(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391557 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(22) Дата подачи заявки
2018.10.17

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

(54) ВАРИАНТНЫЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ЛИГАНДА ICOS И СОПУТСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

(31) **62/574,161**
(32) **2017.10.18**
(33) **US**
(62) **202090974; 2018.10.17**

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

(72) Изобретатель:
Эванс Лоуренс, Корнакер Майкл, Свенсон Райан (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В данном документе представлены иммуномодулирующие белки, содержащие варианты ICOSL и нуклеиновые кислоты, кодирующие такие белки. Иммуномодулирующие белки обеспечивают терапевтическую пользу при различных иммунологических и онкологических состояниях. Предлагаются композиции и способы получения и применения таких белков.

202391557 A2

202391557 A2

ВАРИАНТНЫЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ЛИГАНДА ICOS И СОПУТСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Это заявка заявляет приоритет предварительной патентной заявки 62/574161, поданной 18 октября 2017 г., которая озаглавлена «ВАРИАНТНЫЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ЛИГАНДА ICOS И СОПУТСТВУЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ», содержание которой полностью включено ссылкой.

Включение перечня последовательностей ссылкой

Настоящее заявка подается вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен как файл под названием 761612002240SeqList.txt, созданный 13 октября 2018 года, размер которого составляет 1655996 байт. Информация списка последовательностей в электронном формате включена в виде ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям для терапевтического модулирования иммунного ответа при лечении онкологических и иммунологических заболеваний. В некоторых аспектах настоящее раскрытие относится к особым вариантам лиганда ICOS (ICOSL), которые проявляют улучшенное связывание, например, аффинность или селективность, с одним или обоими когнатными белками-партнерами связывания, ICOS или CD28.

Предшествующий уровень техники

Модуляция иммунного ответа путем вмешательства в процессы, происходящие в иммунологическом синапсе (IS), образованные посредством и между антигенпрезентирующими клетками (APC) или клетками-мишенями и лимфоцитами, вызывает всё больший интерес для медицины. Механистически, белки клеточной поверхности в IS могут включать координированное и часто одновременное взаимодействие нескольких белковых мишеней с одиночным белком, с которым они связываются. Взаимодействие IS происходит при тесной ассоциации с соединением двух клеток, и один белок в этой структуре может взаимодействовать как с белком в той же клетке (цис), так и с белком на связанной клетке (транс), вероятно, в одно и тоже время. Хотя известны терапевтические средства, которые могут модулировать IS, существует потребность в улучшенных терапевтических средствах. В данном документе предлагаются иммуномодулирующие белки, включая растворимые белки или

трансмембранные иммуномодулирующие белки, способные экспрессироваться на клетках, которые отвечают таким потребностям.

Резюме

В данном документе представлен полипептид вариантного лиганда ICOS (ICOSL), содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где референсный полипептид ICOSL представляет собой укороченный внеклеточный домен, содержащий непрерывную последовательность аминокислот, содержащую аминокислоты 1-112 и С-концевое укорочение, по меньшей мере, на 25 аминокислот относительно последовательности внеклеточного домена ICOSL, представленной в SEQ ID NO: 32. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами). В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами).

В некоторых воплощениях С-концевое укорочение составляет составляет, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 125 аминокислотных остатков. В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL изменен или отсутствует сайт расщепления протеазой, обозначенный как аминокислоты 204-209 в SEQ ID NO: 32. В некоторых примерах референсный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 545. В некоторых аспектах референсный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 545.

В данном документе представлен вариант полипептида лиганда ICOSL (ICOSL), содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в референсном полипептиде ICOSL, где референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 545. В данном документе также представлен вариант полипептида лиганда ICOSL (ICOSL), содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где референсный полипептид ICOSL изменен в одной или нескольких аминокислотах, соответствующих аминокислотам 204-209 относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL проявляет измененное связывание с одним или несколькими его

партнерами по связыванию по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с одним или несколькими партнерами по связыванию. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его партнерами по связыванию по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с одним или несколькими партнерами по связыванию.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений изменение (например, модификация) включает делецию одной или нескольких смежных аминокислот, соответствующих аминокислотам 204-209, относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых случаях референсный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 600-605. В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 600-605.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений изменение (например, модификация) включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в одном или обоих положениях 207 и 208, соответствующих положениям, изложенным в SEQ ID NO: 32. В некоторых примерах, по меньшей мере, одна аминокислотная замена представляет собой N207A, N207G или L208G или их консервативную аминокислотную замену.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 623-628. В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 623-628.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL демонстрирует пониженное протеолитическое расщепление при экспрессии в клетке. В некоторых примерах клетка является клеткой млекопитающего. В некоторых случаях клетка представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO) или ее производное.

В некоторых из любых таких воплощений аминокислотная модификация представляет собой аминокислотную замену, вставку или делецию. В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении, соответствующем положению(ям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 148, 151, 152, 153,

154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении, соответствующем положению(ям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32.

В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H , N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57L, N57M N57Q, N57S, N57T, N57V, N57Y, N57W, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, E101, V1101 T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, S121G, V122A, V122M, F120S, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138D, C1402, T3S, T3S N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190A , N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативной аминокислотной замены.

В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P , K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E , N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, DAGG , K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100A, L102R, G103R , V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S1261,

S126G, S126F, S126F , T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D15816, L161L116 166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, I21G, I21G, D7 R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K или их консервативной аминокислотной замены.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот находятся в положении, соответствующем положению(ям) 52, 57 или 100. В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N57A, N57D , N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57Y, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100V, Q100S или Q100T, Q100T. В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54P , N57A, N57D, N57E, N57F, N57F, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57Y, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100R , Q100T или Q100V. В некоторых примерах одну или несколько модификаций аминокислот выбирают из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A , N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/T161115 , N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94F L969 , N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R,/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V1002A, N100/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S752/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221 G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I S166 N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122E,

N12H L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217H2 R2/212H2 R2 N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R2 C198R52 R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/H111 C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I22457/Q210/N52H/N C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212Y N198R/S212G N194 N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N101/R755 N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V2 N1Y/F2 N1Y/F2N1D Q100R/V110D/S132F/M175T, N52D, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N119Q, N52Q/N119Q N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168, N169/N168 N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F13RL N10011/F13RL, N1001/F138L C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57R/2/R2/2/R2/R17/2/R/R/R/R/S/R/R/R/S/R/R/R/R/R/S/R/R/R/R/S/H/R/R/R/R/R/H/R/R/R/H/R C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, C198R N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/Q100R/F172R, N52H5 F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V5105/11/155M1/H15611/H15611/H1/155/H1/6/15/H156/11/15/15/15/15/10/15/R156 F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E, N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K192/N5S N5D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57H/Q100P N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H2R1/H115 N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57 N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57F/Q100T N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52G/N57V N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L или N57Q/Q100P.

В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H8R1 C1H/H129P C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203D, Q52H2/N52S, D52S N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N1 R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/R61S L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N100Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161S192 F2/F7196/S192/F2/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57H/N4D986/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M,

N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F N25S, L203F, S25/N227K,
N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C19827725/N195S/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,
R61N61R/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100D, N52S, N52S,
N52S, N52S, N52S, N52S/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/H1105/H1R1105/H5R110/N 57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G,
N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N40/N52S T225A,
N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D,
N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S7111 T1
C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,
N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198Q/N21G N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q,
N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q,
N52H/N84Q, N52H/N84Q/NQ1/NQ2/N168Q N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q,
N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q,
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138R/L1004/N1007/N1003/N1003/N1003/C100R
N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198RY5
I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R,
N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H1
15R/F172S/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/H175Y/F172S,
N52H1002 N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S,
N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/H195R/C198R
V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E, N52S/H115R,
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I,
N30D/K42E/K30E/N52S/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R,
N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/H2S19/N1/N19/N19/N19/N195/N195/F/N115/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100H, N52G, N52G, N52G, N52G, N52G, N52G, N52G, N50/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N 57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N100S Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F, N52R/N57F N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P или R26S/N52H/N57/T137A/C198R.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот N52H/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 567.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот представляют собой N52H/N57Y/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 565.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот представляют собой N52L/N57H/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 761.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько аминокислотных модификаций представляет собой N52D. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 548.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот представляют собой N52H/N57Y/Q100P. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 570.

В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из F120S/Y152H/N201S, E111del, Y33del, N168Q/N207Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N84Q/N119Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, NQ9/NQ9/NQ9/NQ9/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q или F138L/L203P.

В некоторых из любых таких воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из C198R, D158G, E16V, E90A, F120S, F138L, F172S, H115R, H115X, I143T, I143V, I224V, K156M, K42E, K92R, L102R, L203 , L208P, N194D, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52Y, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57S, N57V, N57 , Q100A, Q100D, Q100E, Q100K, Q100M, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q133H, R221I, R75Q, S54A, S54P, T113E, T225A, V110D, V122A, Y146C, Y152C, A117T, A91V , AE88D, C140del, C198R, D158G, D77G, D90K, E117G, E135K, E16V, E81A, E88D, E90A, F120I, F120S, F138L, F172S, F27C, F92Y, G72R, H115R, H115T, H115T, H125 , I143T, I143V, I154F, I218N, I218T, I224V, K156M, K169E, K36G, K42E, K89R, K92R, K93R, L102R, L161P, L166Q, L173S, L203F, L203P, L20P, L70P, L708, L708, L708, L708 , L80P, L96I, L98F, M10I, M10V, N115Q, N119Q, N122S, N144D, N155X, N168Q, N168X, N178S, N194D, N207Q, N207X, N227K, N25S, N30D, N525, NA 7F, N57H, N57L, N57M, N57S, N57V, N57W, N57Y, N63S, N84Q, Q100G, Q100N, Q100V, R221G, S109G, S109N, S114T, S121G, S126R, S126T, S130G, S192F, S132F S212G, S25G, S54A, S54P, S99G, T113E, T120S, T130A, T139S, T190A, T199S, T225A, T41I, V107I, V110A, V110D, V11E, V122A, V122M, Y152, Y152, Y152, Y152, Y152 ,

В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из N52S, N52H, N52D, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y, N52S/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R,
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R, H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N30D/K42E/N52S/H115R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52T/N57H/Q100S, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G or N52T/N57K/Q100P; or N52S, N52H, N52D, N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/D158G, N52D/Q133H, L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A, L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S, L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/ T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V /T120S/T130A, T41I/A91G, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/ N178S, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R, AE88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R, K36G/L40M, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/F120S/N227K, N52S/N194D, N52S/F120S, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R,
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M,
N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R,
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A,
N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/
F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R,
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R,
N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R,
N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q/,
N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/Q100R,
N52H/S121G/C198R, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/Q100P/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E, Q100R,
N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P,
N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/L102R H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D,
N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R,
N52H/Q100R/H115R/I143T F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R R221I,
N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N52S/H115R/F172S/C198R, N119Q, N207Q,
N52Q/N207X, N168X/N207X, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N119Q N155X, N52Q/N119Q,
N52Q/N84Q/N207Q, N119Q/N155Q/N168Q, N52H/N84Q/N119Q,

N52Q/N84Q/N155X/N168X, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G или N52T/N57K/Q100P. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом.

В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из C198R, D158G, E16V, E90A, F120S, F138L, F172S, H115R, I143V, I224V, K156M, K42E, K92R, L102R, L203P, L208P , N194D, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52Y, N57F, N57H, N57L, N57M, N57S, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100 , Q100K, Q100M, Q100P, Q100R, Q100S, Q133H, S212G, S54A, S54P, T113E, V110D, V122A, Y146C, Y152C или T225A.

В некоторых примерах одну или несколько модификаций аминокислот выбирают из N52A/N57Y/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52T/N57H/Q100S, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52S, N52H, N52D, N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y, N52S/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52H/I143T, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A/H115R, N52S/E90A/H115R или N30D/K42E/N52S/H115R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с эктодоменами ICOS и CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с теми же эктодоменами.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800 , 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848 , 850-853, 855, 857, 907, 910 или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91 %%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848, 850-853, 855, 857, 907, 910. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848, 850-853, 855, 857, 907, 910 или последовательности аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91 %%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848,

850-853, 855, 857, 907, 910.

В некоторых из предлагаемых воплощений варианта полипептида лиганда ICOS (ICOSL), содержащего домен IgV или его специфически связывающий фрагмент, домен IgC или его специфически связывающий фрагмент, или оба, вариант вариантного полипептида ICOSL содержит одну или несколько аминокислот модификации в референсном полипептиде ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующие аминокислотным модификациям, выбраны из N52A, N52C, N52D, N52G, N52K, N52L, N52M, N52R, N52T, N52V, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100S, Q100T или Q100V относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых из предлагаемых воплощений одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из N52A/N57F/Q100S, N52A,/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H , N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V , N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L или N57Q/Q100P.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL представляет собой ICOSL млекопитающего или его специфический связывающий фрагмент. В некоторых примерах референсный полипептид ICOSL представляет собой человеческий ICOSL или его специфический связывающий фрагмент.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL содержит (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую домен IgV или домен IgC или их специфически связывающие фрагменты, или и то, и другое. В некоторых из любых предлагаемых воплощений специфический связывающий фрагмент домена IgV или домена IgC имеет длину, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более аминокислот; или фрагмент специфического связывания

домена IgV имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgV, заданного аминокислотами 19-129 из SEQ ID NO: 5, и/или фрагмент специфического связывания домена IgC включает длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgC, заданного аминокислотами 141-227 из SEQ ID NO: 5. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит домен IgV или его конкретный фрагмент и домен IgC или его конкретный фрагмент.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 638-685, или последовательность аминокислот, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91 %%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с любым из SEQ ID NO: 638-685. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 638-685, или последовательности аминокислот, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91 %% 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 638-685.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит домен IgV или его специфически связывающий фрагмент. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 686-781, или последовательность аминокислот, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91 %%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 686-781. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 686-781, или аминокислотной последовательности, которая демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91 %% 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 686-781.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgV или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL. В некоторых примерах домен IgC или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом. В некоторых аспектах вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с

эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем(теми) же эктодоменом(ами). В некоторых примерах связывание увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 40 раз, в 50 раз или в 60 раз.

В некоторых из любых таких воплощений ICOS представляет собой ICOS человека. В некоторых из любых предлагаемых воплощений CD28 представляет собой CD28 человека.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL проявляет пониженное связывание с эктодоменом CTLA-4 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL для того же эктодомена. В некоторых примерах связывание увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 40 раз, в 50 раз или в 60 раз. В некоторых из любых предлагаемых воплощений CTLA-4 представляет собой CTLA-4 человека.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений измененное (повышенное или пониженное) связывание представляет собой измененную (увеличенную или уменьшенную) аффинность связывания. В некоторых из любых таких воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, необязательно аминокислотных замен, вставок и/или делеций. В некоторых случаях вариантный полипептид ICOSL демонстрирует идентичность последовательности, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% относительно референсного полипептида ICOSL.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL представляет собой растворимый белок. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL лишен трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена; и/или, при экспрессии из клетки, вариантный полипептид ICOSL не экспрессируется на поверхности клетки.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает трансмембранный домен. В некоторых случаях трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, представленную в виде остатков 257-277 последовательности SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант, который демонстрирует, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с остатками 257-277 последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL дополнительно

включает цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом. В некоторых случаях цитоплазматический сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, представленную в виде остатков 278-302 SEQ ID NO: 5, или ее функциональный вариант, который демонстрирует, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с остатками 278-302 SEQ ID NO: 5.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL является дегликозилированным или частично дегликозилированным по сравнению с референсной последовательностью ICOSL.

В данном документе представлен иммуномодулирующий белок, содержащий любой из предложенных вариантных полипептидов ICOSL и фрагмент, увеличивающий период полужизни. В некоторых из любых предлагаемых воплощений, фрагмент, увеличивающий период полужизни, включает 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-связывающая малая молекула или их комбинацию. В некоторых случаях фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой или содержит Pro/Ala/Ser (PAS), а вариантный полипептид ICOSL является PAS-илированным. В некоторых из любых предлагаемых воплощений, увеличивающий период полужизни фрагмент включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 904.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений, фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой или содержит домен мультимеризации. В некоторых случаях домен мультимеризации выбран из Fc-области иммуноглобулина, лейциновой молнии, изолейцинной молнии или цинкового пальца. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL напрямую или опосредованно связан через линкер с доменом мультимеризации.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений иммуномодулирующий белок представляет собой мультимер, содержащий первый вариантный полипептид ICOSL, связанный с первым доменом мультимеризации, и второй вариантный полипептид ICOSL, связанный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, включающим первый и второй вариантные полипептиды ICOSL. В некоторых случаях мультимер представляет собой димер.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений первый вариантный полипептид ICOSL и второй вариантный полипептид ICOSL являются одинаковыми. В некоторых из

любых предлагаемых воплощений димер представляет собой гомодимер. В некоторых случаях димер является гетеродимером.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc-область иммуноглобулина. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область представляет собой белок иммуноглобулина G1 (IgG1) или иммуноглобулина G2 (IgG2). В некоторых примерах белок иммуноглобулина является человеческим и/или Fc-область является человеческой. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 227, или ее вариант, который демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 227. В некоторых аспектах Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226, или ее вариант, который демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 226. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область проявляет одну или несколько эффекторных функций. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область проявляет одну или несколько сниженных эффекторных функций по сравнению с областью Fc дикого типа, необязательно, где человеческий Fc дикого типа представляет собой человеческий IgG1.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений одна или несколько эффекторных функций выбраны из числа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности, запрограммированной гибели клеток и клеточного фагоцитоза. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область представляет собой вариант Fc-области, содержащей одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с Fc-областью дикого типа.

В некоторых из предлагаемых примеров одна или несколько аминокислотных замен вариантной Fc-области выбраны из N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K или L234A/L235E/G237A, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариант Fc-области дополнительно включает аминокислотную замену C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых аспектах Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, представленную в любой из SEQ ID NO: 476-478, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям с любой из SEQ ID NO: 476-478 и содержат

аминокислотные замены. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область содержит K447del, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EC по Kabat.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, представленную в любой из SEQ ID NO: 632-634, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям любой из SEQ ID NO: 632-634 и содержит аминокислотные замены.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 474 или 637, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 474 или 637 и содержит аминокислотные замены.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 478 или SEQ ID NO: 634. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 477. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 633. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 474. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 637.

В данном документе представлен иммуномодулирующий белок, содержащий (a) вариантный полипептид ICOSL, содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL для этого же эктодомена(ов); и (b) вариантная Fc-область, содержащей аминокислотные замены, выбранные из N297G/K447del, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/K447del или L234A/L235E/G237A/K447del по сравнению с человеческим IgG1 дикого типа, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых случаях иммуномодулирующий белок представляет собой димер. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариант Fc-области дополнительно включает аминокислотную замену C220S, где остатки пронумерованы в

соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых примерах Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, представленную в любой из SEQ ID NO: 632-634, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям с любой из SEQ ID NO: 476-478 и содержат аминокислотные замены. В некоторых из любых предлагаемых воплощений Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 474 или 637, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 474 или 637 и содержит аминокислотные замены.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL связан, прямо или опосредованно, через линкер, с вариантной Fc-областью. В некоторых примерах линкер содержит от 1 до 10 аминокислот. В некоторых из любых предлагаемых воплощений линкер выбран из AAA, G4S (SEQ ID NO: 636), (G4S) 2 (SEQ ID NO: 229) или линкера GSGGGGS (SEQ ID NO: 635). В некоторых из любых предлагаемых воплощений линкер представляет собой (G4S)3 (SEQ ID NO: 228).

В некоторых из любых предлагаемых воплощений линкер представляет собой AAA. В некоторых из любых предлагаемых воплощений линкер представляет собой G4S (SEQ ID NO: 636). В некоторых из любых предлагаемых воплощений линкер представляет собой (G4S) 2 (SEQ ID NO: 229). В некоторых из любых предлагаемых воплощений линкер представляет собой линкер GSGGGGS (SEQ ID NO: 635).

В некоторых из любых предусмотренных воплощений гибридного белка, например, вариантного гибридного белка ICOSL-Fc, вариантный полипептид ICOSL представляет собой или содержит домен IgV. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52H/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 567. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотные модификации N52H/N57Y/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 565. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотные модификации N52L/N57H/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 761. В некоторых из любых предлагаемых воплощений

вариантный полипептид ICOSL содержит модификации аминокислот N52H/N57Y/Q100P. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 570. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную модификацию N52D. В некоторых из любых предлагаемых воплощений полипептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 548.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений представлен вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 928. В некоторых из любых предлагаемых воплощений представлен вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, который имеет аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 928.

В конкретных воплощениях предлагаются иммуномодулирующие белки, такие как гибридные белки, например, вариантные гибридные белки ICOSL-Fc, связывающие CD28 и ICOS. В некоторых воплощениях, вариантный гибридный белок ICOSL-Fc проявляет повышенную аффинность связывания с CD28 и/или ICOS по сравнению с гибридным белком ICOSL-Fc человека дикого типа, например, содержащий часть ICOSL IgV, указанный в SEQ ID NO: 545, связанную через линкер, например, представленный в SEQ ID NO: 229, с Fc-областью. В таком примере Fc-область представляет собой инертный или безэффекторный Fc, содержащий мутации L234A, L235E и L235E в Fc человеческого IgG1, например, представленный в SEQ ID NO: 637,

В данном документе представлен иммуномодулирующий белок, содержащий любой из вариантов полипептидов ICOSL, связанных со вторым полипептидом, содержащим домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). В некоторых случаях домен IgSF является модифицированным по аффинности и демонстрирует измененное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами по связыванию по сравнению с немодифицированным доменом или доменом IgSF дикого типа. В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его когнатными связывающими партнерами по сравнению с немодифицированным доменом или доменом IgSF дикого типа.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL представляет собой первый вариантный полипептид ICOSL, а домен IgSF второго полипептида представляет собой домен IgSF из второго вариантного полипептида ICOSL, представленного в настоящем документе, где первый и второй вариант ICOSL являются

одинаковыми или разными.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL способен специфически связываться с CD28 или ICOS, а домен IgSF второго полипептида способен связываться с партнером по связыванию, отличным от одного, специфически связанного с вариантным полипептидом ICOSL. В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF относится к представителю семейства B7.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF представляет собой локализующий в опухоли фрагмент, который связывается с лигандом, экспрессируемым на опухоли, или представляет собой локализующий в воспалении фрагмент, который связывается с лигандом, экспрессируемым на клетке или ткани воспалительной среды. В некоторых случаях лиганд представляет собой B7H6. В некоторых примерах домен IgSF представляет собой NKp30.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF второго полипептида представляет собой или содержит домен IgV. В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF второго полипептида представляет собой вариант молекулы NKp30, содержащий L30V/A60V/S64P/S86G. В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF второго полипептида имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 504.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений домен IgSF представляет собой или содержит домен IgV. В некоторых случаях вариантный полипептид ICOSL представляет собой или содержит домен IgV.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL представляет собой или содержит домен IgV. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52H/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 567. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотные модификации N52H/N57Y/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 565. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотные модификации N52L/N57H/Q100R. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 761. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит модификации аминокислот N52H/N57Y/Q100P. В некоторых из любых предлагаемых воплощений

вариантный полипептид ICOSL имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 570. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную модификацию N52D. В некоторых из любых предлагаемых воплощений полипептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 548.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений иммуномодулирующий белок содержит домен мультимеризации, связанный с одним или обоими из вариантов полипептида ICOSL или второго полипептида, содержащего домен IgSF. В некоторых случаях мультимеризационный домен представляет собой Fc-домен или его вариант с пониженной эффекторной функцией.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений иммуномодулирующий белок является димерным. В некоторых случаях иммуномодулирующий белок является гомодимерным. В некоторых аспектах иммуномодулирующий белок является гетеродимерным.

В настоящем документе представлен конъюгат, содержащий любой из предлагаемых вариантных полипептидов ICOSL или любой из предоставленного иммуномодулирующего белка и гетерологичного фрагмента. В некоторых случаях вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с гетерологичным фрагментом. В некоторых из любых предлагаемых воплощений нацеливающий фрагмент представляет собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное вещество или наночастицу. В некоторых примерах целевой фрагмент представляет собой белок или пептид. В некоторых из любых предлагаемых воплощений конъюгат представляет собой гибридный белок.

Предоставлен гибридный белок, содержащий любой из предлагаемых вариантных полипептидов ICOSL или любой из предлагаемых иммуномодулирующего белка и гетерологичного фрагмента. В некоторых случаях фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой на поверхности клетки. В некоторых примерах нацеливающий фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки. В некоторых из любых предлагаемых воплощений иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку или лимфоцит. В некоторых случаях нацеливающий фрагмент представляет собой локализующий опухоль фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности опухоли.

В некоторых из предлагаемых воплощений нацеливающий фрагмент связывается с молекулой HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (рецептор IL-2Rα), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, раковый антиген

125 (CA125), альфа-фетопротеина (AFP), Льюис Y, TAG72, каприн-1, мезотелина, рецептора PDGF (PDGFR; такого как PDGF-Rα), PD-1, PD-L1, CTLA- 4, рецептора IL-2, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, глипикана-3, gpA33, муцинов, CAIX, PSMA, фолат-связывающего белка, ганглиозидов (такие как GD2, GD3, GM1 и GM2) , рецептора VEGF (VEGFR), VEGFR2, VEGF-A, интегрина αVβ3, интегрина α5β1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, тенасцина, AFP, комплекса BCR, CD3, CD18, CD44, CTL, CTL-4, gp72, HLA-DR 10 β, антигена HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, антигена PEM, металлопротеиназ, рецептора эфрина, лигандов эфрина, рецептора HGF, CXCR4, CXCR4, рецептора бомбезина, антигена SK-1, Bcr- abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, mTOR, TSC1 , TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-3, MEK1, MEK2, SMO или B7-H6 (NCR3LG1). В некоторых аспектах нацеливающий фрагмент связывается с PD-L1.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из предлагаемых воплощений антитело выбрано из цетуксимаба, панитумумаба, залутумумаба, нимотузумаба, трастузумаба, адотрастумумаба, эмтансина, тозитумомаба (Bexxar®), ритуксимаба (Rituxan, Mabthera), Ибритумомаб тиуксетана (Zevalin), даклизумаба (Zenapax), гемтузумаба (Mylotarg), алемтузумаба, фрагмента Fab CEA-скана, моноклонального антитела OC125, ab75705, B72.3, бевацизумаба (Avastin®), афатиниба, акситиниба, бозутиниба, кабозантиниба, церитиниба, кризотиниба, дабрафениба, дасатиниба, динутуксимаба (UnituxinTM), эрлотиниба, эверолимуса, ибрутиниба, иматиниба, лапатиниба, ленватиниба, нилотиниба, олапариба, оларатумаба (LartruvoTM), палбоциклиба, пазопаниба, пертузумаба (Perjeta®), рамукирумаба (Cyramza®), регорафениба, руксолитиниба, сорафениба, сунитиниба, темсиролимуса, траметиниба, вандетаниба, вемурафениба, висмодегиба, базиликсимаба, ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба, MPDL3280A, пидилизумаба (CT-011), AMP-224, MSB001078C или MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба или представляет собой их антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с N-концом тяжелой и/или легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых случаях вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с C-концом тяжелой и/или легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений конъюгат является

двухвалентным, четырехвалентным, шестивалентным или восьмивалентным. В некоторых из любых предлагаемых воплощений гетерологичный фрагмент представляет собой или содержит метку для обнаружения или очистки вариантного полипептида ICOSL.

В данном документе представлен одновалентный гибридный белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL, содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами); и метку для обнаружения или очистки вариантного полипептида ICOSL. В некоторых из любого из предлагаемых воплощений метка для обнаружения или очистки выбрана из полигистидиновой (His) метки, FLAG-метки, Myc-метки или метки из флуоресцентного белка.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положении, соответствующем положению (положениям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33 , 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96 , 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138 , 139, 140, 142, 143, 144, 146, 148, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194 , 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в положении, соответствующем положению (положениям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32.

В некоторых случаях одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P N57S, N57T, N57V, N57Y, N57W, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R,

Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V1101, V1103 H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, S121G, V122A, V122M, F120S, S126T, S126R, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, I143, T39S, I403 Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T19G195 L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативной аминокислотной замены. В некоторых случаях одна или несколько аминокислотных модификаций выбираются из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F92R H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107A, V107A, V107A, V107A S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R, S126T, H129P, T1F1, S3G130B, S2G5 T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161162, L161Q, L161S, M16L 75T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218, R220, I22, R220 T225S, N227K или их консервативной аминокислотной замены.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL содержит (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую домен IgV или домен IgC или их специфически связывающие фрагменты, или и то, и другое.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 545, 600-605 и 623-628. В некоторых аспектах референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 32, 196, 545, 600-605 и 623-628.

Предлагается молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая любой из предлагаемых вариантных полипептидов ICOSL, иммуномодулирующих белков или

гибридных белков. В некоторых случаях молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты является синтетической нуклеиновой кислотой. В некоторых примерах молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты представляет собой кДНК.

Предлагается вектор, содержащий любую из предлагаемых молекул нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях вектор является экспрессирующим вектором. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вектор представляет собой экспрессирующий вектор млекопитающего или вирусный вектор.

Предлагается клетка, содержащая любой из предлагаемых векторов. В некоторых случаях клетка является клеткой млекопитающего. В некоторых из любых предлагаемых воплощений клетка представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или ее производное.

Предлагается способ получения иммуномодулирующего белка, содержащего любой из вариантных полипептидов ICOSL, включающий введение любой из предлагаемых молекул нуклеиновой кислоты или векторов в клетку-хозяина в условиях для экспрессии белка в клетке. В некоторых примерах клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых случаях клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомяка или ее производное. В некоторых из любых предлагаемых воплощений способ дополнительно включает выделение или очистку белка из клетки.

Предлагается белок, полученный любым из предлагаемых способов.

Предлагается композиция, содержащая белок, содержащий любой из предлагаемых вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих белков, где, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% отдельных последовательностей белка или иммуномодулирующего белка в композиции имеют одинаковую длину последовательности, необязательно, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых из любых предлагаемых воплощений белок или иммуномодулирующий белок очищают из клеток яичника китайского хомяка или их производного.

Предлагается полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид ICOSL, содержащий предлагаемый трансмембранный домен, и одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного антигенного рецептора. В некоторых случаях рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых из любых предлагаемых воплощений каждая из нуклеиновых кислот, кодирующих вариантный полипептид

ICOSL, и одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора, отделена нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы.

В некоторых примерах полинуклеотид содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид ICOSL, нуклеиновую кислоту, кодирующую саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В некоторых примерах полинуклеотид включает нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид ICOSL, нуклеиновую кислоту, кодирующую первый саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, нуклеиновую кислоту, кодирующую одну сконструированную цепь TCR-альфа или сконструированную цепь TCR-бета, нуклеиновую кислоту, кодирующую второй саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, и нуклеиновую кислоту, кодирующую другую сконструированную цепь TCR-альфа или сконструированную цепь TCR-бета. В некоторых аспектах кодированный первый и второй саморасщепляющиеся пептиды является одинаковыми. В некоторых из любых предлагаемых воплощений саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A.

Предлагается вектор, содержащий любой из предлагаемых полинуклеотидов. В некоторых случаях вектор является вирусным вектором. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

Предлагается сконструированная клетка, содержащая любой из предлагаемых полинуклеотидов или векторов. Также предлагается сконструированная клетка, содержащая любой из предлагаемых вариантов полипептидов ICOSL, иммуномодулирующих белков или гибридных белков.

Предлагается сконструированная клетка, содержащая любую из предлагаемых нуклеотидных молекул или векторов. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок, кодирует сигнальный пептид. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующего белка или гибридного белка не содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок секретируется из сконструированной клетки. В некоторых аспектах сконструированная клетка содержит

вариантный полипептид ICOSL, содержащий трансмембранный домен. В некоторых аспектах вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых случаях иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC) или лимфоцит. В некоторых примерах сконструированная ячейка является первичной клеткой. В некоторых случаях клетка является клеткой млекопитающего. В некоторых случаях клетка является клеткой человека. В некоторых из любых предлагаемых воплощений лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых примерах сконструированная ячейка является APC, а APC является искусственной APC.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений сконструированная клетка дополнительно включает химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор.

Предлагается инфекционный агент, содержащий нуклеотидную молекулу, кодирующую предлагаемый вариантный полипептид ICOSL или предлагаемый иммуномодулирующий белок, предлагаемый гибридный белок. В некоторых случаях кодируемый вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок не содержит трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется. В некоторых из любых предлагаемых воплощений кодируемый вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок секретируется из инфекционного агента, когда он экспрессируется. В некоторых случаях кодированный вариантный полипептид ICOSL включает трансмембранный домен.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений кодированный вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется. В некоторых случаях инфекционным агентом является бактерия или вирус. В некоторых из любых предлагаемых воплощений вирус представляет собой онколитический вирус. В некоторых примерах онколитический вирус представляет собой аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус простого герпеса, вирус желудочно-кишечного тракта, реовирус, вирус ньюкаслской болезни, парвовирус, вирус кори, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус Коксаки или вирус осповакцины.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений вирус специфически воздействует на дендритные клетки (DC) и/или является тропным по отношению к дендритным клеткам. В некоторых случаях вирус представляет собой лентивирусный

вектор, который псевдотипируется с помощью модифицированного продукта оболочки вируса Синдбис. В некоторых из любых предлагаемых воплощений инфекционный агент дополнительно включает нуклеотидную молекулу, кодирующую дополнительный генный продукт, который приводит к гибели клетки-мишени или который может увеличивать или усиливать иммунный ответ. В некоторых из любых предлагаемых воплощений дополнительный генный продукт выбирают из противоопухолевого агента, антиметастатического агента, антиангиогенного агента, иммуномодулирующей молекулы, ингибитора иммунной контрольной точки, антитела, цитокина, фактора роста, антигена, продукта цитотоксического гена, продукта проапоптотического гена, продукта антиапоптотического гена, гена деградации клеточной матрицы, гена регенерации тканей или перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные.

Предлагается фармацевтическая композиция, содержащая любой из вариантных полипептидов ICOSL, иммуномодулирующих белков, конъюгатов или гибридных белков или любые из предлагаемых сконструированных клеток или инфекционных агентов. В некоторых из любых предлагаемых воплощений фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых из любых предлагаемых воплощений фармацевтическая композиция является стерильной.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений предлагается изделие, содержащее фармацевтическую композицию во флаконе. В некоторых случаях флакон запечатан.

Предлагается набор, содержащий любую из предлагаемых композиций и инструкции по применению. Также предлагается набор, содержащий любое из предлагаемых изделий и инструкции по применению.

Предлагается способ модулирования иммунного ответа у объекта, включающий введение фармацевтической композиции объекту. Также предлагается способ модулирования иммунного ответа у объекта, включающий введение сконструированных клеток. В некоторых случаях сконструированные клетки являются аутологичными для объекта. В некоторых из любых предлагаемых воплощений сконструированные клетки являются аллогенными для объекта.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений модулирующий иммунный ответ лечит заболевание или состояние у объекта. В некоторых аспектах иммунный ответ повышен.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений объекту вводят иммуномодулирующий белок или конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL, связанный с функциональным фрагментом, локализующим в опухоли. В некоторых

случаях функциональный фрагмент, локализующий в опухоли, представляет собой или включает связывающую молекулу, которая распознает опухолевый антиген. В некоторых из любых предлагаемых воплощений связывающая молекула включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или включает домен IgSF дикого типа или его вариант. В некоторых из любых предлагаемых воплощений иммуномодулирующий белок или конъюгат или гибридный белок вводят объекту. В некоторых из любых предлагаемых воплощений объекту вводят вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок. В некоторых случаях сконструированную клетку, содержащую вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, вводят объекту. В некоторых из любых предлагаемых воплощений заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак. В некоторых примерах заболевание или состояние выбраны из меланомы, рака легкого, рака мочевого пузыря, гемобластозов, рака печени, рака мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичек, рака яичников, рака матки, рака желудка, мышечно-скелетного рака, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, герминогенного рака или эндокринного и нейроэндокринного рака. В некоторых из любых предлагаемых воплощений иммунный ответ снижается.

В некоторых из любых предлагаемых воплощений изобретения вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий белок, который растворим, вводят объекту. В некоторых из любых предлагаемых воплощений растворимый иммуномодулирующий белок представляет собой иммуномодулирующий Fc-гибридный белок. В некоторых из любых предлагаемых воплощений объекту вводят предлагаемый вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующего белка или гибридного белка. В некоторых из любых предлагаемых воплощений изобретения сконструированная клетка, содержащая секретируемый вариантный полипептид ICOSL, вводится объекту. В некоторых из любых предлагаемых воплощений предлагаемая сконструированная клетка вводится объекту. В некоторых из любых предлагаемых воплощений инфекционный агент, кодирующий вариантный полипептид ICOSL, который является секретируемым иммуномодулирующим белком, вводят объекту, необязательно в условиях, в которых инфекционный агент инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку, и секретируемый иммуномодулирующий белок секретируется из зараженной клетки. В некоторых из любых предлагаемых воплощений заболевание или состояние представляет собой воспалительное или аутоиммунное заболевание или состояние. В некоторых примерах заболевание или состояние представляют собой васкулит, ассоциированный с

антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулит, аутоиммунное заболевание кожи, трансплантацию, ревматическую болезнь, воспалительное желудочно-кишечное заболевание, воспалительное заболевание глаз, воспалительное неврологическое заболевание, воспалительное заболевание легкого, воспалительное эндокринное заболевание или аутоиммунное гематологическое заболевание. В некоторых случаях болезнь или состояние выбраны из воспалительного заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита или псориаза.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны результаты импеданса, отражающие цитотоксическую активность клеток, сконструированных с помощью анти-CD19-химерного антигенного рецептора (CAR) самого по себе, или с примерными трансмембранными иммуномодулирующими TIP (CD80-TIP или ICOSL-TIP) или соответствующим трансмембранным белком CD80 или ICOSL дикого типа после совместного культивирования с целевыми антигенэкспрессирующими клетками. Импеданс оценивали с использованием анализатора клеток Acea Real-Time Cell Analyzer (RTCA), который измеряет изменения импеданса в культуральной среде 96-луночного микроэлектронного планшета (E-plate).

На фиг. 2A показано, что первичные Т-клетки эффективно трансдуцируются вирусами, кодирующими как CAR, так и TIP-белки. Первичные Т-клетки человека активировали 48 часов с помощью анти-CD3 плюс анти-CD28 гранул и затем трансдуцировали с помощью лентивируса, кодирующего анти-CD19 CAR с репортером BFP, плюс с помощью второго лентивируса кодирующего ICOSL TIP с репортером GFP. На графике FACS показана экспрессия BFP по оси y и экспрессия GFP по оси x и указан процент Т-клеток, которые попадают в каждый квадрант. Результаты показывают, что культуры включают только клетки, трансдуцированные CAR (верхний левый квадрант), только клетки, трансдуцированные TIP (нижний правый квадрант), клетки, трансдуцированные обоими вирусами (верхний правый квадрант), и клетки, которые не были ничем трансдуцированы (слева внизу). На фиг. 2B, TIP, экспрессированные на CAR-Т-клетках, обеспечивают совместную стимуляцию CAR-Т-клеток. Клетки CAR-T с котрансдукцией TIP или без нее были помечены Cell-Trace Far Red и инкубированы с клеточной линией CD19 + NALM6 для взаимодействия с CAR. Пролиферацию оценивали по проценту CAR-экспрессирующих клеток, которые имели разбавленный флуоресцентный краситель. Клетки, трансдуцированные мутантными TIP, показали увеличение пролиферации CAR + Т-клеток по сравнению с теми, у которых нет TIP или

теми, которые трансдуцированы ICOSL дикого типа. Клетки, трансдуцированные пустым контролем, которые утратили экспрессию CAR, в этом анализе не пролиферировали.

На фиг. 3A-3B с помощью высвобождения цитокинов показана костимулирующая способность ICOSL дикого типа (WT) или варианта ICOSL при коиммобилизации с анти-CD3. 10 нМ анти-CD3 мокрым способом наносили на лунки 96-луночных полистирольных культуральных планшетов с плоским дном с 40 нМ (стрелки) или 10 нМ ICOSL WT или вариантного ICOSL. Добавляли 100 000 очищенных CD4+ и CD8+ (пан) Т-клеток и надосадочную жидкость собирали через 72 часа для анализа высвобождения цитокинов с помощью ELISA. фиг. 3B демонстрирует уровень белка IL-17, секретируемых пан Т-клетками. Графики являются типичными ответами IFN-гамма и IL-17 на костимуляцию пан Т-клеток.

Фиг. 4A-4B демонстрируют посредством пролиферации костимулирующую способность ICOSL дикого типа (WT) или варианта ICOSL при коиммобилизации с анти-CD3. CFSE-меченые пан Т-клетки инкубировали в планшетах, покрытых анти-CD3 и ICOSL, как описано выше, в течение 72 часов. Клетки собирали, промывали, окрашивали флуоресцентно конъюгированными анти-CD4 или анти-CD8 антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии. Ворота и вольтажи цитометра устанавливали с использованием нестимулированных контрольных CFSE-меченых Т-клеток. Пролиферацию определяли по разбавлению CFSE относительно контроля. Фиг. 4A демонстрирует проценты от общего количества пролиферирующих (стрелки), CD4+ (сплошной столбец) и CD8+ клеток (штрихованный столбец) Т-клеток после костимуляции 40 нМ ICOSL. Фиг. 4B демонстрирует процент пролиферации всех пан Т-клеток после костимуляции 10 нМ ICOSL. Графики представляют типичный пролиферативный ответ на костимуляцию пан-Т-клеток.

На фиг. 5 изображена функция кандидата ICOSL vIgD в реакции смешанных лимфоцитов человека (MLR). Варианты ICOSL и их мутации перечислены на оси x, а также ICOSL дикого типа, отрицательные контрольные группы PDL2-Fc и человеческий IgG, а также положительная контрольная молекула CTLA-Ig белатацепт. Линия по графику представляет базовое количество IFN-гамма, обнаруженное в надосадочных жидкостях культур отрицательного контроля. Для каждого кандидатного варианта ICOSL или контрольного ICOSL были протестированы три различных концентрации, при этом стрелки, указывают на самую высокую концентрацию белка в культурах при 40 нМ. Большинство кандидатов вариантов ICOSL демонстрируют превосходную антагонистическую активность во всех трех протестированных концентрациях по сравнению с белатацептом, что отражается в меньшей концентрации IFN-гамма в этих

культурах.

На фиг. 6A-6D показано ингибирование растворимыми ICOSL Fc-гибридными белками ответов B- и T-клеток в анализе совместной культивирования B-T-клеток. На фиг. 6A показано ингибирование растворимыми ICOSL Fc-гибридными белками, пролиферации B-клеток, управляемой T-клетками. Очищенные CD4+ T-клетки и B-клетки от одного донора метили CFSE и совместно инкубировали в соотношении 1:1 в присутствие или в отсутствие указанных митогенов с или без указанных ICOSL Fc-гибридных белков. Клетки стимулировали энтеротоксином B стафилококка (SEB) при 100 нг/мл, митогеном фитолакки (PWM) в дозе 1 мг/мл или и тем, и другим. ICOSL Fc-гибридные белки включали при конечной концентрации 40 нМ, и культуры инкубировали в течение 7 дней и подвергали анализу FACS. Количество поделившихся B-клеток определяли по количеству клеток в культурах, которые имели разбавленный CFSE. Все ICOSL Fc-гибридные белки тестировали, за исключением белка дикого типа, на предмет пролиферации редуцированных B-клеток. Фиг. 6B-D показывают, что ICOSL Fc-гибридные белки ингибируют продуцирование цитокинов T-клеток в совместных B-T культурах. Надосадочные жидкости из описанных выше культур собирали на 7-й день и анализировали на содержание цитокинов с использованием LEGENDplex Human Th Cytokine Panel (Biolegend). Выработка T-клетками IL-5 (фиг. 6B), IL-13 (фиг. 6C) и IL-21 (фиг. 6D) ослабляется при включении ICOSL Fc-гибридных белков.

На фиг. 7A-7F изображены различные конечные точки в мышиной модели реакции трансплантат против хозяина (GVHD), где человеческие PBMC-клетки были адоптивно перенесены в иммунодефицитных хозяев, NSG-мышей. Фиг. 7A показаны кривые выживаемости обработанных животных. Агрессивное течение болезни и последующую смертность наблюдали у животных с контрольным физраствором, при этом наблюдали одинаковую выживаемость у животных, получавших ICOSL-Fc дикого типа, а также вариантный ICOSL N52H/I143T. Вариант N52H/N57Y/Q100P имел улучшенные показатели выживаемости, сравнимые с клиническим эталоном белатацептом. На Фиг. 7B показаны аналогичные тенденции в потере массы тела с вариантом ICOSL N52H/N57Y/Q100P, демонстрирующим аналогичное поддержание массы, как у животных, обработанных белатацептом, хотя все остальные группы испытывали быструю потерю массы. Фиг. 7C демонстрирует клинические баллы по стандартизованному индексу активности (DAI) заболевания GVHD, опять демонстрируя более низкие баллы у животных, получавших вариантный ICOSL N52H/N57Y/Q100P, что сопоставимо с клиническим эталоном белатацептом, в то время как другие группы животных получали более высокие баллы DAI. На фиг. 7D показано проточное цитометрическое измерение

CD4 и CD8 в крови у экспериментальных животных, проведенное на 14-й день. Процент клеток CD8 между экспериментальными группами был в основном одинаковым, однако животные, обработанные вариантом ICOSL N52H/N57Y/Q100P и белатацептом, имели более низкий процент CD4-клеток по сравнению с другими экспериментальными группами.

На фиг. 7E показаны кривые выживаемости из аналогичного эксперимента, в котором тестируются дополнительные вариантные молекулы ICOSL. На фиг. 7F показаны клинические баллы из аналогичного эксперимента, в котором тестируются дополнительные вариантные молекулы ICOSL.

На фиг. 8 показана костимулирующая активность, придаваемая указанной вариантной стековой молекулой vIgD C-L, где C представляет собой костимулирующий домен ICOSL, а L представляет собой локализующий домен NKp30. В этом анализе клетки-мишени K562, экспрессирующие локализованный на поверхности белок B7-H6, культивировали в присутствии анти-CD3 с человеческими Т-клетками, а активацию Т-клеток оценивали по уровням IFN-гамма в надосадочных жидкостях культуры. Анти-CD3 отдельно или нестековые вариантные молекулы Fc не индуцируют активацию Т-клеток. Аналогичным образом, клетки, культивируемые только с локализующим доменом NKp30 дикого типа или только костимулирующим доменом ICOSL дикого типа, как Fc-гибридные белки, не приводили к активации Т-клеток. Стековый домен, содержащий версию дикого типа как костимулирующего домена, так и локализующего домена, индуцировал измеряемый IFN-гамма при наиболее высокой концентрации, однако, вариантный локализующий костимулирующий стек индуцировал более чем в два раза высокие уровни IFN-гамма при максимальной концентрации, и уровни IFN-гамма, которые все еще наблюдались по мере того, как концентрацию титровали вниз.

На фиг. 9 подытожены изменения толщины ушей у мышей в стандартной модели гиперчувствительности замедленного типа (DTH). Животные, обработанные PBS, сенсибилизированные овальбумином и затем получившие провокационную пробу на ухе одним и тем же белком, показали самый высокий уровень измеренного отека уха. У мышей, получавших клинический контроль абатацепт, отек уха после теста на ухе незначительно уменьшился. Все пять групп обработки ICOSL продемонстрировали равное или улучшенное снижение припухлости уха по сравнению с абатацептом.

На фиг. 10A-10C показаны различные примерные конфигурации вариантного домена IgSF (vIgD), конъюгированного с антителом (V-Mab). На фиг. 10A показаны различные конфигурации, в которых vIgD непосредственно или опосредованно связан с N- и/или C-концом легкой цепи антитела. На фиг. 10B показаны различные конфигурации, в

которых vIgD непосредственно или опосредованно связан с N- и/или C-концом легкой цепи антитела. На фиг. 10C показаны итоговые конфигурации V-Mab, когда легкая цепь по фиг. 10A и тяжелая цепь фиг. 10B коэкспрессируются в клетке.

На фиг. 11A-11B продемонстрирована специфичность V-Mab для когнатных партнеров по связыванию. Анализы связывания проводили на клетках Expi293, временно трансфицированных ДНК для поверхностной экспрессии HER2, CD28, CTLA-4 или ICOS человека на клетках млекопитающих. 200 000 трансфецированных клеток инкубировали с 100 000 пМ-100 пМ родительских антител (C1) или различных V-Mab (C2-9). Несвязанное антитело удаляли, связанное антитело детектировали с помощью флуоресцентно конъюгированного антитела против IgG человека, и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на предмет MFI и процента положительных значений на основании Fc-контролей. Фиг. 11A демонстрирует связывание трансфектантов V-Mab с HER2 на уровнях, сходных с родительским антителом. Связывание с клетками, трансфицированными пустым контролем, наблюдалось со всеми V-Mab, но не с WT ICOSL, из-за низких уровней эндогенной экспрессии HER2 на родительских клетках Expi293. Фиг. 11B демонстрирует, что связывание родительского домена IgSF (N52H/N57Y/Q100P) с его когнатными партнерами поддерживается или увеличивается (C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9) с помощью V-Mab.

Фиг. 12 демонстрируется костимулирующая и пролиферативная способность V-Mab при коиммобилизации с анти-CD3. 10 нМ анти-CD3 покрывали мокрым способом лунки 96-луночных культуральных полистирольных планшетов с плоским дном с 30 нМ-3 нМ родительского антитела, V-Mab или Fc-контроля. CFSE-меченые Т-клетки добавляли в течение 72 часов. Секрецию IFN-гамма измеряли с помощью ELISA и общую пролиферацию Т-клеток измеряли с помощью проточного цитометрического анализа CFSE-разведения. Секреция IFN-гамма и пролиферация домена IgSF (N52H/N57Y/Q100P) выше, чем WT ICOSL. V-Mab демонстрируют повышенную цитокиновую и пролиферативную костимулирующую способность по сравнению с родительским IgSF.

На фиг. 13A-13C показаны различные форматы предлагаемых вариантов молекул домена IgSF. Фиг. 13A демонстрирует растворимые молекулы, включая: (1) вариантный домен IgSF (vIgD), слитый с цепью Fc; (2) стековая молекула, содержащая первый вариантный домен IgSF (первый vIgD) и второй домен IgSF, такой, как второй вариантный домен IgSF (второй vIgD); (3) молекула IgSF, нацеленная на опухоль, содержащая первый вариантный домен IgSF (vIgD) и домен IgSF, который нацелен на опухолевый антиген, такой как домен IgSF NkP30; и (4) вариантный домен IgSF (vIgD), связанный с антителом (V-Mab). Фиг. 13B продемонстрирован трансмембранный иммуномодулирующий белок

(TIP), содержащий вариантный домен IgSF (vIgD), например вариантный ICOSL, экспрессируемый на поверхности клетки. В примерном воплощении когнатный партнер связывания трансмембранного связанного vIgD представляет собой костимулирующий рецептор, например CD28, а TIP, содержащий vIgD (например, ICOSL vIgD), выступает в качестве антагониста по отношению к костимулирующему рецептору, так что TIP индуцирует положительный сигнал в клетке, экспрессирующей костимулирующий рецептор. Фиг. 13C демонстрирует секретируемый иммуномодулирующий белок (SIP), в котором вариантный домен IgSF (vIgD), например, вариантный ICOSL, секретируется из клетки, такой как первая Т-клетка (например, CAR Т-клетки). В примерном воплощении когнатный партнер связывания секретируемого vIgD представляет собой активирующий рецептор, например CD28, который может быть экспрессирован в первой клетке (например, Т-клетке, такой как CAR Т-клетка) и/или во второй клетке (например, Т-клетке, либо эндогенной, либо сконструированной, такой как CAR Т-клетка). При связывании SIP с его когнатным партнером связывания блокируется сигнализация через активирующий рецептор. Во всех случаях vIgD может быть только V-доменом (IgV), комбинацией V-домена (IgV) и C-домена (IgC), включая весь внеклеточный домен (ECD) или любую комбинацию Ig-доменов представителя суперсемейства IgSF.

Фиг. 14 продемонстрирована примерная схема активности вариантного домена IgSF (vIgD), слитого с Fc (vIgD-Fc), в котором vIgD является вариантом домена IgSF из ICOSL. Как показано, растворимый vIgD из ICOSL взаимодействует со своими когнатными партнерами по связыванию для блокирования взаимодействий CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) или ICOSL с CD28 или ICOS соответственно, тем самым блокируя костимуляцию с помощью костимулирующих рецепторов CD28 и/или ICOS.

Фиг. 15 показана примерная схема стековой молекулы для локализации вариантного домена IgSF (vIgD) в опухолевой клетке. В этом формате стековая молекула включает первый вариантный домен IgSF (первый vIgD) и второй домен IgSF (например, второй vIgD), в котором второй домен IgSF (например, второй vIgD) представляет собой домен IgSF, нацеленный на опухоль, который связывается с опухолевым антигеном. Примерный домен IgSF, нацеленный на опухоль, представляет собой домен IgSF NkP30, который связывается с опухолевым антигеном B7-H6. На этом изображении vIgD является вариантом домена IgSF из ICOSL. Как показано, связывание домена IgSF, нацеленного на опухоль, на поверхности опухолевой клетки локализует первый vIgD на поверхности опухолевых клеток, где он может взаимодействовать с одним или несколькими его когнатными партнерами по связыванию (например, CD28 или ICOS), экспрессированными на поверхности соседней иммунной клетки (например, Т-клетки) для стимуляции

костимулирующего рецептора.

Фиг. 16A показаны различные примерные конфигурации стековой молекулы, содержащей первый вариантный домен IgSF (первый vIgD), например, вариантный ICOSL, и второй домен IgSF, такой как второй вариантный домен IgSF (второй vIgD). Как показано, первый vIgD и второй домен IgSF независимо связаны, прямо или опосредованно, с N- или C-концом Fc-области. Для получения гомодимерной молекулы Fc, Fc-область является областью, которая способна формировать гомодимер с соответствующей Fc-областью при совместной экспрессии отдельных Fc-областей в клетке. Для генерации гетеродимерной молекулы Fc, индивидуальные Fc-области содержат мутации (например, мутации типа "выступ-во-впадину" в домене CH3), так что образование гетеродимера предпочтительнее по сравнению с образованием гомодимера, когда отдельные Fc-области совместно экспрессируются в клетке.

На фиг. 16B показаны различные примерные конфигурации стековой молекулы, содержащей первый вариантный домен IgSF (первый vIgD), второй домен IgSF, такой как второй вариантный домен IgSF (второй vIgD) и третий домен IgSF, такой как третий вариантный домен IgSF (третий vIgD). Как показано, первый vIgD и второй IgSF и третий IgSF домены независимо связаны, прямо или опосредованно, с N- или C-концом Fc-области. Для получения гомодимерной молекулы Fc, Fc-область является областью, которая способна формировать гомодимер с соответствующей Fc-областью при совместной экспрессии отдельных Fc-областей в клетке.

На фиг. 17 показана примерная схема активности вариантного домена IgSF (vIgD), конъюгированного с антителом (V-Mab), в котором антитело (например, антитело против HER2) связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки. На этом изображении vIgD является вариантом домена IgSF из ICOSL. Как показано, связывание антитела с поверхностью опухолевой клетки локализует vIgD на поверхности опухолевых клеток, где он может взаимодействовать с одним или несколькими его когнатными партнерами связывания, экспрессируемыми на поверхности соседней иммунной клетки (например, Т-клетки) для оказания агонистического воздействия на рецепторную сигнализацию. В иллюстративном воплощении, как показано, вариантный домен IgSF (vIgD) является вариантом домена IgSF из ICOSL. Связывание ICOSL vIgD с костимулирующими рецепторами CD28 или ICOS обеспечивает агонистический или костимулирующий сигнал.

Фиг. 18 изображает транскрипционную сигнатуру первичных Т-клеток человека при инкубации с 10 нМ анти-CD3 с 40 нМ контрольного белка Fc, ICOSL-Fc дикого типа, CD80-Fc дикого типа, с, обоими этими белками или вариантными ICOSL-Fc-гибридными белками с указанными мутациями. Общую РНК из образцов получали из собранных

клеток и переносили РНК на «Nanostring», а чип «Cancer Immune» использовали для количественного определения транскриптов 750 генов в каждом образце. Измененные транскрипты включают те, уровень которых выше или ниже диагональной линии, включая отмеченные транскрипты.

На фиг. 19 показаны уровни транскриптов примерных транскриптов при инкубации, как описано на фиг. 18 в указанные моменты времени в присутствие различных иммуномодулирующих белков.

На фиг. 20A-20B показана VmAb-опосредованная пролиферация Т-клеток при совместном культивировании с мишенями, экспрессирующими HER2. Меченые CFSE пан Т-клетки активировали с помощью искусственных клеток-мишеней, полученных из клеток K562, презентирующих анти-CD3 одноцепочечные Fv (OKT3) и HER2 на поверхности клетки, в присутствии VmAb или контрольных белков. Пролиферацию измеряли с помощью проточного цитометрического анализа по разведению CFSE в окрашенных CD4 + (левая панель) или окрашенных CD8 + (правая панель) Т-клетках. На фиг. 20A клетки K562 титровали и покрывали с Т-клетками в соотношении эффектор:мишень (E:T) от 40 до 1280:1. VmAb, родительский домен IgSF или WT ICOSL добавляли при 1000 пМ. На фиг. 20B, клетки K562 добавляли к Т-клеткам для соотношения E: T 160: 1. VmAb или контрольные белки титровали и добавляли при температуре от 3000 до 37 пМ.

На фиг. 21 показаны исследования пролиферации Т-клеток, трансдуцированных различными трансмембранными иммуномодулирующими белками (TIP), содержащими домен IgSF, и примерными рекомбинантными E6-специфическими TCR в первичных Т-клетках человека.

Фиг. 22A-22G демонстрируют SEC-анализ протеолиза в молекулах Fc-гибридов с вариантными ICOSL, содержащих мутации N52H/N57Y/Q100R/F172S, полученные в различных референсных последовательностях, таких как белки Fc-гибридов с укороченным ICOSL ECD, Fc-гибридов с отдельным доменом IgV ICOSL, и/или Fc-гибридов с вариантными ICOSL с мутациями в N207G/L208G относительно референсной последовательности внеклеточного домена (ECD) ICOSL, приведенной в SEQ ID NO: 32. Молекулы экспрессировали с использованием клеток, полученных из ExpiCHO-S.

