L85Q	2226	8507	0,05	257	0,03	26676	3,36	104
Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G	2227	1095	0,01	278	0,04	38909	4,90	140
H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q	2228	373548	2,09	434	0,06	98110	12,35	226
Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K	2229	288596	1,61	282	0,04	36055	4,54	128
Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R	2230	1752	0,01	276	0,04	39061	4,92	142
E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W	2231	247334	1,38	272	0,04	64521	8,12	238

A26E/E35D/M43I/ M47L/L85Q/K86E/ R94W	2232	2947	0,02	314	0,04	49440	6,22	157
Q27H/Q33L/E35D/ M47V/N55D/L85Q/ K89N	2233	56061	0,31	269	0,04	14802	1,86	55
H18Y/V20A/Q33L/ E35D/M47V/Y53F	2234	2878	0,02	260	0,03	120517	15,17	463
V22A/E35D/V68E/ A71D	2235	437038	2,45	13987	1,83	1350	0,17	0
Q33L/E35D/M47L/ A71G/F92S	2236	2107	0,01	366	0,05	28041	3,53	77
V22A/R29H/E35D/ D46E/M47I	2237	77423	0,43	323	0,04	25407	3,20	79
Q33L/E35D/M43I/ L85Q/R94W	2238	1083	0,01	272	0,04	29001	3,65	107
H18Y/E35D/V68M/ L97Q	2239	172538	0,97	299	0,04	121591	15,31	407
Q33L/E35D/M47L/ V68M/L85Q/E88D	2240	3526	0,02	264	0,03	125741	15,83	476
Q33L/E35D/M43V/ M47I/A71G	2241	13964	0,08	284	0,04	78029	9,82	275
E35D/M47L/A71G/ L97Q	2242	225591	1,26	300	0,04	65944	8,30	220
E35D/M47V/A71G/ L85M/L97Q	2243	239089	1,34	339	0,04	61708	7,77	182
H18Y/Y31H/E35D/ M47V/A71G/L85Q	2244	3835	0,02	268	0,04	76364	9,61	285
E35D/D46E/M47V/ L97Q	2245	305331	1,71	371	0,05	19484	2,45	52
E35D/D46V/M47I/ A71G/F92V	2246	287194	1,61	7543	0,99	45755	5,76	6
E35D/M47V/T62A/ A71G/V83A/Y87H/	2247	18113	0,10	305	0,04	77547	9,76	255

L97M								
Q33L/E35D/N48K/ L85Q/L97Q	2248	1183	0,01	279	0,04	45185	5,69	162
ECD CD80 WT–Fc (R&D)	2	178708	1,00	7627	1,00	7943	1,00	1

ТАБЛИЦА 13: Связывание вариантов CD80 с клетками Jurkat (CD28) и клетками CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Ratio of PD–L1:CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 НМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	
E35D/L85Q/K93T/ E95V/L97Q	2249	246401	1,57	400	0,02	19880	1,67	50
E35D/M47V/N48K /V68M/K89N	2250	807	0,01	11736	0,65	89775	7,56	8
Q33L/E35D/M47I/ N48D/A71G	2251	116798	0,74	644	0,04	31151	2,62	48
R29H/E35D/M43V /M47I/I49V	2252	4694	0,03	336	0,02	1590	0,13	5
Q27H/E35D/M47I/ L85Q/D90G	2253	257734	1,64	3513	0,19	30667	2,58	9
E35D/M47I/L85Q/ D90G	2254	247703	1,57	4095	0,23	35710	3,01	9
E35D/M47I/T62S/ L85Q	2255	300845	1,91	1758	0,10	44975	3,79	26
A26E/E35D/M47L/ A71G	2256	341248	2,17	2161	0,12	53352	4,49	25

E35D/M47I/Y87Q/K89E	2257	110177	0,70	15452	0,86	29803	2,51	2
V22A/E35D/M47I/Y87N	2258	245711	1,56	15299	0,85	35251	2,97	2
H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G	2259	230588	1,47	3540	0,20	52390	4,41	15
E35D/M47L/A71G/L85Q	2260	156254	0,99	1436	0,08	50474	4,25	35
E35D/M47V/A71G/E88D	2261	211831	1,35	6237	0,35	37146	3,13	6
E35D/A71G	2262	184204	1,17	4299	0,24	34149	2,88	8
E35D/M47V/A71G	2263	226532	1,44	6360	0,35	36216	3,05	6
I30V/E35D/M47V/A71G/A91V	2264	204756	1,30	5779	0,32	43877	3,70	8
V22D/E35D/M47L/L85Q	2266	256426	1,63	542	0,03	34908	2,94	64
H18Y/E35D/N48K	2267	260795	1,66	4189	0,23	45849	3,86	11
E35D/T41S/M47V/A71G/K89N	2268	251238	1,60	5314	0,29	45436	3,83	9
E35D/M47V/N48T/L85Q	2269	281417	1,79	692	0,04	35491	2,99	51
E35D/D46E/M47V/A71D/D90G	2270	274661	1,75	6169	0,34	32371	2,73	5
E35D/D46E/M47V/A71D	2271	174016	1,11	5949	0,33	549	0,05	0
E35D/T41S/M43I/A71G/D90G	2272	208017	1,32	9249	0,51	56172	4,73	6
E35D/T41S/M43I/M47V/A71G	2273	243502	1,55	2845	0,16	44419	3,74	16
E35D/T41S/M43I/M47L/A71G	2274	209034	1,33	3104	0,17	59613	5,02	19

H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G	2275	219782	1,40	4214	0,23	87702	7,39	21
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2276	253787	1,61	14934	0,83	170935	14,40	11
E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N	2277	243506	1,55	1589	0,09	26542	2,24	17
Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G	2278	157358	1,00	10412	0,58	60139	5,07	6
V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G	2279	151600	0,96	7269	0,40	43797	3,69	6
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D	2280	224734	1,43	5027	0,28	137368	11,57	27
E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G	2281	249456	1,59	2698	0,15	12978	1,09	5
E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q	2282	274320	1,74	1331	0,07	69780	5,88	52
E35D/M47V/T62A/A71D/K93E	2283	225737	1,44	12030	0,67	693	0,06	0
E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E	2284	273157	1,74	27080	1,50	71903	6,06	3
E35D/M43I/M47V/K89N	2285	278391	1,77	6752	0,37	19250	1,62	3
E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y	2286	215998	1,37	2459	0,14	46684	3,93	19
E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q	2287	225986	1,44	1291	0,07	11897	1,00	9
V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q	2288	127835	0,81	527	0,03	17670	1,49	34
E35D/T41S/M47V/L97Q	2289	262204	1,67	290	0,02	13591	1,14	47
E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R	2290	182701	1,16	1547	0,09	57455	4,84	37
E35D/A71D/L72V/	2291	18658	1,19	3365	0,19	503	0,04	0

R73H/E81K		2						
Q33L/E35D/M43I/ Y53F/T62S/L85Q	2292	3985	0,03	1024	0,06	72065	6,07	70
E35D/M38T/D46E/ M47V/N48S	2293	175387	1,11	587	0,03	19393	1,63	33
Q33R/E35D/M47V /N48K/L85M/F92L	2294	2680	0,02	265	0,01	21425	1,80	81
E35D/M38T/M43V /M47V/N48R/L85Q	2295	203938	1,30	285	0,02	21795	1,84	76
T28Y/Q33H/E35D/ D46V/M47I/A71G	2296	156810	1,00	298	0,02	46038	3,88	154
ECD CD80 WT–Fc (R&D)	2	157306	1,00	18035	1,00	11871	1,00	1

[0624] Для дополнительного сравнения связывания анализировали различные концентрации примеров молекул вариантов IgV CD80–Fc и сравнивали их с IgV CD80–Fc дикого типа по связыванию с экспрессирующимися на поверхности клетки PD–L1, CD28 и CTLA–4. Примеры тестируемых вариантов IgV CD80–Fc включали: E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276), H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G (SEQ ID NO: 2275) и E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250). Связывание с CD28 анализировали с использованием репортерных клеток Jurkat/ИЛ–2, экспрессирующих CD28, и связывание с CTLA–4 и PD–L1 анализировали с использованием клеток CHO, стабильно трансфицированных для экспрессии huCTLA–4 или huPD–L1, как описано выше. Указанных трансфектантов или линии клеток высевали и окрашивали с использованием титруемых количеств vIgD CD80–Fc или IgV CD80–Fc дикого типа. Связанный белок определяли с помощью конъюгированного с флуорохромом антитела против huFc и средней интенсивности флуоресценции (MFI), измеряемой посредством проточной цитометрии. Как показано на фиг. 9A, некоторые из тестируемых vIgD CD80–Fc связывались с PD–L1 человека, CTLA–4 человека и CD28 человека с более высокой аффинностью, чем CD80 дикого типа.

ПРИМЕР 8

Оценка биологической активности подвергнутых аффинному созреванию молекул, содержащих домен IgSF CD80, с использованием репортерного анализа Jurkat/ИЛ–2

[0625] В этом примере описывают репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2 для оценки биологической активности иммуномодулирующих белков с вариантами доменов CD80, в отношении блокады костимуляции CD28.

[0626] За день до анализа подготавливали планшет. Для получения планшета для анализа 10 нМ антитела против CD3 (клон OKT3; BioLegend, кат. № 317315) и 20 нМ

CD86–Fc (R&D Systems, кат. № 141–B2) в PBS аликвотировали в количестве 100 мкл/лунку в белый плоскодонный 96–луночный планшет (Costar). Планшет инкубировали в течение ночи при 4°C, чтобы позволить антителу и белку CD86–Fc прикрепиться к поверхности планшета. На следующий день перед анализом лунки планшета для анализа дважды промывали 150 мкл PBS.

[0627] В день анализа 60 мкл примеров слитых молекул вариантов IgV CD80–Fc и контроля, IgV CD80–Fc дикого типа или CD80 (ECD)–Fc дикого типа, или отрицательный контроль, Fc в отдельности, разводили до концентрации 40 нМ в буфере для анализа (RPMI1640+5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS)) или буфере в отдельности и добавляли в лунки нового 96–луночного полипропиленового планшета. Эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2–люцифераза, подсчитывали и ресуспендировали в буфере для анализа до концентрации 2×10^6 клеток/мл. Затем 60 мкл суспензии клеток Jurkat добавляли в лунки, содержащие слитые молекулы CD80–Fc или контроли. Клетки и белки CD80 инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, а затем 100 мкл смеси клеток/белка CD80 переносили в лунку подготовленного планшета для анализа с антителом против CD3/CD86–Fc.

[0628] Планшет для анализа центрифугировали в течение короткого периода времени (10 секунд при 1200 об./мин.) и инкубировали при 37°C в течение 5 часов. Через 5 часов инкубации планшет вынимали и уравновешивали до комнатной температуры в течение 15 минут. Добавляли 100 мкл Bio–Glo (Promega) на лунку планшета для анализа, который затем помещали в орбитальный шейкер в течение 10 минут. Люминесценцию измеряли со временем интегрирования 1 секунда на лунку с использованием люминометра BioTek Cytation 3.

[0629] Определяли среднее значение относительной люминесценции для каждого варианта IgV CD80–Fc и вычисляли кратное повышение сигнала репортера ИЛ–2 для каждого варианта по сравнению с белком IgV CD80–Fc дикого типа. Результаты представлены в таблице 14 ниже.

[0630] Как показано в таблице 14, сокультивирование большинства примеров молекул вариантов IgV CD80–Fc с эффекторными клетками Jurkat, экспрессирующими репортер ИЛ–2–люцифераза, приводило к сниженной костимуляции CD28 (т.е. блокаде) по сравнению с буфером в отдельности или отрицательным контролем, содержащим только Fc. В отличие от этого, несколько молекул вариантов IgV CD80–Fc, по–видимому, повышали костимуляторный сигнал CD28 по сравнению с молекулой IgV CD80–Fc дикого типа, что позволяет предполагать возможную агонистическую активность.

ТАБЛИЦА 14. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2: блокада костимуляции CD28

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**Средние относительные люминесцентные единицы**	**Кратное повышение сигнала репортера ИЛ–2**

Q27H/T41S/A71D	153	1301	0,32
I30T/L70R	154	3236	0,79
T13R/C16R/L70Q/A71D	155	3204	0,78
T57I	156	1463	0,36
M43I/C82R	157	1326	0,32
V22L/M38V/M47T/A71D/L85M	158	1770	0,43
I30V/T57I/L70P/A71D/A91T	159	1731	0,42
V22I/L70M/A71D	160	253	0,06
N55D/K86M	163	4277	1,04
L72P/T79I	164	4157	1,01
L70P/F92S	165	5035	1,22
T79P	166	4397	1,07
E35D/M47I/L65P/D90N	167	2377	0,58
L25S/E35D/M47I/D90N	168	2567	0,62
A71D	170	999	0,24
E81K/A91S	172	4038	0,98
A12V/M47V/L70M	173	4999	1,22
K34E/T41A/L72V	174	4225	1,03
T41S/A71D/V84A	175	2685	0,65
E35D/A71D	176	1461	0,36
E35D/M47I	177	1444	0,35
K36R/G78A	178	2597	0,63
Q33E/T41A	179	4220	1,03
M47V/N48H	180	2656	0,65
M47L/V68A	181	5445	1,32
S44P/A71D	182	2848	0,69
Q27H/M43I/A71D/R73S	183	1891	0,46
E35D/T57I/L70Q/A71D	185	280	0,07
M47I/E88D	186	2178	0,53
M42I/I61V/A71D	187	2549	0,62
P51A/A71D	188	4690	1,14
H18Y/M47I/T57I/A71G	189	924	0,22
V20I/M47V/T57I/V84I	190	1870	0,45

V20I/M47V/A71D	191	360	0,09
A71D/L72V/E95K	192	2939	0,71
V22L/E35G/A71D/L72P	193	2334	0,57
E35D/A71D	194	812	0,20
E35D/I67L/A71D	195	1223	0,30
T13R/M42V/M47I/A71D	197	759	0,18
E35D	198	1981	0,48
E35D/M47I/L70M	199	1077	0,26
E35D/A71/L72V	200	1152	0,28
E35D/M43L/L70M	201	3640	0,88
A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D	202	4078	0,99
E35D/D46V/L85Q	203	3230	0,79
Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/ E88D	204	1180	0,29
Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I	196	2000	0,49
M47V/I69F/A71D/V83I	205	290	0,07
E35D/T57A/A71D/L85Q	206	3213	0,78
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	207	2773	0,67
E35D/M47L	208	1110	0,27
E23D/M42V/M43I/I58V/L70R	209	4460	1,08
V68M/L70M/A71D/E95K	210	2067	0,50
N55I/T57I/I69F	211	1915	0,47
E35D/M43I/A71D	212	3019	0,73
T41S/T57I/L70R	213	3641	0,89
H18Y/A71D/L72P/E88V	214	1354	0,33
V20I/A71D	215	2165	0,53
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/ L72V/L85M	216	2067	0,50
A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/ L72P/E95V	217	2408	0,59
V22L/E35D/M43L/A71G/D76 H	218	2004	0,49
E35G/K54E/A71D/L72P	219	3618	0,88
L70Q/A71D	220	1036	0,25

A26E/E35D/M47L/L85Q	221	4111	1,00
D46E/A71D	222	490	0,12
Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/ R94W	223	3678	0,89
IgV CD80 WT–Fc	3031	4113	1,00
ECD CD80 WT–Fc	2	3816	0,93
Контроль, только Fc	–	4107	1,00
Только буфер	–	4173,25	1,01

ПРИМЕР 9

Оценка биологической активности подвергнутых аффинному созреванию молекул, содержащих домен IgSF CD80, в присутствии и отсутствие PD–L1 с использованием репортерного анализа Jurkat/ИЛ–2

[0631] В этом примере описывают репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2 для оценки способности иммуномодулирующих белков с вариантами доменов CD80, слитыми с неактивной молекулой Fc (например, SEQ ID NO: 1714) или молекулой Fc, способной опосредовать эффекторную активность (SEQ ID NO: 1429), для модуляции костимуляторного сигнала CD28 в присутствии или отсутствие PD–L1–экспрессирующих антигенпрезентирующих клеток.

A. PD–L1–ЗАВИСИМАЯ КОСТИМУЛЯЦИЯ CD28

[0632] Эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие репортер ИЛ–2–люцифераза (приобретенный в Promega Corp., USA), суспендировали в количестве 2×10^6 клеток/мл в буфере для анализа Jurkat (RPMI1640+5% FBS). Затем клетки Jurkat высевали в объеме 50 мкл/лунку в количестве всего 100000 клеток на лунку.

[0633] 25 мкл тестового белка добавляли в каждую лунку к клетками Jurkat. Тестовые белки включали слитые молекулы варианта IgV CD80–Fc (неактивного), или полноразмерный ECD CD80–Fc (R&D Systems, USA), или IgV CD80–Fc дикого типа (неактивного). Все белки добавляли в количестве: 200 нМ, 66,7 нМ и 22,2 нМ (без PD–L1) или 200 нМ, 66,7 нМ, 22,2 нМ, 7,4 нМ и 2,5 нМ (+PD–L1). Клетки Jurkat с тестовыми или контрольными белками инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Полученные из CHO искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC), экспонирующие на поверхности клетки трансдуцированный одноцепочечный Fv против CD3 (OKT3) (т.е. без PD–L1) или OKT3 и PD–L1 (т.е. + PD–L1), доводили до количества $0{,}8\times10^6$ клеток/мл и в каждую лунку добавляли 25 мкл клеток, доводя конечный объем в каждой лунке до 100 мкл. Каждая лунка имела конечное соотношение Jurkat:CHO 5:1 клеток и концентрацию тестового белка 50, 16,7 или 5,6 нМ (без PD–L1) или 50, 16,7, 5,6, 1,9 и 0,6 нМ (+ PD–L1). Клетки Jurkat и клетки CHO инкубировали в течение 5 часов при 37°C во влажной камере инкубатора с 5% CO_2. Затем планшеты вынимали из инкубатора и доводили до комнатной температуры в течение 15 минут. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора для лизиса клеток и субстрата люциферазы (реагента для люциферазы

BioGlo, Promega) и инкубировали планшеты на орбитальном шейкере в течение 10 минут. Люминесценцию измеряли со временем интеграции 1 секунда на лунку с использованием люминометра BioTek Cytation и определяли значение относительной люминесценции (RLU) для каждого тестового образца. Результаты представлены в таблице 15.

[0634] В отсутствие PD–L1 на aAPC наблюдали небольшой костимуляторный сигнал или его отсутствие, что соответствует наблюдению о том, что молекулы вариантов CD80, слитые с неактивным Fc, не могли индуцировать костимуляторный сигнал через CD28. Однако, в присутствии PD–L1 несколько из тестируемых молекул вариантов IgV CD80–Fc (неактивного) проявляли зависящую от концентрации костимуляцию CD28, которая коррелировала с аффинностью связывания молекул вариантов с CD28 и/или PD–L1. Этот результат свидетельствует о том, что молекулы вариантов CD80 с повышенной аффинностью к PD–L1 могут опосредовать PD–L1–зависимую костимуляцию CD28.

ТАБЛИЦА 15. PD–L1–зависимая костимуляция CD28

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**Без PD–L1**			**+ PD–L1**				
		5,6 нМ	**16,7 нМ**	**50 нМ**	**0,6 нМ**	**1,9 нМ**	**5,6 нМ**	**16,7 нМ**	**50 нМ**
E35D/M47I	177	637	710	894	1047	1732	2794	3672	3778
A71D/L72V/E95K	192	466	547	644	524	530	617	641	755
E35D	198	412	480	448	456	465	625	995	1606
E35D/M47I/L70M	199	549	544	600	1004	1640	2348	2629	2629
E35D/M43L/L70M	201	396	439	515	479	525	683	1066	1809
E35D/D46V/L85Q	203	511	554	720	611	1001	1486	1814	2224
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	207	638	660	926	628	621	795	974	1156
E35D/M47L	208	633	731	817	1041	1730	2580	3069	2906
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	216	566	560	606	524	604	659	689	695
E35G/K54E/A71D/L72P	219	417	475	440	529	489	554	504	476
A26E/E35D/M47L/L85Q	221	458	415	432	509	618	886	1385	1998
IgV CD80 WT–Fc (неактивный)	3031	450	444	479	458	486	511	523	483
ECD CD80 WT–Fc (неактивный)	2	436	412	420	518	474	505	462	449

Контроль, только Fc	–	419	406	395	501	457	438	451	440

[0635] В дополнительном варианте другие слитые белки вариантов IgV CD80–Fc (неактивного) тестировали на стимуляцию CD28 в отсутствие aAPC +/– PD–L1, как описано выше, за исключением того, что конечные концентрации каждого тестового белка составляли 50 нМ и 5 нМ. Определяли значение относительной люминесценции (RLU) для каждого тестового образца, вычисляли кратное повышение (или снижение) сигнала репортера ИЛ–2 для каждой молекулы варианта IgV CD80 и сравнивали с белками ECD CD80–Fc дикого типа (неактивного) и IgV CD80–Fc (неактивного).

[0636] Как показано в таблицах 16 и 17, люциферазная активность эффекторных клеток Jurkat, сокультивируемых с K562/OKT3/PD–L1 aAPC и 50 нМ молекул IgV CD80–Fc (неактивного), была измененной (повышенной или сниженной) в случае нескольких из тестируемых молекул. Одновременное связывание PD–L1 на aAPC и CD28 на клетке Jurkat приводило к повышенной костимуляции CD28 и нижележащей передаче сигнала ИЛ–2. Также показано кратное повышение (или снижение) люминесценции относительно IgV CD80–Fc (неактивного) дикого типа. В таблице в первой колонке приведены мутации, а во второй колонке приведен идентификатор SEQ ID NO для каждого тестируемого варианта IgV CD80 из IgV CD80–Fc (неактивного).

ТАБЛИЦА 16: Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+K562/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CD80–Fc, конц. 50 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E	2201	569	1,0
A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q	2202	500	0,9
E35D/M47L/L85Q	2203	2852	5,0
A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2204	416	0,7
A26E/Q33L/E35D/M47L	2205	476	0,8
H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2206	408	0,7
Q33L/E35D/M47I	2207	423	0,7
H18Y/Q33L/E35D/M47I	2208	486	0,9
Q33L/E35D/D46E/M47I	2209	554	1,0
Q33R/E35D/D46E/M47I	2210	522	0,9
H18Y/E35D/M47L	2211	2976	5,3
Q33L/E35D/M47V	2212	393	0,7
Q33L/E35D/M47V/T79A	2213	527	0,9
Q33L/E35D/T41S/M47V	2214	481	0,8

Q33L/E35D/M47I/L85Q	2215	432	0,8
Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q	2216	463	0,8
Q33L/E35D/M47V/L85Q	2217	556	1,0
A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q	2218	526	0,9
Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q	2219	464	0,8
V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V	2220	390	0,7
E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q	2221	3235	5,7
S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q	2222	468	0,8
E7D/E35D/M47I/L97Q	2223	1243	2,2
Q33L/E35D/T41S/M43I	2224	533	0,9
E35D/M47I/K54R/L85E	2225	602	1,1
Q33K/E35D/D46V/L85Q	2226	504	0,9
Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G	2227	496	0,9
H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q	2228	2652	4,7
Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K	2229	513	0,9
Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R	2230	415	0,7
E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W	2231	473	0,8
A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W	2232	498	0,9
Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N	2233	551	1,0
H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F	2234	566	1,0
V22A/E35D/V68E/A71D	2235	538	1,0
Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S	2236	394	0,7
V22A/R29H/E35D/D46E/M47I	2237	3314	5,9
Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W	2238	553	1,0
H18Y/E35D/V68M/L97Q	2239	4336	7,7
Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D	2240	572	1,0
Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G	2241	473	0,8
E35D/M47L/A71G/L97Q	2242	2156	3,8
E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q	2243	576	1,0
H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q	2244	455	0,8
E35D/D46E/M47V/L97Q	2245	1087	1,9
E35D/D46V/M47I/A71G/F92V	2246	2254	4,0

E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M	2247	438	0,8
Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q	2248	358	0,6
ECD CD80 WT–Fc (эффекторный)	2	3045	5,4
IgV CD80 WT–Fc (неактивный)	3031	566	1

ТАБЛИЦА 17: Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+K562/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CD80–Fc, конц. 50 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q	2249	315	1,5
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	2250	1439	7,0
Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G	2251	213	1,0
R29H/E35D/M43V/M47I/I49V	2252	227	1,1
Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G	2253	1313	6,4
E35D/M47I/L85Q/D90G	2254	1438	7,0
E35D/M47I/T62S/L85Q	2255	1571	7,6
A26E/E35D/M47L/A71G	2256	1748	8,5
E35D/M47I/Y87Q/K89E	2257	1581	7,7
V22A/E35D/M47I/Y87N	2258	1388	6,7
H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G	2259	1506	7,3
E35D/M47L/A71G/L85Q	2260	1256	6,1
E35D/M47V/A71G/E88D	2261	1216	5,9
E35D/A71G	2262	1190	5,8
E35D/M47V/A71G	2263	1190	5,8
I30V/E35D/M47V/A71G/A91V	2264	1503	7,3
V22D/E35D/M47L/L85Q	2266	1142	5,5
H18Y/E35D/N48K	2267	1230	6,0
E35D/T41S/M47V/A71G/K89N	2268	1023	5,0
E35D/M47V/N48T/L85Q	2269	897	4,4
E35D/D46E/M47V/A71D/D90G	2270	1042	5,1
E35D/D46E/M47V/A71D	2271	683	3,3
E35D/T41S/M43I/A71G/D90G	2272	1122	5,4
E35D/T41S/M43I/M47V/A71G	2273	1273	6,2

E35D/T41S/M43I/M47L/A71G	2274	1535	7,5
H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G	2275	1379	6,7
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2276	1116	5,4
E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N	2277	851	4,1
Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G	2278	978	4,7
V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G	2279	1123	5,5
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D	2280	1464	7,1
E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G	2281	1672	8,1
E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q	2282	1381	6,7
E35D/M47V/T62A/A71D/K93E	2283	1056	5,1
E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E	2284	1261	6,1
E35D/M43I/M47V/K89N	2285	1094	5,3
E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y	2286	1322	6,4
E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q	2287	1260	6,1
V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q	2288	1542	7,5
E35D/T41S/M47V/L97Q	2289	594	2,9
E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R	2290	1723	8,4
E35D/A71D/L72V/R73H/E81K	2291	282	1,4
Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q	2292	168	0,8
E35D/M38T/D46E/M47V/N48S	2293	1315	6,4
Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L	2294	215	1,0
E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q	2295	680	3,3
T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G	2296	580	2,8
ECD CD80 WT–Fc (эффекторный)	2	1786	8,7
IgV CD80 WT–Fc (неактивный)	3031	206	1,0

[0637] Для дополнительного сравнения активности различные концентрации примеров вариантов IgV CD80–Fc (неактивного) оценивали по индукции люциферазной активности в репортерных клетках Jurkat/ИЛ–2 с использованием линии клеток K562/OKT3/PD–L1 aAPC, описанной выше, и сравнивали активность с IgV CD80–Fc дикого типа (неактивным). Примеры тестируемых молекул вариантов CD80 IgV включали E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G (SEQ ID NO: 2275), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276) и E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280). Как показано на фиг. 9B, примеры тестируемых молекул вариантов CD80, содержащих IgV–домен, индуцировали

PD–L1–зависимую костимуляцию CD28 дозозависимым образом. В случае IgV CD80–Fc дикого типа не наблюдали PD–L1–зависимую костимуляцию CD28 при любой из анализируемых концентраций.

B. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ПОСЛЕ PD–L1–ЗАВИСИМОЙ КОСТИМУЛЯЦИИ

[0638] Клетки K562/OKT3/PD–L1 aAPC, описанные выше, обрабатывали митомицином–с и сокультивировали с первичными пан–Т–клетками человека в присутствии титруемых увеличивающихся концентраций IgV CD80–Fc (неактивного) или IgV CD80–Fc дикого типа (неактивного). Примеры тестируемых вариантов CD80–F включали E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276), E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280), E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E (SEQ ID NO: 2284). В качестве дополнительного контроля также культивировали первичные пан–Т–клетки человека с примером антитела против PD–L1 дурвалумабом или только контрольным Fc (неактивным). Результаты, показанные на фиг. 9C, свидетельствуют о том, что тестируемые молекулы вариантов IgV CD80–Fc приводили к секреции ИЛ–2 в супернатантах культур, что соответствует наблюдению о том, что тестируемые примеры молекул вариантов IgV CD80–Fc индуцировали PD–L1–зависимую костимуляцию. Не наблюдали продукцию ИЛ–2 в культуре Т–клеток при инкубации с IgV CD80–Fc дикого типа или другими тестируемыми контролями.

C. FC–ЗАВИСИМАЯ КОСТИМУЛЯЦИЯ CD28 +/– PD–L1

[0639] В дополнительном эксперименте анализировали костимуляцию CD28 для вариантов слитых белков IgV CD80–Fc, где Fc являлся Fc IgG1 (например, SEQ ID NO: 1429), способным опосредовать эффекторную активность посредством связывания с Fc–рецепторами (FcR). Эксперимент осуществляли, как описано в части A выше, за исключением того, что использовали CD32–экспрессирующие клетки K562, стабильно трансдуцированные с использованием OKT3 (K562/OKT3) или OKT3 и PD–L1 (K562/OKT3/PD–L1) вместо клеток CHO/OKT3 и CHO/OKT3/PD–L1, и результаты представлены в таблице 18.

ТАБЛИЦА 18. Костимуляция CD28 через Fc–рецептор или PD–L1–зависимую перекрестную сшивку

		K562/OKT3 aAPC					K562/OKT3/PD–L1 aAPC				
Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**FcR–зависимая перекрестная сшивка (без PD–L1)**					**Комбинация FcR– и/или PD–L1–зависимой перекрестной сшивки**				
		0,6 нМ	**1,9 нМ**	**5,6 нМ**	**16,7**	**50 нМ**	**0,6 нМ**	**1,9 нМ**	**5,6 нМ**	**16,7**	**50 нМ**

					нМ					**нМ**	
E35D/M47I	177	1777	2133	3651	5792	7144	2832	3604	4702	5321	5704
A71D/L72V/E95K	192	1821	2588	4127	5553	7109	1060	1537	2517	3642	4031
E35D	198	1402	1328	1300	1318	1203	920	1113	1397	1765	2270
E35D/M47I/L70M	199	1609	2520	4231	5370	5780	2238	2689	3654	3907	3870
E35D/M43L/L70M	201	1349	1336	1404	1345	1573	1022	1250	1616	2046	2780
E35D/D46V/L85Q	203	1880	2721	4396	6023	7015	1418	2432	3306	3645	4126
H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q	207	2081	2808	4550	6958	8747	1156	1825	3121	4329	5215
E35D/M47L	208	2119	3042	5615	7736	8685	2783	3846	4726	5406	5036
E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M	216	2022	3300	5052	7011	7855	1153	1949	3219	4042	4138
E35G/K54E/A71D/L72P	219	1337	1367	1380	1430	1510	689	732	735	701	805
A26E/E35D/M47L/L85Q	221	1350	1382	1416	1371	1327	1228	1586	2004	2504	2640
IgV CD80 WT–Fc	3031	1410	1349	1309	1208	1246	662	674	697	673	663
ECD CD80 WT–Fc (неактивный)	2 (ECD)	1344	1270	1481	1727	2202	692	705	847	875	1519
Контроль, только Fc	1714	1404	1390	1390	1370	1373	689	675	666	694	679

[0640] Некоторые из примеров анализируемых иммуномодулирующих белков с вариантами IgV CD80–Fc (эффекторный), включающие E35D, E35D/M43L/L70M и A26E/E35D/M47L/L85Q, не осуществляли костимуляцию CD28 при перекрестной сшивке посредством связывания с FcR. Однако результаты свидетельствуют о том, что несколько примеров анализируемых вариантов с Fc, способным к связыванию FcR (эффекторным),

могут обеспечивать костимуляцию CD28 в транс–положении с перекрестной сшивкой FcR. Среди них некоторые из анализируемых иммуномодулирующих белков с IgV CD80–Fc (эффекторным), таких как E35D/M47I, повышали костимуляцию CD28 посредством перекрестной сшивки и PD–L1, и FcR. В некоторых случаях результаты свидетельствуют о том, что повышенная костимуляция CD28 посредством перекрестной сшивки FcR и PD–L1 была более мощной, чем при перекрестной сшивке PD–L1 в отдельности.

ПРИМЕР 10

Оценка биологической активности подвергнутых аффинному созреванию молекул, содержащих домен IgSF CD80, с использованием анализа стимуляции Т–клеток

[0641] Молекулы IgV CD80–Fc, содержащие неактивный Fc или эффекторный Fc, тестировали в 3 концентрациях, 1 нМ, 10 нМ и 100 нМ, на способность стимулировать Т–клетки в присутствии искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC), K562/OKT3 +/– PD–L1, что определяют по высвобождению цитокинов (ИФН–гамма и ИЛ–2) и пролиферации Т–клеток.

[0642] 100000 выделенных пан–Т–клеток инкубировали с 8000 K562/OKT3 или K562/OTK3/PD–L1 клеток (соотношение 12,5:1) и 1 нМ, 10 нМ или 100 нМ IgV CD80–Fc (эффекторного) или IgV CD80–Fc (неактивного). Смесь клеток также инкубировали с антителом против PD–L1, IgG1 человека дикого типа, Fc IgG1 человека (неактивным), IgV CD80–Fc дикого типа (эффекторным), IgV CD80–Fc дикого типа (неактивным), ECD CD80–Fc дикого типа (неактивным), ECD CD80–Fc дикого типа (эффекторным) или без обработки в качестве контроля. ИФН–гамма, ИЛ–2 и пролиферацию определяли после 72 ч. инкубация.

[0643] Результаты, касающиеся высвобождения ИЛ–2, приведены в таблице 19. В первом эксперименте сокультивирование Т–клеток и K562/OKT3 aAPC (неэкспрессирующих PD–L1) в присутствии некоторых примеров анализируемых молекул вариантов IgV CD80–Fc (эффекторного) приводило к повышенной продукции ИЛ–2. Во втором эксперименте костимуляция CD28 повышалась в присутствии некоторых молекул вариантов IgV CD80–Fc (неактивного) после сокультивирования Т–клеток с K562/OKT3/PD–L1 aAPC, что соответствует активности PD–L1–зависимой костимуляции CD28 для этих вариантов. Молекулы IgV CD80–Fc, плохо связывающиеся с PD–L1 (т.е. E35G/K54E/A71D/L72P), не приводили к значительной костимуляции и продукции ИЛ–2. В некоторых случаях некоторые молекулы вариантов IgV CD80–Fc (эффекторный), подобные E35D, могли осуществлять костимуляцию CD28 только в присутствии PD–L1–экспрессирующих aAPC. Результаты, касающиеся ИФН–гамма и пролиферации, были схожими с результатами, наблюдаемыми для высвобождения ИЛ–2.

ТАБЛИЦА 19. Костимуляция CD28 в первичных Т–клетках посредством Fc–рецептор– или PD–L1–опосредованной перекрестной сшивки молекул IgC CD80–Fc

Мутации CD80	**SEQ ID NO**	**K562/OKT3 (без PD–L1)**	**K562/OKT3/PD–L1**

	(IgV)	IgV CD80–Fc (эффекторный)			IgV CD80–Fc (неактивный)		
		1 нМ	**10 нМ**	**100 нМ**	**1 нМ**	**10 нМ**	**100 нМ**
E35D/M47I	177	11140	21590	27162	244	3432	8313
A71D/L72V/E95K	192	10593	15145	21314	<LOD	<LOD	<LOD
E35D	198	7598	7988	8380	<LOD	210	2739
E35D/M47I/L70M	199	15695	25997	25294	311	6982	8393
E35D/M43L/L70M	201	8025	7712	10496	<LOD	52	1204
E35D/D46V/L85Q	203	14329	21462	25421	<LOD	102	1429
H18Y/A26T/E35D/A71D /L85Q	207	11960	20452	20581	<LOD	<LOD	<LOD
E35D/M47L	208	14571	23581	26827	268	2695	7533
E23G/A26S/E35D/T62N/ A71D/L72V/L85M	216	15377	23462	27028	<LOD	<LOD	102
E35G/K54E/A71D/L72P	219	7032	7902	8886	<LOD	<LOD	59
A26E/E35D/M47L/L85Q	221	6847	8318	10113	72	268	1455
IgV CD80 WT–Fc (эффекторный)	3031	7167	7123	6203	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
IgV CD80 WT–Fc (неактивный)	3031	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	<LOD	7	52
ECD CD80 WT–Fc (неактивный)	2 (ECD)	8046	7022	6481	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
ECD CD80 WT–Fc (эффекторный)	2 (ECD)	11434	20185	23118	507	3114	8393
mAb против PD–L1		8220	8621	6903	461	821	1045
Контрольный неактивный Fc		7040	6335	5512	<LOD	143	<LOD
Контрольный Fc IgG1 WT	–	7077	6916	6258	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали

ПРИМЕР 11

Анализ вариантов полипептидов CD80, блокирующих взаимодействие PD–L1/PD–1 или PD–L1–зависимую костимуляцию

A. СВЯЗЫВАНИЕ И БЛОКИРОВАНИЕ PD–L1/PD–1

[0644] Для тестирования блокирования взаимодействия PD–L1/PD–1 анализировали связывание выбранных иммуномодулирующих слитых белков с клетками, экспрессирующими PD–L1. Клетки CHO/PD–L1 окрашивали с титрованием молекул, содержащих вариант домена IgV CD80–Fc, промывали, а затем инкубировали с конъюгированным с флуоресцентной меткой PD–1–Fc. Примеры тестируемых молекул, содержащих вариант IgV–домена CD80, включали E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G (SEQ ID NO: 2275), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276) и E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280). В качестве контроля также анализировали антитело против PD–L1 и IgV CD80–Fc дикого типа. Образцы анализировали с помощью проточного цитометра и определяли MFI флуоресцентно меченого PD–1 посредством анализа с помощью программного обеспечения Flowjo. Как показано на фиг. 9D**,** примеры тестируемых молекул вариантов IgV CD80–Fc антагонистически действовали или блокировали связывание PD–1 с PD–L1.

B. АКТИВНОСТЬ

[0645] Примеры полипептидов вариантов CD80–Fc анализировали по их способности осуществлять PD–L1–зависимую костимуляцию с использованием репортерных клеток Jurkat/ИЛ–2, экспрессирующих PD–1, как описано выше. Репортерные клетки Jurkat/ИЛ–2 инкубировали с искусственными антигенпрезентирующими клетками K562/OKT3/PD–L1 (aAPC), описанными выше, в присутствии титруемых количеств (в диапазоне от 40 пМ до 100 нМ) примеров полипептидов вариантов IgV CD80–Fc. Среди примеров полипептидов вариантов IgV CD80–Fc были молекулы, содержащие вариант IgV, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G (SEQ ID NO: 2275), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ IN NO: 2276) или E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280), слитый с примером Fc (C220S/L234A/L235E/G237A в соответствии с нумерацией EU; SEQ ID NO: 1714). Другие тестируемые полипептиды вариантов IgV CD80–Fc содержали вариант IgV, E35D/M47I/L70M (SEQ ID NO: 199) или E35D/M47L (SEQ ID NO: 208), слитый с IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1429). В качестве контроля PD–L1–экспрессирующие клетки также инкубировали с IgV CD80–Fc дикого типа (SEQ ID NO: 3031) или антителом против PD–L1 (BioLegend USA).