На фиг. 23A-23B представлена пролиферация человеческих CD4 и CD8 Т-клеток, стимулированных клетками K652, экспрессирующими вариантные TIP ICOSL, содержащие ECD, включающий аффинно-модифицированный IgSF с аминокислотными мутациями, соответствующими N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 288), N52H/N57Y/Q100R (SEQ ID NO: 283) и E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R (SEQ

ID NO: 300).

Фиг. 24A демонстрирует связывание V-mAb с HER2 и CD28. Фиг. 24B-24F демонстрируют результаты костимуляции VmAb Т-клеток с использованием системы трансфицированных клеток на основе клеток Jurkat с люциферазным репортером промотора IL-2, показывающие, что V-mAb обеспечивали значительный костимулирующий сигнал в присутствии клеток HER2 + K562/OKT3.

На фиг. 25A-25D изображено связывание стековых Fc-гибридных молекул с клетками, экспрессирующими когнатных партнеров по связыванию B7H6 (фиг. 25A), ICOS (фиг. 25B), CD28 (фиг. 25C) и CTLA-4 (фиг. 25D).

На фиг. 26A-26B представлены исследования биологической активности для образцов протестированных стековых белков ICOSL/NKp30.

На фиг. 27 изображена пролиферация, индуцированная стековыми белками ICOSL/NKp30, измеренная с помощью проточной цитометрии при разведении CFSE на окрашенных CD4 + или CD8 + Т-клетках.

На фиг. 28 показаны противоопухолевые эффекты комбинации протестированного стекового белка ICOSL/NKp30 и mAb mPD-1.

На фиг. 29A-29E показана противовоспалительная активность профилактической дозы примерной молекулы Fc-гибрида с ICOSL IgV в модели коллаген-индуцированного артрита (CIA), включая средний суммарный балл лапы (фиг. 29A), детектируемый CII IgG (фиг. 29B) уровни сывороточных цитокинов (фиг. 29C), CD44 + активированные Т-клетки или TFH-клетки (фиг. 29D) и фракция B-клеток в дренирующем лимфатическом узле (фиг. 29E).

На фиг. 30A-30D показана противовоспалительная активность при введении дозы с замедленным высвобождением примерной молекулы гибрида Fc с ICOSL IgV в модели коллаген-индуцированного артрита (CIA), включая средний суммарный балл лапы (фиг. 30A) и уровни цитокинов в сыворотке (фиг. 30C- 30D).

На фиг. 31A-31D показаны противовоспалительная активность замедленного дозирования примерной молекулы гибрида Fc с ICOSL IgV в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), включая балл EAE (фиг. 31A), проточный цитометрический анализ Т-клеток пахового лимфатического узла (фиг. 31C) и провоспалительные цитокины (фиг. 31D).

На фиг. 32A-32B изображен балл выживаемости и DAI у мышей с болезнью трансплантат против хозяина (GvHD), получавших различные дозы (20, 100 или 500 мкг) молекулы вариантного ICOSL IgV-Fc.

На фиг. 33A-33F показаны результаты анализа проточной цитометрии соотношения

«трансплантат против хозяина» (GvHD) клеток человека/клеток мыши в собранной крови (фиг. 33A) или общего количества Т-клеток (фиг. 33B) в конце исследование и оценка клеток ICOS+ CD4+ или CD8+ (фиг. 33C-33D) или клеток CD28 + CD4+ или CD8+ (фиг. 33E-33F) из мышей с болезнью "трансплантат против хозяина" (GvHD), получавших различные дозы (20, 100 или 500 мкг) вариантной молекулы ICOSL IgV-Fc.

На фиг. 34A-34B изображена экспрессия маркеров активации или истощения Т-клеток у мышей с болезнью "трансплантат против хозяина" (GvHD), получавших различные дозы (20, 100 или 500 мкг) вариантной молекулы ICOSL IgV-Fc.

На фиг. 34C показано отношение Т-эффекторных клеток (Teff) к Т-регуляторным клеткам (Treg) у мышей с болезнью "трансплантат против хозяина" (GvHD), которых лечили различными дозами (20, 100 или 500 мкг) вариантной молекулы ICOSL IgV-Fc.

На фиг. 35A-35D изображены сывороточные провоспалительные цитокины от мышей "трансплантат против хозяина" (GvHD), которых лечили различными дозами (20, 100 или 500 мкг) вариантной молекулы ICOSL IgV-Fc. На фиг. 35E изображено экспонирование в сыворотке вариантного ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) в модели GVHD по сравнению с нормальными мышами.

На фиг. 36A показаны результаты DAI, а на фиг. 36B показаны результаты гистологии обработки примерного вариантного ICOSL IgV-Fc по индексу активности болезни (DAI), рассчитанному по массе тела и баллам стула в модели индуцированного колита CD4 + CD45RBhigh.

Подробное описание

Предлагаемое в данном документе является иммуномодулирующими белками, которые представляют собой или включают варианты или мутанты лиганда ICOS (ICOSL) или их специфические связывающие фрагменты, которые обладают активностью связываться, по меньшей мере, с одним когнатным партнером связывания целевого лиганда (также называемым контрструктурным белком). В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL содержат одну или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотные замены, делеции или добавления) по сравнению с референсным (например, немодифицированным полипептидом) ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций (например, аминокислотные замены, делеции или добавления) находятся в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) (например, IgV) референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененную, например, повышенную или пониженную,

связывающую активность или аффинность, по меньшей мере, по отношению к одному когнатному связывающему партнеру, такому как, по меньшей мере, один из ICOS, CD28 или CTLA-4. В некоторых воплощениях иммуномодулирующие белки являются растворимыми. В некоторых воплощениях иммуномодулирующими белками являются трансмембранные иммуномодулирующие белки, способные экспрессироваться на поверхности клеток. В некоторых воплощениях в данном документе также представлены один или несколько других иммуномодулирующих белков, которые представляют собой конъюгаты или гибридные белки, содержащие вариантный полипептид ICOSL, представленный в данном документе, и один или несколько других фрагментов или полипептидов.

В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL и иммуномодулирующие белки модулируют иммунный ответ, например, увеличенный или уменьшенный иммунный ответ. В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL и иммуномодулирующие белки, представленные в данном документе, могут быть использованы для лечения заболеваний или состояний, которые связаны с дисрегулированным иммунным ответом.

В некоторых воплощениях предлагаемые вариантные полипептиды ICOSL модулируют активацию Т-клеток посредством взаимодействия с костимулирующими сигнальными молекулами. В общем, антигенспецифическая Т-клеточная активация требует двух различных сигналов. Первый сигнал обеспечивается взаимодействием Т-клеточного рецептора (TCR) с антигенами, ассоциированными с главными комплексами гистосовместимости (MHC), присутствующими на антигенпрезентирующих клетках (APC). Второй сигнал является костимулирующим для вовлечения TCR и необходим для предотвращения апоптоза или анергии Т-клеток.-

В некоторых воплощениях в нормальных физиологических условиях опосредованный Т-клетками иммунный ответ инициируется распознаванием антигена Т-клеточным рецептором (TCR) и регулируется балансом костимулирующих и ингибирующих сигналов (т.е. иммунных чекпоинт-рецепторов). Иммунная система опирается на иммунные чекпоинт-рецепторы для того, чтобы предотвратить аутоиммунитет (то есть, аутотолерантность) и защитить ткани от чрезмерного повреждения во время иммунного ответа, например, во время атаки на патогенную инфекцию. В некоторых случаях, однако, эти иммуномодулирующие белки могут быть дисрегулированы при заболеваниях и состояниях, включая опухоли, в качестве механизма уклонения от иммунной системы.

В некоторых воплощениях, среди известных Т-клеточных костимулирующих

рецепторов представлен CD28, который является Т-клеточным рецептором для костимулирующих лигандов B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), оба из которых присутствуют на APC. Эти же лиганды могут также связываться с ингибирующим Т-клеточным рецептором CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный белок 4) с большей аффинностью, чем с CD28; связывание с CTLA-4 действует для понижающей модуляции иммунного ответа. ICOS (индуцируемый костимулятор) является еще одним Т-клеточным костимулирующим рецептором, который связывается с лигандом ICOS (ICOSL) на APC. В некоторых случаях также известно, что CD28 и CTLA-4 взаимодействуют с ICOSL в сайте связывания, который перекрывается со связыванием ICOSL с Т-клеточным костимулирующим рецептором ICOS (Yao et al. (2011) Immunity, 34:729-740). Хотя CD28 и ICOS относятся к активирующим рецепторам семейства CD28, которые имеют некоторые общие внутриклеточные сигнальные мотивы, костимулирующие эффекты между CD28 и ICOS различаются. Например, CD28 экспрессируется как на неактивированных, так и на активированных Т-клетках, и его сигнальный путь важен для продуцирования IL-2 и последующей эффекторной функции Т-клеток. ICOS обычно не экспрессируется на поверхности Т-клеток до момента активации Т-клеток, а передача сигналов через ICOS на активированных Т-клетках поддерживает специализированную дифференцировку подмножества Т-клеток. Таким образом, в некоторых случаях костимуляция CD28 и ICOS дает перекрывающиеся и дополнительные эффекты.

В некоторых аспектах Т-клетки экспрессируют костимуляторные молекулы CD28 и ICOS, которые взаимодействуют с CD80/CD86 и ICOSL, соответственно, на антигенпрезентирующих клетках (APC). В лимфоидных органах профессиональные APC (то есть дендритные клетки, макрофаги и В-клетки) экспрессируют CD80, CD86 и ICOSL и вовлекают CD28+/ICOS+ Т-клетки. В некоторых воплощениях активированные Т-клетки могут затем дифференцироваться в эффекторные клетки, такие как CD8 + цитотоксические Т-клетки (CTL), IL-17A/F-секретирующие CD4+ Th17 клетки или CD4+ фолликулярные хелперные клетки (TFH). Экспрессирующие TFH CD40L вовлекают В-клетки в лимфоидные фолликулы и выделяют цитокины (например, IL-21), индуцируя дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, секретирующие антитела (Ab). Плазматические клетки могут продуцировать повреждающие ткани антитела, например, антитела против ревматоидного фактора (RF) и цитруллинированных пептидов (ACPA) у людей, и анти-коллагеновые (CII) антитела у мышей, которые могут образовывать иммунные комплексы и отложения в суставах и других тканях. ICOSL также может быть экспрессирован на непрофессиональных APC, что приводит к активации Т-клеток в нелимфоидных тканях и дальнейшему повреждению тканей и суставов.

В некоторых аспектах CD4+ Th1-, Th9- и Th17-клетки участвуют в качестве ключевых факторов развития рассеянного склероза (MS) путем усиления воспаления в ЦНС как при рассеянном склерозе, так и при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите и фолликулярные CD4+ ICOS+ CXCR5+ Т-хелперы увеличиваются в PBMC при ремиттирующем и коррелирующем с прогрессированием заболевания при вторично прогрессирующем MS. В некоторых воплощениях значительно повышена экспрессия гена ICOS в клетках спинномозговой жидкости, при вторичном прогрессирующем MS, и наблюдается повышенный процент общих моноцитов и моноцитов, экспрессирующих ICOSL. ICOSL также экспрессируется на непрофессиональных APC, что приводит к активации Т-клеток в нелимфоидных тканях и дальнейшему повреждению тканей.

Среди предлагаемых вариантных полипептидов ICOSL находятся полипептиды, которые при модификации одной или несколькими аминокислотными модификациями домена IgSF референсного полипептида ICOSL проявляют повышенную аффинность связывания с CD28 и/или ICOS. В некоторых случаях общее увеличение связывания с ICOS в предлагаемых вариантах меньше, чем увеличение связывания с CD28, поскольку ICOSL дикого типа уже демонстрирует существенно более высокую аффинность связывания с ICOS, чем с CD28. Также предлагаются различные форматы предлагаемых вариантных полипептидов. Как показано в данном документе, альтернативные форматы могут облегчать манипулирование иммунным ответом и, следовательно, терапевтическое применение. Например, в данном документе показано, что доставка усиленных белков ICOSL в растворимых форматах противодействует активации Т-клеток путем ингибирования передачи сигналов CD28 и/или ICOS. В других примерах привязывание различных молекул ICOSL к поверхности облегчает активацию Т-клеток, обеспечивая костимуляторный сигнал. Предусмотрены различные стратегии привязывания для локализации доставки костимулирующего сигнала Т-клеток, включая, без ограничения указанным, прямое нанесение покрытия на пластик, использование другого вариантного домена IgSF для локализации на белке-мишени, связанном с пластиной или экспрессируемом на клеточной поверхности, или слияние вариантного белка ICOSL с опухолеспецифическим моноклональным антителом.

В некоторых воплощениях модуляция иммунной сигнализации, достигаемая предлагаемыми вариантными полипептидами ICOSL и иммуномодулирующими полипептидами, предлагает преимущества для лечения воспалительных и аутоиммунных расстройств и других заболеваний и состояний по сравнению с другими способами лечения. Однако в некоторых случаях, однако, терапии для вмешательства и изменения

костимулирующих эффектов обоих рецепторов ограничены требованиями пространственной ориентации, а также ограничениями по размеру, налагаемыми границами иммунологического синапса. В некоторых аспектах существующие терапевтические лекарственные средства, в том числе антитела, могут быть не способны взаимодействовать одновременно с несколькими целевыми белками, участвующими в модулировании этих взаимодействий. Кроме того, в некоторых случаях существующие терапевтические лекарственные средства могут обладать способностью к антагонизму, но не к агонизму в отношении иммунного ответа. Кроме того, фармакокинетические различия между лекарственными средствами, которые независимо нацелены на один или другой из этих двух рецепторов, могут создавать трудности в правильном поддержании желаемой концентрации в крови таких комбинаций лекарств на протяжении всего курса лечения.

В некоторых воплощениях предлагаемые вариантные полипептиды ICOSL или иммуномодулирующие белки модулируют (например, увеличивают или уменьшают) иммунологическую активность, вызванную костимулирующими рецепторами CD28 или ICOS. Таким образом, в некоторых воплощениях предоставленные полипептиды преодолевают эти ограничения, предоставляя вариантный ICOSL (индуцибельный костимулирующий лиганд) с измененными (например, увеличенными или уменьшенными) аффинностями связывания как с CD28, так и с ICOS, а в некоторых случаях CTLA-4, тем самым оказывая агонистическое или антагонистическое воздействие на комплементарные эффекты костимуляции рецепторами. Также предлагаются способы создания и применения этих вариантов ICOSL.

В некоторых аспектах предоставленные молекулы также могут быть более эффективными, чем другие растворимые терапевтические белковые агенты. Например, было показано, что абатацепт (CTLA-4-Fc) препятствует костимуляции Т-клеток, ослабляя реакции Т-клеток в условиях аутоиммунного заболевания, например, для лечение ревматоидного артрита, псориатического артрита и ювенильного идиопатического артрита, и белатацепта, вариантной молекулы CTLA-4-Fc, для отторжения трансплантата. Эти белки CTLA-4-Fc, однако, связываются с CD80 и CD86 и препятствуют тому, чтобы эти костимулирующие лиганды вовлекались и включались только CD28. Представленные в данном документе вариантные полипептиды ICOSL в некоторых случаях проявляют аффинность связывания и повышенную активность как для CD28, так и для ICOS.

Кроме того, способность форматировать вариантные полипептиды в различных конфигурациях, чтобы, в зависимости от контекста, дейсвовать на иммунный ответ

антагонистически или агонистически, обеспечивает гибкость в терапевтических применениях, основанную на одинаковом увеличении связывания и активности вариантного ICOSL для партнеров по связыванию. В некоторых воплощениях конкретный формат может быть выбран для искомого терапевтического применения. В некоторых примерах, как описано, иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный полипептид ICOSL, предлагается в формате, например, в виде Fc-гибридного белка, для того, чтобы оказывать антагонистичное воздействие или блокировать активность его когнатного партнера связывания, например, CD28. В некоторых воплощениях блокирование или ингибирование костимулирующей передачи сигналов через CD28 или ICOS может быть полезным для подавления иммунного ответа, что может быть полезно при лечении воспалительных или аутоиммунных нарушений (например, рассеянного склероза или воспаления головного мозга) или при трансплантации органов. В качестве примера, привязывание вариантных белков ICOSL к поверхности может доставлять локализованный костимулирующий сигнал, который в некоторых аспектах может использоваться для нацеливания на опухолевую ткань для доставки локализованной костимуляции в инфильтрирующие опухоль Т-клетки. В большинстве первичных опухолей отсутствует экспрессия костимулирующих молекул, таких как CD80, CD86 или ICOSL, и, таким образом, противоопухолевые ответы Т-клеток могут быть скомпрометированы отсутствием костимуляции (Yu et al. (1998) Int. Immunol. 10:791-797). Путем локализации костимулирующих доменов в опухолевых клетках с использованием локализующего опухоль фрагмента, такого как Nkp30, локализованного в опухолевых клетках B7H6 или опухолеспецифического антитела, ответы Т-клеток могут быть усилены в отсутствие экспрессируемых опухолью костимулирующих белков.

Все публикации, в том числе патенты, патентные заявки, научные статьи и базы данных, упомянутые в данном описании, включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, включая патент, патентную заявку, научную статью или базу данных, была специально и индивидуально указана для включения в качестве ссылки. Если определение, изложенное в данном документе, противоречит или иным образом противоречит определению, изложенному в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящее описание посредством ссылки, определение, изложенное в настоящем документе, превалирует над определением, которое включено в данный документ ссылкой.

Используемые в данном документе заголовки разделов предназначены только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описанный

объект изобретения.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины данной области, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют тот же смысл, который обычно понимается специалистом в данной области, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях, термины с общепризнанно понимаемыми значениями определяются в данном документе для ясности и/или в качестве быстрой справки, и включение таких определений в данном документе не должно обязательно толковаться как представляющую существенное отличие от того что обычно понимается в данной области.

Термины, используемые в данном описании, определяются следующим образом, если иное не ограничено в конкретных случаях. При использовании в описании и прилагаемой формуле изобретения, слова, имеющие значение в форме единственного числа, включают множественное число, если контекст явно не указывает иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, акронимы и аббревиатуры, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которому относится изобретение. Если не указано иное, аббревиатуры и символы для химических и биохимических названий соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB. Если не указано иное, все числовые диапазоны включают значения, определяющие диапазон, и все целочисленные значения между ними.

Термин “с модифицированной аффинностью“, используемый в контексте домена суперсемейства иммуноглобулинов, означает домен суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающих (IgSF), имеющий измененную аминокислотную последовательность (относительно соответствующего родительского или немодифицированного домена IgSF дикого типа), благодаря которой он имеет повышенную или пониженную аффинность или авидность связывания, по меньшей мере, по отношению к одному из его когнатных партнеров связывания (в ином случае «контрструктур») по сравнению с родительским контрольным доменом IgSF дикого типа или немодифицированным (т.е. без модифицированной аффинности) контрольным доменом IgSF. В этом контексте включен аффинный модифицированный домен ICOSL IgSF. В некоторых воплощениях домен IgSF с модифицированной аффинностью 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 аминокислотных различий, таких как аминокислотные замены, в референсном (например, немодифицированным) доменом IgSF дикого типа. Увеличение или уменьшение аффинности или авидности связывания можно определить 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, Vol. 1: 793-801 (1994). Увеличение аффинности или авидности связывания белка или с его когнатным партнером(ами) является значением, по меньшей мере, на 10% большим, чем в случае контрольного значения домена IgSF дикого типа, а в некоторых воплощениях, по меньшей мере, на 20%, 30%, 40 %, 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 5000% или 10000% больше, чем контрольное значение домена IgSF дикого типа. Снижение аффинности или авидности связывания белка, по меньшей мере, с одним из его когнатных партнеров связывания представляет собой значение не больше чем 90% от контроля, но не менее 10% контрольного значения домена IgSF дикого типа и в некоторых воплощениях не более 80%, 70% 60%, 50%, 40%, 30% или 20%, но не менее 10% от контрольного значения домена IgSF дикого типа. Белок с модифицированной аффинностью изменен в первичной аминокислотной последовательности заменой, добавлением или делецией аминокислотных остатков. Термин "домен IgSF с модифицированной аффинностью" не следует истолковывать как наложение какого-либо условия для какой-либо конкретной исходной композиции или способа, с помощью которого был создан домен с модифицированной афинностью IgSF. Таким образом, аффинность модифицированных доменов IgSF по настоящему изобретению не ограничено доменами IgF дикого типа, которые затем трансформируются в домен IgSF с модифицированной аффинностью любым конкретным процессом модификации аффинности. Полипептид домена IgSF с модифицированной аффинностью, может, например, быть получен на основании информации о последовательности домена IgSF млекопитающего дикого типа, затем смоделирован in silico для связывания с его когнатным партнером связывания и, наконец, рекомбинантно или химически синтезирован так, чтобы получить композицию домена IgSF с модифицированной аффинностью объекта изобретения. В одном альтернативном примере домен IgSF с модифицированной аффинностью может быть создан путем сайт-направленного мутагенеза домена IgSF дикого типа. Таким образом, домен IgSF с модифицированной аффинностью обозначает продукт и не обязательно продукт, полученный любым данным способом. Могут быть использованы различные способы, включая рекомбинантные способы, химический синтез или их комбинации.

Используемый в данном документе термин "аллогенный" означает клетку или ткань, которые удаляют из одного организма, а затем вводят или адоптивно переносят в генетически непохожий организм одного и того же вида. В некоторых воплощениях изобретения вид является мышью или человеком.

Термин "аутологичный", используемый в данном документе, означает клетку или

ткань, которые удаляются из того же организма, в который они позже вводятся или адоптивно переносятся. Аутологичная клетка или ткань могут быть изменены, например, методами рекомбинантных ДНК, так что они уже не идентичны генетически нативной клетке или нативной ткани, которые удаляется из организма. Например, нативная аутологичная Т-клетка может быть генетически модифицирована методами рекомбинантных ДНК, чтобы стать аутологичной сконструированной клеткой, экспрессирующей трансмембранный иммуномодулирующий белок и/или химерный антигенный рецептор (CAR), который в некоторых случаях включает конструирование Т-клетки или TIL (инфильтрирующего опухоли лимфоцита). Затем сконструированные клетки вводят в пациента, из которого была выделена нативная Т-клетка. В некоторых воплощениях организм является человеком или мышью.

Термины "аффинность связывания" и "авидность связывания", используемые в данном описании, означает специфическую аффинность связывания и специфическую авидность связывания, соответственно, белка с его контрструктурой при определенных условиях связывания. В биохимической кинетике авидность относится к накопленной силе множественной аффинности отдельных нековалентных связывающих взаимодействий, таких как между ICOSL и ее контрструктурами ICOS и/или CD28. Таким образом, авидность отличается от аффинности, которая описывает силу одного взаимодействия. Увеличение или затухание аффинности связывания варианта ICOSL, содержащего аффинный модифицированный домен ICOSL IgSF, с его контрструктурой определяют относительно аффинности связывания немодифицированного ICOSL, такого как немодифицированный ICOSL, содержащий домен IgSF нативного или дикого типа, такого как домен IgV. Способы определения аффинности или авидности связывания известны в данной области техники. Например, см., Larsen et al., American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005). В некоторых воплощениях вариантный ICOSL по изобретению (то есть белок ICOSL, содержащий домен IgSF с модифицированной аффинностью) специфически связывается с CD28 и/или ICOS, измеренным проточной цитометрией с аффинностью связывания, которая дает значение средней интенсивности флуоресценции (MFI), по меньшей мере, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или на 100% больше, чем контроль ICOSL дикого типа в анализе связывания, как описано в Примере 6.

Термин "биологический период полужизни" относится к количеству времени, которое требуется для вещества, такого как иммуномодулирующий полипептид, содержащего вариантный ICOSL по настоящему изобретению, потерять половину своей фармакологической или физиологической активности или концентрации. На

биологический период полужизни может влиять выделение, экскреция, деградация (например, ферментативная) вещества или поглощение и концентрирование в определенных органах или тканях организма. В некоторых воплощениях биологический период полужизни можно оценить, определив время, необходимое для того, чтобы концентрация в плазме крови в крови достигла половины своего уровня стационарного состояния ("период полужизни в плазме"). Конъюгаты, которые могут быть использованы для дериватизации и увеличения биологического периода полужизни полипептидов по изобретению, известны в данной области и включают, без ограничения указанным, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксиэтилкрахмал (HES), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды, WO2013130683), альбумин сыворотки человека (HSA), альбумин бычьей сыворотки (BSA), липиды (ацилирование) и поли-Pro-Ala-Ser (PAS), полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

Используемый в данном документе термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к искусственному (то есть изготовленному человеком) трансмембранному белку, экспрессируемому в клетке млекопитающего, который включает, по меньшей мере, эктодомен, трансмембранный домен и эндодомен. Необязательно, белок CAR включает «спейсер», который ковалентно связывает эктодомен с трансмембранным доменом. Спейсер часто представляет собой полипептид, связывающий эктодомен с трансмембранным доменом посредством пептидных связей. CAR обычно экспрессируется в лимфоците млекопитающих. В некоторых воплощениях CAR экспрессируется в клетке млекопитающего, такой как Т-клетка или инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL). CAR, экспрессируемый на Т-клетках, упоминается в данном документе как “CAR Т-клетка” или “CAR-T.” В некоторых воплощениях CAR-T представляет собой хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку естественного киллера, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку или гамма-дельта-Т-клетку. При использовании в клинической практике, например, при адоптивном переносе клеток, CAR-T с антигенсвязывающей специфичностью к опухоли пациента обычно конструируется для экспрессии на нативной Т-клетке, полученной из пациента. Сконстуированная Т-клетка, экспрессирующая CAR, затем вводится обратно пациенту. Таким образом, CAR-T часто является аутологичной CAR-T, хотя аллогенные CAR-T включены в объем изобретения. Эктодомен CAR включает антигенсвязывающую область, такую как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который специфически связывается в физиологических условиях с антигеном, таким как опухолеспецифический антиген. При специфическом связывании биохимическая цепь событий (т.е. сигнальная трансдукция) приводит к модуляции иммунологической

активности CAR-T. Так, например, при специфическом связывании антигенсвязывающей области CAR-T с его антигеном может приводить к изменениям иммунологической активности активности Т-клеток, что отражается на изменениях цитотоксичности, пролиферации или продукции цитокинов. Передача сигнала при активации CAR достигается в некоторых воплощениях CD3-дзета цепью («CD3-z»), которая участвует в трансдукции сигнала в нативных Т-клетках млекопитающего. CAR-T могут дополнительно содержать несколько доменов сигнализации, таких как CD28, 41BB или OX40, для дальнейшей модуляции иммуномодулирующего ответа Т-клетки. CD3-z включает консервативный мотив, известный как мотив активации на основе тирозина на основе иммунорецептора (ITAM), который участвует в трансдукции сигнала Т-клеточного рецептора.

Термин «совокупно» или «совокупный», когда используется в отношении выработки цитокинов, вызванной наличием двух или более вариантов ICOSL по изобретению в анализе in vitro, означает общий уровень экспрессии цитокинов независимо от выработки цитокинов, индуцированной индивидуальным вариантом ICOSL. В некоторых воплощениях анализируемый цитокин представляет собой IFN-гамма в анализе первичной Т-клетки in vitro, такой как описанный в Примере 6 и Примере 7.

Термины «когнатный партнер связывания» или «контрструктура» в отношении полипептида, например, в отношении домена IgSF варианта ICOSL, относится, по меньшей мере, к одной молекуле (обычно к нативному белку млекопитающего), с которой референсный полипептид связывается в определенных условиях связывания. В некоторых аспектах вариантный ICOSL, содержащий домен IgSF с модифицированной аффинностью, специфически связывается с контрструктурой соответствующего нативного ICOSL или ICOSL дикого типа, но с повышенной или аттенуированной аффинностью. Вид лиганда, распознаваемый и специфически связывающийся с его родственным рецептором в условиях специфического связывания, является примером контрструктуры или когнатного партнера связывания этого рецептора. «Когнатный партнер связывания клеточной поверхности» является когнатным партнером связывания, экспрессированным на поверхности клеток млекопитающих. «Молекулярное соединение клеточной поверхности» является когнатным партнером связывания лигандов иммунологического синапса (IS), экспрессируемым на клетках и клетками, такими как клетки млекопитающих, образующие иммунологический синапс.

При использовании в данном описании, термин «конъюгат», «конъюгация» или его грамматические варианты относятся к присоединению или соединению вместе двух или

более соединений, что приводит к образованию другого соединения, с помощью любых соединений или связывающих способов, известных в данной области техники. Он также может относиться к соединению, которое образуется путем объединения или соединения двух или более соединений. Например, вариантный полипептид ICOSL, прямо или опосредованно связанный с одним или несколькими химическими группами или полипептидом, является примерным конъюгатом. Такие конъюгаты включают гибридные белки, продуцируемые химическими конъюгатами, и те, которые получены любыми другими способами.

Используемый в данном документе термин «конкурентное связывание» означает, что белок способен специфически связываться, по меньшей мере, с двумя когнатными партнерами связывания, но что специфическое связывание одного когнатного партнера связывания ингибирует, например, предотвращает или исключает одновременное связывание второго когнатного партнера связывания. Таким образом, в некоторых случаях белок может одновременно связывать два когнатных партнера связывания. Как правило, конкурентные связующие содержат тот же или перекрывающий сайт связывания для специфического связывания, но это не является обязательным требованием. В некоторых воплощениях конкурентное связывание вызывает измеримое ингибирование (частичное или полное) специфического связывания белка с одним его когнатным партнером связывания из-за специфического связывания второго когнатного партнера связывания. Известно множество способов количественного определения конкурентного связывания, таких как анализ ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

Используемый в данном документе термин «консервативная аминокислотная замена» означает аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим группу R боковой цепи с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Консервативными группами замещения аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

Термин «соответствующий» по отношению к положениям белка, такой как

изложение того, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» нуклеотидным или аминокислотным положениям в раскрытой последовательности, как указано в списке последовательностей, относится к нуклеотидным или аминокислотным положениям, идентифицированные при совмещении с раскрытой последовательностью, основанной на выравнивании структурной последовательности или с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Например, соответствующие остатки могут быть определены путем выравнивания референсной последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 32 (домен ECD) или указанной в SEQ ID NO: 196 или 545 (домен IgV) методами структурного выравнивания, как описано в данном документе. Выравнивая последовательности, специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих.

Термины «уменьшать» или «аттенуировать» «или подавлять», используемые в данном документе, означают уменьшение на статистически значимую величину. Снижение может составлять не менее 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% контрольного значения, например, ненулевого контрольного значения.

Термин «пониженный» или «уменьшенный», используемый в данном документе в контексте понижения иммунологической активности лимфоцитов млекопитающих, означает увеличение одной или нескольких активностей лимфоцитов, по сравнению с контролем, таким как необработанный контроль или контроль, в котором обработку с использованием немодифицированного или неизмененного контроля применяли в тех же условиях. Пониженная активность может относиться к одному или нескольким из числа ингибирования клеточного цикла, пониженной выживаемости клеток, уменьшенной пролиферации клеток, уменьшенной выработки цитокинов или сниженной цитотоксичности Т-клеток, например, в статистически значимом количестве. В некоторых воплощениях ссылка на пониженную иммунологическую активность означает уменьшение выработки интерферона-гамма (IFN-гамма) по сравнению с отсутствием обработки, например, в статистически значимом количестве. В некоторых воплощениях иммунологическая активность может быть оценена в анализе реакции смешанных лимфоцитов (MLR). Способы проведения MLR-анализов известны в данной области. Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846-56. Способы оценки активности лимфоцитов известны в данной области, включая любой анализ, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях улучшение может представлять собой понижение, по меньшей мере, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% 90% или 100% по сравнению с контрольным значением, таким как необработанное

контрольное значение или ненулевое контрольное значение.

Термины «производные» или «дериватизированные» относятся к модификации белка путем ковалентного связывания его, прямо или опосредованно, с композицией, с тем, чтобы изменить такие характеристики, как биологический период полужизни, биодоступность, иммуногенность, растворимость, токсичность, эффективность или эффективность при хранении или усиление его терапевтического эффекта. Производные иммуномодулирующих полипептидов по изобретению входят в объем изобретения и могут быть получены, например, путем гликозилирования, пегилирования, липидации или Fc-слияния.

Используемый в данном документе термин «домен» (обычно последовательность из трех или более, обычно 5 или 7 или более аминокислот, например от 10 до 200 аминокислотных остатков) относится к части молекулы, такой как белок или кодирующая нуклеиновая кислота, который структурно и/или функционально отличен от других частей молекулы и является идентифицированным. Например, домены включают те части полипептидной цепи, которые могут образовывать независимо сложную структуру внутри белка, состоящую из одного или нескольких структурных мотивов и/или распознаваемых в силу функциональной активности, такой как связывающая активность. Белок может иметь один или несколько отдельных доменов. Например, домен может быть идентифицирован, определен или выделен с помощью гомологии первичной последовательности или структуры со связанными представителями семейства, например с помощью гомологии к мотивам. В другом примере домен может быть выделен по своей функции, такой как способность взаимодействовать с биомолекулой, такой как когнатный партнер связывания. Домен независимо может проявлять биологическую функцию или активность, так что домен независимо или слитый с другой молекулой может выполнять активность, такую как, например, связывание. Домен может представлять собой линейную аминокислотную последовательность или нелинейную аминокислотную последовательность. Многие полипептиды содержат множество доменов. Такие домены известны и могут быть идентифицированы специалистами в данной области техники. В качестве примера в данном документе приведены определения, но понятно, что специалистам в данной области техники известно, что они идентифицируют определенные домены по названию. При необходимости для идентификации доменов можно использовать соответствующее программное обеспечение.

Термин «эктодомен», используемый в данном документе, относится к области мембранного белка, такого как трансмембранный белок, которая лежит за пределами везикулярной мембраны. Эктодомены часто включают связывающие домены, которые

специфически связываются с лигандами или клеточными рецепторами поверхности, например, через связывающий домен, который специфически связывается с лигандом или рецептором поверхности клетки. Эктодомен клеточного трансмембранного белка попеременно называют внеклеточным доменом.

Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству и/или концентрации терапевтической композиции по настоящему изобретению, в том числе композиции белка или клеточной композиции, которые при введении ex vivo (при контакте с клеткой от пациента) или in vivo (путем введения пациенту) либо самостоятельно (то есть, как монотерапия), либо в сочетании с дополнительными терапевтическими агентами приводит к статистически значимому снижению прогресса заболевания, например, путем улучшения или устранения симптомов и/или причины заболевания. Эффективным количеством может быть количество, которое уменьшает или уменьшает, по меньшей мере, один симптом или биологический ответ или эффект, связанный с заболеванием или расстройством, предотвращает прогрессирование заболевания или расстройства или улучшает физическое функционирование пациента. В случае клеточной терапии эффективное количество представляет собой эффективную дозу или количество клеток, вводимых пациенту с помощью адоптивной клеточной терапии. В некоторых воплощениях пациент является млекопитающим, таким как примат, не являющийся человеком, или человеком.

Используемый в данном документе термин «эндодомен» относится к области, обнаруженной в некоторых мембранных белках, таких как трансмембранные белки, которые простираются во внутреннее пространство, определяемое поверхностной мембраной клетки. В клетках млекопитающих эндодомен представляет собой цитоплазматическую область мембранного белка. В клетках эндодомен взаимодействует с внутриклеточными компонентами и может играть роль в трансдукции сигнала и, следовательно, в некоторых случаях может быть внутриклеточным сигнальным доменом. Эндодомен клеточного трансмембранного белка попеременно называют цитоплазматическим доменом, который в некоторых случаях может быть цитоплазматическим сигнальным доменом.

Термин «усиленный» или «увеличенный», используемый в данном документе в контексте повышения иммунологической активности лимфоцитов млекопитающих, означает увеличение одной или нескольких активностей лимфоцитов, по сравнению с контролем, таким как необработанный контроль или контроль, в котором обработку с использованием немодифицированного или неизмененного контроля применяли в тех же условиях. Повышенная активность может быть одной или более из числа увеличения

выживаемости клеток, пролиферации клеток, продуцирования цитокинов или цитотоксичности Т-клеток, таких как статистически значимое количество. В некоторых воплощениях ссылка на повышенную иммунологическую активность означает увеличение выработки интерферона гамма (IFN-гамма), например, статистически значимого количества. В некоторых воплощениях иммунологическая активность может быть оценена в анализе реакции смешанных лимфоцитов (MLR). Способы проведения MLR-анализов известны в данной области. Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846-56. Способы оценки активности лимфоцитов известны в данной области, включая любой анализ, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях повышение может быть увеличением, по меньшей мере, на 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400 или 500% больше, чем ненулевое контрольное значение.

Используемый в данном документе термин «сконструированная клетка» относится к клетке млекопитающего, которая была генетически модифицирована путем вмешательства человека, например, методами рекомбинантных ДНК или вирусной трансдукцией. В некоторых воплощениях клетка представляет собой иммунную клетку, такую как лимфоцит (например, Т-клетка, В-клетка, NK-клетка) или антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка). Клетка может быть первичной клеткой из пациента или может быть клеточной линией. В некоторых воплощениях сконструированная клетка по изобретению содержит вариантный ICOSL, представленный в данном документе. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок (далее называемый «TIP»), который экспрессируется на сконструированной клетке. В некоторых воплощениях TIP содержит внеклеточный домен или его часть, содержащую домен IgV, связанный с трансмембранным доменом (например, трансмембранным доменом ICOSL), и, необязательно, внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых случаях TIP отформатирован как гибридный рецептор, содержащий гетерологичный цитоплазматический сигнальный домен или эндодомен. В некоторых воплощениях, сконструированная клетка способна экспрессировать и секретировать в иммуномодулирующий белок, как описано в данном документе. Среди предлагаемого сконструированные клетки также являются клетками, дополнительно содержащими сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR).

Используемый в данном документе термин «сконструированная Т-клетка» относится к Т-клетке, такой как хелперная Т-клетка, цитотоксическая Т-клетка (в качестве варианта цитотоксический Т-лимфоцит или CTL), Т-клетка натуральный киллер,

регуляторная Т-клетка, Т-клетка памяти или гамма-дельта-Т-клетка, которая была генетически модифицирована путем вмешательства человека, например, методами рекомбинантных ДНК. Сконструированная Т-клетка включает трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP) или секретируемый иммуномодулирующий белок (SIP) вариантного ICOSL по настоящему изобретению, который экспрессируется на Т-клетке и сконструирован для модуляции иммунологической активности самой сконструированной Т-клетки или клетки млекопитающего, с которой специфически связывается вариантный ICOSL, экспрессируемый на Т-клетке. Сконструированная Т-клетка может содержать вариантный ICOSL секретируемого иммуномодулирующего белка (SIP) по настоящему изобретению, который экспрессируется и/или секретируется Т-клеткой и сконструирован для модуляции иммунологической активности самой сконструированной Т-клетки, или клетки млекопитающего, с которой вариантный ICOSL при секреции Т-клеткой специфически связывается.

Термин «сконструированный Т-клеточный рецептор» или «сконструированный TCR» относится к Т-клеточному рецептору (TCR), сконструированному для специфического связывания с искомой аффинностью к главному комплексу гистосовместимости (MHC)/пептидному целевому антигену, который выбран, клонирован, и/или впоследствии вводится в популяцию Т-клеток, часто используемых для адоптивной иммунотерапии. В отличие от сконструированных TCR, CAR сконструированы таким образом, чтобы связывать целевые антигены MHC-независимым образом.

Используемый в данном документе термин «экспрессированный на» используется в данном документе в отношении белка, экспрессируемого на поверхности клетки, такой как клетка млекопитающего. Таким образом, белок экспрессируется в виде мембранного белка. В некоторых воплощениях экспрессированный белок представляет собой трансмембранный белок. В некоторых воплощениях белок конъюгирован с низкомолекулярной группой, такой как лекарственное средство или детектируемая метка. Белки, экспрессируемые на поверхности клетки, могут включать белки клеточной поверхности, такие как рецепторы клеточной поверхности, которые экспрессируются на клетках млекопитающих.

Термин «фрагмент, увеличивающий период полужизни» относится к остатку гибридного полипептида или химического конъюгата, который увеличивает период полужизни белка, циркулирующего в сыворотке крови млекопитающих по сравнению с периодом полужизни белка, который не конъюгирован с функциональным фрагментом. В некоторых воплощениях период полужизни увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза,

в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4 раза, в 5,0 раз или в 6,0 раз. В некоторых воплощениях период полужизни продлевается более чем на 6 часов, более 12 часов, более 24 часов, более 48 часов, более 72 часов, более 96 часов или более чем на 1 неделю после введения in vivo по сравнению с белком без фрагмента, увеличивающего период полужизни. Период полужизни относится к количеству времени, которое требуется для того, чтобы белок потерял половину своей концентрации, количества или активности. Период полужизни можно определить, например, с помощью анализа ELISA или анализа активности. Примерные фрагменты, удлиняющие период полужизни, включают домен Fc, домен мультимеризации, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксиэтилкрахмал (HES), XTEN (удлиненные рекомбинантные пептиды, см. WO2013130683), человеческий сывороточный альбумин (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), липиды (ацилирование), поли-Pro-Ala-Ser (PAS) и полиглутаминовую кислоту (глутамилирование).

Используемый в данном документе термин «иммунологический синапс» или «иммунный синапс» означает интерфейс между клеткой млекопитающего, которая экспрессирует MHC I (основной комплекс гистосовместимости) или MHC II, такой как антигенпрезентирующая клетка или опухолевая клетка, и лимфоцит млекопитающих, такой как как эффекторная Т-клетка или клетка натуральный киллер (NK).

Fc (фрагментированная кристаллизуемая) область или домен молекулы иммуноглобулина (также называемый полипептидом Fc) в значительной степени соответствует константной области тяжелой цепи иммуноглобулина и отвечает за различные функции, включая эффекторную функцию(ии) антитела. Область Fc включает часть или весь шарнирный домен молекулы иммуноглобулина плюс домен CH2 и CH3. Fc-домен может образовывать димер двух полипептидных цепей, соединенных одной или несколькими дисульфидными связями. В некоторых воплощениях Fc представляет собой вариант Fc, который проявляет пониженную (например, пониженную более чем на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более) активность для облегчения эффекторной функции. В некоторых воплощениях ссылка на аминокислотные замены в области Fc представляет собой систему нумерации EU, если не описывается со ссылкой на конкретный SEQ ID NO. Нумерация EU известна и соответствует последней обновленной научной карте IMGT (IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics® http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (создана: 17 мая 2001 г., последнее обновление: 10 января 2013 г.) и индексе EU, представленному в Kabat, 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).

Гибридный Fc иммуноглобулина («Fc-гибрид»), такой как иммуномодулирующий

Fc-гибридный белок, представляет собой молекулу, содержащую один или несколько полипептидов (или одну или несколько малых молекул), функционально связанных с Fc-областью иммуноглобулина. Fc-гибрид может включать, например, Fc-область антитела (что облегчает эффекторные функции и фармакокинетику) и вариантный ICOSL. Область Fc иммуноглобулина может быть связана опосредованно или непосредственно с одним или несколькими вариантами ICOSL или с небольшими молекулами (партнерами по слиянию). Различные линкеры известны в данной области техники и могут быть использованы для связывания Fc с партнером по слиянию для получения Fc-гибрида. Fc-гибриды идентичных видов можно димеризовать с образованием гомодимеров Fc-гибридов или с использованием неидентичных видов с образованием гетеродимеров Fc-гибридов. В некоторых воплощениях Fc представляет собой Fc млекопитающего, такой как мышиный или человеческий Fc.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, которая может быть использована для экспрессии белка, кодируемого рекомбинантным экспрессирующим вектором. Клетка-хозяин может быть прокариотическим организмом, например, E. coli, или она может представлять собой эукариотический организм, например, одноклеточный эукариотический организм (например, дрожжи или другой гриб), растительную клетку (например, растительнцю клетку табака или томата), клетку животного (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого) или гибридому. Примеры клеток-хозяев включают клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Veggie CHO и родственные клеточные линии, которые растут в бессывороточной среде или линия CHO DX-B11, которая дефицитна по DHFR. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого).

Термин "иммуноглобулин" (сокращенно «Ig»), при использовании в данном документе, относится к иммуноглобулиновому белку млекопитающих, включающему любой и пяти классов антитела: IgA (который включает подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (который включает подклассы IgG1 IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Термин также включает иммуноглобулины, которые являются менее чем полноразмерными, будь то полностью или частично синтетическими (например, рекомбинантный или химический синтез) или природными, такими как антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv), содержащий VH и VL, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий VH и VL, соединенные вместе в одной цепи, а также фрагменты V-областей других антител, такие как Fab', F(ab)2, F(ab')2, dsFv, полипептидные фрагменты Fc и Fd.

Биспецифические антитела, гомоспецифические и гетеробиспецифические, включены в значение термина.

Используемый в данном документе термин «суперсемейство иммуноглобулинов» или «IgSF» означает группу белков клеточной поверхности и растворимых белков, которые участвуют в процессах распознавания, связывания или адгезии клеток. Молекулы классифицируются как представители этого надсемейства, на основании общих структурных особенностей с иммуноглобулинами (т.е. антителами); все они обладают областью, известной как домен иммуноглобулина или складка. Представители IgSF включают рецепторы антигена клеточной поверхности, корецепторы и костимулирующие молекулы иммунной системы, молекулы, участвующие в представлении антигена лимфоцитам, молекулы клеточной адгезии, некоторые рецепторы цитокинов и внутриклеточные белки мышц. Они обычно связаны с ролями в иммунной системе. Белки в иммунологическом синапсе часто являются представителями IgSF. IgSF также можно разделить на «подсемейства» на основании общих свойств, таких как функции. Такие подсемейства обычно включают от 4 до 30 представителей IgSF.

Термины «домен IgSF» или «иммуноглобулиновый домен» или «домен Ig», используемый в данном документе, относится к структурному домену белков IgSF. Домены Ig названы в честь молекул иммуноглобулинов. Они содержат около 70-110 аминокислот и классифицируются в зависимости от их размера и функции. Домены Ig обладают характерной Ig-складкой, которая имеет сэндвич-подобную структуру, образованную двумя листами антипараллельных бета-цепей. Взаимодействия между гидрофобными аминокислотами на внутренней стороне сэндвича и высококонсервативными дисульфидными связями, образованными между остатками цистеина в цепях B и F, стабилизируют Ig-складку. Один конец домена Ig имеет секцию, называемую областью определения комплементарности, которая важна для специфичности антител к их лигандам. Ig-подобные домены могут быть классифицированы (в классы) как: IgV, IgC1, IgC2 или IgI. Большинство доменов Ig являются либо вариабельными (IgV), либо константными (IgC). Домены IgV с 9 бета-цепями обычно больше, чем домены IgC с 7 бета-цепями. Домены Ig некоторых представителей IgSF напоминают домены IgV по аминокислотной последовательности, но по размеру сходны с доменами IgC. Они называются доменами IgC2, тогда как стандартные домены IgC называются доменами IgC1. Цепи Т-клеточного рецептора (TCR) содержат два домена Ig во внеклеточной части; один домен IgV на N-конце и один домен IgC1, рядом с клеточной мембраной. ICOSL включает два домена Ig: IgV и IgC.

Используемый в данном документе термин «виды IgSF» означает совокупность

белков-представителей IgSF с идентичной или по существу идентичной первичной аминокислотной последовательностью. Каждый представитель суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающих (IgSF) определяет уникальную идентичность всех видов IgSF, которые принадлежат этому представителю IgSF. Таким образом, каждый представитель семейства IgSF уникален среди других представителей семейства IgSF, и, соответственно, каждый вид конкретного представителя семейства IgSF уникален среди видов другого представителя семейства IgSF. Тем не менее, изменение между молекулами одного и того же вида IgSF может происходить из-за различий в посттрансляционной модификации, таких как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидация. Кроме того, незначительные различия в последовательности в пределах одного вида IgSF из-за полиморфизма генов представляют собой еще одну форму вариации в пределах одного вида IgSF, и укороченные формы видов IgSF дикого типа из-за, например, протеолитического расщепления. «Вид IgSF клеточной поверхности» представляет собой вид IgSF, экспрессируемый на поверхности клетки, как правило, клетки млекопитающих.

Термин «иммунологическая активность», используемый в данном описании в контексте лимфоцитов млекопитающих, таких как Т-клетки, относится к одному или более из числа выживаемости клеток, пролиферации клеток, выработки цитокинов (например, интерферона-гамма) или активности Т-клеточной цитотоксичности. В некоторых случаях иммунологическая активность может означать клеточную экспрессию цитокинов, таких как хемокины или интерлейкины. Анализы для определения усиления или подавления иммунологической активности включают реакции MLR (реакция смешанных лимфоцитов), измеряющие уровни интерферона-гамма-цитокинов в культуральных надосадочных жидкостях (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 с помощью анти-CD3 (Li and Kurlander, J Transl Med. 2010: 8: 104). Поскольку активация Т-клеток связана с секрецией цитокина IFN-гамма, определение уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях из этих анализов Т-клеток человека in vitro может быть проанализировано с использованием коммерческих наборов ELISA (Wu et al, Immunol Lett 2008 Apr 15, 117 (1): 57-62). Индукция иммунного ответа приводит к увеличению иммунологической активности по сравнению с покоящимися лимфоцитами. Иммуномодулирующий белок, такой как вариантный полипептид ICOSL, содержащий домен IgSF с модифицированной аффинностью, как предусмотрено в данном документе, может в некоторых воплощениях увеличивать или в альтернативных вариантах

уменьшать экспрессию IFN-гамма (интерферона-гамма) в первичном анализе Т-клеток относительно представителя IgSF дикого типа или контроля домена IgSF. Специалисты признают, что формат первичного анализа Т-клеток, используемый для определения увеличения экспрессии IFN-гамма, будет отличаться от формата, используемого для анализа уменьшения экспрессии IFN-гамма. При анализе способности иммуномодулирующего белка или домена IgSF с модифицированной аффинностью по изобретению уменьшать экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток может быть использован анализ реакции смешанных лимфоцитов (MLR), как описано в Примере 6. Удобно, если растворимая форма модифицированного по аффинности домена IgSF по изобретению могла быть использована для определения его способности к оказывать антогонистичное воздействие и, таким образом, к уменьшению экспрессии IFN-гамма в MLR, как описано в Примере 6. В ином случае при анализе способности иммуномодулирующего белка или домена IgSF с модифицированной аффинностью изобретения увеличивать экспрессию IFN-гамма в анализе первичных Т-клеток может быть использован анализ коиммобилизации. В анализе коиммобилизации сигнал Т-клеточного рецептора, представленный в некоторых воплощениях анти-CD3-антителом, используется в сочетании с коиммобилизованным аффинным модифицированным доменом IgSF, таким как вариантный ICOSL, для определения способности увеличивать IFN-гамма по сравнению с контрольным доменом IgSF дикого типа. Способы исследования иммунологической активности сконструированных клеток, в том числе для оценки активности трансмембранного иммуномодулирующего белка-варианта ICOSL, известны в данной области и включают, без ограничения перечисленным, способность приводить к размножению Т-клеток после стимуляции антигенами, поддерживать размножение Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции и противоопухолевые активности в соответствующих животных моделях. Анализы также включают анализы для оценки цитотоксичности, включая стандартный анализ высвобождения 51Cr (см., например, Milone et al., (2009) Molecular Therapy 17: 1453-1464) или проточные анализы цитотоксичности или анализ цитотоксичности на основе импеданса (Peper et al. (2014) Journal of Immunological Methods, 405:192-198).

Термин «иммуномодулирующий полипептид» или "иммуномодулирующий белок" представляет собой полипептид или белковую молекулу, которые модулируют иммунологическую активность. Под «модуляцией» или «модулировать» иммунный ответ подразумевается, что иммунологическая активность либо увеличивается, либо уменьшается. Иммуномодулирующим белком может быть одиночная полипептидная цепь или мультимер (димеры или мультимеры более высокого порядка), по меньшей мере, две

полипептидные цепи, ковалентно связанные между собой, например, дисульфидными связями между цепями. Таким образом, мономерные, димерные и мультимерные полипептиды более высокого порядка находятся в пределах указанного термина. Мультимерные полипептиды могут быть гомомультимерными (идентичных полипептидных цепей) или гетеромультимерными (из неидентичных полипептидных цепей). Иммуномодулирующий белок по изобретению включает вариантный ICOSL.

Используемый в данном документе термин «увеличение» означает увеличение на статистически значимое количество. Увеличение может составлять не менее 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100% или более ненулевой контрольной величины.

Термин «изоформа» ICOSL (индуцируемый костимулирующий лиганд; CD275) является одним из множества природных полипептидов ICOSL, которые отличаются по аминокислотной последовательности. Изоформы могут быть продуктом вариантов сплайсинга транскрипта РНК, экспрессируемого одним геном, или продуктом экспрессии генов с высоким сходством, но отличающихся, дающих функционально подобный белок, как, например, может происходить при дубликации генов. Используемый в данном документе термин «изоформа» ICOSL также относится к продукту различных аллелей гена ICOSL (например, ICOSLG).

Используемый в данном документе термин «лимфоцит» означает любой из трех подтипов лейкоцитов в иммунной системе млекопитающих. К ним относятся натуральные клетки-киллеры (NK-клетки) (которые функционируют в клеточно-опосредованном, цитотоксическом врожденном иммунитете), Т-клетки (для клеточно-опосредованного, цитотоксического адаптивного иммунитета) и В-клетки (для гуморального, адаптивного иммунитета, управляемого антителами). Т-клетки включают: хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки натуральные киллеры, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки или гамма-дельта Т-клетки. Врожденные лимфоидные клетки (ILC) также включены в определение лимфоцитов.

Термины «млекопитающее» или «пациент» специфически включают ссылку, по меньшей мере, на одного животного из числа: человека, шимпанзе, макаки-резуса, яванского макака, собаки, кошки, мыши или крысы.

Используемый в данном документе термин «мембранный белок» означает белок, который в физиологических условиях непосредственно или опосредованно прикрепляется к липидному бислою. Липидный бислой, который образует мембрану, может быть биологической мембраной, например, эукариотической клеточной мембраной (например, из млекопитающего) или искусственной мембраной (т.е. изготовленной человеком), например, такой, которая обнаруживается на липосоме. Присоединение мембранного

белка к липидному бислою может быть осуществлено путем ковалентной фиксации или путем нековалентных взаимодействий, таких как гидрофобные или электростатические взаимодействия. Мембранный белок может быть интегральным мембранным белком или белком периферической мембраны. Мембранные белки, являющиеся белками периферических мембран, нековалентно присоединены к липидному бислою или нековалентно присоединены к интегральному мембранному белку. Белок периферической мембраны образует временное прикрепление к липидному бислою, так что в диапазоне физиологических условий у млекопитающего белок периферической мембраны может ассоциироваться и/или диссоциироваться от липидного бислоя. В отличие от белков периферической мембраны, интегральные мембранные белки образуют по существу постоянную связь с липидным бислоем мембраны, так что в диапазоне условий, которые являются физиологическими у млекопитающих, интегральные мембранные белки не диссоциируются от их прикрепления к липидному бислою. Мембранный белок может образовывать прикрепление к мембране посредством одного слоя липидного бислоя (монотопный) или прикрепляться через оба слоя мембраны (политопный). Интегральный мембранный белок, который взаимодействует только с одним липидным бислоем, представляет собой «интегральный монотопный белок». Интегральный мембранный белок, который взаимодействует с обоими липидными бислоями, представляет собой «интегральный политопный белок», альтернативно называемый в данном документе «трансмембранным белком».

Термины «модулирующий» или «модулировать», используемый в данном описании в контексте иммунного ответа, например, иммунного ответа млекопитающего, относятся к любому изменению, например, к увеличению или уменьшению, существующих или потенциальных иммунных реакций, которые происходят в результате введения иммуномодулирующего полипептида, включающего вариантный ICOSL по настоящему изобретению, или в результате введения сконструированных клеток, экспрессирующих иммуномодулирующий белок, такой как вариант трансмембранного иммуномодулирующего белка ICOSL по настоящему изобретению. Таким образом, он относится к изменению, такому как увеличение или уменьшение иммунного ответа по сравнению с иммунным ответом, который возникает или присутствует в отсутствие введения иммуномодулирующего белка, включающего вариантный ICOSL или клеток, экспрессирующих такой иммуномодулирующий полипептид. Такая модуляция включает любую индукцию, активацию, подавление или изменение степени или величины иммунологической активности иммунной клетки. Иммунные клетки включают В-клетки, Т-клетки, NK-клетки (натуральные киллеры), NK Т-клетки, профессиональные

антигенпрезентирующие клетки (APC) и непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки и воспалительные клетки (нейтрофилы, макрофаги, моноциты, эозинофилы и базофилы). Модуляция включает любые изменения, связанные с существующим иммунным ответом, развивающийся иммунный ответ, потенциальный иммунный ответ или способность индуцировать, регулировать, влиять или реагировать на иммунный ответ. Модуляция включает любое изменение экспрессии и/или функции генов, белков и/или других молекул в иммунных клетках как части иммунного ответа. Модуляция иммунного ответа или модуляция иммунологической активности включает, например, следующее: элиминацию, делецию или секвестрование иммунных клеток; индукцию образования иммунных клеток, которые могут модулировать функциональную способность других клеток, таких как аутореактивные лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки или воспалительные клетки; индукцию нечувствительного состояния в иммунных клетках (т.е. анергию); усиление или подавление активности или функции иммунных клеток, включая, без ограничения указанным, изменение структуры белков, экспрессируемых этими клетками. Примеры включают измененную выработку и/или секрецию определенных классов молекул, таких как цитокины, хемокины, перфорины, гранзимы, факторы роста, факторы транскрипции, киназы, костимулирующие молекулы или другие клеточные поверхностные рецепторы или любую комбинацию этих модуляторных событий. Модуляция может быть оценена, например, путем изменения экспрессии IFN-гамма (интерферона гамма) по сравнению с контрольным ICOSL дикого типа в анализе первичных Т-клеток (см. Zhao and Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan1; 340 (1) 132-138). Модуляция может быть оценена, например, путем изменения иммунологической активности сконструированных клеток, таких как изменение цитотоксической активности сконструированных клеток или изменение секреции цитокинов сконструированных клеток по сравнению с клетками, сконструированными с трансмембранным белком ICOSL дикого типа.

Используемый в данном документе термин «молекулярные виды» означает совокупность белков с идентичной или по существу идентичной первичной аминокислотной последовательностью. Каждый представитель суперсемейства иммуноглобулинов млекопитающих (IgSF) определяет набор идентичных или по существу идентичных молекулярных видов. Так, например, ICOSL человека является членом IgSF, и каждая молекула ICOSL человека представляет собой молекулярный вид ICOS. Изменение между молекулами, которые принадлежат к одним и тем же молекулярным видам, может происходить из-за различий в посттрансляционной модификации, таких как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование,

нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидация. Кроме того, незначительные различия в последовательности в пределах одного молекулярного вида вследствие полиморфизма генов представляют собой другую форму вариации внутри одного молекулярного вида, как в случае усеченных форм дикого типа отдельного молекулярного вида вследствие, например, протеолитического расщепления. «Молекулярный вид клеточной поверхности» представляет собой молекулярный вид, экспрессируемый на поверхности клетки млекопитающего. Два или более различных видов белка, каждый из которых присутствует исключительно на одной или исключительно другой (но не на обеих) из двух клеток млекопитающих, образующих IS, упоминаются как находящиеся в «цис» или «цис-конфигурации» между собой. Два разных вида белка, первый из которых исключительно присутствует на одной из двух клеток млекопитающих, образующих IS, а второй из которых присутствует исключительно на второй из двух клеток млекопитающих, образующих IS, как говорят, находятся в «транс» или «транс-конфигурации». Два разных вида белка, каждый из которых присутствует на обеих клетках млекопитающих, образующих IS, находятся как в цис-, так и в транс-конфигурациях на этих клетках.

Термин «домен мультимеризации» относится к аминокислотной последовательности, которая способствует стабильному взаимодействию молекулы полипептида с одним или несколько дополнительными полипептидными молекулами, каждая из которых включает комплементарный домен мультимеризации (например, первый домен мультимеризации и второй домен мультимеризации), который может быть одинаковым или отличающимся доменом мультимеризации. Взаимодействия между комплементарными доменами мультимеризации, например, взаимодействие между первым доменом мультимеризации и вторым доменом мультимеризации, образует стабильное белок-белковое взаимодействие для получения мультимера молекулы полипептида с дополнительной молекулой полипептида. В некоторых случаях домен мультимеризации является одним и тем же и взаимодействует сам с собой, образуя стабильное межбелковое взаимодействие между двумя полипептидными цепями. Как правило, полипептид присоединяется прямо или опосредованно к домену мультимеризации. Типичные домены мультимеризации включают последовательности иммуноглобулина или их части, лейциновые молнии, гидрофобные области, гидрофильные области и домены белок-белкового взаимодействия. Например, домен мультимеризации может быть константной областью или доменом иммуноглобулина, таким как, например, домен Fc или его части из IgG, включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, IgA, IgE, IgD и IgM и их модифицированные формы.

Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» взаимозаменяемы для обозначения полимера нуклеотидных остатков (например, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов) в одно- или двухцепочечной форме. Если не указано иное, термины охватывают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов и которые имеют с ними сходные связывающие свойства и метаболизируются аналогично естественным нуклеотидам. Если не указано иное, конкретная нуклеотидную последовательность также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные нуклеотидные последовательности, а также явно указанную последовательность («референсную последовательность»). В частности, вырожденные замены кодонов могут быть получены путем генерации последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина. Термин нуклеиновая кислота или полинуклеотид включает кДНК или мРНК, кодируемую геном.

Используемый в данном документе термин «неконкурентное связывание» означает способность белка специфически связываться одновременно, по меньшей мере, с двумя когнатными партнерами связывания. Таким образом, белок способен связываться, по меньшей мере, с двумя разными когнатными партнерами связывания одновременно, хотя взаимодействие связывания не обязательно должно быть одной и той же продолжительности, так что в некоторых случаях белок специфически связан только с одним из когнатных партеров связывания. В некоторых воплощениях связывание происходит в определенных условиях связывания. В некоторых воплощениях одновременное связывание таково, что связывание одного родственного партнера-связывания существенно не ингибирует одновременное связывание со вторым когнатным партнером связывания. В некоторых воплощениях неконкурентное связывание означает, что связывание второго когнатного партнера связывания с его сайтом связывания на белке не вытесняет связывание первого когнатного партнера связывания с его сайтом связывания на белке. Способы оценки неконкурентного связывания хорошо известны в данной области, например, способ, описанный в Perez de La Lastra et al., Immunology, 1999 Apr: 96(4): 663–670. В некоторых случаях в неконкурентных взаимодействиях первый когнатный партнер связывания специфически связывается с участком связывания, который не перекрывается с сайтом взаимодействия второго когнатного партнера связывания, так что связывание второго когнатного партнера связывания напрямую не мешает связыванию первого когнатного партнера связывания. Таким образом, любое влияние на связывание когнатного партнера связывания посредством связывания второго

когнатного партнера связывания оказывается через механизм, отличный от прямого вмешательства в связывание с первым когнатным партнером связывания. Например, в контексте фермент-субстратных взаимодействий неконкурентный ингибитор связывается с сайтом, отличным от активного сайта фермента. Неконкурентное связывание включает в себя неконкурентоспособные связывающие взаимодействия, в которых второй когнатный партнер связывания специфически связывается с сайтом взаимодействия, который не перекрывается со связыванием первого когнатного партнера, но связывается только со вторым участком взаимодействия, который занимает первый когнатный партнер связывания.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения у объекта млекопитающего, часто человека. Фармацевтическая композиция обычно включает эффективное количество активного агента (например, иммуномодулирующего белка, включающего вариантный ICOSL, или сконструированных клеток, экспрессирующих трансмембранный иммуномодулирующий белок-вариантный ICOSL по настоящему изобретению) и носителя, эксципиента или разбавителя. Носитель, эксципиент или разбавитель обычно представляют собой фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель, соответственно.

Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к молекулярной цепи двух или более аминокислот, связанных через пептидные связи. Термины не относятся к определенной длине продукта. Таким образом, «пептиды» и «олигопептиды» включены в определение полипептида. Термины включают посттрансляционные модификации полипептида, например гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. Термины также включают молекулы, в которые включены один или несколько аминокислотных аналогов или неканонические или неестественные аминокислоты, которые могут быть синтезированы или экспрессированы рекомбинантно с использованием известных методов белковой инженерии. Кроме того, белки могут быть дериватизованы.

Используемый в данном документе термин «первичный анализ Т-клеток» относится к анализу in vitro для измерения экспрессии интерферона-гамма («IFN-гамма»). В данной области известно множество таких анализов первичных Т-клеток, как описано в Примере 7. В предпочтительном воплощении используемый анализ представляет собой анализ коиммобилизации с анти-CD3. В этом анализе первичные Т-клетки стимулируются анти-CD3, иммобилизованными с помощью дополнительных рекомбинантных белков или без них. Культуральные надосадочные жидкости собирают по временным точкам, обычно через 24-72 часа. В другом воплощении используемым анализом является MLR. В этом

анализе первичные Т-клетки стимулируются аллогенным APC. Культуральные надосадочные жидкости собирают по временным точкам, обычно через 24-72 часа. Уровни человеческого IFN-гамма измеряют в культуральных надосадочных жидкостях стандартными методами ELISA. Коммерческие наборы доступны от поставщиков, и анализ проводится в соответствии с рекомендацией производителя.

Термин «очищенный» в применении к нуклеиновым кислотам, таким как, те, которые кодируют иммуномодулирующие белки по настоящему изобретению, как правило, означает нуклеиновую кислоту или полипептид, который по существу свободен от других компонентов, определенных с помощью аналитических методов, хорошо известных в данной области техники (например, очищенный полипептид или полинуклеотид образует дискретную полосу в электрофоретическом геле, хроматографическом элюате и/или среде, подвергнутой центрифугированию в градиенте плотности). Например, нуклеиновая кислота или полипептид, который дает по существу одну полосу в электрофоретическом геле, является «очищенной». Очищенная нуклеиновая кислота или белок является очищенной, по меньшей мере, около на 50%, обычно, по меньшей мере, на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 99% или более очищенной (например, в процентах по массе или на молярной основе).

Термин «рекомбинантный» указывает на то, что материал (например, нуклеиновая кислота или полипептид) искусственно (т.е. не природным образом) изменен путем вмешательства человека. Изменение может быть выполнено на материале внутри или, при его удалении из его естественного окружения или состояния. Например, «рекомбинантная нуклеиновая кислота» представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая производится рекомбинированием нуклеиновых кислот, например, во время клонирования, модификации аффинности, перетасовкой ДНК или другими хорошо известными молекулярно-биологическими процедурами. «Рекомбинантная молекула ДНК» состоит из сегментов ДНК, соединенных вместе с помощью таких молекулярно-биологических методов. Используемый в данном документе термин «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид» относится к молекуле белка, которая экспрессируется с использованием молекулы рекомбинантной ДНК. «Рекомбинантная клетка-хозяин» представляет собой клетку, которая включает и/или экспрессирует рекомбинантную нуклеиновую кислоту или которая в противном случае изменена генной инженерией, например, путем введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, такой как трансмембранный иммуномодулирующий белок, предлагаемый в данном документе. Сигналы контроля транскрипции у эукариот включают элементы «промотор» и «энхансер». Промоторы и энхансеры состоят из

коротких массивов последовательностей ДНК, которые специфически взаимодействуют с клеточными белками, участвующими в транскрипции. Элементы промотора и энхансера были выделены из различных источников эукариот, включая гены в клетках дрожжей, насекомых и млекопитающих и вирусах (аналогичные контрольные элементы, т.е. промоторы, также обнаружены у прокариот). Выбор конкретного промотора и энхансера зависит от того, какой тип клетки следует использовать для экспрессии интересующего белка. Термины «в функциональной комбинации», «функциональным образом» и «функционально связанные», используемые в данном документе, относятся к связыванию нуклеотидных последовательностей таким образом или в такой ориентации, что образуется нуклеотидная молекула, способная направлять транскрипцию данного гена и/или синтез молекулы искомого белка.

Термин «рекомбинантный экспрессирующий вектор», при использовании в данном документе, относится к молекуле ДНК, содержащей требуемую кодирующую последовательность и соответствующую нуклеотидную последовательность, необходимую для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. Нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосом и, возможно, другие последовательности. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования. Секреторную сигнальную пептидную последовательность также необязательно можно кодировать рекомбинантным экспрессирующим вектором, функционально связанным с кодирующей последовательностью рекомбинантного белка, такой как рекомбинантный гибридный белок, так что экспрессируемый гибридный белок может быть секретирован рекомбинантной клеткой-хозяином, для облегчения выделения гибридного белка из клетки, если это необходимо. Термин включает вектор как самовоспроизводящую нуклеотидную структуру, и вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Среди векторов есть вирусные векторы, такие как лентивирусные векторы.

Термин «селективность» относится к предпочтению испытуемого белка или полипептида специфически связываться с одним субстратом, таким как один когнатный партнер связывания, по сравнению со специфическим связыванием с другим субстратом, таким как другой когнатный партнер связывания целевого белка. Селективность может быть отражена как отношение активности связывания (например, аффинности связывания) испытуемого белка и первого субстрата, такого как первый когнатный партнер связывания (например, Kd1) и активность связывания (например, аффинность

связывания) того же испытуемого белка со вторым когнатным партнером связывания (например, Kd2).

Используемый в данном документе термин «идентичность последовательности» относится к идентичности последовательности между генами или белками на уровне нуклеотидов или аминокислот, соответственно. «Идентификация последовательности» является мерой идентичности между белками на уровне аминокислот и мерой идентичности между нуклеиновыми кислотами на уровне нуклеотидов. Идентификация последовательности белка может быть определена путем сравнения аминокислотной последовательности в данном положении в каждой последовательности, когда последовательности выровнены. Точно так же идентичность нуклеотидной последовательности может быть определена путем сравнения нуклеотидной последовательности в заданном положении в каждой последовательности, когда последовательности выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области, такие способы включают GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA. Алгоритм BLAST вычисляет процент идентичности последовательности и выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями. Программное обеспечение для выполнения BLAST-анализа доступно на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

Термин «растворимый», используемый в данном документе в отношении белков, означает, что белок не является мембранным белком. В общем, растворимый белок включает только внеклеточный домен рецептора семейства IgSF или его часть, содержащую домен IgSF или домены или их специфически связывающие фрагменты, но не включает трансмембранный домен и/или не способен экспрессироваться на поверхности клетки. В некоторых случаях растворимость белка может быть улучшена путем связывания или прикрепления, прямо или опосредованно через линкер, с доменом Fc, что в некоторых случаях также может улучшить стабильность и/или период полужизни белка. В некоторых аспектах растворимый белок представляет собой Fc-гибридный белок.

Термин «виды», при использовании в данном документе в отношении полипептидов или нуклеиновых кислот означает ансамбль молекул с идентичными или по существу идентичными последовательностями. Изменение между молекулами, которые принадлежат к одному и тому же молекулярному виду, может происходить из-за различий в посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, нитрозилирование, метилирование, ацетилирование и липидация. Слегка укороченные последовательности, которые отличаются (или кодируют отличие) от

полноразмерных видов на аминоконце или карбоксиконце не более чем на 1, 2 или 3 аминокислотных остатка, считаются одним видом. Такие микрогетерогенности являются общей чертой изготовленных белков.

Термин «специфический связывающий фрагмент», используемый в данном документе в отношении полноразмерного полипептида ICOSL дикого типа млекопитающих или его домена IgV или IgC, означает полипептид, имеющий подпоследовательность с доменом IgV и/или IgC и который специфически связывается in vitro и/или in vivo с ICOS млекопитающих и/или CD28 млекопитающих, таким как человеческий или мышиный ICOS или CD28. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент ICOSL IgV или ICOSL IgC составляет, по меньшей мере, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% длины последовательности полноразмерной последовательности дикого типа. Специфический связывающий фрагмент может быть изменен в последовательности с образованием варианта ICOSL по изобретению.

Используемый в данном документе термин «специфически связывается» означает способность белка в условиях специфического связывания связываться с белком-мишенью, так что его аффинность или авидность, по меньшей мере, в 10 раз больше, но необязательно 50, 100, 250 или 500 или даже, по меньшей мере, в 1000 раз больше, чем средняя аффинность или авидность одного и того же белка, к набору случайных пептидов или полипептидов с достаточным статистическим размером. Конкретно связывающийся белок не обязательно должен связываться исключительно с одной молекулой-мишенью, но может специфически связываться с молекулой, не являющейся мишенью, из-за сходства структурной конформации между мишенью и не-мишенью (например, паралогами или ортологами). Специалисты поймут, что возможно специфическое связывание с молекулой, имеющей ту же функцию у разных видов животных (то есть ортологом), или с нецелевой молекулой, имеющей по существу подобный эпитоп, что и молекула-мишень (например, паралогом) и не это не понижает специфичность связывания, которая определяется относительно статистически достоверного набора уникальных не-мишеней (например, случайных полипептидов). Таким образом, полипептид по изобретению может специфически связываться с более чем одним отдельным видом молекулы-мишени из-за перекрестной реактивности. Для определения специфического связывания между двумя белками можно использовать твердофазные иммуноанализы ELISA или измерения Biacore. Как правило, взаимодействия между двумя связывающими белками имеют константы диссоциации (Kd) менее $1x10^{-5}$ М и часто до $1 x 10^{-12}$ М. В некоторых аспектах настоящего раскрытия взаимодействия между двумя связывающими белками имеют константы диссоциации $1x10^{-6}$ М, $1x10^{-7}$ М, $1x10^{-8}$ М,

$1x10^{-9}$ M, $1x10^{-10}$ M или $1x10^{-11}$ M.

Термины «экспрессирует на поверхности» или «поверхностная экспрессия» применительно к клетке млекопитающего, экспрессирующей полипептид, означает, что полипептид экспрессируется в виде мембранного белка. В некоторых воплощениях мембранный белок представляет собой трансмембранный белок.

Используемый в данном документе термин «синтетический» применительно, например, к синтетической молекуле нуклеиновой кислоты или синтетическому гену или синтетическому пептиду относится к молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле полипептида, которая образуется рекомбинантными способами и/или способами химического синтеза.

Термин «нацеливающий фрагмент», используемый в данном описании, относится к композиции, которая является ковалентно или нековалентно присоединенной к, или физически инкапсулирующей полипептид, содержащий вариантный ICOSL по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях нацеливающий фрагмент обладает специфической аффинностью связывания с молекулой-мишенью, такой как молекула-мишень, экспрессируемая в клетке. Как правило, молекула-мишень локализуется в определенной ткани или клеточном типе. Нацеливающие функциональные группы включают: антитела, антигенсвязывающий фрагмент (Fab), вариабельный фрагмент (Fv), содержащий VH и VL, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий VH и VL, соединенные вместе в одной цепи, а также другие фрагменты V-области антитела, такие как Fab′, F(ab)2, F(ab′)2, dsFv-диатело, нанотела, растворимые рецепторы, рецепторные лиганды, аффинные зрелые рецепторы или лиганды, а также низкомолекулярные композиции (<500 дальтон) (например, специфические связывающие рецепторные композиции). Нацеливающие функциональные группы также могут быть присоединены ковалентно или нековалентно к липидной мембране липосом, которые инкапсулируют полипептид по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин «трансмембранный белок» означает мембранный белок, который по существу или полностью пронизывает липидный бислой, например, липидные бислои, обнаруженные в биологической мембране, например, в клетке млекопитающего, или в искусственной конструкции, такой как липосома. Трансмембранный белок включает трансмембранный домен («трансмембранный домен»), посредством которого он интегрирован в липидный бислой и с помощью которого интеграция является термодинамически устойчивой в физиологических условиях. Трансмембранные домены обычно прогнозируются по их аминокислотной последовательности любым из коммерчески доступных программных приложений для

биоинформатики из-за их повышенной гидрофобности по сравнению с областями белка, которые взаимодействуют с водными средами (например, цитозолем, внеклеточной жидкостью). Трансмембранный домен часто представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая заполняет мембрану. Трансмембранный белок может проходить через оба слоя липидного бислоя один или несколько раз. Трансмембранный белок включает предоставленные трансмембранные иммуномодулирующие белки, описанные в данном документе. В дополнение к трансмембранному домену трансмембранный иммуномодулирующий белок по изобретению дополнительно включает эктодомен и, в некоторых воплощениях, эндодомен.

Термины «лечить», «лечение» или «терапия» заболевания или расстройства, используемые в данном документе, означает замедление, прекращение или обращение прогрессирования заболевания или расстройства, о чем свидетельствует убывание, прекращение или устранение либо клинических либо диагностических симптомов, путем введения терапевтической композиции (например, содержащей иммуномодулирующий белок или сконструированные клетки) по изобретению либо отдельно, либо в комбинации с другим соединением, как описано в данном документе. «Лечить», «лечение» или «терапия» также означает снижение тяжести симптомов при остром или хроническом заболевании или расстройстве или снижение частоты рецидивов, как, например, в случае рецидивирующего или ремиссионного аутоиммунного заболевания, или уменьшение воспаления в случае воспалительного аспекта аутоиммунного заболевания. При использовании в данном документе в контексте ракового заболевания, термины «лечение» или «ингибировать» или «ингибирование» рака относится, по меньшей мере, к одному из числа: статистически значимого снижения скорости роста опухоли, прекращению рост опухоли или уменьшению размера, массы, метаболической активности или объема опухоли, что измеряется стандартными критериями, такими как, без ограничения указанным, критерии оценки ответа для солидных опухолей (RECIST) или статистически значимое увеличение выживаемости без прогрессирования (PFS) или общая выживаемость (OS). «Предотвращать», «профилактика» или «предотвращение» заболевания или расстройства, используемое в контексте настоящего изобретения, относится к введению иммуномодулирующего полипептида или сконструированных клеток, по изобретению, либо отдельно, либо в комбинации с другим соединением для предотвращения возникновения или начала заболевания или расстройства или некоторых или всех симптомов заболевания или расстройства или для уменьшения вероятности возникновения заболевания или расстройства.

Термин «опухоль-специфический антиген» или «TSA», при использовании в

данном документе, относится к антигену, который присутствует, в основном, в опухолевых клетках объекта млекопитающего, но обычно не обнаруживается в нормальных клетках испытуемого млекопитающего. Опухоль-специфичный антиген не обязательно должен быть эксклюзивным для опухолевых клеток, но процент клеток конкретного млекопитающего, у которых опухоль-специфичный антиген достаточно высок, или уровни опухоль-специфичного антигена на поверхности опухоли достаточно высоки, так что антиген может быть использован в качестве мишени противоопухолевой терапии и обеспечивать профилактику или лечение млекопитающего от воздействия опухоли. В некоторых воплощениях в случайном статистическом образце клеток млекопитающего с опухолью, по меньшей мере, 50% клеток, имеющих TSA, являются раковыми. В других воплощениях, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% клеток, содержащих TSA, являются раковыми.

Термин «вариантный» (также «модифицированный» или мутант»), используемый по отношению к вариантному ICOSL, означает ICOSL, например, ICOSL млекопитающих (например, человека или мыши), созданный путем вмешательства человека. Вариантный ICOSL представляет собой полипептид, имеющий измененную аминокислотную последовательность, относительно референсного (немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа. Вариантный ICOSL представляет собой полипептид, который отличается от референсного ICOSL, последовательности изоформы ICOSL дикого типа одной или несколькими модификациями, такими как одна или несколько аминокислотных замен, делеций, добавлений или их комбинаций. Для целей настоящего изобретения вариантный ICOSL содержит, по меньшей мере, один домен с модифицированной аффинностью, в результате чего одно или несколько аминокислотных отличий встречаются в домене IgSF (например, домене IgV). Вариантный ICOSL 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 аминокислотных различий, таких как аминокислотные замены. Вариантный полипептид ICOSL обычно имеет, 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 относительно соответствующего референсного (например, немодифицированного ICOSL) или ICOSL дикого типа, такой как последовательность SEQ ID NO: 5, ее зрелой последовательности или ее части, содержащей внеклеточный домен или ее домен IgSF. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет, 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 для соответствующего референсного (например, немодифицированного ICOSL) или ICOSL

дикого типа, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 196 или 545. Неприродные аминокислоты, а также природные аминокислоты включены в объем допустимых замен или добавлений. Вариантный ICOSL не ограничивается каким-либо конкретным способом получения и включает, например, химический синтез de novo, методы рекомбинантной ДНК de novo или их комбинации. Вариант ICOSL по изобретению специфически связывается с CD28, ICOS и/или CTLA-4 млекопитающих. В некоторых воплощениях измененная аминокислотная последовательность приводит к изменению (то есть увеличению или уменьшению) аффинности или авидности связывания с ICOS и/или CD28 по сравнению с белком ICOSL дикого типа. Увеличение или уменьшение аффинности или авидности связывания можно определить 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, Vol. 1(9): 793-801 (1994). Увеличение аффинности или авидности связывания вариантного ICOSL с ICOS и/или CD28 имеет значение, по меньшей мере, на 5% больше, чем значение референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа, и в некоторых воплощениях, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, на 100% больше контрольного значения референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа. Уменьшение аффинности или авидности связывания ICOSL с ICOS и/или CD28 составляет значение не более 95% от контрольных значений для дикого типа, а в некоторых воплощениях не более 80%, 70% 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или отсутствие обнаруживаемой аффинности или авидности связывания контрольных значений ICOS и/или CD28 дикого типа. Вариантный ICOSL изменяется в первичной аминокислотной последовательности путем замещения, добавления или делеции аминокислотных остатков. Термин «вариантный» в контексте вариантного ICOSL не может быть истолкован как наложение какого-либо условия для какой-либо конкретной исходной композиции или способа, с помощью которого создается вариантный ICOSL. Вариантный ICOSL может, например, быть получен, начиная с информации о последовательности референсного ICOSL или ICOSL дикого типа млекопитающего, затем смоделирован in silico для связывания с ICOS и/или CD28 и, наконец, рекомбинантно или химически синтезирован так, чтобы получить вариантный ICOSL по настоящему изобретению. В одном альтернативном примере вариантный ICOSL может быть создан путем сайт-направленного мутагенеза референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа. Таким образом, вариантный ICOSL обозначает композицию, а не продукт, полученный любым способом. Могут быть использованы

различные способы, включая рекомбинантные способы, химический синтез или их комбинации.

Используемый в данном документе термин «дикий тип» или «естественный» или «нативный» в связи с биологическими материалами, такими как нуклеотидные молекулы, белки, представители IgSF, клетки-хозяева и тому подобное, относится к тем биологическим материалам, которые обнаруживаются в природе и не модифицированы вмешательством человека.

11. II. ВАРИАНТНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ICOSL

В данном документе, предлагаются вариантные полипептиды ICOSL, которые демонстрируют измененную (увеличенную или уменьшенную) активность связывания или аффинность к одному или нескольким из когнатных партнеров связывания ICOSL. В некоторых воплощениях когнатный партнер связывания ICOSL представляет собой один или несколько из числа CD28, ICOS или CTLA-4. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает одну или несколько аминокислотных модификаций, таких как одна или несколько замен (в качестве варианта «мутаций» или «замещений»), делеций или добавлений в домене (IgD) иммуноглобулинового суперсемейства (IgSF) по отношению к полипептиду ICOSL дикого типа или немодифицированному полипептиду ICOSL или к части ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL, содержащей домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) или его специфический связывающий фрагмент. Таким образом, предоставленный вариантный полипептид ICOSL представляет собой или включает вариантный IgD (далее именуемый «vIgD»), в котором в IgD имеют место одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замен).

В некоторых воплощениях IgD включает домен IgV или домен IgC (например, IgC2) или специфический связывающий фрагмент домена IgV или домена IgC (например, IgC2), или их комбинации. В некоторых воплощениях IgD может представлять собой только IgV, комбинацию IgV и IgC, включая весь внеклеточный домен (ECD), или любую комбинацию Ig-доменов ICOSL. В Таблице 2 приведены примерные остатки, которые соответствуют областям IgV или IgC в ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или домен IgC или их специфические связывающие фрагменты, в которых в домене IgV или IgC или его специфическом связывающем фрагменте, по меньшей мере, имеет место одна аминокислотная модификация (например, замена). В некоторых воплощениях в силу измененной связывающей активности или аффинности домен IgV или домен IgC является доменом IgSF с модифицированной аффинностью.

В некоторых воплощениях вариант модифицирован в еще одном домене IgSF

относительно последовательности референсного (например, немодифицированного) ICOSL. В некоторых воплощениях последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL представляет собой ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях референсный (например, немодифицированный) ICOSL или ICOSL дикого типа имеет последовательность нативного ICOSL или его ортолога. В некоторых воплощениях референсный (например, немодифицированный) ICOSL или ICOSL дикого типа представляет собой или включает внеклеточный домен (ECD) ICOSL или его часть, содержащую один или несколько доменов IgSF (см. Таблицу 2). В некоторых воплощениях внеклеточный домен полипептида референсного (например, немодифицированного) ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа включает домен IgV и домен IgC или домены. Однако вариантный полипептид ICOSL не должен включать как домен IgV, так и домен или домены IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает или состоит в основном из домена IgV или его специфического связывающего фрагмента. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает или состоит в основном из домена IgC или его специфических связывающих фрагментов. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL является растворимым и не имеет трансмембранного домена. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL дополнительно включает трансмембранный домен, а в некоторых случаях также и цитоплазматический домен.

В некоторых воплощениях последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа представляет собой последовательность ICOSL млекопитающего. В некоторых воплощениях последовательность последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа может представлять собой ICOSL млекопитающего, которым является, без ограничения указанным, человек, мышь, яваский макак или крыса. В некоторых воплощениях последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа является человеческой.

В некоторых воплощениях последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа имеет (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или его зрелую форму, утратившую сигнальную последовательность, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 или ее зрелой формой или (iii) представляет собой часть (i) или (ii), содержащую домен IgV или IgC или их специфические связывающие фрагменты.

В некоторых воплощениях последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа представляет собой или включает внеклеточный домен ICOSL или его часть. В некоторых воплощениях последовательность референсного ICOSL или ICOSL дикого типа включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, или ее ортолог.

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTG EKNAAT (SEQ ID NO:32)

В некоторых случаях последовательность референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа может включать (i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 32 или (iii) является специфическим связывающим фрагментом последовательности (i) или (ii), содержащей домен IgV или домен IgC.

В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL содержит укороченный внеклеточный домен, содержащий укорочение С-конца относительно референсной последовательности внеклеточного домена ICOSL, представленную в SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях С-концевое укорочение составляет составляет, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 125 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях С-концевое укорочение имеет, по меньшей мере, 1, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 15, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 25, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 35 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях полипептид ICOSL, содержащий С-концевое укорочение, не содержит, за пределами С-концевой точки укорочения, смежные аминокислотные остатки ICOSL дикого типа. Следовательно, среди предлагаемых референсных последовательностей ICOSL имеются такие, которые короче полного внеклеточного домена ICOSL дикого типа, например изложенного в SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях полипептид ICOSL, содержащий укорочение С-конца, не содержит или не слит с аминокислотными остатками домена ICOSL за пределами внеклеточного домена.

В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL изменен, например,

мутированный или делеционный, в одном или нескольких сайтах расщепления протеазой. Как обнаружено в данной работе, полипептид ICOSL дикого типа содержит сайт расщепления протеазой, который в некоторых случаях приводит к расщеплению белка при экспрессии в клетках, например, клетках яичника китайского хомяка, в результате чего получается неоднородный продукт нескольких видов, в том числе видов различной длины или размеров. Например, расщепление полипептида ICOSL может происходить в сайте расщепления протеазы LQQN/LT между остатками 207 и 208 SEQ ID NO: 32 («/» обозначает потенциальный сайт расщепления). В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL изменен или в нем отсутствует сайт расщепления протеазой, обозначенный как аминокислоты 204-209 в SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях укороченный полипептид ICOSL является более устойчивым к расщеплению протеазой по сравнению с полипептидом ICOSL дикого типа или не укороченным. Примерный укороченный полипептид ICOSL с укорочением ECD, в которых отсутствует весь сайт расщепления LQQN/LT или его часть (укороченные варианты обозначены как # 2, # 3, # 4, # 5, # 6, # 7 или # 8), представлены в SEQ ID NO: 600-606.

Укороченный вариант #2:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNL (SEQ ID NO: 600)

Укороченный вариант #3:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLTVGSQ (SEQ ID NO: 601)

Укороченный вариант #4:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQN (SEQ ID NO: 602)

Укороченный вариант #5:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQ (SEQ ID NO: 603)

Укороченный вариант #6:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL (SEQ ID NO: 604)

Укороченный вариант #7:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIEN (SEQ ID NO: 605)

Укороченный вариант #8:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLT (SEQ ID NO: 606)

В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL изменен в одной или нескольких аминокислотах, соответствующих аминокислотам 204-209, относительно SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен в референсном ICOSL или его специфическом связывающем фрагменте, соответствующих положению(ям) 207 и/или 208, относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N207A, N207G, L208G, или их консервативных аминокислотых модификаций, например, замен. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, представляют собой N207A/L208G или N207G/L208G. В некоторых воплощениях полноразмерные референсные ECD или укороченные референсные ECD вариантного полипептида ICOSL модифицированы так, чтобы содержать одну или несколько модификаций аминокислот, например замен, выбранных из N207A, N207G, L208G или консервативной модификации аминокислот. Примерные полноразмерные или укороченные референсные ECD с одной или несколькими модификациями приведены в SEQ ID NO: 607-628. Примерные референсные последовательности, содержащие мутации в сайте расщепления N207 и/или L208 относительно положений, приведенных в SEQ ID NO: 32, изложены в SEQ ID NO: 624-628. В некоторых случаях предоставленные модификации могут снижать расщепление протеазой полипептида ICOSL, такое как расщепление, которое может

происходить в сайте расщепления протеазой LQQN/LT.

В некоторых воплощениях комбинации вышеупомянутых стратегий укорочения и модификации могут использоваться в референсной последовательности ICOSL ECD. В некоторых воплощениях модификации, например замены, сделаны в укороченном референсном полипептиде ICOSL, таком как примерная эталонная последовательность ICOSL, приведенная в SEQ ID NO: 600-606. Примерные последовательности вариантных ICOSL с модификациями в потенциальных сайтах расщепления протеаз N207 и/или L208 приведены в SEQ ID NO: 607-628. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет пониженное расщепление протеазой по сравнению с полипептидом ICOSL дикого типа, таким как содержащий последовательность ECD, представленную в SEQ ID NO: 32.

В некоторых воплощениях эталонный (например, немодифицированный) полипептид ICOSL или полипептид ICOSL дикого типа содержит домен IgV или домен IgC или их специфический связывающий фрагмент. В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL, содержащий домен IgV, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 196 (соответствует аминокислотным остаткам 19-129 в SEQ ID NO: 5), или ее ортолог.

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS
LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVE
(SEQ ID NO:196)

В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL, содержащий домен IgV, содержит, по меньшей мере, аминокислоты 1-112, 1-113, 1-114, 1-115, 1-116, 1-117, 1-118, 1-119, 1 -120, 1-121, 1-122, относительно представленной в SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях референсный полипептид ICOSL, содержащий домен IgV, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 545 (соответствует аминокислотным остаткам 19-140 в SEQ ID NO: 5), или ее ортолог. В некоторых воплощениях домен IgV является единственным доменом IgSF референсного полипептида ICOSL.

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS
LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT
LHVAANFSV (SEQ ID NO: 545)

В некоторых воплощениях домен IgV эталонного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа может содержать (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 196 или 545, (ii) последовательность аминокислот которая имеет, по меньшей мере, приблизительно 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 196 или 545, или (iii) специфический связывающий фрагмент последовательности аминокислот, указанных в SEQ ID NO: 196 или 545, или специфический связывающий фрагмент последовательности (i) или (ii). В некоторых воплощениях эталонный (например, немодифицированный) домен IgV способен связывать один или несколько когнатных белков, связывающих ICOSL, таких как один или несколько из числа CD28, ICOS или CTLA-4.

В некоторых воплощениях домен IgC референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде остатков 141-227 SEQ ID NO: 5, или ее ортолог. Например, домен IgC полипептида ICOSL дикого типа или немодифицированного полипептида ICOSL может включать (i) аминокислотную последовательность, содержащую остатки 141-227 в SEQ ID NO: 5, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности к остаткам 141 -227 в SEQ ID NO: 5 или (iii) (i) или (ii). В некоторых воплощениях референсный домен IgV способен связывать один или несколько родственных ICOSL связывающих белков.

В некоторых воплощениях референсный (например, немодифицированный) полипептид ICOSL или полипептид ICOSL дикого типа содержит специфический связывающий фрагмент ICOSL, такой как специфический связывающий фрагмент домена IgV или домена IgC. В некоторых вариантах конкретный связывающий фрагмент может связывать CD28, ICOS и/или CTLA4. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент может иметь аминокислотную длину, по меньшей мере, 50 аминокислот, например, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90, 100 или 110 аминокислот. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент домена IgV включает аминокислотную последовательность, которая составляет, по меньшей мере, около 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% длины домена IgV, представленного как аминокислоты 19-129 в SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях специфический связывающий фрагмент домена IgC включает аминокислотную последовательность, которая составляет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% длины домена IgC, представленного как аминокислоты 141-227 в SEQ ID NO: 5.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает домен ECD, укороченный домен ECD или его часть, содержащую один или большее количество IgSF

доменов с модифицированной аффинностью. В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL могут содержать домен IgV или домен IgC, в котором один или несколько доменов IgSF (IgV или IgC) или специфический связывающий фрагмент домена IgV или специфический связывающий фрагмент домена IgC включает одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замен). В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL могут содержать домен IgV и домен IgC или специфический связывающий фрагмент домена IgV и специфический связывающий фрагмент домена IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgV. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgV. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgV и полноразмерный домен IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полноразмерный домен IgV и специфический связывающий фрагмент домена IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgV и полноразмерный домен IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент домена IgV и специфический связывающий фрагмент домена IgC.

В любом из таких воплощений, модификация одной или нескольких аминокислот (например, замены) вариантных полипептидов ICOSL может быть расположена в любом одном или нескольких из полипептидных доменов ICOSL. Например, в некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находятся во внеклеточном домене (ECD) вариантного полипептида ICOSL, такого как представленный в SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен расположены в домене IgV или специфическом связывающем фрагменте домена IgV. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций (например, замены) расположены в домене IgC или специфическом связывающем фрагменте домена IgC.

В целом, каждый из различных атрибутов полипептидов раскрыт отдельно ниже (например, растворимые, секретируемые и мембраносвязанные полипептиды, аффинность ICOSL к CD28, ICOS и CTLA-4, количество вариаций в полипептидной цепи, количество связанных полипептидных цепей, количество и характер изменений аминокислот на один вариантный ICOSL и т. д.). Однако, как будет ясно специалисту в данной области, любой конкретный полипептид может включать комбинацию этих независимых атрибутов.

Понятно, что ссылка на аминокислоты, в том числе на конкретную последовательность, представленную как SEQ ID NO, используемую для описания доменной организации домена IgSF, предназначена для иллюстративных целей и не предназначена для ограничения объема предлагаемых воплощений. Понятно, что полипептиды и описание их доменов теоретически получены на основании анализа гомологии и выравнивания с аналогичными молекулами. Таким образом, точный локус может варьировать и не обязательно является одинаковым для каждого белка. Следовательно, специфический домен IgSF, такой как специфический домен IgV или домен IgC, может быть на несколько аминокислот (одну, две, три или четыре) длиннее или короче.

Кроме того, различные воплощения изобретения, как обсуждается ниже, часто предоставляются в пределах значения определенного термина, как описано выше. Поэтому воплощения, описанные в конкретном определении, должны интерпретироваться как включаемые посредством ссылки, когда определенный термин используется при обсуждении различных аспектов и атрибутов, описанных в данном документе. Таким образом, заголовки, порядок представления различных аспектов и воплощений и отдельное раскрытие каждого независимого атрибута не являются ограничением объема настоящего раскрытия.

A. Примерные модификации

В данном документе предлагаются вариантные полипептиды ICOSL, содержащие, по меньшей мере, один аффинной модифицированный домен IgSF (например, IgV или IgC) или их специфический связывающий фрагмент в домене IgSF, содержащемся в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа таким образом, что вариантный полипептид ICOSL проявляет измененную (увеличенную или уменьшенную) связывающую активность или аффиность к одному или нескольким лигандам, ICOS, CD28 или CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет аффинность связывания с CD28, ICOS и/или CTLA-4, которая отличается от контрольной последовательности референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа, что определено, например, твердофазным иммуноферментным анализом ELISA, проточной цитометрией или анализом Biacore. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет повышенную аффинность связывания с CD28, ICOS и/или CTLA-4. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет уменьшенную аффинность связывания с CD28, ICOS и/или CTLA-4 относительно референсного (немодифицированного) полипептида ICOSL дикого

типа или полипептида ICOSL дикого типа. CD28, ICOS и/или CTLA-4 могут представлять собой белок млекопитающих, такой как белок человека или белок мыши.

Аффинность связывания для каждого из когнатных партнеров связывания является независимой; то есть в некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет повышенную аффинность связывания с одним, двумя или тремя из CD28, ICOS и/или CTLA-4 и уменьшенную аффинность связывания с одним, двумя или тремя из CD28, ICOS, и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и пониженной аффинностью связывания с ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида

ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и повышенной аффинностью связывания с ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и пониженной аффинностью связывания с CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и повышенной аффинностью связывания с CTLA4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. -

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с ICOS и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с ICOS и пониженной аффинностью связывания с CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с ICOS и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с ICOS и повышенной аффинностью связывания с CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28, ICOS и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и ICOS и пониженной аффинностью связывания с

CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и CTLA-4 и пониженной аффинностью связывания с ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и ICOS и повышенной аффинностью связывания с CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и повышенной аффинностью связывания с ICOS и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает повышенной аффинностью связывания с CD28 и пониженной аффинностью связывания с ICOS и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28, CTLA-4 и ICOS, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL обладает пониженной аффинностью связывания с CD28 и повышенной аффинностью связывания с ICOS и CTLA-4, относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL с повышенной или большей аффинностью связывания с CD28, ICOS и/или CTLA-4 будет иметь увеличение аффинности связывания относительно контрольного референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа, по меньшей мере, на около 5%, например, по меньшей мере, на около 10%, 15%, 20%, 25%, 35% или 50% для CD28, ICOS и/или CTLA-4. В некоторых воплощениях увеличение аффинности связывания относительного референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа составляет более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз 40 раз или 50 раз. В таких примерах референсный (например, немодифицированный) полипептид ICOSL или полипептид ICOSL дикого типа имеет такую же последовательность, что и вариантный полипептид ICOSL, за исключением того, что он

не включает одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замен).

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL с уменьшенной или сниженной аффинностью связывания с CD28, ICOS, и/или CTLA-4 будет иметь снижение аффинности связывания относительно контрольного референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа, по меньшей мере, на 5%, например, по меньшей мере, на около 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более для CD28, ICOSL и/или CTLA-4. В некоторых воплощениях уменьшение аффинности связывания относительного референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа составляет более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз 40 раз или 50 раз. В таких примерах референсный (например, немодифицированный) полипептид ICOSL или полипептид ICOSL дикого типа имеет такую же последовательность, что и вариантный полипептид ICOSL, за исключением того, что он не включает одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замен).

В некоторых воплощениях, равновесная константа диссоциации (Kd) любого из вышеприведенных воплощений, для CD28, ICOS и/или CTLA-4 может составлять меньше, чем $1x10^{-5}$ M, $1x10^{-6}$ M, $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-8}$ M, $1x10^{-9}$ M, $1x10^{-10}$ M or $1x10^{-11}$M, или $1x10^{-12}$ M.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет повышенную или большую аффинность связывания с CD28. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL с повышенной или большей аффинностью связывания с CD28 будет иметь увеличение аффинности связывания по отношению к референсному (например, немодифицированному) полипептиду ICOSL или полипептиду ICOSL дикого типа, по меньшей мере, примерно на 25%, например, по меньшей мере, около 30%, 40%, 50% или 60% для CD28. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL с повышенной или большей аффинностью связывания с CD28 имеет равновесную константу диссоциации (Kd) менее 200 пМ, 300 пМ, 400 пМ, 500 пМ или 600 мкМ для CD28. В некоторых воплощениях вариантный полипептид специфически связывается с эктодоменом одного из ICOS, CD28 или CTLA4 с повышенной селективностью по сравнению с референсным (например, немодифицированным) полипептидом ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях повышенная селективность в отношении CD28. В некоторых воплощениях повышенная селективность включает большее соотношение связывания вариантного полипептида ICOSL с одним когнатным партнером связывания, выбранным из ICOS, CD28 и CTLA4, относительно другого когнатного партнера связывания по сравнению с соотношением связывания референсного

(например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа с одним когнатным партнером связывания относительно другого когнатного партнера связывания. В некоторых воплощениях отношение выше, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около в 1,5 раза, в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4,0 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 15 раз, в 20 раз, в 30 раз, 40 раз, 50 раз или более.

Референсный (например, немодифицированный) полипептид ICOSL или полипептид ICOSL дикого типа не обязательно должен использоваться в качестве исходной композиции для получения описанных в данном документе вариантов полипептидов ICOSL. Поэтому применение термина «модификация», например, «замещение», не означает, что настоящие воплощения ограничены конкретным способом получения вариантных полипептидов ICOSL. Вариантные полипептиды ICOSL могут быть получены, например, путем пептидного синтеза de novo и, следовательно, необязательно требуют модификации, такой как «замещение», в смысле изменения кодона для кодирования модификации, например замещения. Этот принцип также распространяется на термины «добавление» и «делеция» аминокислотного остатка, которые также не подразумевают конкретного способа осуществления. Средства, с помощью которых разрабатываются или создаются вариантные полипептиды ICOSL, не ограничены каким-либо конкретным способом. В некоторых воплощениях, однако, нуклеиновая кислота, кодирующая референсный (например, немодифицированный) полипептид ICOSL или полипептид ICOSL дикого типа, подергается мутагенезу из генетического материала референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа и подвергается скринингу для поиска искомой специфической аффинности связывания и/или индукции экспрессии IFN-гамма или другой функциональной активности. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL синтезируется de novo с использованием последовательностей белков или нуклеиновых кислот, доступных в любом количестве из общедоступных баз данных, а затем подвергается скринингу. Национальный центр информации по биотехнологии предоставляет такую информацию, и его веб-сайт является общедоступным через Интернет, как и база данных UniProtKB, обсуждаемая ранее.

Если не указано иное, как указано в настоящем описании, аминокислотная модификация(и) обозначена номером положения аминокислоты, соответствующей нумерации положений референсной последовательности ECD, указанной в SEQ ID NO: 32. Способность определения соответствующего положения модификации находится в пределах компетенции специалиста в данной области, например, определения аминокислотной замены в полипептиде ICOSL, включая его часть, содержащую домен

IgSF (например, IgV), например, путем выравнивания референсной последовательности (например, SEQ ID NO:196, 545, 600-628) с SEQ ID NO:32. При перечислении модификаций во всем этом описании, аминокислотное положение указывается посередине с соответствующей референсной (например, немодифицированной или дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной аминокислотной заменой, указанной после номера. Если модификация является делецией в данном положении, то указывается «del», а если модификация является вставкой в данном положении, то указывается «ins». В некоторых случаях вставка указана с аминокислотным положением, указанным в середине, с соответствующей референсной аминокислотой, указанной до и после номера, и идентифицированной вариантной аминокислотной вставкой, указанной после немодифицированной (например, дикого типа) аминокислоты.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен в референсной (например, немодифицированной) последовательности ICOSL или последовательности ICOSL дикого типа. Одна или несколько аминокислотных модификаций, например замен, может иметь место в эктодомене (внеклеточном домене) референсной (например, немодифицированной) последовательности ICOSL или последовательности ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замен, может иметь место в домене IgV или его специфическом связывающем фрагменте. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замен, может иметь место в домене IgC или его специфическом связывающем фрагменте. В некоторых воплощениях вариантного полипептида ICOSL могут иметь место некоторые из одной или нескольких аминокислотных модификаций, например замен, в домене IgV или его специфическом связывающем фрагменте, и могут иметь место некоторые из одной или нескольких аминокислотных модификаций, например замен, в IgC домен или его специфическом связывающем фрагменте.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, например замен. Модификация, например замена, может иметь место в домене IgV или в домене IgC. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных замен в домене IgV или его специфическом связывающем фрагменте. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислотных замен в домене IgC или его специфическом связывающем фрагменте. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL идентичен, по

меньшей мере, на 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% с референсной (например, немодифицированной) последовательностью ICOSL или последовательностью ICOSL дикого типа или его специфического связывающего фрагмента, таких как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 32, 196 или 545.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33, 37, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 77, 78, 75, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно нумерации SEQ ID NO: 32.

В некоторых воплощениях такие вариантные полипептиды ICOSL проявляют измененную аффинность связывания с одним или несколькими из числа CD28, ICOS и/или CTLA-4 относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа. Например, в некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с CD28, ICOS и/или CTLA-4 по сравнению с референсным (например, немодифицированным) или полипептидом ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет пониженную аффинность связывания с CD28, ICOS или CTLA-4 по сравнению с референсным (например, немодифицированным) или полипептидом ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, Y47H, T43A, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S,

N52T, N52V, N52Y, S54A, S54P, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G,S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F,I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H,W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190S, T190A, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K или их консервативных аминокислотых модификаций, например, замен. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K или их консервативных аминокислотых модификаций, например, замен.

Консервативная аминокислотная модификация, например замена, представляет собой любую аминокислоту, которая попадает в тот же класс аминокислот, что и замещенные аминокислоты, но отлична от референсной (например, немодифицированной) аминокислоты или аминокислоты дикого типа. Классами аминокислот являются алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксильные или серосодержащие (серин, цистеин, треонин и метионин), циклические (пролин),

ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан) основные (гистидин, лизин и аргинин) и кислые/амид (аспартат, глутамат, аспарагин и глутамин).

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из числа NM10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54P, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y,R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T, Q100V, G103E, L102R, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G,S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H,W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A или N227K.. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K или их консервативных аминокислотых модификаций, например, замен.

В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций,

например, замен, выбрана из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/G103E, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/Q100P, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D,

N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, Q100R, F138L/L203P, N57Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115Q/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R /F172S/C198R, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q/N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P,

N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L или N57Q/Q100P.

В некоторых воплощениях, одну или несколько модификаций выбирают из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R,
Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G,
A20T/N52D/Y146C/Q164L,
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R,
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R,
N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,
N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q, F138L/L203P, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,

E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P, S54F/V193A или R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из мутаций, перечисленных в Таблице 1. В Таблице 1 также приведены примерные последовательности со ссылкой на SEQ ID NO для внеклеточного домена (ECD) или домена IgV референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа примерных вариантных полипептидов ICOSL. Как видно, точный локус или остатки, соответствующие данному домену, могут варьировать, например, в зависимости от способов, используемых для идентификации или классификации домена. Кроме того, в некоторых случаях соседние N- и/или C-концевые аминокислоты данного домена (например, IgV) также могут быть включены в последовательность вариантного полипептида IgSF, например, чтобы обеспечить правильное сворачивание домена при его экспрессии. Таким образом, понятно, что иллюстративные примеры SEQ ID NO в Таблице 1 не следует рассматривать как ограничение. Например, конкретный домен, такой как домен ECD вариантного полипептида ICOSL может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, в частности на 1-10, например на 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот длиннее или короче, чем аминокислотная последовательность, указанная в

соответствующей SEQ ID NO.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из мутаций, перечисленных в Таблице 1. В некоторых примерах мутации сделаны в референсном ICOSL, содержащем аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, референсном ICOSL, который содержит домен IgV ICOSL, указанный в SEQ ID NO: 196 или 545, или референсном ICOSL, который является укороченным и/или модифицированным, содержащий последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 600-628. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в Таблице 1 (то есть любую из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в Таблице 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685) и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в Таблице 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685) и включает аминокислотную модификацию(ии), например замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в Таблице 1 (то есть любую из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685, 905, 908). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в Таблице 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 109-142, 239,

280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685, 905, 908) и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), перечисленных в Таблице 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685, 905, 908) и включает аминокислотную модификацию(ии), например замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей IgV, перечисленных в Таблице 1 (то есть любую из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любой из последовательностей IgV, перечисленных в Таблице 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857) и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей IgV, перечисленных в Таблице 1 (то есть в любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857) и включает аминокислотную замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей IgV, перечисленных в Таблице 1 (то есть любую из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98%

идентичности или 99% идентичности с любой из последовательностей IgV, перечисленных в Таблице 1 (то есть любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910) и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей IgV, перечисленных в Таблице 1 (то есть в любой из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910) и включает аминокислотную замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) ICOSL или ICOSL дикого типа.

Мутации, обозначенные буквой «X», указывают на то, что обозначенное положение включает Q или остаток дикого типа, указанный в соответствующем положении SEQ ID NO: 32.

ТАБЛИЦА 1. Примерные вариантные полипептиды ICOSL

Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Дикий тип	32	196, 545
N52S	109	197, 546
N52H	110	198, 547
N52D	111	199, 548
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	782, 783
N52H/N57Y/Q100P	113	201, 549
N52S/Y146C/Y152C	114	197, 546
N52H/C198R	115	198, 547
N52H/C140D/T225A	116	198, 547
N52H/C198R/T225A	117	198, 547
N52H/K92R	118	202, 550
N52H/S99G	119	203, 551
N52Y	120	204, 552
N57Y	121	205, 553
N57Y/Q100P	122	206, 554
N52S/S130G/Y152C	123	197, 546
N52S/Y152C	124	197, 546
N52S/C198R	125	197, 546
N52Y/N57Y/Y152C	126	782, 783
N52Y/N57Y/H129P/C198R	127	782, 783
N52H/L161P/C198R	128	198, 547
N52S/T113E	129	197, 555
S54A	130	207, 556
N52D/S54P	131	208, 557
N52K/L208P	132	785, 786
N52S/Y152H	133	197, 546
N52D/V151A	134	199, 548

ТАБЛИЦА 1. Примерные вариантные полипептиды ICOSL		
Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N52H/I143T	135	198, 547
N52S/L80P	136	210, 558
F120S/Y152H/N201S	137	196, 545
N52S/R75Q/L203P	138	787, 788
N52S/D158G	139	197, 546
N52D/Q133H	140	199, 548
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R	141	212, 559
N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	142	789, 560
N52S/G103E	239	240, 561
N52H/F78L/Q100R	280	326, 562
N52H/N57Y/Q100R/V110D	281	327, 563
N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D	282	328, 564
N52H/N57Y/Q100R	283	329, 565
N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D	284	330, 566
N52H/Q100R	285	331, 567
N52H/S121G	286	198, 568
A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G	287	332, 569
N52H/N57Y/Q100P	288	333, 570
N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S	289	791, 792
N52H/N57Y/Q100R/V122A	290	329, 571
N52H/N57Y/Q100R/F172S	291	329, 565
N52H/N57Y	292	334, 572
N52S/F120S	293	197, 573
N52S/V97A	294	335, 574
N52S/G72R	295	336, 575
N52S/A71T/A117T	296	793, 576
N52S/E220G	297	197, 546
Y47H/N52S/V107A/F120S	298	794, 577
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T	299	327, 563
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R	300	795, 796
Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G	301	797, 798
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R	302	327, 563
N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R	303	799, 800
F27S/N52H/N57Y/V110N	304	337, 578
N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q	305	801, 802
S18R/N52S/F93L/I143V/R221G	306	803, 804
A20T/N52D/Y146C/Q164L	307	805. 806
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T	308	807, 808
N52S/H94E/L96I/V122M	309	809, 579
N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N	310	810, 811
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F	311	812, 813
S25G/N30D/N52S/F120S/N227K	312	814, 815
N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S	313	816, 817

ТАБЛИЦА 1. Примерные вариантные полипептиды ICOSL		
Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R	314	327, 818
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R	315	327, 563
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R	316	819, 820
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I	317	821, 822
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R	318	823, 824
N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R	319	825, 826
N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R	320	327, 827
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R	321	327, 563
N52S/H94E/L98F/Q100R	322	338, 580
N52S/E90A	323	339, 581
N30D/K42E/N52S	324	340, 582
N52S/F120S/I143V/I224V	325	197, 573
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G	364	828, 829
N52H/N57Y/Q100R/C198R	365	329, 565
N52S/N194D	366	197, 546
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R	367	830, 831
N52S/S54P	368	382, 583
T38P/N52S/N57D	369	383, 584
E111del	370	384, 585
Y33del	371	385, 586
N52H/C140del/T225A	372	198, 547
N52H/F78L/Q100R/C198R	373	326, 562
N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D	374	386, 587
N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G	375	832, 833
N52H/S121G/C198R	376	198, 568
N52S/F120S/N227K	377	197, 573
N52S/A71T/A117T/T190A/C198R	378	793, 576
T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S	379	790, 834
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T	380	327, 563
N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G	381	835, 836
N84Q	387	425, 588
N119Q	388	196, 842
N168Q	389	196, 545
N207Q	390	196, 545
N52Q/N207X	391	837, 838
N168X/N207X	392	196, 545
N52Q/N168Q	393	837, 838
N84Q/N207Q	394	425, 840
N155Q/N207Q	395	196, 545
N119Q/N168Q	396	196, 842
N119Q/N207Q	397	196, 842
N119Q/N155X	398	196, 842
N52Q/N84Q	399	426, 590
N52Q/N119Q	400	837, 591
N84Q/N119Q	401	425, 592

ТАБЛИЦА 1. Примерные вариантные полипептиды ICOSL		
Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N52Q/N84Q/N168Q	402	426, 590
N52Q/N84Q/N207Q	403	426, 590
N84Q/N155Q/N168Q	404	425, 588
N84Q/N168Q/N207Q	405	425, 588
N84Q/N155H/N207Q	406	425, 588
N155Q/N168Q/N207Q	407	196, 545
N119Q N155Q/N168Q	408	196, 842
N119Q/N168Q/N207Q	409	196, 842
N84Q/N119Q/N207Q	410	425, 592
N119Q/N155H/N207Q	411	196, 842
N84Q/N119Q/N155Q	412	425, 592
N52Q/N119Q/N155Q	413	837, 591
N52H/N84Q/N119Q	414	839, 593
N52H/N84Q/N168X/N207X	415	839, 841
N52Q/N84Q/N155X/N168X	416	426, 590
N52Q/N84Q/N119Q/N168Q	417	426, 843
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q	418	425, 592
N84Q/N155Q/N168Q/N207Q	419	425, 588
N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	420	425, 592
N52Q/N84Q/N119Q/N207Q	421	426, 843
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q	422	426, 843
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	423	426, 843
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q	424	425, 592
Q100R	427	434, 594
F138L/L203P	428	196, 545
N52Y/F138L/L203P	429	204, 552
N57Y/Q100R/C198R	430	844, 845
N57Y/F138L/L203P	431	205, 553
Q100R/F138L	432	846, 847
L203P	433	196, 545
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	435	329, 596
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R	436	329, 565
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R	437	329, 596
N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R	438	329, 596
N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R	439	849, 850
N52H/V122A/F172S/C198R	440	198, 851
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D	441	329, 596
N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R	442	334, 595
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	443	329, 596
N52H/N57Y/H115R	444	334, 595
N52H/N57Y/Q100R/H115R	445	329, 596
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V	446	329, 596
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S	447	329, 596
N52H/N57Y/Q100R/F172S	448	329, 565
N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S	449	331, 852
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S	450	333, 853
N52Y/N57Y/Q100P/F172S	451	854, 855

ТАБЛИЦА 1. Примерные вариантные полипептиды ICOSL		
Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R	452	795, 796
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R	453	795, 796
N52S/E90A/H115R	454	339, 597
N30D/K42E/N52S/H115R	455	856, 598
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I	456	856, 598
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R	457	856, 598
N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D	458	856, 598
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R	459	197, 857
N52S/H115R/F172S/C198R	460	197, 853
N52H/N57Y/Q100P/C198R	461	333, 570
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R	462	333, 599
N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R	463	333, 570
N52H/N57Y/Q100P/H115R	464	333, 599
N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R	465	333, 599
N52H/Q100R/C198R	466	331, 567
N52H/Q100R/H115R/F172S	467	331, 852
N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R	468	331, 848
N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R	469	331, 852
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R	470	329, 565
N52A/N57F/Q100S	638	686, 734
N52A/N57H/Q100S	639	687, 735
N52A/N57Y/Q100A	640	688, 736
N52D/N57A/Q100A	641	689, 737
N52D/Q100S	642	690, 738
N52G/Q100A	643	691, 739
N52H/Q100A	644	692, 740
N52M/N57H/Q100S	645	693, 741
N52M/N57W/Q100P	646	694, 742
N52Q/N57F	647	695, 743
N52Q/N57S/Q100A	648	696, 744
N52R/N57L/Q100A	649	697, 745
N52R/N57Y/Q100P	650	698, 746
N52R/N57Y/Q100S	651	699, 747
N52S/N57A/Q100A	652	700, 748
N52S/N57H/Q100E	653	701, 749
N52S/N57L/Q100S	654	702, 750
N52S/N57M/Q100S	655	703, 751
N52S/N57Y/Q100S	656	704, 752
N52S/N57Y/Q100M	657	705, 753
N52S/N57Y/Q100V	658	706, 754
N52T/N57H/Q100S	659	707, 755
N52T/N57H/Q100A	660	708, 756
N52T/N57Y/Q100A	661	709, 757
N52V/N57L/Q100A	662	710, 758
N52H/N57Y/Q100K	663	711, 759
N52K/N57Y/Q100R	664	712, 760

ТАБЛИЦА 1. Примерные вариантные полипептиды ICOSL		
Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
N52L/N57H/Q100R	665	713, 761
N52R/N57F/Q100N	666	714, 762
N52R/N57F/Q100P	667	715, 763
N52R/N57F/Q100R	668	716, 764
N52R/N57F/Q100T	669	717, 765
N52R/N57H/Q100K	670	718, 766
N52R/N57L/Q100S	671	719, 767
N52R/N57W/Q100K	672	720, 768
N52R/N57W	673	721, 769
N52R/N57Y/Q100R	674	722, 770
N52C/N57E/Q100S	675	723, 771
N52G/N57P/Q100D	676	724, 772
N52G/N57V/Q100G	677	725, 773
N52G/N57V	678	726, 774
N52L/N57V	679	727, 775
N52P/N57P	680	728, 776
N52P/N57S/Q100G	681	729, 777
N52S/N57L/Q100G	682	730, 778
N52T/N57K/Q100P	683	731, 779
N52V/N57T/Q100L	684	732, 780
N57Q/Q100P	685	733, 781
S54F/V193A	905	906, 907
R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R	908	909, 910

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность к эктодомену CD28 по сравнению с референсным (например, немодифицированным) полипептидом ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа, например, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, 196 или 545. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность к эктодомену ICOS по сравнению с референсным (например, немодифицированным) полипептидом ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа, например, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, 196 или 545. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность к эктодомену CD28 и эктодомену ICOS по сравнению с референсным (например, немодифицированным) полипептидом ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа, например, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, 196 или 545.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену, соответствующую положению(ям) 52, 54 или 57. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или

несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранную из N52H, N52D, N52Q, N52S, N52Y, N52K, S54A, S54P или N57Y или консервативную аминокислотную модификацию, например, замену. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранную из N52H, N52D, N52S, N52K или N57Y или консервативную аминокислотную модификацию, например замену.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL может содержать одну или несколько дополнительных аминокислотных модификаций, например, замену в дополнение к аминокислотной модификации, например, замену в положении, соответствующем положению 52, 54 или 57. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замена, находятся в положении, соответствующем 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 37, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 221, 224, 225 или 227. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например замена, находятся в положении, соответствующем 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO:32.