[0646] Репортерные клетки Jurkat/ИЛ–2/PD–1 высевали в количестве 100000 клеток на лунку в буфере для анализа Jurkat (RPMI1640+5% FBS). Затем клетки Jurkat инкубировали с тестовыми или контрольными белками в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки K562/OKT3/PD–L1 добавляли таким образом, что каждая

лунка имела соотношение клеток Jurkat:K562 5:1. Клетки Jurkat, клетки K562 и тестовые или контрольные белки инкубировали в течение 5 часов при 37°C во влажной камере инкубатора с 5% CO_2. Затем планшеты вынимали из инкубатора и доводили до комнатной температуры в течение 15 минут. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора для лизиса клеток и субстрата для люциферазы (реагент для люциферазы BioGlo, Promega) и планшеты инкубировали на орбитальном шейкере в течение 10 минут. Люминесценцию измеряли со временем интеграции 1 секунда на лунку с использованием люминометра BioTek Cytation и определяли кратное повышение значения люминесценции (RLU) для каждого тестируемого образца.

[0647] Как показано на фиг. 9E, добавление примеров анализируемых вариантов IgV CD80–Fc блокировало PD–L1–опосредованную супрессию активации TCR и/или агонистически действовало на CD28, что приводило к повышенной люминесценции. Молекулы вариантов, как определено, имеющие повышенную аффинность связывания с PD–L1, проявляли более высокую активность в отношении агонистического действия на активацию Т–клеток.

ПРИМЕР 12

Противоопухолевая активность in vivo вариантов полипептидов CD80

А. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ВАРИАНТОВ CD80

[0648] Опухолевые клетки мыши MC38 стабильно трансфицировали с использованием PD–L1 человека (MC38 hPD–L1) и имплантировали их подкожно мышам C57BL/6. Контрольный неактивный Fc или примеры молекул вариантов IgV CD80–Fc, содержащие вариант IgV (E35D/M47I/L70M, SEQ ID NO: 199; или E35D/M47L, SEQ ID NO: 208), слитый с неактивной молекулой Fc (например, SEQ ID NO: 1714) или молекулой Fc, способной опосредовать эффекторную активность (SEQ ID NO: 1429), инъецировали i.p. в дозе 100 мкг/мышь в дни 8, 10, 13, 15 и 17 после имплантации. Отслеживали объем опухоли с течением времени.

[0649] Как показано на фиг. 10, наблюдали супрессию роста опухоли у всех мышей, которым вводили IgV CD80, по сравнению с контрольным Fc, что свидетельствует о том, что молекулы вариантов IgV CD80–Fc являлись функционально активными in vivo.

В. ЗАВИСИМОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ОТ ДОЗЫ

1. Объем опухоли (доза 50 мкг, 100 мкг и 500 мкг)

[0650] 70 самок мышей C57CL/6, имеющих схожие объемы опухолей приблизительно 50–51 $мм^3$ после имплантации опухолевых клеток MC38 hPD–L1, подвергали стадированию и разделяли на 5 групп лечения, включающих по 14 мышей. Группе 1 (изотипический контроль) вводили 75 мкг только Fc (SEQ ID NO: 1714); группам 2, 3 и 4 вводили 50, 100 и 500 мкг, соответственно, варианта CD80 E35D/M47L (SEQ ID NO: 208), слитого с неактивным Fc человека (SEQ ID NO: 1714) через линкер GSG_4S (SEQ ID NO: 1716); и группе 5 вводили 100 мкг mAb человека против PD–L1 (дурвалумаба) в дни 8, 10 и 12. Объемы опухолей измеряли в дни 7, 10 и 12. В день 13 5 животных

умерщвляли для анализа, как описано в разделе ниже. Для оставшихся 9 мышей в каждой группе возобновляли измерения опухолей в дни 17, 20 и 27. В дни 26, 28 и 31 животных в группе 1 (изотипический контроль Fc) подвергали внутриопухолевой инъекции 100 мкг E35D/M47L IgV CD80–Fc.

[0651] Медианные и средние объемы опухолей показаны на фиг. 11. Как показано, наблюдали дозозависимое снижение объемов опухолей у мышей, которым вводили IgV CD80–Fc, по сравнению с контрольным Fc. В этом исследовании медианный объем опухоли, определяемый у мышей, которым вводили от 100 мкг до 500 мкг IgV CD80–Fc, был схожим с объемом у мышей, которым вводили контрольное антитело против PD–L1.

2. Анализ цитокинов

[0652] После ферментативного расщепления опухолей MC38 раствор лизата центрифугировали, а супернатанты собирали и хранили при –80°C до анализа. Затем измеряли концентрацию ИФНγ мыши в каждом образце с использованием коммерческого набора для ELISA (R&D Systems, Inc.) по инструкциям производителя и нормализовали концентрации по массе опухоли или общему количеству клеток, выделенных из опухоли. Результаты, показанные на фиг. 12, свидетельствуют о том, что наибольшая доза (500 мкг) E35D/M47L IgV CD80–Fc приводила к наибольшим концентрациям ИФНγ в лизатах опухолей, что позволяет предполагать, что обработка IgV CD80–Fc приводит к продукции ИФНγ, механизму, как известно, способствующему противоопухолевому иммунитету.

C. Противоопухолевая активность выбранных вариантов CD80 и их активность при повторной стимуляции

[0653] 95 самкам мышей C57BL/6 имплантировали опухолевые клетки MC38 hPD–L1. Опухоли подвергали стадированию в день 7 и 77 мышей со схожими объемами опухолей приблизительно 60 $мм^3$ разделяли на 7 группы лечения, включающих по 11 мышей. Группе 1 (изотипический контроль) вводили 75 мкг только неактивного Fc (SEQ ID NO: 1714); группе 2 вводили 100 мкг варианта E35D/M47V/N48K/V68M/K89N IgV CD80 (SEQ ID NO: 2250)–Fc (неактивного); группе 3 вводили 100 мкг варианта H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G IgV CD80 (SEQ ID NO: 2276)–Fc (неактивного); группе 4 вводили 100 мкг варианта E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D IgV CD80 (SEQ ID NO: 2280)–Fc (неактивного); группе 5 вводили 100 мкг варианта E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E IgV CD80 (SEQ ID NO: 2284)–Fc (неактивного); группе 6 вводили 100 мкг варианта E35D/M47L CD80 (SEQ ID NO: 208)–Fc (неактивного) и группе 7 вводили 100 мкг mAb человека против PD–L1 (дурвалумаба) в дни 7, 9 и 11. В случае молекул вариантов IgV CD80–Fc IgV–домены CD80 подвергали слиянию с неактивным Fc человека, приведенным в SEQ ID NO: 1714, через линкер GSG_4S (SEQ ID NO: 1716). Объемы опухолей измеряли в дни 14, 17, 21, 24, 28, 31 и 37. Животных, которым вводили изотипический контроль Fc, умерщвляли ко дню 28 из–за избыточной опухолевой массы.

[0654] Медианные и средние объемы опухолей представлены на фиг. 13, где показано, что все тестируемые молекулы IgV CD80–Fc проявляли схожую или, в

некоторых случаях, по существу, улучшенную активность по сравнению с контрольным антителом против PD–L1. После завершения исследования 8 мышей из группы 3, 2 мыши из группы 4, 1 мышь из группы 6 и 2 мыши из группы 7 больше не имели детектируемые опухоли, и их обозначали как "неимеющих опухоли".

[0655] В день 49 неимеющих опухолей мышей из групп 3, 4, 6 и 7 и 2 наивных мышей C57CL/6 подвергали повторной стимуляции с использованием дополнительной инъекции клеток hPD–L1 MC38. Объемы опухолей измеряли в дни 56, 59 и 63. Результаты показаны на фиг. 14. У наивных мышей, как и ожидали, наблюдали быстрый рост опухоли. Ко дню 59 8/8 мышей из группы 3, 1/2 мышей из группы 4, 1/1 мыши из группы 6 и 2/2 мышей из группы 7 не имели опухолей, и ко дню 63 все мыши в группе 3, группе 4, группе 6 и группе 7 не имели опухолей. Этот результат соответствует наблюдению о том, что тестируемые средства, включая молекулы IgV CD80–Fc, могли обеспечивать долговременный, устойчивый иммунитет и противоопухолевые эффекты.

[0656] Опухоли мышей, умерщвленных через 3 дня после введения второй дозы, расщепляли и анализировали живые CD45– опухолевые клетки на наличие связанного неактивного Fc, варианта CD80–Fc и антитела против PD–L1 посредством проточной цитометрии. Результаты для групп 1, 3, 6 и 7 показаны на фиг. 15. Аналогично исследованию, описанному выше, результаты свидетельствуют о том, что молекулы IgV CD80–Fc демонстрировали меньшее связывание с опухолью по сравнению с контрольным антителом против PD–L1. Несмотря на это, с помощью IgV CD80–Fc можно достигать превосходящей активности, например, как наблюдали в случае мышей, которым вводили пример IgV CD80–Fc, приведенный в SEQ ID NO: 2276 (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G), что соответствует тому, что дифференцирующим признаком для активности является агонизм CD28 (PD–L1–зависимая костимуляция CD28) и/или антагонизм CTLA–4.

D. Противоопухолевая активность варианта CD80 и антитела против PD–L1

[0657] 75 животных подвергали стадированию и разделяли по 3 группам лечения через 7 дней после имплантации опухолевых клеток hPD–L1 MC38. Группе 1 вводили 3 инъекции по 75 мкг неактивного Fc (SEQ ID NO: 1714), группе 2 вводили 3 инъекции по 100 мкг варианта H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G IgV CD80 (SEQ ID NO: 2276)–Fc (неактивный) и группе 3 вводили 3 инъекции по 100 мкг mAb человека против PD–L1 (дурвалумаба), при этом инъекции осуществляли в дни 8, 10 и 12 после имплантации. Объемы опухолей измеряли каждые 3–4 дня со дня 11 до дня 35. Через 3 дня после введения 1–ой дозы, 2–ой дозы и 3–ей дозы 4 мышей из каждой группы умерщвляли для анализа опухоли и LN, оставляя 13 мышей для измерений объема опухоли на всем протяжении исследования.

[0658] На фиг. 16 большее снижение медианных и средних объемов опухолей наблюдали у мышей, которым в этом исследовании вводили пример IgV CD80–Fc, по сравнению с контрольным антителом против PD–L1. В день 18 0/13 мышей из группы 1 (которым вводили контрольный Fc) не имели опухолей, 6/13 мышей из группы 2 (которым

вводили вариант IgV CD80–Fc) не имели опухолей, и 3/13 мышей из группы 3 (которым вводили дурвалумаб) не имели опухолей. Ко дню 35 1/13, 6/13 и 3/13 мышей в группах 1, 2 и 3, соответственно, не имели опухолей. У мышей, которым вводили вариант IgV CD80–Fc, определяли опухоли, которые в среднем имели опухоли с меньшим размером по сравнению с опухолями у мышей, которым вводили антитело против hPD–L1 или контрольный неактивный Fc.

1. Характеризация опухолевых клеток

[0659] Через три после введения 2–ой дозы контрольного Fc, варианта IgV CD80–Fc и антитела против PD–L1 (дурвалумаба) получали опухоли и дренирующие лимфоузлы (LN) из 3–4 мышей из каждой группы лечения. Ткани перерабатывали в суспензии отдельных клеток (опухоли ферментативно расщепляли в ходе обработки, а дренирующие LN – нет) и подвергали многоцветному проточному цитометрическому анализу CD8+ Т–клеток в субпопуляции CD45+ клеток (иммунные клетки в LN или опухоли), а также определяли % hIgG+ окрашивания в субпопуляции CD45– клеток (опухолевых клеток) для детекции молекул (IgV CD80–Fc или антитела против PD–L1), связанных с опухолевыми клетками. Результаты показаны на фиг. 17A–C.

[0660] Процентные доли CD8+ Т–клеток были значимо выше ($p<0,05$ или $p<0,01$) в TIL и LN мышей, которым вводили H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G IgV CD80–Fc, по сравнению с мышами, которым вводили контрольный Fc или антитело против PD–L1 (фиг. 17A (LN) и 17B (опухоль). Это свидетельствует о том, что введение H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G IgV CD80–Fc может способствовать экспансии CD8+ Т–клеток in vivo, что является важной составляющей противоопухолевого иммунитета. Кроме того, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G IgV CD80–Fc определяли на опухоли (ex vivo посредством hIgG+ окрашивания CD45– клеток), хотя его уровни были снижены по сравнению с уровнями антитела против PD–L1 (фиг. 17C). Несмотря на сниженное присутствие E35D/M47L CD80–Fc на опухоли по сравнению с определяемым антителом против PD–L1, противоопухолевая активность CD80–Fc превосходила активность антитела против PD–L1 (см. раздел B1 выше). Эти результаты соответствуют наблюдению о том, что активностью IgV CD80–Fc может быть не только антагонизм PD–L1/PD–1, но и агонизм CD28 (PD–L1–зависимая костимуляция CD28) и/или антагонизм CTLA4.

ПРИМЕР 13

Получение дополнительных вариантов IgV–доменов CD80

A. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ IGV–ДОМЕНЫ CD80 И АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ

[0661] Дополнительные варианты CD80 получали и экспрессировали в виде Fc–слитых белков, по существу, как описано в примерах 2–5. Варианты тестировали на связывание, по существу, как описано в примере 7, и биологическую активность, по существу, как описано в примере 9. Результаты исследований связывания и активности представлены в таблицах 20–23.

1. Анализ связывания

Таблица. 20 Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации CD80	SEQ ID NO	CTLA4		CD28		PD–L1		Соотношение PD–L1:CD28
		MFI при 33,3 нМ	Кратное изменение относительно CD80 WT	MFI при 33,3 нМ	Кратное изменение относительно CD80 WT	MFI при 33,3 нМ	Кратное изменение относительно CD80 WT	
E35D/N48K/L72V	2719	32731	17,1	582	8,8	3031	43,1	5
E35D/T41S/N48T	2720	30262	15,8	72,4	1,1	2191	31,2	30
D46V/M47I/A71G	2721	28420	14,8	1325	20,1	7328	104,2	6
M47I/A71G	2722	27768	14,5	823	12,5	5097	72,5	6
E35D/M43I/M47L/L85M	2723	24584	12,8	265	4,0	4878	69,4	18
E35D/M43I/D46E/A71G/L85M	2724	26878	14,0	200	3,0	7138	101,5	36
H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S	2725	24218	12,6	528	8,0	7582	107,9	14
E35D/M47I/N48K/I61F	2726	25859	13,5	816	12,4	5627	80,0	7
E35D/M47V/T62S/L85Q	2727	31230	16,3	99,4	1,5	6653	94,6	67
M43I/M47L/A71G	2728	23292	12,2	1000	15,2	7763	110,4	8

E35D/M47V	2729	20893	10,9	461	7,0	2935	41,7	6
E35D/M47L/A71G/L85M	2730	16609	8,7	199	3,0	8312	118,2	42
V22A/E35D/M47L/A71G	2731	21855	11,4	990	15,0	8168	116,2	8
E35D/M47L/A71G	2732	20576	10,7	626	9,5	6635	94,4	11
E35D/D46E/M47I	2733	21394	11,2	1001	15,2	3789	53,9	4
Q27H/E35D/M47I	2734	27530	14,4	756	11,5	3424	48,7	5
E35D/D46E/L85M	2735	30289	15,8	164	2,5	2880	41,0	18
E35D/D46E/A91G	2736	32189	16,8	3450	52,3	2818	40,1	1
E35D/D46E	2737	27921	14,6	779	11,8	3757	53,4	5
E35D/L97R	2738	22803	11,9	44,6	0,7	2614	37,2	59
H18Y/E35D	2739	26258	13,7	479	7,3	3526	50,2	7
Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M	2740	27881	14,6	230	3,5	2705	38,5	12
E35D/M47V/I61V/L85M	2741	28848	15,1	274	4,2	3054	43,4	11
E35D/M47V/L85M/R94Q	2742	23334	12,2	23,7	0,4	3039	43,2	128
E35D/M47V/N48K/L85M	2743	11792	11,5	413	10,0	5660	67,9	14
H18Y/E35D/M47V/N48K	2744	11747	11,4	841	20,4	6462	77,5	8
ECD CD80 WT–Fc H22.6	2	31563	16,5	43	0,7	46,3	0,7	1

IgV CD80 WT–Fc	3031	1916	1,0	66	1,0	70,3	1,0	1
Неактивный Fc	1714	65,7	0,0	23	0,4	41	0,6	2

Таблица 21. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации CD80	**SEQ ID NO**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–L1:CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	
E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2765	15505	8,8	15	0,5	18649	362,1	1268,6
E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C	2766	16987	9,7	486	15,5	18734	363,8	38,5
E35D/D46E/M47I/V68M/L85M	2767	14036	8,0	353	11,2	16341	317,3	46,3
E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R	2768	15098	8,6	425	13,5	24297	471,8	57,2
E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M	2769	15049	8,6	403	12,8	8641	167,8	21,4
E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q	2770	96	0,1	14	0,5	4617	89,7	325,1
E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q	2771	15533	8,9	1740	55,4	1723	33,5	1,0
E35D/M43I/M47L/V68M	2772	16243	9,3	1517	48,3	16912	328,4	11,1

E35D/M47I/V68M/Y87N	2773	17860	10,2	3553	113,2	13145	255,2	3,7
E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2774	14955	8,5	14	0,5	18600	361,2	1300,7
E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2775	16013	9,1	383	12,2	25024	485,9	65,3
E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M	2776	16604	9,5	302	9,6	22770	442,1	75,4
E35D/M47V/N48K/V68M/L85M	2777	15581	8,9	245	7,8	7618	147,9	31,1
E35D/M47V/V68M/L85M	2778	15997	9,1	201	6,4	9177	178,2	45,7
E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D	2779	13936	7,9	509	16,2	1721	33,4	3,4
E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V	2780	18369	10,5	476	15,2	14790	287,2	31,1
H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L	2781	23300	13,3	244	7,8	18806	365,2	77,1
H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M	2782	139	0,1	16,7	0,5	3589	69,7	214,9
H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N	2783	18626	10,6	4038	128,6	14988	291,0	3,7
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2784	19541	11,1	437	13,9	18669	362,5	42,7
H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2785	20475	11,7	14,5	0,5	14750	286,4	1017,2
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G	2786	146	0,1	15,7	0,5	5105	99,1	325,2
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2787	18356	10,5	334	10,6	23390	454,2	70,0
H18Y/E35D/M47V/	2788	1836	10,5	373	11,9	1677	325,7	45,0

V68M/L85M		7				4		
H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V	2789	18281	10,4	16	0,5	14990	291,1	954,8
H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q	2790	19766	11,3	14	0,4	14410	279,8	1036,7
H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M	2791	16287	9,3	1041	33,2	14907	289,5	14,3
H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M	2792	15798	9,0	257	8,2	12867	249,8	50,1
Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M	2793	178	0,1	15	0,5	16492	320,2	1129,6
Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M	2794	86	0,0	15	0,5	16838	327,0	1107,8
Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M	2795	107	0,1	15	0,5	16502	320,4	1107,5
R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2796	91	0,1	16	0,5	16251	315,6	997,0
S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M	2797	20616	11,8	540	17,2	17833	346,3	33,0
S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L	2798	20142	11,5	284	9,0	17789	345,4	62,6
T13R/E35D/M47L/V68M	2799	21255	12,1	15,6	0,5	19969	387,7	1280,1
T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M	2801	109	0,1	14,6	0,5	3272	63,5	224,1
T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M	2802	141	0,1	15,7	0,5	3228	62,7	205,6
T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M	2803	105	0,1	16	0,5	3968	77,0	248,0
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M	2804	193	0,1	13,8	0,4	4482	87,0	324,8

T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q	2805	20652	11,8	1111	35,4	19157	372,0	17,2
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M	2806	22011	12,6	14,2	0,5	1106	21,5	77,9
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q	2807	19105	10,9	15,2	0,5	20366	395,5	1339,9
T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M	2808	20738	11,8	14,1	0,4	14680	285,0	1041,1
T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M	2809	13438	7,7	112	3,6	18938	367,7	169,1
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M	2810	19403	11,1	1254	39,9	15418	299,4	12,3
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G	2811	14574	8,3	1183	37,7	19047	369,8	16,1
V22D/E24D/E35D/M47V/V68M	2812	16899	9,6	191	6,1	17793	345,5	93,2
ECD CD80 WT–Fc	2	1753	1,0	31	1,0	52	1,0	1,6
IgV CD80 WT–Fc	3031	26392	15,1	95	3,0	44	0,9	0,5

2. Оценка биологической активности

Таблица 22. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO**	**CD80, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
E35D/N48K/L72V	2719	1731	4,3
E35D/T41S/N48T	2720	1136	2,8
D46V/M47I/A71G	2721	1601	4,0
M47I/A71G	2722	1762	4,4
E35D/M43I/M47L/L85M	2723	1427	3,6

E35D/M43I/D46E/A71G/L85M	2724	1475	3,7
H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S	2725	1898	4,7
E35D/M47I/N48K/I61F	2726	2078	5,2
E35D/M47V/T62S/L85Q	2727	1402	3,5
M43I/M47L/A71G	2728	1641	4,1
E35D/M47V	2729	1353	3,4
E35D/M47L/A71G/L85M	2730	1513	3,8
V22A/E35D/M47L/A71G	2731	2583	6,5
E35D/M47L/A71G	2732	1954	4,9
E35D/D46E/M47I	2733	1915	4,8
Q27H/E35D/M47I	2734	1829	4,6
E35D/D46E/L85M	2735	1413	3,5
E35D/D46E/A91G	2736	395	1,0
E35D/D46E	2737	1961	4,9
E35D/L97R	2738	914	2,3
H18Y/E35D	2739	1990	5,0
Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M	2740	1166	2,9
E35D/M47V/I61V/L85M	2741	1176	2,9
E35D/M47V/L85M/R94Q	2742	466	1,2
E35D/M47V/N48K/L85M	2743	2116	5,3
H18Y/E35D/M47V/N48K	2744	2146	5,4
IgV CD80 WT–Fc	3031	400	1,0
ECD CD80–Fc	2	521	1,3

Таблица 23. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CD80, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение IgV CD80 WT–Fc**
E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2765	1087	2,7
E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/ Y87C	2766	1104	2,8
E35D/D46E/M47I/V68M/L85M	2767	1230	3,1
E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/ K93R	2768	1198	3,0

E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M	2769	1137	2,8
E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q	2770	160	0,4
E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q	2771	1006	2,5
E35D/M43I/M47L/V68M	2772	1072	2,7
E35D/M47I/V68M/Y87N	2773	958	2,4
E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2774	1086	2,7
E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2775	1546	3,9
E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M	2776	1422	3,6
E35D/M47V/N48K/V68M/L85M	2777	1203	3,0
E35D/M47V/V68M/L85M	2778	1167	2,9
E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D	2779	1181	3,0
E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V	2780	1165	2,9
H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L	2781	1425	3,6
H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M	2782	198	0,5
H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N	2783	1117	2,8
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2784	1219	3,0
H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2785	225	0,6
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G	2786	120	0,3
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2787	1190	3,0
H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M	2788	1013	2,5
H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V	2789	183	0,5
H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q	2790	195	0,5
H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M	2791	1161	2,9
H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M	2792	1072	2,7
Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M	2793	170	0,4
Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M	2794	158	0,4
Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M	2795	147	0,4
R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2796	155	0,4
S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M	2797	1064	2,7

S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L	2798	1205	3,0
T13R/E35D/M47L/V68M	2799	1021	2,6
T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M	2801	170	0,4
T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M	2802	153	0,4
T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M	2803	136	0,3
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M	2804	152	0,4
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q	2805	993	2,5
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M	2806	153	0,4
T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q	2807	580	1,5
T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M	2808	399	1,0
T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M	2809	1160	2,9
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M	2810	974	2,4
V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G	2811	963	2,4
V22D/E24D/E35D/M47V/V68M	2812	1023	2,6
IgV CD80 WT–Fc	3031	400	1,0
ECD CD80 WT–Fc H22.6	2	521	1,3

B. ПОЛУЧЕНИЕ ВАРИАНТОВ СВЯЗЫВАЮЩИХ IGV–ДОМЕНОВ CD80 И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ СЕЛЕКЦИЯ

[0662] Дополнительные варианты IgV CD80 подвергали селекции после получения 300 конструкций IgV CD80–Fc из полученных дрожжей, описанных в примере 7. Затем супернатанты, содержащие белки IgV CD80–Fc, подвергали скринингу на связывание PD–L1 в формате 96–луночного планшета с использованием системы Octet®. Выбирали варианты, демонстрирующие высокое связывание с PD–L1, и подвергали их повторному скринингу на связывание, как описано в примере 7 выше, и выбирали варианты, демонстрирующие высокое связывание с PD–L1. Примеры вариантов и данные анализа связывания посредством FACS представлены в таблице 24. Выбранные варианты также анализировали на биологическую активность способами, по существу, описанными в примере 9, и результаты представлены в таблице 25.

Таблица 24. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно

экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии								
Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–L1:CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно WT**	
A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q	2323	10848	10,6	78	1,9	9315	111,7	119
E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L	2324	214	0,2	15	0,4	13200	158,3	863
E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D	2325	8913	8,7	111	2,7	8417	100,9	76
E24D/Q27R/E35D/T41S M47V/L85Q	2326	13867	13,5	66	1,6	2858	34,3	44
S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N	2327	10994	10,7	1068	25,9	13883	166,5	13
E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G	2328	10332	10,1	1400	33,9	16832	201,8	12
H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L	2329	10036	9,8	1905	46,1	14487	173,7	8
deltaE10–A98	2330	125	0,1	15	0,4	45	0,5	3
Q33R/M47V/T62N/A71G	2331	308	0,3	17	0,4	12216	146,5	719
H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G	2332	10290	10,0	1591	38,5	8459	101,4	5
IgV CD80 WT–Fc	3031	1026	1,0	41	1,0	83	1,0	2

ECD CD80–Fc	2	31725	30,9	30	0,7	68	0,8	2

Таблица 25. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CD80–Fc, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q	2323	433	1,1
E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L	2324	2551	6,4
E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D	2325	605	1,5
E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q	2326	147	0,4
S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N	2327	872	2,2
E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G	2328	936	2,3
H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L	2329	879	2,2
deltaE10–A98	2330	137	0,3
Q33R/M47V/T62N/A71G	2331	149	0,4
H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G	2332	1045	2,6
IgV CD80 WT–Fc	3031	400	1,0
ECD CD80–Fc	2	521	1,3

C. ПОЛУЧЕНИЕ КОНСЕНСУСНЫХ ВАРИАНТОВ IGV CD80

[0663] Консенсусные варианты из вариантов IgV CD80 конструировали с учетом выравнивания всех результатов селекции дрожжей, описанных выше. Затем консенсусные последовательности использовали для получения белков IgV CD80–Fc, которые затем тестировали на связывание и биологическую активность, как описано выше. Результаты анализа связывания и биологической активности представлены в таблицах 26 и 27, соответственно.

Таблица 26. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации CD80	**SEQ ID NO (IgV)**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–**
		MFI при 33,3	**Кратное изме**	**MFI при 33,3**	**Кратное изме**	**MFI при 33,3**	**Кратное изме**	

		нМ	**нение относительно CD80 WT**	**нМ**	**нение относительно CD80 WT**	**нМ**	**нение относительно CD80 WT**	**L1:CD28**
H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L	2781	19236	18,4	1006	24,4	2082	29,4	2,1
H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N	2783	19722	18,9	1429	34,7	9299	131,2	6,5
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2784	20660	19,8	2848	69,1	9894	139,5	3,5
H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2785	18022	17,2	2602	63,2	9629	135,8	3,7
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G	2786	19528	18,7	478	11,6	9576	135,1	20,0
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V	2787	19754	18,9	2194	53,3	9339	131,7	4,3
H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M	2788	19306	18,5	1387	33,7	3094	43,6	2,2
H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V	2789	19396	18,6	455	11,0	1836	25,9	4,0
H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q	2790	21955	21,0	962	23,3	9283	130,9	9,6
IgV CD80 WT–Fc	3031	1045	1,0	41,2	1,0	70,9	1,0	1,7
ECD CD80–Fc	2	46137	44,2	46	1,1	58	0,8	1,3

Таблица 27. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO:**	**CD80, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L	2781	2850	7,1

H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N	2783	2196	5,5
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M	2784	2193	5,5
H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q	2785	2052	5,1
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G	2786	2277	5,7
H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/ K93R/E95V	2787	2212	5,5
H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M	2788	2575	6,4
H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V	2789	1968	4,9
H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q	2790	2215	5,5
IgV CD80 WT–Fc	3031	400	1,0
ECD CD80–Fc	2	521	1,3

ПРИМЕР 14

Оценка активности связывания панели вариантов IgV CD80

[0664] Для идентификации остатков, участвующих в связывании и активности с учетом выбранного набора вариантов, приведенных в SEQ ID NO: 2250, 2276 и 2280, конструировали панель обратных мутаций и варианты экспрессировали в виде Fc–слитых белков, по существу, как описано в примерах 4 и 5. Полученные варианты содержали от 1 до 6 мутаций, обнаруживаемых в SEQ ID NO: 2250, 2276 и 2280 в различных комбинациях, как указано в таблице 28.

Таблица 28. Дополнительные варианты CD80

Мутация	**SEQ ID NO**
E35D	198
D46V	2813
M47L	2814
V68M	2815
L85Q	2816
E35D/D46V	2817
E35D/M47L	208
E35D/L85Q	2819
D46V/M47L	2820
D46V/V68M	2821
D46V/L85Q	2822
M47L/V68M	2823
M47L/L85Q	2824
V68M/L85Q	2825

E35D/D46V/M47L	2826
E35D/D46V/V68M	2827
E35D/D46V/L85Q	2828
E35D/M47L/V68M	2756
E35D/M47L/L85Q	2203
E35D/V68M/L85Q	2829
D46V/M47L/V68M	2830
D46V/M47L/L85Q	2831
D46V/V68M/L85Q	2832
M47L/V68M/L85Q	2833
E35D/D46V/M47L/V68M	2761
E35D/D46V/M47L/L85Q	2834
E35D/D46V/V68M/L85Q	2835
E35D/M47L/V68M/L85Q	2836
D46V/M47L/V68M/L85Q	2837
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q	2760
M47V	2838
N48K	2839
K89N	2840
E35D/M47V	2729
E35D/N48K	2841
E35D/K89N	2842
M47V/N48K	2843
M47V/V68M	2844
M47V/K89N	2845
N48K/V68M	2846
N48K/K89N	2847
V68M/K89N	2848
E35D/M47V/N48K	2849
E35D/M47V/V68M	2850
E35D/M47V/K89N	2851
E35D/N48K/V68M	2852
E35D/N48K/K89N	2853
E35D/V68M/K89N	2854

M47V/N48K/V68M	2855
M47V/N48K/K89N	2856
M47V/V68M/K89N	2857
N48K/V68M/K89N	2858
E35D/M47V/N48K/V68M	2764
E35D/M47V/N48K/K89N	2859
E35D/M47V/V68M/K89N	2860
E35D/N48K/V68M/K89N	2861
M47V/N48K/V68M/K89N	2862
E35D/D46V/M47V/N48K/V68M	2863
E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q	2864
E35D/D46V/M47V/V68M/K89N	2865
E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q	2866
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	2250
E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N	2867
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2868
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2869
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2870
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2871
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2872
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2873
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2874
E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2875
H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G	2876
H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G	2877
H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G	2878
H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G	2879
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M	2880
A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2881
A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2882
A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2883
A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2884
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2885
H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G	2886

H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G	2887
H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G	2888
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G	2889
H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G	2890
H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G	2891
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G	2892
H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G	2893
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G	2894
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G	2895
M47L/V68M/A71G/D90G	2896
H18Y/V68M/A71G/D90G	2897
H18Y/A26E/A71G/D90G	2898
H18Y/A26E/E35D/D90G	2899
H18Y/A26E/E35D/M47L	2900
E35D/V68M/A71G/D90G	2901
E35D/M47L/A71G/D90G	2902
E35D/M47L/V68M/D90G	2903
E35D/M47L/V68M/A71G	2904
A26E/V68M/A71G/D90G	2905
A26E/M47L/A71G/D90G	2906
A26E/M47L/V68M/D90G	2907
A26E/M47L/V68M/A71G	2908
A26E/E35D/V68M/D90G	2910
A26E/E35D/V68M/A71G	2911
A26E/E35D/M47L/D90G	2912
A26E/E35D/M47L/A71G	2913
H18Y/M47L/A71G/D90G	2914
H18Y/M47L/V68M/D90G	2915
H18Y/M47L/V68M/A71G	2916
H18Y/E35D/A71G/D90G	2917
H18Y/E35D/M47L/A71G	2921
H18Y/A26E/V68M/D90G	2923
H18Y/A26E/V68M/A71G	2924
H18Y/A26E/M47L/D90G	2925

H18Y/A26E/M47L/A71G	2926
H18Y/A26E/E35D/V68M	2929

[0665] Варианты тестировали на связывание и биологическую активность, как описано выше. Результаты анализа связывания представлены в таблицах 29 и 30, а результаты анализа биологической активности представлены в таблицах 31 и 32.