В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52H, N52D, N52S, N52Y, N52K, N52Q, S54A, S54P, N57D, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100R, Q100K, Q100P, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S,S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G,S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140del, S142F,I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H,W153R, I154F, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V,

T225A, N227K или их консервативных аминокислотных замен. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных модификаций, например замену, выбранных из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K или их консервативных аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях любого из вариантных полипептидов ICOSL, описанных выше, вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает одну или несколько аминокислотных делеций, соответствующих положению 140 из SEQ ID NO: 32.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет еще одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из числа N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52S/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q,

N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 52, 57 или 100 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T или Q100V. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбрана из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C,

N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R,
Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L,
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R,
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R,
N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K,

N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52D, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G,

N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L или N57Q/Q100P.

В некоторых воплощениях, одну или несколько модификаций выбирают из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R,
Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G,
A20T/N52D/Y146C/Q164L,
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R,
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R,
N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,

N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D,
N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D,
N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K,
N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,
N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q,
N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q,
N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q,
N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q,
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R,
N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R,
N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S,
N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S,
N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R,
N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I,
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D,
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R,
N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R,
N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S,
N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A,
N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A,
N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A,
N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S,
N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A,
N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R,

N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P или R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52A, N52C, N52D, N52G, N52K, N52L, N52M, N52R, N52T, N52V, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100S, Q100T или Q100V относительно SEQ ID NO:32. В некоторых воплощениях, одну или несколько модификаций выбирают из N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L или N57Q/Q100P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замену, выбранных из N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52Y/N57Y/F138L/L203P, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R, N52H/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/V152C/K156M/C198R, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52S/E90A, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, N52H/N57Y/Q100P или N52S/N194D.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или

несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R или N52H/N57Y/Q100R/C198R. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R и N52H/N57Y/Q100P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52H/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52H/K92R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y/Q100P, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52K/L208P или N52H/I143T.

В некоторых воплощениях, одну или несколько модификаций выбирают из F120S/Y152H/N201S, E111del, Y33del, N168Q/N207Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N84Q/N119Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q или F138L/L203P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания при связывании с одним из эктодоменов CD28 или ICOS и проявляет пониженную аффинность связывания при связывании с другими эктодоменами из CD28 или ICOS по сравнению с референсным (например, немодифицированным) полипептидом ICOSL или полипептидом ICOSL дикого типа, например, включающим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, 196 или 545.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с ICOS. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находится в положении, соответствующем 16, 30, 42, 52, 54, 57, 75, 90, 92, 100, 102, 110, 113, 115, 120, 122, 133, 138, 143, 146, 152, 156, 158, 172, 194, 198, 203, 208, 221, 224 или 225. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из C198R, D158G, E16V, E90A, F120S, F138L, F172S, H115R, H115X, I143T, I143V, I224V, K156M, K42E, K92R, L102R, L203P, L208P, N194D, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52Y, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57S, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100D, Q100E, Q100K, Q100M, Q100P, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q133H, R221I, R75Q, S54A, S54P, T113E, T225A, V110D, V122A, Y146C, Y152C или их консервативных

аминокислотных замен. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52S, N52H, N52D, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y, N52S/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R , N57Y/F138L/L203P, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R, H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N30D/K42E/N52S/H115R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52T/N57H/Q100S, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G или N52T/N57K/Q100P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с ICOS и проявляет пониженную аффинностью связывания с

CD28. В некоторых воплощениях одна или несколько дополнительных аминокислотных замен находятся в положении, соответствующем 52, 57, 80 100, 130, 152, 161 или 198. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52S, N52H, N52Y, N52H, N57Y, L80P, Q100P Q100R, Q100K, V110D, S130G, Y152C, L161P, L161M, C198R, R221G или их консервативных аминокислотных замен. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52Y/N57Y/Y152C, N52H/L161P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/L80P, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M/C198R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с CD28. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находится в положении, соответствующем 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 36, 40, 41, 42, 52, 54, 57, 63, 70, 71, 72, 74, 77, 80, 81, 84, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96, 98, 99, 100, 102, 107, 109, 110, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 126, 127, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 143, 144, 146, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 166, 168, 169, 172, 173, 178, 190, 192, 193, 194, 198, 199, 201, 203, 207, 208, 209, 212, 218, 221, 224, 225 или 227.

В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из A117T, A20V, A71T, A91G, A91G, AE88D, C140del, C198R, D158G, D77G, D90K, E117G, E135K, E16V, E81A, E88D, E90A, F120I, F120S, F138L, F172S, F27C, F92Y, G72R, H115R, H115X, H129P, H94E, I118V, I127T, I143T, I143V, I154F, I218N, I218T, I224V, K156M, K169E, K36G, K42E, K89R, K92R, K93R, L102R, L161P, L166Q, L173S, L203F, L203P, L208P, L209P, L40M, L70Q, L70R, L74Q, L80P, L96I, L98F, M10I, M10V, N115Q, N119Q, N122S, N144D, N155X, N168Q, N168X, N178S, N194D, N207Q, N207X, N227K, N25S, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N57A, N57F, N57H, N57L, N57M,

N57S, N57V, N57W, N57Y, N63S, N84Q, Q100A, Q100E, Q100G, Q100K, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, Q133H, R221G, R221I, S109G, S109N, S114T, S121G, S126R, S126T, S130G, S132F, S13G, S18R, S192G, S212G, S25G, S54A, S54P, S99G, T113E, T120S, T130A, T139S, T190A, T199S, T225A, T41I, V107I, V110A, V110D, V11E, V122A, V122M, V193M, V210A, W153R, Y146C, Y152C, Y152H или их консервативных аминокислотных замен. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52S, N52H, N52D, N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/D158G, N52D/Q133H, L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/E117G/ I118V/T120S/T130A, L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S, L70Q/E81A/A91G/ I118V/T120S/I127T/ T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V /T120S/T130A, T41I/A91G, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/ N178S, E88D/K89R/D90K/A91G/ F92Y/K93R, AE88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R, K36G/L40M, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/F120S/N227K, N52S/N194D, N52S/F120S, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/ F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q/, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/Q100R, N52H/S121G/C198R, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R R221I, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N52S/H115R/F172S/C198R, N119Q, N207Q, N52Q/N207X, N168X/N207X, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N119Q N155X, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N207Q, N119Q/N155Q/N168Q, N52H/N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N155X/N168X, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G или N52T/N57K/Q100P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с CD28 и проявляет пониженную аффинность связывания с ICOS. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находится в положении, соответствующем 52, 75 или 203. В некоторых воплощениях вариантный

ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52S, R75Q, L203F или L203P. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет аминокислотные замены N52S/R75Q/L203P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 16, 30, 42, 52, 57, 90, 100, 102, 110, 115, 120, 122, 138, 143, 152, 156, 172, 194, 198, 203, 221 или 224 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из E16V, N30D, K42E, N52H, N52Y, N52S, N57Y, E90A, Q100R, Q100P, L102R, V110D, H115R, F120S, V122A, F138L, I143V, I143T, H152C, K156M, F172S, N194D, C198R, L203P, R221I или I224V. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 115, 172 или 198 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из H115R, F172S или C198R. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, представляют собой N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R,

N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R или N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R. В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL демонстрируют потенциально повышенную растворимость белка или повышенную экспрессию белка («мутации растворимости») относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), представленную в SEQ ID NO: 435-470. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любым из внеклеточных доменов (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенную аффинность связывания с CD28 и проявляет пониженную аффинность связывания с ICOS. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных замен находится в положении, соответствующем 16, 30, 42, 52, 54, 57, 90, 92, 100, 102, 110, 113, 115, 120, 122, 133, 138, 143, 146, 152, 156, 158, 172, 194, 198, 203, 208, 212, 224 или 225. В некоторых воплощениях вариантный ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из C198R, D158G, E16V, E90A, F120S, F138L, F172S, H115R, I143V, I224V, K156M, K42E, K92R, L102R, L203P, L208P, N194D, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52Y, N57F, N57H, N57L, N57M, N57S, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100E, Q100G, Q100K, Q100M, Q100P, Q100R, Q100S, Q133H, S212G, S54A, S54P, T113E, T225A, V110D, V122A, Y146C, Y152C или их консервативных аминокислотных замен. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N52A/N57Y/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P,

N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52T/N57H/Q100S, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52S, N52H, N52D, N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y, N52S/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52H/I143T, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A/H115R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 52, 57, 100, 138, 198 или 203 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52H, N52Y, N57Y, Q100R, Q100P, F138L, C198R или L203P. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций,

например, замен, представляют собой Q100R, F138L/L203P, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, или L203P.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей внеклеточного домена (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 427-433. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любым из внеклеточных доменов (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 427-433, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает последовательность IgV, представленную в SEQ ID NO: 434. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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 с последовательностью IgV, представленной в SEQ ID NO: 434, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент последовательности IgV, представленный в SEQ ID NO: 434, и включает аминокислотную замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или

специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 52, 84, 91, 119, 155, 168, 207 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из A91S, N52H, N52Q, N84Q, N119Q, N155H, N155Q, N168Q, N207Q. В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, представляют собой N84Q, N119Q, N168Q, N207Q, N52Q, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q , N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q or A91S/N119Q/N168Q/N207Q. В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL проявляют потенциально сниженное гликозилирование относительно референсного (например, немодифицированного) полипептида ICOSL или полипептида ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD) представлены в SEQ ID NO: 387-424, 427-433, 435-470. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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, такие как, по меньшей мере, 96% идентичности, 97% идентичности, 98% идентичности или 99% идентичности с любым из внеклеточных доменов (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент любой из последовательностей внеклеточного домена (ECD), предлагаемых в SEQ ID NO: 387-424, 427-433, 435-470, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы) отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде

ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает любую из последовательностей IgV, предлагаемых в SEQ ID NO: 425-426. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает полипептидную последовательность, которая имеет, 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 с последовательностью IgV, представленной в SEQ ID NO: 425-426, и включает аминокислотную модификацию(ии), например, замену(ы), отсутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL включает специфический связывающий фрагмент последовательностей IgV, предлагаемых в SEQ ID NO: 425-426, и включает аминокислотную замену(ы), не присутствующую в референсном (например, немодифицированном) полипептиде ICOSL или полипептиде ICOSL дикого типа.

III. ФОРМАТЫ ВАРИАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ

Иммуномодуляторный полипептид, содержащий вариантный ICOSL, представленный в данном документе, может быть задан в формате различных форм, в том числе и в виде растворимого белка, мембранного связанного белка, секретируемого белка, конъюгата или гибрида или для экспрессии сконструированной клеткой с помощью инфекционного агента, как описано в других местах в данном документе. В некоторых аспектах как иммуномодулирующие полипептиды, содержащие один или несколько видов ICOSL, так и иммуномодулирующие полипептиды, содержащие несколько доменов IgSF, могут быть отформатированы различными способами.

В некоторых воплощениях конкретный формат может быть выбран для искомого терапевтического применения. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный полипептид ICOSL, предоставляется в формате для того, чтобы оказывать антагонистичное воздействие или блокировать активность его когнатного партнера связывания, например, CD28. В некоторых воплощениях антагонизм CD28 может быть полезен для лечения воспаления или аутоиммунитета. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный полипептид ICOSL, предоставляется в форме для агонистического воздействия или стимуляции активности его когнатного партнера связывания, например, CD28. В некоторых воплощениях агонизм CD28 может быть полезен для лечения онкологических заболеваний. Специалист в данной области может легко определить активность конкретного формата, например, для

антагонизма или агонизма одного или нескольких конкретных когнатных партнеров связывания. Примерные способы оценки таких видов активности приведены в данном документе, в том числе в примерах.

В некоторых воплощениях, растворимый иммуномодулирующий полипептид, такие как вариантный ICOSL, содержащий vIgD, может быть инкапсулирован в липосоме, которая сам по себе может быть конъюгирована с любым из или с любой комбинацией предлагаемых конъюгатов (например, нацеливающим функциональным фрагментом). В некоторых воплощениях растворимые или мембранные иммуномодулирующие полипептиды по изобретению дегликозилируются. В более конкретных воплощениях последовательность вариантного ICOSL является дегликозилированной. В еще более конкретных воплощениях IgG и/или IgC (например, IgC2) домен или домены варианта ICOSL дегликозилированы.

Неограничивающие примеры предлагаемых форматов описаны на фиг. 13A-13C и дополнительно описано ниже.

A. РАСТВОРИМЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

В некоторых аспектах предлагаются иммуномодулирующие полипептиды, содержащие vIgD из ICOSL. В некоторых воплощениях изобретения иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL представляет собой растворимый белок. Специалистам будет понятно, что клеточные поверхностные белки обычно имеют внутриклеточный, трансмембранный и внеклеточный домен (ECD) и что растворимая форма таких белков может быть получена с использованием внеклеточного домена или его иммунологически активной подпоследовательности. Таким образом, в некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL, не имеет трансмембранного домена или части трансмембранного домена. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный ICOSL, не имеет внутриклеточного (цитоплазматического) домена или части внутриклеточного домена. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL, включает только часть vIgD, содержащую домен ECD, или его часть, содержащую домен IgV и/или IgC (например, IgC2) или домены или их специфические связывающие фрагменты, содержащие аминокислотную модификацию(ии).

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный ICOSL, может включать один или несколько вариантных полипептидов ICOSL. В некоторых аспектах один или несколько дополнительных доменов IgSF, таких как один или несколько дополнительных vIgD, могут быть связаны с vIgD ICOSL, как

предлагается в настоящем документе. В некоторых аспектах как иммуномодулирующие полипептиды, содержащие один или несколько видов ICOSL, так и иммуномодулирующие полипептиды, содержащие несколько доменов IgSF, могут быть отформатированы различными способами, например, описанными в подразделе C в Разделе III.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный ICOSL, может включать один или несколько вариантных полипептидов ICOSL согласно изобретению. В некоторых воплощениях полипептид по изобретению будет содержать точно 1, 2, 3, 4, 5 вариантных последовательностей ICOSL. В некоторых воплощениях, по меньшей мере, две из вариантных последовательностей ICOSL являются идентичными вариантными последовательностями ICOSL.

В некоторых воплощениях предлагаемое представляет собой иммуномодулирующий полипептид, который включает две или более vIgD-последовательности ICOSL. Множество вариантных полипептидов ICOSL в пределах полипептидной цепи могут быть идентичными (то есть одинаковыми) между собой или могут быть не идентичными (то есть различными видами) вариантными последовательностями ICOSL. В дополнение к воплощениям с одной полипептидной цепью, в некоторых воплощениях два, три, четыре или более полипептидов по изобретению могут быть ковалентно или нековалентно прикреплены друг к другу. Таким образом, в данном документе предлагаются мономерные, димерные и более высокого порядка (например, 3, 4, 5 или более) мультимерные белки. Например, в некоторых воплощениях точно два полипептида по изобретению могут быть ковалентно или нековалентно прикреплены друг к другу с образованием димера. В некоторых воплощениях присоединение осуществляют посредством межцепочечных дисульфидных связей. Композиции, содержащие два или более полипептида по изобретению, могут иметь идентичные виды или, по существу, идентичные виды полипептида (например, гомодимеры) или не идентичные виды полипептидов (например, гетеродимеры). Композиция, имеющая множество связанных полипептидов по изобретению, может, как отмечено выше, иметь один или несколько идентичных или не идентичных вариантных полипептидов ICOSL по изобретению в каждой полипептидной цепи.

В некоторых аспектах один или несколько дополнительных доменов IgSF, таких как один или несколько дополнительных vIgD, могут быть связаны с vIgD из ICOSL, как указано в данном документе (далее называемый «стек» или «стековый» иммуномодулирующий белок). В некоторых воплощениях модульный формат предлагаемых иммуномодулирующих белков обеспечивает гибкость при разработке или

получении иммуномодулирующих белков для модуляции активности множественных контрструктур (множественных когнатных партнеров связывания). В некоторых воплощениях такие «стековые» молекулы могут быть представлены в растворимом формате или, в некоторых случаях, могут быть представлены в виде связанных с мембраной или секретируемых белков.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующие белки могут содержать любой из вариантных полипептидов ICOSL, предлагаемых в данном документе, который связан, прямо или опосредованно, с одним или несколькими другим доменом суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) («стековая» конструкция иммуномодулирующего белка и также называется «иммуномодулирующий белок II типа»). В некоторых аспектах это может создать уникальные многодоменные иммуномодулирующие белки, которые связывают два или более таких, например, три или более, когнатных партнеров связывания, тем самым обеспечивая мультитаргетную модуляцию иммунного синапса.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок включает комбинацию («комбинацию не дикого типа») и/или компоновку («компоновку не дикого типа» или «пермутацию не дикого типа») домена вариантного ICOSL с одной или несколькими последовательностями других модифицированных по аффинности и/или не модифицированных по аффинности доменов IgSF другого представителя семейства IgSF (например, представителя семейства IgSF млекопитающих), которые не встречаются в представителях семейства IgSF дикого типа. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок включает 2, 3, 4, 5 или 6 доменов суперсемейства иммуноглобулина (IgSF), где, по меньшей мере, один из доменов IgSF является вариантным ICOSL IgSF доменом (vIgD ICOSL) в соответствии с предоставленным описанием.

В некоторых воплощениях, последовательности дополнительных доменов IgSF могут быть модифицированным доменом IgSF, который включает одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, по сравнению с референсным (например, немодифицированным) доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа. В некоторых воплощениях домен IgSF может быть с немодифицированной аффинностью (например, дикого типа) или с модифицированной аффинностью. В некоторых воплощениях референсный (например, немодифицированный) домен IgSF или домен IgSF дикого типа может происходить из мыши, крысы, яванского макака или человека или их комбинаций. В некоторых воплощениях дополнительные домены IgSF могут быть доменом IgSF представителя семейства IgSF, описанного в Таблице 2. В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF может быть доменом IgSF с

модифицированной аффинностью, содержащим одну или несколько аминокислотных модификаций, например замен, по сравнению с доменом IgSF, содержащимся в представителе семейства IgSF, описанном в Таблице 2.

В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF является доменом IgSF с модифицированной или немодифицированной аффинностью содержащийся в представителе семейства IgSF, выбранном из семейства сигнал-регулирующего белка (SIRP), семейства белков, подобных инициирующему рецептору на миелоидных клетках (TREML), семейства молекул клеточной адгезии связанный с карциноэмбриональным антигеном (CEACAM), семейства Ig-подобного лектина, связывающего сиаловую кислоту (SIGLEC), семейства бутирофилина, семейства B7, семейства CD28, семейства белков, содержащих V-set и иммуноглобулиновый домен (VSIG), семейства V-set трансмембранного домена (VSTM), семейства главного комплекса гистосовместимости (MHC), семейства молекул активации лимфоцитарного сигналинга (SLAM), лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LIR), семейства нектинов (Nec), семейства нектиноподобных белков (NECL), семейства белков, родственных рецептору полиовируса (PVR), семейства рецептора запуска естественной цитотоксичности (NCR), семейства Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM) или семейства иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KIR). В некоторых воплощениях дополнительные домены IgSF независимо получены 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-alpha), CD8B(CD8-beta), LAG3, HAVCR2(TIM-3), CEACAM1, TIGIT, PVR(CD155), PVRL2(CD112), CD226, CD2, CD160, CD200, CD200R1(CD200R) и NCR3 (NKp30).

В первом столбце таблицы 2 указано название и, необязательно, название некоторых возможных синонимов для данного конкретного представителя IgSF. Второй столбец включает идентификатор белка в базе данных UniProtKB, публичной базе данных, доступной через Интернет на uniprot.org или, в некоторых случаях, номер GenBank. Universal Protein Resource (UniProt) - это комплексный ресурс для белковых последовательностей и аннотирующих данных. Базы данных UniProt включают UniProt Knowledgebase (UniProtKB). UniProt представляет собой сотрудничество между Европейским институтом биоинформатики (EMBL-EBI), Швейцарским институтом биоинформатики SIB и Protein Information Resource (PIR) и поддерживается главным образом грантом Национальных институтов здоровья США (NIH). GenBank - это база данных генетических последовательностей NIH, аннотированная коллекция всех

общедоступных последовательностей ДНК (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41 (D1): D36-42). Третий столбец включает область, в которой расположен указанный домен IgSF. Область указана как диапазон, где домен расположен между остатками, определяющими диапазон. Столбец 3 также указывает класс домена IgSF для указанной области IgSF. Столбец 4 описывает область, в которой расположены указанные дополнительные домены (сигнальный пептид, S, внеклеточный домен, E, трансмембранный домен, T; цитоплазматический домен, C). Понятно, что описание доменов может варьировать в зависимости от способов, используемых для идентификации или классификации домена, и может быть идентифицировано по-разному из разных источников. Описание остатков, соответствующих домену в Таблице 2, представлено только для примера и может быть на несколько аминокислот (например, одну, две, три или четыре) длиннее или короче. Столбец 5 указывает для некоторых из перечисленных представителей IgSF, некоторые из их когнатных партнеров связывания клеточной поверхности.

ТАБЛИЦА 2. Представители IgSF согласно настоящему раскрытию.

Представитель IgSF (Сино-нимы)	Идентификационный номер белка NCBI/ Идентификатор белка UniProtKB	Область IgSF & Класс Домена	Другие домены	Когнатные партнеры связывания клеточной поверхности	Аминокислотная последовательность представителя IgSF (SEQ ID NO)		
					Прекурсор (зрелые остатки)	Зрелый	ECD
CD80 (B7-1)	NP_005182.1 P33681	35-135, 35-138 или 35-141, 37-138 IgV, 145-230 или 154-232 IgC	S: 1-34, E: 35-242, T: 243-263, C: 264-288	CD28, CTLA4, PD-L1	SEQ ID NO: 1 (35-288)	SEQ ID NO: 253	SEQ ID NO: 28
CD86 (B7-2)	P42081.2	33-131 IgV, 150-225 IgC2	S: 1-23, E: 24-247, T: 248-268, C: 269-329	CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 2 (24-329)	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 29
CD274 (PD-L1, B7-H1)	Q9NZQ7.1	24-130, 19-127, IgV, 133-225 IgC2	S: 1-18, E: 19-238, T: 239-259, C: 260-290	PD-1, B7-1	SEQ ID NO: 3 (19-290)	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 30

ТАБЛИЦА 2. Представители IgSF согласно настоящему раскрытию.

Представитель IgSF (Сино-нимы)	Идентификационный номер белка NCBI/ Идентификатор белка UniProtKB	Область IgSF & Класс Домена	Другие домены	Когнатные партнеры связывания клеточной поверхности	Аминокислотная последовательность представителя IgSF (SEQ ID NO)		
					Прекурсор (зрелые остатки)	Зрелый	ECD
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	SEQ ID NO: 4 (20-273)	SEQ ID NO: 256	SEQ ID NO: 31
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)	O75144.2	19-129 IgV, 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277, C: 278-302	ICOS, CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 5 (19-302)	SEQ ID NO: 257	SEQ ID NO: 32
CD276 (B7-H3)	Q5ZPR3.1	29-139 IgV, 145-238 IgC2, 243-357 IgV2, 367-453, 363-456 IgC2	S: 1-28, E: 29-466, T: 467-487, C: 488-534		SEQ ID NO: 6 (29-534)	SEQ ID NO: 258	SEQ ID NO: 33
VTCN1 (B7-H4)	Q7Z7D3.1	35-146 IgV, 153-241 IgV	S: 1-24, E: 25-259, T: 260-280, C: 281-282		SEQ ID NO: 7 (25-282)	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 34
CD28	P10747.1	28-137 IgV	S: 1-18, E: 19-152, T: 153-179, C: 180-220	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 8 (19-220)	SEQ ID NO: 260	SEQ ID NO: 35
CTLA4	AAL07473 .1P16410.3	39-152 IgV, 39-140 IgV	S: 1-35, E: 36-161, T: 162-182, C: 183-223	B7-1, B7-2, B7RP1	SEQ ID NO: 9 (36-223)	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 36

ТАБЛИЦА 2. Представители IgSF согласно настоящему раскрытию.

Представитель IgSF (Сино-нимы)	Идентификационный номер белка NCBI/ Идентификатор белка UniProtKB	Область IgSF & Класс Домена	Другие домены	Когнатные партнеры связывания клеточной поверхности	Аминокислотная последовательность представителя IgSF (SEQ ID NO)		
					Прекурсор (зрелые остатки)	Зрелый	ECD
PDCD1 (PD-1)	Q15116.3	35-145 IgV	S: 1-20, E: 21-170, T: 171-191, C: 192-288	PD-L1, PD-L2	SEQ ID NO: 10 (21-288)	SEQ ID NO: 262	SEQ ID NO: 37
ICOS	Q9Y6W8.1	30-132 IgV	S: 1-20, E: 21-140, T: 141-161, C: 162-199	B7RP1	SEQ ID NO: 11 (21-199)	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 38
BTLA (CD272)	Q7Z6A9.3	31-132 IgV	S: 1-30, E: 31-157, T: 158-178, C: 179-289	HVEM	SEQ ID NO: 12 (31-289)	SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 39
CD4	P01730.1	26-125 IgV, 126-203 IgC2, 204-317 IgC2, 317-389, 318-374 IgC2	S: 1-25, E: 26-396, T: 397-418, C: 419-458	MHC класс II	SEQ ID NO: 13 (26-458)	SEQ ID NO: 265	SEQ ID NO: 40
CD8A (CD8-альфа)	P01732.1	22-135 IgV	S: 1-21, E: 22-182, T: 183-203, C: 204-235	MHC класс I	SEQ ID NO: 14 (22-235)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 41
CD8B (CD8-бета)	P10966.1	22-132 IgV	S: 1-21, E: 22-170, T: 171-191, C: 192-210	MHC класс I	SEQ ID NO: 15 (22-210)	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 42

ТАБЛИЦА 2. Представители IgSF согласно настоящему раскрытию.

Представитель IgSF (Сино-нимы)	Идентификационный номер белка NCBI/ Идентификатор белка UniProtKB	Область IgSF & Класс Домена	Другие домены	Когнатные партнеры связывания клеточной поверхности	Аминокислотная последовательность представителя IgSF (SEQ ID NO)		
					Прекурсор (зрелые остатки)	Зрелый	ECD
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 класс II	SEQ ID NO: 16 (29-525)	SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 43
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	SEQ ID NO: 17 (22-301)	SEQ ID NO: 269	SEQ ID NO: 44
CEACAM1	P13688.2	35-142 IgV, 145-232 IgC2, 237-317 IgC2, 323-413 IgC2	S: 1-34, E: 35-428, T: 429-452, C: 453-526	TIM-3	SEQ ID NO: 18 (35-526)	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 45
TIGIT	Q495A1.1	22-124 IgV	S: 1-21, E: 22-141, T: 142-162, C: 163-244	CD155, CD112	SEQ ID NO: 19 (22-244)	SEQ ID NO: 271	SEQ ID NO: 46
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	SEQ ID NO: 20 (21-417)	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 47
PVRL2 (CD112)	Q92692.1	32-156 IgV, 162-256 IgC2, 261-345 IgC2	S: 1-31, E: 32-360, T: 361-381, C: 382-538	TIGIT, CD226, CD112R	SEQ ID NO: 21 (32-538)	SEQ ID NO: 273	SEQ ID NO: 48

ТАБЛИЦА 2. Представители IgSF согласно настоящему раскрытию.

Представитель IgSF (Сино-нимы)	Идентификационный номер белка NCBI/ Идентификатор белка UniProtKB	Область IgSF & Класс Домена	Другие домены	Когнатные партнеры связывания клеточной поверхности	Аминокислотная последовательность представителя IgSF (SEQ ID NO)		
					Прекурсор (зрелые остатки)	Зрелый	ECD
CD226	Q15762.2	19-126 IgC2, 135-239 IgC2	S: 1-18, E: 19-254, T: 255-275, C: 276-336	CD155, CD112	SEQ ID NO: 22 (19-336)	SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 49
CD2	P06729.2	25-128 IgV, 129-209 IgC2	S: 1-24, E: 25-209, T: 210-235, C: 236-351	CD58	SEQ ID NO: 23 (25-351)	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 50
CD160	O95971.1	27-122 IgV	S: 1-26 E: 27-122	HVEM, семейство белков MHC	SEQ ID NO: 24 (27-159)	SEQ ID NO: 276	SEQ ID NO: 51
CD200	P41217.4	31-141 IgV, 142-232 IgC2	S: 1-30, E: 31-232, T: 233-259, C: 260-278	CD200R	SEQ ID NO: 25 (31-278)	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 52
CD200R1 (CD200R)	Q8TD46.2	53-139 IgV, 140-228 IgC2	S: 1-28, E: 29-243, T: 244-264, C: 265-325	CD200	SEQ ID NO: 26 (29-325)	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 53
NCR3 (NKp30)	O14931.1	19-126 IgC-like	S: 1-18, E: 19-135, T: 136-156, C: 157-201	B7-H6	SEQ ID NO:27 (19-201)	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 54
VSIG8	Q5VU13	22-141 IgV1 146-257 IgV2	S: 1-21 E: 22-263 T: 264-284 C: 285-414	VISTA	SEQ ID NO: 341 (22-414)	SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 343

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предлагаемые иммуномодулирующие белки, в дополнении к вариантному полипептиду ICOSL, также содержат, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных доменов суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), такие как домен IgD из представителя семейства IgSF, указанного в Таблице 2.

В некоторых воплощениях предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, один дополнительный домен IgSF (например, второй домен IgSF). В некоторых воплощениях предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, два дополнительных домена IgSF (например, второй и третий домен IgSF). В некоторых воплощениях предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, три дополнительных домена IgSF (например, второй, третий и четвертый). В некоторых воплощениях предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, четыре дополнительных домена IgSF (например, второй, третий, четвертый и пятый). В некоторых воплощениях предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, пять дополнительных доменов IgSF (например, второй, третий, четвертый, пятый и шестой). В некоторых воплощениях предлагаемый иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, шесть дополнительных доменов IgSF (например, второй, третий, четвертый, пятый, шестой и седьмой). В некоторых воплощениях каждый из доменов IgSF в иммуномодулирующем белке различен. В некоторых воплощениях, по меньшей мере, один из дополнительных доменов IgSF является таким же, как, по меньшей мере, один другой домен IgSF в иммуномодулирующем белке. В некоторых воплощениях каждый из доменов IgSF происходит из или получен из другого представителя семейства IgSF. В некоторых воплощениях, по меньшей мере, два из доменов IgSF происходят из одного и того же члена семейства IgSF или происходят от него.

В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF содержит домен или домены IgV или домен или домены IgC (например, IgC2), или специфический фрагмент связывания домена IgV или специфический фрагмент связывания домена или доменов IgC (например, IgC2). В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит полноразмерный домен IgV. В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит полноразмерный домен или домены IgC (например, IgC2). В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит специфический связывающий фрагмент домена IgV. В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF представляет собой или содержит

специфический связывающий фрагмент домена или доменов IgC (например, IgC2). В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, два дополнительных домена IgSF от одного (того же) представителя IgSF. Например, в некоторых аспектах иммуномодулирующий белок содержит ECD или его часть члена IgSF, содержащего полноразмерный домен IgV и полноразмерный домен IgC (например, IgC2) или домены или их специфические связывающие фрагменты.

В некоторых воплощениях предоставленные иммуномодулирующие белки содержат, по меньшей мере, один дополнительный домен IgSF (например, второй домен IgSF, или, в некоторых случаях, также третий домен IgSF), в котором, по меньшей мере, один дополнительный, например, второй или третий домен IgSF представляет собой домен IgSF, указанный в референсном (например, немодифицированном) домене IgSF или домене IgSF дикого типа или специфического связывающего фрагмента, содержащегося в аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-27 и 341. В некоторых воплощениях референсный (например, немодифицированный) домен IgSF или домен IgSF дикого типа представляет собой домен IgV или домен IgC, такой как домен IgC1 или IgC2.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения, предусмотренные иммуномодулирующие белки, в дополнении к вариантному полипептиду ICOSL, также включают, по меньшей мере, один дополнительный домен IgSF (например, или в некоторых случаях, также третий домен IgSF с модифицированной аффинностью и т.д.), в котором, по меньшей мере, один дополнительный домен IgSF представляет собой vIgD, который включает одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замен, делеций или мутаций) по сравнению с доменом IgSF в референсном (например, немодифицированной) домене IgSF или IgSF дикого типа, таком как домен IgSF в представителе семейства IgSF, представленном в Таблице 2. В некоторых воплощениях дополнительный, например, второй или третий домен IgSF с модифицированной аффинностью включает, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с референсным (например, немодифицированным) доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа или его фрагментом специфического связывания, содержащемся в аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-27 и 341. В некоторых воплощениях референсный (например, немодифицированный) домен IgSF или домен IgSF дикого типа представляет собой домен IgV или домен IgC, такой как домен IgC1 или IgC2. В некоторых воплощениях дополнительный, например, второй или третий домен IgSF представляет собой аффинно-модифицированный домен IgV и/или домен IgC. В

некоторых воплощениях один или несколько дополнительных доменов IgSF представляет собой аффинно-модифицированный домен IgSF, который содержит домен или домены IgV и/или домен или домены IgC (например, IgC2), или специфический связывающий фрагмент домена IgV и/или специфический связывающий фрагмент домена или доменов IgC (например, IgC2), в котором домен IgV и/или IgC содержит аминокислотную(ые) модификацию(ии) (например, замену(ы)). В некоторых воплощениях один или несколько дополнительных аффинно-модифицированных доменов IgSF содержат домен IgV, содержащий аминокислотную(ые) модификацию(ии) (например, замену(ы)). В некоторых воплощениях один или несколько дополнительных аффинно-модифицированных доменов IgSF включают в себя домены IgSF, присутствующие в ECD, или часть ECD соответствующего представителя референсного семейства IgSF, такие как полноразмерный домен IgV и полноразмерный домен или домены IgC (например, IgC2) или их специфически связывающие фрагменты, в которых один или оба из IgV и IgC содержат аминокислотную(ые) модификацию(ии) (например, замену(ы)). В некоторых воплощениях специфический домен или каждый из конкретных доменов (например, дополнительный, например, второй или третий домен IgSF) полипептида вариантного домена IgSF может быть на несколько аминокислот длиннее или короче, например 1-10, например 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот длиннее или короче, чем последовательность аминокислот, указанная в соответствующей SEQ ID NO.

В некоторых воплощениях предоставленный иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, один дополнительный (например, второй или, в некоторых случаях, также третий домен IgSF и т.д.) или второй домен IgSF, который представляет собой vIgD, который содержит одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с доменом IgSF (например, IgV) референсного (например, немодифицированного) домена IgSF или домена IgSF дикого типа, отличного от ICOSL.

В некоторых воплощениях дополнительный или второй домен IgSF включает одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с доменом референсного (например, немодифицированного) домена IgSF или домена IgSF дикого типа, таким как домен IgSF в представителе семейства IgSF, указанном в Таблице 2. В некоторых воплощениях дополнительный, например, второй или третий домен IgSF с модифицированной аффинностью включает, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с референсным (например, немодифицированным) доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа или его фрагментом специфического связывания, содержащемся в аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-27. В некоторых воплощениях

референсный (например, немодифицированный) домен IgSF или домен IgSF дикого типа представляет собой домен IgV или домен IgC, такой как домен IgC1 или IgC2. В некоторых воплощениях дополнительный или второй домен IgSF представляет собой домен IgV или IgC с модифицированный аффинностью. В таблицах 3-5 представлены примерные полипептиды, содержащие один или несколько доменов с модифицированным аффинностью IgSF, которые могут быть использованы в стековых конструкциях, предлагаемых в данном документе.

В некоторых воплощениях один или несколько дополнительных доменов IgSF (например, второй IgSF) является доменом IgSF (например, IgV) другого представителя семейства IgSF, который связывается или распознает опухолевый антиген. В таких воплощениях представитель семейства IgSF служит в качестве функциональной составляющей, локализующей в опухоли, тем самым доставляя vIgD ICOSL в непосредственную близость от иммунных клеток в микроокружении опухоли. В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF (например, второй IgSF) представляет собой домен IgSF NkP30, который связывает или распознает B7-H6, экспрессируемый в опухолевой клетке. В некоторых воплощениях, по меньшей мере, один дополнительный (например, второй) домен IgSF, например NkP30, представляет собой vIgD, который включает одну или несколько аминокислотных модификаций (например, замены, делеции или добавления). В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций увеличивают аффинность и/или селективность связывания с B7-H6 по сравнению с немодифицированным доменом IgSF, например, NkP30, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около в 1,2 раза, в 1,5 раза, 2-в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз в 40 раз или в 50 раз.

ТАБЛИЦА 3. Примерные вариантные полипептиды CD80

Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Дикий тип	28	152
L70Q/A91G	55	153
L70Q/A91G/T130A	56	
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A	57	
V4M/L70Q/A91G/T120S/T130A	58	154
L70Q/A91G/T120S/T130A	59	
V20L/L70Q/A91S/T120S/T130A	60	155
S44P/L70Q/A91G/T130A	61	156
L70Q/A91G/E117G/T120S/T130A	62	
A91G/T120S/T130A	63	157
L70R/A91G/T120S/T130A	64	158

L70Q/E81A/A91G/T120S/I127T/T130A	65	159
L70Q/Y87N/A91G/T130A	66	160
T28S/L70Q/A91G/E95K/T120S/T130A	67	161
N63S/L70Q/A91G/T120S/T130A	68	162
K36E/I67T/L70Q/A91G/T120S/T130A/N152T	69	163
E52G/L70Q/A91G/T120S/T130A	70	164
K37E/F59S/L70Q/A91G/T120S/T130A	71	165
A91G/S103P	72	
K89E/T130A	73	166
A91G	74	
D60V/A91G/T120S/T130A	75	167
K54M/A91G/T120S	76	168
M38T/L70Q/E77G/A91G/T120S/T130A/N152T	77	169
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/T130A	78	170
Y31H/T41G/L70Q/A91G/T120S/T130A	79	171
V68A/T110A	80	172
S66H/D90G/T110A/F116L	81	173
R29H/E52G/T120S/T130A	82	174
A91G/L102S	83	
I67T/L70Q/A91G/T120S	84	175
L70Q/A91G/T110A/T120S/T130A	85	
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/T120S/T130A	86	176
V22A/L70Q/S121P	87	177
A12V/S15F/Y31H/T41G/T130A/P137L/N152T	88	178
I67F/L70R/E88G/A91G/T120S/T130A	89	179
E24G/L25P/L70Q/T120S	90	180
A91G/F92L/F108L/T120S	91	181
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/I118T/N149S	92	182
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N144S/N149S	93	
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M42T/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/L148S/N149S	94	183
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/H96R/N149S/C182S	95	184
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S	96	
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	97	185
T41I/A91G	98	186
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S	99	187
K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	100	
K36G/K37Q/M38I/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S	101	188
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	102	189, 543
K36G/K37Q/M38I/L40M	103	190
K36G	104	191
R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	105	192
A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	106	193
R29V/Y31F/K36G/M38L/M43Q/E81R/V83I/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	107	194
V68M/L70P/L72P/K86E	108	195

L70Q/A91G/N144D	508	
L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E	509	
V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	510	
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	511	
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A	512	
V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A	513	
L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A	514	
A91G/I118V/T120S/T130A	515	
L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S	516	
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A	517	
T28S/L70Q/A91G/E95K/I118V/T120S/I126V/T130A/K169E	518	
N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A	519	
K36E/I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	520	
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A/K169E	521	
K37E/F59S/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K185E	522	
D60V/A91G/I118V/T120S/T130AK169E	523	
K54M/L70Q/A91G/Y164H/T120S	524	
M38T/L70Q/E77G/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	525	
Y31H/T41G/M43L/L70Q/A91G/I118V/T120S/I126V/T130A	526	
LS656H/D90G/T110A/F116L	527	
R29H/E52G/D90N/I118V/T120S/T130A	528	
R29H/E52G/D90N/I118V/T120S/T130A	529	
I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S	530	
L70Q/A91G/T110A/I118V/T120S/T130A	531	
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/V83A/K89E/I118V/T120S/I126V/T130A	532	
A12V/S15F/Y31H/M38L/T41G/M43L/D90N/T130A/P137L/N149D/N152T	533	
I67F/L70R/E88G/A91G/I118V/T120S/T130A	534	
E24G/L25P/L70Q/A91G/I118VT120S/N152T	535	
A91G/F92L/F108L/I118V/T120S	536	
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/N177S	537	
K36G/K37Q/M38I/L40M/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S	539	
K36G/L40M	540	542, 544

ТАБЛИЦА 4. Примерные вариантные полипептиды NKp30

Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgC-подобный домен SEQ ID NO	IgV-подобный домен SEQ ID NO
Дикий тип	54	214	929
L30V/A60V/S64P/S86G	143	215	504
L30V	144	216	930
A60V	145	217	931
S64P	146	218	932
S86G	147	219	933

ТАБЛИЦА 5. Примерные вариантные полипептиды CD86		
Мутация(и)	ECD SEQ ID NO	IgV SEQ ID NO
Дикий тип	29	220
Q35H/H90L/Q102H	148	221
Q35H	149	222
H90L	150	223
Q102H	151	224

Количество таких доменов IgSF с немодифицированной или модифицированной аффинностью, присутствующих в «стековой» конструкции иммуномодулирующего белка (будь то комбинации дикого типа или компоновки не дикого типа) составляет, по меньшей мере, 2, 3, 4 или 5 и в некоторых воплощениях точно 2, 3, 4 или 5 доменов IgSF (при этом определение количества доменов IgSF с модифицированной аффинностью игнорирует любые их фракционные последовательности неспецифического связывания и/или по существу иммунологически неактивные фракционные последовательности).

В некоторых воплощениях стекового иммуномодулирующего белка, представленного в данном описании, число доменов IgSF составляет, по меньшей мере, 2, где количество IgSF доменов с модифицицированной или немодифицированной аффинностью независимо друг от друга составляет по меньшей мере: 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Таким образом, количество доменов с модифицированной аффинностью IgSF и количество доменов IgSF с немодифицированной аффинностью, соответственно (домен IgSF модифицированной аффинностью: домен IgSF немодифицированной аффинностью), может составлять точно или не менее: 2: 0 (с модифицированной аффинностью : 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.

В некоторых воплощениях стекового иммуномодулирующего белка, по меньшей мере, два из числа доменов с немодифицированной и/или модифицированной аффинностью идентичны доменам IgSF.

В некоторых воплощениях стековый иммуномодулирующий белок, представленный в данном документе, включает, по меньшей мере, два домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффиностью из одного представителя IgSF, но в компоновке не дикого типа (в качестве варианта «пермутации»). Одним иллюстративным примером компоновки или пермутации не дикого типа является иммуномодуляторный белок, включающим порядок не дикого типа аффинности последовательностей домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью относительно тех, которые обнаруживаются в ICOSL дикого типа, чьи последовательности домена IgSF служили источником вариантных доменов IgSF,

предлагаемых в настоящем документе. Таким образом, в одном примере иммуномодулирующий белок может содержать проксимальный IgV и IgC, дистальный к трансмембранному домену, хотя и в форме с немодифицированной аффинностью и/или модифицированной аффинностью. Присутствие в иммуномодулирующем белке, представленном в данном документе, как комбинаций недикого типа, так и компоновок недикого типа доменов IgSF с немодифицированной и/или модифицированной аффинностью также входит в объем предоставленного объекта изобретения.

В некоторых воплощениях стекового иммуномодулирующего белка, домены IgSF с немодифицированной и/или модифицированной аффинностью являются неидентичными (то есть, разными) доменами IgSF. Неидентичные модифицированные по аффинности домены IgSF специфически связывают в специфических условиях связывания с различными когнатными партнерами по связыванию и являются «неидентичными» независимо от того, являются ли референсные (например, немодифицированные) домены IgSF или домены IgSF дикого типа, из которых они были сконструированы, одинаковыми. Так, например, комбинация недикого типа, по меньшей мере, двух неидентичных доменов IgSF в иммуномодулирующем белке может включать, по меньшей мере, одну последовательность домена IgSF, чье происхождение уникально для одного ICOSL, и, по меньшей мере, одну последовательность второго IgSF, чье происхождение уникально для другого представителя семейства IgSF, который не является ICOSL, где домены IgSF иммуномодулирующего белка находятся форме с немодифицированной и/или модифицированной аффинностью. Однако в альтернативных воплощениях два неидентичных домена IgSF происходят из одной и той же последовательности доменов IgSF, но, по меньшей мере, один из них с модифицированной аффинностью, так что они специфически связывают различные когнатные партнеры связывания.

Множество доменов IgSF с немодифицированной и/или модифицированной аффинностью в полипептидной цепи стекового иммуномодулирующего белка не должно быть обязательно ковалентно связанно непосредственно между собой. В некоторых воплощениях промежуточный интервал одного или нескольких аминокислотных остатков опосредованно ковалентно связывает домены IgSF с немодифицированной аффинностью и/или домены IgSF с модифицированной аффинностью между собой. Связь может осуществляться через от N-концевые остатки с C-концевыми остатками.

В некоторых воплощениях, связь может быть выполнена с помощью боковых цепей аминокислотных остатков, которые не расположены на N-конце или C-конце домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью. Таким образом, связи могут быть осуществлены через концевые или внутренние аминокислотные остатки или

их комбинации.

В некоторых воплощениях два или более доменов IgSF, в том числе vIgD из ICOSL и один или более дополнительных доменов IgSF (например, второй или третий вариантный домен IgSF) от другого представителя семейства IgSF, ковалентно или нековалентно связаны между собой. В некоторых воплощениях два или более домена IgSF связаны прямо или опосредованно, например, через линкер. В некоторых воплощениях промежуточный участок из одного или нескольких аминокислотных остатков опосредованно ковалентно связывает домены IgSF между собой. Связь может осуществляться через от N-концевые остатки с C-концевыми остатками. В некоторых воплощениях связь может быть осуществлена через боковые цепи аминокислотных остатков, которые не расположены на N-конце или C-конце домена(ов) IgSF. Таким образом, связи могут быть осуществлены через концевые или внутренние аминокислотные остатки или их комбинации.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, два домена IgSF, каждый из которых прямо или опосредованно связан через линкер. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок содержит, по меньшей мере, три иммуномодулирующих белка, каждый из которых связан прямо или опосредованно через линкер. Различные конфигурации показаны на фиг. 16A и 16B.

В некоторых воплощениях один или более «пептидных линкеров» связывают vIgD из ICOSL и дополнительный домен IgSF (например, второй или третий вариантный домен IgSF). В некоторых воплощениях пептидный линкер может быть одним аминокислотным остатком или иметь большую длину. В некоторых воплощениях пептидный линкер имеет, 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 воплощениях линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых воплощениях линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS («4GS»; SEQ ID NO: 636) или мультимеры линкера 4GS, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS. В некоторых воплощениях пептидный линкер представляет собой (GGGGS)2 или (GGGGS)3, как указано в SEQ ID NO: 229 и 228, соответственно. В некоторых воплощениях линкер также может включать ряд остатков аланина отдельно или в дополнение к другому пептидному линкеру (такому как линкер 4GS или его мультимер). В некоторых воплощениях количество аланиновых остатков в каждой серии составляет: 2, 3, 4, 5 или 6 аланинов. В некоторых воплощениях линкер представляет собой жесткий линкер. Например, линкер представляет собой α-спиральный линкер. В некоторых воплощениях линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде):

EAAAK или мультимеры линкера EAAAK, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 линкеров EAAAK, как указано в SEQ ID NO: 629 (1xEAAAK), SEQ ID NO: 630 (3xEAAAK) или SEQ ID NO: 631 (5xEAAAK). В некоторых воплощениях линкер может дополнительно включать аминокислоты, введенные путем клонирования и/или из сайта рестрикции, например, линкер может включать аминокислоты GS (в однобуквенном аминокислотном коде), которые введены с использованием сайта рестрикции BAMHI. В некоторых воплощениях линкер (в однобуквенном аминокислотном коде) представляет собой GSGGGGS (SEQ ID NO: 635). В некоторых примерах линкер представляет собой 2xGGGGS, за которым следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 230).

В некоторых воплощениях домены IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью связываются «пептидными линкерами дикого типа», вставленными на N-конце и/или C-конце вторых доменов IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью. В некоторых воплощениях присутствует лидерный пептидный линкер, вставленный на N-конце первого домена IgSF и/или первая трейлерная последовательность, вставленная на C-конце первого домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью. В некоторых воплощениях присутствует второй лидерный пептидный линкер, вставленный на N-конец второго домена IgSF и/или вторая трейлерная последовательность, вставленная на C-конце второго домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью. Если первый и второй домены IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью получены из одного и того же родительского белка и связаны в одной и той же ориентации, то пептидные линкеры дикого типа между первым и вторым доменами IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью не дублируются. Например, когда первый трейлерный пептидный линкер дикого типа и второй лидерный пептидный линкер дикого типа являются одинаковыми, иммуномодулирующий белок II типа не включает ни первый трейлерный пептидный линкер дикого типа, ни второй лидерный пептидный линкер дикого типа.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующие белки II типа включают первый лидерный пептидный линкер дикого типа, вставленный на N-конце первого домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью, в котором первый лидерный пептидный линкер дикого типа включает, по меньшей мере, 5 (например, по меньшей мере, около любое количество из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислот из промежуточной последовательности в белке дикого типа из которых первый домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью получен между родительским доменом IgSF и непосредственно

предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF). В некоторых воплощениях первый лидерный пептидный линкер дикого типа включает всю промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которой получают первый домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF).

В некоторых воплощениях иммуномодулирующих белки II типа дополнительно включает первый трейлерный пептидный линкер дикого типа, вставленный на С-конце первого домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью, в котором первый трейлерный пептидный линкер дикого типа включает, по меньшей мере, 5 (например, по меньшей мере, около любое количество из 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 домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен). В некоторых воплощениях первый трейлерный пептидный линкер дикого типа включает всю промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которой происходит первый домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (например, доменом IgSF или трансмембранным доменом).

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок II типа дополнительно включает второй лидерный пептидный линкер дикого типа, вставленный на N-конце второго домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью, в котором второй лидерный пептидный линкер дикого типа включает, по меньшей мере, 5 (например, по меньшей мере, около любое количество из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) последовательных аминокислот из промежуточной последовательности белка дикого типа из которой получают второй домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF). В некоторых воплощениях второй лидерный пептидный линкер дикого типа включает всю промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которой получен второй домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью, между родительским доменом IgSF и непосредственно предшествующим доменом (таким как сигнальный пептид или домен IgSF).

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок II типа дополнительно

включает второй продольный пептидный линкер дикого типа, вставленный в С-конце второе домена IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью, в котором второй пептидный линкер дикого типа включает, по меньшей мере, 5 (например, по меньшей мере, любое количество из около 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 домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (таким как домен IgSF или трансмембранный домен). В некоторых воплощениях второй конечный пептидный линкер дикого типа включает всю промежуточную последовательность в белке дикого типа, из которой получен второй домен IgSF с модифицированной и/или немодифицированной аффинностью между родительским доменом IgSF и непосредственно следующим доменом (например, доменом IgSF или трансмембранным доменом).

Пример лидерной последовательности и трейлерной последовательности для белка типа II, содержащего домен CD80 IgSF, представлен в SEQ ID NO: 231 и SEQ ID NO: 232. Пример лидерной последовательности и трейлерной последовательности для белка типа II, содержащего домен ICOSL IgSF, представлен в SEQ ID NO: 233 и 234. Примеры лидерной последовательности и трейлерной последовательности для белка типа II, содержащего домен CD86 IgSF, изложены в любой из SEQ ID NO: 236-238. Пример линкерной последовательности дикого типа для белка типа II, содержащего домен IgGF NKp30, представлен в SEQ ID NO: 235.

1. *Моновалентные*

В данном документе представлены иммуномодулирующие белки, содержащие вариантный полипептид ICOSL, которые является моновалентными. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL моновалентного иммуномодулирующего белка прямо или опосредованно связан с другим фрагментом. В некоторых воплощениях дополнительная часть представляет собой белок, пептид, небольшую молекулу или нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях одновалентный иммуномодулирующий белок представляет собой гибридный белок.

В некоторых воплощениях фрагмент представляет собой молекулу, продлевающую период полужизни. Примеры таких молекул, продлевающих период полужизни, включают, без ограничения указанным, 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-связывающая малая молекула или их комбинацию.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариант ICOSL, может включать конформационно неупорядоченные полипептидные последовательности, состоящие из аминокислот Pro, Ala и Ser (см., например, WO2008/155134; SEQ ID NO: 904). В некоторых случаях аминокислотный повтор включает, 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 включает остаткок(ки) Ala, Ser и Pro. Таким образом, в данном документе представлен иммуномодулирующий белок, представляющий собой PAS-илированный белок, в котором вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с Pro/Ala/Ser (PAS). В некоторых воплощениях может использоваться одна или несколько дополнительных линкерных структур.

В некоторых воплощениях фрагмент облегчает обнаружение или очистку вариантного полипептида ICOSL. В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид содержит метку или слитый домен, например, метка аффинности или очистки, прямо или опосредованно связанная с N- и/или с-концом полипептида ICOSL. Известны различные подходящие полипептидные метки и/или гибридные домены, которые включают, без ограничения указанным, полигистидиновую (His) метку, FLAG-метку (SEQ ID NO: 865), Myc-метку и метку на основе флуоресцентного белка (например, EGFP, указанные в SEQ ID NO: 858, 859 или 896). В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, включающий вариант ICOSL, содержит, по меньшей мере, шесть остатков гистидина (изложенных в SEQ ID NO: 864). В некоторых случаях иммуномодулирующий полипептид, включающий вариант ICOSL, дополнительно включает различные комбинации фрагментов. Например, иммуномодулирующий полипептид, включающий вариант ICOSL, дополнительно включает одну или несколько полигистидиновых меток и FLAG-меток.

В некоторых воплощениях полипептид ICOSL связан с модифицированной константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), которая остается в моновалентной форме, такой как представлена в SEQ ID NO: 472.

2. *Бивалентные*

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, содержащий вариант ICOSL, является многовалентным, таким как бивалентный. В некоторых аспектах иммуномодулирующий белок прямо или опосредованно связан через линкер с доменом мультимеризации. В некоторых аспектах домен мутлимизации увеличивает период

полужизни молекулы.

Взаимодействие двух или более вариантных полипептидов ICOSL может быть облегчено за счет их связи, прямо или опосредованно, с любым фрагментом или другим полипептидом, которые сами способны взаимодействовать с образованием стабильной структуры. Например, отдельные кодируемые варианты полипептидных цепей ICOSL могут быть соединены путем мультимеризации, при этом мультимеризация полипептидов опосредуется мультимеризационным доменом. Как правило, домен мультимеризации обеспечивает формирование стабильного межбелкового взаимодействия между первым вариантным полипептидом ICOSL и вторым вариантным полипептидом ICOSL. Гомо- или гетеромультимерные полипептиды могут быть получены при коэкспрессии отдельных вариантных полипептидов ICOSL. Первый и второй вариантные полипептиды ICOSL могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых воплощениях домен мультимеризации включает любой, способный образовывать стабильное белок-белковое взаимодействие. Домены мультимеризации могут взаимодействовать через последовательность иммуноглобулина (например, Fc-домен; см., например, International Patent Pub. No. WO 93/10151 и WO 2005/063816 US; U.S. публ. No. 2006/0024298; U.S. Пат. США № 5457035); лейциновую молнию (например, из ядерных трансформирующих белков fos и jun или протоонкогена c-myc или из белка общего контроля азота (GCN4)) (см, например, Busch and Sassone-Corsi (1990) Trends Genetics, 6: 36-40; Gentz et al., (1989) Science, 243: 1695-1699); гидрофобную область; гидрофильную область; или свободный тиол, который образует межмолекулярную дисульфидную связь между химерными молекулами гомо- или гетеромультимера. Кроме того, домен мультимеризации может включать аминокислотную последовательность, содержащую выпуклость, комплементарную аминокислотной последовательности, содержащей углубление, как описано, например, в Пат. США США № 5731168; международных патентных публ. No. WO 98/50431 и WO 2005/063816; Ridgway et al. (1996) Protein Engineering, 9:617-621. Такая область мультимеризации может быть сконструирована таким образом, что стерические взаимодействия не только способствовали стабильному взаимодействию, но также способствовали образованию гетеродимеров вместо гомодимеров из смеси химерных мономеров. Обычно выступы конструируют путем замены небольших аминокислотных боковых цепей на границе первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсаторные полости идентичного или похожего размера с крупной боковой цепью создают в области контакта второго полипептида путем замены аминокислотных боковых цепей на боковые цепи меньшего размера (например, аланин

или треонин). Примерные домены мультимеризации описаны ниже.

Вариантный полипептид ICOSL может быть присоединен где угодно, но обычно через его N- или C-конец, к N- или C-концу домена мультимеризации с образованием химерного полипептида. Связь может быть прямой или опосредованной с помощью линкера. Кроме того, химерный полипептид может представлять собой гибридный белок или может быть образован путем химической связи, такой как ковалентные или нековалентные взаимодействия. Например, при получении химерного полипептида, содержащего домен мультимеризации, нуклеиновая кислота, кодирующая весь или часть вариантного полипептида ICOSL, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей последовательность домена мультимеризации, прямо, опосредованно или необязательно, через линкерный домен. В некоторых случаях конструкция кодирует химерный белок, где C-конец вариантного полипептида ICOSL соединен с N-концом домена мультимеризации. В некоторых случаях конструкция кодирует химерный белок, где N-конец вариантного полипептида ICOSL соединен с N- или C-концом домена мультимеризации.

Полипептидный мультимер содержит два химерных белка, созданных путем прямого или опосредованного связывания двух одинаковых или разных вариантных полипептидов ICOSL прямо или опосредованно с доменом мультимеризации. В некоторых примерах, где домен мультимеризации представляет собой полипептид, гибридный ген, кодирующий вариантный полипептид ICOSL и домен мультимеризации, вставляется в соответствующий экспрессирующий вектор. Полученный химерный или гибридный белок может экспрессироваться в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным экспрессирующим вектором, и может собираться в мультимеры, где домены мультимеризации взаимодействуют с образованием многовалентных полипептидов. Химерная связь доменов мультимеризации вариантных полипептидов ICOSL может быть осуществлена с использованием гетеробифункциональных линкеров.

Полученные в результате химерные полипептиды, такие как гибридные белки и образованные из них мультимеры, могут быть очищены любым подходящим способом, таким как, например, аффинная хроматография на колонках с протеином A или протеином G. Если две молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие разные полипептиды, трансформируются в клетки, происходит образование гомо- и гетеродимеров. Условия для экспрессии можно регулировать так, чтобы образование гетеродимера было предпочтительным по сравнению с образованием гомодимера.

Иммуноглобулиновый Домен

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок содержит вариантный

полипептид ICOSL, присоединенный к Fc-области иммуноглобулина (приводящий к «иммуномодулирующий Fc-гибрид», такой как «вариантный гибрид ICOSL-Fc», также называемый гибридом ICOSL vIgD-Fc). В некоторых воплощениях вариантный гибрид ICOSL-Fc также содержит один или несколько дополнительных доменов IgSF, таких как один или несколько дополнительных vIgD, связанных с vIgD ICOSL. В некоторых воплощениях присоединение вариантного полипептида ICOSL или дополнительного домена IgSF происходит на N-конце Fc. В некоторых воплощениях присоединение вариантного ICOSL или дополнительного полипептида домена IgSF происходит на C-конце Fc. В некоторых воплощениях два или более вариантных полипептида ICOSL или дополнительных вариантных IgSF-домена (одинаковых или разных) независимо присоединены на N-конце и на C-конце.

В некоторых воплощениях Fc является мышиным или человеческим Fc. В некоторых воплощениях Fc представляет собой области Fc из IgG1, lgG2, lgG3 или lgG4 млекопитающих или человека. В некоторых воплощениях Fc получают из IgG1, такого как IgG1 человека. В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 226.

В некоторых воплощениях Fc-область включает более одной модификации для изменения (например, уменьшения) одной или нескольких из ее нормальных функций. В целом, Fc-область отвечает за эффекторные функции, такие как комплементарно-зависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), в дополнение к антигенсвязывающей способности, которая является основной функцией иммуноглобулинов. Кроме того, последовательность FcRn, присутствующая в области Fc, играет роль регулирования уровня IgG в сыворотке путем увеличения периода полужизни in vivo путем конъюгации с рецептором FcRn in vivo. В некоторых воплощениях такие функции могут быть уменьшены или изменены в Fc для применения с предлагаемыми Fc-гибридными белками.

В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-область вариантного гибрида ICOSL-Fc, представленного в данном описании, тем самым формируя вариантную Fc-область. В некоторых воплощениях вариантная Fc-область уменьшает эффекторную функцию. Существует много примеров изменений или мутаций в последовательностях Fc, которые могут изменять эффекторную функцию. Например, WO 2000/42072, WO2006/019447,

WO2012/125850, WO2015/107026, US2016/0017041 и Shields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) описывают примерные варианты Fc с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций конкретно включено в данный документ ссылкой.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предлагаемые вариантные гибриды ICOSL-Fc содержат Fc-область, которая проявляет пониженные эффекторные функции (также называемой инертной Fc или Fc без эффекторной функции), что делает их желательным кандидатом для приложений, в которых период полужизни вариантного гибрида ICOSL -Fc in vivo является важным, а некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) не нужны или вредны. Анализы цитотоксичности in vitro и/или in vivo могут проводиться для подтверждения сокращения/истощения активности CDC и/или ADCC. Например, анализы связывания Fc-рецептора (FcR) могут быть проведены для того, чтобы гарантировать, что вариантный ICOSL- Fc гибрид утратил способность связывания с FcγR (следовательно, вероятно, не имеет активности ADCC), но сохраняет способность связывания FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоэтических клетках приведена в Таблице 3 на стр. 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов in vitro для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте Пат. 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); U.S. Пат. США № 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). Альтернативно, могут быть использованы способы нерадиоактивного анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности ACTI™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, Калифорния; и CytoTox 96™ нерадиоактивный анализ цитотоксичности (Promega, Мэдисон, Висконсин). Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и клетки-натуральные киллеры (NK). В ином случае или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена in vivo, например, в модели на животных, такой как описанная в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Анализы связывания C1q также могут быть проведены для подтверждения того, что гибридный вариантный ICOSL-Fc не может связывать C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, ELISA для определения связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ CDC (см., например, Gazzano-

Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); b Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Связывание FcRn и определение клирена/полужизни in vivo также могут быть выполнены с использованием способов, известных в данной области (см., например, Petkova, SB et al., Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Вариантные гибриды ICOSL-Fc с пониженной эффекторной функцией включают те, у которых заменен один или несколько остатков в области Fc из числа 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 по нумерации EU (Пат. США США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами в двух или более положениях аминокислот из числа 265, 269, 270, 297 и 327 по нумерации EU, включая так называемый «DANA» Fc-мутант с заменой остатков 265 и 297 на аланин (Пат. США США № 7323281).

В некоторых воплощениях Fc-область вариантных ICOSL-Fc гибридов имеет Fc область, в которой любая одна или несколько из аминокислот в положениях 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, и 329 (обозначенные по нумерации EU) заменены различными аминокислотами по сравнению с нативной Fc-областью. Такие изменения Fc-области не ограничиваются 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 WO 2008/092117; аминокислотные вставки в положениях 233, 234, 235 и 237 (обозначены по нумерации EU); и изменения в сайтах, описанных в WO 2000/042072.

Описаны некоторые варианты Fc с повышенным или пониженным связыванием с FcR. (См., например, Пат. США США No. 6,737,056; WO 2004/056312, WO2006/019447 и Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

В некоторых воплощениях изобретения, предложен вариант синтеза ICOSL -Fc, включающий вариантную Fc-область, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полужизни и/или улучшение связывания с неонатальным рецептором Fc (FcRn). Антитела с повышенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с FcRn описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.) или WO2015107026. Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают те, которые имеют замены в одном или нескольких остатках области Fc: 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, замена остатка 434 в Fc-области (Пат. США США № 7371826).

В некоторых воплощениях Fc-область вариантного гибрида ICOSL-Fc содержит одну или несколько аминокислотных замен E356D и M358L по нумерации EU. В некоторых воплощениях Fc-область вариантного гибрида ICOSL-Fc содержит одну или несколько аминокислотных замен C220S, C226S и/или C229S по нумерации EU. В некоторых воплощениях Fc-область вариантного гибрида ICOSL включает одну или несколько аминокислотных замен R292C и V302C. См. также Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988); Пат. США США № 5648260; Пат. США CIF № 5624821; и WO 94/29351, касающейся других примеров вариантов Fc-области.

В некоторых воплощениях Fc IgG1 дикого типа может представлять собой Fc, представленный в SEQ ID NO: 226, имеющий аллотип, содержащий остатки Glu (E) и Met (M) в положениях 356 и 358 по нумерации EU (например, аллотип f) , В других воплощениях Fc IgG1 дикого типа содержит аминокислоты аллотипа G1m1 человека, такие как остатки, содержащие Asp (D) и Leu (L) в положениях 356 и 358, например, как указано в SEQ ID NO: 927. Таким образом, в некоторых случаях представленный в данном документе Fc может содержать аминокислотные замены E356D и M358L для восстановления остатков аллотипа G1 m1 (например, альфа-аллотипа). В некоторых аспектах Fc дикого типа модифицируют одной или несколькими аминокислотными заменами, чтобы уменьшить эффекторную активность или сделать Fc инертным для эффекторной функции Fc. Типичные мутации с потерей эффекторной функции или инертные мутации включают мутации, описанные в данном документе. Среди мутаций с потерей эффекторной функции, которые могут быть включены в Fc конструкций, предлагаемых в настоящем документе, предлагаются L234A, L235E и G237A по нумерации EU. В некоторых воплощениях Fc дикого типа дополнительно модифицируется удалением одного или нескольких остатков цистеина, например заменой остатков цистеина на остаток серина в положении 220 (C220S) по нумерации EU. Примерные инертные Fc-области, имеющие пониженную эффекторную функцию, приведены в SEQ ID NO: 633 или 477 и SEQ ID NO: 474 или 637, которые основаны на аллотипах, указанных в SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 927, соответственно. В некоторых воплощениях Fc-область, используемая в конструкции, предоставленной в настоящем документе, может дополнительно не иметь C-концевой остаток лизина.

В некоторых воплощениях в Fc-область вносятся изменения, которые приводят к уменьшению связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в Пат. США США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al., J.

Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

В некоторых воплощениях изобретения, предлагается гибридный вариант ICOSL - Fc, включающий вариант Fc-область, содержащий одну или несколько аминокислотных модификаций, где вариантная Fc-область является производным IgG1, такого как IgG1 человека. В некоторых воплощениях вариантная Fc-область получена из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 226. В некоторых воплощениях Fc проявляет пониженную эффекторную функцию. В некоторых воплощениях Fc включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, которая представляет собой N82G по нумерации SEQ ID NO: 226 (что соответствует N297G в соответствии с нумерацией EU). В некоторых воплощениях Fc дополнительно включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, которая представляет собой R77C или V87C по нумерации SEQ ID NO: 226 (соответствующих R292C или V302C в соответствии с нумерацией EU). В некоторых воплощениях вариант Fc-области дополнительно включает модификацию аминокислоты C5S по нумерации SEQ ID NO: 226 (что соответствует C220S в соответствии с нумерацией EU). Например, в некоторых воплощениях вариант Fc-области включает следующие модификации аминокислот: V297G и одну или несколько из следующих модификаций аминокислот C220S, R292C или V302C по нумерации EU (соответствует N82G и одной или нескольким из следующих аминокислотных модификаций C5S, R77C или V87C относительно SEQ ID NO: 226), например Fc-область включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 476. В некоторых воплощениях вариант Fc-области включает одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, L234A, L235E или G237A, например, Fc-область включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 477. В некоторых воплощениях вариант Fc-области включает одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, E233P, L234V, L235A, G236del or S267K, например, Fc-область включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 478. В некоторых воплощениях вариант Fc-области включает одну или несколько аминокислотных модификаций C220S, L234A, L235E, G237A, E356D или M358L, например, Fc-область включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 474.

В некоторых воплощениях в Fc-области отсутствует C-концевой лизин, соответствующий положению 232 референсной (например, немодифицированной) Fc или Fc дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 56 (соответствует K447del по нумерации EU). В некоторых воплощениях, поскольку C-концевой лизин может быть дифференцированно удален во время биосинтеза, удаление C-концевого остатка лизина приводит к более гомогенному продукту, при экспрессии белка в клетках. В некоторых

аспектах такая Fc-область может дополнительно включать одну или несколько дополнительных модификаций, например, аминокислотные замены, такие как любые из описанных. Пример такой Fc-области приведен в SEQ ID NO: 632, 633, 634 или 637.

В некоторых воплощениях предложен вариантный гибрид ICOSL-Fc, содержащий вариант Fc-область, в которой вариант Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 или 507 или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или более идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478 или 507. В некоторых воплощениях Fc проявляет пониженную эффекторную функцию.

В некоторых воплощениях Fc является производным от IgG2, такого как IgG2 человека. В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 227, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 227.

В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 505 или аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 505. В некоторых воплощениях Fc IgG4 представляет собой стабилизированную Fc, в котором домен CH3 человеческого IgG4 замещен доменом CH3 человеческого IgG1 и который проявляет ингибированное образование агрегатов, антитело, в котором домены CH3 и CH2 человеческого IgG4 замещены доменами CH3 и CH2 человеческого IgG1 соответственно или антитело, в котором аргинин в положении 409, указанный по индексу EU, предложенном Kabat et al. человеческого IgG4 замещен лизином, и которое проявляет ингибированное образование агрегатов (см., например, Пат. США No. 6159477). В некоторых воплощениях Fc представляет собой IgG4, содержащий мутацию S228P, которая, как было показано, предотвращает рекомбинацию между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 путем обмена Fab-плеча (см., например, Labrijin et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27(8)767-71.) В некоторых воплощениях Fc включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 506, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 506.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL непосредственно

связана с последовательностью Fc. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL опосредованно связан с последовательностью Fc, например, через линкер. В некоторых воплощениях один или несколько «пептидных линкеров» связывают вариантный полипептид ICOSL и домен Fc. В некоторых воплощениях пептидный линкер может быть одним аминокислотным остатком или иметь большую длину. В некоторых воплощениях пептидный линкер имеет, 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 воплощениях линкер представляет собой три аланина (AAA). В некоторых воплощениях линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): GGGGS («4GS»; SEQ ID NO: 636) или мультимеры 4GS-линкера, такие как повторы 2, 3, 4, 5 или линкеры 6 4GS, такие как указанные в SEQ ID NO: 229 (2xGGGGS) или SEQ ID NO: 228 (3xGGGGS). В некоторых воплощениях линкер представляет собой жесткий линкер. Например, линкер представляет собой α-спиральный линкер. В некоторых воплощениях линкер представляет собой (в однобуквенном аминокислотном коде): EAAAK или мультимеры линкера EAAAK, такие как повторы 2, 3, 4 или 5 линкеров 4GS, как указано в SEQ ID NO: 629 (EAAAK) или SEQ ID NO: 630 (3xEAAAK) или SEQ ID NO: 631 (5xEAAAK). В некоторых воплощениях линкеры начинаются с одного или нескольких блоков EAAAK и могут быть удлинены путем добавления последовательностей A, AA, AAA, AAAA, EAAAA и EAAAK. В некоторых воплощениях линкер может дополнительно включать аминокислоты, введенные путем клонирования и/или из сайта рестрикции, например, линкер может включать аминокислоты GS (в однобуквенном аминокислотном коде), которые введены с использованием сайта рестрикции BAMHI. В некоторых воплощениях линкер (в однобуквенном аминокислотном коде) представляет собой GSGGGGS (SEQ ID NO: 635). В некоторых примерах линкер представляет собой 2xGGGGS, за которым следуют три аланина (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 230).

В некоторых воплощениях вариантный гибридный белок ICOSL-Fc представляет собой димер, образованный двумя вариантными полипептидами ICOSL-Fc, связанными с доменом Fc. В некоторых конкретных воплощениях идентичные или по существу идентичные виды (с учетом 3 или меньшего количества различий в аминокислотных последовательностях на N-конце или C-конце) вариантных гибридных полипептидов ICOSL-Fc будут димеризоваться с созданием гомодимера. В некоторых воплощениях димер является гомодимером, в котором два вариантных полипептида ICOSL-Fc являются одинаковыми. В ином случае, различные разновидности гибридных полипептидов ICOSL-Fc можно димеризовать, чтобы получить гетеродимер. Таким образом, в некоторых

воплощениях димер представляет собой гетеродимер, в котором два вариантных полипептида ICOSL-Fc различны.

В некоторых воплощениях представлен вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, содержащий вариантный полипептид ICOSL, который включает одну или несколько аминокислотных модификаций в референсном ICOSL, как описано в разделе II, который прямо или опосредованно связан с Fc-областью. В некоторых случаях С-конец вариантного полипептида ICOSL присоединен к N-концу Fc-области. В некоторых воплощениях вариант ICOSL гибрида ICOSL-Fc содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в аминокислотной последовательности референсного домена IgV, указанного в SEQ ID NO: 545. В конкретных случаях такой иммуномодулирующий белок содержит вариантный полипептид ICOSL, содержащий домен IgV, такой как домен IgV, представленный в любом из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910 или домен IgV, который имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% к любому из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326 -340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910 и содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, соответствующей SEQ ID NO. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет домен IgSF (например, домен IgV), который проявляет повышенную аффинность связывания с CD28 или ICOS, такой как любая из модификаций аминокислот, описанных в настоящем документе. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет домен IgSF (например, домен IgV), содержащий одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 52, 57 или 100 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T или Q100V. Примеры таких вариантных молекул включают любые, как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52H/N57Y/Q100R (например, является или включает домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 565). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52D (например, является или включает домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 548). В некоторых

воплощениях вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52H/Q100R (например, является или включает домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 567). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52L/N57H/Q100R (например, является или включает домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 761). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL содержит аминокислотные модификации N52H/N57Y/Q100P (например, является или включает домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 570).

В конкретных воплощениях таких вариантных гибридных белков ICOSL-Fc, полипептид Fc представляет собой вариант Fc-области человеческого IgG1, который проявляет пониженные эффекторные функции, такие как любые из описанных. В некоторых воплощениях Fc-область представляет собой человеческий IgG1, который содержит аминокислотные модификации N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K или L234A/L235E/G237A, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых воплощениях вариантная Fc-область из IgG1 дополнительно включает аминокислотную замену C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых воплощениях Fc-область содержит K447del, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых аспектах Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, представленную в любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478, 633 или 637, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям с любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478, 633 или 637 и содержат аминокислотные замены соответствующего SEQ ID NO. Связь между вариантным полипептидом ICSL IgSF (например, IgV) и Fc может осуществляться через пептидный линкер, такой как любой из описанных. В некоторых воплощениях линкер представляет собой GGGGS («4GS»; SEQ ID NO: 636), SEQ ID NO: 229 (2xGGGGS) или SEQ ID NO: 228 (3xGGGGS). В конкретных примерах C-конец вариантного полипептида ICOSL присоединен к N-концу Fc-области, так что порядок компонентов представляет собой вариантный ICOSL-линкер-Fc.

В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 636, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 637. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 636, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 474. В некоторых воплощениях

предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 636, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 477. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 636, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 633.

В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 229, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 637. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 229, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 474. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 229, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 477. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 229, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 633.

В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 228, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 637. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 228, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 474. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 228, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 477. В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL-Fc, например, вариантный ICOSL-линкер-Fc, содержащий вариантный домен ICVL IgV, указанный в SEQ ID NO: 565, линкер, указанный в SEQ ID NO: 228, и полипептид Fc, указанный в SEQ ID NO: 633.

В некоторых воплощениях предлагается вариантный гибридный белок ICOSL IgSF Fc, который имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 928, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% от SEQ ID NO: 928. В некоторых воплощениях вариантный гибридный белок ICOSL IgSF Fc связывается с CD28 и ICOS, например, с повышенной аффинностью связывания по сравнению с референсным гибридным белком (дикого типа) ICOSL-Fc. В некоторых воплощениях вариантный гибрид ICOSL IgSF Fc проявляет пониженную эффекторную функцию Fc по сравнению с гибридом с Fc IgG1 человека дикого типа.

В некоторых воплощениях предлагается иммуномодулирующий белок с мультидоменным стеком, в котором два или более домена IgSF, в том числе vIgD из ICOSL и один или более дополнительный домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF) из другого представителя семейства IgSF, связаны или присоединены к Fc с образованием гибрида Fc, который при экспрессии в клетке, может, в некоторых аспектах, продуцировать иммуномодулирующий белок с димерным мультидоменным стеком. Таким образом, также предлагаются димерные мультидоменные иммуномодулирующие белки.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL и одного или более дополнительного домена IgSF независимо связаны, прямо или опосредованно, с N- или C-концом Fc-области. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL и, по меньшей мере, один или более дополнительный домен IgSF связаны прямо или опосредованно, и один из вариантных ICOSL или один из одного или более дополнительного домена IgSF также прямо или опосредованно связаны с N- или C-концом Fc-области. В некоторых воплощениях N- или C-конец Fc-области связан с вариантным полипептидом ICOSL или одним или несколькими дополнительными доменами IgSF, а другой N- или C-конец Fc-области связан с другим вариантным ICOSL или другим из одного или нескольких дополнительных доменов IgSF. В некоторых воплощениях связь с Fc осуществляется через пептидный линкер, например пептидный линкер, такой как описано выше. В некоторых воплощениях связь между вариантным ICOSL и вторым доменом IgSF осуществляется через пептидный линкер, например пептидный линкер, такой как описанный выше. В некоторых воплощениях связь между вариантным ICOSL и одним или несколькими дополнительными доменами IgSF осуществляется через пептидный линкер, например пептидный линкер, такой как описанный выше. В некоторых воплощениях vIgD ICOSL, один или несколько дополнительных доменов IgSF и домен Fc могут быть связаны между собой в любой из многочисленных конфигураций,

как показано на фиг. 16A и 16B. В некоторых воплощениях вариантный гибрид ICOSL-Fc может дополнительно содержать сигнальный пептид, такой как примерный сигнальный пептид, который содержится в последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 59 или 225. Примерные конфигурации описаны в Примерах.

В некоторых воплощениях изобретения стековый иммуномодулирующий белок представляет собой димер, образованный двумя иммуномодулирующими гибридными полипептидами Fc. Также предлагаются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любой из стековых иммуномодулирующих белков. В некоторых воплощениях димерный многодоменный стековый иммуномодулирующий белок может быть получен в клетках путем экспрессии или, в некоторых случаях, совместной экспрессии иммунодулирующих Fc-гибридных полипептидов, таких как описанные ниже.

В некоторых воплощениях димерный многодоменный стековый иммуномодулирующий белок является двухвалентным для каждой субъединицы Fc, одновалентным для каждой субъединицы, или двухвалентным для одной субъединицы и четырехвалентным для другой.

В некоторых воплощениях димерный многодоменный стековый иммуномодулирующий белок представляет собой гомодимерный многодоменный стековый Fc-белок. В некоторых воплощениях димерный многодоменный стековый иммуномодулирующий белок включает первый стековый иммуномодулирующий гибридный полипептид Fc и второй стековый иммунодулирующий гибридный полипептид Fc, в котором первый и второй полипептиды являются одинаковыми. В некоторых воплощениях Fc-часть полипептида может представлять собой любой Fc, описанный выше.

В некоторых воплощениях мультидоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL и второй домен IgSF, и второй полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL и второй домен IgSF. В некоторых воплощениях мультидоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL и второй домен IgSF, и третий домен IgSF, и второй гибридный полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL и второй домен IgSF и третий домен IgSF. В некоторых воплощениях Fc-часть первого и/или второго гибридного полипептида может представлять собой любой Fc, как описано выше. В некоторых воплощениях Fc-часть или область первого и второго гибридных полипептидов являются одинаковыми.

В некоторых воплощениях предлагается иммуномодулирующий белок, который представляет собой мультидоменный стек ICOSL-NKp30, содержащий любой из

вариантных полипептидов ICOSL и один или несколько доменов IgF из NKp30, например, NKp30 дикого типа или немодифицированного NKp30, такого как домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 929, или ECD или его связывающая часть, указанную в SEQ ID NO: 215, или его связывающая часть. В некоторых воплощениях предлагается иммуномодулирующий белок, содержащий любой вариантный полипептид ICOSL и один или несколько доменов IgSF варианта NKp30, содержащего одну или несколько аминокислотных модификаций в последовательности дикого типа или немодифицированной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 215 или 929. В некоторых воплощениях одна или несколько модификаций аминокислот (например, замен) включают одну или несколько из L30V, A60V, S64P, S86G, таких как 1, 2, 3 или 4 таких аминокислотных модификаций. В некоторых аспектах вариант NKp30 мультидоменных стековых полипептидов представляет собой или включает вариантный домен IgV, такой как вариантный домен IgV, указанный в любом из SEQ ID NO: 504, 930, 931, 932 или 933, или IgV домен, который имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% с любой из SEQ ID NO: 504, 930, 931, 932 или 933 и содержит одну или несколько аминокислотных модификаций соответствующей SEQ ID NO. В некоторых аспектах вариантный полипептид NKp30 мультидоменных стековых полипептидов представляет собой или включает вариант домена ECD, такой как вариант ECD, представленный в любой из SEQ ID NO: 215, 216, 217, 218 или 219, или домен ECD который имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% с любой из SEQ ID NO: 215, 216, 217, 218 или 219 и содержит одну или несколько аминокислотных модификаций соответствующей SEQ ID NO.

В любом из таких воплощений мультидоменного стека ICOSL-NKp30, вариантный полипептид ICOSL может включать любой, описанный в разделе II, содержащий вариантный домен IgSF (например, IgV или ECD), такой как включение любой из аминокислотных модификаций, указанных в Таблице 1. В некоторых случаях такой иммуномодулирующий белок содержит вариантный полипептид ICOSL, содержащий домен ECD, такой как домен ECD, указанный в любом из SEQ ID NO: 09-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685, 905, 908, или ECD-домен, который имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% к любому из SEQ ID NO: 109-142, 239, 280-325, 364-381, 387-424, 427-433, 435-470, 638-685, 905, 908 и содержит одну или несколько аминокислотных модификаций соответствующей SEQ ID NO. В конкретных случаях такой иммуномодулирующий белок содержит вариантный полипептид ICOSL, содержащий домен IgV, такой как домен IgV, представленный в любом из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386,

425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910 или домен IgV, который имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% к любому из SEQ ID NO: 197-199, 201-208, 210, 212, 240, 326-340, 382-386, 425-426, 434, 546-599, 686-857, 906-907, 909-910 и содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, соответствующей SEQ ID NO. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет домен IgSF (например, домен IgV), который проявляет повышенную аффинность связывания с CD28 или ICOS, как описано где-либо в данном документе. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет домен IgSF (например, домен IgV), содержащий одну или более аминокислотную модификацию, например, замену в референсном ICOSL или специфическом связывающем фрагменте в соответствующем положении(ях) 52, 57 или 100 относительно нумерации SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL имеет одну или несколько аминокислотных модификаций, например, замен, выбранных из N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T или Q100V. Примеры таких вариантных молекул включают любые, как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL содержит модификации аминокислот N52D (например, представляет собой или включен в домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 548), N52H/Q100R (например, представляет собой или включен в домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 567), N52H/N57Y/Q100R (например, представляет собой или включен в домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 565), или N52L/N57H/Q100R (например, представляет собой или включен в домен IgV, указанный в SEQ ID NO: 761).

В некоторых воплощениях предоставленные иммуномодулирующие белки с множеством доменов, такие как иммуномодулирующий белок с множеством доменов ICOSL-NKp30, слиты с полипептидом Fc. В конкретных воплощениях полипептид Fc представляет собой вариант Fc-области человеческого IgG1, который проявляет пониженные эффекторные функции, такие как любые из описанных. В некоторых воплощениях Fc-область представляет собой человеческий IgG1, который содержит аминокислотные модификации N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K или L234A/L235E/G237A, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых воплощениях вариантная Fc-область из IgG1 дополнительно включает аминокислотную замену C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых воплощениях Fc-область содержит K447del, где остаток

пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat. В некоторых аспектах Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, представленную в любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478, 633 или 637, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям с любой из SEQ ID NO: 474, 476, 477, 478, 633 или 637 и содержат аминокислотные замены соответствующего SEQ ID NO.

Пример таких конфигураций представлен на фиг. 16A-16B и описан в данном документе. В некоторых воплощениях любой из предлагаемых иммуномодулирующих полипептидов ICOSL-NKp30 может содержать две копии полипептида, имеющего структуру: вариантный ICOSL IgSF (например, IgV, такой как представлен в SEQ ID NO: 548, 565, 567 или 761) - линкер 1 - вариантный NKp30 IgSF (например, IgV, такой как представлен в SEQ ID NO: 504) - линкер 2 - Fc. В некоторых воплощениях любой из предлагаемых иммуномодулирующих полипептидов ICOSL-NKp30 может содержать две копии полипептида, имеющего структуру: вариантный ICOSL IgSF (например, IgV, такой как представлен в SEQ ID NO: 548, 565, 567 или 761) - линкер 1 - вариантный NKp30 IgSF (например, IgV, такой как указано в SEQ ID NO: 504) - линкер 1 - вариантный NKp30 IgSF (например, IgV, такой как представлен в SEQ ID NO: 504) - линкер 2 - Fc. В некоторых воплощениях линкер 1 и линкер 2 представляют собой пептидные линкеры, такие как любые описанные. В некоторых воплощениях линкер 1 и линкер 2 являются одинаковыми. В некоторых воплощениях линкер 1 и линкер 2 являются разными. В некоторых воплощениях линкер 1 представляет собой 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228). В некоторых воплощениях линкер 2 представляет собой GSGGGS (SEQ ID NO: 635).

Типичные мультидоменные стеки ICOSL-NKp30 имеют последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924 или 926, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% для любой из SEQ ID NOS: 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924 или 926.

В некоторых воплощениях любой из предлагаемых иммуномодулирующих белков мультидоменного стека ICOSL-NKp30 связывается с ICOS и/или CD28 и связывается с B7-H6. В некоторых воплощениях иммуномодулирующие белки ICOSL-NKp30 обеспечивают связывающую молекулу, способную локализоваться в опухоли, рядом с иммунной клеткой, которая экспрессирует ICOS и/или CD28 (например, Т-клетку). В некоторых воплощениях такие иммуномодулирующие белки ICOSL-NKp30 могут использоваться для усиления иммунного ответа путем вовлечения костимулирующих

рецепторов ICOS и/или CD28 в Т-клетках в микроокружении опухоли. В некоторых случаях такие мультидоменные стековые иммуномодулирующие белки ICOSL-NKp30 или их фармацевтические композиции можно использовать для лечения опухоли или рака.

В некоторых воплощениях мультидоменная стековая молекула является гетеродимерной и содержит два различных полипептида Fc-гибрида, например первый и второй полипептид Fc, где, по меньшей мере, один представляет собой полипептид Fc-гибрида, содержащий, по меньшей мере, один вариантный полипептид ICOSL, и/или, по меньшей мере, один полипептид Fc содержит второй домен IgSF (например, второй вариант домена IgSF). В некоторых воплощениях первый или второй полипептид Fc-гибрида дополнительно включает третий домен IgSF (например, третий вариантный домен IgSF). В некоторых воплощениях мультидоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc-гибрида, содержащий вариантный ICOSL и второй полипептид Fc-гибрида, содержащий домен IgSF, в котором, в некоторых случаях, первый или второй полипептид Fc-гибрида дополнительно включает третий домен IgSF. В некоторых воплощениях мультидоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий вариантный ICOSL, второй домен IgSF, и в некоторых случаях третий домен IgSF, и второй полипептид Fc-гибрида, который не связан либо с полипептидом вариантного ICOSL или дополнительного домена IgSF. В некоторых воплощениях Fc-часть или область первого и второго гибридных полипептидов являются одинаковыми. В некоторых воплощениях Fc-часть или область первого и второго гибридных полипептидов являются одинаковыми. В некоторых воплощениях многодоменная стековая молекула включает первый полипептид Fc, содержащий 1, 2, 3, 4 или больше вариантных полипептидов ICOSL и/или 1, 2, 3, 4 или больше дополнительных доменов IgSF, где общее количество доменов IgSF в первом стековом полипептиде Fc больше, чем 2, 3, 4, 5, 6 или более. В одном примере такого воплощения второй стековый полипептид Fc включает 1, 2, 3, 4 или более вариантных полипептидов ICOSL и/или 1, 2, 3, 4 или более вторых доменов IgSF, где общее количество доменов IgSF во втором стековом полипептиде Fc больше 2, 3, 4, 5, 6 или более. В другом примере такого воплощения второй полипептид Fc-гибрида не связан ни с вариантным полипептидом ICOSL, ни с дополнительным доменом IgSF.

В некоторых воплощениях гетеродимерная стековая молекула включает первый стековый иммуномодулирующий гибридный полипептид Fc и второй стековый иммуномодулирующий гибридный полипептид Fc, в котором первый и второй полипептиды различны. В некоторых воплощениях стековая гетеродимерная молекула включает первый полипептид Fc-гибрида, содержащий Fc-область и первый вариантный

полипептид ICOSL и/или второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF) и второй полипептид Fc-гибрида, содержащий отличный от первого вариантный полипептид ICOSL или второй домен IgSF. В некоторых воплощениях молекула гетеродимерная стековая молекула содержит первый полипептид Fc-гибрида, содержащий Fc-область и первый вариантный полипептид ICOSL и/или второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF), и второй полипептид Fc-гибрида, содержащий как первый вариантный полипептид ICOSL и второй домен IgSF (например, второй вариантный домен IgSF), но в ориентации или конфигурации отличной, от первой Fc-области. В некоторых воплощениях первый или второй полипептид Fc-гибрида дополнительно включает третий домен IgSF (например, третий вариантный домен IgSF).

В некоторых воплощениях домен Fc одного или обоих из первого и второго стековых иммуномодулирующих гибридных полипептидов Fc включает модификацию (например, замену) таким образом, что интерфейс молекулы Fc модифицируется для облегчения и/или содействия гетеродимеризации. В некоторых воплощениях модификации включают введение выступов (выпуклостей) в первый полипептид Fc и полостей (отверстий) во второй полипептид Fc, так чтобы выступы устанавливались в полости для содействия комплексообразованию первого и второго Fc-содержащих полипептидов. Аминокислоты, предназначенные для замены и/или модификации для создания выступов или полостей в полипептиде, обычно являются аминокислотами интерфейса, которые взаимодействуют или контактируют с одной или несколькими аминокислотами в интерфейсе второго полипептида.

В некоторых воплощениях аминокислотную последовательность добавляют перед последовательностью Fc для конструкций, в которых последовательность Fc является N-концевой частью последовательности. В некоторых случаях последовательность аминокислот HMSSVSAQ (SEQ ID NO: 475) добавляют непосредственно перед последовательностью Fc для конструкций, в которых последовательность Fc является N-концевой частью последовательности. В некоторых воплощениях гетеродимерная стековая молекула содержит первый полипептид Fc-гибрида, содержащий Fc-область (выступ) и первый вариантный полипептид ICOSL и/или второй домен IgSF (например, второй вариант домена IgSF), и второй полипептид Fc-гибрида, содержащий Fc-область (углубление) и промежуточную последовательность HMSSVSAQ (SEQ ID NO: 475), добавленную непосредственно перед обеими Fc-областями первого и второго полипептида Fc-гибрида.

В некоторых воплощениях первый полипептид, который модифицирован так, чтобы содержать выпуклость (отверстие) аминокислот включающих замену нативной или

исходной аминокислоты на аминокислоту, которая имеет, по меньшей мере, одну боковую цепь, которая выступает из интерфейса первого полипептида и поэтому размещается в компенсационной полости (отверстии) в соседнем интерфейсе второго полипептида. Чаще всего замещающая аминокислота представляет собой такую, которая имеет больший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалист в данной области знает, как определить и/или оценить свойства аминокислотных остатков, чтобы идентифицировать те, которые являются идеальными аминокислотами для замены с тем, чтобы создать выступ. В некоторых воплощениях замещающие остатки для образования выступов представляют собой встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включают, например, аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W). В некоторых примерах исходный остаток, идентифицированный для замещения, представляет собой аминокислотный остаток, который имеет небольшую боковую цепь, такую как, например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, серин, треонин или валин.

В некоторых воплощениях второй полипептид, который модифицирован для того, чтобы содержать полость (отверстие), является полипептидом, который включает замену нативной или исходной аминокислоты на аминокислоту, которая имеет, по меньшей мере, одну боковую цепь, которая утоплена в интерфейсе второго полипептида и, таким образом, способна уместить соответствующий выступ интерфейса первого полипептида. Чаще всего замещающая аминокислота представляет собой ту, которая имеет меньший объем боковой цепи, чем исходный аминокислотный остаток. Специалист в данной области знает, как определить и/или оценить свойства аминокислотных остатков, чтобы идентифицировать те, которые являются идеальными заменами остатков для образования полости. Как правило, замещающие остатки для образования полости представляют собой встречающиеся в природе аминокислоты и включают, например, аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V). В некоторых примерах исходная аминокислота, идентифицированная для замещения, представляет собой аминокислоту, которая имеет большую боковую цепь, такую как, например, тирозин, аргинин, фенилаланин или триптофан.

Интерфейс CH3 IgG1 человека, например, включает шестнадцать остатков в каждом домене, расположенном на четырех антипараллельных β-цепях, которые создают углубление 1090 Å 2 с 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; U.S. Пат. США No. 5,731,168). Модификации домена CH3 для создания выступов или полостей описаны, например, в Пат. США США № 5731168;

Международных патентных заявках WO 98/50431 и WO 2005/063816; и Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9: 617-621. В некоторых примерах модификации домена CH3 для создания выступов или полостей обычно ориентированы на остатки, расположенные на двух центральных антипараллельных β-цепях. Цель состоит в том, чтобы свести к минимуму риск того, чтобы создающиеся выступы, могли быть размещены путем выпячивания в окружающий растворитель, и не размещены в компенсаторную полость в домене партнера CH3.

В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутацию T366W в домене CH3 из «цепи с выступом» цепи и мутации T366S, L368A, Y407V в домене CH3 «цепи с полостью». В некоторых случаях также может быть использован дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами CH3 (Merchant, A. M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), например, путем введения мутации Y349C в домен CH3 цепи «выступа « или «отверстия» и мутацит E356C или мутацит S354C в домен CH3 другой цепи. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации S354C, T366W в одной из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации E356C, T366W в одной из двух доменов CH3 и мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации Y349C, T366W в одном из двух доменов CH3 и мутации E356C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. В некоторых воплощениях гетеродимерная молекула включает мутации Y349C, T366W в одной из двух доменов CH3 и мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в другом из двух доменов CH3. Примеры других технологий «выступ-во-впадину» известны в данной области техники, например, как описано в EP 1 870 459 A1.

В некоторых воплощениях Fc-области гетеродимерной молекулы могут дополнительно включать одну или более других мутаций Fc, например, любые описанные выше. В некоторых воплощениях молекула гетеродимера включает Fc-область с мутацией, которая уменьшает эффекторную функцию.

В некоторых воплощениях вариантный Fc, содержащий модификации выступа(выпуклость) или полости(отверстие) в CH3, может быть присоединен к стековому иммуномодулирующему полипептиду в любом месте, но обычно через его N- или C-конец, к N- или C-концу первого и/или второго стекового иммуномодулирующего полипептида, например, для образования гибридного полипептида. Связь может быть прямой или опосредованной с помощью линкера. Как правило, молекула с выступом и отверстием генерируется путем совместной экспрессии первого стекового

иммуномодулирующего полипептида, связанного с вариантным Fc, содержащим модификацию(ии) выступ на CH3, со вторым стековым иммуномодулирующим полипептидом, связанным с вариантом Fc, содержащим модификацию(ии) полости на CH3.

Кроме того, предлагаемое представляет собой нуклеотидную молекулу, кодирующую вариантный гибридный белок ICOSL-Fc. В некоторых воплощениях для получения гибридного белка Fc нуклеотидную молекулу, кодирующую гибридный белок ICOSL-Fc, встраивают в соответствующий экспрессирующий вектор. Полученный в результате вариантный гибридный белок ICOSL-Fc может быть экспрессирован в клетках-хозяевах, трансформированных экспрессией, где сборка между доменами Fc происходит посредством межцепочечных дисульфидных связей, формирующихся между Fc-фрагментами, с получением димера, такого как двухвалентные, вариантные гибридные белки ICOSL-Fc.

Полученные гибридные белки Fc могут быть легко очищены с помощью аффинной хроматографии на колонках с протеином A или протеином G. Для получения гетеродимеров могут потребоваться дополнительные стадии очистки. Например, когда две нуклеиновые кислоты, кодирующие различные вариантные полипептиды ICOSL, трансформируются в клетки, образование гетеродимеров должно быть достигнуто биохимически, поскольку вариантные молекулы ICOSL, несущие Fc-домен, будут также экспрессироваться как дисульфидные гомодимеры. Таким образом, гомодимеры могут быть восстановлены в условиях, благоприятствующих разрушению межцепочечных дисульфидов, но не влияют на внутрицепочечные дисульфиды. В некоторых случаях различные мономеры ICOSL-Fc смешивают в эквимолярных количествах и окисляют с образованием смеси гомо- и гетеродимеров. Компоненты этой смеси разделяют хроматографическими методами. В ином случае, на образование этого типа гетеродимера может быть оказано влияние с помощью генной инженерии и экспрессии гибридных молекул Fc, которые содержат вариантный полипептид ICOSL с использованием описанных ниже способов «выступ-во-впадине».

B. КОНЪЮГАТЫ И ГИБРИДЫ ВАРИАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

В некоторых воплощениях настоящего изобретения вариантные полипептиды, представленные в данном документе, которые представляют собой иммуномодулирующие белки, содержащие варианты домена Ig семейства IgSF (vIgD), могут быть конъюгированы с или слиты прямо или опосредованно с фрагментом, таким как эффекторный фрагмент, такой как другой белок, прямо или опосредованно, с

образованием конъюгата («конъюгат IgSF»). В некоторых воплощениях вариантный иммуномодулирующий белок ICOSL предоставляется в виде конъюгата, в котором имеет место прямое или оспосредованное связывание ICOSL с нацеливающим агентом или функциональным фрагментом, например, с антителом или другими связывающими молекулами, которые специфически связываются с лигандом, например, антигеном, например, для нацеливания или локализации vIgD в конкретной среде или клетке, например, при введении объекту. В некоторых воплощениях нацеливающий агент, например антитело или другая связывающая молекула, связывается с опухолевым антигеном, тем самым локализуя вариантный ICOSL, содержащий vIgD, в микроокружении опухоли, например, для модуляции активности инфильтрационных опухолей лимфоцитов (TIL), специфичных для микроокружение опухоли. В некоторых воплощениях соединение может быть ковалентным или нековалентным, например, посредством нековалентного взаимодействия биотина-стрептавидина. В некоторых воплощениях конъюгат представляет собой гибридный белок вариантного полипептида ICOSL, связанный напрямую или через линкер с другим белком или полипептидным фрагментом.

В некоторых воплощениях гибридный белок представляет собой вариантный гибрид ICOSL-Fc, в котором любые два или более из вышеупомянутых вариантных полипептидов могут быть присоединены к Fc.

В некоторых воплощениях конъюгат IgSF, такой как гибридный белок, содержит ECD дикого типа (полноразмерный или укороченный) или вариантный полипептид ICOSL. В некоторых воплощениях дополнительный домен IgSF содержит домен или домены IgV или домен или домены IgC (например, IgC2), или специфический фрагмент связывания домена IgV или специфический фрагмент связывания домена или доменов IgC (например, IgC2). В некоторых воплощениях конъюгат IgSF, такой как гибридный белок, содержит домен IgV ICOSL, как указано в SEQ ID NO: 196 или 545.

В некоторых воплощениях фрагмент может быть нацеливающим фрагментом, низкомолекулярным лекарственным средством (неполипептидным лекарственным средством с молярной массой менее 500 дальтон), токсином, цитостатическим агентом, цитотоксическим агентом, иммунодепрессантом, радиоактивным агентом, пригодным для диагностических целей, ионом радиоактивного металла в терапевтических целях, ферментом, активирующим пролекарство, агентом, который увеличивает биологический период полужизни или диагностическим или детектируемым агентом.

В некоторых воплощениях эффекторный фрагмент представляет собой терапевтический агент, такой как противоопухолевый терапевтический агент, который

является либо цитотоксическим, цитостатическим, либо иным образом обеспечивает некоторое терапевтическое преимущество. В некоторых воплощениях эффекторная часть представляет собой нацеливающий фрагмент или агент, такой как агент, который нацелен на антиген клеточной поверхности, например антиген на поверхности опухолевой клетки. В некоторых воплощениях эффекторная часть представляет собой метку, которая может генерировать детектируемый сигнал, прямо или опосредованно. В некоторых воплощениях эффекторная часть представляет собой токсин. В некоторых воплощениях эффекторная часть представляет собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, малую молекулу или наночастицу.

В некоторых воплощениях, 1, 2, 3, 4, 5 или более эффекторных фрагментов, которые могут быть одинаковыми или различными, конъюгированы, связаны или слиты с вариантным полипептидом или белком с образованием конъюгата IgSF. В некоторых воплощениях такие эффекторные фрагменты могут быть присоединены к вариантному полипептиду или иммуномодулирующему белку с использованием различных способов молекулярно-биологической или химической конъюгации и связывания, известных в данной области и описанных ниже. В некоторых воплощениях линкеры, такие как пептидные линкеры, расщепляемые линкеры, нерасщепляемые линкеры или линкеры, которые помогают в реакции конъюгации, могут быть использованы для связывания или конъюгации эффекторных фрагментов с вариантным полипептидом или иммуномодулирующим белком.

В некоторых воплощениях конъюгат IgSF включает следующие компоненты: (белок или полипептид), (L)q и (эффекторный фрагмент)n, в котором белок или полипептид представляет собой любой из описанных вариантных полипептидов или иммуномодулирующих белков, способных связывать один или несколько когнатных контрструктурных лигандов, как описано; L представляет собой линкер для связывания белка или полипептида с фрагментом; m равно, по меньшей мере, 1; q равно 0 или более; и полученный конъюгат IgGF связывается с одним или несколькими контрструктурными лигандами. В конкретных воплощениях m составляет от 1 до 4, а q равно от 0 до 8. В некоторых воплощениях линкер представляет собой пептид. В некоторых воплощениях эффекторный фрагмент представляет собой белок или полипептид.

В некоторых воплощениях предлагается конъюгат IgSF, содержащий вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, обеспеченный в данном документе, конъюгированный с направляющим агентом, который связывается с молекулой клеточной поверхности, например, для направленной доставки вариантного полипептида или иммуномодулирующего белка к специфической клетке. В некоторых воплощениях

нацеливающий агент представляет собой молекулу(ы), которая обладает способностью локализоваться и связываться с молекулой, присутствующей в нормальной клетке/ткани и/или опухолевой клетке/опухоли у объекта. Другими словами, конъюгаты IgSF, содержащие нацеливающий агент, могут связываться с лигандом (прямо или опосредованно), который присутствует в клетке, такой как опухолевая клетка. Нацеливающие агенты по изобретению включают антитела, полипептиды, пептиды, аптамеры, другие лиганды или любую их комбинацию, которые могут связывать компонент клетки-мишени или молекулы.

В некоторых воплощениях нацеливающий агент связывает клетку(и) опухоли или может связываться в непосредственной близости от опухолевой клетки(ок) (например, опухолевой сосудистой системы или опухолевого микроокружения) после введения объекту. Нацеливающий агент может связываться с рецептором или лигандом на поверхности раковой клетки. В другом аспекте изобретения выбран нацеливающий агент, который специфичен для нераковых или ткани. Например, нацеливающий агент может быть специфичным для молекулы, обычно присутствующей на конкретной клетке или ткани. Кроме того, в некоторых воплощениях одна и та же молекула может присутствовать на нормальных и раковых клетках. Известны различные клеточные компоненты и молекулы. Например, если целевой агент специфичен для EGFR, полученный конъюгат IgSF может быть нацелен на раковые клетки, экспрессирующие EGFR, а также на нормальные эпидермальные клетки кожи, экспрессирующие EGFR. Поэтому в некоторых воплощениях конъюгат IgSF по изобретению может функционировать с помощью двух отдельных механизмов (нацеленных на раковые и незлокачественные клетки).

В различных аспектах настоящего изобретения, раскрытый в настоящем описании конъюгат IgSF по настоящему изобретению включает нацеливающий агент, который может связывать/нацеливать на клеточный компонент, такой как опухолевый антиген, бактериальный антиген, вирусный антиген, антиген микоплазмы, антиген гриба, прионный антиген, антиген из паразита. В некоторых аспектах клеточный компонент, антиген или молекула могут быть использованы для обозначения искомой мишени для нацеливающего агента. Например, в различных воплощениях нацеливающий агент специфичен или связывается с компонентом, который включает, но не ограничивается ими, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB-1, HERl), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, семейство лигандов EGFR; семейство инсулиноподобных рецепторов 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 фактора роста эндотелиальных сосудов (VEGFR), семейство VEGF; семейство рецепторов HGF; семейство TRK-рецепторов; семейство рецепторов эфрина (EPH); семейство рецепторов AXL; семейство рецепторов лейкоцитарной тирозинкиназы (LTK); семейство рецепторов TIE, ангиопоэтин 1,2; семейство рецепторов-сирот, подобных рецепторной тирозинкиназе (ROR), например ROR1; CD171 (L1CAM); B7-H6 (NCR3LG1); PD-L1, антиген гликозилирования опухолей, например sTn или Tn, такой как sTn Ag MUC1; LHR (LHCGR); фосфатидилсерин, семейство рецепторов доменного диска (DDR); семейство RET-рецепторов; семейство рецепторов KLG; семейство рецепторов RYK; семейство рецепторов MuSK; рецепторы трансформирующего фактора роста-α (TGF-α), TGF-β; рецепторы цитокинов, рецепторы класса I (семейство гематопоэтина) и семейства II (интерферон/IL-10), суперсемейство рецепторов некроза опухолей (TNF) (TNFRSF), семейство рецепторов смерти; антигены рака яичка (CT), специфические для линии антигены, дифференцирующие антигены, альфа-актинин-4, ARTCl, область кластеров точки останова-продукты слияния Абелсона (Bcr-abl), B-RAF, каспаза-5 (CASP-5) каспаза-8 (CASP-8), β-катенин (CTNNBl), цикл клеточного деления 27 (CDC27), циклинзависимая киназа 4 (CDK4), CDKN2A, COA-I, гибридный белок dek-can, EFTUD-2, фактор элонгации 2 (ELF2), гибридный белок, содержащий вариантный ген Ets 6/острый миелоидный лейкоз 1 генETS (ETC6-AML1), фибронектин (FN), например экстрадомен A (EDA) фибронектина, GPNMB, гибридный белок, включающий липидный рецептор низкой плотности/GDP-L фукоза: гибридный белок β-D галактоза 2-α-L фукозилтрансферазу (LDLR/FUT), HLA-A2 замена аргинина на изолейцин в остатке 170 α-спирали α2-домена в гене HLA-A2 (HLA-A * 201-R170I), HLA-Al 1, мутированный белок теплового шока 70-2 (HSP70-2M), K1AA0205, MART2, убиквитарный для меланомы, мутированный 1, 2, 3 (MUM-I, 2, 3), простатическая кислая фосфатаза (PAP), нео-PAP, миозин класса I, NFYC, OGT, OS-9, гибридный белок pml-RARальфа, PRDX5, PTPRK, K-ras (KRAS2), N-ras (NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPDl, SYT-SSXl или -SSX2, триозофосфатизомераза, BAGE, BAGK-1, BAGE-2,3, 4,5, GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8, GnT-V (аберрантная N-ацетилглюкозанилтрансфераза V, MGAT5), HERV-K-MEL, KK-LC, KM- H-1, LAGE, LAGE-I, CTL-распознаваемый антиген при меланоме (CAMEL), MAGE-Al (MAGE-I), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE -A8, MAGE-A9, MAGE-AlO, MAGE-AI l, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-Bl, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-Cl, MAGE-C2, муцин 1 (MUC1), MART-1/мелан-A (MLANA), gp100, gp100/Pmell7 (SILV), тирозиназа (TYR), TRP-I, HAGE, NA-88, NY-ESO-I, NY-ESO-l/LAGE-2, SAGE, Spl7, SS X-1,2,3,4, TRP2-INT2,

карцино-эмбриональный антиген (CEA), калликреин 4, маммаглобин-A, OAl, антиген предстательной железы (PSA), TRP-1/gp75, TRP-2, адипофилин, индуцируемый интерфероном белок в меланоме 2 (AIM-2), BING-4, CPSF, циклин D1, молекула адгезии эпителиальных клеток (Ep-CAM), EphA3, фактор роста фибробластов-5 (FGF-5), гликопротеин 250 (gp250), EGFR (ERBBl), HER-2/neu (ERBB2), цепь α2 рецептора интерлейкина-13 (IL13Rα2), рецептор IL-6, кишечная карбоксиэстераза (iCE), альфа-фетобетон (AFP), M-CSF, mdm-2, MUCl, p53 (TP53), PBF, PRAME, PSMA, RAGE-I, RNF43, RU2AS, SOXlO, STEAPl, сурвивин (BIRC5), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), теломеразу, ген опухоли Вильмса (WTl) SYCPl, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIPl, CTAGE-I, CSAGE, MMAl, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15ql4, HCA661, LDHC, MORC, SGY-I, SPO1 1, TPXl, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2, TDRD1, TEX15, FATE, TPTE, идиотипы иммуноглобулина, белок Bence-Jones, рецепторы эстрогенов (ER), андрогенные рецепторы (AR), CD40, CD3 0, CD20, CD19, CD33, опухолевый антиген 72-4 (CA 72-4), опухолевый антиген 15-3 (CA 15-3), опухолевый антиген 27-29 (CA 27-29), опухолевый антиген 125 (CA 125), опухолевый антиген 19-9 (CA 19-9), хорионический гонадотропин β-человека, β-2 микроглобулин, антиген плоскоклеточной карциномы, нейроспецифическую энолазу, белок теплового шока gp96, GM2, сарграмостим, CTLA-4, 707 аланин-пролин (707-AP), антиген аденокарциномы, распознаваемый Т-клетками 4 (APT-4), карциноэмбриональный антигенный пептид 1 (CAP-1), кальций-активированный хлоридный канал-2 (CLCA2), циклофилин B (Cyp-B), перстневидноклеточная опухоль человека-2 (HST-2), белки вируса папилломы человека (HPV) (HPV-E6, HPV-E7, основные или малые капсидные антигены, другие), белки вируса Эпштейна-Барр (EBV) (латентные мембранные белки EBV-LMPl, LMP2; другие), белки вируса гепатита B или C и белки HIV.

В некоторых воплощениях нацеливающий агент является специфическим или связывается с компонентом, который включает, без ограничения указанным, HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (рецептор IL-2Rα), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, раковый антиген 125 (CA125), альфа-фетопротеина (AFP), Льюис Y, TAG72, каприн-1, мезотелина, рецептора PDGF (PDGFR; такого как PDGF-Rα), PD-1, PD-L1, CTLA- 4, рецептора IL-2, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, глипикана-3, gpA33, муцинов, CAIX, PSMA, фолат-связывающего белка, ганглиозидов (такие как GD2, GD3, GM1 и GM2) , рецептора VEGF (VEGFR), VEGFR2, VEGF-A, интегрина αVβ3, интегрина α5β1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, тенасцина, AFP, комплекса BCR, CD3, CD18, CD44, CTL, CTL-4, gp72, HLA-DR 10 β, антигена HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242,

антигена PEM, металлопротеиназ, рецептора эфрина, лигандов эфрина, рецептора HGF, CXCR4, CXCR4, рецептора бомбезина, антигена SK-1, Bcr- abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, mTOR, TSC1 , TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-3, MEK1, MEK2, SMO или B7-H6 (NCR3LG1).

В некоторых воплощениях, конъюгат IgSF, через его нацеливающий агент, связывается клеточный компонент опухолевой клетки, опухолевой сосудистой системы или опухолевого микроокружения, способствуя тем самым уничтожению клеток-мишеней с помощью модуляции иммунного ответа, (например, путем активации ко-стимулирующих молекул или ингибирования отрицательных регуляторных молекул активации иммунных клеток), ингибирования сигналов выживаемости (например, фактор роста или антагонистов цитокинов или антагонистов гормонов), активации сигналов смерти и/или иммуно-опосредованной цитотоксичности, например, через антителозависимую клеточную цитотоксичность. Такие конъюгаты IgSF могут функционировать с помощью нескольких механизмов для предотвращения, уменьшения или устранения опухолевых клеток, например, для облегчения доставки конъюгированных эффекторных фрагментов в опухолевую мишень, 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). Более того, в некоторых случаях один или несколько из вышеперечисленных путей могут действовать при введении одного или нескольких конъюгатов IgSF по изобретению.

В некоторых воплощениях конъюгат IgSF, через нацеливающий агент, будет локализован на, например, связываться с, клеточным компонентом опухолевой клетки, опухолевой сосудистой системы или опухолевого микроокружения, модулируя тем самым клетки иммунной реакции в непосредственной близости от опухоли. В некоторых воплощениях нацеливающий агент облегчает доставку конъюгированного IgSF (например, vIgD) в опухолевую мишень, например, для того, чтобы взаимодействовать со своим когнатным партнером связывания для изменения сигнализации иммунных клеток (например, NK-клеток, моноцитов/макрофагов, дендритных клеток, Т-клеток, В-клеток), несущих когнатный партнер связывания. В некоторых воплощениях локализованная доставка оказывает агонистическое воздействие или стимулирует костимулирующий рецептор.

В некоторых воплощениях нацеливающий агент представляет собой иммуноглобулин. Используемый в данном документе термин «иммуноглобулин» включает природные или искусственные моно- или поливалентные антитела, включая, без

ограничения указанным, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, полученные библиотекой экспрессии Fab, одноцепочечные Fv (scFv); анти-идиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антитела против Id к антителам по изобретению) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанных. Термин «антитело», используемый в данном описании, относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть к молекулам, которые содержат сайт связывания антигена, который специфически связывается с антигеном. Молекулы иммуноглобулина по изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях конъюгат IgSF, через его антительный нацеливающий фрагмент, будет связывать клеточный компонент опухолевой клетки, опухолевой сосудистой системы или опухолевого микроокружения, способствуя тем самым апоптозу клеток-мишеней с помощью модуляции иммунного ответа (например, путем активации костимулирующих молекул или ингибирования отрицательных регуляторных молекул активацией иммунных клеток), ингибированию сигналов выживаемости (например, антагонистов рецепторов факторов роста или цитокинов или гормонов), активацию сигналов смерти и/или иммуно-опосредованной цитотоксичности, такой как антителозависимая клеточная цитотоксичность. Такие конъюгаты IgSF могут функционировать с помощью нескольких механизмов для предотвращения, уменьшения или устранения опухолевых клеток, например, для облегчения доставки конъюгированных эффекторных фрагментов в опухолевую мишень, 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).