Таблица 29. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации	**SEQ ID NO (IgV)**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–L1:CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	
E35D	198	42923	1,1	134	0,2	2584	20,2	19,3
M47L	2814	30774	0,8	309	0,4	1895	14,8	6,1
V68M	2815	568	0,0	37,9	0,1	118	0,9	3,1
L85Q	2816	3002	0,1	35	0,0	97	0,8	2,8
E35D/D46V	2817	50112	1,2	880	1,2	3971	31,0	4,5
E35D/M47L	208	48010	1,2	411	0,6	7529	58,8	18,3
D46V/M47L	2820	49711	1,2	918	1,3	3905	30,5	4,3
D46V/V68M	2821	5334	0,1	556	0,8	2271	17,7	4,1
D46V/L85Q	2822	41896	1,0	131	0,2	2197	17,2	16,8
M47L/L85Q	2824	31671	0,8	88,1	0,1	5801	45,3	65,8
V68M/L85Q	2825	3288	0,1	91,7	0,1	347	2,7	3,8
E35D/D46V/M47L	2826	44977	1,1	1165	1,6	7988	62,4	6,9
E35D/D46V/V68M	2827	31195	0,8	1820	2,6	26114	204,0	14,3
E35D/D46V/L85Q	2828	48005	1,2	196	0,3	4039	31,6	20,6
E35D/M47L/V68M	2756	28603	0,7	1243	1,8	27896	217,9	22,4
E35D/M47L/L85Q	2203	12909	0,3	46,3	0,1	6097	47,6	131,7
E35D/V68M/L85Q	2829	42761	1,1	76,2	0,1	5971	46,6	78,4

D46V/M47L/V68M	2830	34688	0,9	2183	3,1	28020	218,9	12,8
D46V/M47L/L85Q	2831	40153	1,0	567	0,8	5976	46,7	10,5
D46V/V68M/L85Q	2832	7567	0,2	104	0,1	4170	32,6	40,1
M47L/V68M/L85Q	2833	11134	0,3	60,9	0,1	4039	31,6	66,3
E35D/D46V/M47L/V68M	2761	34319	0,8	1808	2,6	29266	228,6	16,2
E35D/D46V/M47L/L85Q	2834	38150	0,9	268	0,4	7523	58,8	28,1
E35D/D46V/V68M/L85Q	2835	32176	0,8	261	0,4	23637	184,7	90,6
E35D/M47L/V68M/L85Q	2836	28106	0,7	159	0,2	15307	119,6	96,3
D46V/M47L/V68M/L85Q	2837	32521	0,8	660	0,9	29743	232,4	45,1
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q	2760	26207	0,6	464	0,7	28418	222,0	61,2
M47V	2838	33341	0,8	68,7	0,1	2317	18,1	33,7
N48K	2839	4952	0,1	60,1	0,1	481	3,8	8,0
K89N	2840	944	0,0	56,3	0,1	52,8	0,4	0,9
E35D/M47V	2729	44569	1,1	501	0,7	6796	53,1	13,6
E35D/N48K	2841	41325	1,0	194	0,3	6545	51,1	33,7
E35D/K89N	2842	21755	0,5	236	0,3	757	5,9	3,2
M47V/N48K	2843	44640	1,1	413	0,6	3083	24,1	7,5
M47V/V68M	2844	7282	0,2	328	0,5	4294	33,5	13,1
M47V/K89N	2845	32381	0,8	197	0,3	622	4,9	3,2
N48K/V68M	2846	2341	0,1	118	0,2	754	5,9	6,4
N48K/K89N	2847	4370	0,1	170	0,2	186	1,5	1,1
V68M/K89N	2848	2330	0,1	210	0,3	538	4,2	2,6
E35D/M47V/N48K	2849	47430	1,2	771	1,1	4852	37,9	6,3
E35D/M47V/V68M	2850	26988	0,7	791	1,1	16645	130,0	21,0
E35D/M47V/K89N	2851	39282	1,0	507	0,7	4336	33,9	8,6
E35D/N48K/V68M	2852	33583	0,8	642	0,9	17733	138,5	27,6
E35D/N48K/K89N	2853	34727	0,9	411	0,6	5766	45,0	14,0
E35D/V68M/K89N	2854	24838	0,6	1191	1,7	10422	81,4	8,8

M47V/N48K/V68M	2855	34612	0,9	641	0,9	14464	113,0	22,6
M47V/N48K/K89N	2856	42071	1,0	366	0,5	2366	18,5	6,5
M47V/V68M/K89N	2857	24787	0,6	1324	1,9	11806	92,2	8,9
N48K/V68M/K89N	2858	19129	0,5	1176	1,7	11464	89,6	9,7
E35D/M47V/N48K/V68M	2764	32913	0,8	789	1,1	23479	183,4	29,8
E35D/M47V/N48K/K89N	2859	43756	1,1	701	1,0	6669	52,1	9,5
E35D/M47V/V68M/K89N	2860	29493	0,7	1610	2,3	21827	170,5	13,6
E35D/N48K/V68M/K89N	2861	29772	0,7	1534	2,2	17425	136,1	11,4
M47V/N48K/V68M/K89N	2862	29777	0,7	1597	2,3	23666	184,9	14,8
E35D/D46V/M47V/N48K/V68M	2863	23880	0,6	1085	1,5	25940	202,7	23,9
E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q	2864	36463	0,9	331	0,5	26290	205,4	79,4
E35D/D46V/M47V/V68M/K89N	2865	15124	0,4	2119	3,0	21603	168,8	10,2
E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q	2866	26104	0,6	118	0,2	10479	81,9	88,8
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	2250	20884	0,5	1348	1,9	14800	115,6	11,0
E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N	2867	30276	0,7	246	0,3	12085	94,4	49,1
ECD CD80 WT–Fc (Abcam)		40376	1,0	709	1,0	128	1,0	0,2
Контрольный Fc1.1 N10118	1714	52	0,0	12,7	0,0	44	0,3	3,5

Таблица 30. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации	**SEQ ID NO**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–L1:CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2868	21749	16,0	2211	50,4	30232	693,4	13,7
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2869	19892	14,6	2793	63,6	29944	686,8	10,7
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2870	121	0,1	2556	58,2	31716	727,4	12,4
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2871	23386	17,2	1757	40,0	28683	657,9	16,3
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2872	21215	15,6	1099	25,0	16926	388,2	15,4
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2873	24855	18,3	2675	60,9	25217	578,4	9,4
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2874	25404	18,7	526	12,0	28546	654,7	54,3
E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2875	26007	19,1	3072	70,0	29377	673,8	9,6
H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G	2876	22235	16,4	3184	72,5	29517	677,0	9,3
H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G	2877	18305	13,5	2683	61,1	27872	639,3	10,4
H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G	2878	–100	–0,1	1075	24,5	14822	340,0	13,8
H18Y/A26E/E35D/M47L /D90G	2879	19736	14,5	1379	31,4	12698	291,2	9,2

H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M	2880	20015	14,7	626	14,3	24683	566,1	39,4
A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2881	21807	16,0	2790	63,6	28139	645,4	10,1
A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2882	23286	17,1	2102	47,9	26510	608,0	12,6
A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2883	22127	16,3	1272	29,0	14550	333,7	11,4
A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2884	26698	19,6	2908	66,2	24978	572,9	8,6
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2885	24587	18,1	417	9,5	27806	637,8	66,7
H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G	2886	24335	17,9	2724	62,1	30088	690,1	11,0
H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G	2887	22983	16,9	1273	29,0	13327	305,7	10,5
H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G	2888	22834	16,8	3389	77,2	27410	628,7	8,1
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G	2889	23667	17,4	928	21,1	30377	696,7	32,7
H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G	2890	25420	18,7	2047	46,6	17737	406,8	8,7
H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G	2891	28649	21,1	32	0,7	23594	541,1	737,3
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G	2892	21742	16,0	544	12,4	29730	681,9	54,7
H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G	2893	19331	14,2	2584	58,9	23206	532,2	9,0
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G	2894	19394	14,3	394	9,0	27476	630,2	69,7
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G	2895	19353	14,2	379	8,6	16887	387,3	44,6
M47L/V68M/A71G/D90G	2896	17418	12,8	3610	82,2	31114	713,6	8,6

H18Y/V68M/A71G/D90G	2897	22321	16,4	3414	77,8	30670	703,4	9,0
H18Y/A26E/A71G/D90G	2898	19878	14,6	2001	45,6	15491	355,3	7,7
H18Y/A26E/E35D/D90G	2899	22813	16,8	46,5	1,1	10019	229,8	215,5
H18Y/A26E/E35D/M47L	2900	23990	17,7	324	7,4	9951	228,2	30,7
E35D/V68M/A71G/D90G	2901	23290	17,1	2843	64,8	28005	642,3	9,9
E35D/M47L/A71G/D90G	2902	20921	15,4	1331	30,3	12073	276,9	9,1
E35D/M47L/V68M/D90G	2903	27607	20,3	3414	77,8	23482	538,6	6,9
E35D/M47L/V68M/A71G	2904	24656	18,1	806	18,4	27872	639,3	34,6
A26E/V68M/A71G/D90G	2905	8666	6,4	1194	27,2	3195	73,3	2,7
A26E/M47L/A71G/D90G	2906	21955	16,2	1955	44,5	13204	302,8	6,8
A26E/M47L/V68M/D90G	2907	21900	16,1	2583	58,8	10626	243,7	4,1
A26E/M47L/V68M/A71G	2908	3227	2,4	98,7	2,2	1667	38,2	16,9
A26E/E35D/V68M/D90G	2910	13879	10,2	1683	38,3	6987	160,3	4,2
A26E/E35D/V68M/A71G	2911	11791	8,7	135	3,1	12611	289,2	93,4
A26E/E35D/M47L/D90G	2912	18167	13,4	1550	35,3	9577	219,7	6,2
A26E/E35D/M47L/A71G	2256	20645	15,2	236	5,4	11666	267,6	49,4
H18Y/M47L/A71G/D90G	2914	18162	13,4	1601	36,5	10796	247,6	6,7

H18Y/M47L/V68M/D90G	2915	19006	14,0	3795	86,4	21768	499,3	5,7
H18Y/M47L/V68M/A71G	2916	21298	15,7	1192	27,2	28478	653,2	23,9
H18Y/E35D/A71G/D90G	2917	25886	19,0	1310	29,8	8524	195,5	6,5
H18Y/E35D/M47L/A71G	2921	22368	16,5	604	13,8	11881	272,5	19,7
H18Y/A26E/V68M/D90G	2923	25794	19,0	2394	54,5	12845	294,6	5,4
H18Y/A26E/V68M/A71G	2924	11323	8,3	99,4	2,3	6866	157,5	69,1
H18Y/A26E/M47L/D90G	2925	23485	17,3	2858	65,1	8933	204,9	3,1
H18Y/A26E/M47L/A71G	2926	22108	16,3	611	13,9	15563	356,9	25,5
H18Y/A26E/E35D/V68M	2929	20929	15,4	372	8,5	17904	410,6	48,1
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2276	18244	13,4	1836	41,8	29167	669,0	15,9
IgV CD80 WT–Fc	3031	1359	1,0	43,9	1,0	43,6	1,0	1,0
ECD CD80–Fc	2	19552	14,4	42,3	1,0	6377	146,3	150,8
Контрольный Fc1.1	1714	37,9	0,0	15,4	0,4	77,1	1,8	5,0

Таблица 31. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации	**SEQ ID NO**	**CD80, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
E35D	198	368	3,2
M47L	2814	530	4,6
V68M	2815	130	1,1
L85Q	2816	132	1,1
E35D/D46V	2817	609	5,3

E35D/M47L	208	603	5,2
D46V/M47L	2820	773	6,7
D46V/V68M	2821	292	2,5
D46V/L85Q	2822	342	3,0
M47L/L85Q	2824	416	3,6
V68M/L85Q	2825	146	1,3
E35D/D46V/M47L	2826	746	6,5
E35D/D46V/V68M	2827	799	6,9
E35D/D46V/L85Q	2828	410	3,6
E35D/M47L/V68M	2756	749	6,5
E35D/M47L/L85Q	2203	177	1,5
E35D/V68M/L85Q	2829	511	4,4
D46V/M47L/V68M	2830	724	6,3
D46V/M47L/L85Q	2831	598	5,2
D46V/V68M/L85Q	2832	267	2,3
M47L/V68M/L85Q	2833	238	2,1
E35D/D46V/M47L/V68M	2761	681	5,9
E35D/D46V/M47L/L85Q	2834	481	4,2
E35D/D46V/V68M/L85Q	2835	864	7,5
E35D/M47L/V68M/L85Q	2836	890	7,7
D46V/M47L/V68M/L85Q	2837	654	5,7
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q	2760	712	6,2
M47V	2838	445	3,9
N48K	2839	160	1,4
K89N	2840	116	1,0
E35D/M47V	2729	543	4,7
E35D/N48K	2841	590	5,1
E35D/K89N	2842	293	2,5
M47V/N48K	2843	490	4,3
M47V/V68M	2844	553	4,8
M47V/K89N	2845	312	2,7
N48K/V68M	2846	127	1,1
N48K/K89N	2847	127	1,1

V68M/K89N	2848	100	0,9
E35D/M47V/N48K	2849	561	4,9
E35D/M47V/V68M	2850	841	7,3
E35D/M47V/K89N	2851	668	5,8
E35D/N48K/V68M	2852	721	6,3
E35D/N48K/K89N	2853	719	6,3
E35D/V68M/K89N	2854	537	4,7
M47V/N48K/V68M	2855	664	5,8
M47V/N48K/K89N	2856	472	4,1
M47V/V68M/K89N	2857	862	7,5
N48K/V68M/K89N	2858	614	5,3
E35D/M47V/N48K/V68M	2764	747	6,5
E35D/M47V/N48K/K89N	2859	814	7,1
E35D/M47V/V68M/K89N	2860	779	6,8
E35D/N48K/V68M/K89N	2861	772	6,7
M47V/N48K/V68M/K89N	2862	671	5,8
E35D/D46V/M47V/N48K/V68M	2863	696	6,1
E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q	2864	980	8,5
E35D/D46V/M47V/V68M/K89N	2865	817	7,1
E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q	2866	907	7,9
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	2250	767	6,7
E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N	2867	854	7,4
IgV CD80 WT–Fc	3031	115	1,0
ECD CD80–Fc	2	131	1,1
Контрольный Fc1.1	1714	97	0,8

Таблица 32. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации	**SEQ**	**CD80, конц.**	**Кратное**

	ID NO	**5,0 нМ**	**повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2868	1117	2,86
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2869	1028	2,64
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2870	853	2,19
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2871	940	2,41
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2872	1015	2,60
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2873	893	2,29
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2874	976	2,50
E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2875	1041	2,67
H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G	2876	986	2,53
H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G	2877	974	2,50
H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G	2878	956	2,45
H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G	2879	925	2,37
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M	2880	895	2,29
A26E/M47L/V68M/A71G/D90G	2881	793	2,03
A26E/E35D/V68M/A71G/D90G	2882	912	2,34
A26E/E35D/M47L/A71G/D90G	2883	1132	2,90
A26E/E35D/M47L/V68M/D90G	2884	1091	2,80
A26E/E35D/M47L/V68M/A71G	2885	1010	2,59
H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G	2886	815	2,09
H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G	2887	851	2,18
H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G	2888	852	2,18
H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G	2889	853	2,19
H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G	2890	1036	2,66
H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G	2891	1075	2,76
H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G	2892	1160	2,97

H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G	2893	1049	2,69
H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G	2894	961	2,46
H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G	2895	944	2,42
M47L/V68M/A71G/D90G	2896	771	1,98
H18Y/V68M/A71G/D90G	2897	797	2,04
H18Y/A26E/A71G/D90G	2898	933	2,39
H18Y/A26E/E35D/D90G	2899	948	2,43
H18Y/A26E/E35D/M47L	2900	1208	3,10
E35D/V68M/A71G/D90G	2901	990	2,54
E35D/M47L/A71G/D90G	2902	784	2,01
E35D/M47L/V68M/D90G	2903	711	1,82
E35D/M47L/V68M/A71G	2904	745	1,91
A26E/V68M/A71G/D90G	2905	590	1,51
A26E/M47L/A71G/D90G	2906	827	2,12
A26E/M47L/V68M/D90G	2907	821	2,11
A26E/M47L/V68M/A71G	2908	517	1,33
A26E/E35D/V68M/D90G	2910	871	2,23
A26E/E35D/V68M/A71G	2911	839	2,15
A26E/E35D/M47L/D90G	2912	843	2,16
A26E/E35D/M47L/A71G	2256	766	1,96
H18Y/M47L/A71G/D90G	2914	675	1,73
H18Y/M47L/V68M/D90G	2915	834	2,14
H18Y/M47L/V68M/A71G	2916	881	2,26
H18Y/E35D/A71G/D90G	2917	1487	3,81
H18Y/E35D/M47L/A71G	2921	1387	3,56
H18Y/A26E/V68M/D90G	2923	1131	2,90
H18Y/A26E/V68M/A71G	2924	469	1,20
H18Y/A26E/M47L/D90G	2925	1159	2,97
H18Y/A26E/M47L/A71G	2926	1107	2,84
H18Y/A26E/E35D/V68M	2929	1214	3,11
IgV CD80 WT–Fc	3031	390	1,00

ПРИМЕР 15

Оптимизация вариантов посредством селекции библиотеки NNK

[0666] Получали дополнительные молекулы вариантов, содержащие IgV–домены

CD80, с комбинациями мутаций в положениях 18, 26, 35, 47, 48, 68, 71, 85, 88, 90 и 93 относительно положений, приведенных в SEQ ID NO: 2250, 2276 и 2280. Варианты получали из библиотеки NNK в выбранных положениях, где N=A, G,C или T и K=T или G, таким образом, что вырожденные кодоны кодируют все потенциальные аминокислоты, но при этом предотвращают кодирование двух стоп–кодонов TAA и TGA. ДНК, содержащую NNK, встраивали в дрожжи, по существу, как описано в примере 2, для получения библиотек дрожжей. Библиотеки использовали для селекции дрожжей, экспрессирующих аффинно–модифицированные варианты CD80, по существу, как описано в примере 3.

[0667] Результаты трех раундов селекции посредством FACS с использованием rhPD–L1–Fc, по существу, как описано в примере 4, дополнительно форматировали, подвергали селекции и экспрессировали в виде неактивных Fc–слитых белков, по существу, как описано в примере 5. Fc–слитые белки тестировали на связывание, по существу, как описано в примере 7, и биологическую активность, по существу, как описано в примере 9. В качестве референса также измеряли связывание и биологическую активность ECD CD80–Fc дикого типа (неактивного), IgV CD80–Fc дикого типа (неактивного), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276) IgV CD80–Fc (неактивного) и неактивный Fc в отдельности. Результаты исследований связывания и активности представлены в таблицах 33 и 34, соответственно.

Таблица 33. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации CD80	**SEQ ID NO:**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–L1:CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относительно CD80 WT**	
H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G	2992	23650	17,1	3227	31,6	64919	393,4	20,1
H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G	2993	23371	16,9	1906	18,7	67010	406,1	35,2
H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G	2994	21923	15,8	2573	25,2	64919	393,4	25,2

H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G	2995	17045	12,3	7253	71,1	67999	412,1	9,4
H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2996	202800	14,7	6349	62,2	64761	392,5	10,2
H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G	2997	20911	15,1	1366	13,4	68498	415,1	50,1
H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G	2998	22932	16,6	3641	35,7	67338	408,1	18,5
H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G	2999	22395	16,2	1297	12,7	68165	413,1	52,6
H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G	3000	13669	9,9	2253	22,1	55417	335,9	24,6
H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G	3001	16192	11,7	2452	24,0	52405	317,6	21,4
H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3002	16769	12,1	2115	20,7	43588	264,2	20,6
H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G	3003	12156	8,8	5125	50,2	54482	330,2	10,6
H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G	3004	17904	12,9	6911	67,8	51521	312,2	7,5
H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G	3005	16458	11,9	2549	25,0	47905	290,3	18,8
H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3006	17165	12,4	6792	66,6	52151	316,1	7,7
A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G	3007	19761	14,3	8189	80,3	54747	331,8	6,7
H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3008	25398	18,4	8189	80,3	66198	401,2	8,1
H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3009	24919	18,0	8063	79,0	73884	447,8	9,2
H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3010	23151	16,7	9620	94,3	73166	443,4	7,6

H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3011	22132	16,0	6253	61,3	67503	409,1	10,8
H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G	3012	17654	12,8	3126	30,6	33597	203,6	10,7
H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3013	23763	17,2	4731	46,4	33436	202,6	7,1
H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3014	21360	15,4	4913	48,2	36284	219,9	7,4
H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G	3015	23932	17,3	4801	47,1	32253	195,5	6,7
H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3016	16420	11,9	8392	82,3	20666	125,2	2,5
H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K	3017	15206	11,0	3170	31,1	22395	135,7	7,1
H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G	3018	14618	10,6	82,2	0,8	26510	160,7	322,5
H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G	3019	8281	6,0	1818	17,8	27280	165,3	15,0
H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G	3020	16652	12,0	6733	66,0	24450	148,2	3,6
H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P	3021	17327	12,5	18589	182,2	29306	177,6	1,6
H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G	3022	17205	12,4	6028	59,1	27541	166,9	4,6
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2276	21512	15,5	5202	51,0	35251	213,6	6,8
IgV CD80 WT–Fc		1384	1,0	102	1,0	165	1,0	1,6

ECD CD80 WT–Fc		17862	12,9	57,8	0,6	161	1,0	2,8
Контрольный Fc1.1		194	0,1	81	0,8	185	1,1	2,3

Таблица 34. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации CD80	**SEQ ID NO**	**CD80, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G	2992	963	5,6
H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G	2993	936	5,5
H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G	2994	916	5,4
H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G	2995	815	4,8
H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	2996	910	5,3
H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G	2997	1053	6,2
H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G	2998	957	5,6
H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G	2999	985	5,8
H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G	3000	881	5,2
H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G	3001	808	4,7
H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3002	854	5,0
H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G	3003	761	4,5
H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G	3004	821	4,8

H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G	3005	862	5,0
H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3006	825	4,8
A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G	3007	823	4,8
H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3008	907	5,3
H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3009	883	5,2
H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3010	738	4,3
H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G	3011	771	4,5
H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G	3012	795	4,6
H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3013	857	5,0
H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3014	1054	6,2
H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G	3015	926	5,4
H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	3016	907	5,3
H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K	3017	919	5,4
H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G	3018	911	5,3
H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G	3019	865	5,1
H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G	3020	994	5,8
H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P	3021	972	5,7

H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G	3022	833	4,9
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G	2276	912	5,3
IgV CD80 WT–Fc	3031	171	1,0
ECD CD80 WT–Fc	2	159	0,9
Контрольный Fc1.1	1714	129	0,8

ПРИМЕР 16

Варианты линкера IgV CD80–Fc

[0668] Конструировали варианты IgV CD80–Fc с различными линкерными областями (линкерами) между IgV– и Fc–доменами и анализировали связывание и/или биологическую активность. Получали слитые белки, содержащие E35D/M47V/N48K/V68M/K89N IgV CD80–Fc и E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D IgV–Fc белки, содержащие линкеры EAAAK (SEQ ID NO: 3026), $(EAAAK)_3$ (SEQ ID NO: 3027), $GS(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 3028), $GS(G_4S)_5$ (SEQ ID NO: 3029).

[0669] Также получали белки IgV CD80–Fc, содержащие модификации E35D/M47V/N48K/V68M/K89N или E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D в последовательности остова IgV CD80 с делецией трех аминокислот, соединяющих IgV и IgC в CD80 дикого типа (последовательности остова, приведенной в SEQ ID NO: 3030). Затем полученный вариант CD80 IgV подвергали слиянию с неактивным Fc, в котором дополнительно отсутствовали 6 аминокислот шарнирной области (Fc, приведенном в SEQ ID NO: 3025). Молекулы, полученные с помощью этой стратегии, подвергали слиянию напрямую с Fc без дополнительного линкера и обозначали как "дельта"–линкер.

[0670] Затем варианты IgV CD80–Fc тестировали на связывание и биологическую активность, как описано в примерах 7 и 9. Для сравнения также измеряли связывание и биологическую активность IgV CD80 дикого типа (SEQ ID NO: 3031)–Fc (неактивного), ECD CD80 (SEQ ID NO: 2)–Fc (неактивного), содержащего линкер GSG_4S (SEQ ID NO: 1716), и неактивного Fc в отдельности. Результаты представлены в таблицах 34 и 35, соответственно.

Таблица 34. Связывание с клетками Jurkat (CD28) и CHO, стабильно экспрессирующими CTLA4 или PD–L1, по результатам проточной цитометрии

Мутации	**Линкер**	**CTLA4**		**CD28**		**PD–L1**		**Соотношение PD–L1: CD28**
		MFI при 33,3 нМ	**Кратное изменение относ**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение**	**MFI при 33,3 нМ**	**Кратное изменение относи**	

			ительно CD80 WT		**относительно CD80 WT**		**тельно CD80 WT**	
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	дельта	3091	2,6	4678	83,7	20442	438,7	4
	EAAAK	27516	23,0	2634	47,1	22862	490,6	9
	$(EAAAK)_3$	27132	22,6	1285	23,0	24476	525,2	19
	$GS(G_4S)_3$	29793	24,9	2109	37,7	24222	519,8	11
	$GS(G4S)_5$	26994	22,5	1154	20,6	22707	487,3	20
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D	дельта	12177	10,2	4173	74,7	22538	483,6	5
	EAAAK	28959	24,2	563	10,1	24821	532,6	44
	$(EAAAK)_3$	32048	26,8	197	3,5	25461	546,4	129
	$GS(G_4S)_3$	26961	22,5	267	4,8	22596	484,9	85
	$GS(G_4S)_5$	26607	22,2	143	2,6	22408	480,9	157
IgV CD80 WT–Fc	GSG_4S	1198	1,0	56	1,0	47	1,0	1
ECD CD80–Fc	GSG_4S	32735	27,3	37	0,7	35	0,7	1
Неактивный Fc (контроль)	N/A	40	0,0	20	0,3	58	1,2	3

Таблица 35. Репортерный анализ Jurkat/ИЛ–2+CHO/OKT3/PD–L1: Относительные люминесцентные единицы (RLU)

Мутации	**Линкер**	**CD80, конц. 5,0 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV CD80 WT–Fc**
E35D/M47V/N48K/V68M/K89N	дельта	1026	2,63

	EAAAK	1707	4,38
	$(EAAAK)_3$	1761	4,52
	$GS(G_4S)_3$	1400	3,59
	$GS(G4S)_5$	1541	3,95
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D	дельта	1079	2,77
	EAAAK	1462	3,75
	$(EAAAK)_3$	2046	5,25
	$GS(G_4S)_3$	1592	4,08
	$GS(G4S)_5$	2053	5,26
IgV CD80 WT–Fc	GSG_4S	390	1,00

ПРИМЕР 17

Дополнительные аффинно–модифицированные домены IgSF

[0671] В этом примере описывают дизайн, получение и скрининг дополнительных аффинно–модифицированных иммуномодулирующих белков CD155, CD112, PD–L1, PD–L2 и CD86 (B7–2), являющихся другими компонентами иммунного синапса (IS), продемонстрировавшими двойную роль в иммунной активации и ингибировании. Также получали аффинно–модифицированные варианты NKp30 и подвергали их скринингу. В этих примерах показано, что при аффинной модификации доменов IgSF получают белки, которые могут действовать, повышая и снижая иммунологическую активность. Для достижения иммуномодулирующей активности различные комбинации этих доменов подвергали слиянию парами (т.е. в составном виде) с вариантом аффинно–модифицированного CD80 для получения иммуномодулирующего белка типа II.

[0672] Мутантные конструкции ДНК, кодирующие вариант IgV–домена CD155, CD112, CD80, PD–L1 и PD–L2 человека, для трансляции и экспрессии в виде библиотек дрожжевого дисплея получали, по существу, как описано в примере 1. Целевые библиотеки, направленные на конкретные остатки для полной или частичной рандомизации с использованием вырожденных кодонов и/или рандомизированных библиотек, конструировали для идентификации вариантов IgV CD112 (SEQ ID NO: 829), CD155(SEQ ID NO: 421), PD–L1 (SEQ ID NO: 1196) и вариантов IgV PD–L2 (SEQ ID NO: 1257), по существу, как описано в примере 1. Схожие способы также использовали для получения библиотек IgC–подобного домена NKp30 (SEQ ID NO: 355).

[0673] ДНК вырожденных или рандомизированных библиотек встраивали в дрожжи, по существу, как описано в примере 2, для получения библиотек дрожжей. Библиотеки использовали для селекции дрожжей, экспрессирующих аффинно–модифицированные варианты CD155, CD112, PD–L1, PD–L2, CD86 (B7–2) и NKp30, по существу, как описано в примере 3. Клетки обрабатывали для снижения несвязывающих средств и обогащения вариантов CD155, CD112, PD–L1 или PD–L2 со способностью связываться с их экзогенными рекомбинантными белками–противоструктурами, по

существу, как описано в примере 3.

[0674] С библиотеками CD80, CD86 и NKp30 из R&D Systems (USA) получали следующие целевые белки–лиганды: rCD28.Fc человека (т.е. рекомбинантный CD28–Fc–слитый белок), rPD–L1.Fc, rCTLA4.Fc и rB7H6.Fc. Двухцветную проточную цитометрию осуществляли, по существу, как описано в примере 3. Результаты проточно–цитометрической сортировки дрожжей оценивали на более высокую аффинность специфического связывания. Полученные при сортировке дрожжи выращивали и повторно индуцировали для экспрессии конкретных вариантов аффинно–модифицированных доменов IgSF, которые они кодируют. Затем эту популяцию можно сравнивать с родительским штаммом дрожжей дикого типа или любыми другими выбранными результатами, такими как популяция дрожжей, полученная с помощью бус, посредством проточной цитометрии.

[0675] В случае вариантов дрожжей NKp30, выбранных по связыванию с B7–H6, из результатов сортировки F2 получали значение MFI 533 при окрашивании с использованием 16,6 нМ rB7H6.Fc, в то время как в случае родительского штамма NKp30 получали MFI 90 при окрашивании той же концентрацией rB7H6.Fc (6–кратное улучшение).

[0676] Среди идентифицированных вариантов NKp30 был вариант, содержавший мутации L30V/A60V/S64P/S86G относительно положений во внеклеточном домене NKp30, соответствующих положениям, приведенным в SEQ ID NO: 275.

[0677] В случае вариантов CD155, представленных в таблице 20A, библиотеки CD155 подвергали селекции против каждого из TIGIT, CD96 и CD226 раздельно. В случае вариантов CD155, представленных в таблице 20B–F, селекция включала две положительные селекции с использованием желаемых противоструктур TIGIT и CD96 с последующей одной отрицательной селекцией с использованием противоструктуры CD226 для селекции против CD226 и улучшения специфичности связывания варианта CD155. Селекцию осуществляли, по существу, как описано в примере 3 выше, за исключением того, что для оптимизации идентификации варьировали концентрации противоструктур (TIGIT/CD96) и строгость селекции положительной сортировки. Концентрацию CD226 для отрицательной селекции поддерживали на уровне 100 нМ.

[0678] В случае вариантов CD112, представленных в таблице 21A, библиотеки CD112 подвергали селекции против каждого из TIGIT, CD112R и CD226 раздельно. В случае дополнительных вариантов CD112, представленных в таблице 21B–C, селекция включала две положительные селекции с использованием желаемых противоструктур TIGIT и CD112R с последующей одной отрицательной селекцией с использованием противоструктур CD226 для селекции против CD226 и улучшения специфичности связывания варианта CD112. Селекцию осуществляли, по существу, как описано в примере 3 выше, за исключением того, что концентрации противоструктур (TIGIT/CD112R) и строгость селекции при положительной сортировке варьировали для оптимизации идентификации. Концентрацию CD226 для отрицательной селекции

поддерживали на уровне 100 нМ.

[0679] В случае PD–L1 и PD–L2, представленных в таблицах 22A–C или таблицах 23A и 23B, соответственно, целевые или рандомизированные библиотеки дрожжевого дисплея PD–L1 или PD–L2 подвергали селекции против PD–1. Затем осуществляли два–три раунда проточно–цитометрической сортировки с использованием окрашивания экзогенного белка–противоструктуры для обогащения фракции дрожжевых клеток, экспонирующих улучшенные связывающие средства. Альтернативно, в случае PD–L1 селекцию осуществляли с использованием rCD80.Fc человека (т.е. рекомбинантного слитого белка CD80–Fc человека от R&D Systems, USA). Селекцию осуществляли, по существу, как описано для PD–1 выше. Обогащение с помощью магнитных бус и селекцию посредством проточной цитометрии осуществляли, по существу, как описано в Miller, K.D., et al., Current Protocols in Cytometry 4,7.1–4,7.30, July 2008. Варианты PD–L1 из таблицы 22A–B анализировали на связывание с противоструктурами, экспрессируемыми клетками. Дополнительные варианты PD–L1, идентифицированные при скрининге, как описано выше, представлены в таблице 22C.

[0680] Примеры результатов селекции переформатировали в виде иммуномодулирующих белков, содержащих аффинно–модифицированный (вариант) IgV CD155, вариант IgV CD112, вариант IgV PD–L1, вариант IgV PD–L2, каждый из которых подвергали слиянию с молекулой Fc (молекул вариантов слитых белков IgV–Fc), по существу, как описано в примере 4, и Fc–слитый белок экспрессировали и очищали, по существу, как описано в примере 5.

[0681] Затем связывание примеров вариантов доменов IgSF с экспрессируемыми клеткой противоструктурами анализировали, по существу, как описано в примере 6. Получали клетки, экспрессирующие когнатных партнеров по связыванию, и исследования связывания и проточную цитометрию осуществляли, по существу, как описано в примере 6. Кроме того, биологическую активность вариантов Fc–слитых белков охарактеризовывали посредством реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) или анализа соиммобилизации с антителом против CD3, по существу, как описано в примере 6.

[0682] Как указано выше, в каждой таблице примеры замен аминокислот обозначены по номеру положения аминокислоты, соответствующему соответствующей референсной немодифицированной последовательности ECD (таблица 2). Положение аминокислоты указано в середине, при этом соответствующая немодифицированная аминокислота (например, дикого типа) указана перед номером, и идентифицированный вариант замены аминокислоты указан (или инсерция обозначена) после номера.

[0683] Также показана активность связывания, измеряемая по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI), для связывания каждого варианта Fc–слитой молекулы с клетками, сконструированными для экспрессирования когнатного лиганда–противоструктуры и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей немодифицированной Fc–слитой молекулы, несодержащей замены аминокислот с тем же

экспрессируемым клеткой лигандом–противоструктурой. Также показана функциональная активность вариантов Fc–слитых молекул PD–L2 для модуляции активность Т–клеток с учетом вычисленных уровней ИФН–гамма в супернатантах культур (пг/мл), полученных с использованием указанного варианта Fc–слитой молекулы, в анализе MLR. В таблице 23B также показано соотношение ИФН–гамма, получаемого с помощью каждого варианта IgV–Fc, по сравнению с соответствующим немодифицированным IgV–Fc в анализе MLR.

Как показано, селекция приводила к идентификации ряда вариантов доменов IgSF CD155, CD112, PD–L1 и PD–L2, являвшихся аффинно–модифицированными таким образом, что они демонстрируют повышенное связывание по меньшей мере с одним и, в некоторых случаях, несколькими когнатными лигандами–противоструктурами. Кроме того, результаты свидетельствуют о том, что аффинная модификация вариантов молекул также приводила к улучшенной активности в отношении повышения и снижения иммунологической активности.

ТАБЛИЦА 20A: Вариант CD155, подвергнутый селекции против когнатных партнеров по связыванию. Последовательности молекул, данные о связывании и данные о костимуляторной биологической активности.

Мутации CD155	**MFI CD226 tfxn (первичное соотношение MFI CD226)**	**MFI TIGIT tfxn (первичное соотношение MFI TIGIT)**	**CD96 MFI (первичное соотношение MFI CD96)**	**MFI ложнотрансфицированных Expi293 (первичное соотношение MFI ложнотрансфицированных клеток)**	**ИФН–гамма при использовании антитела против CD3 (пг/мл) (первичное соотношение ИФН–гамма при использовании антитела против CD3)**
P18S/P64S/F91S	497825 (133,7)	247219 (91,1)	140065 (45,4)	3528 (1,2)	270,1 (0,7)
P18S/F91S/L104P	26210 (7,0)	75176 (27,7)	10867 (3,5)	2130 (0,7)	364,2 (0,9)
L44P	581289 (156,1)	261931 (96,5)	152252 (49,4)	3414 (1,2)	277,6 (0,7)
A56V	455297 (122,3)	280265 (103,2)	161162 (52,2)	2601 (0,9)	548,2 (1,4)
P18L/L79	5135 (1,4)	4073 (1,5)	3279	2719 (0,9)	1241,5 (3,2)

V/F91S			(1,1)		
P18S/F91S	408623 (109,8)	284190 (104,7)	147463 (47,8)	3348 (1,1)	760,6 (2,0)
P18T/F91S	401283 (107,8)	223985 (82,5)	157644 (51,1)	3065 (1,1)	814,7 (2,1)
P18T/S42P/F91S	554105 (148,8)	223887 (82,5)	135395 (43,9)	3796 (1,3)	539,7 (1,4)
G7E/P18T/Y30C/F91S	12903 (3,5)	12984 (4,8)	7906 (2,6)	2671 (0,9)	275,9 (0,7)
P18T/F91S/G111D	438327 (117,7)	287315 (105,8)	167583 (54,3)	4012 (1,4)	307,2 (0,8)
P18S/F91P	4154 (1,1)	3220 (1,2)	2678 (0,9)	2816 (1,0)	365,7 (0,9)
P18T/F91S/F108L	394546 (106,0)	298680 (110,0)	193122 (62,6)	2926 (1,0)	775,4 (2,0)
P18T/T45A/F91S	435847 (117,1)	222044 (81,8)	191026 (61,9)	2948 (1,0)	1546,8 (4,0)
P18T/F91S/R94H	3589 (1,0)	2942 (1,1)	2509 (0,8)	2390 (0,8)	1273,2 (3,3)
P18S/Y30C/F91S	382352 (102,7)	276358 (101,8)	56934 (18,5)	3540 (1,2)	426,5 (1,1)
A81V/L83P	4169 (1,1)	2912 (1,1)	2616 (0,8)	2993 (1,0)	339,7 (0,9)
L88P	65120 (17,5)	74845 (27,6)	35280 (11,4)	2140 (0,7)	969,2 (2,5)
Дикий тип	3723 (1,0)	2715 (1,0)	3085 (1,0)	2913 (1,0)	389,6 (1,0)
R94H	18905 (5,1)	104013 (38,3)	11727 (3,8)	1663 (0,6)	372,6 (1,0)
A13E/P18S/A56V/F91S	357808 (96,1)	179060 (66,0)	118570 (38,4)	2844 (1,0)	349,2 (0,9)
P18T/F91	38487	46313	22718	2070 (0,7)	1574,5 (4,0)

S/V115A	(10,3)	(17,1)	(7,4)		
P18T/Q60K	238266 (64,0)	173730 (64,0)	154448 (50,1)	4778 (1,6)	427,2 (1,1)

ТАБЛИЦА 20B: Дополнительные варианты CD155 и данные о связывании.

Мутации CD155	**TIGIT**		**CD226**		**CD112R**		**CD96**	
	MFI при 100 нМ	**Кратное повышение относительно ECD WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно ECD WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно ECD WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно ECD WT**
S52M	1865,3	0,00	1901,0	0,01	1553,4	0,87	1609,8	0,02
T45Q/S52L/L104E/G111R	2287,0	0,01	2390,4	0,01	1735,1	0,97	1575,1	0,02
S42G	4837,5	0,01	2448,1	0,01	1815,4	1,02	1699,6	0,02
Q62F	2209,5	0,01	2572,1	0,01	2706,5	1,52	2760,7	0,03
S52Q	2288,1	0,01	2022,3	0,01	1790,1	1,00	1822,3	0,02
S42A/L104Q/G111R	1923,7	0,00	1901,7	0,01	1815,1	1,02	1703,8	0,02
S42A/S52Q/L104Q/G111R	1807,5	0,00	2157,2	0,01	1894,4	1,06	1644,0	0,02
S52W/L104E	1938,2	0,00	1905,6	0,01	2070,6	1,16	1629,5	0,02
S42C	1914,0	0,00	2096,1	0,01	1685,0	0,95	1592,4	0,02

S52W	1991,6	0,00	2037,3	0,01	1612,8	0,90	1712,9	0,02
S52M/L104Q	2666,6	0,01	2252,2	0,01	1706,0	0,96	1633,1	0,02
S42L/S52L/Q62F/L104Q	2021,4	0,00	2643,8	0,02	1730,1	0,97	2318,7	0,02
S42W	2434,5	0,01	2133,4	0,01	2325,7	1,30	2555,4	0,03
S42Q	2073,5	0,00	2225,9	0,01	1905,1	1,07	2143,1	0,02
S52L	2224,8	0,01	2676,3	0,02	2038,6	1,14	2043,2	0,02
S52R	4395,4	0,01	3964,4	0,02	2741,7	1,54	4846,9	0,05
L104E	3135,4	0,01	2264,2	0,01	1803,5	1,01	1556,7	0,02
G111R	2082,7	0,00	2791,3	0,02	2470,9	1,39	3317,1	0,03
S52E	2655,4	0,01	2599,8	0,02	1904,9	1,07	1799,0	0,02
Q62Y	2528,6	0,01	2621,4	0,02	1918,4	1,08	1827,5	0,02
T45Q/S52M/L104E	79498,2	0,19	143238,5	0,83	2600,6	1,46	6310,4	0,06
S42N/L104Q/G111R	2432,1	0,01	2311,3	0,01	1847,4	1,04	1958,3	0,02
S52M/V57L	1760,7	0,00	2431,6	0,01	2006,9	1,13	1858,7	0,02
S42N/S52Q/Q62F	2402,7	0,01	2152,0	0,01	1855,0	1,04	1737,6	0,02
S42A/S52L/L104E/	2262,7	0,01	1889,4	0,01	1783,2	1,00	1606,2	0,02

G111R								
S42W/S52Q/V57L/Q62Y	1961,4	0,00	2138,3	0,01	1844,9	1,03	1699,6	0,02
L104Q	10314,4	0,02	3791,4	0,02	2119,9	1,19	1542,6	0,02
S42L/S52Q/L104E	1946,9	0,00	6474,3	0,04	1749,0	0,98	1702,2	0,02
S42C/S52L	1762,5	0,00	2147,3	0,01	1663,4	0,93	1484,7	0,01
S42W/S52R/Q62Y/L104Q	1918,8	0,00	2300,1	0,01	1824,6	1,02	1756,0	0,02
T45Q/S52R/L104E	121636,9	0,29	142381,2	0,82	2617,9	1,47	3748,2	0,04
S52R/Q62F/L104Q/G111R	2969,2	0,01	3171,6	0,02	1725,4	0,97	2362,3	0,02
T45Q/S52L/V57L/L104E	2857,7	0,01	5943,5	0,03	1496,8	0,84	1533,3	0,02
S52M/Q62Y	1926,6	0,00	2000,3	0,01	1771,6	0,99	1651,1	0,02
Q62F/L104E/G111R	1966,4	0,00	2043,5	0,01	1701,9	0,95	1524,8	0,02
T45Q/S52Q	4812,8	0,01	5787,5	0,03	1765,6	0,99	2451,3	0,02
S52L/L104E	4317,8	0,01	2213,9	0,01	1756,9	0,99	1829,3	0,02
S42V/S52E	2055,0	0,00	2272,6	0,01	1808,0	1,01	2530,2	0,03
T45Q/S52	409	0,01	2075,	0,01	1793,6	1,01	2336,6	0,02

R/G111R	2,3		2					
S42G/S52Q/L104E/G111R	2010,1	0,00	2019,2	0,01	1706,4	0,96	1707,6	0,02
S42N/S52E/V57L/L104E	1784,2	0,00	1743,6	0,01	1690,1	0,95	1538,7	0,02
Дикий тип	1964,7	0,00	2317,1	0,01	2169,6	1,22	1893,4	0,02
S42C/S52M/Q62F	1861,0	0,00	2084,2	0,01	1592,3	0,89	1481,3	0,01
S42L	1930,4	0,00	2187,2	0,01	1743,2	0,98	1618,4	0,02
Дикий тип	2182,6	0,01	2374,5	0,01	1743,1	0,98	1680,4	0,02
S42A	1929,2	0,00	2188,6	0,01	1733,7	0,97	1623,6	0,02
S42G/S52L/Q62F/L104Q	1924,3	0,00	2157,6	0,01	1661,3	0,93	1642,1	0,02
S42N	1817,4	0,00	1910,9	0,01	1699,7	0,95	1691,5	0,02
CD155 IgV–Fc	4690	0,01	4690	0,03	2941	1,65	3272	0,03
CD155 ECD–Fc дикого типа	423797	1,00	172839	1,00	1783	1,00	99037	1,00
PE–конъюгированное антитело против Fc человека	1506,3	0,00	3774	0,02	1587	0,89	1618	0,02

ТАБЛИЦА 20C: Дополнительные варианты CD155 и данные о связывании.						
Мутации CD155	**TIGIT**		**CD226**		**CD96**	
	MFI при 100 нМ	**Кратное повышение относительно ECD WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно ECD WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно ECD WT**
P18T/S65A/S67V/F91S	297843	1,99	351195	3,22	128180	1,68
P18T/T45Q/T61R/S65N/S67L	224682	1,50	270175	2,48	22820	0,30
P18F/S65A/S67V/F91S	534106	3,57	350410	3,21	144069	1,89
P18S/L79P/L104M	342549	2,29	320823	2,94	107532	1,41
P18S/L104M	449066	3,00	295126	2,70	121266	1,59
L79P/L104M	3210	0,02	8323	0,08	2894	0,04
P18T/T45Q/L79P	542878	3,63	371498	3,40	193719	2,55
P18T/T45Q/T61R/S65H/S67H	312337	2,09	225439	2,07	152903	2,01
A13R/D23Y/E37P/S42P/Q62Y/A81E	4161	0,03	11673	0,11	5762	0,08
P18L/E37S/Q62M/G80S/A81P/G99Y/S112N	5900	0,04	14642	0,13	3345	0,04
P18S/L104T	321741	2,15	367470	3,37	108569	1,43
P18S/Q62H/L79Q/F91S	283357	1,89	324877	2,98	125541	1,65
P18S/F91S	2227	1,49	3000	2,75	48542	0,64

	80		49			
P18L/V57T/T61S/S65Y/S67A/L104T	278178	1,86	276870	2,54	121499	1,60
P18T/T45Q	326769	2,18	357515	3,28	92389	1,21
T61M/S65W/S67A/L104T	360915	2,41	417897	3,83	148954	1,96
P18S/V41A/S42G/T45G/L104N	3821	0,03	11449	0,10	3087	0,04
P18H/S42G/T45I/S52T/G53R/S54H/V57L/H59E/T61S/S65D/E68G/L104N	5066	0,03	177351	1,63	3700	0,05
P18S/S42G/T45V/F58L/S67W/L104N	14137	0,09	15175	0,14	15324	0,20
P18S/T45I/L104N	141745	0,95	298011	2,73	97246	1,28
P18S/S42G/T45G/L104N/V106A	29387	0,20	117965	1,08	15884	0,21
P18H/H40R/S42G/T45I/S52T/G53R/S54H/V57L/H59E/T61S/S65D/E68G/L104Y/V106L/F108H	12335	0,08	14657	0,13	15779	0,21
P18S/T45Q/L79P/L104T	206674	1,38	285512	2,62	87790	1,15
P18L/Q62R	66939	0,45	25063	0,23	10928	0,14
P18L/H49R/L104T/D116N	167980	1,12	214677	1,97	62451	0,82
S65T/L104T	205942	1,38	187147	1,71	65207	0,86
P18L/A47V/Q62Y/E73D/L104T	146142	0,98	248926	2,28	73956	0,97
P18L/S42P/T45Q/T61G/S65H/S67E/L104T/D116N	153536	1,03	402503	3,69	53044	0,70

T45Q/S52E/Q62F/L104E	132850	0,89	276434	2,53	14558	0,19
CD155 ECD–Fc дикого типа	149692	1,00	109137	1,00	76083	1,00
PE–конъюгированное антитело против Fc человека	2287	0,02	4799	0,04	2061	0,03

ТАБЛИЦА 20D: Дополнительные варианты CD155 и данные о связывании.

Мутации CD155	**TIGIT**		**CD226**		**CD96**	
	MFI при 100 нМ	**Кратное повышение относительно IgV WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно WT IgV**
P18F/T26M/L44V/Q62K/L79P/F91S/L104M/G111D	117327	1,2	1613	0,1	1629	0,1
P18S/T45S/T61K/S65W/S67A/F91S/G111R	124936	1,3	2114	0,1	2223	0,1
P18S/L79P/L104M/T107M	110512	1,1	18337	0,9	22793	1,3
P18S/S65W/S67A/M90V/V95A/L104Q/G111R	101726	1,0	1605	0,1	2571	0,1
ECD CD155 дикого типа	98935	1,0	20029	1,0	17410	1,0

ТАБЛИЦА 20E: Дополнительные варианты CD155 и данные о связывании.

CD155 Мутации	**TIGIT**		**CD226**		**CD96**	
	MFI при 11,1 нМ	Кратное изменение относительно ECD CD155	MFI при 11,1 нМ	Кратное изменение относительно ECD	MFI при 11,1 нМ	Кратное изменение относительно ECD

				CD155		CD155
P18S/A47G/L79P/F91S/L104M/T107A/R113W	56,409	1,19	1,191	0,08	25,362	1,49
P18T/D23G/S24A/N35D/H49L/L79P/F91S/L104M/G111R	128,536	2,72	987	0,06	3,497	0,20
V9L/P18S/Q60R/V75L/L79P/R89K/F91S/L104E/G111R	125,329	2,65	986	0,06	959	0,06
P18S/H49R/E73D/L79P/N85D/F91S/V95A/L104M/G111R	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало					
V11A/P18S/L79P/F91S/L104M/G111R	48,246	1,02	974	0,06	923	0,05
V11A/P18S/S54R/Q60P/Q62K/L79P/N85D/F91S/T107M	190,392	4,02	1,019	0,07	1,129	0,07
P18T/S52P/S65A/S67V/L79P/F91S/L104M/G111R	121,611	2,57	986	0,06	16,507	0,97
P18T/M36T/L79P/F91S/G111R	150,015	3,17	1,029	0,07	2,514	0,15
D8G/P18S/M36I/V38A/H49Q/A76E/F91S/L104M/T107A/R113W	79,333	1,68	1,026	0,07	2,313	0,14
P18S/S52P/S65A/S67V/L79P/F91S/L104M/T107S/R113W	23,766	0,50	1,004	0,07	1,080	0,06
T15I/P18T/L79P/F91S/L104M/G111R	55,498	1,17	1,516	0,10	1,030	0,06
P18F/T26M/L44V/Q62K/L79P/E82D/F91S/L104M/G111D	213,640	4,51	991	0,06	1,276	0,07
P18T/E37G/G53R/Q62K/L79P/F91S/E98D/L104M/T107M	251,288	5,31	2,001	0,13	45,878	2,69
P18L/K70E/L79P/F91S/V95A/G111R	62,608	1,32	1,117	0,07	973	0,06
V9I/Q12K/P18F/S65A/S67V/L79P/L104T/G111R/S112I	81,932	1,73	803	0,05	68,295	4,00
P18F/S65A/S67V/F91S/L104M/G111R	30,661	0,65	901	0,06	3,193	0,19
V9I/V10I/P18S/F20S/T45A/L79P/F9	151,4	3,20	973	0,06	974	0,06

1S/L104M/F108Y/G111R/S112V	89					
V9L/P18L/L79P/M90I/F91S/T102S/L104M/G111R	155,279	3,28	910	0,06	10,568	0,62
P18C/T26M/L44V/M55I/Q62K/L79P/F91S/L104M/T107M	137,521	2,91	973	0,06	111,085	6,51
V9I/P18T/D23G/L79P/F91S/G111R	151,426	3,20	897	0,06	2,725	0,16
P18F/L79P/M90L/F91S/V95A/L104M/G111R	125,639	2,66	917	0,06	3,939	0,23
P18F/L79P/M90L/F91S/V95A/L104M/G111R	115,156	2,43	1,073	0,07	2,464	0,14
P18T/M36T/S65A/S67E/L79Q/A81T/F91S/G111R	10,616	0,22	1,130	0,07	963	0,06
V9L/P18T/Q62R/L79P/F91S/L104M/G111R	195,111	4,12	835	0,05	1,497	0,09
ECD CD155–Fc	47,319	1,00	15,421	1,00	17,067	1,00
Контрольный Fc	2,298	0,05	1,133	0,07	996	0,06

ТАБЛИЦА 20F: Дополнительные варианты CD155 и данные о связывании.

Мутации CD155	**TIGIT**		**CD226**		**CD112R**		**CD96**	
	MFI при 25 нМ	Кратное изменение относительно ECD CD155	MFI при 25 нМ	Кратное изменение относительно ECD CD155	MFI при 25 нМ	Кратное изменение относительно ECD CD155	MFI при 25 нМ	Кратное изменение относительно ECD CD155
P18T/G19D/M36T/S54N/L79P/L83Q/F91S/T107M/F108Y	905	0,02	748	0,02	1276	1,56	726	0,01
V9L/P18L/M55V/S69L/L79P/A81E/F91S/	58656	1,34	11166	0,29	920	1,13	67364	1,39

T107M								
P18F/H40Q/T61K/Q62K/L79P/F91S/L104M/T107V	108441	2,48	853	0,02	918	1,13	8035	0,17
P18S/Q32R/Q62K/R78G/L79P/F91S/T107A/R113W	5772	0,13	701	0,02	843	1,03	831	0,02
Q12H/P18T/L21S/G22S/V57A/Q62R/L79P/F91S/T107M	1084	0,02	687	0,02	876	1,07	818	0,02
V9I/P18S/S24P/H49Q/F58Y/Q60R/Q62K/L79P/F91S/T107M	69926	1,60	1089	0,03	1026	1,26	43856	0,90
P18T/W46C/H49R/S65A/S67V/A76T/L79P/S87T/L104M	918	0,02	640	0,02	803	0,98	717	0,01
P18S/S42T/E51G/L79P/F91S/G92W/T107M	12630	0,29	707	0,02	857	1,05	1050	0,02
P18S/S42T/E51G/L79P/F91S/G92W/T107M	7476	0,17	851	0,02	935	1,15	924	0,02
V10F/T15S/P18L/R48Q/L79P/F91S/T107M/V115M	1168	0,03	792	0,02	901	1,10	998	0,02
P18S/L21M/Y30F/N35D/R84W/F91S/T107M/D116G	1377	0,03	743	0,02	946	1,16	1033	0,02
P18F/E51V/S54G/Q60R/L79Q/E82G/S87T/M90I/F91S/G92R/T107M	46090	1,05	15701	0,41	1012	1,24	61814	1,27
Q16H/P18F/F91S/T107M	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							

P18T/D23G/Q60R/S67L/L79P/F91S/T107M/V115A	64091	1,47	30931	0,81	874	1,07	108875	2,24
D8G/V9I/V11A/P18T/T26M/S52P/L79P/F91S/G92A/T107L/V115A	52508	1,20	9483	0,25	817	1,00	97770	2,01
V9I/P18F/A47E/G50S/E68G/L79P/F91S/T107M	55167	1,26	54341	1,43	752	0,92	102115	2,10
P18S/M55I/Q62K/S69P/L79P/F91S/T107M	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							
P18T/T39S/S52P/S54R/L79P/F91S/T107M	45927	1,05	744	0,02	1038	1,27	1225	0,03
P18S/D23N/L79P/F91S/T107M/S114N	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							
P18S/P34S/E51V/L79P/F91S/G111R	7917	0,18	769	0,02	853	1,04	892	0,02
P18S/H59N/V75A/L79P/A81T/F91S/L104M/T107M	800	0,02	676	0,02	915	1,12	759	0,02
P18S/W46R/E68D/L79P/F91S/T107M/R113G	1359	0,03	717	0,02	798	0,98	737	0,02
V9L/P18F/T45A/S65A/S67V/R78K/L79V/F91S/T107M/S114T	130274	2,98	153569	4,04	812	1,00	85605	1,76
P18T/M55L/T61R/L79P/F91S/V106I/T107M	133399	3,05	1906	0,05	827	1,01	57927	1,19
T15I/P18S/V33M/N35F/T39S/M55L/R78S/L79P/F91S/T107M	7550	0,17	1015	0,03	789	0,97	2709	0,06
P18S/Q62K/K70E/L7	1117	0,26	69	0,02	735	0,90	195	0,04

9P/F91S/G92E/R113W	3		1				1	
P18F/F20I/T26M/A47V/E51K/L79P/F91S	136088	3,11	54026	1,42	1401	1,72	96629	1,99
P18T/D23A/Q60H/L79P/M90V/F91S/T107M	43795	1,00	98241	2,58	888	1,09	70891	1,46
P18S/D23G/C29R/N35D/E37G/M55I/Q62K/S65A/S67G/R78G/L79P/F91S/L104M/T107M/Q110R	1599	0,04	1030	0,03	1115	1,37	1944	0,04
A13E/P18S/M36R/Q62K/S67T/L79P/N85D/F91S/T107M	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							
V9I/P18T/H49R/L79P/N85D/F91S/L104T/T107M	46375	1,06	76851	2,02	794	0,97	80210	1,65
V9A/P18F/T61S/Q62L/L79P/F91S/G111R	26109	0,60	891	0,02	825	1,01	2633	0,05
D8E/P18T/T61A/L79P/F91S/T107M	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							
P18S/V41A/H49R/S54C/L79S/N85Y/L88P/F91S/L104M/T107M	1098	0,03	830	0,02	876	1,07	1678	0,03
V11E/P18H/F20Y/V25E/N35S/H49R/L79P/F91S/T107M/G111R	979	0,02	846	0,02	844	1,03	928	0,02
V11A/P18F/D23A/L79P/G80D/V95A/T107M	45249	1,04	913	0,02	830	1,02	33883	0,70
P18S/K70R/L79P/F91S/G111R	16180	0,37	793	0,02	854	1,05	1182	0,02

P18T/D23A/Q60H/L79P/M90V/F91S/T107M	175673	4,02	16195 8	4,26	879	1,08	50981	1,05
V9L/V11M/P18S/N35S/S54G/Q62K/L79P/L104M/T107M/V115M	2999	0,07	2315	0,06	893	1,09	925	0,02
V9L/P18Y/V25A/V38G/M55V/A77T/L79P/M90I/F91S/L104M	138011	3,16	26015	0,68	919	1,13	17970	0,37
V10G/P18T/L72Q/L79P/F91S/T107M	4253	0,10	1584	0,04	863	1,06	3643	0,07
P18S/H59R/A76G/R78S/L79P	130622	2,99	79435	2,09	1009	1,24	44493	0,91
V9A/P18S/M36T/S65G/L79P/F91S/L104T/G111R/S112I	92503	2,12	989	0,03	886	1,09	7850	0,16
P18T/S52A/V57A/Q60R/Q62K/S65C/L79P/F91T/N100Y/T107M	187338	4,29	10579	0,28	908	1,11	3791	0,08
V11A/P18F/N35D/A47E/Q62K/L79P/F91S/G99D/T107M/S114N	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							
V11A/P18T/N35S/L79P/S87T/F91S	218660	5,00	27382 5	7,20	1269	1,56	69871	1,44
V9D/V11M/Q12L/P18S/E37V/M55I/Q60R/K70Q/L79P/F91S/L104M/T107M	8693	0,20	790	0,02	852	1,04	1991	0,04
T15S/P18S/Y30H/Q32L/Q62R/L79P/F91S/	16213	0,37	2092	0,06	1056	1,29	6994	0,14

T107M								
ECD CD155–Fc	43704	1,00	38032	1,00	816	1,00	48638	1,00
CD112–IgV	1289		824		17819		1172	0,02

ТАБЛИЦА 21A: Вариант CD112, подвергнутый селекции против когнатных партнеров по связыванию. Последовательности молекул, данные о связывании и данные о костимуляторной биологической активности.

Мутации CD112	**MFI TIGIT tfxn (первичное соотношение MFI TIGIT)**	**MFI CD112R tfxn (первичное соотношение MFI CD112R)**	**MFI CD226 (первичное соотношение MFI CD226)**	**MFI ложнотрансфицированных клеток Expi293 (первичное соотношение MFI ложнотрансфицированных клеток)**	**ИФН–гамма при использовании антитела против CD3 (пг/мл) (первичное соотношение ИФН–гамма при использовании антитела против CD3)**
CD112 WT	210829 (1,00)	1452 (1,00)	265392 (1,00)	1112 (1,00)	676,6 (1,00)
Y33H/A112V/G117D	12948 (0,06)	1552 (1,07)	1368 (0,01)	1241 (1,12)	164,8 (0,24)
V19A/Y33H/S64G/S80G/G98S/N106Y/A112V	48356 (0,23)	1709 (1,18)	2831 (0,01)	1098 (0,99)	
L32P/A112V	191432 (0,91)	1557 (1,07)	11095 (0,04)	1259 (1,13)	390,4 (0,58)

A95V/A112I	238418 (1,13)	1706 (1,17)	51944 (0,20)	1215 (1,09)	282,5 (0,42)
P28S/A112V	251116 (1,19)	1985 (1,37)	153382 (0,58)	1189 (1,07)	503,4 (0,74)
P27A/T38N/V101A/ A112V	255803 (1,21)	2138 (1,47)	222822 (0,84)	1399 (1,26)	240,7 (0,36)
S118F	11356 (0,05)	5857 (4,03)	6938 (0,03)	1270 (1,14)	271,7 (0,40)
R12W/H48Y/F54S/S 118F	10940 (0,05)	3474 (2,39)	5161 (0,02)	1069 (0,96)	
R12W/Q79R/S118F	2339 (0,01)	7370 (5,08)	1880 (0,01)	1338 (1,20)	447,4 (0,66)
T113S/S118Y	6212 (0,03)	6823 (4,70)	1554 (0,01)	1214 (1,09)	225,1 (0,33)
S118Y	2921 (0,01)	6535 (4,50)	2003 (0,01)	1463 (1,32)	190,4 (0,28)
N106I/S118Y	2750 (0,01)	7729 (5,32)	1815 (0,01)	1222 (1,10)	265,8 (0,39)
N106I/S118F	1841 (0,01)	9944 (6,85)	1529 (0,01)	1308 (1,18)	437,9 (0,65)
A95T/L96P/S118Y	2352 (0,01)	4493 (3,09)	1412 (0,01)	1329 (1,19)	292,4 (0,43)
Y33H/P67S/N106Y/ A112V	225015 (1,07)	3259 (2,24)	204434 (0,77)	1296 (1,17)	618,8 (0,91)
N106Y/A112V	6036 (0,03)	1974 (1,36)	15334 (0,06)	1108 (1,00)	409,9 (0,61)
T18S/Y33H/A112V	252647 (1,20)	1347 (0,93)	183181 (0,69)	1412 (1,27)	601,8 (0,89)
P9S/Y33H/N47S/A1 12V	240467 (1,14)	1418 (0,98)	203608 (0,77)	1361 (1,22)	449,1 (0,66)
P42S/P67H/A112V	204484 (0,97)	1610 (1,11)	188647 (0,71)	1174 (1,06)	530,6 (0,78)
P27L/L32P/P42S/A1 12V	219883 (1,04)	1963 (1,35)	84319 (0,32)	1900 (1,71)	251,6 (0,37)

G98D/A112V	4879 (0,02)	2369 (1,63)	6100 (0,02)	1729 (1,55)	387,0 (0,57)
Y33H/S35P/N106Y/A112V	250724 (1,19)	1715 (1,18)	94373 (0,36)	1495 (1,34)	516,2 (0,76)
L32P/P42S/T100A/A112V	242675 (1,15)	1742 (1,20)	202567 (0,76)	1748 (1,57)	435,3 (0,64)
P27S/P45S/N106I/A112V	223557 (1,06)	1799 (1,24)	84836 (0,32)	1574 (1,42)	277,5 (0,41)
Y33H/N47K/A112V	251339 (1,19)	1525 (1,05)	199601 (0,75)	1325 (1,19)	483,2 (0,71)
Y33H/N106Y/A112V	297169 (1,41)	1782 (1,23)	258315 (0,97)	1440 (1,30)	485,4 (0,72)
K78R/D84G/A112V/F114S	236662 (1,12)	1638 (1,13)	24850 (0,09)	1345 (1,21)	142,5 (0,21)
Y33H/N47K/F54L/A112V	14483 (0,07)	1617 (1,11)	2371 (0,01)	1353 (1,22)	352,8 (0,52)
Y33H/A112V	98954 (0,47)	1216 (0,84)	1726 (0,01)	1298 (1,17)	
A95V/A112V	168521 (0,80)	2021 (1,39)	200789 (0,76)	1459 (1,31)	412,9 (0,61)
R12W/A112V	135635 (0,64)	1582 (1,09)	23378 (0,09)	1412 (1,27)	165,8 (0,24)
A112V	213576 (1,01)	1986 (1,37)	151900 (0,57)	1409 (1,27)	211,4 (0,31)
Y33H/A112V	250667 (1,19)	1628 (1,12)	230578 (0,87)	1216 (1,09)	612,7 (0,91)
R12W/P27S/A112V	3653 (0,02)	1308 (0,90)	9105 (0,03)	1051 (0,94)	
Y33H/V51M/A112V	218698 (1,04)	1384 (0,95)	195450 (0,74)	1170 (1,05)	709,4 (1,05)
Y33H/A112V/S118T	219384 (1,04)	1566 (1,08)	192645 (0,73)	1313 (1,18)	396,3 (0,59)
Y33H/V101A/A112V/P115S	5605 (0,03)	1582 (1,09)	5079 (0,02)	1197 (1,08)	

H24R/T38N/D43G/A112V	227095 (1,08)	1537 (1,06)	229311 (0,86)	1336 (1,20)	858,6 (1,27)
A112V	4056 (0,02)	1356 (0,93)	10365 (0,04)	986 (0,89)	
P27A/A112V	193537 (0,92)	1531 (1,05)	230708 (0,87)	3084 (2,77)	355,1 (0,52)
A112V/S118T	233173 (1,11)	1659 (1,14)	121817 (0,46)	845 (0,76)	533,3 (0,79)
R12W/A112V/M122I	235935 (1,12)	1463 (1,01)	217748 (0,82)	1350 (1,21)	528,0 (0,78)
Q83K/N106Y/A112V	205948 (0,98)	2042 (1,41)	234958 (0,89)	1551 (1,39)	481,4 (0,71)
R12W/P27S/A112V/S118T	11985 (0,06)	2667 (1,84)	12756 (0,05)	1257 (1,13)	334,4 (0,49)
P28S/Y33H/A112V	4711 (0,02)	1412 (0,97)	3968 (0,01)	955 (0,86)	
P27S/Q90R/A112V	3295 (0,02)	1338 (0,92)	6755 (0,03)	1048 (0,94)	
L15V/P27A/A112V/S118T	209888 (1,00)	1489 (1,03)	84224 (0,32)	1251 (1,13)	512,30,76)
Y33H/N106Y/T108I/A112V	Не тестировали				
Y33H/P56L/V75M/V101M/A112V	Не тестировали				

ТАБЛИЦА 21B: Дополнительные варианты CD112 и данные о связывании.

Мутации CD112	**TIGIT**		**CD226**		**CD112R**		**CD96**	
	MFI при 100 нМ	**Кратное повышение относительно IgV WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV WT**	**MFI при 100 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV WT**

S118F	1763	0,02	1645	0,08	2974	0,61	1659	0,19
N47K/Q79R/S118F	1738	0,02	1689	0,09	2637	0,54	1647	0,19
Q40R/P60T/A112V/S118T	4980	0,06	1608	0,08	2399	0,50	2724	0,32
F114Y/S118F	110506	1,34	7325	0,37	1502	0,31	1553	0,18
N106I/S118Y	1981	0,02	1700	0,09	2394	0,49	1582	0,19
S118Y	101296	1,23	9990	0,50	1429	0,30	1551	0,18
Y33H/K78R/S118Y	2276	0,03	2115	0,11	3429	0,71	2082	0,24
N106I/S118F	1875	0,02	1675	0,08	2365	0,49	1662	0,19
R12W/A46T/K66M/Q79R/N106I/T113A/S118F	3357	0,04	1808	0,09	1664	0,34	4057	0,48
Y33H/A112V/S118F	3376	0,04	2886	0,15	3574	0,74	3685	0,43
R12W/Y33H/N106I/S118F	100624	1,22	24513	1,24	1490	0,31	2060	0,24
L15V/Q90R/S118F	5791	0,07	4169	0,21	2752	0,57	4458	0,52
N47K/D84G/N106I/S118Y	3334	0,04	2819	0,14	2528	0,52	3498	0,41
L32P/S118F	3881	0,05	2506	0,13	2659	0,55	2518	0,29
Y33H/Q79R/A112V/S118Y	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							
T18A/N106I/S118T	84035	1,02	10208	0,52	1585	0,33	1590	0,19
L15V/Y33H/N106Y	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало							

/A112V/S118F								
V37M/S118F	96986	1,18	2523	0,13	1985	0,41	1849	0,22
N47K/A112V/S118Y	1980	0,02	1859	0,09	2733	0,56	1825	0,21
A46T/A112V	4224	0,05	4685	0,24	3288	0,68	4273	0,50
P28S/Y33H/N106I/S118Y	6094	0,07	2181	0,11	1891	0,39	3021	0,35
P30S/Y33H/N47K/V75M/Q79R/N106I/S118Y	2247	0,03	2044	0,10	1796	0,37	2658	0,31
V19A/N47K/N106Y/K116E/S118Y	2504	0,03	2395	0,12	2174	0,45	2852	0,33
Q79R/T85A/A112V/S118Y	2192	0,03	1741	0,09	2367	0,49	1620	0,19
Y33H/A112V		0,25	1465	0,07	1794	0,37	2589	0,30
V101M/N106I/S118Y	55274	0,67	6625	0,33	1357	0,28	1494	0,17
Y33H/Q79R/N106I/A112V/S118T	6095	0,07	1760	0,09	2393	0,49	3033	0,36
Q79R/A112V	1571	0,02	1490	0,08	2284	0,47	1326	0,16
Y33H/A46T/Q79R/N106I/S118F	90813	1,10	15626	0,79	1298	0,27	3571	0,42
A112V/G121S	95674	1,16	19992	1,01	1252	0,26	4005	0,47
Y33H/Q79R/N106I/S118Y	36246	0,44	2118	0,11	1970	0,41	3250	0,38
Y33H/N106I/A112V	47352	0,57	4217	0,21	2641	0,55	1488	0,17
Y33H/A46T/V101M/A112V/S118T	14413	0,17	1596	0,08	2335	0,48	1441	0,17

L32P/L99M/N106I/S118F	3056	0,04	1791	0,09	2210	0,46	2000	0,23
L32P/T108A/S118F	104685	1,27	4531	0,23	2308	0,48	1518	0,18
A112V	4937	0,06	1903	0,10	1646	0,34	3011	0,35
R12W/Q79R/A112V	55539	0,67	6918	0,35	1386	0,29	1740	0,20
Y33H/N106Y/E110G/A112V	2786	0,03	2517	0,13	1787	0,37	2023	0,24
Y33H/N106I/S118Y	1967	0,02	1579	0,08	2601	0,54	1517	0,18
Q79R/S118F	82055	1,00	7582	0,38	1298	0,27	1970	0,23
Y33H/Q79R/G98D/V101M/A112V	21940	0,27	1632	0,08	1141	0,24	18423	2,16
N47K/T81S/V101M/A112V/S118F	6889	0,08	1311	0,07	1303	0,27	1145	0,13
G82S/S118Y	4267	0,05	1938	0,10	2140	0,44	2812	0,33
Y33H/A112V/S118Y	14450	0,18	1532	0,08	2353	0,49	3004	0,35
Y33H/N47K/Q79R/N106Y/A112V	70440	0,85	3557	0,18	1447	0,30	1679	0,20
Y33H/S118T	113896	1,38	17724	0,89	1252	0,26	5001	0,59
R12W/Y33H/Q79R/V101M/A112V	3376	0,04	2727	0,14	2047	0,42	2339	0,27
S118F	2685	0,03	1864	0,09	2520	0,52	1566	0,18
IgV CD112–Fc дикого типа	82414	1,00	19803	1,00	4842	1,00	8541	1,00
ECD CD112–Fc	29157	0,35	8755	0,44	1107	0,23	1103	0,13

PE–конъюгированное антитело против hFc	1383	0,02	1461	0,07	1358	0,28	1468	0,17

ТАБЛИЦА 21C: Дополнительные варианты CD112 и данные о связывании.

Мутации CD112	**TIGIT**		**CD226**		**CD112R**		**CD96**	
	MFI 20 нМ	**Кратное повышение относительно IgV WT**	**MFI при 20 нМ**	**Кратное повышение относительно WT IgV**	**MFI при 20 нМ**	**Кратное повышение относительно WT IgV**	**MFI при 20 нМ**	**Кратное повышение относительно IgV WT**
N106I/S118Y	1288	0,04	1334	0,12	6920	4,16	1102	0,44
Y33H/Q83K/A112V/S118T	115690	3,31	10046	0,93	1128	0,68	2053	0,82
R12W/Q79R/S118F	1436	0,04	1296	0,12	6546	3,93	1046	0,42
V29M/Y33H/N106I/S118F	Не тестировали							
Y33H/A46T/A112V	111256	3,18	14974	1,39	1148	0,69	3333	1,34
Y33H/Q79R/S118F	1483	0,04	1326	0,12	7425	4,46	1138	0,46
Y33H/N47K/F74L/S118F	1338	0,04	1159	0,11	1516	0,91	1140	0,46
R12W/V101M/N106I/S118Y	1378	0,04	1249	0,12	5980	3,59	1182	0,47
A46T/V101A/N106I/S118Y	1359	0,04	1199	0,11	6729	4,04	1173	0,47
Y33H/N106Y/A112V	113580	3,25	17771	1,65	1207	0,72	2476	0,99

N106Y/A112V/S118T	Не тестировали							
S76P/T81I/V101M/N106Y/A112V/S118F	Не тестировали							
N106Y/A112V	29015	0,83	2760	0,26	1159	0,70	1639	0,66
P9R/L21V/P22L/I34M/S69F/F74L/A87V/A112V/L125A	1920	0,05	1218	0,11	1107	0,66	1074	0,43
Y33H/V101M/A112V	126266	3,61	24408	2,27	1150	0,69	4535	1,82
N106I/S118F	1776	0,05	1385	0,13	9058	5,44	1370	0,55
V29A/L32P/S118F	1265	0,04	1148	0,11	5057	3,04	1194	0,48
A112V	69673	1,99	6387	0,59	1140	0,68	1214	0,49
Y33H/V101M/A112V	133815	3,83	24992	2,32	1184	0,71	6338	2,54
P28S/Y33H/N106I/S118Y	2745	0,08	1689	0,16	6625	3,98	1978	0,79
Y33H/V101M/N106I/A112V	118654	3,40	21828	2,03	1253	0,75	3871	1,55
R12W/Y33H/N47K/Q79R/S118Y	171390	4,91	5077	0,47	1124	0,68	2636	1,06
A112V/S118T	103203	2,95	15076	1,40	1155	0,69	1426	0,57
Y33H/A46T/A112V/S118T	141859	4,06	29436	2,74	1184	0,71	5760	2,31
Y33H/A112V/F114L/S118T	5161	0,15	1734	0,16	1184	0,71	1249	0,50
A112V	78902	2,26	6224	0,58	1114	0,67	1181	0,47

Y33H/T38A/A46T/V101M/A112V	111293	3,19	25702	2,39	1192	0,72	99015	39,69
Q79R/A112V	96674	2,77	7264	0,67	1130	0,68	1216	0,49
Y33H/N106I/S118Y	5720	0,16	1453	0,14	6543	3,93	1248	0,50
P28S/Y33H/S69P/N106I/A112V/S118Y	22393	0,64	1378	0,13	1550	0,93	19174	7,68
Y33H/P42L/N47K/V101M/A112V	214116	6,13	13878	1,29	1315	0,79	4753	1,91
Y33H/N47K/F74S/Q83K/N106I/F111L/A112V/S118T	6719	0,19	1319	0,12	1305	0,78	1278	0,51
Y33H/A112V/S118T/V119A	184794	5,29	10204	0,95	1269	0,76	4321	1,73
Y33H/N106I/A112V/S118F	6872	0,20	1591	0,15	2308	1,39	2796	1,12
Y33H/K66M/S118F/W124L	1724	0,05	1259	0,12	6782	4,07	1197	0,48
S118F	1325	0,04	1213	0,11	7029	4,22	1135	0,46
N106I/A112V	111342	3,19	4241	0,39	1546	0,93	1178	0,47
Y33H/A112V	177926	5,09	13761	1,28	1152	0,69	3117	1,25
IgV CD112 WT	34932	1,00	10762	1,00	1665	1,00	2495	1,00
ECD CD112 WT–Fc	28277	0,81	8023	0,75	1253	0,75	1064	0,43
PE–конъюгированное антитело против huFc	1138	0,03	1006	0,09	1010	0,61	1062	0,43

ТАБЛИЦА 22A: Выбранные варианты PD–L1 и данные о связывании.

Мутации PD–L1	**Связывание с клетками Jurkat/PD–1**	
	MFI при 50 нМ	**Кратное повышение относительно IgV PD–L1–Fc дикого типа**
K28N/M41V/N45T/H51N/K57E	12585	2,4
I20L/I36T/N45D/I47T	3119	0,6
I20L/M41K/K44E	9206	1,8
P6S/N45T/N78I/I83T	419	0,1
N78I	2249	0,4
M41K/N78I	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
N17D/N45T/V50A/D72G	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
I20L/F49S	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
N45T/V50A	23887	4,6
I20L/N45T/N78I	29104	5,6
N45T/N78I	24865	4,7
I20L/N45T	24279	4,6
I20L/N45T/V50A	34158	6,5
N45T	6687	1,3
M41K	5079	1,0
M41V/N45T	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
M41K/N45T	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
A33D/S75P/D85E	685	0,1
M18I/M41K/D43G/H51R/N78I	20731	4,0
V11E/I20L/I36T/N45D/H60R/S75P	3313	0,6
A33D/V50A	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
S16G/A33D/K71E/S75P	Белок не продуцировался или его продуцировалось	

	мало	
E27G/N45T/M97I	881	0,2
E27G/N45T/K57R	5022	1,0
A33D/E53V	650	0,1
D43G/N45D/V58A	63960	12,2
E40G/D43V/N45T/V50A	809	0,2
Y14S/K28E/N45T	16232	3,1
A33D/N78S	1725	0,3
A33D/N78I	8482	1,6
A33D/N45T	17220	3,3
A33D, N45T/N78I	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало	
E27G/N45T/V50A	25267	4,8
N45T/V50A/N78S	28572	5,4
N45T/V50A	18717	3,6
I20L/N45T/V110M	464	0,1
I20L/I36T/N45T/V50A	7658	1,5
N45T/L74P/S75P	5251	1,0
N45T/S75P	12200	2,3
S75P/K106R	388	0,1
S75P	1230	0,2
A33D/S75P	306	0,1
A33D/S75P/D104G	251	0,0
A33D/S75P	1786	0,3
I20L/E27G/N45T/V50A	29843	5,7
I20L/E27G/D43G/N45D/V58A/N78I	69486	13,3
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I	72738	13,9
I20L/A33D/D43G/N45D/V58A/N78I	80205	15,3
I20L/D43G/N45D/N78I	67018	12,8
E27G/N45T/V50A/N78I	30677	5,9
N45T/V50A/N78I	32165	6,1
V11A/I20L/E27G/D43G/N45	73727	14,1

D/H51Y/S99G		
I20L/E27G/D43G/N45T/V50A	36739	7,0
I20L/K28E/D43G/N45D/V58A/Q89R	80549	15,4
I20L/I36T/N45D	16870	3,2
I20L/K28E/D43G/N45D/E53G/V58A/N78I	139	0,0
A33D/D43G/N45D/V58A/S75P	58484	11,2
K23R/D43G/N45D	67559	12,9
I20L/D43G/N45D/V58A/N78I/D90G/G101D	259	0,0
D43G/N45D/L56Q/V58A/G101G–ins	88277	16,8
I20L/K23E/D43G/N45D/V58A/N78I	89608	17,1
I20L/K23E/D43G/N45D/V50A/N78I	88829	16,9
T19I/E27G/N45I/V50A/N78I/M97K	25496	4,9
I20L/M41K/D43G/N45D	599	0,1
K23R/N45T/N78I	84980	16,2
Полноразмерный PD–L1–Fc	18465	3,5
IgV PD–L1 дикого типа	5243	1,0
Моноклональное антитело против PD–1 (ниволумаб)	79787	15,2
IgG человек	198	0,0

Таблица 22B: Связывание с клетками, экспрессирующими PD–1 или CD80, по результатам проточной цитометрии

Мутации PD–L1	**PD–1**		**CD80**	
	MFI при 20 нМ	**Кратное изменение относите**	**MFI при 20 нМ**	**Кратное изменение относительно PD–L1**

		льно PD–L1 WT		**WT**
K57R/S99G	2953	0,9	16253	121,3
K57R/S99G/F189L	1930	0,6	12906	96,3
M18V/M97L/F193S/R195G/E200K/H202Q	69	0,0	241	1,8
I36S/M41K/M97L/K144Q/R195G/E200K/ H202Q/L206F	3498	1,1	68715	512,8
C22R/Q65L/L124S/K144Q/R195G/E200N/ H202Q/T221L	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало			
M18V/I98L/L124S/P198T/L206F	2187	0,7	143	1,1
S99G/N117S/I148V/K171R/R180S	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало			
I36T/M97L/A103V/Q155H	120	0,0	128	1,0
K28I/S99G	830	0,3	693	5,2
R195S	3191	1,0	138	1,0
A79T/S99G/T185A/R195G/E200K/H202Q/ L206F	1963	0,6	643	4,8
K57R/S99G/L124S/K144Q	2081	0,7	14106	105,3
K57R/S99G/R195G	2479	0,8	10955	81,8
D55V/M97L/S99G	11907	3,8	71242	531,7
E27G/I36T/D55N/M97L/K111E	1904	0,6	88724	662,1
E54G/M97L/S99G	8414	2,7	51905	387,4
G15A/I36T/M97L/K111E/H202Q	112	0,0	13530	101,0
G15A/I36T/V129D	114	0,0	136	1,0
G15A/I36T/V129D/R195G	125	0,0	134	1,0
G15A/V129D	2075	0,7	128	1,0
I36S/M97L	3459	1,1	44551	332,5
I36T/D55N/M97L/K111E/A204T	265	0,1	62697	467,9
I36T/D55N/M97L/K111E/V129A/F173L	393	0,1	72641	542,1
I36T/D55S/M97L/K111E/I148V/R180S	94	0,0	30704	229,1
I36T/G52R/M97L/V112A/K144E/V175A/P 198T	81	0,0	149	1,1
I36T/I46V/D55G/M97L/K106E/K144E/T18	69	0,0	190	1,4

5A/R195G				
I36T/I83T/M97L/K144E/P198T	62	0,0	6216	46,4
I36T/M97L/K111E	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало			
I36T/M97L/K144E/P198T	197	0,1	40989	305,9
I36T/M97L/Q155H/F193S/N201Y	69	0,0	1251	9,3
I36T/M97L/V129D	523	0,2	50905	379,9
L35P/I36S/M97L/K111E	190	0,1	155	1,2
M18I/I36T/E53G/M97L/K144E/E199G/V207A	104	0,0	47358	353,4
M18T/I36T/D55N/M97L/K111E	138	0,0	71440	533,1
M18V/M97L/T176N/R195G	1301	0,4	45300	338,1
M97L/S99G	12906	4,1	81630	609,2
N17D/M97L/S99G	10079	3,2	73249	546,6
S99G/T185A/R195G/P198T	2606	0,8	22062	164,6
V129D/H202Q	2001	0,6	219	1,6
V129D/P198T	3245	1,0	152	1,1
V129D/T150A	1941	0,6	142	1,1
V93E/V129D	1221	0,4	150	1,1
Y10F/M18V/S99G/Q138R/T203A	70	0,0	412	3,1
PD–L1 WT (IgV+IgC) Fc	3121	1,0	134	1,0
CTLA4–Fc	59	N/A	199670	N/A
mAb против PD1	31482	N/A	134	N/A
Контрольный Fc	59	N/A	132	N/A

ТАБЛИЦА 22C. Дополнительные молекулы, содержащие подвергнутый аффинному созреванию домен IgSF

Мутации PD–L1	**Мутации PD–L1**
N45D	N45D/G102D/R194W/R195G
K160M/R195G	N45D/G52V/Q121L/P198S
N45D/K144E	N45D/I148V/R195G/N201D
N45D/P198S	N45D/K111T/T183A/I188V
N45D/P198T	N45D/Q89R/F189S/P198S
N45D/R195G	N45D/S99G/C137R/V207A

N45D/R195S	N45D/T163I/K167R/R195G
N45D/S131F	N45D/T183A/T192S/R194G
N45D/V58D	N45D/V50A/I119T/K144E
V129D/R195S	T19A/N45D/K144E/R195G
I98T/F173Y/L196S	V11E/N45D/T130A/P198T
N45D/E134G/L213P	V26A/N45D/T163I/T185A
N45D/F173I/S177C	K23N/N45D/L124S/K167T/R195G
N45D/I148V/R195G	K23N/N45D/Q73R/T163I
N45D/K111T/R195G	K28E/N45D/W149R/S158G/P198T
N45D/N113Y/R195S	K28R/N45D/K57E/I98V/R195S
N45D/N165Y/E170G	K28R/N45D/V129D/T163N/R195T
N45D/Q89R/I98V	M41K/D43G/N45D/R64S/R195G
N45D/S131F/P198S	M41K/D43G/N45D/R64S/S99G
N45D/S75P/P198S	N45D/R68L/F173L/D197G/P198S
N45D/V50A/R195T	N45D/V50A/I148V/R195G/N201D
E27D/N45D/T183A/I188V	M41K/D43G/K44E/N45D/R195G/N201D
F173Y/T183I/L196S/T203A	N45D/V50A/L124S/K144E/L179P/R195G
K23N/N45D/S75P/N120S	

ТАБЛИЦА 23A: Вариант PD–L2, подвергнутый селекции против PD–1. Последовательность молекул и данные о связывании.