В некоторых воплощениях конъюгат IgSF, через его антительный нацеливающий фрагмент, будет связывать клеточный компонент опухолевой клетки, опухолевой сосудистой системы или опухолевого микроокружения, тем самым модулируя иммунный ответ (например, путем активации костимулирующих молекул или ингибирования молекул отрицательной регуляции активации иммунных клеток). В некоторых воплощениях 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).

Антительные нацеливающие фрагменты по изобретению включают фрагменты антител, которые включают, без ограничения указанным, Fab, Fab' и F(ab')2, Fd, одноцепочечные Fv (ScFv), одноцепочечные антитела, дисульфидсвязанные Fv (sdFv) и фрагменты, содержащие либо домен VL, либо VH. Антигенсвязывающие фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную область(и) самостоятельно или в комбинации со всей или частью следующих областей: шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Также в изобретение включены антигенсвязывающие фрагменты, которые также включают любую комбинацию вариабельной области(ей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2 и CH3. Также в изобретение включены фрагменты Fc, гибридные белки антиген-Fc и конъюгаты Fc-нацеливающий фрагмент или гибридные продукты (Fc-пептид, Fc-аптамер). Антитела, нацеливающие фрагменты по изобретению, могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. В одном аспекте антительные нацеливающие фрагменты, происходят из человека, представителей подсемейства мышиных (например, мыши и крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Кроме того, такие антитела могут быть гуманизированными вариантами антител животных. Антитела, нацеливающие фрагменты по изобретению, могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или обладать большей мультиспецифичностью.

В различных воплощениях антитело/нацеливающий фрагмент рекрутирует, связывается и/или активирует иммунные клетки (например, NK-клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки) с помощью взаимодействий между Fc (антителами) и рецепторами Fc (на иммунных клетках) и через конъюгированные вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки, представленные в данном документе. В некоторых воплощениях антитело/нацеливающий фрагмент распознает или связывает опухолевой агент через и локализует в опухолевой клетке конъюгированные вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки, представленные в данном документе, для облегчения модуляции иммунных клеток в окрестности опухоли.

Примеры антител, которые могут быть включены в конъюгаты IgSF включают, без ограничения указанным, антитела, такие как цетуксимаб (IMC-C225; Erbitux®), трастузумаб (Herceptin®), ритуксимаб (Rituxan®; MabThera®), бевацизумаб (Avastin ®), алемтузумаб (Campath®, Campath-1H®, Mabcampath®), пертузумаб (Perjeta®), панитумумаб (ABX-EGF, Vectibix®), ранибизумаб (Lucentis®),ибритумомаб, ибритумомаб тиуксетан, (Zevalin®), тоситумомаб, йод I131 тоситумомаб (BEXXAR®), катумаксомаб (Removab®), динутуксимаб (UnituxinTM), гемтузумаб, гемтузумаб

озогамицин (Mylotarg®), абатацепт (CTLA4-Ig, Orencia®), белатацепт (L104EA29YIg, LEA29Y, LEA), ипилимумаб (MDX-010, MDX-101), тремелимумаб (тицилимумаб, CP-675,206), PRS-010, PRS-050, афлиберцепт (VEGF Trap, 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, панорекс @ (17-1A) (мышиное моноклональное антитело); панорекс @ (17-1A) (химерное мышиное моноклональное антитело); IDEC-Y2B8 (мышиное, анти-CD2O моноклональное антитело); BEC2 (анти-идиотипическое моноклональное антитело, имитирующий эпитоп GD) (с BCG); оларатумаб (LartruvoTM); онколим (моноклональное антитело Lym-1); SMART MI95 Ab, гуманизированный 13 'I LYM-I (Oncolym), оварекс (B43.13, анти-идиотипическое мышиное моноклональное антитело); MDX-210 (гуманизированное биспецифическое антитело против HER-2); моноклональное антитело 3622W94 MAb, которое связывается с антигенами панкарциномы EGP40 (17-1A) на аденокарциномах; Анти-VEGF, зенапакс (SMART Anti-Tac (рецептор IL-2), SMART MI95 Ab, гуманизированное Ab, гуманизированное); Рамучирумаб (Cyramza®); MDX-210 (гуманизированное биспецифическое антитело против HER-2); MDX-447 (гуманизированное биспецифическое антитело против рецептора EGF); NovoMAb-G2 (специфичное для панкрециномы антитело); TNT (химерное моноклональное антитело-гистоновые антигены); TNT (химерное моноклональное антитело-гистоновые антигены); Gliomab-H (моноклональные-гуманизированные антитела); GNI-250 Mab; EMD-72000 (антагонист химерного EGF); LymphoCide (гуманизированное антитело LL2); и MDX-260, предназначенные для GD-2, ANA Ab, SMART IDlO Ab, SMART ABL 364 Ab или ImmuRAIT-CEA. Как проиллюстрировано вышеизложенным перечнем, принято получать антитела к определенному целевому эпитопу.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент предлагаемых конъюгатов, включая гибридные молекулы, представляет собой цетуксимаб, панитумумаб, залутумумаб, нимотузумаб, трастузумаб, адотрастумумаб, эмтансин, тозитумомаб (Bexxar ®), ритуксимаб (Rituxan, Mabthera), ибритумомаб тиуксетан (Zevalin), даклизумаб (Zenapax), гемтузумаб (Mylotarg), алемтузумаб, CEA-скан Fab-фрагмент, моноклональное антитело OC125, ab75705, B72.3, бевацизумаб (Avastin ®), афатиниб, акситиниб, босутиниб, кабозантиниб, церитиниб, кризотиниб, дабрафениб, дазатиниб, динутуксимаб (UnituxinTM), эрлотиниб, эверолимус, ибрутиниб, иматиниб, лапатиниб, ленватиниб, нилотиниб, олапариб, оларатумаб (LartruvoTM), палбоциклиб, пазопаниб, пертузумаб (Perjeta®), рамукирумаб (Cyramza®), регорафениб, руксолитиниб,

сорафениб, сунитиниб, темсиролимус, траметиниб, вандетаниб, вемурафениб, висмодегиб, базиликсимаб, ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MPDL3280A, пидилизумаб (CT-011), AMP-224, MSB001078C или MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб или является его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых воплощениях антитела против PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть включены в конъюгаты IgSF. Примеры антител PD-L1, которые могут быть включены в конъюгаты IgSF, включают, без ограничения указанным, антитела, такие как BMS-936559, 12A4, LY3300054, атезолизумаб (Tecentriq®), авелумаб (Bavencio®), дурвалумаб (Imfinzi®). См., например, WO2007/005874, WO2017/034916, WO2010/077634, WO2013/079174, WO2011/066389, эти источники включены в ссылкой во всей полноте. В некоторых воплощениях vIgD прямо или опосредованно связан с N- или C-концом легкой и/или тяжелой цепи антитела против PD-L1. В некоторых воплощениях антитело против PD-L1 представляет собой BMS-936559, LY3300054, атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб. Примерные легкая цепь и тяжелая цепь атезолизумаба антитела против PD-L1 приведены в SEQ ID NO: 866 и 867, соответственно. Типичные конъюгаты IgSF, которые включают антитело против PD-L1 атезолизумаб, приведены в SEQ ID NO: 868-895.

В некоторых воплощениях изобретения антительный нацеливающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен Fc. В некоторых воплощениях вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок конъюгируют с Fc-частью антительного нацеливающего фрагмента, например, конъюгацией с N-концом Fc-части антитела.

В некоторых воплощениях vIgD связана, прямо или опосредованно, к N- или C-концом легкой и/или тяжелой цепи антитела. В некоторых воплощениях связь может осуществляться через пептидный линкер, такой как любой описанный выше. В некоторых воплощениях линкер может дополнительно включать аминокислоты, введенные путем клонирования и/или из сайта рестрикции. В некоторых воплощениях линкер может включать дополнительные аминокислоты на каждом конце, введенные сайтом рестрикции. Например, линкер может включать дополнительные аминокислоты, такие как SA (в однобуквенном аминокислотном коде), которые вводятся с использованием сайта рестрикции AFEI. Могут быть построены различные конфигурации. На фиг. 10A-10C изображены примерные конфигурации. В некоторых воплощениях конъюгат антитела может быть получен путем совместной экспрессии тяжелой и легкой цепи антитела в клетке.

В одном аспекте настоящего изобретения нацеливающий агент представляет собой молекулу-аптамер. Например, в некоторых воплощениях аптамер состоит из нуклеиновых кислот, которые действуют как нацеливающий агент. В различных воплощениях конъюгат IgSF по изобретению включает аптамер, который специфичен для молекулы в опухолевой клетке, опухолевой сосудистой сети и/или микроокружении опухоли. В некоторых воплощениях сам аптамер может содержать биологически активную последовательность в дополнение к целевому модулю (последовательности), где биологически активная последовательность может индуцировать иммунный ответ на клетку-мишень. Другими словами, такая молекула аптамера является агентом двойного назначения. В некоторых воплощениях конъюгат IgSF по изобретению включает конъюгацию аптамера с антителом, где аптамер и антитело специфичны для связывания с отдельными молекулами на опухолевой клетке, опухолевой сосудистой сети, микроокружении опухоли и/или иммунных клетках.

Термин «аптамер» включает ДНК, РНК или пептиды, которые выбираются на основе специфических связывающих свойств к конкретной молекуле. Например, аптамер(ы) может быть выбран для связывания определенного гена или продукта гена в опухолевой клетке, опухолевой сосудистой сети, микроокружении опухоли и/или иммунной клетке, как раскрыто в данном документе, где селекцию осуществляют способами, известными в данной области и знакомыми специалисту в данной области техники.

В некоторых аспектах настоящего изобретения нацеливающий агент представляет собой пептид. Например, вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки, представленные в данном документе, могут быть конъюгированы с пептидом, который может связываться с компонентом раковых или опухолевых клеток. Следовательно, такие конъюгаты IgSF по изобретению включают агенты, нацеленные на пептид, которые связываются с клеточным компонентом опухолевой клетки, опухолевой сосудистой сети и/или компонентом микроокружения опухоли. В некоторых воплощениях пептиды нацеливающего агента могут быть антагонистом или агонистом интегрина. Интегрины, которые включают альфа- и бета-субъединицу, включают многочисленные типы, хорошо известные специалисту в данной области техники.

В одном воплощении нацеливающий агент представляет собой Vvβ3. Интегрин Vvβ3 экспрессируется на множестве клеток и, как было показано, опосредует несколько биологически важных процессов, включая адгезию остеокластов к костному матриксу, миграцию клеток гладких мышц сосудов и ангиогенез. Подходящие молекулы-мишени для интегринов включают RGD-пептиды или пептидомиметики, а также не-RGD-пептиды

или пептидомиметики (см., например, США Пат. США No. 5777071 и 5780426) для других интегринов, таких как V4.βi (VLA-4), V4-P7 (см., например, Пат. США США № 6366519; Chang et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12: 159-163 (2002); Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12: 133-136 (2002)) и тому подобное.

В некоторых воплощениях предлагается конъюгат IgSF, включающий вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, обеспеченный в данном документе, конъюгированный с терапевтическим агентом. В некоторых воплощениях терапевтический агент включает, например, дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187, 1986). В некоторых воплощениях терапевтический агент обладает внутриклеточной активностью. В некоторых воплощениях конъюгат IgSF интернализуется, и терапевтический агент представляет собой цитотоксин, который блокирует белковый синтез клетки, что приводит к гибели клеток. В некоторых воплощениях терапевтический агент представляет собой цитотоксин, содержащий полипептид, обладающий активностью, дезактивирующей рибосому, включая, например, гелонин, буганин, сапорин, рицин, цепь рицина А, бриодин, дифтерийный токсин, рестриктоцин, экссутоксин А Pseudomonas и их варианты. В некоторых воплощениях, где терапевтический агент представляет собой цитотоксин, содержащий полипептид, обладающий активностью, дезактивирующей рибосому, конъюгат IgSF необходимо интернализовать при связывании с клеткой-мишенью, чтобы белок был цитотоксичным по отношению к клеткам.

В некоторых воплощениях, предлагается конъюгат IgSF, содержащий вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, предлагаемый в данном документе, конъюгированный с токсином. В некоторых воплощениях токсин включает, например, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекульные 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)), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)) и калихеамицин (Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993)). Токсины могут оказывать свои цитотоксические и цитостатические эффекты с помощью механизмов, включая связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

В некоторых воплощениях предлагается конъюгат IgSF, содержащий вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, предлагаемый в данном документе, конъюгированный с меткой, которая может генерировать детектируемый сигнал, непосредственно или опосредованно. Эти конъюгаты IgSF могут использоваться для

исследований или диагностических применений, например, для выявления рака in vivo. Метка предпочтительно способна производить, прямо или опосредованно, детектируемый сигнал. Например, метка может быть радионепрозрачной или радиоизотопом, таким как 3H, 14C, 32P, 35S, 123I, 125I, 131I; флуоресцентным (флуорофорным) или хемилюминесцентным (хромофорным) соединением, такое как изотиоцианат флуоресцеин, родамин или люциферин; ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза или пероксидаза хрена; визуализирующим агентом; или ионом металла. В некоторых воплощениях метка представляет собой радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например 99Tc или 123I, или спиновую метку для визуализации с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известную как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как цирконий-89, йод -123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо. Цирконий-89 может быть введен в комплекс с различными металлическими хелатирующими агентами и конъюгирован с антителами, например, для PET-визуализации (WO 2011/056983). В некоторых воплощениях конъюгат IgSF детектируется косвенно. Например, вторичное антитело, специфичное для конъюгата IgSF и содержащее детектируемую метку, может быть использовано для детекции конъюгата IgSF.

Конъюгаты IgSF могут быть получены с использованием любых способов, известных в данной области техники. См., например, WO 2009/067800, WO 2011/133886 и публикация патентной заявки США № 2014322129, полностью включенная в настоящий документ ссылкой.

Вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки конъюгата IgSF могут быть «присоединены к» эффекторному фрагменту с помощью любых средств, с помощью которых вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки могут быть ассоциированы с, или связаны с эффекторным фрагментом. Например, вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки конъюгата IgSF могут быть присоединены к эффекторному фрагменту с помощью химических или рекомбинантных средств. Химические средства для получения гибридов или конъюгатов известны в данной области и могут быть использованы для получения конъюгата IgSF. Способ, используемый для конъюгации вариантных полипептидов или иммуномодулирующих белков и эффекторного фрагмента, должен быть способен связывать вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки с эффекторным фрагментом, не мешая способности вариантных полипептидов или иммуномодулирующих белков связываться с их одним или более контрструктурных лигандов.

Вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки конъюгата IgSF могут

быть связаны опосредованно с эффекторным фрагментом. Например, вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки конъюгата IgSF могут быть непосредственно связаны с липосомой, содержащей эффекторный фрагмент одного из нескольких типов. Эффекторный фрагмент(ы) и/или вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки также могут быть связаны с твердой поверхностью.

В некоторых воплощениях вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки конъюгата IgSF и эффекторный фрагмент оба являются белками и могут быть конъюгированы с использованием методов, хорошо известных в данной области. Существует несколько сотен сшивающих агентов, которые могут конъюгировать два белка. (См., например, “Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking,” 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor). Сшивающий агент обычно выбирают на основе реакционноспособных функциональных групп, доступных или вставленных на вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки и/или эффекторный фрагмент. Кроме того, если нет реакционноспособных групп, может быть использован фотоактивируемый сшивающий агент. В некоторых случаях желательным может быть включение спейсера между вариантными полипептидами или иммуномодулирующими белками и эффекторным фрагментом. Сшивающие агенты, известные в данной области, включают гомобифункциональные агенты: глутаровый альдегид, диметиладипимидат и бис (диазобензидин) и гетеробифункциональные агенты: m Малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид и Сульфо-m Малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид.

В некоторых воплощениях вариантный полипептид или иммуномодулирующие белки конъюгата IgSF может быть сконструирован с конкретными остатками для химического присоединения эффекторного фрагмента. Специфические остатки, используемые для химического присоединения молекулы, известные в данной области, включают лизин и цистеин. Сшивающий агент выбирают на основе реакционноспособных функциональных групп, вставленных в вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки, и доступные на эффекторном фрагменте.

Конъюгат IgSF также может быть получен с использованием методик рекомбинантной ДНК. В этом случае последовательность ДНК, кодирующая вариантные полипептиды или иммуномодулирующие белки, слита с последовательностью ДНК, кодирующей эффекторную часть, в результате чего образуется молекула гибридной ДНК. Гибридную последовательность ДНК трансфицируют в клетку-хозяин, которая экспрессирует гибридный белок. Гибридный белок может быть выделен из культуры клеток и очищен с использованием методов, известных в данной области.

Примеры присоединения эффекторного фрагмента, который представляет собой

метку, к вариантным полипептидам 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); and 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).

Радиоактивные или другие метки могут быть включены в конъюгат известными способами. Например, пептид может быть получен биосинтезом или может быть синтезирован химическим аминокислотным синтезом с помощью подходящих аминокислотных предшественников, с включением, например, фтора-19 вместо водорода. Метки, такие как 99Tc или 123I, 186Re, 188Re и 111In, могут быть присоединены через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 может быть прикреплен через остаток лизина. Способ "IODOGEN" (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)) можно использовать для включения йода-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описывает другие способы.

Конъюгаты вариантных полипептидов или иммуномодулирующих белков и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис (п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис- (п-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 может быть получен как описано у Vitetta et al (1987) Science, 238:1098. Меченная углеродом-14 1-п-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типичный хелатирующий агент для конъюгации радионуклеотида с антителом. См., например, WO94/11026. Линкер может быть «расщепляемым линкером», облегчающим высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, может быть использован кислотно-лабильный линкер, линкер, чувствительный к пептидазе, фотолабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Patent No. 5,208,020).

Конъюгаты IgSF по настоящему изобретению явно рассматривают, без ограничения указанным, конъюгаты лекарственных средств, приготовленных с помощью перекрестно-связывающих 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 и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил- (4-винилсульфон) бензоат), которые являются коммерчески доступными (например, у Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Иллинойс, США). См. стр. 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

C. ТРАНСМЕМБРАННЫЕ И СЕКРЕТИРУЕМЫЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ И СКОНСТРУИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

В данном документе предлагаются сконструированы клетки, которые экспрессируют иммуномодулирующие вариантные полипептиды ICOSL (в качестве варианта «сконструированные клетки»). В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL экспрессируется в клетке, такой как иммунная клетка (например, Т-клетка или клетка, представляющая антиген), в связанной с мембраной форме, тем самым обеспечивая трансмембранный иммуномодулирующий белок (далее также называемый «TIP»). В некоторых аспектах вариантный полипептид ICOSL экспрессируется в клетке, такой как иммунная клетка (например, Т-клетка или клетка, представляющая антиген), в секретируемой форме, чтобы таким образом продуцировать секретируемую или растворимую форму вариантного полипептида ICOSL (далее также называемого «SIP»), например, когда клетки вводят объекту. В некоторых аспектах SIP может оказывать антагонистическое воздействие на когнатного партнера связывания в окружающей среде (например, в микроокружение опухоли), в котором он секретируется.

1. Трансмембранные иммуномодулирующие белки

В некоторых воплощениях иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный ICOSL может быть мембраносвязанным белком. Как описано более подробно ниже, иммуномодулирующий полипептид может представлять собой трансмембранный иммуномодулирующий полипептид, содержащий вариантный ICOSL, в котором содержится: эктодомен, содержащий, по меньшей мере, один домен IgSF с модифицированной аффинностью (IgV или IgC), трансмембранный домен и, необязательно, цитоплазматический домен. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок может быть экспрессирован 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 воплощениях 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 ЦТЛ), Т-клетка натуральный киллер, регуляторная Т-клетка, Т-клетка памяти или гамма-дельта Т-клетка. В некоторых воплощениях клетка млекопитающего представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC). Обычно, но не исключительно, эктодомен (в качестве варианта «внеклеточный домен») включает одну или несколько вариаций аминокислот (например, аминокислотных замен) варианта ICOSL по изобретению. Так, например, в некоторых воплощениях трансмембранный белок будет содержать эктодомен, который включает одну или несколько аминокислотных замен в вариантном ICOSL по изобретению.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки экспрессируют вариантные полипептиды ICOSL, которые являются трансмембранными иммуномодулирующими полипептидами (TIPS), которые могут представлять собой мембранный белок, такой как трансмембранный белок. В типичных воплощениях эктодомен мембранного белка включает внеклеточный домен или его домен IgSF вариантного ICOSL, представленного в данном документе, в котором содержится одна или несколько аминокислотных замен, по меньшей мере, в одном домене IgSF, как описано. Трансмембранные иммуномодулирующие белки, представленные в данном документе, дополнительно содержат трансмембранный домен, связанный с эктодоменом. В некоторых воплощениях трансмембранный домен приводит к кодированному белку для экспрессии на поверхности клетки. В некоторых воплощениях трансмембранный домен связан непосредственно с эктодоменом. В некоторых воплощениях трансмембранный домен связывается опосредованно с эктодоменом через один или несколько линкеров или спейсеров. В некоторых воплощениях трансмембранный домен включает преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки, такие как лейцин и валин.

В некоторых воплощениях может быть использован полноразмерный трансмембранный якорный домен, чтобы гарантировать, что TIP будут экспрессированы на поверхности сконструированной клетки, такой как сконструированная Т-клетка. Удобно, что этот домен может быть из конкретного нативного белка, который является модифицированным по аффинности (например, CD80 или ICOSL или другого нативного белка IgSF), и который просто сливается с последовательностью первого мембранного проксимального домена аналогично природному белку IgSF (например, CD80 или ICOSL). В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок включает трансмембранный домен соответствующего референсного (например, немодифицированного) представителя IgSF или представителя IgSF дикого типа, такого

как трансмембранный домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, указанные в SEQ ID NO: 5 (таблица 2). В некоторых воплощениях связанная с мембраной форма включает трансмембранный домен соответствующего полипептида референсного (например, немодифицированного) пептида или пептида дикого типа, такого как соответствующие остатки 257-277 из SEQ ID NO: 5.

В некоторых воплощениях трансмембранный домен является ненативным трансмембранным доменом, который не является трансмембранным доменом нативного ICOSL. В некоторых воплощениях трансмембранный домен получают из трансмембранного домена из другого полипептида-представителя семейства ICOSL, который является мембранным или представляет собой трансмембранный белок. В некоторых воплощениях может быть использован трансмембранный якорный домен из другого белка на Т-клетках. В некоторых воплощениях трансмембранный домен получен из CD8. В некоторых воплощениях трансмембранный домен может дополнительно содержать внеклеточную часть CD8, которая служит в качестве спейсерного домена. Примерный трансмембранный домен, полученный из CD8, представлен в SEQ ID NO: 246 или 483 или их части, содержащей трансмембранный домен CD8. В некоторых воплощениях трансмембранный домен представляет собой синтетический трансмембранный домен.

В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок дополнительно включает эндодомен, такой как цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом. В некоторых воплощениях цитоплазматический сигнальный домен индуцирует клеточную сигнализацию. В некоторых воплощениях эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка включает цитоплазматический домен соответствующего референсного (например, немодифицированного) пептида или пептида дикого типа, такого как цитоплазматический домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 (см. Таблицу 2).

В некоторых воплощениях предлагаемый трансмембранный иммуномодулирующий белок, который является или включает вариантный ICOSL включающий аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 257 и включает эктодомен, содержащий, по меньшей мере, один аффинно-модифицированный домен ICOSL IgSF, как описано, и трансмембранный домен. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок включает любую одну или несколько аминокислотных

замен в домене IgSF (например, домен IgV), как описано, включая любые, указанные в Таблице 1. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок может дополнительно содержать цитоплазматический домен, как описано. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок может дополнительно включать сигнальный пептид. В некоторых воплощениях сигнальный пептид представляет собой нативный сигнальный пептид из представителя IgSF дикого типа, такой как содержащийся в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5 (см., например, таблицу 2).

В некоторых воплощениях предлагаемое представляет собой трансмембранные иммуномодулирующие белки, содержащие аминокислотные замены E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R или N52H/N57Y/Q100P. В некоторых воплощениях предоставленный трансмембранный иммуномодулирующий белок представляет собой или включает вариантный ICOSL, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 257, но в которой содержатся аминокислотные замены E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R или N52H/N57Y/Q100P в соответствующих положениях в SEQ ID NO: 257 или в аминокислотной последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 257 и включает аминокислотные замены E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R или N52H/N57Y/Q100P.

В некоторых воплощениях предлагаемое представляет собой трансмембранные иммуномодулирующие белки, содержащие аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 496 или 497 (каждая из которых включает аминокислотную замену N52D), SEQ ID NO: 498 или 499 (каждая из которых включает аминокислотные замены N52H/N57Y/Q100P), SEQ ID NO: 500 или 501 (каждый из которых включает аминокислотные замены E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R) или SEQ ID NO: 502 или 503 (каждый из которых включает аминокислотные замены N52H/N57Y/Q100R) или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности к любой из SEQ ID NO: 495-503 и которая включает указанные аминокислотные замены. В некоторых воплощениях при экспрессии в сконструированной клетке, такие трансмембранные иммуномодулирующие белки экспрессируются на поверхности клетки.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей такие трансмембранные иммуномодулирующие белки. В некоторых воплощениях нуклеотидная молекула, кодирующая трансмембранный иммуномодулирующий белок, включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 257 и включает эктодомен, содержащий, по меньшей мере, один домен IgSF с модифицированной аффинностью, как описано, трансмембранный домен и, необязательно, цитоплазматический домен. В некоторых воплощениях нуклеотидная молекула может дополнительно содержать последовательность нуклеотидов, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых воплощениях сигнальный пептид представляет собой нативный сигнальный пептид соответствующего представителя IgSF дикого типа (см., например, Таблицу 2).

Примерный трансмембранный иммуномодулирующий белок представляет собой ICOSL TIP, включающий i) аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 383 или ii) аминокислотную последовательность, которая обладает, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 243 и которая включает домен с модифицированной аффинностью, содержащийся в SEQ ID NO: 243, или аминокислотные замены в нем. Также предусматривается i) последовательность нуклеотидов, предлагаемых в SEQ ID NO: 384, ii) последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 244 и которая кодирует TIP, который включает домен с модифицированной аффинностью SEQ ID NO: 243 или iii) последовательность i) или ii) с вырожденными кодонами.

В некоторых воплощениях предлагаются трансмембранные иммуномодулирующие белки, связанные с CAR, в которых эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка включает цитоплазматический сигнальный домен, который включает, по меньшей мере, один ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив)-содержащий сигнальный домен. ITAM является консервативным мотивом, обнаруженным в ряде белковых доменов сигнализации, участвующих в сигнальной трансдукции иммунных клеток, в том числе в CD3-дзета-цепи («CD3-z»), участвующей в трансдукции сигнала Т-клеточного рецептора. В некоторых воплощениях эндодомен включает сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 387, или

аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 387 и сохраняет сигнальную активность для Т-клеток. В некоторых воплощениях эндодомен трансмембранного иммуномодулирующего белка, связанного с CAR, может дополнительно содержать костимулирующий сигнальный домен для дальнейшей модуляции иммуномодулирующих ответов Т-клетки. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является CD28, ICOS, 41BB или OX40. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является производным от CD28 или 4-1BB и включает аминокислотную последовательность, указанную в любом из SEQ ID NO: 484-487, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 484-487 и сохраняет костимулирующую сигнальную активность Т-клеток. В некоторых воплощениях предоставленные связанные с CAR трансмембранные иммуномодулирующие белки имеют признаки CAR для стимуляции передачи Т-клеток при связывании домена IgSF с модифицированной аффинностью с когнатным связывающим партнером или контрструктурой. В некоторых воплощениях специфическое связывание домена с модифицированной аффинностью IgSF с его контрструктурой может приводить к изменениям в иммунологической активности Т-клеток, что отражается в изменениях цитотоксичности, пролиферации или выработки цитокинов.

В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок не включает эндодомен, способный опосредовать цитоплазматическую сигнализацию. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок утратил механизм трансдукции сигнала полипептида дикого типа или немодифицированного полипептида и, следовательно, сам по себе не индуцирует клеточную сигнализацию. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок не имеет внутриклеточного (цитоплазматического) домена или части внутриклеточного домена соответствующего референсного (например, немодифицированного) полипептида или полипептида дикого типа, такого как цитоплазматический сигнальный домен, содержащийся в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5 (см. Таблицу 2). В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок не включает ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив), такой как содержащийся в некоторых ингибирующих рецепторах, включая ингибирующие рецепторы семейства IgSF (например, PD-1 или TIGIT). Таким образом, в некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок включает только эктодомен

и трансмембранный домен, например, любой из описанных.

2. Секретируемые иммуномодулирующие белки и сконструированные клетки

В некоторых воплощениях вариантный иммуномодулирующий полипептид ICOSL, содержащий одну или несколько аминокислотных мутаций, как описано в настоящем документ, является секретируемым, например, при экспрессии из клетки. Такой вариантный иммуностимулирующий белок ICOSL не включает трансмембранного домена. В некоторых воплощениях вариантный иммуномодулирующий белок ICOSL не конъюгирован с фрагментом для удлинения периода полужизни (таким как домен Fc или домен мультимеризации). В некоторых воплощениях вариантный иммуномодулирующий белок ICOSL включает сигнальный пептид, например сигнальный пептид антитела или другую эффективную сигнальную последовательность для получения доменов вне клетки. Когда иммуномодулирующий белок включает сигнальный пептид и экспрессируется сконструированной клеткой, сигнальный пептид вызывает секрецию иммуномодулирующего белка сконструированной клеткой. Как правило, сигнальный пептид или часть сигнального пептида отщепляется от иммуномодулирующего белка при секреции. Иммуномодулирующий белок можно кодировать нуклеиновой кислотой (которая может быть частью экспрессирующего вектора). В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок экспрессируется и секретируется клеткой (такой как иммунная клетка, например первичная иммунная клетка).

Таким образом, в некоторых воплощениях, предлагается вариантные иммуномодулирующие белки ICOSL, которые дополнительно содержат сигнальный пептид. В некоторых воплощениях, предлагаемое в данном документе, представляет собой нуклеотидную молекулу, кодирующую вариантный иммуномодулирующий белок ICOSL, функционально связанный с последовательностью секреции, кодирующей сигнальный пептид.

Сигнальный пептид представляет собой последовательность на N-конце иммуномодулирующего белка, которая дает сигнал о секреции иммуномодулирующего белка из клетки. В некоторых воплощениях сигнальный пептид имеет длину от около 5 до около 40 аминокислот (например, от около 5 до около 7, от около 7 до около 10, от около 10 до около 15, от около 15 до около 20, от около 20 до около 25, или от около 25 до около 30, от около 30 до около 35 или от около 35 до около 40 аминокислот).

В некоторых воплощениях, сигнальный пептид представляет собой нативный сигнальный пептид из соответствующего ICOSL дикого типа (таблица 6). В некоторых воплощениях сигнальный пептид является ненативным сигнальным пептидом. Например, в некоторых воплощениях ненативный сигнальный пептид является мутантным нативным

сигнальным пептидом из соответствующего ICOSL дикого типа и может включать одну или несколько (таких как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более) замен, вставок или делеций. В некоторых воплощениях ненативный сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид или мутант представителя семейства из того же семейства IgSF, что и представитель семейства IgSF дикого типа. В некоторых воплощениях ненативный сигнальный пептид является сигнальным пептидом или мутантом из представителя семейства IgSF из другого семейства IgSF, чем представитель семейства IgSF дикого типа. В некоторых воплощениях сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид или его мутант не из семейства белков IgSF, такой как сигнальный пептид из иммуноглобулина (такого как тяжелая цепь IgG или легкая цепь IgG-каппа), цитокина (такой как интерлейкин-2 (IL-2) или CD33), сывороточного альбумина (например, HSA или альбумина), сигнальной последовательности предшественника азуроцидина человека, люциферазы, трипсиногена (например, химотрипсиногена или трипсиногена) или другого сигнального пептида, способного эффективно секретировать белок из клетки. Примерные сигнальные пептиды включают любые, описанные в Таблице 6.

ТАБЛИЦА 6. Примерные сигнальные пептиды

SEQ ID NO.	Сигнальный Пептид	Последовательность пептида
SEQ ID NO: 346	сигнальный пептид HSA	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 347	Ig легкая цепь каппа	MDMRAPAGIFGFLLVLFPGYRS
SEQ ID NO: 348	Сигнальная последовательность пребелка азуроцидина человека	MTRLTVLALLAGLLASSRA
SEQ ID NO: 349	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLSWIFLLAILKGVQC
SEQ ID NO: 350	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MELGLRWVFLVAILEGVQC
SEQ ID NO: 351	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
SEQ ID NO: 352	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 353	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDWTWRFLFVVAAATGVQS
SEQ ID NO: 354	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
SEQ ID NO: 355	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MEFGLSWVFLVALFRGVQC
SEQ ID NO: 356	сигнальный пептид тяжелой цепи IgG	MDLLHKNMKHLWFFLLLVAA PRWVLS
SEQ ID NO: 357	сигнальная последовательность легкой цепи каппа IgG	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGA RC

SEQ ID NO: 358	сигнальная последовательность легкой цепи каппа IgG	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM A
SEQ ID NO: 359	Люцифераза Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA
SEQ ID NO: 360	Альбумин человека	MKWVTFISLLFLFSSAYS
SEQ ID NO: 361	химотрипсиноген человека	MAFLWLLSCWALLGTTFG
SEQ ID NO: 362	интерлейкин-2 человека	MQLLSCIALILALV
SEQ ID NO: 363	Трипсиноген-2 человека	MNLLLILTFVAAAVA

В некоторых воплощениях секретируемого вариантного иммуномодулирующего белка ICOSL, иммуномодулирующий белок включает сигнальный пептид при экспрессии, и сигнальный пептид (или его часть) отщепляются от иммуномодулирующего белка после секреции.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки экспрессируют вариантные полипептиды ICOSL, которые секретируются из клетки. В некоторых воплощениях такой вариантный полипептид ICOSL кодируется нуклеотидной молекулой, кодирующей иммуномодулирующий белок, под функциональным контролем сигнальной последовательности для секреции. В некоторых воплощениях кодируемый иммуномодулирующий белок секретируется при экспрессии из клетки. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, кодируемый нуклеотидной молекулой, не включает трансмембранный домен. В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, кодируемый нуклеотидной молекулой, не включает фрагмент для увеличения периода полужизни (такой как домен Fc или домен мультимеризации). В некоторых воплощениях иммуномодулирующий белок, кодируемый нуклеотидной молекулой, включает сигнальный пептид. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению дополнительно включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует секреторный или сигнальный пептид, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей иммуномодулирующий белок, тем самым позволяя секрецию иммуномодулирующего белка.

3. Клетки и сконструированные клетки

В данном документе предлагаются сконструированные клетки, экспрессирующие любой из предлагаемых иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых воплощениях сконструированные клетки экспрессируют на своей поверхности любой из предлагаемых трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов. В некоторых воплощениях сконструированные клетки экспрессируют и способны или могут секретировать иммуномодулирующий белок из клеток в условиях, подходящих для секреции белка. В некоторых воплощениях трансмембранный иммуномодулирующий белок экспрессируется

на лимфоците, таком как инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL), Т-клетка или NK-клетка, или на миелоидной клетке. В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой антигенпрезентирующие клетки (APC). В некоторых воплощениях сконструированные клетки представляют собой модифицированные Т-клетки млекопитающих или сконструированные антигенпрезентирующие клетки млекопитающих (APC). В некоторых воплощениях сконструированные Т-клетки или APC представляют собой человеческие или мышиные клетки.

В некоторых воплощениях сконструированные Т-клетки включают, без ограничения перечисленным, хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (в качестве варианта цитотоксический Т-лимфоцит или CTL), Т-клетку естественного киллера, регуляторную Т-клетку, Т-клетку памяти, или гамма-дельта-Т-клетку. В некоторых воплощениях сконструированные Т-клетки являются CD4+ или CD8+. В дополнение к сигналу MHC, сконструированные Т-клетки также нуждаются в костимулирующем сигнале, который в некоторых воплощениях обеспечивается вариантным трансмембранным иммуномодулирующим полипептидом ICOSL, экспрессированным в мембраносвязанной форме, как обсуждалось ранее.

В некоторых воплощениях сконструированные APC включают, например, APC, экспрессирующие MHC II, такие как макрофаги, В-клетки и дендритные клетки, и искусственные APC (aAPC), включая как клеточные, так и бесклеточные (например, биодеградируемые полимерные микрочастицы) aAPC. Искусственные APC (aAPC) - это синтетические версии APC, которые могут действовать аналогично APC, поскольку они презентируют антигены Т-клеткам, и активируют их. Презентацию антигена осуществляет MHC (класс I или класс II). В некоторых аспектах в сконструированных APC, таких как aAPC, антиген, который загружается в MHC, в некоторых воплощениях представляет собой опухолеспецифический антиген или опухолесодержащий антиген. Антиген, загруженный в MHC, распознается Т-клеточным рецептором (TCR) Т-клетки, который в некоторых случаях может экспрессировать ICOS, CD28 или другую молекулу, распознанную вариантными полипептидами ICOSL, представленными в данном документе. Материалы, которые могут быть использованы для разработки aAPC, включают: поли (гликолевую кислоту), поли (молочно-ко-гликолевую кислоту), оксид железа, липосомы, липидные бислои, сефарозу и полистирол.

В некоторых воплощениях клеточная aAPC может быть сконструирована так, чтобы содержать агонист TIP и TCR, который используется в адоптивной клеточной терапии. В некоторых воплощениях клеточная aAPC может быть сконструирована так, чтобы содержать агонист TIP и TCR, который используется для экспансии ex vivo

человеческих Т-клеток, например, перед введением, например, для повторной интродукции в организм пациента. В некоторых аспектах aAPC может включать экспрессию, по меньшей мере, одного клона анти-CD3 антитела, например, такого как, например, OKT3 и/или UCHT1. В некоторых аспектах aAPC могут быть инактивированы (например, облучены). В некоторых воплощениях TIP может включать любой вариантный домен IgSF, который проявляет аффинность связывания к когнатному связывающему партнеру на Т-клетке.

В некоторых воплощениях изобретения иммуномодулирующий белок, представленный в данном документе, такой как трансмембранный иммуномодулирующий белок или секретируемый иммуномодулирующий белок, коэкспрессирован или сконструирован в клетке, которая экспрессирует антигенсвязывающий рецептор, такой как рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых воплощениях сконструированная клетка, такая как сконструированная Т-клетка, распознает искомый антиген, связанный со раковой опухолью, воспалительными и аутоиммунными нарушениями, или вирусной инфекцией. В конкретных воплощениях антигенсвязывающий рецептор включает антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает опухолеспецифический антиген или опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых воплощениях сконструированная Т-клетка представляет собой Т-клетку с CAR (химерным антигенным рецептором), которая включает антигенсвязывающий домен (например, scFv), который специфически связывается с антигеном, таким как опухолеспецифический антиген или опухольассоциированный антиген. В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен (например, scFv) является специфичным к конкретному антигену, например, CD19. Примером CAR является анти-CD19 CAR, такой как CAR, содержащий анти-CD19 scFv, представленный в SEQ ID NO: 482 или SEQ ID NO: 245. В некоторых воплощениях белок TIP экспрессируется в сконструированной клетке Т-клеточного рецептора или в сконструированной клетке с химерным антигенным рецептором. В таких воплощениях сконструированная клетка совместно экспрессирует TIP и CAR или TCR. В некоторых воплощениях белок SIP экспрессируется в сконструированной клетке Т-клеточного рецептора или в сконструированной клетке с химерным антигенным рецептором. В таких воплощениях сконструированная клетка совместно экспрессирует SIP и CAR или TCR.

Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой рекомбинантные рецепторы, которые включают антигенсвязывающий домен (эктодомен), трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область (эндодомен), которая способна индуцировать или опосредовать сигнал активации для Т-клетки после

связывания антигена. В некоторых примерах CAR-экспрессирующие клетки сконструированы для экспрессии внеклеточного одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) со специфичностью к конкретному опухолевому антигену, связанному с внутриклеточной сигнальной частью, содержащей активирующий домен и, в некоторых случаях, костимулирующий домен. Костимулирующий домен может быть получен, например, из CD28, OX-40, 4-1BB/CD137 или индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS). Активирующий домен может быть получен, например, из CD3, такого как дзета CD3, эпсилон, дельта, гамма или тому подобное. В некоторых воплощениях изобретения CAR имеет два, три, четыре или более костимулирующих домена. CAR scFv может быть предназначен для направленного воздействия на антиген, экспрессируемый в клетке, связанной с заболеванием или состоянием, например, опухолевый антиген, такой как, например, CD19, который представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый клетками в линии В-клеток, включая все нормальные В-клетки и В-клеточные злокачественные новообразования, включая, без ограничения указанным, NHL, CLL и не-Т-клеточные ALL. Пример терапии и конструкций с CAR + Т-клетками описан в Патентных публикациях США No. 2013/0287748, 2014/0227237, 2014/0099309 и 2014/0050708, и эти источники включены ссылкой во всей полноте.

В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как одноцепочечный фрагмент (scFv). В некоторых воплощениях антиген экспрессируется в опухолевой или раковой. Примером антигена является CD19. Примером CAR является CAR против CD19, такой как CAR, содержащий scFv против CD19, представленный в SEQ ID NO: 245. В некоторых воплощениях CAR дополнительно включает спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен или область, содержащую сигнальный домен ITAM, такой как сигнальный домен CD3дзета. В некоторых воплощениях CAR дополнительно включает костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых воплощениях CAR дополнительно включает спейсер или шарнир, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации (эндодомен), содержащий сигнальный домен ITAM, например, сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях CAR дополнительно включает костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий домен может быть получен, например, из CD28, OX-40, 4-1BB/CD137 или индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS). В некоторых воплощениях изобретения CAR имеет два, три, четыре или более костимулирующих домена. CAR scFv может быть предназначен для направленного воздействия на антиген,

экспрессируемый в клетке, связанной с заболеванием или состоянием, например, опухолевый антиген, такой как, например, CD19, который представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый клетками в линии В-клеток, включая все нормальные В-клетки и В-клеточные злокачественные новообразования, включая, без ограничения указанным, NHL, CLL и не-Т-клеточные ALL. Пример терапии и конструкций с CAR + Т-клетками описан в Патентных публикациях США No. 2013/0287748, 2014/0227237, 2014/0099309 и 2014/0050708, и эти источники включены ссылкой во всей полноте. В некоторых воплощениях спейсер или шарнир присутствует между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, например, между антигенсвязывающим доменом и плазматической мембраной, когда он экспрессируется в клетке. В некоторых воплощениях спейсер или шарнир получают из подкласса IgG (такого как IgG1 и IgG4, IgD или CD8 (см., например, Qin et al. (2017) J. Hematol. Oncol., 10:68). В некоторых воплощениях спейсер или шарнир получают из IgG1.

В некоторых воплощениях спейсер и трансмембранный домен являются шарниром и трансмембранным доменом, которые получены из CD8, например, как указано в SEQ ID NO: 246, 483 или 897 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 246, 483 или 897. В некоторых воплощениях эндодомен включает сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых воплощениях сигнальный домен CD3-дзета включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 243, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 247 и сохраняет сигнальную активность для Т-клеток. В некоторых воплощениях эндодомен CAR может дополнительно содержать костимулирующий сигнальный домен или область для дальнейшей модуляции иммуномодулирующих ответов Т-клетки. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является или включает костимулирующую область или происходит из костимулирующей области CD28, ICOS, 41BB или OX40. В некоторых воплощениях костимулирующий сигнальный домен является производным от CD28 или 4-1BB и включает аминокислотную последовательность, указанную в любом из SEQ ID NO: 484-487, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 484-487 и сохраняет костимулирующую сигнальную активность Т-клеток.

В данном документе представлен полинуклеотид, кодирующий полипептид ICOSL

и кодирующий один или несколько белков, таких как рекомбинантный антигенный рецептор (например, химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR)), маркер и один или несколько саморасщепляющихся пептидов. В некоторых воплощениях конструкция, кодирующая CAR, дополнительно кодирует второй белок, такой как маркер, например, детектируемый белок, отделенный от CAR саморасщепляющейся пептидной последовательностью. В некоторых примерах нуклеиновая кислота, кодирующая вариантный полипептид ICOSL, отделена от одной или нескольких последовательностей, которые представляют собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, где белок кодирует рекомбинантный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), маркер, цитокин или хемокин. Любая из нуклеотидных последовательностей может находиться в векторе, таком как вирусный вектор. В некоторых примерах вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

В некоторых вариантах воплощения саморасщепляющаяся пептидная последовательность представляет собой саморасщепляющийся пептид F2A, T2A, E2A или P2A. Типичные последовательности саморасщепляющегося пептида T2A представлены в любой из SEQ ID NO: 250, 488, 860-862 или последовательности аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательностей с любой из SEQ ID NO: 250, 488, 860-862. В некоторых воплощениях T2A кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 249, или последовательностью, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 249. Примерная последовательность саморасщепляющегося пептида P2A представлена в SEQ ID NO: 863 или последовательности аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 863. В некоторых случаях нуклеотидная конструкция, которая кодирует более одного саморасщепляющегося пептида P2A (такого как P2A1 и P2A2), в которой каждая нуклеотидная последовательность P2A1 и P2A2 кодирует P2A, представленный в SEQ ID NO: 863, то нуклеотидные последовательности могут отличаться, чтобы избежать рекомбинации между последовательностями.

В некоторых воплощениях маркер представляет собой детектируемый белок, такой как флуоресцентный белок, например зеленый флуоресцентный белок (GFP) или синий флуоресцентный белок (BFP). Примерные последовательности маркера на основе

флуоресцентного белка приведены в SEQ ID NO: 489, 858, 859, 903 или последовательности аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 489, 858, 859, 903.

В некоторых воплощениях CAR является анти-CD19 CAR, который имеет аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 479, 490, 491, 492, 898, 899, 901 или 902, или последовательность аминокислот которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательностей с любой из SEQ ID NO: 479, 490, 491, 492, 898, 899, 901 или 902. В некоторых воплощениях CAR кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 248 или 900, или последовательностью аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательностей с любой из SEQ ID NO: 248 или 900.

В другом воплощении сконструированная Т-клетка обладает TCR, включая рекомбинантный или сконструированный TCR. В некоторых воплощениях TCR может быть нативным TCR. Специалисты в данной области техники поймут, что в основном нативные рецепторы Т-клеток млекопитающих содержат альфа- и бета-цепь (или гамма и дельта-цепь), участвующие в специфическом распознавании и связывании антигена. В некоторых воплощениях TCR представляет собой сконструированный TCR. В некоторых воплощениях TCR сконструированной Т-клетки специфически связывается с ассоциированным с опухолью или опухолеспецифическим антигеном, представленным APC.

В некоторых воплощениях иммуномодулирующие полипептиды, такие как трансмембранные иммуномодулирующик полипептиды или секретируемые иммуномодулирующие полипептиды, могут быть включены в сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки или сконструированные APC, с помощью различных стратегий, таких как те, которые используются для рекомбинантных клеток-хозяев. В данной области техники известно множество способов введения ДНК-конструкций в первичные Т-клетки. В некоторых воплощениях используют вирусную трансдукцию или плазмидную электропорацию. В типичных воплощениях нуклеотидная молекула, кодирующая иммуномодулирующий белок или экспрессирующий вектор, включают сигнальный пептид, который локализует экспрессируемые трансмембранные иммуномодулирующие белки в клеточной мембране или для секреции. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая трансмембранные

иммуномодулирующие белки по изобретению, субклонируется в вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор, который позволяет экспрессироваться в клетке-хозяине млекопитающего. Экспрессирующий вектор можно вводить в клетку-хозяин млекопитающего, и в условиях культивирования клеток-хозяев иммуномодулирующий белок экспрессируется на поверхности или секретируется.

В типичном примере первичные Т-клетки могут быть очищены ex vivo (CD4-клетки или CD8-клетки или и те, и другие) и стимулироваться протоколом активации, состоящим из различных агонистов TCR/CD28, например, с помощью гранул, покрытых анти-CD3/анти-CD28. После 2 или 3-дневного процесса активации рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий иммуномодулирующий полипептид, можно стабильно вводить в первичные Т-клетки с помощью стандартных в данной области лентивирусных или ретровирусных протоколов трансдукции или стратегии плазмидной электропорации. Клетки могут отслеживаться по экспрессии иммуномодулирующего полипептида, например, с помощью проточной цитометрии с использованием антител против эпитопной метки или антител, которые перекрестно реагируют с нативной родительской молекулой и полипептидами, включающими вариантный ICOSL. Т-клетки, которые экспрессируют иммуномодулирующий полипептид, могут быть обогащены путем сортировки с антителами против эпитопной метки или могут быть обогащены по высокой или низкой экспрессии в зависимости от применения.

При экспрессии иммуномодулирующего полипептида сконструированные Т-клетки могут быть проанализированы по соответствующей функции с помощью различных средств. Коэкспрессия сконструированных CAR или TCR может быть подтверждена для того, чтобы показать, что эта часть сконструированной Т-клетки существенно не повлияла на экспрессию иммуномодулирующего белка. После подтверждения, для оценки функции сконструированных Т-клеток можно использовать стандартные анализы цитотоксичности, пролиферации или выработки цитокинов in vitro (например, экспрессии IFN-гамма). Типичными стандартными конечными точками являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферация сконструированной Т-клетки или экспрессия белка IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях. Может быть выбрана сконструированная конструкция, которая приводит к статистически значимому увеличению лизиса опухолевой линии, увеличению пролиферации сконструированной Т-клетки или увеличению экспрессии IFN-гамма по сравнению с контрольной конструкцией. Кроме того, несконструированные клетки, такие как нативные первичные или эндогенные Т-клетки, также могут быть включены в один и тот же анализ in vitro для измерения способности иммуномодулирующей полипептидной конструкции, экспрессированной в

сконструированных клетках, таких как сконструированные Т-клетки, модулировать активность, в том числе, в некоторых случаях, модулировать активацию и генерацию эффекторной функции у нативных Т-клеток-»свидетелей». Повышенная экспрессия маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD62L, может контролироваться на эндогенных Т-клетках, а увеличенные пролиферация и/или выработка цитокинов могут указывать на искомую активность TIP, экспрессированных на сконструированных Т-клетках.

В некоторых воплощениях аналогичные анализы могут использоваться для сравнения функции сконструированных Т-клеток, содержащих CAR или TCR отдельно, с теми, которые содержат CAR или TCR и конструкцию TIP. Как правило, эти анализы in vitro проводят путем рассевания вместе в культуре различных соотношений сконструированных Т-клеток и «опухолевой» клеточной линии, содержащей когнатный CAR или TCR антиген. Стандартными конечными точками являются процент лизиса опухолевой линии, пролиферация сконструированных Т-клеток, или продуцирование IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях. Может быть выбран сконструированный иммуномодулирующий белок, который дает статистически значимое увеличение лизиса опухолевой линии, увеличение пролиферации сконструированной Т-клетки или увеличение продуцирования IFN-гамма по сравнению с одной и той же конструкцией TCR или CAR отдельно.

Сконструированные человеческие Т-клетки могут быть проанализированы у мышей с ослабленным иммунитетом, таких как линия NSG, которая утратила мышиные Т-, NK- и В-клетки. Сконструированные человеческие Т-клетки, в которых CAR или TCR связывают контрструктуру-мишень на ксенотрансплантате и коэкспрессируются с TIP с доменом IgSF с модифицированной аффинностью, могут быть адоптивно перенесены in vivo в разных количествах и соотношениях клеток по сравнению с ксенотрансплантатом. Например, приживление опухолевых линий CD19+ лейкоза, содержащих вектор люциферазы/GFP, можно контролировать с помощью биолюминесценции или ex vivo с помощью проточной цитометрии. В обычном воплощении ксенотрансплантат вводят в мышиную модель, а затем через несколько дней - сконструированные Т-клетки. Сконструированные Т-клетки, содержащие иммуномодулирующий белок, могут быть проанализированы на предмет увеличения выживаемости, клиренса опухоли или количества размноженных сконструированных Т-клеток по сравнению с сконструированными Т-клетками, содержащими только CAR или TCR. Как и в анализе in vitro, эндогенные, нативные (т.е. не-сконструированные) человеческие Т-клетки могут быть ко-адоптивно перенесены для поиск успешного распространения эпитопа в этой

популяции, что приводит к лучшей выживаемости или клиренсу опухоли.

D. ИНФЕКЦИОННЫЕ АГЕНТЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ВАРИАНТНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

Также предлагаемое представляет собой инфекционные агенты, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из вариантных полипептидов, таких как полипептиды ICOSL vIgD, в том числе секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, описанные в настоящей заявке. В некоторых воплощениях такие инфекционные агенты могут доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в данном документе вариантные иммуномодулирующие полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, в клетку-мишень у объекта, например иммунную клетку и/или антигенпрезентирующую клетку (APC) или опухолевую клетку в объекте. Также предусмотрены нуклеиновые кислоты, содержащиеся в таких инфекционных агентах, и/или нуклеиновые кислоты для получения или модификации таких инфекционных агентов, такие как векторы и/или плазмиды, и композиции, содержащие такие инфекционные агенты. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL экспрессируется в инфекционном агенте (например, вирусном или бактериальном агенте), который при введении объекту способен инфицировать клетку in vivo, такую как иммунная клетка (например, Т-клетка или антигенпрезентирующая клетка) или опухоль, для доставки или экспрессии вариантного полипептида в виде TIP или SIP в клетке.

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой микроорганизм или микроб. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой вирус или бактерию. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой вирус. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой бактерию. В некоторых воплощениях такие инфекционные агенты могут доставлять нуклеотидные последовательности, кодирующие любой из вариантных полипептидов, таких как полипептиды ICOSL vIgD, включая описанные в данном документе секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки. Таким образом, в некоторых воплощениях клетка в объекте, которая инфицирована или контактирует с инфекционными агентами, может быть сделана экспрессирующей на поверхности клетки или секретирующей вариантные иммуномодулирующие полипептиды. В некоторых воплощениях инфекционный агент может также доставлять одно или несколько других терапевтических средств или нуклеиновых кислот, кодирующих другие терапевтические средства, в клетке и/или в среде внутри объекта. В некоторых воплощениях другие терапевтические средства, которые могут быть доставлены инфекционными агентами, включают цитокины или другие иммуномодулирующие молекулы.

В некоторых воплощениях инфекционный агент, например, вирус или бактерии, включает нуклеотидные последовательности, которые кодируют любые из вариантных полипептидов, таких как полипептиды ICOSL vIgD, в том числе секретируемых или трансмембранных иммуномодулирующих белков, описанных в данном документе, и в силу контакта и/или инфекции клетки у объекта, клетка экспрессирует вариантные полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, кодируемые нуклеотидными последовательностями, содержащимися в инфекционном агенте. В некоторых воплощениях инфекционный агент может вводиться объекту. В некоторых воплощениях инфекционный агент может быть введен в клетки из объекта ex vivo.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения вариантные полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, в том числе трансмембранные иммуномодулирующие белки, экспрессируемые в клетке, инфицированной инфекционным агентом, является трансмембранным белком и является экспрессируемым на поверхности клетки. В некоторых воплощениях вариантные полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, включая секретируемые иммуномодулирующие белки, экспрессируемые клеткой, инфицированной инфекционным агентом, экспрессируются и секретируются из клетки. Трансмембранный иммуномодулирующий белок или секретируемый иммуномодулирующий белок может быть любым описанным в данном документе.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения клетки в объекте, которые нацелены на инфекционный агент включает опухолевую клетку, иммунную клетку и/или антигенпрезентирующую клетку (APC). В некоторых воплощениях инфекционный агент нацелен на клетку в микроокружении опухоли (TME). В некоторых воплощениях инфекционный агент доставляет нуклеиновые кислоты, кодирующие вариантные полипептиды, такие как полипептиды ICOSL vIgD, включая секретируемые или трансмембранные иммуномодулирующие белки, в соответствующую клетку (например, APC, такую как клетка, которая презентирует комплекс пептид/MHC на своей клеточной поверхности, такой как дендритная клетка) или ткань (например, лимфоидная ткань), которая модулирует иммунный ответи/или специфический клеточно-опосредованный иммунный ответ, например, CD4 и/или CD8 Т-клеточный ответ, где CD8 Т-клеточный ответ может включать цитотоксический Т-клеточный ответ (CTL). В некоторых воплощениях инфекционный агент нацелен на APC, такую как дендритная клетка (DC). В некоторых воплощениях нуклеотидная молекула, доставленная описанными в данном документе инфекционными агентами, включает соответствующие нуклеотидные

последовательности, необходимые для экспрессии функционально связанных последовательностей, кодирующих вариантные иммуномодулирующие полипептиды, в конкретной клетке-мишени, например регуляторные элементы, такие как промоторы.

В некоторых воплощениях, инфекционный агент, который включает нуклеотидные последовательности, кодирующие иммуномодулирующие полипептиды может также содержать нуклеотидные последовательности, которые кодируют один или несколько дополнительных генных продуктов, например, цитокин, ферменты, конвертирующие пролекарства, цитотоксины и/или детектируемые генные продукты. Например, в некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой онколитический вирус, и вирус может включать нуклеотидные последовательности, кодирующие дополнительные терапевтические генные продукты (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. Пат. США No. 7,588,767, 7,588,771, 7,662,398 и 7,754,221 и Пат. США публ. США No. 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 воплощениях дополнительный генный продукт может быть продуктом терапевтического гена, который может привести к гибели клетки-мишени (например, опухолевой клетки) или генными продуктами, которые могут усиливать или стимулировать или регулировать иммунный ответ (например, цитокином). Примеры генных продуктов также включают противоопухолевый агент, антиметастатический агент, антиангиогенный агент, иммуномодулирующую молекулу, ингибитор иммунного чекпоинта, антитело, цитокин, фактор роста, антиген, продукт цитотоксического гена, продукт апоптотического гена, продукт антиапоптотического гена, ген деградации клеточной матрицы, гены для регенерации тканей и перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентность и другие гены, описанные в данном документе или известные специалисту в данной области. В некоторых воплощениях дополнительный генный продукт представляет собой гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

1. Вирусы

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой вирус. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой онколитический вирус или вирус, который нацелен на конкретные клетки, например иммунные клетки. В некоторых воплощениях инфекционный агент нацелен на опухолевую клетку и/или раковую клетку у объекта. В некоторых воплощениях инфекционный агент нацелен на иммунную клетку или антигенпрезентирующую клетку (APC).