Мутации PD–L2	**Связывание с клетками Jurkat/PD–1**		**Связывание с PD–1–Fc в единицах ответа при использовании Fortebio**
	MFI при 50 нМ	**Кратное повышение относительно IgV PD–L2–Fc дикого типа**	
H15Q	15998	1,63	0,007
N24D	1414	0,14	–0,039
E44D	2928	0,3	–0,006

V89D	3361	0,34	0,005
Q82R, V89D	44977	4,57	1,111
E59G, Q82R	12667	1,29	–0,028
S39I, V89D	26130	2,65	0,26
S67L, V89D	15991	1,62	0,608
S67L, I85F	529	0,05	–0,005
S67L, I86T	6833	0,69	0,141
H15Q, K65R	13497	1,37	–0,001
H15Q, Q72H, V89D	12629	1,28	0,718
H15Q, S67L, R76G	47201	4,8	0,418
H15Q, R76G, I85F	2941	0,3	–0,038
H15Q, T47A, Q82R	65174	6,62	0,194
H15Q, Q82R, V89D	49652	5,04	1,198
H15Q, C23S, I86T	830	0,08	–0,026
H15Q, S39I, I86T	1027	0,1	0,309
H15Q, R76G, I85F	1894	0,19	–0,006
E44D, V89D, W91R	614	0,06	–0,048
I13V, S67L, V89D	26200	2,66	1,42
H15Q, S67L, I86T	15952	1,62	0,988
I13V, H15Q, S67L, I86T	21570	2,19	1,391
I13V, H15Q, E44D, V89D	23958	2,43	1,399
I13V, S39I, E44D, Q82R, V89D	71423	7,26	0,697
I13V, E44D, Q82R, V89D	45191	4,59	1,283
I13V, Q72H, R76G, I86T	10429	1,06	0,733
I13V, H15Q, R76G, I85F	4736	0,48	–0,04
H15Q, S39I, R76G, V89D	Белок не продуцировался или его продуцировалось мало		
H15Q, S67L, R76G, I85F	2869	0,29	0,025
H15Q, T47A, Q72H, R76G, I86T	32103	3,26	0,512
H15Q, T47A, Q72H, R76G	16500	1,68	0,327
I13V, H15Q, T47A, Q72H, R76G	73412	7,46	0,896
H15Q, E44D, R76G, I85F	2885	0,29	–0,013

H15Q, S39I, S67L, V89D	45502	4,62	1,174
H15Q, N32D, S67L, V89D	25880	2,63	1,407
N32D, S67L, V89D	31753	3,23	1,155
H15Q, S67L, Q72H, R76G, V89D	40180	4,08	1,464
H15Q, Q72H, Q74R, R76G, I86T	4049	0,41	0,093
G28V, Q72H, R76G, I86T	5563	0,57	0,003
I13V, H15Q, S39I, E44D, S67L	63508	6,45	0,889
E44D, S67L, Q72H, Q82R, V89D	51467	5,23	1,061
H15Q, V89D	17672	1,8	0,31
H15Q, T47A	26578	2,7	0,016
I13V, H15Q, Q82R	76146	7,74	0,655
I13V, H15Q, V89D	28745	2,92	1,331
I13V, S67L, Q82R, V89D	58992	5,99	1,391
I13V, H15Q, Q82R, V89D	49523	5,03	1,419
H15Q, V31M, S67L, Q82R, V89D	67401	6,85	1,37
I13V, H15Q, T47A, Q82R	89126	9,05	0,652
I13V, H15Q, V31A, N45S, Q82R, V89D	68016	6,91	1,327
H15Q, T47A, H69L, Q82R, V89D	65598	6,66	1,44
I13V, H15Q, T47A, H69L, R76G, V89D	54340	5,52	1,719
I12V, I13V, H15Q, T47A, Q82R, V89D	61207	6,22	1,453
I13V, H15Q, R76G, D77N, Q82R, V89D	33079	3,36	0,065
I13V, H15Q, T47A, R76G, V89D	53668	5,45	1,596
I13V, H15Q, T47A, Q82R,	63320	6,43	1,418

V89D			
I13V, H15Q, T47A, Q82R, V89D	60980	6,2	1,448
I13V, H15Q, I36V, T47A, S67L, V89D	52835	5,37	1,627
H15Q, T47A, K65R, S67L, Q82R, V89D	79692	8,1	1,453
H15Q, L33P, T47A, S67L, P71S, V89D	45726	4,65	1,467
I13V, H15Q, Q72H, R76G, I86T	24450	2,48	1,355
H15Q, T47A, S67L, Q82R, V89D	67962	6,9	1,479
F2L, H15Q, D46E, T47A, Q72H, R76G, Q82R, V89D	23039	2,34	1,045
I13V, H15Q, L33F, T47A, Q82R, V89D	62254	6,32	1,379
H15Q, N24S, T47A, Q72H, R76G, V89D	32077	3,26	0,4
I13V, H15Q, E44V, T47A, Q82R, V89D	61005	6,2	1,329
H15Q, N18D, T47A, Q72H, V73A, R76G, I86T, V89D	48317	4,91	0,475
I13V, H15Q, T37A, E44D, S48C, S67L, Q82R, V89D	47605	4,84	1,255
H15Q, L33H, S67L, R76G, Q82R, V89D	62326	6,33	1,507
I13V, H15Q, T47A, Q72H, R76G, I86T	49016	4,98	1,477
H15Q, S39I, E44D, Q72H, V75G, R76G, Q82R, V89D	43713	4,44	0,646
H15Q, T47A, S67L, R76G, Q82R, V89D	71897	7,3	1,539
I13V, H15Q, T47A, S67L,	71755	7,29	1,536

Q72H, R76G, Q82R, V89D			
IgV PD–L2 дикого типа	9843	1	–0,024
Полноразмерный ECD PD–L2	2145	0,22	0,071
Полноразмерный ECD PD–L1 (R&D Systems)	23769	2,41	1,263
Моноклональное антитело против PD–1 (ниволумаб)	87002	8,84	0,899

ТАБЛИЦА 23B: Данные о биологической активности вариантов PD–L2, подвергнутых селекции против PD–1, в MLR.

Мутации PD–L2	**Уровни ИФН–гамма (пг/мл)**	**Кратное повышение относительно IgV PD–L2–Fc дикого типа**
H15Q	1817,1	1,32
N24D	1976,3	1,44
E44D	1499,4	1,09
V89D	1168,1	0,85
Q82R, V89D	1617	1,17
E59G, Q82R	1511,3	1,1
S39I, V89D	1314,5	0,95
S67L, V89D	1230,1	0,89
S67L, I85F	1281,9	0,93
S67L, I86T	1020,4	0,74
H15Q, K65R	1510,8	1,1
H15Q, Q72H, V89D	1272,2	0,92
H15Q, S67L, R76G	1426,2	1,04
H15Q, R76G, I85F	1725,7	1,25
H15Q, T47A, Q82R	1317,9	0,96
H15Q, Q82R, V89D	1081,2	0,79
H15Q, C23S, I86T	1847,2	1,34
H15Q, S39I, I86T	1415,2	1,03
H15Q, R76G, I85F	1437,8	1,04
E44D, V89D, W91R	1560,1	1,13
I13V, S67L, V89D	867,5	0,63

H15Q, S67L, I86T	1034,2	0,75
I13V, H15Q, S67L, I86T	1014,4	0,74
I13V, H15Q, E44D, V89D	1384,2	1,01
I13V, S39I, E44D, Q82R, V89D	935,6	0,68
I13V, E44D, Q82R, V89D	1009,5	0,73
I13V, Q72H, R76G, I86T	1953	1,42
I13V, H15Q, R76G, I85F	1528,5	1,11
H15Q, S67L, R76G, I85F	1318,7	0,96
H15Q, T47A, Q72H, R76G, I86T	1599,6	1,16
H15Q, T47A, Q72H, R76G	1462,5	1,06
I13V, H15Q, T47A, Q72H, R76G	1469,8	1,07
H15Q, E44D, R76G, I85F	1391,6	1,01
H15Q, S39I, S67L, V89D	1227	0,89
H15Q, N32D, S67L, V89D	1285,7	0,93
N32D, S67L, V89D	1194	0,87
H15Q, S67L, Q72H, R76G, V89D	1061,2	0,77
H15Q, Q72H, Q74R, R76G, I86T	933,8	0,68
G28V, Q72H, R76G, I86T	1781,6	1,29
I13V, H15Q, S39I, E44D, S67L	1256,9	0,91
E44D, S67L, Q72H, Q82R, V89D	1281,4	0,93
H15Q, V89D	1495,4	1,09
H15Q, T47A	1637,2	1,19
I13V, H15Q, Q82R	1432,9	1,04
I13V, H15Q, V89D	1123	0,82
I13V, S67L, Q82R, V89D	1372,8	1
I13V, H15Q, Q82R, V89D	1596,6	1,16
H15Q, V31M, S67L, Q82R, V89D	1206,5	0,88
I13V, H15Q, T47A, Q82R	1703,3	1,24
I13V, H15Q, V31A, N45S, Q82R, V89D	1723,1	1,25
H15Q, T47A, H69L, Q82R,	1732,5	1,26

V89D		
I13V, H15Q, T47A, H69L, R76G, V89D	1075,5	0,78
I12V, I13V, H15Q, T47A, Q82R, V89D	1533,2	1,11
I13V, H15Q, R76G, D77N, Q82R, V89D	1187,9	0,86
I13V, H15Q, T47A, R76G, V89D	1253,7	0,91
I13V, H15Q, T47A, Q82R, V89D	1445,5	1,05
I13V, H15Q, T47A, Q82R, V89D	1737	1,26
I13V, H15Q, I36V, T47A, S67L, V89D	1357,4	0,99
H15Q, T47A, K65R, S67L, Q82R, V89D	1335,3	0,97
H15Q, L33P, T47A, S67L, P71S, V89D	1289,1	0,94
I13V, H15Q, Q72H, R76G, I86T	1221	0,89
H15Q, T47A, S67L, Q82R, V89D	1197,1	0,87
F2L, H15Q, D46E, T47A, Q72H, R76G, Q82R, V89D	1170,7	0,85
I13V, H15Q, L33F, T47A, Q82R, V89D	1468,4	1,07
I13V, H15Q, T47A, E58G, S67L, Q82R, V89D	836,1	0,61
H15Q, N24S, T47A, Q72H, R76G, V89D	1091,8	0,79
I13V, H15Q, E44V, T47A, Q82R, V89D	1270,5	0,92
H15Q, N18D, T47A, Q72H, V73A, R76G, I86T, V89D	1065,8	0,77
I13V, H15Q, T37A, E44D, S48C, S67L, Q82R, V89D	1751,7	1,27
H15Q, L33H, S67L, R76G,	1502	1,09

Q82R, V89D		
I13V, H15Q, T47A, Q72H, R76G, I86T	1088,1	0,79
H15Q, S39I, E44D, Q72H, V75G, R76G, Q82R, V89D	940,9	0,68
H15Q, T47A, S67L, R76G, Q82R, V89D	1097,8	0,8
I13V, H15Q, T47A, S67L, Q72H, R76G, Q82R, V89D	1559,6	1,13
IgV PD–L2 дикого типа	1376,8	1
Полноразмерный ECD PD–L2	1173,2	0,85
Полноразмерный ECD PD–L1	2190,9	1,59
Ниволумаб (антитело против PD–1)	418,9	0,3

ПРИМЕР 18

Цитотоксичность в отношении трансдуцированных с использованием HuPD–L1 опухолевых клеток MC38 по сравнению с антителом против PD–L1

[0684] В этом примере описывают оценку цитотоксичности in vitro трансдуцированных с использованием huPD–L1 опухолевых клеток MC38. Опухолевые клетки MC38, нетрансдуцированные или трансдуцированные с использованием huPD–L1, обрабатывали митомицином–C и высевали с пан–T–клетками человека, мечеными CFSE, в соотношении 1:5. Вариант IgV CD80–Fc, содержащий E35D/M47I/L70M (SEQ ID NO: 125) с Fc IgG1 WT или неактивным Fc, добавляли к опухолевым клеткам MC38 в концентрации 100 нМ или 10 нМ и культивировали с клетками в течение 72 часов. В качестве контроля также анализировали пример антитела против PD–1 ниволумаб или только контрольным Fc (неактивным). Затем клетки собирали и окашивали витальным красителем 7–AAD. После анализа образцов с помощью проточного цитометра вычисляли процентную долю погибших клеток с использованием анализа Flowjo посредством гейтирования 7–AAD+ клеток по CFSE–. Как показано на фиг. 18, наблюдали повышенную цитотоксичность против трансдуцированных с использованием huPD–L1 опухолевых клеток MC38, но не нетрансдуцированных родительских клеток MC38, при использовании примеров анализируемых молекул вариантов IgV CD80–Fc. В этом анализе цитотоксическую активность не наблюдали в присутствии контрольного антитела против PD–1, что свидетельствует о том, что молекулы вариантов IgV CD80–Fc демонстрируют улучшенную активность по сравнению с контрольным антителом против PD–1.

ПРИМЕР 19

Связывание варианта CD80 с первичными T–клетками и моноцитами человека

[0685] Анализировали связывание примеров молекул вариантов IgV CD80–Fc с

первичными CD28+ CD4 Т–клетками человека и PD–L1+ моноцитами человека. Анализируемые примеры молекул вариантов IgV CD80–Fc включали E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276), E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280) и E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E (SEQ ID NO: 2284).

[0686] Неактивированные пан–Т–клетки человека инкубировали с различными концентрациями варианта IgV CD80–Fc, а затем окрашивали с использованием антител против CD4, против CD8 и против IgG человека для детекции Fc–части IgV CD80–Fc. В качестве контроля также анализировали связывание IgV CD80–Fc дикого типа, только Fc отрицательного контроля и CD28–связывающего vIgD ICOSL–Fc. Связывание анализировали посредством проточной цитометрии и определяли MFI с использованием программного обеспечения Flowjo. Как показано на фиг. 19A, тестируемые молекулы вариантов IgV CD80–Fc проявляли дифференциальное связывание с первичными Т–клетками человека, которое, в некоторых случаях, было выше, чем у IgV CD80–Fc дикого типа.

[0687] Для связывания с экспрессируемым моноцитами PD–L1 человека PBMC человека высевали на ночь в присутствии антител против CD3 и против CD28. Клетки собирали на следующий день, инкубировали с различными концентрациями варианта IgV CD80–Fc или контрольного антитела против PD–L1 (дурвалумаба), а затем окрашивали с использованием антитела против CD14 для идентификации моноцитов и антитела против IgG человека для детекции Fc–части молекул IgV CD80. Связывание анализировали посредством проточной цитометрии и определяли MFI с использованием программного обеспечения Flowjo. Как показано на фиг. 19B, все тестируемые молекулы вариантов IgV CD80–Fc проявляли, по существу, более высокое связывание с первичными моноцитами человека, чем IgV CD80–Fc дикого типа.

ПРИМЕР 20

Антагонизм варианта IgV CD80–Fc в отношении PD–L1–опосредованного рекрутирования PD–1 SHP2

[0688] В этом примере описывают анализ передачи сигнала Jurkat/PD–1/SHP2 для оценки эффекта молекул вариантов IgV CD80–Fc для антагонизма в отношении рекрутирования цитоплазматического белка тирозинфосфотазы SHP–2 к PD–1 посредством блокирования взаимодействия PD–L1/PD–1. В примере анализа использовали линию клеток Jurkat, содержащую рецептор PD–1, меченый донорным фрагментом (ED) рекомбинантной β–галактозидазы (β–gal), и домен SHP–2, меченый ферментативным акцептором (EA) (например, DiscoverX, USA; кат. № 93–1106C19). В анализе рекрутирование SHP–2 к PD–1 приводит к тому, что EA и ED находятся в непосредственной близости, что делает возможной комплементацию двух фрагментов фермента с образованием функционального фермента бета–Gal, гидролизующего субстрат, что приводит к генерации хемилюминесцентного сигнала.

[0689] K562/OKT3/PD–L1 aAPC предварительно инкубировали с различными концентрациями примеров вариантов IgV CD80–Fc (неактивного) в течение 30 минут. Анализируемые примеры молекул вариантов IgV CD80–Fc включали H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276), E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280) и E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E (SEQ ID NO: 2284). В качестве контроля также анализировали IgV CD80–Fc дикого типа (неактивного), антитело против PD–L1 и контрольный Fc в отдельности (неактивный). Добавляли клетки Jurkat/PD–1/SHP2 (линия DiscoverX Pathhunter Enzyme Complementation Fragment Recruitment) и инкубировали в течение 2 часов. В лунки добавляли субстрат бета–Gal (реагент для детекции DiscoverX Bioassay Detection reagent), инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте и измеряли активность люциферазы с помощью спектрофотометр для чтения микропланшетов (BioTek Cytation).

[0690] Как показано на фиг. 20, примеры молекул вариантов IgV CD80–Fc снижали активность люциферазы, что соответствует наблюдению о том, что молекулы вариантов IgV CD80–Fc демонстрируют мощную антагонистическую активность в отношении PD–L1–опосредованного рекрутирования PD–1 SHP2. Мощную антагонистическую активность также наблюдали при использовании антитела против PD–L1 положительного контроля, но молекула IgV CD80–Fc дикого типа не проявляла антагонистическую активность в отношении PD–1/PD–L1, о чем свидетельствует отсутствие снижения сигнала люциферазы, определяемого в присутствии молекулы IgV CD80–Fc дикого типа.

ПРИМЕР 21

Антагонизм варианта CD80 в отношении связывания B7/CTLA–4

[0691] Для анализа способности vIgD CD80–Fc антагонистически действовать на взаимодействие CTLA–4 и B7, клетки CHO, стабильно экспрессирующие CTLA–4 человека на своей поверхности, высевали с титрованием E35D/M47V/N48K/V68M/K89N (SEQ ID NO: 2250), H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G (SEQ ID NO: 2275), H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G (SEQ ID NO: 2276) E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D (SEQ ID NO: 2280), или vIgD CD80–Fc дикого типа, или антитела против CTLA–4 (ипилимумаба) в качестве положительного контроля. После промывания клетки инкубировали с 25 нМ конъюгированного с флуорохромом CD80–Fc дикого типа. Связанный флуоресцентно меченый конкурентный белок определяли и измеряли посредством проточной цитометрии. Как показано на фиг. 21, все варианты vIgD CD80–Fc, но не CD80–Fc дикого типа, антагонистически действовали на связывание CD80 с CTLA–4.

[0692] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными описанными вариантами осуществления, представленными, например, для иллюстрирования различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов будут очевидны из описания и идеи, представленных в настоящем описании. Такие изменения можно осуществлять на практике без отклонения от объема и сущности

изобретения, и они предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 35, 46, 71, 7, 23, 26, 30, 34, 51, 55, 57, 58, 65, 73, 78, 79, 82 или 84 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2, где вариант полипептида CD80 содержит до 14 модификаций аминокислот.

2. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 35, 46, 71, 7, 23, 26, 30, 34, 51, 55, 57, 58, 65, 73, 78, 79, 82 или 84 относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

3. Вариант полипептида CD80 по п.1 или 2, где полипептид CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот, соответствующих одному или более из положений 26, 35, 46, 57 или 71 относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

4. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих E7D, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, T28Y, I30F, I30T, I30V, Y31C, Y31S, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54E, K54N, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, N63A, N63D, L65P, I67L, I67V, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73H, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87Q, E88V, D90P, F92S, F92V, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M или L97Q относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2, где вариант полипептида CD80 содержит до 14 модификаций аминокислот.

5. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте,

соответствующие E7D, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18T, H18V, V20A, V20I, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, T28Y, I30F, I30T, I30V, Y31C, Y31S, Q33E, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, E35G, K36R, T41S, M42I, M42V, M43L, M43T, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47V, M47Y, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54E, K54N, K54R, N55D, N55I, T57A, T57I, I58V, I61F, I61V, T62A, T62N, N63A, N63D, L65P, I67L, I67V, V68E, V68I, V68L, I69F, L70M, A71D, A71G, L72V, R73H, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87Q, E88V, D90P, F92S, F92V, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95V, L97M или L97Q относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

6. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–5, где вариант полипептида CD80 содержит:

модификацию аминокислоты A26E;

модификацию аминокислоты E35D;

модификацию аминокислоты D46E;

модификацию аминокислоты D46V; или

модификацию аминокислоты A71G.

7. Вариант полипептида CD80 по п.4 или 5, где варианты полипептидов CD80 содержат модификацию аминокислоты M47L.

8. Вариант полипептида CD80, содержащий IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент, IgC–домен или его специфически связывающийся фрагмент, или и то, и другое, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот, выбранные из I30F/L70P, Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/L70P/E77G, T57A/I69T, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, A71D, E81K/A91S, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, V22L/E35G/A71D/L72P, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, Q27H/E35G/A71D/L72P/T79I, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, Q27L/E35D/M47I/T57I/L70Q/E88D, M47V/I69F/A71D/V83I, E35D/T57A/A71D/L85Q, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, H18Y/A71D/L72P/E88V, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, A12T/E24D/E35D/D46V/I61V/L72P/E95V,

V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, E35G/K54E/A71D/L72P, L70Q/A71D, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, V22A/E35D/V68E/A71D, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, R29H/E35D/M43V/M47I/I49V, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, I30V/Y31C/E35D/M47V/A71G/L85M, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/D46E/M47V/A71D, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/M47V/T62A/A71D/K93E, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, E35D/M42V/M47V/E52D/L85Q, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, E35D/A71D/L72V/R73H/E81K, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q,

E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, и T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E35D/M47L/L70M, E35D/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V68M/E88D, E35D/D46V/M47L/V68M/D90G, E35D/D46V/M47L/V68M/K89N, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/V68M, E35D/D46V/M47L/V70M, E35D/D46V/M47L/V70M/L85Q, E35D/M47V/N48K/V68M, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M,

T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, E35D/D46V, E35D/V68M, E35D/L85Q, D46V/M47L, D46V/V68M, D46V/L85Q, M47L/V68M, M47L/L85Q, V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L, E35D/D46V/V68M, E35D/D46V/L85Q, E35D/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M, D46V/M47L/L85Q, D46V/V68M/L85Q, M47L/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47L/L85Q, E35D/D46V/V68M/L85Q, E35D/M47L/V68M/L85Q, D46V/M47L/V68M/L85Q, E35D/N48K, E35D/K89N, M47V/N48K, M47V/V68M, M47V/K89N, N48K/V68M, N48K/K89N, E35D/M47V/N48K, E35D/M47V/V68M, E35D/M47V/K89N, E35D/N48K/V68M, E35D/N48K/K89N, E35D/V68M/K89N, M47V/N48K/V68M, M47V/N48K/K89N, M47V/V68M/K89N, N48K/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/K89N, E35D/M47V/V68M/K89N, E35D/N48K/V68M/K89N, M47V/N48K/V68M/K89N, E35D/D46V/M47V/N48K/V68M, E35D/D46V/M47V/V68M/L85Q, E35D/D46V/M47V/V68M/K89N, E35D/M47V/N48K/V68M/L85Q, E35D/M47V/V68M/L85Q/K89N, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M, A26E/M47L/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/A71G/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/V68M/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/D90G, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/A71G/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/D90G, H18Y/A26E/M47L/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M/D90G, H18Y/A26E/E35D/V68M/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/A71G, M47L/V68M/A71G/D90G, H18Y/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26E/A71G/D90G, H18Y/A26E/E35D/D90G, H18Y/A26E/E35D/M47L, E35D/V68M/A71G/D90G, E35D/M47L/A71G/D90G, E35D/M47L/V68M/D90G, E35D/M47L/V68M/A71G, A26E/V68M/A71G/D90G, A26E/M47L/A71G/D90G, A26E/M47L/V68M/D90G, A26E/M47L/V68M/A71G, A26E/E35D/A71G/D90G, A26E/E35D/V68M/D90G, A26E/E35D/V68M/A71G, A26E/E35D/M47L/D90G, A26E/E35D/M47L/V68M, H18Y/M47L/A71G/D90G, H18Y/M47L/V68M/D90G, H18Y/M47L/V68M/A71G, H18Y/E35D/A71G/D90G, H18Y/E35D/V68M/D90G, H18Y/E35D/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/D90G, H18Y/E35D/M47L/A71G, H18Y/E35D/M47L/V68M, H18Y/A26E/V68M/D90G, H18Y/A26E/V68M/A71G, H18Y/A26E/M47L/D90G, H18Y/A26E/M47L/A71G, H18Y/A26E/M47L/V68M, H18Y/A26E/E35D/A71G, H18Y/A26E/E35D/V68M,

H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P и H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2.

9. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–8, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/E35D, E35D/D46E, E35D/D46V, E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/M47V, E35D/V68M, E35D/L85M, E35D/L85Q, D46E/M47I, D46E/M47L, D46E/M47V, D46V/M47I, D46V/M47L, D46V/M47L, D46E/V68M, D46V/V68M, H18Y/M47I, H18Y/M47L, H18Y/M47V, M47I/V68M, M47L/V68M или M47V/V68M, M47I/E85M, M47L/E85M, M47V/E85M, M47I/E85Q, M47L/E85Q или M47V/E85Q.

10. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–9, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/M47V или E35D/V68M.

11. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–10, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/M47L/V68M или E35D/M47V/V68M.

12. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–11, где вариант CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 человека по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1 человека.

13. Вариант полипептида CD80 по п.12, где аффинность повышена более чем в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 80 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 400 раз или 450 раз по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

14. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–13, где вариант полипептида

CD80 содержит модификации аминокислот Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, M47V/I69F/A71D/V83I, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q, Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q' E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q,

H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L, E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V,

H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P или H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2.

15. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–9 и 11–13, где модификации аминокислот включают E35D/M47I/L70M.

16. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–13, где модификации аминокислот включают E35D/M47V/N48K/V68M/K89N.

17. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–13, где модификации аминокислот включают H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G.

18. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–13, где модификации аминокислот включают E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E.

19. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.4–13, где модификации

аминокислот включают E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D.

20. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–19, где немодифицированный CD80 содержит (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2; или (iii) является частью (i) или (ii), содержащей IgV–домен или его специфически связывающиеся фрагменты.

21. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–19, где вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

22. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–21, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью варианта полипептида CD80.

23. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–22, где вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 модификаций аминокислот.

24. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–23, содержащий:

аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507 или 2930–2960, или ее специфически связывающийся фрагмент, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 3–75, 2009–2104, 2297–2507 или 2930–2960 или ее специфически связывающемуся фрагменту и содержащую одну или более модификаций аминокислот; или

аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929 или 2961–3022 или ее специфически связывающийся фрагмент, аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 77–149, 151–223, 2105–2296, 2508–2929 или 2961–3022 или ее специфически связывающемуся фрагменту и содержащую одну или более модификаций аминокислот.

25. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–24, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 199, 208, 2250, 2276, 2280 или 2284.

26. Вариант полипептида CD80 по любому из вариантов осуществления 1–25, где:

в варианте полипептида CD80 отсутствует трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен CD80; и/или

вариант полипептида CD80 не может экспрессироваться на поверхности клетки.

27. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–26, где вариант полипептида CD80 соединяют с функциональным фрагментом, повышающим биологическое время полужизни полипептида.

28. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–27, где вариант полипептида CD80 соединяют с доменом мультимеризации.

29. Вариант полипептида CD80 по п.28, где домен мультимеризации является Fc–доменом или вариантом Fc–домена со сниженной эффекторной функцией.

30. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–29, являющийся трансмембранным иммуномодулирующим белком, где вариант полипептида CD80 дополнительно содержит трансмембранный домен и/или цитоплазматический сигнальный домен.

31. Иммуномодулирующий белок, где иммуномодулирующий белок является мультимером, содержащим первый вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–29, соединенный с первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–29, соединенный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй варианты полипептида CD80.

32. Иммуномодулирующий белок по п.31, где мультимер является димером, необязательно, гомодимером.

33. Иммуномодулирующий белок по п.31 или 32, где первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми.

34. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–33, где домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc–область иммуноглобулина, необязательно, где иммуноглобулиновый белок принадлежит человеку, и/или Fc–область принадлежит человеку.

35. Иммуномодулирующий белок по п.34, где Fc–область получают из иммуноглобулина G1 (IgG1) или иммуноглобулина G2 (IgG2).

36. Иммуномодулирующий белок по п.34 или 35, где Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций.

37. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–36, где иммуномодулирующий белок демонстрирует Fc–зависимую костимуляцию CD28.

38. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–34, где Fc–область является вариантом Fc–области, содержащим одну или более замен аминокислот в Fc–области дикого типа, демонстрирующим одну или более эффекторных функций, сниженных по сравнению с Fc–областью дикого типа, необязательно, где Fc человека дикого типа получают из IgG1 человека.

39. Иммуномодулирующий белок по п.38, где Fc–область содержит замену аминокислоты N297G, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

40. Иммуномодулирующий белок по п.38, где Fc–область содержит замены аминокислот R292C/N297G/V302C, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

41. Иммуномодулирующий белок по п.38, где Fc–область содержит замены аминокислот L234A/L235E/G237A, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

42. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.39–41, где вариант Fc–области дополнительно содержит замену аминокислоты C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

43. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.38–42, где Fc–область содержит K447del, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

44. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.38–43, содержащий вариант полипептида CD80 по любому из пп.12–29.

45. Иммуномодулирующий белок по любому из пп.38–44, где иммуномодулирующий белок демонстрирует PD–L1–зависимую костимуляцию CD28.

46. Иммуномодулирующий белок, содержащий вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–29, соединенный, прямо или косвенно через линкер, со вторым полипептидом, содержащим домен члена суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF).

47. Иммуномодулирующий белок по п.46, где домен IgSF является аффинно–модифицированным доменом IgSF, содержащим одну или более модификаций аминокислот по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа члена семейства IgSF.

48. Иммуномодулирующий белок по п.47, где домен IgSF является аффинно–модифицированным доменом IgSF, демонстрирующим повышенное связывание с одним или более из когнатных партнеров по связыванию по сравнению со связыванием немодифицированного домена IgSF или домена IgSF дикого типа члена семейства IgSF с теми же одним или более когнатными партнерами по связыванию.

49. Конъюгат, содержащий вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–29, соединенный с направляющим функциональным фрагментом, специфически связывающимся с молекулой на поверхности клетки.

50. Конъюгат по п.49, где клетка является иммунной клеткой или опухолевой клеткой.

51. Конъюгат по п.49 или 50, где функциональный фрагмент является белком, пептидом, нуклеиновой кислотой, низкомолекулярным соединением или наночастицей.

52. Конъюгат по любому из пп.49–51, где функциональный фрагмент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

53. Конъюгат по любому из пп.50–52, являющийся слитым белком.

54. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30, иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–48 или конъюгат, являющийся слитым белком по любому из пп.49–53

55. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.54.

56. Вектор по п.55, являющийся экспрессирующим вектором.

57. Клетка, содержащая вектор по п.55 или 56.

58. Способ получения варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка, включающий встраивание молекулы нуклеиновой кислоты по п.54 или вектора по п.55 или 56 в клетку–хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке.

59. Способ по п.58, дополнительно включающий выделение или очистку варианта полипептида CD80 или иммуномодулирующего белка из клетки.

60. Способ конструирования клетки, экспрессирующей вариант полипептида CD80, включающий встраивание молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30, в клетку–хозяина в условиях, в которых полипептид экспрессируется в клетке.

61. Сконструированная клетка, содержащая вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30, иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–48, конъюгат, являющийся слитым белком по любому из пп.49–53, молекулу нуклеиновой кислоты по п.54 или вектор по п.55 или 56.

62. Сконструированная клетка по п.61, где:

вариант полипептида CD80 не содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки; и/или

вариант полипептида CD80 может секретироваться сконструированной клеткой при экспрессии.

63. Сконструированная клетка по п.61, где:

вариант полипептида CD80 содержит трансмембранный домен или является трансмембранным иммуномодулирующим белком по п.29; и/или

вариант полипептида CD80 экспрессируется на поверхности клетки.

64. Сконструированная клетка по любому из пп.61–63, где клетка является иммунной клеткой, необязательно, антигенпрезентирующей клеткой (АПК) или лимфоцитом, необязательно, Т–клеткой.

65. Сконструированная клетка по любому из пп.61–64, где клетка дополнительно содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т–клеточный рецептор (TCR).

66. Возбудитель инфекции, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30, иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–47 или конъюгат, являющийся слитым белком по любому из пп.48–52.

67. Возбудитель инфекции по п.66, где возбудитель инфекции является бактерией или вирусом.

68. Возбудитель инфекции по п.67, где возбудитель инфекции является вирусом, и вирус является онколитическим вирусом.

69. Фармацевтическая композиция, содержащая вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30, иммуномодулирующий белок по любому из пп.31–48, конъюгат по любому из пп.49–53, сконструированную клетку по любому из пп.61–65 или возбудитель инфекции по любому из пп.66–68.

70. Фармацевтическая композиция по п.69, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

71. Фармацевтическая композиция по п.69 или 70, где фармацевтическая

композиция является стерильной.

72. Промышленное изделие, содержащее фармацевтическую композицию по любому из пп.69–71 во флаконе.

73. Промышленное изделие по п.72, где флакон запаян.

74. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп.69–71 или промышленное изделие по п.72 или 73 и инструкции по использованию.

75. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп.69–71.

76. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение иммуномодулирующего белка по любому из пп.31–48.

77. Способ по п.76, где иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком по п.37, демонстрирующим Fc–зависимую костимуляцию CD28.

78. Способ по п.74, где иммуномодулирующий белок является иммуномодулирующим белком по п.44, демонстрирующим PD–L1–зависимую костимуляцию CD28, необязательно, где иммуномодулирующий белок содержит вариант полипептида CD80 по любому из пп.12–29.

79. Способ модуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение сконструированных клеток по любому из пп.61–65.

80. Способ по п.79, где сконструированные клетки являются аутологичными для индивидуума.

81. Способ по любому из пп.75–80, где с помощью модуляции иммунного ответа лечат заболевание или состояние у индивидуума.

82. Способ по любому из пп.75–81, где иммунный ответ является повышенным.

83. Способ повышения иммунного ответа у индивидуума, включающий введение иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где иммуномодулирующий белок демонстрирует PD–L1–зависимую костимуляцию CD28.

84. Способ по п.83, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

85. Способ опосредования агонизма CD28 посредством PD–L1–зависимой костимуляции CD28 у индивидуума, включающий введение иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению

с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

86. Способ по любому из пп.83–85, предназначенный для применения в лечении заболевания или состояния.

87. Способ по любому из пп.75–86, где:

перед введением для лечения выбирают индивидуума, имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные по поверхностному PD–L1, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; или

индивидуума выбирают как имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные на поверхностный PD–L1, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками.

88. Способ по п.87, где выбор индивидуума включает: (a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с эктодоменом PD–L1;

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; и

(c) если образец опухолевой ткани содержит детектируемый уровень клеток, положительных по поверхностному PD–L1, выбор индивидуума для лечения.

89. Способ по любому из пп.75–88, где:

перед введением для лечения выбирают индивидуума, имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные по поверхностному CD28, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками; или

индивидуума выбирают как имеющего опухоль, содержащую клетки, положительные по поверхностному CD28, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками.

90. Способ по п.89, где выбор индивидуума включает:

(a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с эктодоменом CD28;

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками; и

(c) если образец опухолевой ткани содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный CD28, выбор индивидуума для лечения.

91. Способ выбора индивидуума для лечения, включающий:

(a) приведение образца опухолевой ткани индивидуума в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с PD–L1; и

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из образца опухолевой ткани, необязательно, где клетки являются опухолевыми клетками или инфильтрирующими опухоль иммунными клетками; и

(c) если образец опухоли содержит детектируемый уровень клеток, положительных на поверхностный PD–L1, выбор индивидуума для лечения с использованием иммуномодулирующего белка, содержащего вариант полипептида CD80, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

92. Способ по п.91, включающий приведение образца опухолевой ткани в контакт со связывающим реагентом, способным специфически связываться с CD28, где индивидуума выбирают, если образец опухолевой ткани дополнительно содержит детектируемый уровень инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, положительных по CD28, необязательно, где лимфоциты являются Т–клетками, необязательно, CD8+ Т–клетками.

93. Способ по любому из пп.88 и 90–92, где образец опухолевой ткани содержит инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, опухолевые клетки, стромальные клетки или любую их комбинацию.

94. Способ по п.88 и 90–93, где связывающий реагент является антителом или антигенсвязывающим фрагментом, белковым лигандом или партнером по связыванию, аптамером, аффимером, пептидом или гаптеном.

95. Способ по п.88,91, 93 или 94, где связывающий реагент является антителом против PD–L1 или антигенсвязывающим фрагментом.

96. Способ по любому из пп.88–94, где связывающий реагент содержит вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30.

97. Способ по п.96, где вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

98. Способ по п.96 или 97, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью связывающего реагента.

99. Способ по любому из пп.96–98, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с PD–L1 по сравнению с полипептидом CD80 дикого типа или немодифицированным полипептидом CD80.

100. Способ по любому из пп.88 и 90–99, где связывающий реагент соединен, прямо или косвенно, с функциональным фрагментом, являющимся детектируемым функциональным фрагментом или функциональным фрагментом, который можно подвергать детекции.

101. Способ по п.100, где функциональный фрагмент является Fc–областью.

102. Способ по п.101, где Fc–область не принадлежит человеку, но, необязательно, принадлежит мыши или кролику.

103. Способ по любому из пп.88 и 90–102, где определение наличия связанного связывающего реагента осуществляют посредством иммуногистохимии, псевдоиммуногистохимии, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии, ELISA или иммуноблоттинга.

104. Способ по любому из пп.91–103, дополнительно включающий введение индивидууму иммуномодулирующего белка.

105. Способ по любому из пп.83–104, где иммуномодулирующий белок является мультимером, содержащим первый вариант полипептида CD80, соединенный с первым доменом мультимеризации, и второй вариант полипептида CD80, соединенный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй варианты полипептида CD80.

106. Способ по п.105, где мультимер является димером.

107. Способ по п.105 или 106, где первый вариант полипептида CD80 и второй вариант полипептида CD80 являются одинаковыми.

108. Способ по любому из пп.105–107, где домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc–область.

109. Способ по п.108, где Fc–область является вариантом Fc–области, содержащим одну или более замен аминокислот по сравнению с Fc–областью дикого типа, где Fc–область демонстрирует одну или более эффекторных функций, сниженные по сравнению с Fc–областью дикого типа, необязательно, где Fc дикого типа получают из IgG1 человека.

110. Способ по любому из пп.83–109, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих положениям 7, 12, 13, 15, 16, 18, 21, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 и/или 97, относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2.

111. Способ по любому из пп.83–110, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот в немодифицированном CD80 или его специфически связывающемся фрагменте, соответствующих E7D, A12V, T13A, T13R, S15P, S15T, C16R, H18A, H18C, H18F, H18I, H18L, H18T, H18V, H18Y, V20A, V20I, S21P, V22A, V22D, V22I, V22L, E23D, E23G, E24D, L25S, A26D, A26E, A26G, A26H, A26K, A26N, A26P, A26Q, A26R, A26S, A26T, Q27H, Q27L, Q27R, T28Y, R29C, R29H, I30T, I30V, Y31H, Y31S, Q33E, Q33H, Q33K, Q33L, Q33R, K34E, E35D, K36R, K37E, M38I, M38T, M38V, T41A, T41S, M42I, M42V, M43I, M43L, M43T, M43V, S44P, D46E, D46N, D46V, M47F, M47I, M47L, M47T, M47V, M47Y, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, N48Y, P51A, Y53F, Y53H, K54R, N55D, N55I, T57I, I58V, I61F, I61N, I61V, T62A, T62N,

T62S, N63D, N64S, L65P, I67L, I67T, V68A, V68I, V68L, V68M, I69F, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, L72P, L72V, R73S, P74S, D76H, E77A, G78A, T79A, T79I, T79L, T79M, T79P, E81G, E81K, C82R, V83A, V83I, V84A, V84I, L85E, L85M, L85Q, K86E, K86M, Y87C, Y87D, Y87H, Y87N, Y87Q, E88D, E88G, K89E, K89N, D90G, D90K, D90N, D90P, A91G, A91S, A91T, A91V, F92L, F92S, F92V, F92Y, K93E, K93R, K93T, R94L, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97M, L97Q и L97R относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2.

112. Способ по любому из пп.83–110, где вариант полипептида CD80 содержит одну или более модификаций аминокислот, соответствующих одному или более из положений 13, 18, 21, 22, 24, 26, 27, 33, 35, 37, 38, 41, 43, 46, 47, 48, 53, 61, 62, 68, 70, 71, 79, 85, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 95 или 97, необязательно, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из T13A, T13R, H18L, H18Y, S21P, V22A, V22D, V22I, V22L, E24D, A26E, A26P, A26S, A26T, Q27H, Q33E, Q33H, Q33K, Q33L, Q33R, E35D, K37E, M38T, M38V, T41A, T41S, M43I, M43L, M43T, M43V, D46E, D46V, M47I, M47L, M47T, M47V, N48D, N48H, N48K, N48R, N48S, N48T, Y53F, Y53H, I61N, I61V, T62A, T62N, T62S, V68A, V68L, V68M, L70M, L70P, L70Q, L70R, A71D, A71G, T79A, T79I, T79L, T79P, L85E, L85M, L85Q, Y87H, Y87N, Y87Q, E88D, E88G, D90G, D90N, A91T, A91V, K93E, K93R, K93T, R94Q, R94W, E95D, E95K, E95V, L97M, L97Q или L97R относительно нумерации в SEQ ID NO: 2.

113. Способ по любому из пп.83–112, где одна или более модификаций аминокислот выбраны из Q27H/T41S/A71D, I30T/L70R, T13R/C16R/L70Q/A71D, T57I, M43I/C82R, V22L/M38V/M47T/A71D/L85M, I30V/T57I/L70P/A71D/A91T, V22I/L70M/A71D, N55D/K86M, L72P/T79I, L70P/F92S, T79P, E35D/M47I/L65P/D90N, L25S/E35D/M47I/D90N, S44P/I67T/P74S/E81G/E95D, A71D, T13A/I61N/A71D, E81K, A12V/M47V/L70M, K34E/T41A/L72V, T41S/A71D/V84A, E35D/A71D, E35D/M47I, K36R/G78A, Q33E/T41A, M47V/N48H, M47L/V68A, S44P/A71D, Q27H/M43I/A71D/R73S, E35D/T57I/L70Q/A71D, M47I/E88D, M42I/I61V/A71D, P51A/A71D, H18Y/M47I/T57I/A71G, V20I/M47V/T57I/V84I, V20I/M47V/A71D, A71D/L72V/E95K, E35D/A71D, E35D/I67L/A71D, T13R/M42V/M47I/A71D, E35D, E35D/M47I/L70M, E35D/A71D/L72V, E35D/M43L/L70M, A26P/E35D/M43I/L85Q/E88D, E35D/D46V/L85Q, M47V/I69F/A71D/V83I, H18Y/A26T/E35D/A71D/L85Q, E35D/M47L, E23D/M42V/M43I/I58V/L70R, V68M/L70M/A71D/E95K, N55I/T57I/I69F, E35D/M43I/A71D, T41S/T57I/L70R, V20I/A71D, E23G/A26S/E35D/T62N/A71D/L72V/L85M, V22L/E35D/M43L/A71G/D76H, A26E/E35D/M47L/L85Q, D46E/A71D, Y31H/E35D/T41S/V68L/K93R/R94W, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q/K86E, A26E/Q33R/E35D/M47L/L85Q, E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, A26E/Q33L/E35D/M47L, H18Y/A26E/Q33L/E35D/M47L/L85Q, Q33L/E35D/M47I, H18Y/Q33L/E35D/M47I, Q33L/E35D/D46E/M47I, Q33R/E35D/D46E/M47I, H18Y/E35D/M47L, Q33L/E35D/M47V, Q33L/E35D/M47V/T79A, Q33L/E35D/T41S/M47V, Q33L/E35D/M47I/L85Q,

Q33L/E35D/M47I/T62N/L85Q, Q33L/E35D/M47V/L85Q, A26E/E35D/M43T/M47L/L85Q/R94Q, Q33R/E35D/K37E/M47V/L85Q, V22A/E23D/Q33L/E35D/M47V, E24D/Q33L/E35D/M47V/K54R/L85Q, S15P/Q33L/E35D/M47L/L85Q, E7D/E35D/M47I/L97Q, Q33L/E35D/T41S/M43I, E35D/M47I/K54R/L85E, Q33K/E35D/D46V/L85Q, Y31S/E35D/M47L/T79L/E88G, H18L/V22A/E35D/M47L/N48T/L85Q, Q27H/E35D/M47L/L85Q/R94Q/E95K, Q33K/E35D/M47V/K89E/K93R, E35D/M47I/E77A/L85Q/R94W, A26E/E35D/M43I/M47L/L85Q/K86E/R94W, Q27H/Q33L/E35D/M47V/N55D/L85Q/K89N, H18Y/V20A/Q33L/E35D/M47V/Y53F, Q33L/E35D/M47L/A71G/F92S, V22A/R29H/E35D/D46E/M47I, Q33L/E35D/M43I/L85Q/R94W, H18Y/E35D/V68M/L97Q, Q33L/E35D/M47L/V68M/L85Q/E88D, Q33L/E35D/M43V/M47I/A71G, E35D/M47L/A71G/L97Q, E35D/M47V/A71G/L85M/L97Q, H18Y/Y31H/E35D/M47V/A71G/L85Q, E35D/D46E/M47V/L97Q, E35D/D46V/M47I/A71G/F92V, E35D/M47V/T62A/A71G/V83A/Y87H/L97M, Q33L/E35D/N48K/L85Q/L97Q, E35D/L85Q/K93T/E95V/L97Q, E35D/M47V/N48K/V68M/K89N, Q33L/E35D/M47I/N48D/A71G, Q27H/E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/L85Q/D90G, E35D/M47I/T62S/L85Q, A26E/E35D/M47L/A71G, E35D/M47I/Y87Q/K89E, V22A/E35D/M47I/Y87N, H18Y/A26E/E35D/M47L/L85Q/D90G, E35D/M47L/A71G/L85Q, E35D/M47V/A71G/E88D, E35D/A71G, E35D/M47V/A71G, I30V/E35D/M47V/A71G/A91V, V22D/E35D/M47L/L85Q, H18Y/E35D/N48K, E35D/T41S/M47V/A71G/K89N, E35D/M47V/N48T/L85Q, E35D/D46E/M47V/A71D/D90G, E35D/T41S/M43I/A71G/D90G, E35D/T41S/M43I/M47V/A71G, E35D/T41S/M43I/M47L/A71G, H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G, H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, E35D/K37E/M47V/N48D/L85Q/D90N, Q27H/E35D/D46V/M47L/A71G, V22L/Q27H/E35D/M47I/A71G, E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D, E35D/T41S/M43V/M47I/L70M/A71G, E35D/D46E/M47V/N63D/L85Q, E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E, E35D/M43I/M47V/K89N, E35D/M47L/A71G/L85M/F92Y, V22D/E35D/M47L/L70M/L97Q, E35D/T41S/M47V/L97Q, E35D/Y53H/A71G/D90G/L97R, Q33L/E35D/M43I/Y53F/T62S/L85Q, E35D/M38T/D46E/M47V/N48S, Q33R/E35D/M47V/N48K/L85M/F92L, и E35D/M38T/M43V/M47V/N48R/L85Q, T28Y/Q33H/E35D/D46V/M47I/A71G, E35D/N48K/L72V, E35D/T41S/N48T, D46V/M47I/A71G, M47I/A71G, E35D/M43I/M47L/L85M, E35D/M43I/D46E/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/A71G/A91S, E35D/M47I/N48K/I61F, E35D/M47V/T62S/L85Q, M43I/M47L/A71G, E35D/M47V, E35D/M47L/A71G/L85M, V22A/E35D/M47L/A71G, E35D/M47L/A71G, E35D/D46E/M47I, Q27H/E35D/M47I, E35D/D46E/L85M, E35D/D46E/A91G, E35D/D46E, E35D/L97R, H18Y/E35D, Q27L/E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/I61V/L85M, E35D/M47V/L85M/R94Q, E35D/M47V/N48K/L85M, H18Y/E35D/M47V/N48K, A26E/Q27R/E35D/M47L/N48Y/L85Q, E35D/D46E/M47L/V68M/L85Q/F92L,

E35D/M47I/T62S/L85Q/E88D, E24D/Q27R/E35D/T41S/M47V/L85Q, S15T/H18Y/E35D/M47V/T62A/N64S/A71G/L85Q/D90N, E35D/M47L/V68M/A71G/L85Q/D90G, H18Y/E35D/M47I/V68M/A71G/R94L, Q33R/M47V/T62N/A71G, H18Y/V22A/E35D/T41S/M47V/T62N/A71G/A91G, E24D/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/D46E/M47I/T62A/V68M/L85M/Y87C, E35D/D46E/M47I/V68M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/A71G/Y87C/K93R, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M, E35D/D46E/M47L/V68M/T79M/L85M/L97Q, E35D/D46E/M47V/V68M/L85Q, E35D/M43I/M47L/V68M, E35D/M47I/V68M/Y87N, E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, E35D/M47V/N48K/V68M/A71G/L85M, E35D/M47V/N48K/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M, E35D/M47V/V68M/L85M/Y87D, E35D/T41S/D46E/M47I/V68M/K93R/E95V, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/D46E/M47I/V68M/R94L, H18Y/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47I/V68M/Y87N, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/V68M/E95V/L97Q, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47L/Y53F/V68M/A71G/K93R/E95V, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/M47V/V68M/L85M, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/A71G/R94Q/E95V, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/L85M/R94Q, H18Y/E35D/V68M/T79M/L85M, H18Y/V22D/E35D/M47V/N48K/V68M, Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, R29C/E35D/M47L/V68M/A71G/L85M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M, S21P/E35D/K37E/D46E/M47I/V68M/R94L, T13R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q27L/Q33L/E35D/T41S/M47V/N48K/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33L/E35D/M47V/T62S/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/E95V/L97Q, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M, T13R/Q33R/E35D/M38I/M47L/V68M/L85M/R94Q, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M, T13R/Q33R/E35D/M47L/V68M/L85M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M, V22D/E24D/E35D/M47L/V68M/L85M/D90G, V22D/E24D/E35D/M47V/V68M, H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G, H18C/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18I/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18L/A26N/D46E/V68M/A71G/D90G, H18L/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18T/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26K/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G, H18V/A26P/E35D/M47V/V68L/A71G, H18V/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G, H18V/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G, H18Y/A26P/E35D/M47V/V68M/A71G, H18Y/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G,

H18Y/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18V/A26G/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26S/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26R/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18V/A26D/E35D/M47V/V68M/A71G/D90G, H18V/A26Q/E35D/M47V/V68L/A71G/D90G, H18A/A26P/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18A/A26N/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26P/E35D/M47I/V68M/A71G/D90G, H18F/A26H/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G, H18F/A26N/E35D/M47V/V68M/A71G/D90K, H18Y/A26N/E35D/M47F/V68M/A71G/D90G, H18Y/A26P/E35D/M47Y/V68I/A71G/D90G, H18Y/A26Q/E35D/M47T/V68M/A71G/D90G, H18R/A26P/E35D/D46N/M47V/V68M/A71G/D90P или H18F/A26D/E35D/D46E/M47T/V68M/A71G/D90G относительно нумерации положений, приведенной в SEQ ID NO: 2.

114. Способ по любому из пп.83–113, где вариант полипептида CD80 содержит:

модификацию аминокислоты H18Y;

модификацию аминокислоты A26E;

модификацию аминокислоты E35D;

модификацию аминокислоты D46E;

модификацию аминокислоты D46V;

модификацию аминокислоты M47I;

модификацию аминокислоты M47L;

модификацию аминокислоты V68M;

модификацию аминокислоты A71G;

модификацию аминокислоты L85Q или

модификацию аминокислоты D90G.

115. Способ по любому из пп.83–114, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/E35D, E35D/D46E, E35D/D46V, E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/M47V, E35D/V68M, E35D/L85M, E35D/L85Q, D46E/M47I, D46E/M47L, D46E/M47V, D46V/M47I, D46V/M47L, D46V/M47L, D46E/V68M, D46V/V68M, H18Y/M47I, H18Y/M47L, H18Y/M47V, H18Y/V68M, M47I/V68M, M47L/V68M или M47V/V68M, M47I/E85M, M47L/E85M, M47V/E85M, M47I/E85Q, M47L/E85Q или M47V/E85Q.

116. Способ по любому из пп.83–115, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/M47I, E35D/M47L, E35D/M47V или E35D/V68M.

117. Способ по любому из пп.83–116, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/M47L/V68M или E35D/M47V/V68M.

118. Способ по любому из пп.83–116, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/M47I/L70M.

119. Способ по любому из пп.83–117, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/M47V/N48K/V68M/K89N.

120. Способ по любому из пп.83–117, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G.

121. Способ по любому из пп.83–117, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E.

122. Способ по любому из пп.83–117, где вариант полипептида CD80 содержит модификации аминокислот E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D.

123. Способ по пп.83–122, где иммуномодулирующий белок является растворимым, необязательно, где в варианте полипептида CD80 отсутствует трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домены CD80.

124. Способ по любому из пп.83–123, где немодифицированный CD80 содержит (i) аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, (ii) аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 95% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2; или (iii) является частью (i) или (ii), содержащей IgV–домен или его специфически связывающиеся фрагменты.

125. Способ по любому из пп.83–124, где вариант полипептида CD80 представляет собой или содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

126. Способ по любому из пп.83–125, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью иммуномодулирующего белка.

127. Способ по любому из пп.83–126, где вариант полипептида CD80 содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 модификаций аминокислот.

128. Способ по любому из пп.83–127, где иммуномодулирующий белок является Fc–слитым белком.

129. Способ по любому из пп.81, 82 и 86–128, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или злокачественное новообразование.

130. Способ по любому из пп.75–129, где у индивидуума наблюдают рецидив после ремиссии, он становится рефрактерным или не отвечает после лечения антагонистом PD–1/PD–L1 или PD–1/PD–L2.

131. Способ по п.130, где антагонистом является антитело против PD–1, необязательно, ниволумаб или пембролизумаб.

132. Способ по любому из пп.75–81, где иммунный ответ является сниженным.

133. Способ по любому из пп.75–81 и 132, где заболевание или состояние является воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием.

134. Способ детекции партнера по связыванию CD80 в биологическом образце, включающий:

(a) приведение биологического образца в контакт со связывающим реагентом, содержащим вариант полипептида CD80 по любому из пп.1–30; и

(b) определение наличия связанного связывающего реагента в клетках или на клетках из биологического образца.

135. Способ по п.134, где партнером по связыванию является PD–L1, CD28, CTLA–4 или их комбинации.

136. Способ по п.134 или 135, где вариант полипептида CD80 содержит одну или

более модификаций аминокислот в одном или более положениях в IgV–домене, или IgC–домене, или их специфически связывающемся фрагменте из немодифицированного CD80 или его специфически связывающегося фрагмента, где вариант полипептида CD80 демонстрирует повышенную аффинность связывания с эктодоменом PD–L1 по сравнению с аффинностью связывания немодифицированного CD80 с эктодоменом PD–L1.

137. Способ по любому из пп.134–136, где биологический образец представляет собой или содержит образец физиологической жидкости, клеток или ткани.

138. Способ по п.137, где физиологическая жидкость является сывороткой, плазмой или мочой.

139. Способ по п.137, где образец ткани является образцом опухолевой ткани.

140. Способ по п.139, где образец опухолевой ткани содержит инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, опухолевые клетки, стромальные клетки или любую их комбинацию.

141. Вариант полипептида CD80 по любому из пп.134–140, где вариант полипептида CD80 содержит IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент.

142. Способ по п.141, где IgV–домен или его специфически связывающийся фрагмент является единственной CD80–частью связывающего реагента.

143. Способ по любому из пп.134–142, где связывающий реагент соединен, прямо или косвенно, с меткой, являющейся детектируемым функциональным фрагментом или функциональным фрагментом, который можно подвергать детекции.

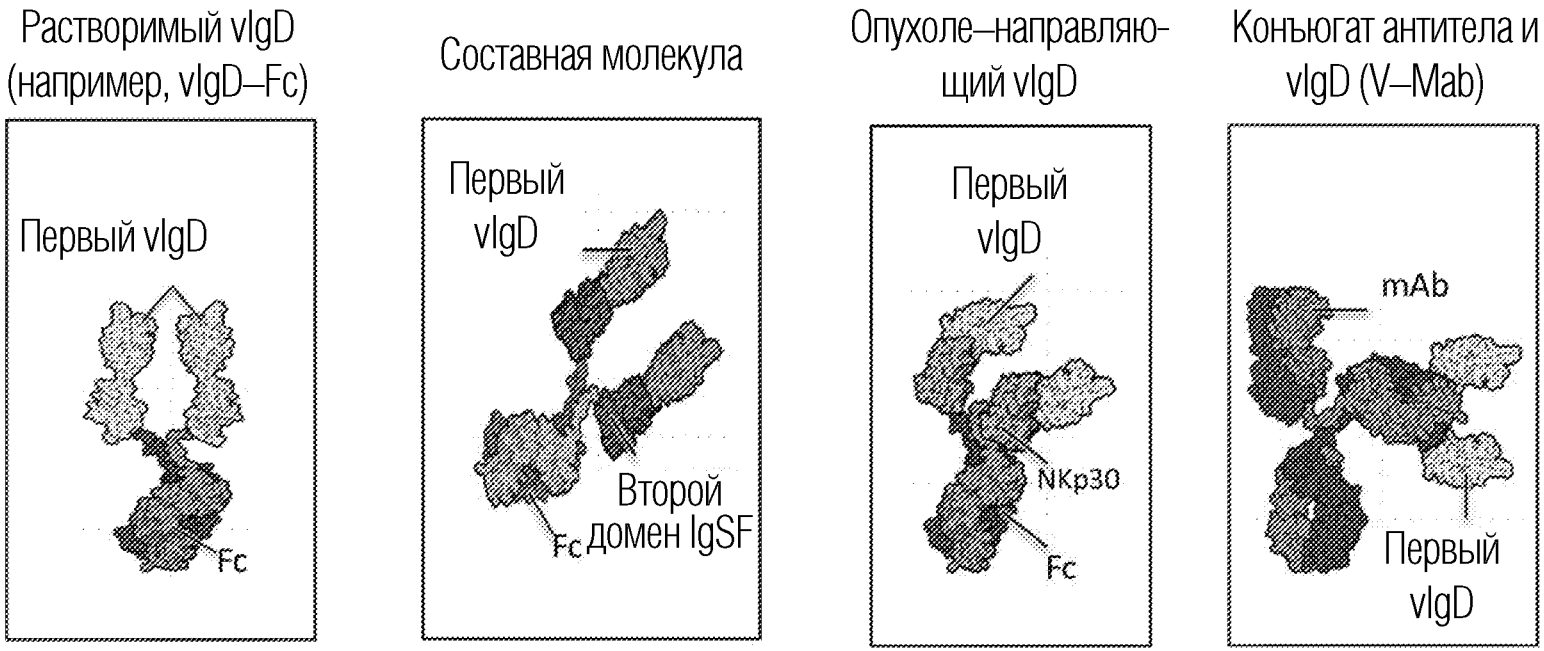
144. Способ по п.143, где функциональный фрагмент является Fc–областью.

145. Способ по п.144, где Fc–область не принадлежит человеку, но, необязательно, принадлежит мыши или кролику.

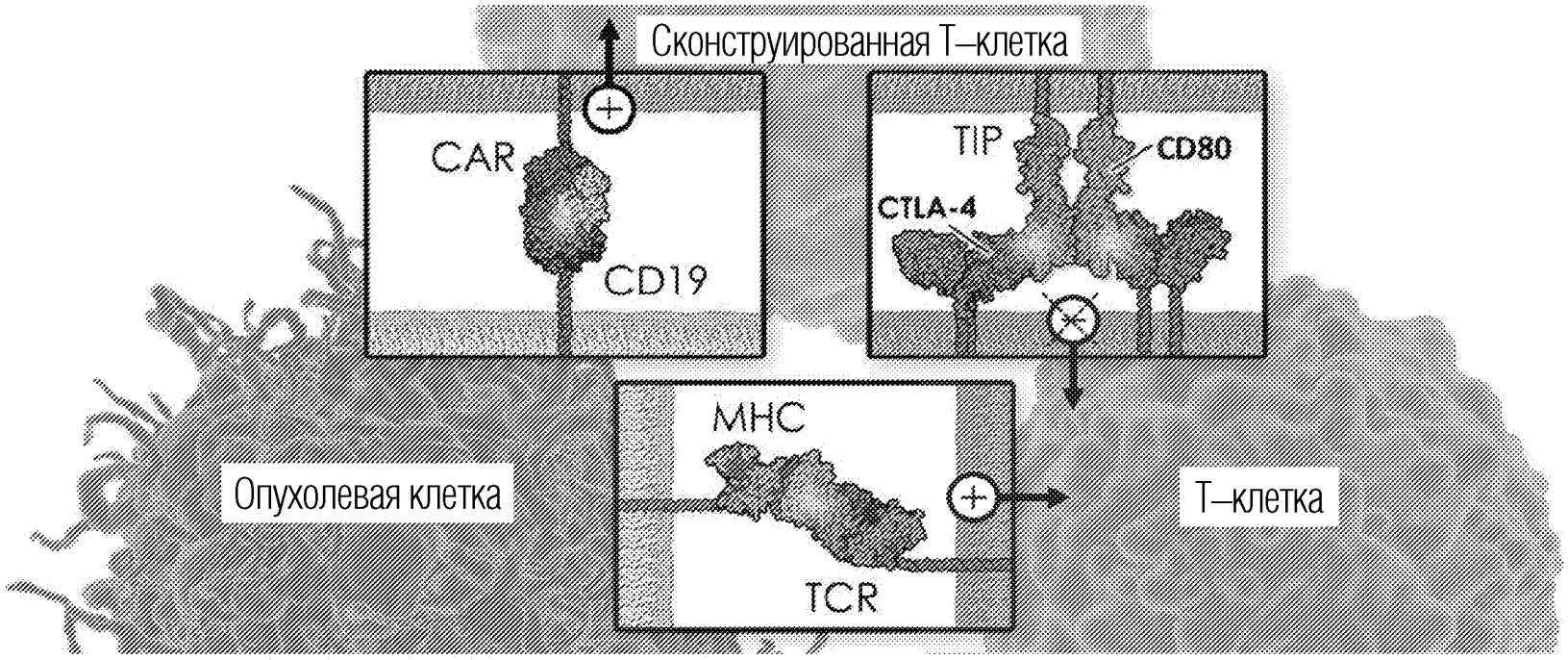
146. Способ по любому из пп.134–145, где определение наличия связанного связывающего реагента осуществляют посредством иммуногистохимии, псевдоиммуногистохимии, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии, ELISA или иммуноблоттинга.

По доверенности

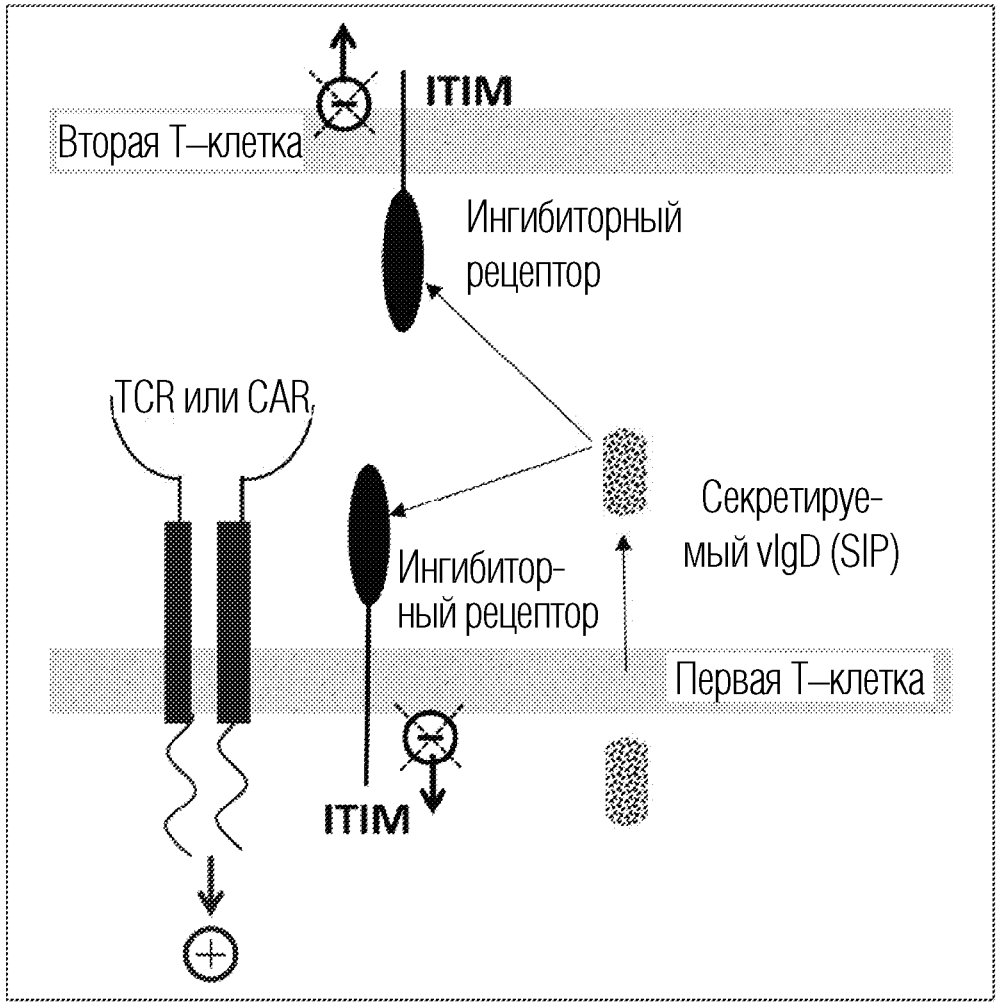
ФИГ. 1А


Растворимый vIgD
(например, vIgD–Fc)
Первый vIgD
Fc
Составная молекула
Первый
vIgD
Второй
домен IgSF
Fc
Опухоле–направляю-
щий vIgD
Первый
vIgD
NKp30
Fc
Конъюгат антитела и
vIgD (V–Mab)
mAb
Первый
vIgD

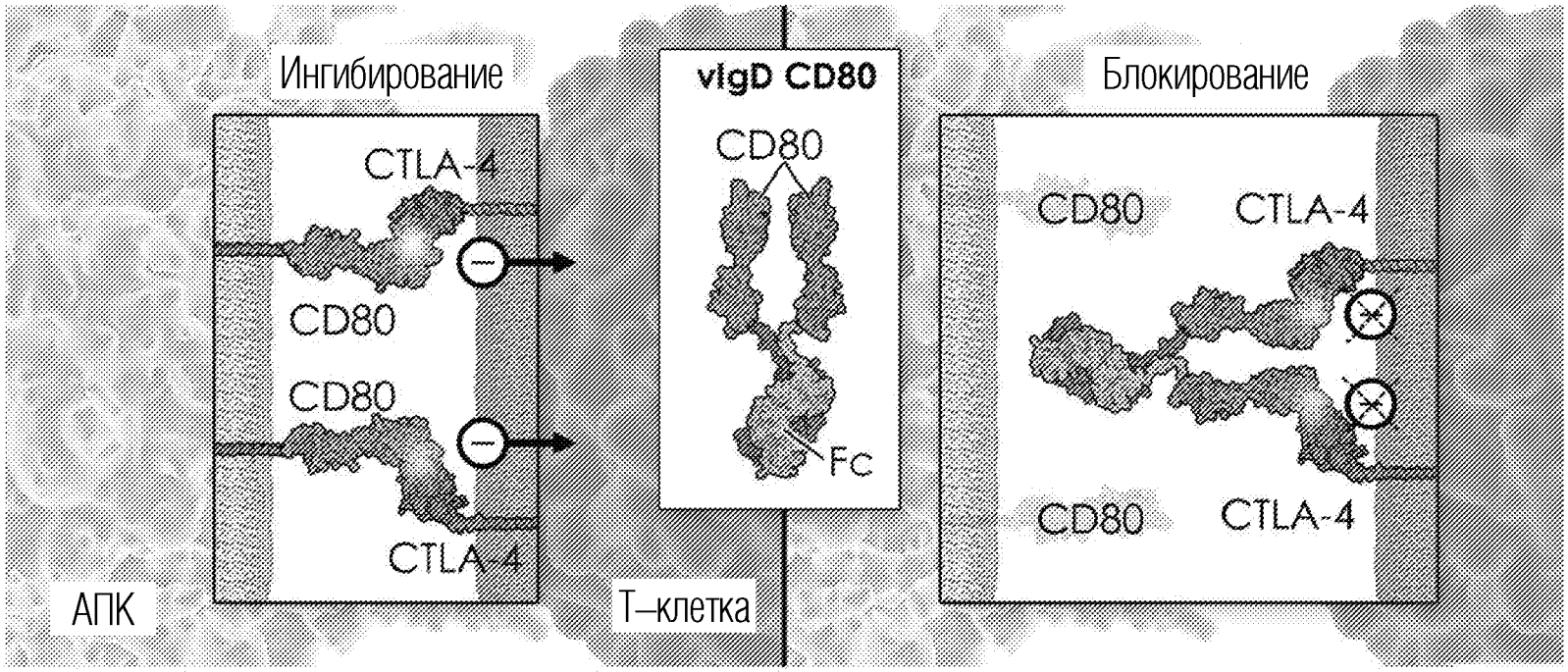
ФИГ. 1B


Сконструированная Т–клетка
CAR
CD19
TIP
CD80
CTLA-4
MHC
TCR
Опухолевая клетка
Т–клетка

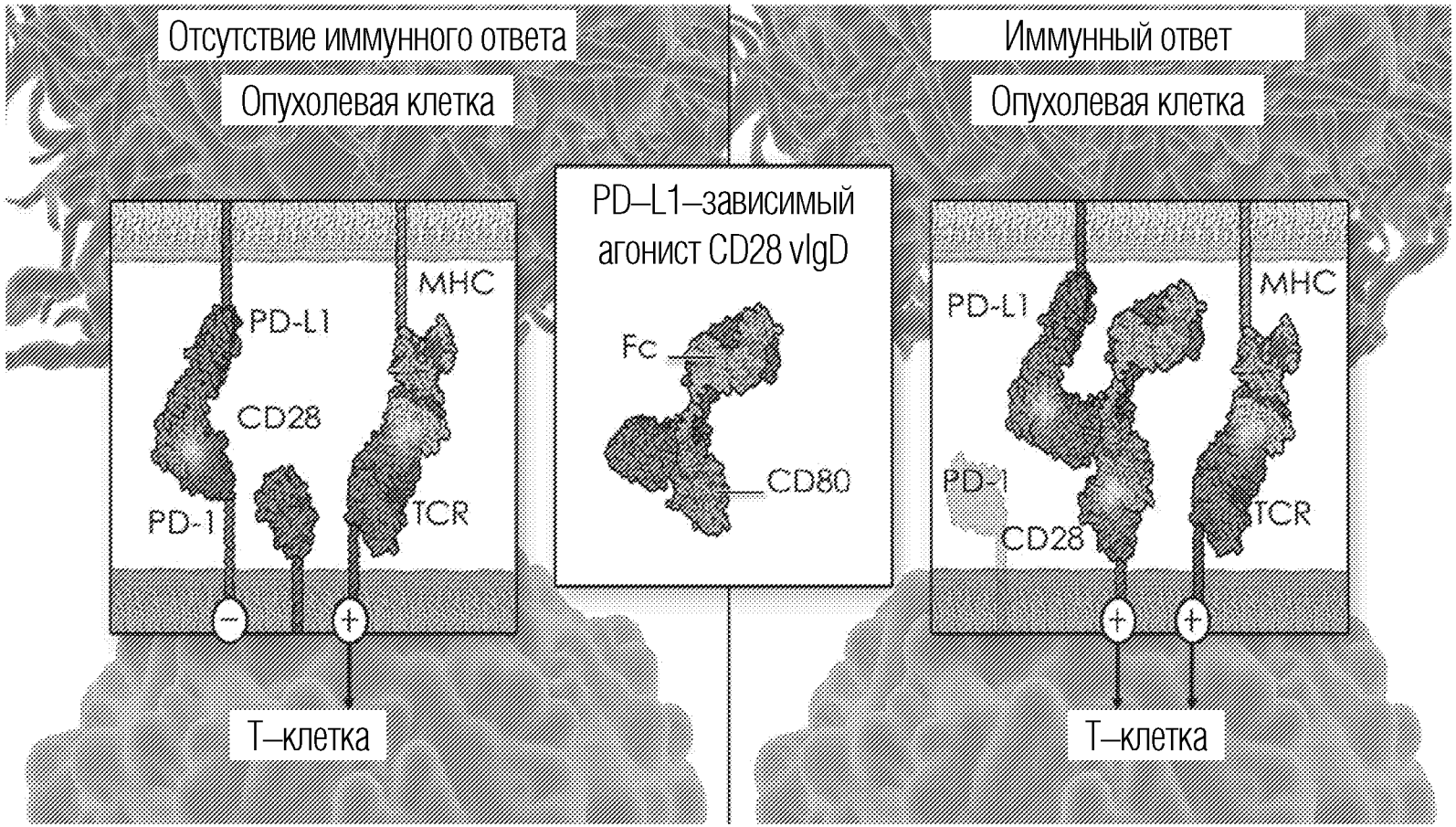
ФИГ. 1C


ITIM
Вторая Т–клетка
Ингибиторный рецептор
TCR или CAR
Секретируемый vIgD (SIP)
Ингибиторный рецептор
Первая Т–клетка
ITIM