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой онколитический вирус. Онколитические вирусы - это вирусы, которые накапливаются в опухолевых клетках и реплицируются в опухолевых клетках. В силу репликации в опухолевых клетках и необязательной доставки нуклеиновых кислот, кодирующих вариантные полипептиды ICOSL или иммуномодулирующие полипептиды, описанные в данном документе, опухолевые клетки лизируются, и опухоль сжимается и может быть устранена. Онколитические вирусы также могут иметь широкий диапазон хозяев и типов клеток. Например, онколитические вирусы могут накапливаться в иммунопривилегированных клетках или иммунопривилегированных тканях, включая опухоли и/или метастазы, а также включая раневые ткани и клетки, что позволяет доставку и экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих вариантные иммуномодулирующие полипептиды, описанные в данном документе, в широком диапазоне типов клеток. Онколитические вирусы могут также реплицироваться специфическим для опухолевых клеток образом, что приводит к лизису опухолевых клеток и эффективной регрессии опухоли.

Примерные онколитические вирусы включают аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, парвовирус, вирус кори, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус Коксаки и вирус осповакцины. В некоторых воплощениях онколитические вирусы могут специфически колонизировать солидные опухоли, не заражая другие органы, и могут быть использованы в качестве инфекционного агента для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих вариантные иммуномодулирующие полипептиды, описанные в данном документе, в такие солидные опухоли.

Онколитической вирусы для применения в доставке нуклеиновых кислот, кодирующие вариантные полипептиды ICOSL или иммуномодулирующие полипептиды, описанные в данном документе, могут быть любыми из тех, которые известны специалисту в данной области и включают, например, вирус везикулярного стоматита, см., например, Пат. США No. 7,731,974, 7,153,510, 6,653,103 и Пат. США публ. No. 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 20050260601, 20050220818 и пат. ЕП No. 1385466, 1606411 и 1520175; вирус простого герпеса, см., например, Пат. США No. 7 897 146, 7 731 952, 7 550 296, 7 537 924, 6 723 316, 6 428 968 и Пат. США публ. Nos., 2014/0154216, 2011/0177032, 2011/0158948, 2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894, 2004/0009604, 2004/00066094 Международная пат. публ. № WO 2007/052029, WO 1999/038955;

ретровирусы, см., например, Пат. США No. 6 689 871, 6 635 472, 5 851 529, 5 716 826, 5 716 613 и Пат. США публ. № 20110212530; вирусы осповакцины, см., например, 2016/0339066, и аденоассоциированные вирусы, см., например, Пат. США No. 8 007 780, 7 968 340, 7 943 374, 7 906 111, 7 927 585, 7 811 814, 7 662 627, 7 241 447, 7 238 526, 7 172 893, 7 033 826, 7 001 765, 6 897 045 и 6 632 670.

Онколитические вирусы также включают вирусы, которые были генетически изменены для ослабления их вирулентности, для улучшения их профиля безопасности, повышения их специфичности к опухоли, а также были оснащены дополнительными генами, например цитотоксинами, цитокинами, ферментами, конвертирующими пролекарства, 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. Пат. США No. 7,588,767, 7,588,771, 7,662,398 и 7,754,221 и Пат. США публ. США No. 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 воплощениях онколитические вирусы могут быть теми, которые были модифицированы так, чтобы они выборочно реплицировались в раковых клетках и, таким образом, являлись онколитическими. Например, онколитический вирус представляет собой аденовирус, который был спроектирован так, чтобы иметь модифицированный тропизм для лечения опухолей, а также в качестве векторов для генной терапии. Примерами таких вирусов 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®.

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой модифицированный вирус простого герпеса. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой модифицированную версию Talimogene laherparepvec (также известную как T-Vec, Imlygic или OncoVex GM-CSF), которая модифицирована, чтобы включать нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, описанных в данном документе. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой модифицированный вирус простого герпеса, который описан, например, в WO 2007/052029, WO 1999/038955, US 2004/0063094, US 2014/0154216 или их вариантах.

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой вирус, который нацелен на конкретный тип клеток у объекта, которому вводят вирус, например, вирус, который нацелен на иммунные клетки или антигенпрезентирующие клетки (APC). Дендритные клетки (DC) являются важными APC для инициирования и контроля

иммунных реакций. DC могут захватывать и обрабатывать антигены, мигрировать с периферии в лимфоидный орган и представлять антигены в покоящиеся Т-клетки в манере, ограниченной по основному комплексу гистосовместимости (MHC). В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой вирус, который специфически может нацеливать DC для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующие полипептиды для экспрессии в DC. В некоторых воплощениях вирус представляет собой лентивирус или его вариант или производное, такой как лентивирусный вектор, дефицитный по интеграции. В некоторых воплощениях вирус представляет собой лентивирус, который псевдотипирован для эффективного связывания и продуктивного заражения клеток, экспрессирующих клеточный маркер, специфичный для дендритных клеток не-интегрин, захыватывающий молекулу межклеточной адгезии-3 (DC-SIGN), таких как DC. В некоторых воплощениях вирус представляет собой лентивирус, псевдотипированный гликопротеином E2 вируса Синдбис или его модифицированной формой, такой как описанная в публикации WO 2013/149167. В некоторых воплощениях вирус допускает доставку и экспрессию представляющей интерес последовательности (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей любой из вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, описанных в данном документе) в DC. В некоторых воплощениях вирус включает последовательности, которые описаны в WO 2008/011636, US 2011/0064763, Tareen et al. (2014) Mol. Ther., 22:575-587, или их варианты. Образцом обладающей тропизмом к дедритным клеткам векторной платформы является ZVex™.

1. Бактерии

В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой бактерию. Например, в некоторых воплощениях бактерии могут доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из вариантных иммуномодулирующих полипептидов, описанных в данном документе, например, вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид, в клетку-мишень у объекта, такую как опухолевая клетка, иммунная клетка, антигенпрезентирующая клетка и/или фагоцитарная клетка. В некоторых воплощениях бактерия может быть предпочтительно нацелена на конкретную среду внутри объекта, такую как микроокружение опухоли (TME), для экспрессии и/или секреции вариантных иммуномодулирующих полипептидов и/или для поражения определенных клеток в среде для экспрессии вариантных иммуномодулирующих полипептидов.

В некоторых воплощениях эта бактерия доставляет нуклеиновые кислоты в клетки с помощью бактериального-опосредованного переноса плазмидной ДНК в клетки млекопитающих (также называемый как «бактофекцией»). Например, в некоторых

воплощениях доставка генетического материала достигается путем ввода всей бактерии в клетки-мишени. В некоторых воплощениях спонтанный или индуцированный бактериальный лизис может привести к высвобождению плазмиды для последующей экспрессии в эукариотических клетках. В некоторых воплощениях бактерия может доставлять нуклеиновые кислоты в нефагоцитирующие клетки млекопитающих (например, опухолевые клетки) и/или в фагоцитирующие клетки, например, определенные иммунные клетки и/или APC. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, доставленные бактерией, могут быть перенесены в ядро клетки объекта для экспрессии. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты также включают соответствующие нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии функционально связанных последовательностей, кодирующих вариантные иммуномодулирующие полипептиды в конкретной клетке-хозяине, например регуляторные элементы, такие как промоторы или энхансеры. В некоторых воплощениях инфекционный агент, который представляет собой бактерию, может доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуномодулирующие белки, в форме РНК, такой как предварительно обработанная трансляционно-компетентная РНК, доставляемая в цитоплазму клетки-мишени для трансляции машинерией клетки-мишени.

В некоторых воплощениях эта бактерия способна к репликации и лизису клеток-мишеней, например, опухолевых клеток. В некоторых воплощениях бактерия может содержать и/или высвобождать нуклеотидные последовательности и/или продукты гена в цитоплазму клеток-мишеней, тем самым убивая клетку-мишень, например опухолевую клетку. В некоторых воплощениях инфекционный агент представляет собой бактерию, которая может специфически реплицироваться в конкретной среде у объекта, например, в микроокружении опухоли (TME). Например, в некоторых воплощениях бактерии могут реплицироваться специфически в анаэробных или гипоксических микросредах. В некоторых воплощениях условия или факторы, присутствующие в конкретных средах, например, аспартат, серин, цитрат, рибоза или галактоза, продуцируемые клетками в TME, могут действовать как хемоаттрактанты для привлечения бактерии к среде. В некоторых воплощениях бактерия может экспрессировать и/или секретировать иммуномодулирующие белки, описанные в данном документе в окружающей среде, например TME.

В некоторых воплощениях инфекционный агент является бактерией, которая принадлежит к Listeria sp., a Bifidobacterium sp., an Escherichia sp., a Clostridium sp., a Salmonella sp., a Shigella sp., a Vibrio sp. или Yersinia sp. В некоторых воплощениях бактерии выбраны из одной или нескольких из числа 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 воплощениях бактерия представляет собой сконструированную бактерию. В некоторых воплощениях бактерия представляет собой сконструированную бактерию, такую 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. Бактерия может быть модифицирована для доставки нуклеотидных последовательностей, кодирующих любой из вариантных иммуномодулирующих полипептидов, конъюгатов и/или гибридов, предлагаемых в данном документе, и/или для экспрессии таких вариантных иммуномодулирующих полипептидов в объекте.

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

Предлагаемое в данном документе представляет собой выделенные или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, совместно именуемые как «нуклеиновые кислоты», которые кодируют любой из различных предусмотренных воплощениями вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, предлагаемых в данном документе. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, представленные в данном документе, включая все описанные ниже, пригодны для рекомбинантного продуцирования (например, экспрессии) вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, предлагаемых в данном документе. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, представленные в данном документе, включая все описанные ниже, полезны для экспрессии вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, предлагаемых в данном документе в клетках, например, в сконструированных клетках, например, иммунных клетках или клетках инфекционного агента. Нуклеиновые кислоты, представленные в данном документе, могут быть в форме РНК или в форме ДНК и включать мРНК, кРНК, рекомбинантную или синтетическую РНК и ДНК и кДНК. Нуклеиновые кислоты по изобретению представляют собой, как правило, молекулы ДНК и обычно двухцепочечные молекулы ДНК. Тем не менее также предлагаются одноцепочечная ДНК, одноцепочечная РНК, двухцепочечная РНК и гибридные ДНК/РНК нуклеиновые кислоты или их комбинации, включающие любую из нуклеотидных последовательностей по изобретению.

Кроме того, предлагаемое в данном документе представляют собой рекомбинантные экспрессирующие векторы и рекомбинантные клетки-хозяева, используемые при получении вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, приведенных в данном документе.

Предлагаемое в данном документе также представляют собой сконструированные клетки, такие как сконструированные иммунные клетки, содержащие любую из предлагаемых нуклеотидных молекул или любой из вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, например, любой из трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов или секретируемых иммуномодулирующих полипептидов.

Кроме того, предлагаемое в данном документе, представляет собой инфекционные агенты, такие как бактериальные или вирусные клетки, содержащие любую из предусмотренных нуклеотидных молекул или любой из вариантных полипептидов ICOSL или иммуномодулирующих полипептидов, таких как любой из трансмембранных иммуномодулирующих полипептидов или секретируемых иммуномодулирующих полипептидов.

В любом из указанных выше предлагаемых воплощениях, нуклеиновые кислоты, кодирующие вариантные полипептиды или иммуномодулирующие полипептиды, приведенные в данном документе, могут быть введены в клетки с использованием методов рекомбинантных ДНК и клонирования. Для этого получают рекомбинантную молекулу ДНК, кодирующую иммуномодулирующий полипептид. Способы получения таких молекул ДНК хорошо известны в данной области. Например, последовательности, кодирующие пептиды, могут быть вырезаны из ДНК с использованием подходящих рестрикционных ферментов. В ином случае, молекулу ДНК можно синтезировать с использованием методов химического синтеза, таких как фосфорамидитный способ. Кроме того, можно использовать комбинацию этих методов. В некоторых случаях рекомбинантная или синтетическая нуклеиновая кислота может быть получена посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых воплощениях может быть сгенерирована вставка ДНК, кодирующая один или несколько вариантных полипептидов ICOSL, содержащих, по меньшей мере, один домен с модифицированной аффинностью IgSF, и в некоторых воплощениях сигнальный пептид, трансмембранный домен и/или эндодомен в соответствии с предоставленным описанием. Эта ДНК-вставка может быть клонирована в соответствующий вектор трансдукции/трансфекции Т-клеток, как известно специалистам в данной области. Также представлены векторы, содержащие нуклеотидные молекулы.

В некоторых воплощениях экспрессирующие векторы способны экспрессировать трансмембранные иммуномодулирующие белки в соответствующей клетке в условиях, подходящих для экспрессии белка. В некоторых аспектах нуклеотидная молекула или экспрессирующий вектор включает молекулу ДНК, которая кодирует иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями контроля экспрессии. Способы влияния на эту функциональную связь, как до, так и после молекулы ДНК, вставленной в вектор, хорошо известны. Контрольные последовательности экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты рибосомного связывания, сигналы запуска, сигналы остановки, кэп-сигналы, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции.

В некоторых воплощениях экспрессия иммуномодулирующего белка контролируется промотором или энхансером для того, чтобы контролировать или регулировать экспрессию. Промотор функционально связан с частью молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок. В некоторых воплощениях промотор представляет собой конститутивно активный промотор (такой как тканеспецифический конститутивно активный промотор или другой конститутивный промотор). В некоторых воплощениях промотор представляет собой индуцибельный промотор, который может реагировать на индуцирующий агент (такой как сигнал активации Т-клеток).

В некоторых воплощениях конститутивный промотор функционально связан с нуклеотидной молекулой, кодирующей вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок. Типичные конститутивные промоторы включают промотор вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С (UbC) и промотор EF-1 альфа (EF1a). В некоторых воплощениях конститутивный промотор специфичен к тканям. Например, в некоторых воплощениях промотор допускает конститутивную экспрессию иммуномодулирующего белка в определенных тканях, таких как иммунные клетки, лимфоциты или Т-клетки. Примерные тканеспецифические промоторы описанные в патенте США № 5998205, включают, например, фетопротеин, DF3, тирозиназу, CEA, белок поверхностно-активного вещества и промоторы ErbB2.

В некоторых воплощениях, индуцируемый промотор функционально связан с нуклеотидной молекулой, кодирующей вариантный полипептид или иммуномодулирующий белок, таким образом, что экспрессия нуклеиновой кислоты является управляемой путем контроля наличия или отсутствия соответствующего

индуктора транскрипции. Например, промотор может быть регулируемой промоторной системой и системой экспрессии транскрипционных факторов, такой как опубликованные системы, регулируемые тетрациклином, или другие регулируемые системы (см., например, опубликованную Международную заявку PCT No. № WO 01/30843), чтобы обеспечить регулируемую экспрессию кодированного полипептида. Типичной регулируемой промоторной системой является система Tet-On (и Tet-Off), доступная, например, у Clontech (Пало-Альто, Калифорния). Эта промоторная система позволяет регулировать экспрессию трансгена, контролируемого производными тетрациклина или тетрациклина, такими как доксициклин. Известны другие регулируемые промоторные системы (см., например, опубликованную заявку США № 2002-0168714, озаглавленную «Регулирование экспрессии генов с использованием одноцепочечных, мономерных, зависимых от лиганда полипептидных переключателей», которая описывает переключатели генов, которые содержат домены, связывающие лиганды, и домены, регулирующие транскрипцию, такие как гормональные рецепторы).

В некоторых воплощениях промотор является респонсивным для элемента, который является респонсивным по отношению к сигналам активации Т-клеток. Исключительно в качестве примера в некоторых воплощениях сконструированная Т-клетка включает экспрессирующий вектор, кодирующий иммуномодулирующий белок, и промотор, функционально связанный с контрольной экспрессией иммуномодулирующего белка. Сконструированную Т- клетку можно активировать, например, посредством передачи через Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR) и тем самым инициируя экспрессию и секрецию иммуномодулирующего белка через респонсивный промотор.

В некоторых воплощениях индуцируемый промотор функционально связан с нуклеотидной молекулой, кодирующей иммуномодулирующий белок таким образом, чтобы иммуномодулирующий белок экспрессировался в ответ на ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор, энхансер легких цепей каппа активированных В-клеток (NF-κB). Например, в некоторых воплощениях индуцируемый промотор включает сайт связывания для NFAT или NF-κB. Например, в некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор NFAT или NF-κB или его функциональную вариацию. Таким образом, в некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты позволяют контролировать экспрессию иммуномодулирующего белка, одновременно уменьшая или устраняя токсичность иммуномодулирующего белка. В частности, сконструированные иммунные клетки, содержащие нуклеиновые кислоты по изобретению, экспрессируют и секретируют иммуномодулирующий белок только тогда,

когда клетка (например, Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR), экспрессируемый клеткой) специфически стимулируется антигеном и/или клеткой (например, сигнальный путь кальция в клетке), неспецифически стимулируется, например, форболмиристатацетатом (PMA)/иономицином. Соответственно, экспрессия и, в некоторых случаях, секреция иммуномодулирующего белка может контролироваться только тогда, когда и где это необходимо (например, в присутствии возбудителя инфекционных заболеваний, в раковой опухоли или в опухолевом участке), что позволяет уменьшить или избежать нежелательных иммуномодулирующих белковых взаимодействий.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая, описанный в данном документе иммуномодулирующий белок, включает подходящую нуклеотидную последовательность, которая кодирует промотор NFAT, промотор NF-κB, или его функциональный вариант. Используемый в данном документе «промотор NFAT» означает один или несколько чувствительных к NFAT элементов, связанных с минимальным промотором. «Промотор NF-κB» относится к одному или нескольким чувствительным к NF-κB элементам, связанным с минимальным промотором. В некоторых воплощениях минимальный промотор гена представляет собой минимальный промотор IL-2 человека или промотор CMV. Респонсивные элементы NFAT могут включать, например, респонсивные элементы NFAT1, NFAT2, NFAT3 и/или NFAT4. Промотор NFAT, промотор NF-kB или его функциональный вариант, может включать 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 вплоть до двенадцати мотивов связывания. ----

Полученный рекомбинантный экспрессирующий вектор, имеющий молекулу ДНК, используются для трансформации соответствующего хозяина. Эта трансформация может быть выполнена с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, представленная в данном документе, дополнительно включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует секреторный или сигнальный пептид, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей иммуномодулирующий полипептид, так что результирующий растворимый иммуномодулирующий полипептид извлекают из культуральной среды, клетки-хозяина или периплазмы клетки-хозяина. В других воплощениях соответствующие сигналы контроля экспрессии выбирают так, чтобы обеспечить экспрессию иммуномодулирующего полипептида на мембране. Кроме того, коммерчески доступные

наборы, а также подрядные производственные компании также могут быть использованы для создания сконструированных клеток или рекомбинантных клеток-хозяев, предлагаемых в данном документе.

В некоторых воплощениях полученный экспрессирующий вектор, несущий молекулу ДНК, используется для трансформации, такой как трансдукция, соответствующей клетки. Введение может быть выполнено с использованием способов, хорошо известных в данной области. Примерные способы включают те, которые переносят нуклеиновые кислоты, кодирующие рецепторы, в том числе с помощью вирусов, например, ретровирусов или лентивирусов, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых воплощениях, экспрессирующий вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота переносится в клетки с помощью лентивирусных или ретровирусных методов трансдукции.

Любой из большого числа общедоступных и хорошо известных клеток-хозяев млекопитающих, в том числе Т-клеток или APC млекопитающих, могут быть использованы при получении полипептидов или сконструированных клеток. Выбор клетки зависит от ряда факторов, признанных в данной области. К ним относятся, например, совместимость с выбранным экспрессирующим вектором, токсичность пептидов, кодируемых молекулой ДНК, скорость трансформации, легкость извлечения пептидов, характеристики экспрессии, биологическая безопасность и затраты. Баланс этих факторов должен быть принят с пониманием того, что не все клетки могут быть одинаково эффективными для экспрессии конкретной последовательности ДНК.

В некоторых воплощениях, клетки-хозяева могут представлять собой различные эукариотические клетки, например, клетки дрожжей, или с клетки млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки HEK293. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой суспензионную клетку, и полипептид сконструирован или продуцируется в культивируемой суспензии, такой как в культивируемая суспензия клеток CHO, например, клеток CHO-S. В некоторых примерах клеточная линия представляет собой клеточную линию CHO, которая дефицитна по DHFR (DHFR-), такую как DG44 и DUXB11. В некоторых воплощениях в клетке наблюдается дефицит глютаминсинтазы (GS), например, в клетках CHO-S, в клетках CHOK1 SV и в клетках CHOZN((R)) GS-/-. В некоторых воплощениях клетки CHO, такие как клетки суспензии CHO, могут быть клетками CHO-S-2H2, клетками CHO-S-clone 14 или клетками ExpiCHO-S.

В некоторых воплощениях экспрессия предлагаемых полипептидов ICOSL из клеток CHO приводит к более гомогенной композиции продуцируемых белков. В

некоторых воплощениях предлагаемые полипептиды ICOSL приводят к более гомогенному продукту, когда белки экспрессируются из клеток CHO по сравнению с полипептидами ICOSL, содержащими полную референсную последовательность ECD и/или содержащими сайт расщепления протеазой (например, LQQN/LT). В некоторых воплощениях, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% композиции продуцируемых белков, содержат вариантный полипептид ICOSL, полученный в данной работе, который имеет ту же самую длину в аминокислотах или тот же размер. Методы оценки однородности размера включают высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), эксклюзионную хроматографию по размеру, SDS-PAGE или секвенирование.

В некоторых воплощениях клетки-хозяева также могут быть прокариотическими клетками, такими как E.coli. Трансформированный рекомбинантный хозяин культивируется в условиях экспрессии полипептидов и затем очищается с получением растворимого белка. Рекомбинантные клетки-хозяева можно культивировать в обычных условиях ферментации, так чтобы экспрессировались искомые полипептиды. Такие условия ферментации хорошо известны в данной области. Наконец, представленные в данном документе полипептиды могут быть выделены и очищены из культур рекомбинантных клеток любым из ряда способов, хорошо известных в данной области, включая осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионную или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, аффинную хроматографию. Стадии повторного сворачивания белка можно использовать по желанию при завершении конфигурации зрелого белка. Наконец, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) может быть использована на заключительных стадиях очистки.

В некоторых воплощениях клетка является иммунной клеткой, такой, как любая из описанных выше в связи с получением сконструированных клеток. В некоторых воплощениях такие сконструированные клетки являются первичными клетками. В некоторых воплощениях сконструированные клетки являются аутологичными для объекта. В некотором воплощении сконструированные клетки являются аллогенными для объекта. В некоторых воплощениях сконструированные клетки получают из объекта, например, лейкаферезом, и трансформируют ex vivo для экспрессии иммуномодулирующего полипептида, например трансмембранного иммуномодулирующего полипептида или секретируемого иммуномодулирующего полипептида.

Кроме того, предлагаемое представляет собой нуклеиновые кислоты, кодирующие

любой из вариантных иммуномодулирующих полипептидов, содержащихся в инфекционных агентах, описанных в данном документе. В некоторых воплощениях инфекционные агенты доставляют нуклеиновые кислоты в клетку объекта и/или делают возможной экспрессию кодированных вариантных полипептидов в клетке. Также предлагаются нуклеиновые кислоты, которые используются для получения, производства или модификации таких инфекционных агентов. Например, в некоторых воплощениях представлены векторы и/или плазмиды, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие вариантные иммуномодулирующие полипептиды, для образования инфекционных агентов, доставку в клетки у объекта и/или экспрессию вариантных иммуномодулирующих полипептидов в клетках объекта.

В некоторых воплощениях предлагаемые нуклеиновые кислоты представляют собой рекомбинантные вирусные или бактериальные векторы, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие вариантные иммуномодулирующие полипептиды. В некоторых воплощениях рекомбинантные векторы могут быть использованы для получения инфекционного агента, который включает нуклеотидные последовательности, кодирующие вариантные иммуномодулирующие полипептиды и/или доставляемые в клетку-мишень у объекта для экспрессии клеткой-мишенью. В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор представляет собой экспрессирующий вектор. В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор включает соответствующие последовательности, необходимые для генерации и/или продуцирования инфекционного агента и экспрессии в клетке-мишени.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор представляет собой плазмиду или космиду. Плазмиды и космиды, кодирующие вариабельные иммуномодулирующие полипептиды, описанные в данном документе, легко конструируют с использованием стандартных методов, хорошо известных в данной области. Для получения инфекционного агента вектор или геном могут быть сконструированы в форме плазмиды, которая затем может быть трансфицирована в упаковочную или продуцирующую клеточную линию бактерию-хозяина. Рекомбинантные векторы могут быть получены с использованием любого из рекомбинантных методов, известных в данной области. В некоторых воплощениях векторы могут включать прокариотическую точку начала репликации и/или ген, чья экспрессия придает детектируемый или селектируемый маркер, такой как лекарственное средство для размножения и/или отбора в прокариотических системах.

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор. Иллюстративные рекомбинантные вирусные векторы включают геном

лентивирусного вектора, геном поксвирусного вектора, геномом вектора вируса осповаакцины, геном аденовирусного вектора, геном вектора на основе аденоассоциированного вируса, геном герпесвирусного вектора и геном альфа-вирусного вектора. Вирусные векторы могут быть живыми, ослабленными, вектором с зависимой от условий репликацией или репликативно-дефицитным вектором, непатогенным (дефектным), репликативно-компетентным вектором и/или модифицированным для экспрессии гетерологичного гена, например, вариантных иммуномодулирующих полипептидов, предлагаемых в данном документе. Векторы для получения вирусов также могут быть модифицированы для изменения ослабления вируса, которое включает любой способ увеличения или уменьшения транскрипционной или трансляционной нагрузки.

Примерные вирусные векторы, которые могут быть использованы, включают модифицированные вирусные векторы вируса осповакцины (см., например, Guerra et al., 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); Пат. США № 5 698 530, 6 998 252, 5 443 964, 7 247 615 и 7 368 116); аденовирусный вектор или векторы на основе аденовирус-ассоциированного вируса (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); Пат. США № 6 143 290; 6 596 535; 6 855 317; 6 936 257; 7 125 717; 7 378 087; 7 550 296); ретровирусные векторы, включая те, которые основаны на вирусе лейкоза мышей (MuLV), вирусе лейкоза гиббонов (GaLV), экотропных ретровирусах, вирусе иммунодефицита обезьян (SIV), вирусе иммунодефицита человека (HIV) и комбинациях (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. Cell Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2: 215 (1991)); лентивирусные векторы, включая те, которые основаны на вирусе иммунодефицита человека (HIV-1), вирусе иммунодефицита кошек (FIV), вирусе инфекционной анемии лошадей, вирусе иммунодефицита обезьян (SIV) и вирусе Маеди/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 and 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 могут быть использованы для

получения любого из описанных выше вирусов. В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор может включать регуляторные последовательности, такие как промоторные или энхансерные последовательности, которые могут регулировать экспрессию вирусного генома, например, в случае РНК-вирусов, в упаковочной клеточной линии (см., например, пат. США № 5 385 839 и 5 168 062).

В некоторых воплощениях рекомбинантный вектор представляет собой экспрессирующий вектор, например, экспрессирующий вектор, который позволяет экспрессию кодируемого генного продукта при доставке в клетку-мишень, например, клетку в объекте, например, опухолевую клетку, иммунную клетку и/или APC. В некоторых воплощениях рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащиеся в инфекционном агенте, способны экспрессировать иммуномодулирующие белки в клетке-мишени у объекта в условиях, подходящих для экспрессии белка.

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты или экспрессирующий вектор включают нуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуномодулирующий белок, функционально связанный с соответствующими последовательностями, контролирующими экспрессию. Способы воздействия на эту функциональную связь, либо до, либо после нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуномодулирующий белок, вставленной в вектор, хорошо известны. Контрольные последовательности экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты рибосомного связывания, сигналы запуска, сигналы остановки, кэп-сигналы, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции. Промотор может быть функционально связан с частью нуклеотидные последовательности, кодирующей иммуномодулирующий белок. В некоторых воплощениях промотор представляет собой конститутивно активный промотор в клетке-мишени (такой как тканеспецифический конститутивно активный промотор или другой конститутивный промотор). Например, рекомбинантный экспрессирующий вектор может также включать регуляторные элементы транскрипции, специфичные для лимфоидной ткани (TRE), такой как TRE, специфичные для В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов или дендритных клеток. TRE, специфические для лимфоидной ткани, известны в данной 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 воплощениях промотор представляет собой индуцибельный промотор, который может реагировать на индуцирующий агент (такой как сигнал активации Т-клеток). В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, доставленные в клетку-мишень объекта, например, опухолевую клетку, иммунную клетку и/или APC, могут быть функционально связаны с

любым из регуляторных элементов, описанных выше.

В некоторых воплощениях вектор представляет собой бактериальный вектор, например, бактериальную плазмиду или космиду. В некоторых воплощениях бактериальный вектор доставляется в клетку-мишень, например опухолевую клетку, иммунные клетки и/или APC, посредством опосредованной бактериями передачи плазмидной ДНК в клетки млекопитающих (также называемой «бактофекцией»). В некоторых воплощениях доставленный бактериальный вектор также включает 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 воплощениях бактериальный вектор включает соответствующие последовательности для контроля экспрессии для экспрессии и/или секреции кодированных вариантных полипептидов в инфекционном агенте, например бактерии.

В некоторых воплощениях полипептиды, представленные в данном документе, также могут быть получены синтетическими способами. Твердофазный синтез является предпочтительным методом получения индивидуальных пептидов, поскольку он является наиболее экономичным способом получения небольших пептидов. Например, хорошо известные методы твердофазного синтеза включают использование защитных групп, линкеров и твердофазных носителей, а также специфические условия реакции защиты и снятия защиты, условия расщепления линкера, использование поглотителей и другие аспекты твердофазного пептидного синтеза. Затем пептиды могут быть собраны в полипептиды, как указано в данном документе.

V. СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ИММУННОЙ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ВАРИАНТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ ICOSL И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

В некоторых воплощениях вариантные полипептиды ICOSL, представленные в данном документе (например, полноразмерные и/или специфические связывающие фрагменты или конъюгаты, стековые конструкции или их гибриды), демонстрируют иммуномодулирующую активность – модулируют активацию Т-клеток. В некоторых воплощениях полипептиды ICOSL модулируют экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток относительно контрольного референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа. В некоторых случаях модуляция экспрессии IFN-гамма может увеличивать или уменьшать экспрессию IFN-гамма по сравнению с контролем. Анализы для определения специфического связывания и экспрессии IFN-гамма хорошо известны в данной области и включают реакции MLR

(реакции смешанных лимфоцитов), в которых измеряются уровни интерферона-гамма-цитокинов в культуральных надосадочных жидкостях (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 с помощью анти-CD3 (Li and Kurlander, J Transl Med. 2010: 8: 104).

В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL может в некоторых воплощениях увеличить или, в альтернативных воплощениях, снизить экспрессию IFN-гамма (интерферона-гамма) в первичном Т-клеточном анализе относительно контрольного ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях предлагаемых полипептидов, содержащих последовательность растворимого ICOSL, полипептид может увеличивать экспрессию IFN-гамма, а в альтернативных вариантах уменьшать экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток относительно контрольного ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях предлагаемых полипептидов, включающих последовательности множества вариантных ICOSL, полипептид может увеличивать экспрессию IFN-гамма и в альтернативных вариантах уменьшать экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток по сравнению с контрольным ICOSL дикого типа.

Специалистам будет понятно, что формат анализа первичных Т-клеток, используемый для определения увеличения экспрессии IFN-гамма, может отличаться от используемого для анализа снижения экспрессии IFN-гамма. При анализе способности вариантного ICOSL уменьшать экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток может быть использован анализ реакции смешанных лимфоцитов (MLR), как описано в Примере 6. В некоторых случаях растворимую форму варианта ICOSL можно использовать для определения способности варианта ICOSL оказывать антагонистическое воздействие и тем самым уменьшать экспрессию IFN-гамма в MLR, как описано в Примере 6.

В качестве альтернативы, при тестировании способности вариантного ICOSL повышать экспрессию IFN-гамма в анализе первичных Т-клеток, может быть использован анализ коиммобилизации, описанный в Примере 6. В анализе коиммобилизации сигнал TCR, представленный в некоторых воплощениях анти-CD3 антителом, используется в сочетании с совместно иммобилизованным вариантным ICOSL для определения способности увеличивать экспрессию IFN-гамма по сравнению с контрольным ICOSL. В некоторых случаях растворимая форма вариантного ICOSL, которая мультимеризуется до степени, обеспечивающей многовалентное связывание, может быть использована для определения способности вариантного ICOSL оказывать агонистическое воздействие и, таким образом, увеличивать экспрессию IFN-гамма в MLR, как описано в Примере 6.

В некоторых воплощениях при анализе способности вариантного ICOSL модулировать увеличение или уменьшение экспрессии IFN-гамма можно использовать Т-клеточный репортерный анализ. В некоторых воплощениях Т-клетка представляет собой Т-клеточную линию Jurkat или происходит от Т-клеточных линий Jurkat. В репортерных анализах линию репортерных клеток (например, репортерную клетку Jurkat) также получают для сверхэкспрессии ингибиторного рецептора, который является когнатным партнером связывания вариантного полипептида домена IgSF. В некоторых воплощениях репортерные Т-клетки также содержат репортерную конструкцию, содержащую индуцибельный промотор, чувствительный к активации Т-клеток, функционально связанный с репортером. В некоторых воплощениях репортер представляет собой флуоресцентный или люминесцентный репортер. В некоторых воплощениях репортером является люцифераза. В некоторых воплощениях промотор реагирует на передачу сигналов CD3. В некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор NFAT. В некоторых воплощениях промотор реагирует на костимулирующую передачу сигналов, например, по сигнальному пути CD28. В некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор IL-2.

В некоторых аспектах репортерного анализа репортерная клеточная линия стимулируется, например, путем совместной инкубации с антигенпрезентирующими клетками (APC), экспрессирующими лиганд дикого типа ингибирующего рецептора, например, ICOSL. В некоторых воплощениях APC являются искусственными APC. Искусственные APC хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых воплощениях искусственные APC получают из одной или нескольких клеточных линий млекопитающих, таких как клетки K562, CHO или 293.

В некоторых воплощениях репортерные клетки Jurkat совместно инкубируют с искусственными APC, сверхэкспрессирующими ингибирующий лиганд, в присутствии молекулы вариантного домена IgSF или иммуномодулирующего белка, например, вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка. В некоторых воплощениях мониторинг репортерной экспрессии осуществляют, например, путем определения люминесценции или флуоресценции клеток. В некоторых воплощениях нормальные взаимодействия между ингибирующим рецептором и лигандом приводят к подавлению или уменьшению сигнала репортера, например по сравнению с контролем, например, репортерной экспрессии при совместной инкубации контрольных Т-клеток и APC, в которых отсутствует ингибирующее взаимодействие рецептора и лиганда, например, в случае APC, которые не сверхэкспрессируют ICOSL. В некоторых воплощениях вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий белок,

предлагаемый в настоящем документе, противодействует взаимодействию, например когда он представлен в растворимой форме в качестве вариантного ICOSL-Fc или когда экспрессируется из APC в виде секретируемого иммуномодулирующего белка, что приводит к увеличению сигнала репортера по сравнению с отсутствием вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка. В некоторых случаях определенные форматы вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка, представленные в настоящем документе, могут обеспечивать активность агониста, тем самым уменьшая репортерную экспрессию по сравнению с отсутствием вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка.

Применение надлежащих контролей известно специалистам в данной области, однако, в вышеупомянутых воплощениях контроль, как правило, включает применение референсного ICOSL, такого как, например, изоформы дикого типа нативного ICOSL из того же вида млекопитающих, что и вид, из которого был получен или разработан вариантный ICOSL. Независимо от того, увеличена или уменьшена аффинность связывания с одним или обоими из числа ICOS и CD28, вариантный ICOSL в некоторых воплощениях увеличит экспрессию IFN-гамма и в альтернативных вариантах уменьшит экспрессию IFN-гамма в первичном анализе Т-клеток по сравнению с контрольным ICOSL дикого типа.

В некоторых воплощениях вариантный ICOSL увеличивает экспрессию IFN-гамма (т.е. экспрессию белка) относительно контрольного референсного (например, немодифицированного) ICOSL или ICOSL дикого типа по меньшей мере: на 5%, 10%, 20%, 30%, 40 %, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или выше. В других воплощениях вариантный ICOSL уменьшает экспрессию IFN-гамма (т.е. экспрессию белка) относительно контрольного ICOSL дикого типа или немодифицированного ICOSL, по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90% или выше. В некоторых воплощениях контрольный ICOSL дикого типа представляет собой мышиный ICOSL, такой как обычно используется для вариантного ICOSL, измененного по последовательности из последовательности мышиной последовательности ICOSL дикого типа. В некоторых воплощениях контрольный ICOSL дикого типа представляет собой ICOSL человека, такой как обычно используется для вариантного ICOSL, измененного в последовательности относительно последовательности ICOSL человека дикого типа, такой как последовательность ICOSL, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 196 или 545.

VI. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ

В данном документе предлагаются композиции, содержащие любой из вариантных

полипептидов ICOSL, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток или инфекционных агентов, описанных в данном документе. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксцепиент. Например, фармацевтическая композиция может содержать один или несколько эксципиентов для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. В некоторых аспектах квалифицированный специалист понимает, что фармацевтическая композиция, содержащая клетки, может отличаться от фармацевтической композиции, содержащей белок.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция представляет собой твердое вещество, например, в виде порошка, капсулы, или таблетки. Например, компоненты фармацевтической композиции могут быть лиофилизированы. В некоторых воплощениях твердая фармацевтическая композиция восстанавливается или растворяется в жидкости перед введением.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция представляет собой жидкость, например с вариантными полипептидами ICOSL, растворенными в водном растворе (например, в физиологическом растворе или растворе Рингера). В некоторых воплощениях pH фармацевтической композиции составляет от около 4,0 до около 8,5 (например, от около 4,0 до около 5,0, от около 4,5 до около 5,5, от около 5,0 до около 6,0, от около 5,5 до около 6,5, 6,0 и около 7,0, от около 6,5 до около 7,5, от около 7,0 до около 8,0 или от около 7,5 до около 8,5).

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый наполнитель, например, наполнитель, связующее, покрытие, консервант, смазывающее вещество, вкусовое вещество, подсластитель, красящий агент, растворитель, буферный агент, хелатирующий агент или стабилизатор. Примеры фармацевтически приемлемых наполнителей включают целлюлозу, двухосновный фосфат кальция, карбонат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, маннит, сорбит, мальтол, прежелатинизированный крахмал, кукурузный крахмал или картофельный крахмал. Примеры фармацевтически приемлемых связующих 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 гликолят крахмала натрия. Примеры фармацевтически приемлемых смазывающих веществ включают полиэтиленгликоль, стеарат магния или стеариновую кислоту. Примеры фармацевтически приемлемых консервантов включают метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бензойную кислоту или сорбиновую кислоту. Примеры фармацевтически приемлемых подсластителей включают сахарозу, сахарин, аспартам или сорбит. Примеры фармацевтически приемлемых буферных агентов включают карбонаты, цитраты, глюконаты, ацетаты, фосфаты или тартраты.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно включает средство для контролируемого или замедленного высвобождения продукта, такого как инъецируемые микросферы, биоразрушаемые частицы, полимерные соединения (полимолочная кислота, полигликолевая кислота), гранулы или липосомы.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция является стерильной. Стерилизацию можно осуществлять путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны или радиацией. Если композиция лиофилизирована, стерилизация с использованием этого способа может проводиться либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиция для парентерального введения может храниться в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например, мешок для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

В некоторых воплощениях предлагаемое представляет собой фармацевтические композиции, содержащие трансмембранные иммуномодулирующие белки, в том числе сконструированные клетки, экспрессирующие такие трансмембранные иммуномодулирующие белки. В некоторых воплощениях фармацевтические композиции и составы включают один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Такие композиции могут включать буферы, например, нейтральный буферный физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составлены для внутривенного введения.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция включает инфекционные агенты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие иммуномодулирующее вариантные полипептиды. В некоторых воплощениях

фармацевтическая композиция включает дозу инфекционных агентов, подходящих для введения объекту, которому необходимо лечение. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает инфекционный агент, который является вирусом, в количестве одной или нескольких доз, от около 1×10^5 до около 1×10^{12} бляшкообразующих единиц (БОЕ), $1 \times 10^6 \times 10^{10}$ БОЕ или $1 \times 10^7 \times 10^{10}$ БОЕ, в каждом случае включительно, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 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 около 1×10^{10} БОЕ. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может содержать концентрацию вируса от или от около 10^5 до около 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, около или около 10^6 БОЕ/мл, 10^7 БОЕ/мл, 10^8 БОЕ/мл или 10^9 БОЕ/мл. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает инфекционный агент, который представляет собой бактерию, в количестве единичной или множественной дозы, от, от около 1×10^3 до около 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ), 1×10^4 и 1×10^9 КОЕ, или 1×10^5 и 1×10^7 КОЕ, в каждом случае включительно, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около или около 1×10^4, 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 или 1×10^9 КОЕ. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может включать бактерии в концентрации от или от около 10^3 до около 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, около или около 10^5 КОЕ/мл, 10^6 КОЕ/мл, 10^7 КОЕ/мл или 10^8 КОЕ/мл.

Такая композиция может, например, быть в форме, подходящей для внутривенного вливания. Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, который участвует в переносе или транспортировке интересующих клеток из одной ткани, органа или части тела в другую ткань, орган или часть тела. Например, носитель может быть жидким или твердым наполнителем, разбавителем, эксципиентом, растворителем или инкапсулирующим материалом или их комбинацией. Каждый компонент носителя должен быть «фармацевтически приемлемым», поскольку он должен быть совместим с другими ингредиентами композиции. Он также должен быть подходящим для контакта с любой тканью, органом или частью тела, с которой он может столкнуться, что означает, что он не должен нести риск токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности или любого другого осложнения, которое чрезмерно перевешивает его терапевтическую выгоду.

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию вводят объекту. Как правило, дозы и пути введения фармацевтической композиции определяются в

соответствии с размером и состоянием объекта, в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Для любой композиции терапевтически эффективную дозу можно оценить первоначально либо в анализах на клеточных культурах, либо на моделях животных, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или обезьяны. Животную модель также можно использовать для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация может затем использоваться для определения полезных доз и путей введения людям. Точная дозировка будет определяться в свете факторов, связанных с объектом, нуждающимся в лечении. Дозировка и введение корректируются для обеспечения достаточных уровней активного соединения или для поддержания желаемого эффекта. Факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают серьезность болезненного состояния, общее состояние здоровья объекта, возраст, массу и пол объекта, время и частоту введения, комбинацию (комбинации) лекарственных средств, чувствительность к реакции и реакцию к терапии.

Фармацевтические композиции длительного действия можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или раз в две недели в зависимости от периода полужизни и скорости выведения конкретного состава. Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров молекулы в используемой композиции. Как правило, композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, которая достигает желаемого эффекта. Поэтому композицию можно вводить в виде одной дозы или в виде нескольких доз (в одинаковых или разных концентрациях/дозировках) с течением времени или в виде непрерывной инфузии. Дальнейшее уточнение соответствующей дозировки производится регулярно. Подходящие дозы могут быть определены путем использования соответствующих данных доза-ответ. Можно отслеживать ряд биомаркеров или физиологических маркеров для терапевтического эффекта, включая активацию или пролиферацию Т-клеток, синтез или выработку цитокинов (например, выработку TNF- α, IFN-γ, IL-2), индукцию различных маркеров активации (например, CD25, рецептор IL-2), воспаления, набухания или болезненности суставов, уровень С-реактивного белка в сыворотке, продуцирования антител против коллагена и/или Т-зависимого ответа на антитела.

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию вводят объекту любым путем, в том числе перорально, трансдермально, путем ингаляции, внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, непосредственно применяют на участок раны, применяют к хирургическому участку, внутрибрюшинно, суппозиторием, подкожно, внутрикожно, чрескожно, путем распыления, внутриплеврально, внутрижелудочково, внутрисуставно, внутриглазно или внутрипозвоночно.

В некоторых воплощениях изобретения доза фармацевтической композиции представляет собой разовую дозу или повторяющуюся дозу. В некоторых воплощениях дозы вводят объекту один раз в день, два раза в день, три раза в день или четыре или более раз в день. В некоторых воплощениях в течение недели вводят около 1 или более (например, около 2 или более, около 3 или более, около 4 или более, около 5 или более, около 6 или более или около 7 или более) доз. В некоторых воплощениях множественные дозы вводятся в течение дней, недель, месяцев или лет. В некоторых воплощениях курс лечения составляет около 1 или более доз (например, около 2 или более, около 3 или более доз, около 4 или более доз, около 5 или более доз, около 7 или более доз, около 10 или больше доз, около 15 или более доз, около 25 или более доз, около 40 или более доз, около 50 или более доз или около 100 или более доз).

В некоторых воплощениях вводимая доза фармацевтической композиции составляет около 1 мкг белка на кг массы тела объекта или более (например, около 2 мкг белка на кг при условии массы тела объекта или более, около 5 мкг белка на кг массы тела объекта или более, около 10 мкг белка на кг массы тела объекта или более, около 25 мкг белка на кг массы тела объекта или более, около 50 мкг белка на кг массы тела объекта или более, около 100 мкг белка на кг массы тела объекта тела или более, около 250 мкг белка на кг массы тела объекта или более, около 500 мкг белка на кг массы тела объекта тела или более, около 1 мг белка на кг массы тела объекта или более, около 2 мг белка на кг массы тела объекта или более, или около 5 мг белка на кг массы тела объекта или более).

В некоторых воплощениях вводится терапевтическое количество клеточной композиции. Как правило, точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени заражения или метастазировании и состояния пациента (объекта). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая сконструированные клетки, например, Т-клетки, как описано в данном описании, можно вводить в дозировке от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, например, от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целочисленные значения в пределах этих диапазонов. Композиции сконструированных клеток, такие как композиции Т-клеток, также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки можно вводить с использованием методов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Оптимальная дозировка и режим лечения для конкретного пациента может быть легко определен специалистом в данной области медицины путем мониторинга у пациента признаков заболевания и

соответствующей корректировки лечения.

Известно множество способов определения того, позволяет ли введение терапевтической композиции по изобретению достаточно модулировать иммунологическую активность путем элиминации, секвестрации или инактивации иммунных клеток, опосредующих или способных опосредовать нежелательный иммунный ответ; индуцирования, образования или включения иммунных клеток, которые опосредуют или способны опосредовать защитный иммунный ответ; изменения физических или функциональных свойств иммунных клеток; или сочетания этих эффектов. Примеры измерений модуляции иммунологической активности включают, без ограничения указанным, 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 устойчивость к пролиферации или делению в ответ на сигнал (например, с использованием анализов пролиферации Т-клеток и pepscan-анализа на основе включения 3H-тимидина после стимуляции анти-CD3 антителом, антителом Т-клеточного рецептора, анти-CD28 антителом, ионофорами кальция, PMA (форбол-12-миристат-13-ацетатом), антигенпрезентирующими клетками, загруженными пептидом или белковым антигеном; анализов пролиферации В-клеток); измерение способности убивать или лизировать другие клетки (такие как анализы цитотоксичных Т-клеток); измерения цитокинов, хемокинов, молекул клеточной поверхности, антител и других продуктов клеток (например, проточной цитометрией, иммуноферментными анализами, связанными с ферментами, анализом вестерн-блоттинга, анализом белковых микрочипов, анализом иммунопреципитации); измерение биохимических маркеров активации иммунных клеток или сигнальных путей в иммунных клетках (например, анализ Вестерн-блоттингом и иммунопреципитационный анализ фосфорилирования тирозина, серина или треонина, расщепление полипептида, образование или диссоциация белковых комплексов, анализ белковой матрицы, транскрипция ДНК, профилирование с помощью ДНК-эрреев или субтрактивная гибридизация); измерение гибели клеток из-за апоптоза, некроза или других механизмов (например, окрашивание аннексином V, анализы TUNEL, гель-электрофорез для измерения ДНК-лестницы, гистология, флуорогенные анализы каспазы, вестерн-блот-анализ субстратов каспазы); измерение генов, белков и других молекул, продуцируемых иммунными клетками (например, анализ нозерн-блоттингом, полимеразной цепной реакцией, на ДНК-микроэрреях, белковых микроэрреях, двухмерным гель-электрофорезом, анализ вестерн-блоттингом, твердофазным

иммуноферментным анализом, проточной цитометрией); и измерение клинических симптомов или результатов, таких как улучшение аутоиммунных, нейродегенеративных и других заболеваний, включающих собственные белки или собственные полипептиды (клинические оценки, требования к применению дополнительных способов лечения, функциональный статус, визуализационные исследования), например, путем измерения частоты рецидивов или тяжести заболевания (с использованием клинических показателей, известных обычному квалифицированному специалисту) в случае рассеянного склероза, измерения уровня глюкозы в крови при диабете I типа или воспаления суставов в случае ревматоидного артрита.

VII. ГОТОВЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

Кроме того, предлагаемое в данном документе представляет собой готовые изделия, содержащие фармацевтические композиции, описанные в данном документе, в соответствующей упаковке. Подходящая упаковка для композиций (таких как офтальмические композиции), описанных в данном документе, известна в данной области и включает, например, флаконы (например, герметичные флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты), и тому подобное. Эти готовые изделия могут дополнительно стерилизоваться и/или запечатываться.

Кроме того, представлены наборы, содержащие фармацевтические композиции (или готовые изделия), описанные в данном документе, которые могут дополнительно содержать инструкцию(ии) о способах применения композиции, такие как используемые описанные в данном документе. Наборы, описанные в данном документе, могут также включать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши для упаковки с инструкциями для выполнения любых способов, описанных в данном документе.

VIII. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе (в том числе фармацевтическая композиция, содержащая вариантные полипептиды ICOSL, иммуномодулирующие протеины, конъюгаты, сконструированные клетки и инфекционные агенты, описанные в данном описании) могут быть использованы в различных терапевтических применениях, таких, как лечение заболевания. Например, в некоторых воплощениях фармацевтическая композиция используется для лечения воспалительных или аутоиммунных заболеваний, рака, трансплантации органов, вирусных инфекций и/или бактериальных инфекций у млекопитающих.

Фармацевтическая композиция может модулировать (например, увеличивать или уменьшать) иммунный ответ для лечения заболевания.

Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение молекул или сконструированных клеток или композиций, содержащих их, объекту, имеющему заболевание, состояние или расстройство. В некоторых описанных случаях, заболевание или расстройство представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых описанных случаях, заболевание или расстройство представляет собой опухоль или рак. В некоторых воплощениях молекулу или сконструированную клетку вводят в эффективном количестве для эффективного лечения заболевания или расстройства. Применение включает использование молекул, содержащих вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок, конъюгат, сконструированные клетки и инфекционные агенты, в таких способах и подходах лечения, а также при приготовлении лекарственного средства для осуществления таких подходов лечения. В некоторых воплощениях способы осуществляются путем введения вариантного полипептида ICOSL, иммуномодулирующего белка, конъюгата, сконструированной клетки и инфекционного агента или композиций, содержащих их, объекту, имеющему или у которого подозревается заболевание или состояние. В некоторых воплощениях способы, таким образом, лечат заболевание или состояние или расстройство у объекта.

В некоторых воплощениях предлагаемые способы применимы для терапевтического введения вариантных полипептидов ICOSL, иммуномодулирующих белков, конъюгатов, сконструированных клеток и инфекционных агентов, описанных в данном документе. В пределах уровня квалифицированного специалиста, с учетом предоставленного раскрытия, выбирать формат для указания в зависимости от типа модуляции иммунного ответа, например увеличения или уменьшения желаемого.

В некоторых воплощениях вводится фармацевтическая композиция, предлагаемая в данном описании, стимулирующая иммунный ответ, которая может быть полезна, например, при лечении рака, вирусных или бактериальных инфекций. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает вариантный полипептид ICOSL в формате, который проявляет агонистическую активность к его когнатному связующему партнеру CD28 или ICOS и/или который стимулирует или инициирует костимулирующую сигнализацию через CD28 или ICOS. Типичные форматы полипептида ICOSL для применения в таких терапевтических применениях включают, например, иммуномодулирующий белок или «стековый» вариантный полипептид ICOSL и домен IgSF или его вариант, который связывается с опухолевым антигеном (например, Nkp30

или вариантом с модифицированной аффинностью) (также называемый "доменом IgSF, локализующим в опухоли"), конъюгатом, содержащим вариантный полипептид ICOSL, связанный с нацеливающим на опухоль фрагментом (также называемым фрагментом, локализующим в опухоли), сконструированную клетку, экспрессирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок или инфекционный агент, включающий нуклеотидную молекулу, кодирующую трансмембранный иммуномодулирующий белок, например, для экспрессии трансмембранного иммуномодулирующего белка в инфицированной клетке (например, опухолевой клетке или APC, например дендритной клетке).

Фармацевтические композиции, включающие сконструированные клетки и способы, описанные в данном документе, могут быть использованы в приложениях адоптивного переноса клеток. В некоторых воплощениях клеточные композиции, содержащие сконструированные клетки, могут быть использованы в связанных способах, например, для модуляции иммунологической активности в иммунотерапевтическом подходе для лечения, например, рака млекопитающих или в других воплощениях для лечения аутоиммунных расстройств. Используемые способы обычно включают способ контакта TIP по настоящему изобретению с клеткой млекопитающего в условиях, которые разрешают специфическое связывание домена IgSF с модифицированной аффинностью и модуляцию иммунологической активности клетки млекопитающего. В некоторых воплощениях иммунные клетки (такие как инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL), Т-клетки (включая CD8 + или CD4 + Т-клетки) или APC) сконструированы для экспрессии в виде мембранного белка и/или в виде растворимого полипептида ICOSL, иммуномодулирующего белка или конъюгата, как описано в данном документе. Затем сконструированные клетки могут контактировать с клеткой млекопитающего, такой как APC, второй лимфоцит или опухолевая клетка, в которой желательна модуляция иммунологической активности и в условиях, которые разрешают специфическое связывание домена IgSF с модифицированной аффинностью с контрструктурой на клетка млекопитающего, так что иммунологическая активность может модулироваться в клетке млекопитающего. Клетки могут контактировать in vivo или ex vivo.

В некоторых воплощениях сконструированные клетки являются аутологичными клетками. В других воплощениях клетки являются аллогенными. В некоторых воплощениях клетки представляют собой аутологичные модифицированные клетки, повторно вводимые в организм млекопитающего, из которого он был выделен. В некоторых воплощениях клетки представляют собой аллогенные сконструированные клетки, введенные в млекопитающее. В некоторых воплощениях клетки собирают из

крови или опухоли пациента, конструируют для экспрессии полипептида (такого как вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или конъюгат, как описано в данном документе), размножают в системе культивирования in vitro (например, посредством стимуляции клетки) и повторно вводят пациенту для опосредования разрушению опухоли. В некоторых воплощениях способы проводят с помощью адоптивного переноса клеток, в которой клетки, экспрессирующие TIP (например, Т-клетки), вводятся обратно пациенту. В некоторых воплощениях способы по изобретению используются для лечения пациентов-млекопитающих от рака, такого как лимфома, лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, рак шейки матки, нейробластома или множественная миелома.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может быть использована для ингибирования роста раковых клеток у млекопитающих (например, раковых клеток человека). Способ лечения рака может включать введение эффективного количества любой из описанных в данном документе фармацевтических композиций объекту с раком. Эффективное количество фармацевтической композиции можно вводить для ингибирования, остановки или обратного прогрессирования рака.

Рак, который можно лечить с помощью фармацевтических композиций и способов лечения, описанных в данном документе, включает, без ограничения указанным, меланому, рак мочевого пузыря, гематологические раки (лейкоз, лимфому, миелому), рак печени, рак мозга, рак почек, рак молочной железы, рак поджелудочной железы (аденокарцинома), колоректальный рак, рак легкого (мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого), рак селезенки, рак тимуса или клеток крови (то есть лейкемия), рак предстательной железы, яичек рак, рак яичников, рак матки, рак желудка, мышечно-скелетный рак, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак зародышевых клеток или эндокринный и нейроэндокринный рак. В некоторых воплощениях рак представляет собой саркому Юинга. В некоторых воплощениях рак выбирают из меланомы, рака легкого, рака мочевого пузыря и гематологического рака. В некоторых воплощениях рак представляет собой лимфому, лимфоидный лейкоз, миелоидный лейкоз, рак шейки матки, нейробластому или множественную миелому.

Раковые клетки человека можно обрабатывать in vivo или ex vivo. При обработке ex vivo пациента-человека, ткань или жидкости, содержащие раковые клетки, обрабатываются вне организма, а затем ткань или жидкости снова вводятся обратно в пациента. В некоторых воплощениях рак лечится у пациента-человека in vivo путем введения терапевтической композиции пациенту.

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию вводят в виде

монотерапии (т.е. в виде единственного агента) или в виде комбинированной терапии (то есть, в сочетании с одним или несколькими дополнительными противоопухолевыми агентами, такими как химиотерапевтическое лекарственное средство, противоопухолевая вакцина или ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция также может вводиться с лучевой терапией.

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию вводят в виде монотерапии (т.е. в виде единственного агента) или в виде комбинированной терапии (то есть, в сочетании с одним или несколькими дополнительными противоопухолевыми агентами, такими как химиотерапевтическое лекарственное средство, противоопухолевая вакцина или ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция также может вводиться с лучевой терапией. В некоторых аспектах ингибитор иммунной контрольной точки блокирует взаимодействия PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. В некоторых случаях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает PD-1, PD-L1 или PD-L2. В некоторых случаях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело против PD-1, такое как ниволумаб или пембролизумаб или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых случаях ингибитор иммунной контрольной точки блокирует или является антагонистом CTLA-4, таким как антитело против CTLA-4 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах настоящего изобретения ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой тремелимумаб или ипилимумаб.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция подавляет иммунный ответ, что может быть полезно при лечении воспалительных или аутоиммунных расстройств или трансплантации органов. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает вариантный полипептид ICOSL в формате, который проявляет антагонистическую активность к его когнатному партнеру связывания CD28 или ICOS и/или который блокирует или ингибирует костимулирующую сигнализацию через CD28 или ICOS. Иллюстративные форматы полипептида ICOSL для использования в таких терапевтических применениях включают, например, вариантный полипептид ICOSL, который является растворимым (например, гибридный белок IFOSL-Fc), иммуномодулирующий белок или «стек» вариантного полипептида ICOSL и другого IgSF, включая его растворимые формы, которые представляют собой Fc-гибриды, сконструированную клетку, экспрессирующую секретируемый иммуномодулирующий белок, или инфекционный агент, содержащий нуклеотидную молекулу, кодирующую секретируемый иммуномодулирующий белок, например, для экспрессии и секреции

секретируемого иммуномодулирующего белка в инфицированной клетке (например, опухолевой клетке или APC, например дендритной клетке).