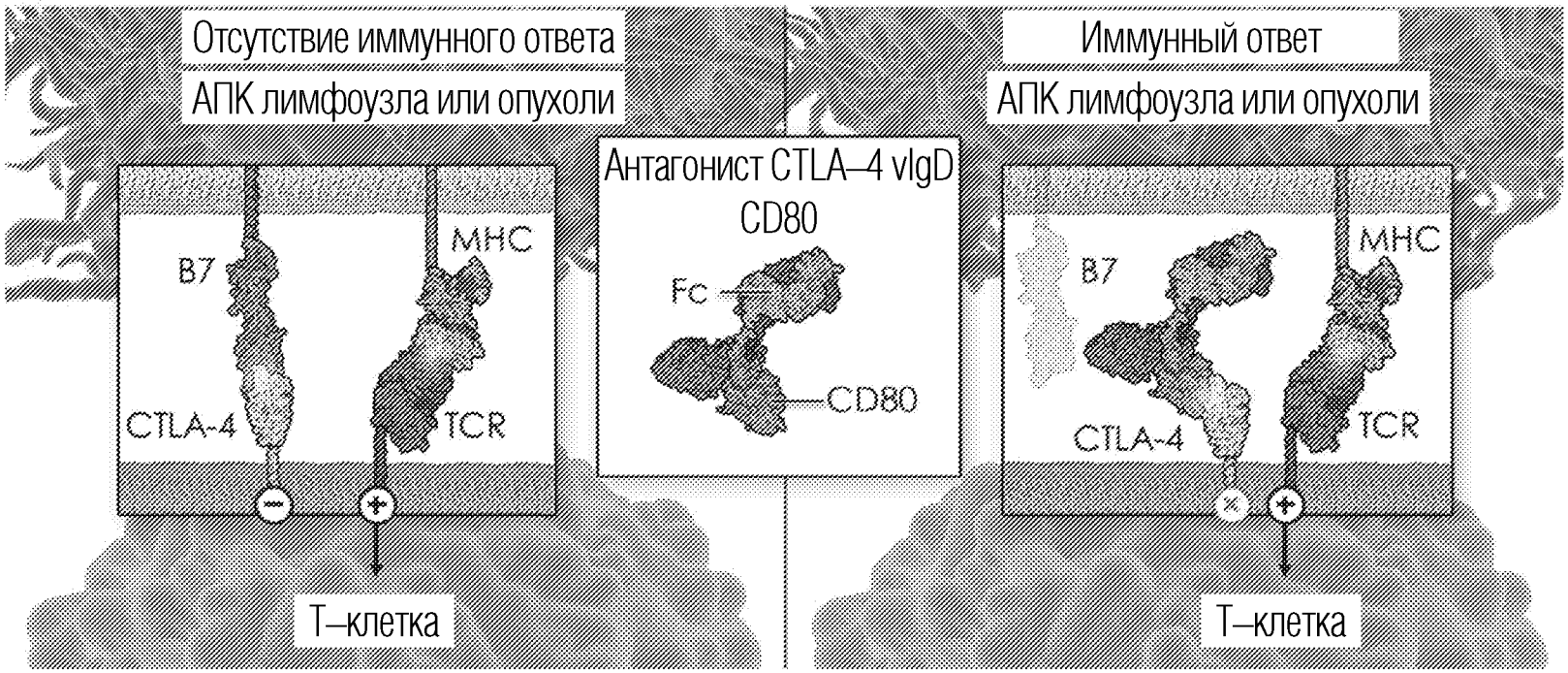
ФИГ. 2


Ингибирование
CTLA-4
CD80
CD80
CTLA-4
АПК
vIgD CD80
CD80
Fc
Т–клетка
Блокирование
CD80
CTLA-4
CD80
CTLA-4

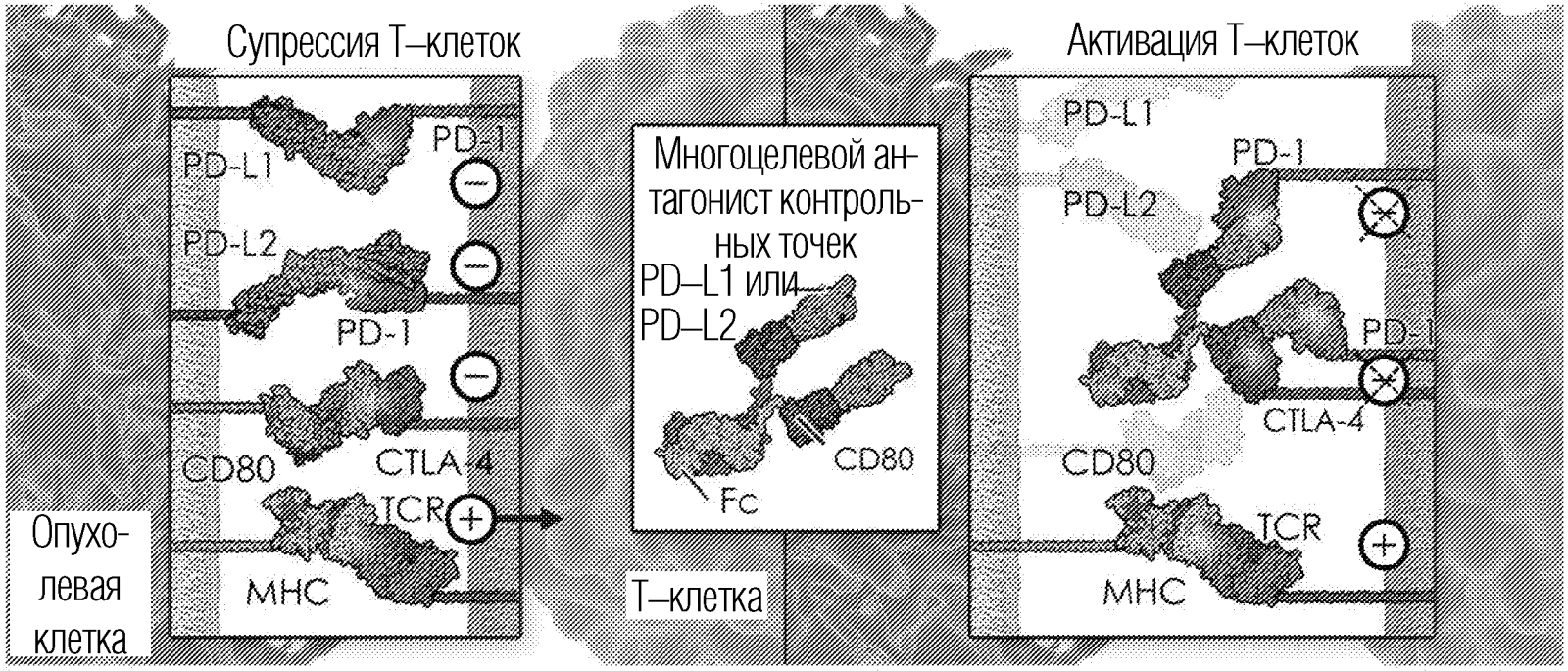
ФИГ. 3А


Отсутствие иммунного ответа
Опухолевая клетка
PD-L1
MHC
CD28
PD-1
TCR
T–клетка
PD–L1–зависимый
агонист CD28 vIgD
Fc
CD80
Иммунный ответ
Опухолевая клетка
PD-L1
MHC
PD-1
CD28
TCR
T–клетка

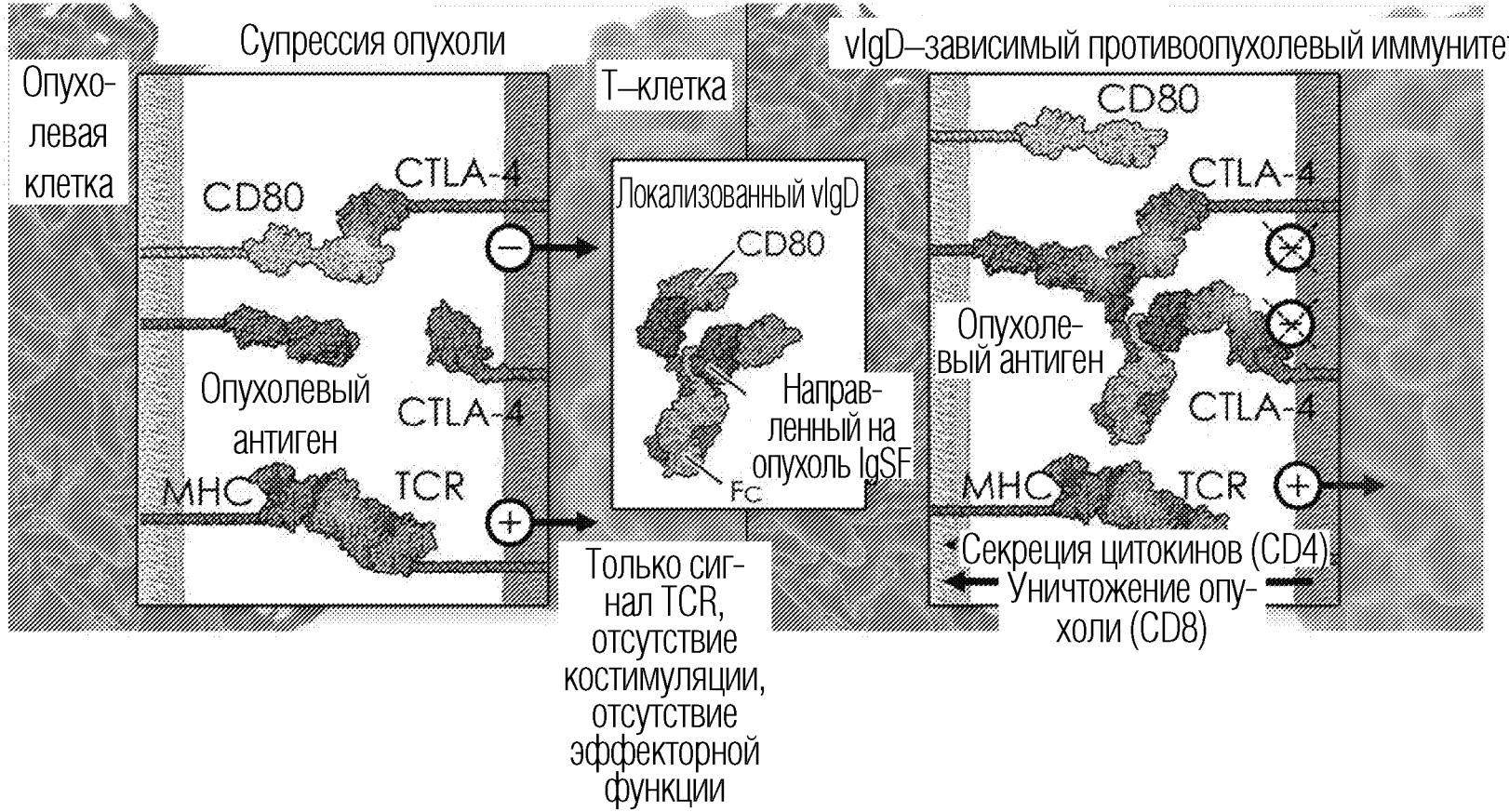
ФИГ. 3B


Отсутствие иммунного ответа
АПК лимфоузла или опухоли
B7
MHC
CTLA-4
TCR
Т–клетка
Антагонист CTLA–4 vIgD
CD80
Fc
CD80
Иммунный ответ
АПК лимфоузла или опухоли
B7
MHC
CTLA-4
TCR
Т–клетка

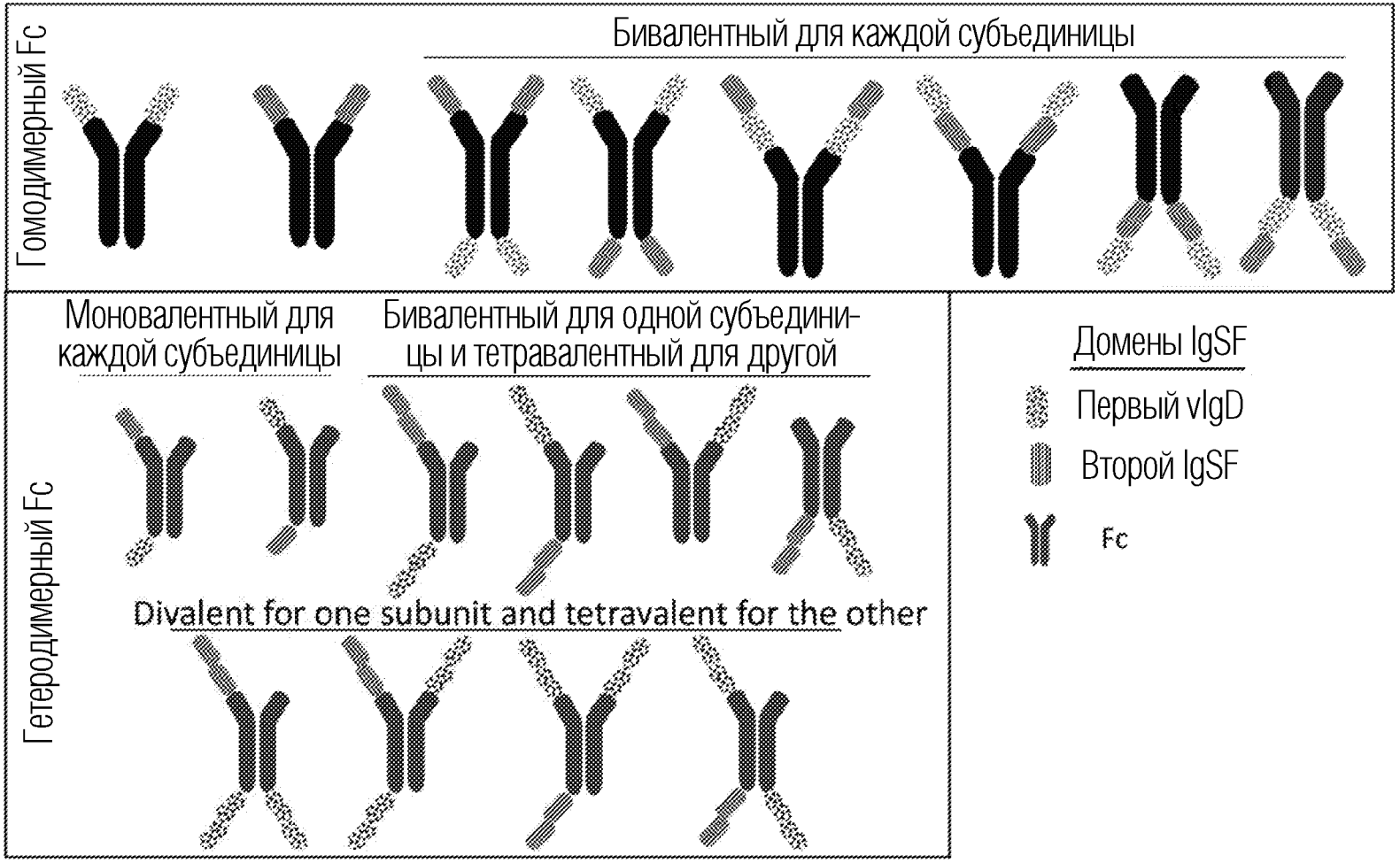
ФИГ. 4


Супрессия Т–клеток
PD-L1
PD-1
PD-L2
PD-1
CD80
CTLA-4
TCR
MHC
Опухолевая клетка
Многоцелевой антагонист контрольных точек
PD–L1 или PD–L2
Fc
CD80
Т–клетка
Активация Т–клеток
PD-L1
PD-1
PD-L2
PD-1
CTLA-4
CD80
TCR
MHC

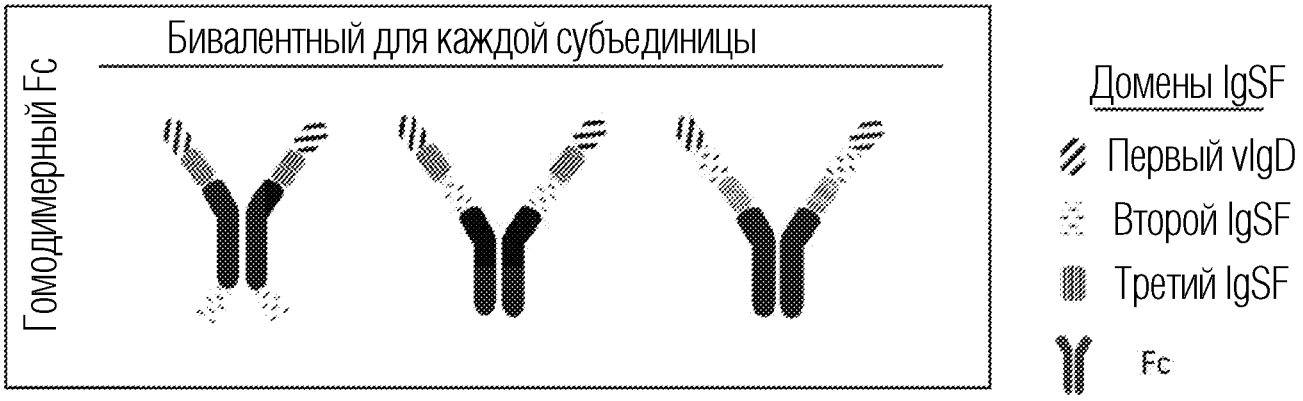
ФИГ. 5


Супрессия опухоли
Опухолевая клетка
CD80
CTLA-4
Опухолевый антиген
CTLA-4
MHC
TCR
Только сигнал TCR, отсутствие костимуляции, отсутствие эффекторной функции
Т–клетка
Локализованный vIgD
CD80
Направленный на опухоль IgSF
Fc
vIgD–зависимый противоопухолевый иммунитет
CD80
CTLA-4
Опухолевый антиген
CTLA-4
MHC
TCR
Секреция цитокинов (CD4)
Уничтожение опухоли (CD8)

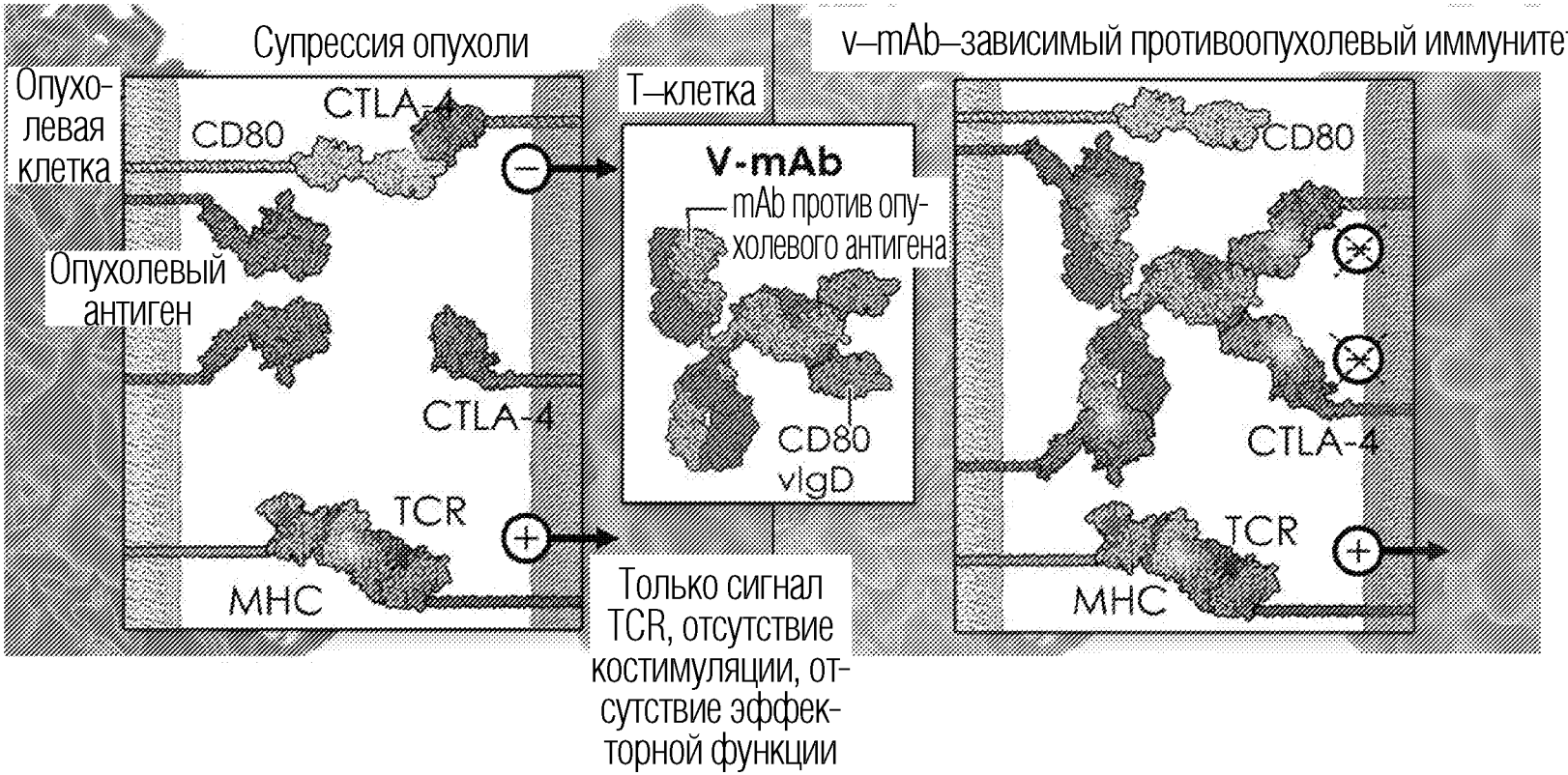
ФИГ. 6A


Гомодимерный Fc
Бивалентный для каждой субъединицы
Моновалентный для каждой субъединицы
Бивалентный для одной субъединицы и тетравалентный для другой
Гетеродимерный Fc
Divalent for one subunit and tetravalent for the other
Домены IgSF
Первый vIgD
Второй IgSF
Fc

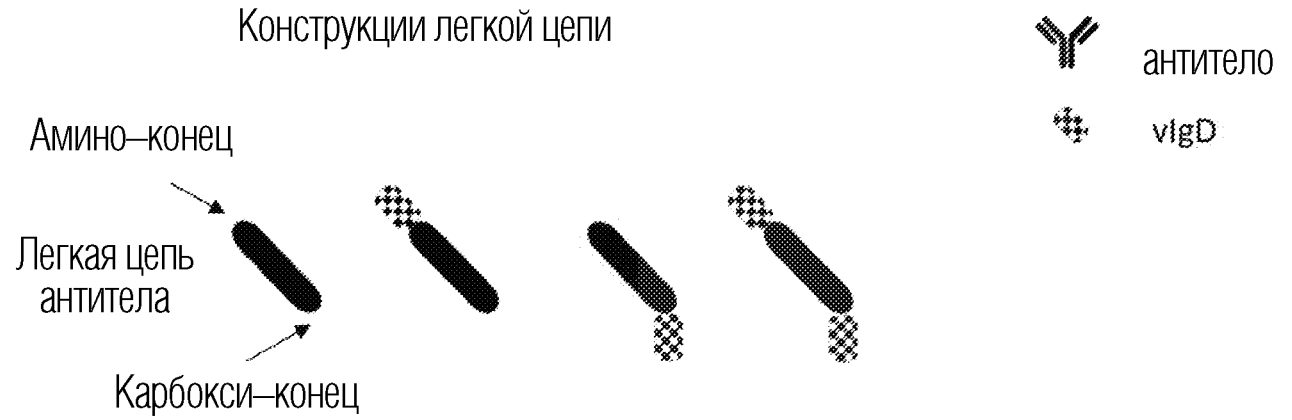
ФИГ. 6В


Гомодимерный Fc
Бивалентный для каждой субъединицы
Домены IgSF
Первый vIgD
Второй IgSF
Третий IgSF
Fc

ФИГ. 7


Супрессия опухоли
v–mAb–зависимый противоопухолевый иммунитет
Опухолевая клетка
CTLA-4
CD80
Опухолевый антиген
CTLA-4
TCR
MHC
T–клетка
V-mAb
mAb против опухолевого антигена
CD80
vIgD
CD80
CTLA-4
TCR
MHC
Только сигнал TCR, отсутствие костимуляции, отсутствие эффекторной функции

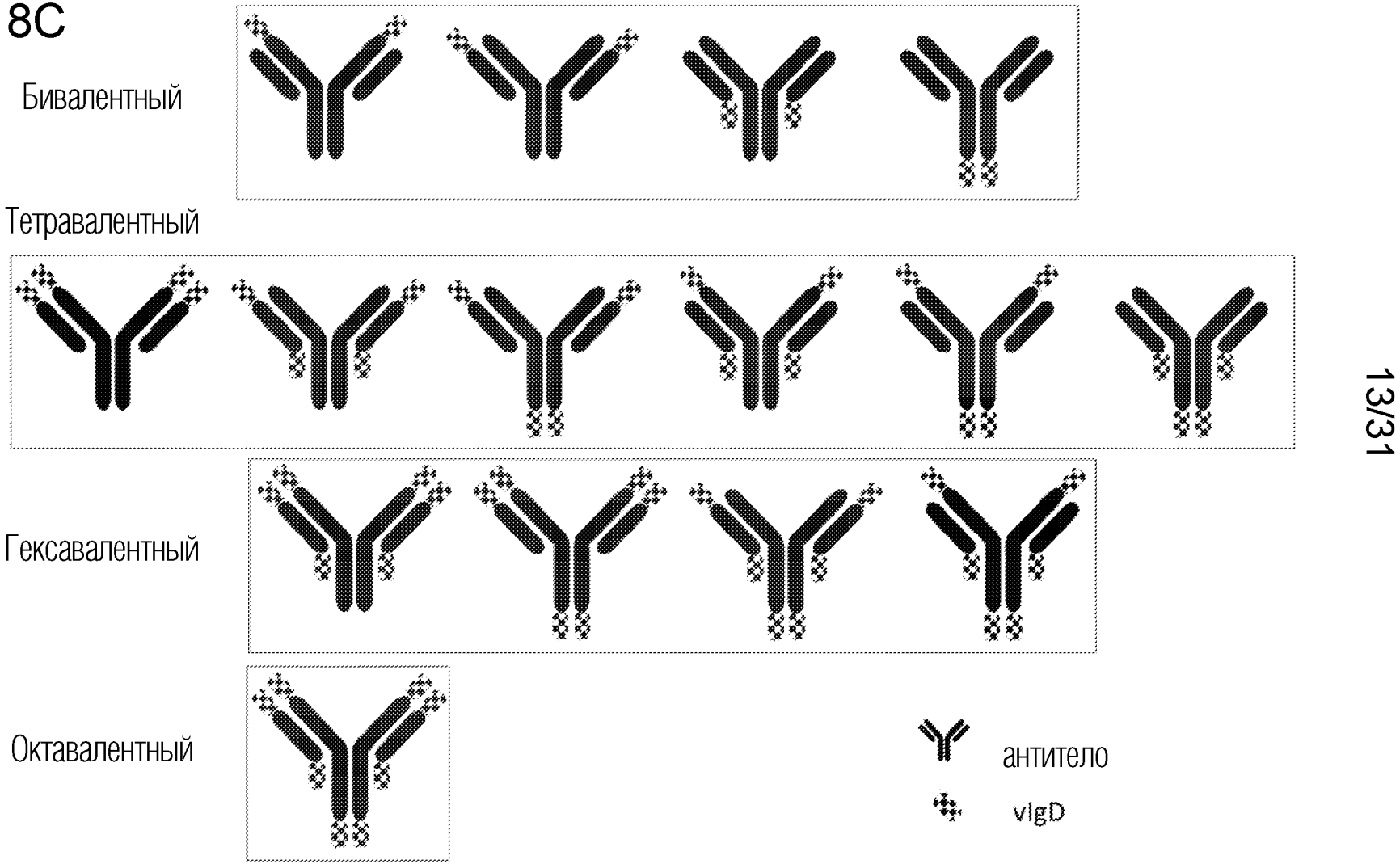
ФИГ. 8A


Конструкции легкой цепи
антитело
vIgD
Амино–конец
Легкая цепь антитела
Карбокси–конец

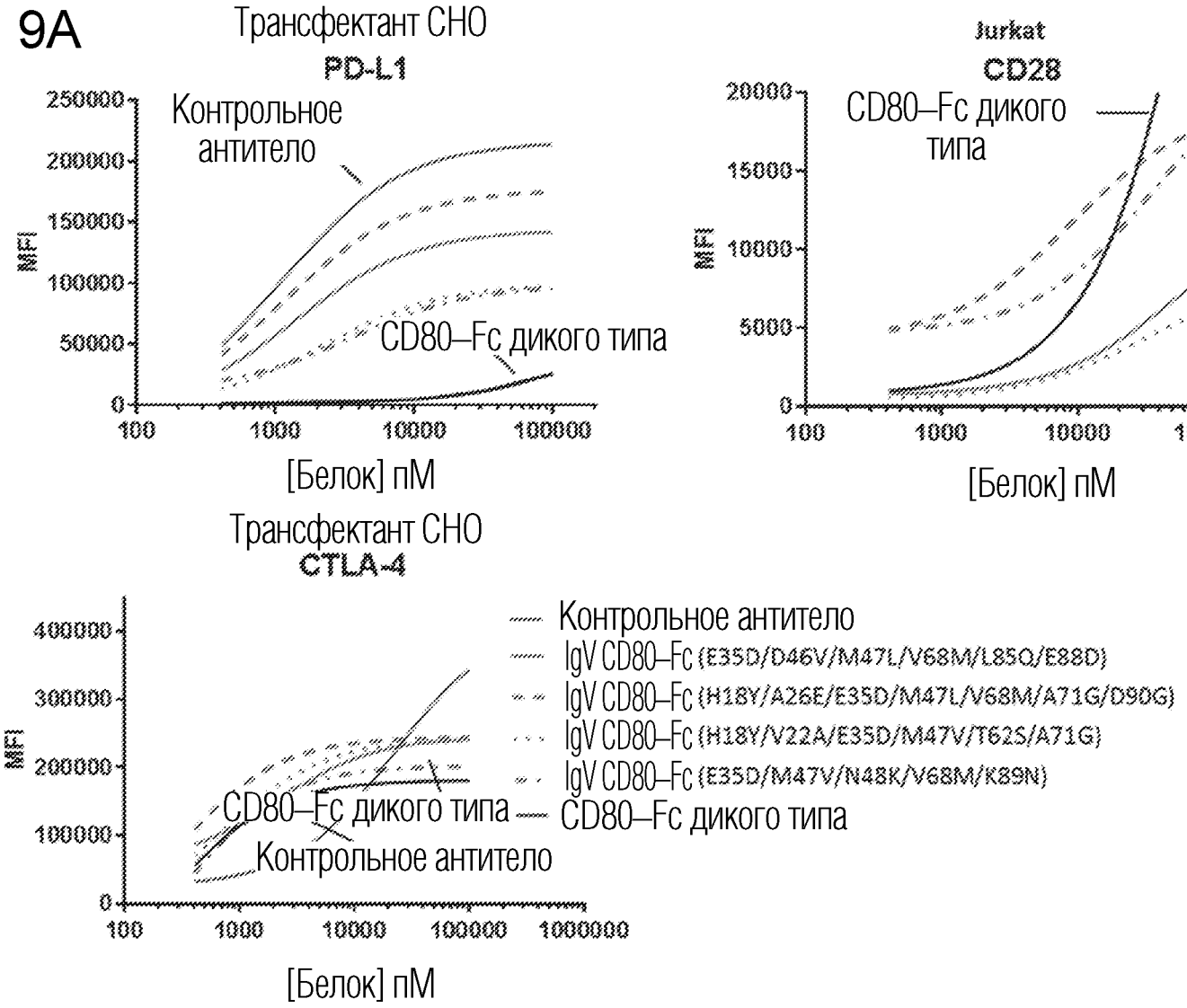
ФИГ. 8B


Конструкции тяжелой цепи
Амино–конец
Тяжелая цепь антитела
Карбокси–конец

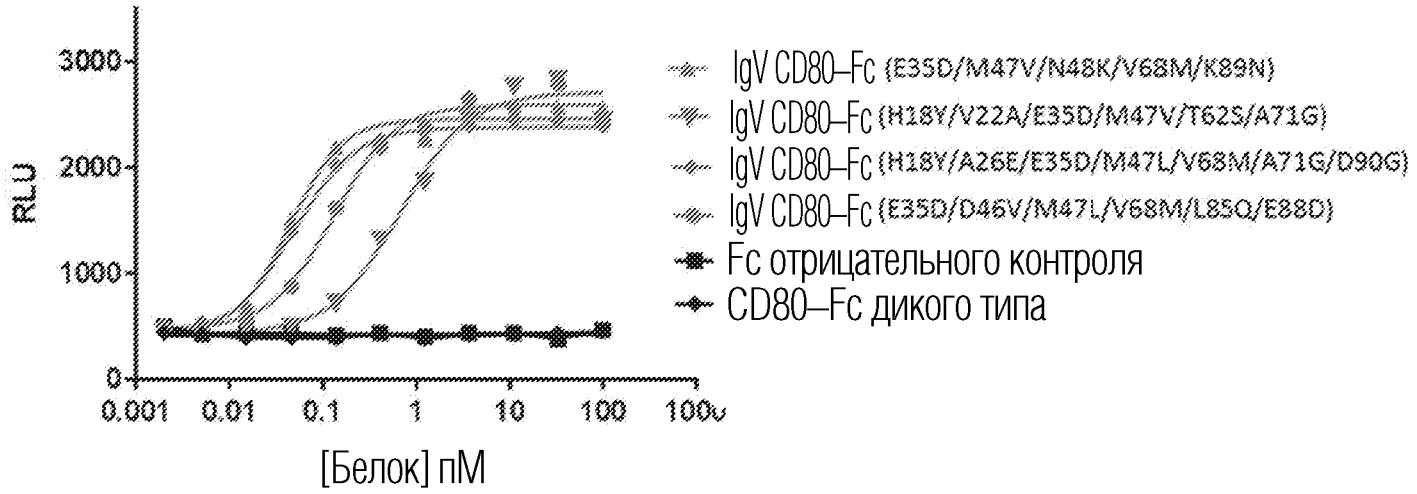
ФИГ. 8С


Бивалентный
Тетравалентный
Гексавалентный
Октавалентный
антитело
vIgD

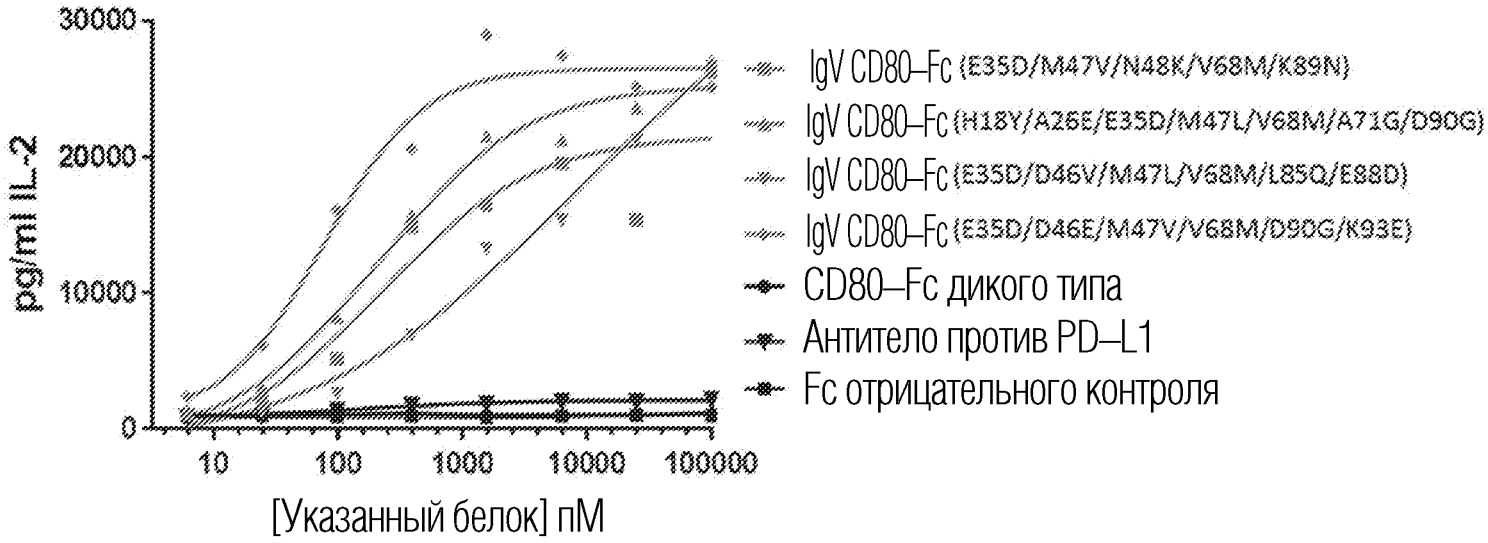
ФИГ. 9А


Трансфектант CHO
PD-L1
Контрольное антитело
CD80–Fc дикого типа
MFI
250000
200000
150000
100000
50000
0
100
1000
10000
100000
[Белок] пМ
Jurkat
CD28
CD80–Fc дикого типа
MFI
20000
15000
10000
5000
0
100
1000
10000
100000
[Белок] пМ
Трансфектант CHO
CTLA-4
MFI
400000
300000
200000
100000
0
100
1000
10000
100000
1000000
[Белок] пМ
CD80–Fc дикого типа
Контрольное антитело
Контрольное антитело
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G)
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
CD80–Fc дикого типа

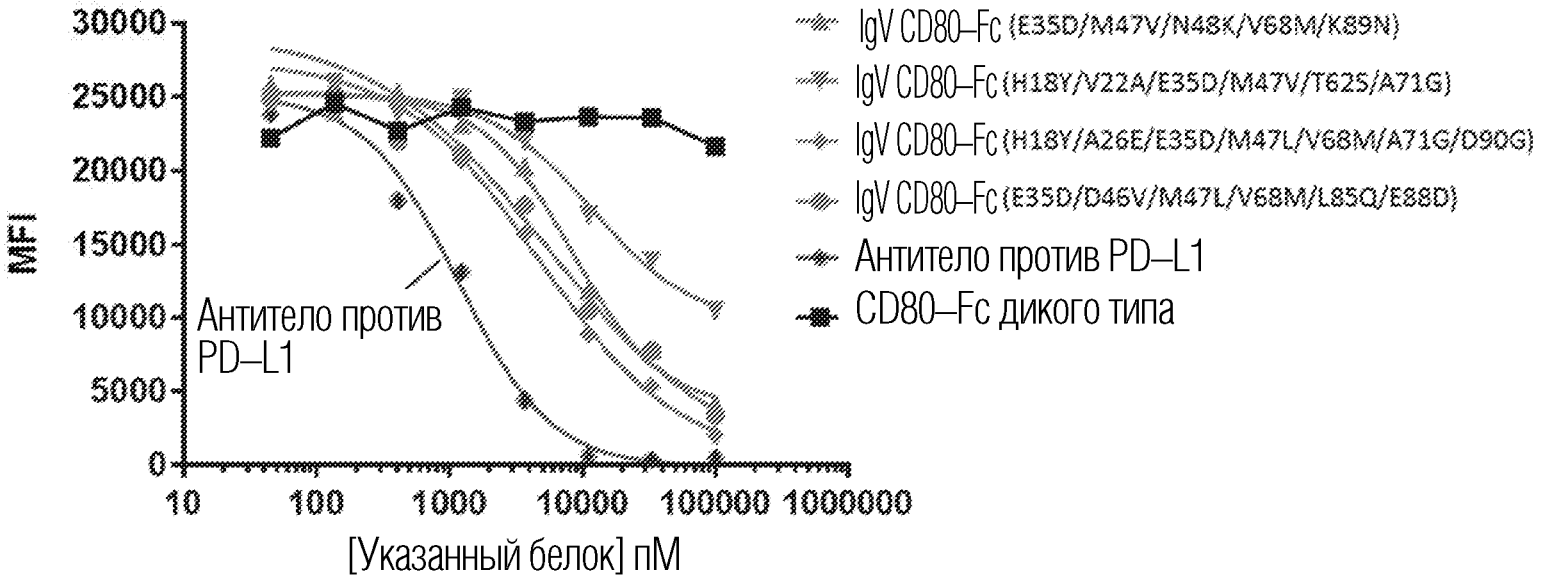
ФИГ. 9В


3000
2000
1000
0
RLU
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[Белок] пМ
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
Fc отрицательного контроля
CD80–Fc дикого типа

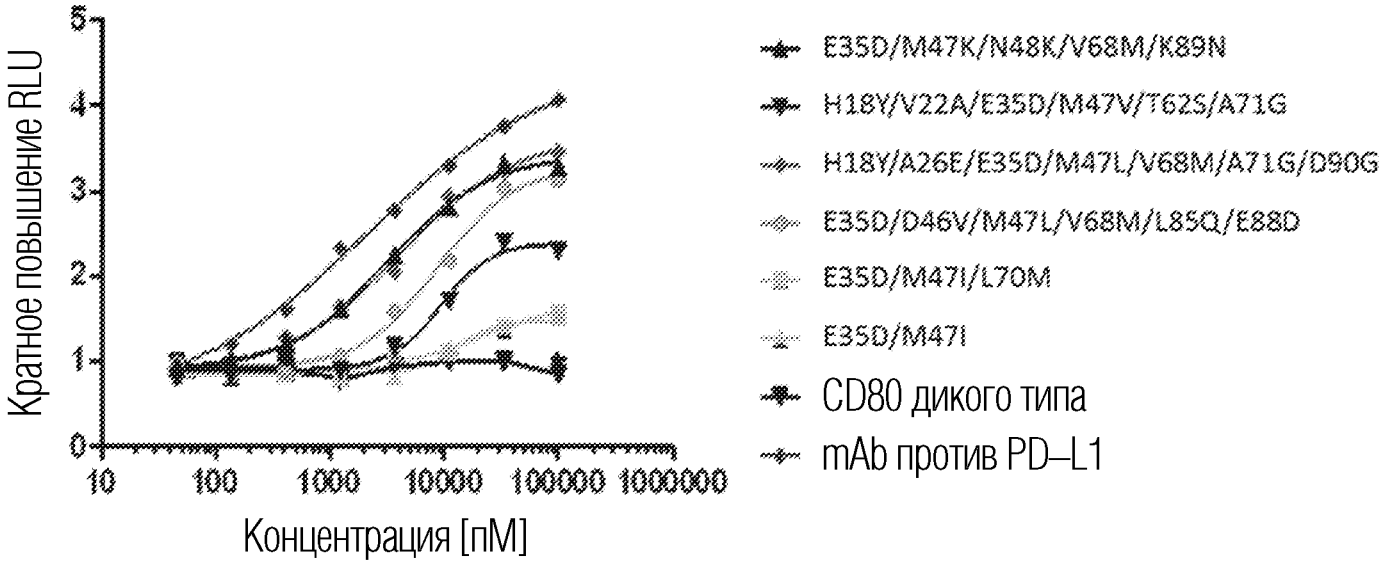
ФИГ. 9С


30000
20000
10000
0
pg/ml IL-2
10
100
1000
10000
100000
[Указанный белок] пМ
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
IgV CD80–Fc (E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E)
CD80–Fc дикого типа
Антитело против PD–L1
Fc отрицательного контроля

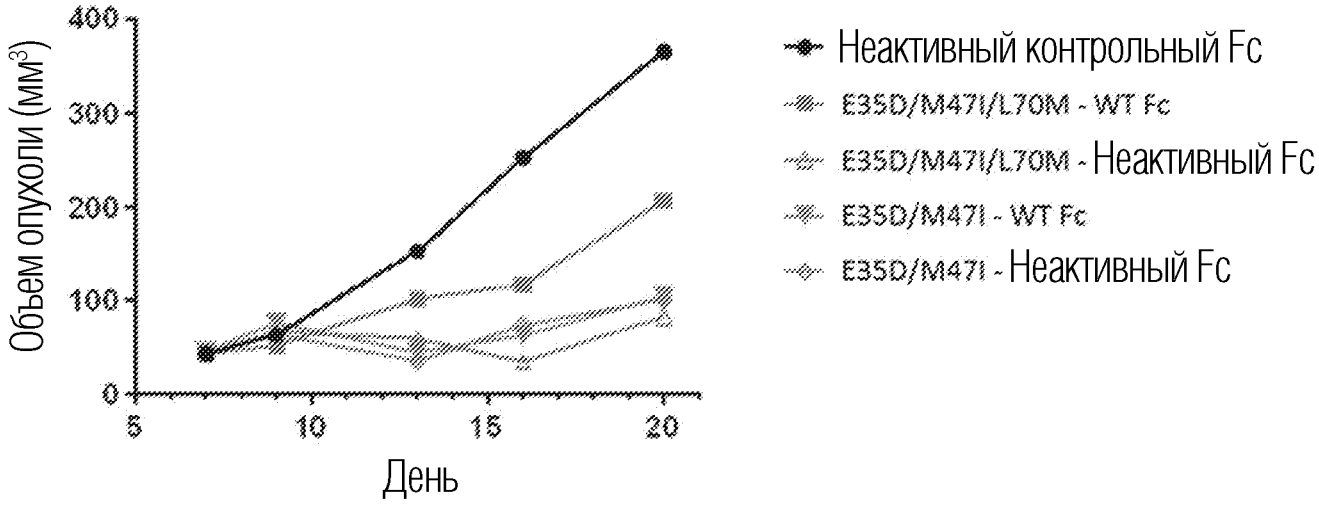
ФИГ. 9D


30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
MFI
10
100
1000
10000
100000
1000000
[Указанный белок] пМ
Антитело против PD–L1
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
Антитело против PD–L1
CD80–Fc дикого типа

ФИГ. 9E

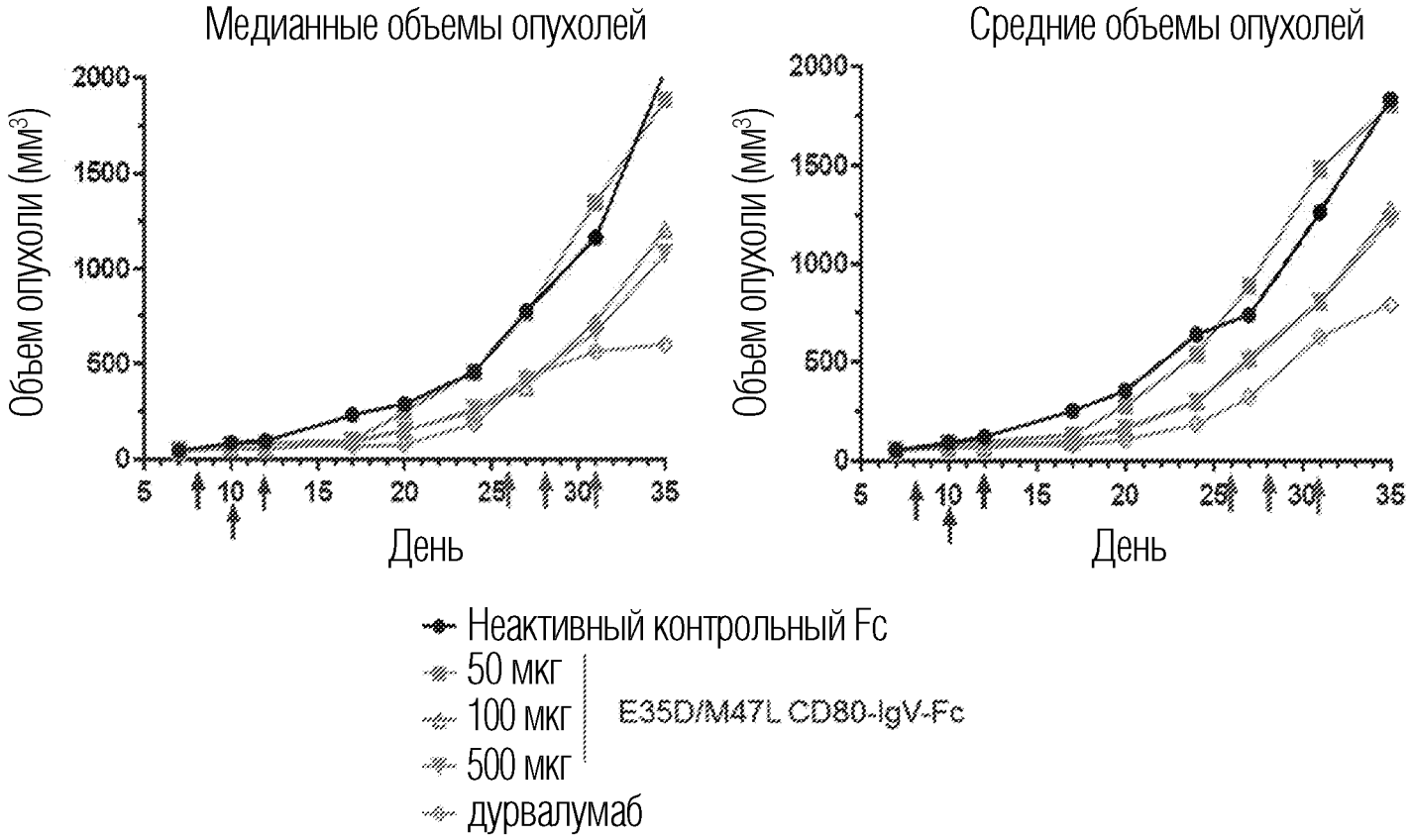

Кратное повышение RLU
0
1
2
3
4
5
10
100
1000
10000
100000
1000000
Концентрация [пМ]
E35D/M47K/N48K/V68M/K89N
H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G
E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D
E35D/M47I/L70M
E35D/M47I
CD80 дикого типа
mAb против PD–L1

ФИГ. 10



100 мкг/мышь в дни 8, 10, 13, 15, 17

ФИГ. 11

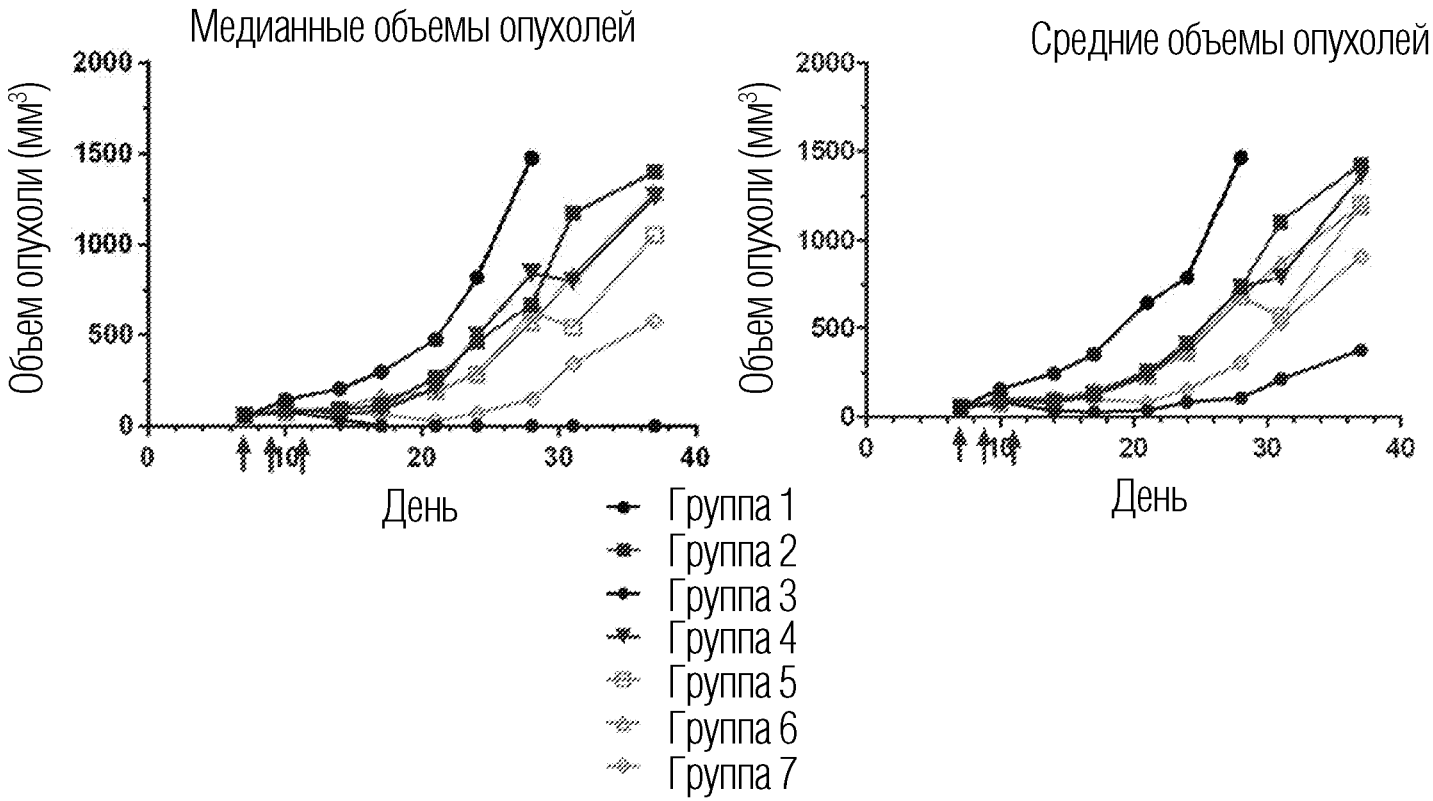

Медианные объемы опухолей
Средние объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
35
День
Неактивный контрольный Fc
50 мкг
100 мкг
500 мкг
E35D/M47L CD80-IgV-Fc
дурвалумаб

ФИГ. 12

ИФНγ (разведение 1:4) в лизатах опухоли на г массы опухоли
пг/мл
10000
8000
6000
4000
2000
0
Неактивный контрольный Fc
50 мкг
100 мкг
500 мкг
E35D/M47L CD80-IgV-Fc
дурвалумаб

ИФНγ (разведение 1:4) в лизатах опухоли на миллион клеток
пг/мл
300
200
100
0
Неактивный контрольный Fc
50 мкг
100 мкг
500 мкг
E35D/M47L CD80-IgV-Fc
дурвалумаб

ФИГ. 13


Медианные объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
День
Средние объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
День
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Группа 4
Группа 5
Группа 6
Группа 7

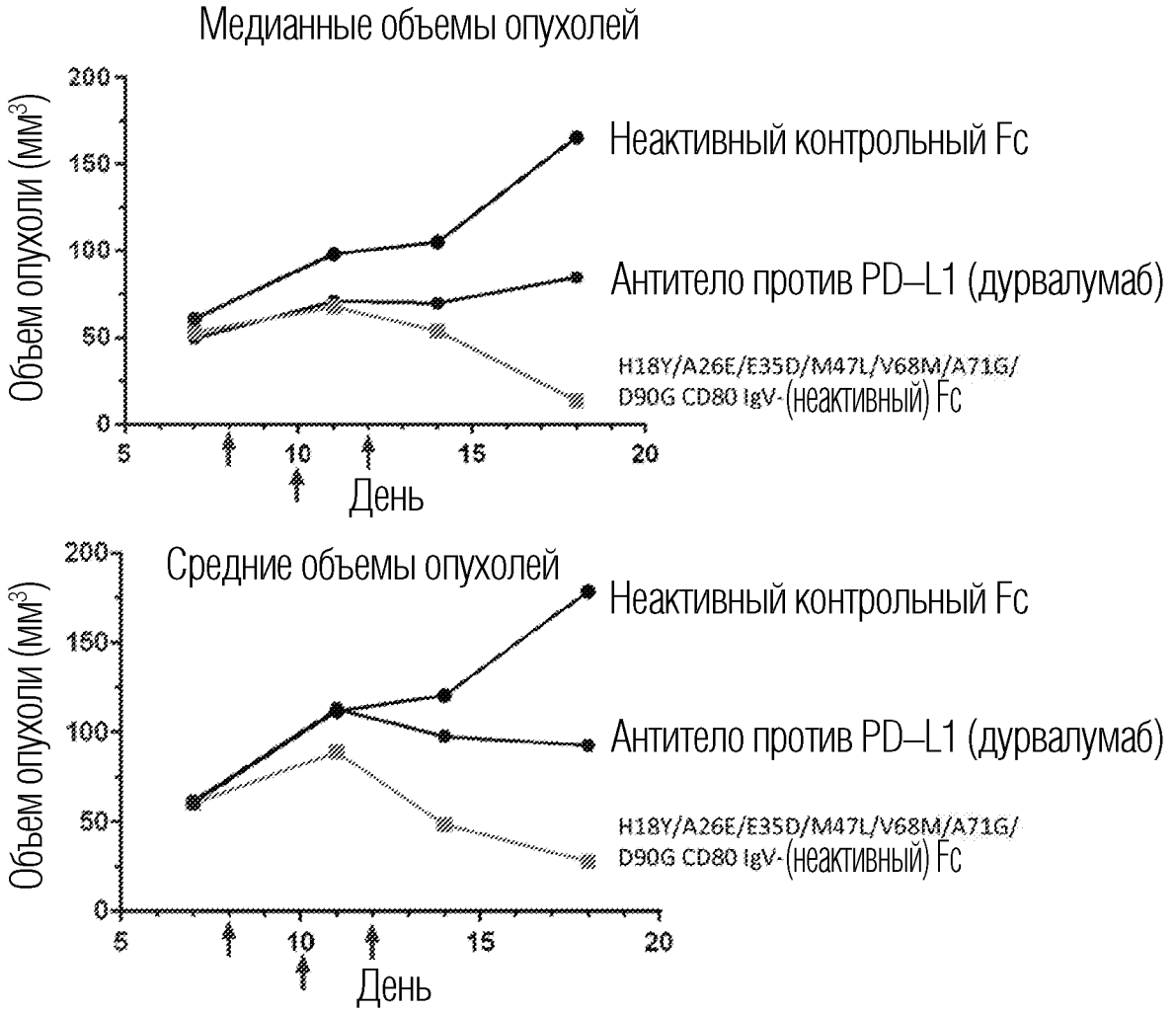
ФИГ. 14


Медианные объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
500
400
300
200
100
0
50
60
70
День
Наивные
Средние объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
500
400
300
200
100
0
50
60
70
День
Наивные
Группа 3
Группа 4
Группа 6
Группа 7
Наивные в отношении повторной стимуляции

ФИГ. 15

% живых CD45– опухолевых клеток
100
80
60
40
20
0
Группа 1(Контрольный Fc)
Группа 3
Группа 6
Группа 7(антитело против PD–L1)

ФИГ. 16


Медианные объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
200
150
100
50
0
5
10
15
20
День
Неактивный контрольный Fc
Антитело против PD–L1 (дурвалумаб)
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/
D90G CD80 IgV-(неактивный) Fc
Средние объемы опухолей
Объем опухоли (мм3)
200
150
100
50
0
5
10
15
20
День
Неактивный контрольный Fc
Антитело против PD–L1 (дурвалумаб)
H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/
D90G CD80 IgV-(неактивный) Fc

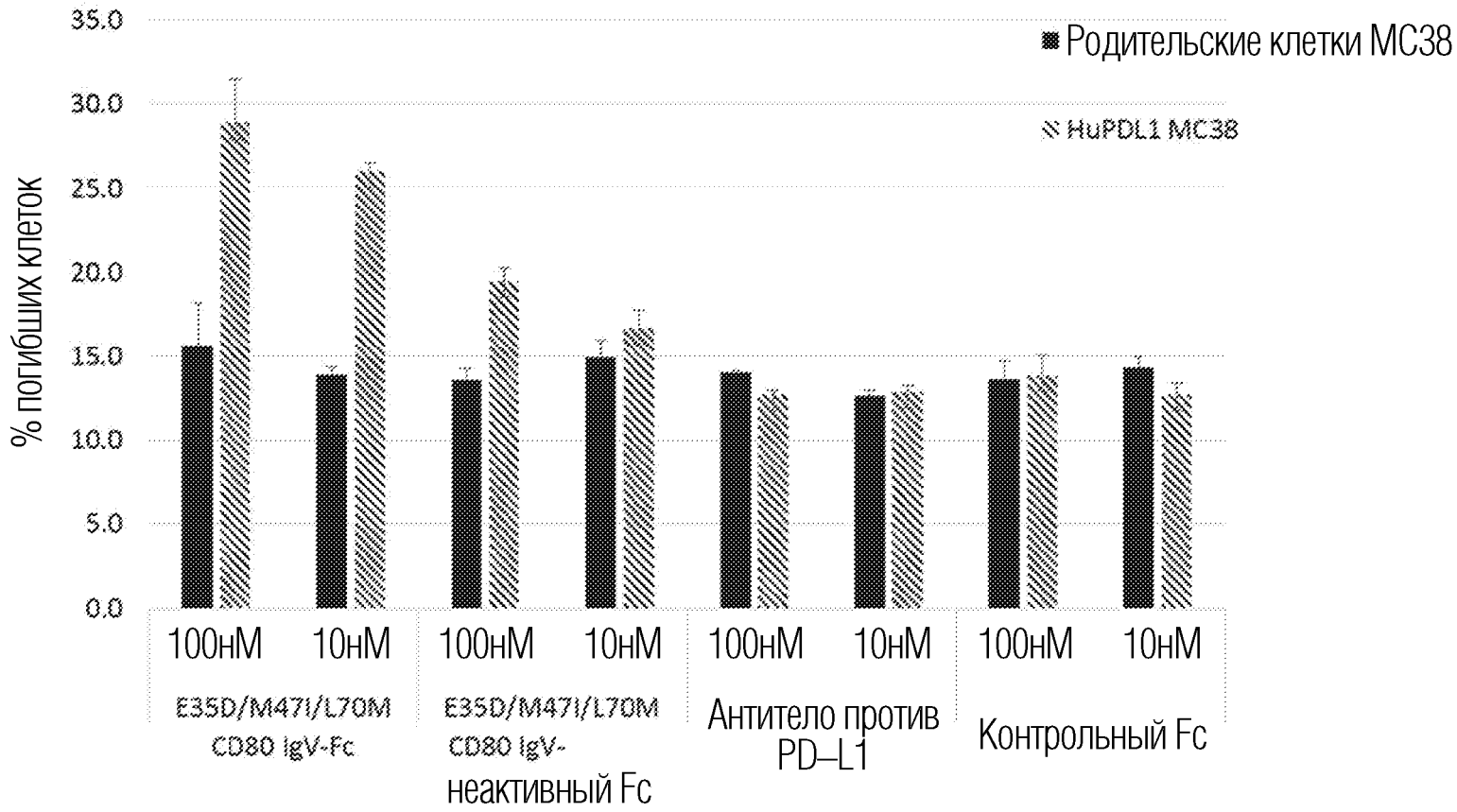
ФИГ. 17A

ФИГ. 17B

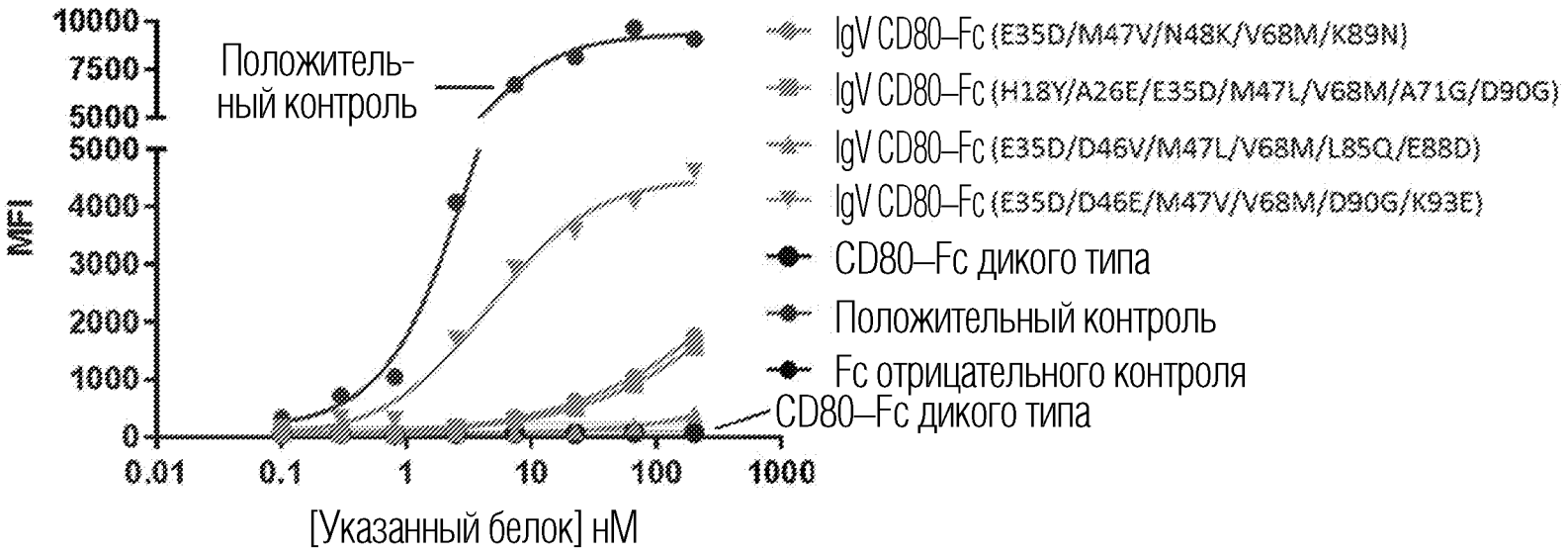
ФИГ. 17C

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ по результатам одностороннего ANOVA

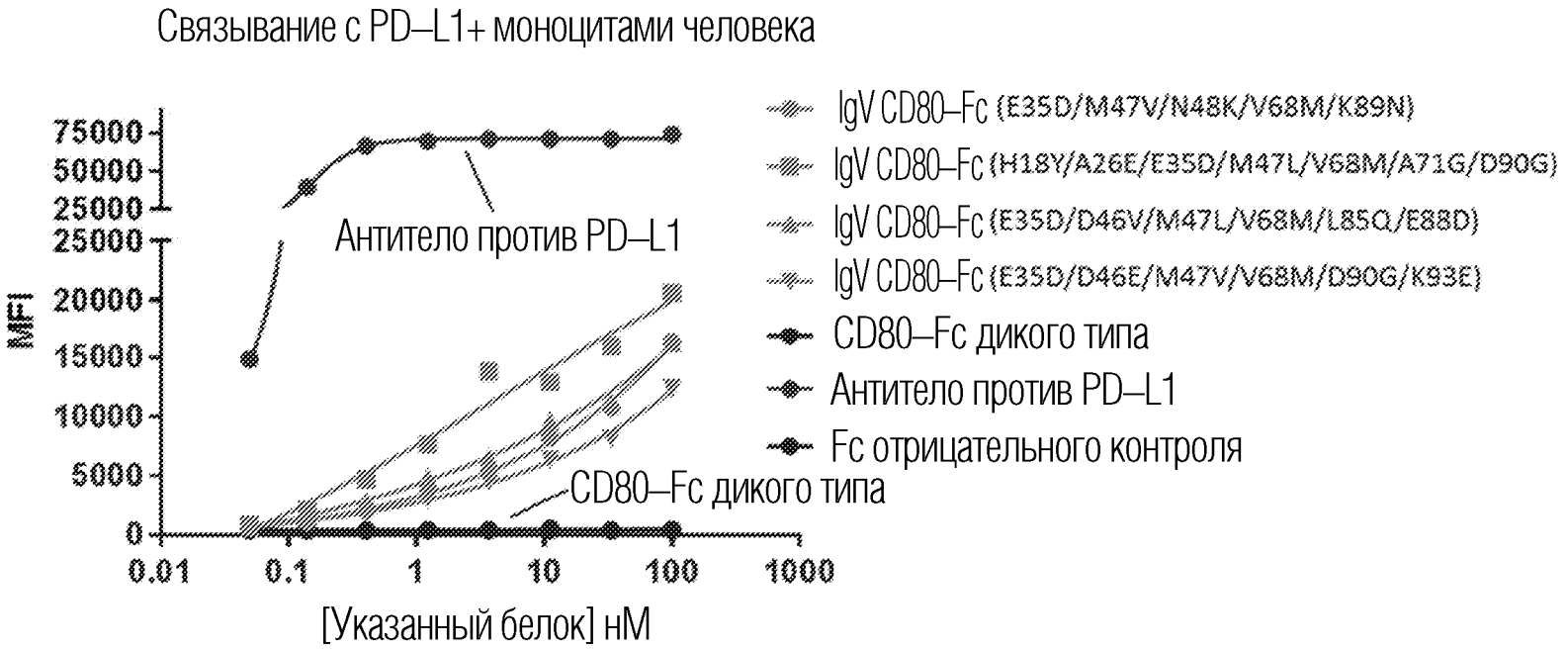
ФИГ. 18


35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
% погибших клеток
Родительские клетки MC38
HuPDL1 MC38
100нМ
10нМ
100нМ
10нМ
100нМ
10нМ
100нМ
10нМ
E35D/M47I/L70M CD80 IgV-Fc
E35D/M47I/L70M CD80 IgV-неактивный Fc
Антитело против PD–L1
Контрольный Fc

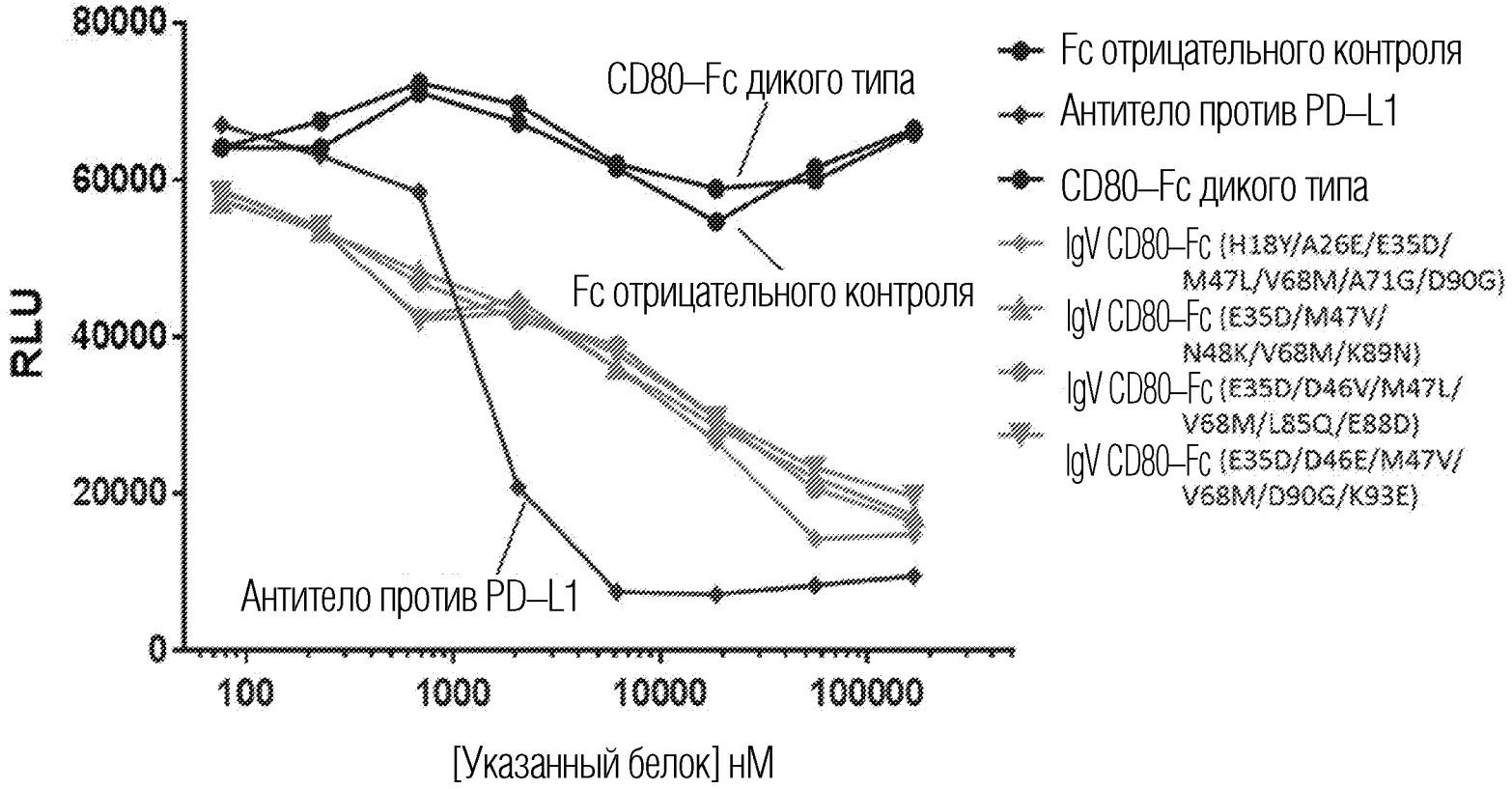
ФИГ. 19А


Связывание с CD8+ CD4 Т–клетками человека
MFI
10000
7500
5000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[Указанный белок] нМ
Положитель-
ный контроль
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
IgV CD80–Fc (E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E)
CD80–Fc дикого типа
Положительный контроль
Fc отрицательного контроля
CD80–Fc дикого типа

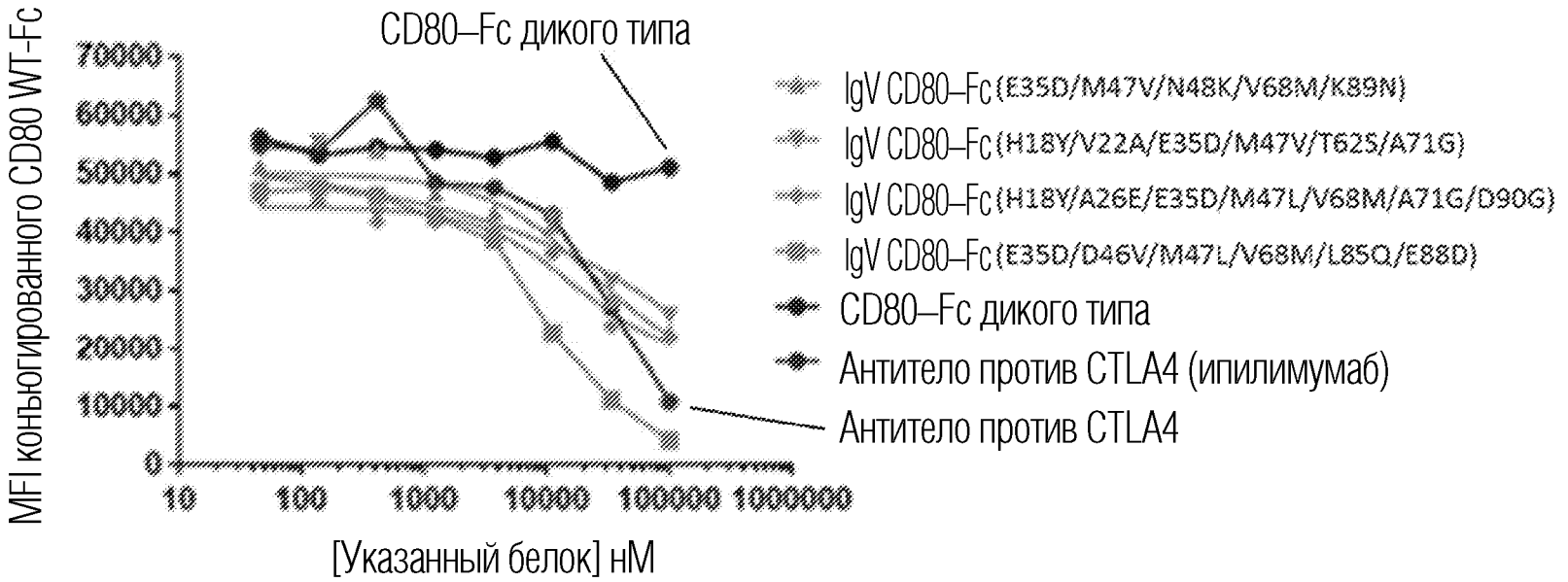
ФИГ. 19B


Связывание с PD–L1+ моноцитами человека
MFI
75000
50000
25000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
[Указанный белок] нМ
Антитело против PD–L1
CD80–Fc дикого типа
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
IgV CD80–Fc (E35D/D46E/M47V/V68M/D90G/K93E)
CD80–Fc дикого типа
Антитело против PD–L1
Fc отрицательного контроля

ФИГ. 20


80000
60000
40000
20000
0
RLU
CD80–Fc дикого типа
Fc отрицательного контроля
Антитело против PD–L1
100
1000
10000
100000
[Указанный белок] нМ
Fc отрицательного контроля
Антитело против PD–L1
CD80–Fc дикого типа
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/ M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/ N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/ V68M/L85Q/E88D)
IgV CD80–Fc (E35D/D46E/M47V/ V68M/D90G/K93E)

ФИГ. 21


CD80–Fc дикого типа
MFI конъюгированного CD80 WT-Fc
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
[Указанный белок] нМ
IgV CD80–Fc (E35D/M47V/N48K/V68M/K89N)
IgV CD80–Fc (H18Y/V22A/E35D/M47V/T62S/A71G)
IgV CD80–Fc (H18Y/A26E/E35D/M47L/V68M/A71G/D90G)
IgV CD80–Fc (E35D/D46V/M47L/V68M/L85Q/E88D)
CD80–Fc дикого типа
Антитело против CTLA4 (ипилимумаб)
Антитело против CTLA4