В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулит, аутоиммунные заболевания кожи, трансплантацию, болезнь ревматической, воспалительное желудочно-кишечные заболевания, воспалительное заболевание глаз, воспалительные неврологическое болезнь, воспалительное заболевание легких, воспалительное эндокринное заболевание или аутоиммунное гематологическое заболевание.

В некоторых воплощениях воспалительные и аутоиммунные расстройства, которые можно лечить с помощью фармацевтической композиции, описанной в данном документе, представляют собой болезнь Аддисона, аллергии, гнездную алопецию, болезнь Альцгеймера, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром (синдром Хьюза), астму, атеросклероз, ревматоидный артрит, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный синдром внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, азооспермию, болезнь Бехчета, болезнь Бергера, буллезный пемфигоид, кардиомиопатию, сердечно-сосудистые заболевания, целиакию-спру/глютеновую энтеропатию, синдром хронической усталостной иммунной дисфункции (CFIDS), хронический идиопатический полиневрит, хроническую воспалительную демиелинизацию, сочетание синдрома Гийена-Барре с миозитом (CIDP), хроническая рецидивирующую полинейропатию (синдром Гийена-Барре), синдром Чарга□Стросса (CSS), рубцовый пемфигоид, болезнь холодовых агглютининов (CAD), COPD (хроническую обструктивную болезнь легких), синдром CREST, болезнь Крона, дерматит, герпетиформ, дерматомиозит, диабет, дискоидную волчанку, экзему, буллезный эпидермоз, существенную смешанную криоглобулинемию, синдром Эвана, экзофтальм, фибромиалгию, синдром Гудпасчера, Болезнь Грейвса, тиреоидит Хасимото, идиопатический фиброз легких, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), нефропатию IgA, иммунопролиферативное заболевание или расстройство, воспалительное заболевание кишечника (IBD), интерстициальную болезнь легких, ювенильный артрит, ювенильный идиопатический артрит (JIA), болезнь Кавасаки, мигренический синдром Ламберт-Итона, красный плоский лишай, волчаночный нефрит, лимфоцитарный липофизит, болезнь Меньера, синдром Миллера-Фишера/острую диссеминированную энцефаломиелорадикулопатию, смешанную болезнь соединительной ткани, рассеянный

склероз (MS), мышечный ревматизм, миалгический энцефаломиелит (ME), миастению, воспаление глаз, листовидную пузырчатку, обыкновенную пузырчатку, злокачественную анемию, нодозный полиартериит, полихондрию, полигландулярные синдромы (синдром Витакера), ревматическую полимиалгию, полимиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз/аутоиммунную холангиопатию, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера/реактивный артрит, рестеноз, ревматическую лихорадку, ревматическое заболевание, саркоидоз, синдром Шмидта, склеродермию, синдром Сьоргена, синдром жесткого человека, системную красную волчанку (SLE), системную склеродермию, артерит Такаюсу, височный артериит/гигантский клеточный артериит, тиреоидит, диабет 1 типа, язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, интерстициальное заболевание кишечника или гранулематоз Вегенера. В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из интерстициального заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита и псориаза.

В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное расстройство представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание. В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное расстройство представляет собой синдром Шегрена (pSS) или системную красную волчанку (SLE). В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное расстройство представляет собой воспалительное заболевание кишечника (IBD). В некоторых примерах воспалительное или аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Крона. В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное расстройство представляет собой заболевание или расстройство, связанное с IBD, например интерстициальная болезнь легких (ILD). В некоторых воплощениях воспалительное или аутоиммунное расстройство представляет собой псориатический артрит или ревматоидный артрит. В некоторых воплощениях фармацевтической композиция вводится для того, чтобы модулировать аутоиммунное состояние. Например, подавление иммунного ответа может быть полезным в способах ингибирования отторжения трансплантата ткани, клетки или органа от донора реципиентом. Соответственно, в некоторых воплощениях фармацевтические композиции, описанные в данном документе, используются для ограничения или предотвращения связанных с трансплантатом или связанных с трансплантацией заболеваний или расстройств, таких как болезнь трансплантат против хозяина (GVHD). В некоторых воплощениях фармацевтические композиции используются для подавления аутоиммунного отторжения трансплантированного или привитого костного мозга, органов, кожи, мышц, нейронов, островков или паренхиматозных клеток.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения псориатического артрита (PsA). В некоторых случаях PsA поражает один или несколько суставов, таких как пальцы рук, ног, рук или ног, включая локти, запястья, кисти рук и ступни или крестцово-подвздошное сочленение. В некоторых случаях PsA является слабым и/или поражает четыре или менее суставов. В некоторых случаях PsA является умеренным и/или затрагивает четыре или более суставов. В некоторых случаях у объекта с PsA может наблюдаться боль, скованность или воспаление в позвоночнике или шее или в еще одном суставе.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения ревматоидного артрита (RA). В некоторых случаях RA влияет на суставы, выстилку суставов и/или несуставные структуры в организме (например, на кожу, глаза, легкие, сердце, почки, слюнные железы, нервную ткань, костный мозг или кровеносные сосуды). В некоторых воплощениях RA или симптомы RA являются хроническими.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения GVHD. В некоторых воплощениях GVHD является острой GVHD (aGVHD). В некоторых случаях aGVHD возникает после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) и/или реакции донорных иммунных клеток против тканей хозяина. В некоторых случаях aGVHD проявляется в коже, печени или желудочно-кишечном тракте.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения аутоиммунного состояния, ассоциированного с органным трансплантом. В некоторых случаях лечение аутоиммунного состояния, связанного с трансплантацией органа, может продлить выживаемость хозяина и трансплантированного органа. В некоторых воплощениях лечение аутоиммунного состояния, связанного с трансплантацией органа, включает профилактику или ингибирование или предотвращение отторжения трансплантата объектом, который является реципиентом органного трансплантата.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например,

IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения воспалительной болезни кишечника (IBD). В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения болезни Крона. В некоторых воплощениях болезнь Крона может включать подтип из колита Крона, энтерита Крона, илеита Крона или энтероколита Крона.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения системной красной волчанки (SLE). В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предоставленная в настоящем документе, такая как вариантный Fc-гибридный белок ICOSL IgSF (например, IgV), предоставленный в настоящем документе, используется для лечения синдрома Шегрена.

IX. ПРИМЕРНЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ

Среди предлагаемых воплощений:

1. Полипептид вариантного лиганда ICOS (ICOSL), включающий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где референсный полипептид ICOSL представляет собой укороченный внеклеточный домен, содержащий непрерывную последовательность аминокислот, содержащую аминокислоты 1-112 и С-концевое укорочение, по меньшей мере, 25 аминокислот относительно последовательности внеклеточного домена ICOSL, представленного в SEQ ID NO: 32.

2. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 1, где вариантный полипептид ICOSL проявляет усиленное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами).

3. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 1 или воплощению 2, где вариантный полипептид ICOSL проявляет измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами).

4. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-3, где С-концевое укорочение составляет, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 90, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 125 аминокислотных остатков.

5. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-4, где

референсный полипептид ICOSL изменен или отсутствует сайт расщепления протеазой, представленный в виде аминокислот 204-209 из SEQ ID NO: 32.

6. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-5, где референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 545.

7. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-5, где референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 545.

8. Вариантный полипептид лиганда ICOSL (ICOSL), содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в референсном полипептиде ICOSL, где референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 545.

9. Вариантный полипептид лиганда ICOS (ICOSL), содержащий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где референсный полипептид ICOSL изменен в одной или нескольких аминокислотах, соответствующих аминокислотам 204-209 относительно SEQ ID NO: 32.

10. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 8 или воплощению 9, где вариантный полипептид ICOSL проявляет измененное связывание с одним или несколькими его партнерами по связыванию по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с одним или несколькими связывающими партнерами.

11. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 8 или воплощению 9, где вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его партнерами по связыванию по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с одним или несколькими связывающими партнерами.

12. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 9-11, где изменение включает делецию одной или нескольких смежных аминокислот, соответствующих аминокислотам 204-209 относительно SEQ ID NO: 32.

13. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-6 и 9-12, где референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 600-605.

14. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-6 и 9-12, где референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 600-605.

15. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-6 и 9-14, где

изменение включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в одном или обоих положениях 207 и 208, соответствующих положениям, изложенным в SEQ ID NO: 32.

16. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 15, где, по меньшей мере, одна аминокислотная замена представляет собой N207A, N207G или L208G или их консервативную аминокислотную замену.

17. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 9-16, где референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 623-628.

18. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 9-17, где референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 623-628.

19. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 5-7 и 9-18, где вариантный полипептид ICOSL проявляет пониженное протеолитическое расщепление при экспрессии из клетки, необязательно по сравнению с полноразмерным внеклеточным доменом вариантного полипептида ICOSL при экспрессии из той же самой клетки.

20. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 19, где клетка представляет собой клетку млекопитающего.

21. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 19 или воплощению 20, где клетка представляет собой клеточную линию яичника китайского хомячка (CHO) или ее производное.

22. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-21, где аминокислотная модификация представляет собой аминокислотную замену, вставку или делецию.

23. Вариант любого из воплощений 1-22, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении, соответствующем положению(положениям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32.

24. Вариант любого из воплощений 1-23, в котором одну или несколько модификаций аминокислот выбирают из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R , T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V,

N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D , N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, NQQ , E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100E, L102, L102 , V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122H, S121306, S126305 , E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, Q154161, L15D L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, I218, I21G R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K или их консервативной аминокислотной замены.

25. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-24, где одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении, соответствующем положению(ям) 52, 57 или 100.

26. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-25, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N52K, S54A, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57Y, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T или Q100V.

27. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-26, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,

E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R,
Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N,
N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G,
A20T/N52D/Y146C/Q164L,
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M,
N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,
M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K,
N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R,
S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,
M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R,
N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A,
N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G,
N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D,
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D,
N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D,
N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K,
N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S,
N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52D,
N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q,
N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q,
N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q,
N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q,
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P,
N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R,
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/ N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P или R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R.

28. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-24, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа F120S/Y152H/N201S, E111del, Y33del, N168Q/N207Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N84Q/N119Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q или F138L/L203P.

29. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-28, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из C198R, D158G, E16V, E90A, F120S, F138L, F172S, H115R, H115X, I143T, I143V, I224V, K156M, K42E, K92R, L102R, L203P, L208P, N194D, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52Y, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57S, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100D, Q100E, Q100K, Q100M, Q100P, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q133H, R221I, R75Q, S54A, S54P, T113E, T225A, V110D, V122A, Y146C, или Y152C; или

A117T, A20V, A71T, A91G, A91G, AE88D, C140del, C198R, D158G, D77G, D90K, E117G, E135K, E16V, E81A, E88D, E90A, F120I, F120S, F138L, F172S, F27C, F92Y, G72R, H115R, H115X, H129P, H94E, I118V, I127T, I143T, I143V, I154F, I218N, I218T, I224V, K156M, K169E, K36G, K42E, K89R, K92R, K93R, L102R, L161P, L166Q, L173S, L203F, L203P, L208P, L209P, L40M, L70Q, L70R, L74Q, L80P, L96I, L98F, M10I, M10V, N115Q, N119Q, N122S, N144D, N155X, N168Q, N168X, N178S, N194D, N207Q, N207X, N227K, N25S, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N57A, N57F, N57H, N57L, N57M, N57S, N57V, N57W, N57Y, N63S, N84Q, Q100A, Q100E, Q100G, Q100K, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, Q133H, R221G, R221I, S109G, S109N, S114T, S121G, S126R, S126T, S130G, S132F, S13G, S18R, S192G, S212G, S25G, S54A, S54P, S99G, T113E, T120S, T130A, T139S, T190A, T199S, T225A, T41I, V107I, V110A, V110D, V11E, V122A, V122M, V193M, V210A, W153R, Y146C, Y152C или Y152H.

30. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-29, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа N52S, N52H, N52D, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y, N52S/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52H/I143T, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S,

N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R, H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N30D/K42E/N52S/H115R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52T/N57H/Q100S, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G или N52T/N57K/Q100P; или

N52S, N52H, N52D, N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140del/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/D158G, N52D/Q133H, L70Q/A91G/N144D, L70Q/A91G/E117G/ I118V/T120S/T130A, L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S, L70Q/E81A/A91G/ I118V/T120S/I127T/ T130A, N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V /T120S/T130A, T41I/A91G, E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R/N122S/ N178S, E88D/K89R/D90K/A91G/ F92Y/K93R, AE88D/K89R/D90K/ A91G/F92Y/K93R, K36G/L40M, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/F120S/N227K, N52S/N194D, N52S/F120S, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/S132F/I154F/C198R/R221G, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,

M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q/, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/Q100R, N52H/S121G/C198R, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, L70Q/A91G/I118A/T120S/T130A/K169E, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R R221I, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R, N52S/H115R/F172S/C198R, N119Q, N207Q, N52Q/N207X, N168X/N207X, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N119Q N155X, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N207Q, N119Q/N155Q/N168Q, N52H/N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N155X/N168X, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A,

N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G или N52T/N57K/Q100P.

31. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-30, где вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом.

32. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-31, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из C198R, D158G, E16V, E90A, F120S, F138L, F172S, H115R, I143V, I224V, K156M, K42E, K92R, L102R, L203P, L208P, N194D, N30D, N52A, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52Y, N57F, N57H, N57L, N57M, N57S, N57V, N57W, N57Y, Q100A, Q100E, Q100G, Q100K, Q100M, Q100P, Q100R, Q100S, Q133H, S212G, S54A, S54P, T113E, V110D, V122A, Y146C, Y152C или T225A.

33. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-33, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа N52A/N57Y/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52T/N57H/Q100S, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52G/N57V, N52L/N57V, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52S, N52H, N52D, N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N57Y, N52S/C198R, N52S/T113E, S54A, N52D/S54P, N52K/L208P, N52H/I143T, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R,

N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, Q100R, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, N52H, N57Y, N57Y/Q100P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52S/E90A/H115R, N52S/E90A/H115R или N30D/K42E/N52S/H115R.

34. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-33, где вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с эктодоменом ICOS и CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом.

35. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-34, где вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848, 850-853, 855, 857, 907, 910, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848, 850-853, 855, 857, 907, 910.

36. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-34, где вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 546-599, 734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848, 850-853, 855, 857, 907, 910, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 546-599,

734-781, 783, 786, 788, 792, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 811, 813, 815, 817, 818, 820, 822, 824, 826, 827, 829, 831, 833, 834, 836, 838, 840-843, 845, 847, 848, 850-853, 855, 857, 907 или 910.

37. Вариантный полипептид лиганда ICOS (ICOSL), содержащий домен IgV или его специфически связывающий фрагмент, домен IgC или его специфически связывающий фрагмент, или оба домена, где вариантный полипептид ICOSL содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в референсном полипептиде ICOSL или его специфически связывающем фрагменте, соответствующих аминокислотным модификациям, выбранных из N52A, N52C, N52D, N52G, N52K, N52L, N52M, N52R, N52T, N52V, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q , N57S, N57T, N57V, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100S, Q100T или Q100V. относительно SEQ ID NO:32.

38. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 37, где одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из числа N52A/N57F/Q100S, N52A,/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L или N57Q/Q100P.

39. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 37 или воплощению 38, где референсный полипептид ICOSL представляет собой ICOSL млекопитающего или его специфический связывающий фрагмент.

40. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-39, где референсный полипептид ICOSL представляет собой человеческий ICOSL или его специфически связывающий фрагмент.

41. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-40, где немодифицированный ICOSL включает (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32; или

(iii) часть (i) или (ii), содержащую домен IgV или домен IgC или их специфические связывающие фрагменты или и то, и другое.

42. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-41, где:

специфический связывающий фрагмент домена IgV или домена IgC имеет длину, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более аминокислот; или

специфический связывающий фрагмент домена IgV имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgV, представленного аминокислотами 19-129 из SEQ ID NO: 5, и/или специфический связывающий фрагмент домена IgC имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 80% длины домена IgC, представленного аминокислотами 141-227 из SEQ ID NO: 5.

43. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-16, где вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический фрагмент и домен IgC или его специфический фрагмент.

44. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-43, где вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 638-685, 905, 908, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 638-685, 905, 908.

45. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-43, где вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 638-685, 905, 908, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 638-685, 905, 908.

46. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-43, где вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический связывающий фрагмент.

47. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-43 и 46, где вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 686-781, 907, 910, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 686-781, 907, 910.

48. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-43 и 46, где

вариантный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 686-781, 907, 910, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 686-781, 907, 910.

49. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-43 и 46-48, где домен IgV или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

50. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-42, где домен IgC или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

51. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 37-50, где вариантный полипептид ICOSL проявляет измененное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL для того же эктодомена.

52. Вариантный полипептид ICOSL по воплощениям 37-51, где вариантный полипептид ICOSL проявляет измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами).

53. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-52, где связывание увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз , в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз в 40 раз или в 50 раз или в 60 раз.

54. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-53, где ICOS представляет собой ICOS человека.

55. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-54, где CD28 представляет собой CD28 человека.

56. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-55, где вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с эктодоменом ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом.

57. Вариантный полипептид ICOSL по воплощений 56, где связывание увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз , в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз в 40 раз или в 50 раз или в 60 раз.

58. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-57, где CTLA-

4 представляет собой CTLA-4 человека.

59. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-58, где измененное (повышенное или пониженное) связывание представляет собой измененную (увеличенную или уменьшенную) аффинность связывания.

60. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-59, где вариантный ICOSL включает вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций, необязательно, аминокислотных замен, вставок и/или делеций.

61. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-60, где вариантный полипептид ICOSL демонстрирует идентичность последовательности, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% относительно референсного полипептида ICOSL.

62. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-61, который является растворимым белком.

63. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-62, где:

вариантный полипептид ICOSL, утратил трансмембранный домен иливнутриклеточный сиганльный домен; и/или

при экспрессии из клетки вариантный полипептид ICOSL не экспрессируется на поверхности клетки.

64. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-61, где вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает трансмембранный домен.

65. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 64, в котором трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность, обозначенную как остатки 257-277 из SEQ ID NO: 5, или его функциональный вариант, который имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с остатками 257-277 из SEQ ID NO: 5.

66. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 64 или воплощению 65, дополнительно содержащий цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом.

67. Вариантный полипептид ICOSL по воплощению 66, в котором цитоплазматический сигнальный домен включает аминокислотную последовательность, обозначенную как остатки 278-302 из SEQ ID NO: 5, или их функциональный вариант, который имеет, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с остатками 278-302 из SEQ ID NO: 5.

68. Вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-67, который

является дигликозилированным или частично дигликозилированным по сравнению с референсной последовательностью ICOSL.

69. Иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68 и фрагмент, увеличивающий период полужизни.

70. Иммуномодулирующий белок по воплощению 67, где фрагмент, увеличивающий период полужизни, включает 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-связывающая малая молекула или их комбинацию.

71. Иммуномодулирующий белок по воплощению 69 или воплощению 70, где фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой или содержит Pro/Ala/Ser (PAS), а вариантный полипептид ICOSL является PAS-илированным.

72. Иммуномодулирующий белок по воплощению 71, где фрагмент, увеличивающий период полужизни, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 904.

73. Иммуномодулирующий белок по воплощению 69 или воплощению 70, где фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой или содержит домен мультимеризации.

74. Иммуномодулирующий белок по воплощению 73, где домен мультимеризации выбран из Fc-области иммуноглобулина, лейциновой молнии, изолейцинной молнии или цинкового пальца.

75. Иммуномодулирующий белок по воплощению 73 или воплощению 74, где вариантный полипептид ICOSL связан, прямо или опосредованно, через линкер, с доменом мультимеризации.

76. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 73-75, где иммуномодулирующий белок представляет собой мультимер, содержащий первый вариантный полипептид ICOSL, связанный с первым доменом мультимеризации, и второй вариантный полипептид ICOSL, связанный со вторым доменом мультимеризации, где первый и второй домены мультимеризации взаимодействуют с образованием мультимера, содержащего первый и второй вариантный полипептид ICOSL.

77. Иммуномодулирующий белок по п. 76, где мультимер представляет собой димер.

78. Иммуномодулирующий белок по воплощению 76 или воплощению 77, где первый вариантный полипептид ICOSL и второй вариантный полипептид ICOSL

являются одинаковыми.

79. Иммуномодулирующий белок по воплощению 77 или воплощению 78, где димер представляет собой гомодимер.

80. Иммуномодулирующий белок по воплощению 77, где димер представляет собой гетеродимер.

81. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 73-80, где домен мультимеризации представляет собой или содержит Fc-область иммуноглобулина.

82. Иммуномодулирующий белок по воплощению 81, в котором Fc-область представляет собой белок иммуноглобулина G1 (IgG1) или иммуноглобулина G2 (IgG2).

83. Иммуномодулирующий белок по воплощению 81 или воплощению 82, где белок иммуноглобулина является человеческим и/или Fc-область является человеческой.

84. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 81-83, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 227, или ее вариант, который демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 227.

85. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 81-84, где Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226, или ее вариант, который демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 226.

86. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 81-85, где Fc-область проявляет одну или несколько эффекторных функций.

87. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 81-86, где Fc-область проявляет одну или несколько сниженных эффекторных функций по сравнению с областью Fc дикого типа, необязательно где человеческий Fc дикого типа представляет собой человеческий IgG1.

88. Иммуномодулирующий белок по воплощению 86 или воплощению 87,где одну или несколько эффекторных функций выбирают из числа нтителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности, запрограммированной гибели клеток и клеточного фагоцитоза.

89. Иммуномодулирующий белок по воплощению 87 или воплощению 88, где Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, содержащей одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с Fc-областью дикого типа.

90. Иммуномодулирующий белок по воплощению 89, где одна или несколько аминокислотных замен вариантной Fc-области выбраны из N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K or L234A/L235E/G237A, где остаток пронумерован в

соответствии с индексом EU по Kabat.

91. Иммуномодулирующий белок по воплощению 90, где вариантная Fc-область из IgG1 дополнительно включает аминокислотную замену C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

92. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 87-91, где Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 476-478, или последовательность аминокислот, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям любой из SEQ ID NO: 476-478 и содержит аминокислотные замены.

93. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 87-92, где Fc-область содержит K447del, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat.

94. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 87-92 и 93, где Fc-область включает последовательность аминокислотной последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 476-478, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям любой из SEQ ID NO: 476-478 и содержат аминокислотные замены.

95. Иммуномодулирующий белок, включающий:

(a) вариантный полипептид ICOSL, включающий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами); и

(b) вариантная Fc-область, включающая аминокислотные замены, выбранные из N297G/K447del, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/K447del или L234A/L235E/G237A/K447del по сравнению с человеческим IgG1 дикого типа, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

96. Иммуномодулирующий белок по воплощению 95, который представляет собой димер.

97. Иммуномодулирующий белок по воплощению 95 или воплощению 96, где вариантная Fc-область из IgG1 дополнительно включает аминокислотную замену C220S, где остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat.

98. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 95-97, где Fc-

область включает последовательность аминокислотной последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 632-634, или последовательность аминокислот, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательностям любой из SEQ ID NO: 632-634 и содержит аминокислотные замены.

99. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 95-98, где вариантный полипептид ICOSL связан прямо или опосредованно через линкер с вариантной Fc-областью.

100. Иммуномодулирующий белок по воплощению 75 и воплощению 99, где линкер содержит от 1 до 10 аминокислот.

101. Иммуномодулирующий белок по воплощению 100, где линкер выбран из линкера AAA, G4S (SEQ ID NO: 636), (G4S) 2 (SEQ ID NO: 229) или GSGGGGS (SEQ ID NO: 635).

102. Иммуномодулирующий белок, включающий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68, связанного со вторым полипептидом, содержащим домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF).

103. Иммуномодулирующий белок по воплощению 102, где домен IgSF имеет модифицированную аффинность и имеет измененное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами связывания по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа.

104. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 103, где домен IgSF проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами связывания по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа.

105. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 102-104, где вариантный полипептид ICOSL представляет собой первый вариантный полипептид ICOSL, а домен IgSF второго полипептида представляет собой домен IgSF из второго вариантного полипептида ICOSL по любому из воплощений 1-68, где первый и второй варианты ICOSL являются одинаковыми или разными.

106. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 102-105, где вариантный полипептид ICOSL способен специфически связываться с CD28 или ICOS, а домен IgSF второго полипептида способен связываться с партнером связывания, отличным от партнера связывания, специфически связанного вариантным полипептидом ICOSL.

107. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 106, где домен IgSF

является представителем семейства B7.

108. Иммуномодулирующий полипептид по любому из пп. 102-104 и 106, в котором домен IgSF представляет собой фрагмент, локализующий на опухоли, который связывается с лигандом, экспрессируемым на опухоли, или представляет собой фрагмент, локализующий в воспалении, который связывается с лигандом, экспрессируемым на клетке или ткани воспалительной среды.

109. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 108, где лиганд представляет собой B7H6.

110. Иммуномодулирующий полипептид по воплощению 108 или воплощению 109, где домен IgSF находится из NKp30.

111. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 102-110, где домен IgSF является или включает домен IgV.

112. Иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 102-111, где вариантный полипептид ICOSL представляет собой или включает домен IgV.

113. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 102-112, где иммуномодулирующий белок включает домен мультимеризации, связанный с одним или обоими вариантными полипептидами ICOSL или вторым полипептидом, содержащим домен IgSF.

114. Иммуномодулирующий белок по воплощению 113, где домен мультимеризации является доменом Fc или его вариантом с уменьшенной эффекторной функцией.

115. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 102-114, который является димерным.

116. Иммуномодулирующий белок по воплощению 115, который является гомодимерным.

117. Иммуномодулирующий белок по воплощению 116, который является гетеродимерным.

118. Конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68 или иммуномодулирующий полипептид по любому из воплощений 69-117, и гетерологичный фрагмент.

119. Конъюгат по воплощению 118, где вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с гетерологичным фрагментом.

120. Конъюгат по любому из воплощения 118 или воплощения 119, где нацеливающий фрагмент представляет собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное вещество или наночастицу.

121. Конъюгат по любому из воплощений 118-120, где нацеливающий фрагмент представляет собой белок или пептид.

122. Конъюгат по воплощению 121, в котором конъюгат представляет собой гибридный белок.

123. Гибридный белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68 или иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 69-117 и гетерологичный фрагмент.

124. Конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 118-123, где фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой на поверхности клетки.

125. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 124, где нацеливающий фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки.

126. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 125, где иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку или лимфоцит.

127. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 124, где нацеливающий фрагмент представляет собой локализующий в опухоли фрагмент, который связывается с молекулой на поверхности опухоли.

128. Конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 124-127, где нацеливающий фрагмент связывается с молекулой HER1/EGFR, HER2/ERBB2, CD20, CD25 (рецептор IL-2Rα), CD33, CD52, CD133, CD206, CEA, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, раковый антиген 125 (CA125), альфа-фетопротеина (AFP), Льюис Y, TAG72, каприн-1, мезотелина, рецептора PDGF (PDGFR) PDGF-Rα, PD-1, PD-L1, CTLA- 4, рецептора IL-2, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), CD30, EpCAM, EphA2, глипикана-3, gpA33, муцинов, CAIX, PSMA, фолат-связывающего белка, ганглиозидов (такие как GD2, GD3, GM1 и GM2) , рецептора VEGF (VEGFR), VEGFR2, VEGF-A, интегрина αVβ3, интегрина α5β1, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, тенасцина, AFP, комплекса BCR, CD3, CD18, CD44, CTL, CTL-4, gp72, HLA-DR 10 β, антигена HLA-DR, IgE, MUC-1, nuC242, антигена PEM, металлопротеиназ, рецептора эфрина, лигандов эфрина, рецептора HGF, CXCR4, CXCR4, рецептора бомбезина, антигена SK-1, Bcr- abl, RET, MET, TRKB, TIE2, ALK, ROS, EML4-ALK, ROS1, BRAFV600E, SRC, c-KIT, mTOR, TSC1 , TSC2, BTK, KIT, BRCA, CDK 4/6, JAK1, JAK2, BRAF, FLT-3, MEK1, MEK2, SMO или B7-H6 (NCR3LG1).

129. Конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 124-128, где нацеливающий фрагмент связывается с PD-L1.

130. Конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 124-129, где

нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

131. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 130, где антитело выбрано из цетуксимаба, панитумумаба, залутумумаба, нимотузумаба, трастузумаба, адотрастумумаба, эмтансина, тозитумомаба (Bexxar®), ритуксимаба (Rituxan, Mabthera), Ибритумомаб тиуксетана (Zevalin), даклизумаба (Zenapax), гемтузумаба (Mylotarg), алемтузумаба, фрагмента Fab CEA-скана, моноклонального антитела OC125, ab75705, B72.3, бевацизумаба (Avastin®), афатиниба, акситиниба, бозутиниба, кабозантиниба, церитиниба, кризотиниба, дабрафениба, дасатиниба, динутуксимаба, эрлотиниба, эверолимуса, ибрутиниба, иматиниба, лапатиниба, ленватиниба, нилотиниба, олапариба, оларатумаба, палбоциклиба, пазопаниба, пертузумаба, рамукирумаба, регорафениба, руксолитиниба, сорафениба, сунитиниба, темсиролимуса, траметиниба, вандетаниба, вемурафениба, висмодегиба, базиликсимаба, ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба, MPDL3280A, пидилизумаба (CT-011), AMP-224, MSB001078C или MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба или представляет собой их антигенсвязывающий фрагмент.

132. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 130 или воплощению 131, где вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с N-концом тяжелой и/или легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

133. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 130 или воплощению 131, где вариантный полипептид ICOSL прямо или опосредованно связан через линкер с C-концом тяжелой и/или легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

134. Конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 118-133, где конъюгат является двухвалентным, четырехвалентным, шестивалентным или восьмивалентным.

135. Конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 118-123, где гетерологичный фрагмент представляет собой или содержит метку для обнаружения или очистки вариантного полипептида ICOSL.

136. Моновалентный гибридный белок, содержащий:

(a) вариантный полипептид ICOSL, включающий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, где вариантный полипептид ICOSL демонстрирует измененное связывание с эктодоменом(ами) ICOS или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем же эктодоменом(ами); и

(b) метку для обнаружения или очистки вариантного полипептида ICOSL.

137. Конъюгат или гибридный белок по воплощению 135 или воплощению 136, в котором метка для детекции или очистки выбрана из полигистидиновой (His) метки, FLAG-метки, Myc-метки или метки на основе флуоресцентного белка.

138. Иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 95-101 или гибридный белок по воплощению 136 или воплощению 137, где вариантный полипептид ICOSL содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, находятся в положении, соответствующем положению(ям), выбранному из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно SEQ ID NO: 32.

139. Иммуномодулирующий белок или гибридный белок по воплощению 138, где одна или несколько модификаций аминокислот выбраны из M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K или их консервативная аминокислотная замена.

140. Иммуномодулирующий белок или гибридный белок по воплощению 138 или воплощению 139, где референсный полипептид ICOSL включает (i) последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 32, (ii) последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 32; или (iii) часть (i) или (ii), содержащая домен IgV или домен IgC или их специфически связывающие фрагменты или и тот, и другой.

141. Иммуномодулирующий белок или гибридный белок по любому из воплощений 138-140, где референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 196, 545, 600-605 и 623-628.

142. Иммуномодулирующий белок или белок слияния по любому из воплощений 138-141, где референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 32, 196, 545, 600-605 и 623-628.

143. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68, иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 69-117 и 118-142 или гибридный белок по любому из воплощений 123-142.

144. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты по воплощению 143, которая представляет собой синтетическую нуклеиновую кислоту.

145. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты по воплощению 143 или воплощению 144, которая представляет собой кДНК.

146. Вектор, включающий молекулу(ы) нуклеиновой кислоты по любому из воплощений 143-145.

147. Вектор по воплощению 146, который является экспрессирующим вектором.

148. Вектор по воплощению 146 или по воплощению 147, где вектор представляет собой экспрессирующий вектор млекопитающих или вирусный вектор.

149. Клетка, содержащая вектор по любому из воплощений 146-148.

150. Клетка по воплощению 149, которая является клеткой млекопитающего.

151. Клетка по воплощению 149 или воплощению 150, которая представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO) или ее производное.

152. Способ получения вариантного полипептида ICOSL или иммуномодулирующего белка, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из воплощений 143-145 или вектора по любому из воплощений 146-148 в клетку-хозяина в условиях экспрессии белка в клетке.

153. Способ воплощения 152, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

154. Способ по воплощению 153, где клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомяка или ее производное.

155. Способ по любому из воплощений 152-154, дополнительно включающий выделение или очистку белка из клетки.

156. Белок, полученный способом по любому из воплощений 152-155.

157. Композиция, включающая белок, содержащий вариантный полипептид

ICOSL по любому из воплощений 1-68 или иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 69-117, где, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% отдельных последовательностей белка или иммуномодулирующего белка в композиции имеют идентичную длину последовательности, необязательно, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

158. Композиция по воплощению 157, где белок или иммуномодулирующий белок очищают из клеток яичника китайского хомяка или их производного.

159. Полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид ICOSL, содержащий трансмембранный домен по любому из воплощений 64-68, и одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного антигенного рецептора.

160. Полинуклеотид по воплощению 159, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR).

161. Полинуклеотид по воплощению 159 или воплощению 160, где каждая из нуклеиновых кислот, кодирующих вариантный полипептид ICOSL, и одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих одну или несколько цепей рекомбинантного рецептора, отделена нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы.

162. Полинуклеотид по воплощению 161, где полинуклеотид содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид ICOSL, нуклеиновую кислоту, кодирующую саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, и нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

163. Полинуклеотид по воплощению 161, гдеполинуклеотид включает нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид ICOSL, нуклеиновую кислоту, кодирующую первый саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, нуклеиновую кислоту, кодирующую одну сконструированную цепь TCR-альфа или сконструированную цепь TCR-бета, нуклеиновую кислоту, кодирующую второй саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, и нуклеиновую кислоту, кодирующую другую сконструированную цепь TCR-альфа или сконструированную цепь TCR-бета.

164. Полинуклеотид по воплощению 163, в котором кодированный первый и второй саморасщепляющийся пептид является одинаковыми.

165. Полинуклеотид по любому из воплощений 160-163, где

саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A.

166. Вектор, включающий полинуклеотид по любому из воплощений 159-165.

167. Вектор по воплощению 166, где вектор представляет собой вирусный вектор.

168. Вектор по воплощению 167, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

169. Сконструированная клетка, включающая полинуклеотид по любому из воплощений 159-165 или вектор по любому из воплощений 166-168.

170. Сконструированная клетка, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68, иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 69-117 или гибридный белок по любому из воплощений 123-142.

171. Сконструированная клетка, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из воплощений 143-145 или вектор по любому из воплощений 146-148.

172. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-171, где нуклеиновая кислота, кодирующая вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок, кодирует сигнальный пептид.

173. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-172, где вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок не содержит трансмембранного домена и/или не экспрессируется на поверхности клетки.

174. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-173, где вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок секретируется из сконструированной клетки.

175. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-171, где сконструированная клетка включает вариантный полипептид ICOSL, включающий трансмембранный домен любого из воплощений 64-68.

176. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-171 и 175, где вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки.

177. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-176, где клетка представляет собой иммунную клетку.

178. Сконструированная клетка по воплощению 177, где иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC) или лимфоцит.

179. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-178, которая является первичной клеткой.

180. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-179, где клетка

представляет собой клетку млекопитающего.

181. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-180, где клетка представляет собой клетку человека.

182. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-181, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

183. Сконструированная клетка по воплощению 178, где сконструированная клетка является APC и APC является искусственной APC.

184. Сконструированная клетка по любому из воплощений 169-183, дополнительно включающая химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор.

185. Фармацевтическая композиция, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68, иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 69-117, конъюгат по любому из воплощений 118-142, сконструированная клетка по любому из воплощений 169-184 или инфекционный агент по любому из воплощений 216-227.

186. Фармацевтическая композиция по воплощению 185, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

187. Фармацевтическая композиция по воплощению 185 или 186, где фармацевтическая композиция является стерильной.

188. Изделие, содержащее фармацевтическую композицию по любому из воплощений 185-187 во флаконе.

189. Изделие по воплощению 188, где флакон герметизирован.

190. Набор, включающий фармацевтическую композицию по любому из воплощений 157-158 и 185-187 и инструкции для применения.

191. Набор, включающийащий изделие по воплощению 189 и 190, и инструкции по применению.

192. Способ модуляции иммунного ответа у объекта, включающий введение объекту фармацевтической композиции по любому из воплощений 157-158 и 185-187.

193. Способ модуляции иммунного ответа у объекта, включающий введение сконструированных клеток по любому из воплощений 169-184.

194. Способ по воплощению 193, где сконструированные клетки являются аутологичными объекту.

195. Способ по воплощению 193, где сконструированные клетки являются аллогенными объекту.

196. Способ по любому из воплощений 193-195, где модуляция иммунного

ответа лечит заболевание или состояние у объекта.

197. Способ по любому из воплощений 193-196, где иммунный ответ увеличивается.

198. Способ по любому из воплощений 192, 196 и 197, где объекту вводят иммуномодулирующий белок или конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL, связанный с опухоль-локализующим фрагментом.

199. Способ по воплощению 198, где опухоль-локализующий фрагмент представляет собой или включает связывающую молекулу, которая распознает опухолевой антиген.

200. Способ по воплощению 199, где связывающая молекула включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или включает домен IgSF дикого типа или его вариант.

201. Способ по любому из воплощений 192 и 196-200, где иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 102-117 или конъюгат или гибридный белок по любому из воплощений 118-142 вводят объекту.

202. Способ по любому из воплощений 193-197, где вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок, вводят объекту.

203. Способ по любому из воплощений 193-197 и 202, где сконструированную клетку, содержащую вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой трансмембранный иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 64-68, вводят объекту.

204. Способ по воплощению 192-203, где заболевание или состояние являются опухолью или раком.

205. Способ по любому из воплощений 192-204, где заболевание или состояние выбраны из меланомы, рака легкого, рака мочевого пузыря, гематологического рака, рака печени, рака мозга, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака селезенки, рака предстательной железы, рака яичка, рака яичника, рака матки, рака желудка, мышечно-скелетного рака, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, герминогенного рака или эндокринного и нейроэндокринного рака.

206. Способ по любому из воплощений 192-196, где иммунный ответ уменьшается.

207. Способ по любому из воплощений 192, 196 и 206, где объекту вводится вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий белок, который является

растворимым.

208. Способ по воплощению 207, где растворимый полипептид или иммуномодулирующий белок представляет собой белок Fc-гибрида.

209. Способ по любому из воплощений 192-196 и 206-208, где вводят вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-63 и 68, иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 70-101 или гибридный белок по воплощениям 136 и 137 объекту.

210. Способ по любому из воплощений 192-196 и 206-208, где сконструированную клетку, содержащую секретируемый полипептид ICOSL, вводят объекту.

211. Способ по любому из воплощений 192-196, 206-208 и 210, где сконструированную клетку по любому из воплощений 169-174 и 177-184 вводят объекту.

212. Способ по любому из воплощений 192, 196 и 206-208 и 210, где инфекционный агент, кодирующий вариантный полипептид ICOSL, который является секретируемым иммуномодулирующим белком, вводят объекту, необязательно в условиях, при которых инфекционный агент инфицирует опухолевую клетку или иммунную клетку и секретируемый иммуномодулирующий белок секретируется из инфицированной клетки.

213. Способ по любому из воплощений 192-196 и 206-212, где заболевание или состояние являются воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием.

214. Способ по любому из воплощений 192-196 и 206-213, где заболевание или состояние представляют собой васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), васкулит, аутоиммунное заболевание кожи, трансплантацию, ревматическую болезнь, воспалительное желудочно-кишечное заболевание, воспалительное заболевание глаз, воспалительное неврологическое заболевание, воспалительное заболевание легкого, воспалительное эндокринное заболевание или аутоиммунное гематологическое заболевание.

215. Способ по воплощению 213 или воплощению 214, где заболевание или состояние выбрано из воспалительного заболевания кишечника, трансплантации, болезни Крона, язвенного колита, рассеянного склероза, астмы, ревматоидного артрита или псориаза.

216. Инфекционный агент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариантный полипептид ICOSL по любому из воплощений 1-68, или иммуномодулирующий белок по любому из воплощений, иммуномодулирующий белок по любому из воплощений 69-117 или гибридный белок по любому из воплощений 123-

142.

217. Инфекционный агент по воплощению 216, где кодированный вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид или гибридный белок не включает трансмембранный домен и/или не экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется.

218. Инфекционный агент по воплощению 216 или воплощению 217, где кодируемый вариантный полипептид ICOSL или иммуномодулирующий полипептид или гибридный белок секретируется из клетки, в которой он экспрессируется.

219. Инфекционный агент по воплощению 218, где кодируемый вариантный полипептид ICOSL включает трансмембранный домен.

220. Инфекционный агент по воплощению 216, по воплощению 217 или воплощению 219, где кодируемый вариантный полипептид ICOSL экспрессируется на поверхности клетки, в которой он экспрессируется.

221. Инфекционный агент по любому из воплощений 216-220, где инфекционный агент представляет собой бактерию или вирус.

222. Инфекционный агент по воплощению 221, где вирус является онколитическим вирусом.

223. Инфекционный агент по воплощению 222, где онколитический вирус представляет собой аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирусы герпеса, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, парвовирус, вирус кори, вирус имплантированного стоматита (VSV), вирус Коксаки или вирус осповакцины.

224. Инфекционный агент по воплощению 222, где вирус специфически нацелен на дендритные клетки (DC) и/или является тропным к дендритным клеткам.

225. Инфекционный агент по воплощению 224, где вирус представляет собой лентивирусный вектор, который псевдотипирован модифицированным продуктом оболочки вируса Синдбис.

226. Инфекционный агент по любому из воплощений 216-225, дополнительно включающий нуклеотидную молекулу, кодирующую дополнительный генный продукт, который приводит к гибели клетки-мишени или которая может усиливать или стимулировать иммунный ответ.

227. Инфекционный агент по воплощению 226, где дополнительный генный продукт выбирают из противоопухолевого агента, антиметастатического агента, антиангиогенного агента, иммуномодулирующей молекулы, ингибитора иммунного чекпоинта, антитела, цитокина, фактора роста, антигена, продукта цитотоксического гена,

проапоптотического генного продукта, продукта антиапоптотического гена, гена деградации клеточной матрицы, генов регенерации тканей или перепрограммирования соматических клеток человека в плюрипотентные.

X. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕР 1

ПРИМЕР 1 Пример 1 Получение мутантных ДНК-конструкций доменов IgSF

Пример 1 описывает получение мутантных ДНК-конструкций доменов ICOSL IgSF человека для трансляции и экспрессии на поверхности дрожжей в качестве библиотек дрожжевого дисплея.

A. Вырожденные библиотеки

Были получены мутантные ДНК-конструкции, кодирующие вариантный ECD-домен ICOSL. Конструкции были созданы на основе последовательности ICOSL человека дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 32, содержащей домен ECD, представленный ниже:

DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSS
LENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVT
LHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVF
LNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTG
EKNAAT

Для библиотек, которые нацелены на специфические остатки для полной или частичной рандомизации с помощью вырожденных кодонов, кодирующую ДНК из SEQ ID NO: 32 заказали в «Integrated DNA Technologies» (Коралвилл, Айова) в виде набора перекрывающихся олигонуклеотидов до 80 пар оснований (п.о.) в длину. Для получения библиотеки различных вариантов каждого ECD, олигонуклеотиды содержали искомые вырожденные кодоны, такие как в специфических наборах оснований для различных аминокислотных замен, в искомых положениях аминокислот. Вырожденные кодоны были сгенерированы с использованием алгоритма по URL: rosettadesign.med.unc.edu/SwiftLib/.

В целом, положения для мутации и вырождения кодонов были выбраны из моделей гомологии (ICOSL) представляющих интерес пар мишень-лиганд, для идентификации контактных остатков лиганда, таких как остатки целевых боковых цепей, которые взаимодействуют с лигандом, а также остатков, которые находятся на границе взаимодействия белка. Этот анализ был выполнен с использованием средства просмотра структуры, доступного по адресу URL: spdbv.vital-it.ch).

Следующим шагом при разработке библиотеки было выравнивание последовательностей ICOSL человека, мыши, крысы и обезьяны для идентификации консервативных остатков. Основываясь на этом анализе, консервативные целевые остатки мутировали с помощью вырожденных кодонов, которые только указывали на консервативные аминокислотные изменения плюс остаток дикого типа. Остатки, которые не были консервативны, мутировали более агрессивно, но также включали остатки дикого типа. Во избежание чрезмерного мутагенеза целевого белка были размещены вырожденные кодоны, которые также кодировали остаток дикого типа. По той же причине одновременно мутагенезу были подвержены только вплоть до 20 положений. Эти остатки представляют собой комбинацию контактных остатков и неконтактных остатков области взаимодействия.

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. ECD-специфические олигонуклеотидные праймеры, которые отжигали на начале и конце ECD, соответственно, затем использовали для получения продукта ПЦР. ECD-специфические олигонуклеотиды, которые перекрываются на 40-50 п.о. с модифицированной версией вектора клонирования pBYDS03 (Life Technologies США), за пределами и включая сайты клонирования BamH1 и Kpn1, затем использовали для амплификации 100 мкг продукта ПЦР с предыдущей стадии для получения в общей сложности 5 мкг ДНК. Обе ПЦР проводились с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием мастермикса OneTaq 2x PCR (New England Biolabs, США). Второй продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки ПЦР (Qiagen, Германия) и ресуспендировали в стерильной деионизированной воде.

Для приготовления вставок в библиотеку модифицированную версию вектора pBYDS03 дрожжевого дисплея расщепляли рестрикционными ферментами BamH1 и Kpn1 (New England Biolabs, США), очищали большой векторный фрагмент в геле и растворяли в стерильной деионизированной воде. Готовая к электропорации ДНК для следующей стадии была получена путем смешивания 12 мкг библиотеки ДНК с 4 мкг линеаризованного вектора в общем объеме 50 мкл деионизированной и стерильной воды. Альтернативным способом создания целевых библиотек было проведение сайт-направленного мутагенеза (Multisite kit, Agilent, США) целевых ECD с помощью олигонуклеотидов, содержащих вырожденные кодоны. Этот подход был использован для создания суббиблиотек, предназначенных только для мутагенеза конкретных участков целевого белка. В этих случаях суббиблиотеки были перемешаны перед переходом к

стадиям отбора. В общем, размеры библиотеки находились в диапазоне от 10E7 до 10E8 клонов, причем суббиблиотеки находились только в диапазоне от 10E4 до 10E5. Для ICOSL были созданы большие библиотеки и суббиблиотеки.

A. Случайные библиотеки

Для идентификации вариантов ECD ICOSL, указанного в SEQ ID NO: 32, содержащей домен ECD, также были сконструированы случайные библиотеки, . ДНК, кодирующую ECD дикого типа, клонировали между сайтами BamH1 и Kpn1 модифицированного вектора pBYDS03 для дрожжевого дисплея. Затем ДНК подвергали мутагенезу с помощью набора Genemorph II (Agilent, США) для того, чтобы получить в среднем три-пять аминокислотных изменений на один вариант библиотеки. Затем подвергнутую мутагенезу ДНК амплифицировали с помощью двухступенчатой ПЦР и далее обрабатывали, как описано выше, для целевых библиотек.

ПРИМЕР 2

Введение ДНК-библиотек в дрожжи

Пример 2 описывает введение ДНК-библиотек ICOSL в дрожжи.

Чтобы ввести вырожденную и случайную библиотечную ДНК в дрожжи, подготавливали компетентные к электропорации клетки штамма дрожжей BJ5464 (ATCC.org, ATCC номер 208288) и подвергали электропорации на Gene Pulser II (Biorad, США) с помощью ДНК, готовой к электропорации, по существу со стадии выше, как описано (Colby, D.W. et al. 2004 Methods Enzymology 388, 348-358). Единственным исключением является то, что трансформированные клетки выращивали в неиндуцирующей минимальной селективной среде SCD-Leu для обеспечения селективного маркера LEU2, переносимого модифицированной плазмидой pBYDS03. Один литр среды SCD-Leu состоит из 14,7 г цитрата натрия, 4,29 грамма моногидрата лимонной кислоты, 20 г декстрозы, 6,7 г основы азотного агара для дрожжей Difco и 1,6 г дрожжевой синтетической исключающей средовой добавки без лейцина. Перед применением среду стерильно фильтровали с помощью 0,2 мкМ вакуумного фильтрующего устройства.

Размер библиотеки определяли путем рассева разведений свежесобранных клеток на планшетах с агаром SCD-Leu, с последующей экстраполяцией размера библиотеки из числа одиночных колоний при рассевании, при котором образовывались, по меньшей мере, 50 колоний на планшет. Как правило, размеры библиотек варьировали от 10E8 до 10E9 трансформантов на основе этого анализа разбавления. Остальную часть электропорированной культуры выращивали до насыщения в SCD-Leu и клетки из этой культуры снова субкультивировали (например, 1/100) в свежей SCD-Leu, чтобы

минимизировать фракцию нетрансформированных клеток. Для поддержания разнообразия библиотеки эта стадия субкультивирования проводилась с использованием инокулята, который содержал, по меньшей мере, 10х больше клеток, чем рассчитанный размер библиотеки. Клетки из второй насыщенной культуры ресуспендировали в свежей среде, содержащей 25% (масс./ об.) стерильного глицерина, до плотности 10E10/мл и замораживали и хранили при -80°C (сток замороженной библиотеки).

Размер библиотеки определяли путем рассева разведений свежесобранных клеток на чашках агара SCD-Leu с последующей экстраполяций размера библиотеки из числа отдельных колоний при рассевании, при котором образуются, по меньшей мере, 50 колоний на чашку.

Для отделения плазмиды от клеток, которые содержат два или более различных клонов библиотеки, количество клеток, соответствующее 10-кратному размеру библиотеки, отбирали из культуры SCD-Leu в течение ночи, субкультивировали 1/100 в свежей среде SCD-Leu и выращивали в течение ночи. Клетки из этой ночной культуры ресуспендировали в стерильном 25% (масс./ об.) глицерине до плотности 10 E10/мл и замораживали и хранили при -80 °C (сток замороженной библиотеки).

ПРИМЕР 3

Отбор дрожжей

Пример 3 описывает отбор дрожжей, экспрессирующих вариантные ICOSL с модифицированной аффинностью.

Количество клеток, по меньшей мере, в 10 раз превышающее размер библиотеки, оттаивали из отдельных библиотечных стоков, суспендировали до 0,1 × 10E6 клеток/мл в неиндуцирующей среде SCD-Leu и выращивали в течение ночи. На следующий день количество клеток, в 10 раз превышающее размер библиотеки, центрифугировали при 2000 об./ мин. в течение двух минут и ресуспендировали до 0,5 × 10E6 клеток/мл в индуцирующей среде SCDG-Leu. Один литр индуцирующей среды SCDG-Leu состоит из 5,4 г Na2HPO4, 8,56 г NaH2PO4 * H2O, 20 г галактозы, 2,0 г декстрозы, 6,7 г основы азотного агара для дрожжей Difco и 1,6 г дрожжевой синтетической исключающей средовой добавки без лейцина, растворенных в воде, и стерилизованных через 0,22 мкм мембранное фильтрующее устройство. Культуру выращивали в течение двух дней при 20°C, чтобы индуцировать экспрессию библиотечных белков на поверхности клеток дрожжей.

Клетки процессировали с помощью магнитных гранул, чтобы уменьшить количество несвязывающих молекул и обогатить все вариантные ICOSL, которые обладают способностью связывать их экзогенные рекомбинантные контрструктурные

белки. Затем следовало от двух до трех циклов сортировки проточной цитометрией с использованием окрашивания экзогенными контрструктурными белками для обогащения фракции дрожжевых клеток, презентирующих улучшенные связывающие молекулы. Обогащение с помощью магнитных гранул и отбор с помощью проточной цитометрии в основном описаны в Miller, K.D. Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008.

С помощью библиотеки ICOSL, получали следующие целевые лигандные белки у R & D Systems (США): rCD28.Fc человека (т.е. рекомбинантный гибридный белок CD28-Fc), rCTLA4.Fc и rICOS.Fc. Магнитные гранулы со стрептавидином получали у New England Biolabs, США. Для биотинилирования контрструктурного белка использовали биотинилирующий набор № 21955, Life Technologies, США. Для двухцветной, проточной цитометрической сортировки использовали сортировщик Becton Dickinson FACS Aria II. Уровни презентации ICOSL контролировали антителом против гемагглютинина, помеченным Alexafluor 488 (Life Technologies, США). Лиганд-связывающие Fc-гибридные белки rCD28.Fc, rCTLA4.Fc, или rCD112R.Fc, детектировали с помощью PE-конъюгированных козьих Fab, специфичных к человеческому Ig (Jackson ImmunoResearch, США). Двойные дрожжи были отобраны выше порогового значения с использованием параметров прямого рассеяния (FSC)/бокового рассеяния (SSC), а сортировочные ворота были основаны на более высоком лигандном связывании, обнаруженном в FL4, который обладал более ограниченным связыванием экспрессии метки в FL1.

Дрожжи, полученные в результате проточной цитометрической сортировки анализировали на предмет более высокой удельной аффинности связывания. Полученные в результате отсортированные дрожжи размножали и повторно индуцировали для того, чтобы экспрессировать специфические варианты доменов IgSF с модифицированной аффинностью, которые они кодируют. Затем эту популяцию можно было сравнить с родительским штаммом дрожжей дикого типа или с любыми другими дрожжами, такими как популяция дрожжей, отобранных на гранулах, с помощью проточной цитометрии.

Для ICOSL результаты второй сортировки (F2) сравнивались с родительскими дрожжами ICOSL для связывания каждого из числа rICOS.Fc, rCD28.Fc и rCTLA4.Fc путем двойного окрашивания каждой популяции с помощью экспрессии анти-HA (гемагглютинин) метки вторичного антитела против Fc человека для детекции связывания лиганда.

В случае вариантных ICOSL в дрожжах, отобранных по связыванию с ICOS, результаты сортировки F2 дали значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) 997 при окрашивании с помощью 5,6 нМ rICOS.Fc, тогда как MFI родительского штамма ICOSL равно 397 при окрашивании в той же самой концентрации rICOS.Fc. Это

представляет собой приблизительно трехкратное улучшение среднего связывания в этом выбранном пуле клонов F2, и прогнозируется, что отдельные клоны из этого пула будут иметь значительно улучшенное MFI/аффинности при индивидуальном тестировании.

В случае вариантных ICOSL в дрожжах, выбранных для связывания с CD28, результаты сортировки F2 дали значения MFI 640 при окрашивании 100 нМ rCD28.Fc, тогда как MFI родительского штамма ICOSL было равно 29 при окрашивании с той же концентрацией rCD28.Fc (улучшение в 22 раза). В случае вариантов дрожжей ICOSL, выбранных для связывания с CTLA4, результаты сортировки F2 дали значения MFI 949 при окрашивании 100 нМ rCTLA4.Fc, тогда как MFI родительского штамма ICOSL измеряли при 29 при окраске с той же концентрацией rCTLA4.Fc (32-кратное улучшение).

Важно отметить, что значения MFI всех результатов F2, описанных выше, при измерении антителом против HA-метки на FL1, не увеличивались и иногда уменьшались по сравнению с штаммами дикого типа, что указывает на то, что увеличенное связывание было не функцией повышенной экспрессии выбранных вариантов на поверхность дрожжей, а валидированной стратегией отбора выше порогового значения только для отбора средних и низких экспрессоров с высоким связыванием лиганда.

Отобранные вариантные ICOSL ECD домены были дополнительно отформатированы в виде гибридных белков и испытаны на связывание и функциональную активность, как описано ниже.

ПРИМЕР 4

Переформатирование результатов отбора в виде Fc-гибридов и в различных типах иммуномодулирующих белков

В Примере 4 описывается переформатирование результатов отбора идентифицированного в Примере 3 в качестве иммуномодулирующих белков, содержащих модифицированный (вариантный) внеклеточный домен (ECD) ICOSL, слитый с молекулой Fc (вариантные гибридные молекулы ECD-Fc).

Клетки, полученные на выходе конечной проточной цитометрической сортировки ICOSL, выращивали до предельной плотности в среде SCD-Leu. Плазмидную ДНК в случае каждого результата выделяли с использованием набора для выделения дрожжевой плазмидной ДНК (Zymo Research, США). Для Fc-гибридов ПЦР-праймеры с добавленными сайтами рестрикции, подходящими для клонирования в выбранный Fc-гибридный вектор, использовали для периодической амплификации из препаратов плазмидной ДНК, кодирующей ДНК мутантных целевых ECD. После рестрикционного гидролиза продукты ПЦР лигировали в соответствующий Fc-вектор с последующей химической трансформацией в штамм XL1 Blue E.Coli (Agilent, США) или NEB5alpha

(New England Biolabs), как указано поставщиком. Примером Fc-гибридного вектора является pFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen, США).

Разбавления реакций трансформации высевали на LB-агар, содержащий 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США) для получения отдельных колоний. До 96 колоний из каждой трансформации затем выращивали в 96-луночных планшетах до насыщения в течение ночи при 37 °C в LB-бульоне (Teknova cat # L8112) и небольшую аликвоту из каждой лунки представляли для секвенирования ДНК ECD-вставки для того, чтобы идентифицировать мутацию(и) во всех клонах. Подготовка образца для секвенирования ДНК проводилась с использованием протоколов, предлагаемых поставщиком услуг (Genewiz, Саус Плейнфилд, Нью-Джерси). После удаления образца для секвенирования ДНК к оставшимся культурам добавляли глицерин для получения конечного содержания глицерина 25% и планшеты хранили при -20°C для будущего применения в качестве мастер-планшетов (см. ниже). В ином случае, образцы для секвенирования ДНК были получены путем пересева репликацией из растущих жидких культур на планшетах с твердым агаром с использованием одноразового 96-луночного репликатора (VWR, США). Эти планшеты инкубировали в течение ночи для получения ростовых патчей, при этом планшеты были предлагаются Genewiz с их указаниями. В некоторых случаях для проверки мутаций выполняли повторное ресеквенирование.

После анализа представляющих интерес клонов из результатов анализа данных секвенирования ДНК, полученных от Genewiz, клоны, представляющие интерес, извлекали из мастер-планшетов и индивидуально выращивали до насыщения в 5 мл жидкого LB-бульона, содержащего 100 мкг/мл карбенициллина (Teknova, США) и 2 мл каждой культуры затем использовали для приготовления около 10 мкг минипрепаративной плазмидной ДНК каждого клона с использованием стандартного набора, такого как набор Pureyield (Promega, США). Идентификация клонов, представляющих интерес, обычно включает следующие стадии. Сначала файлы данных последовательности ДНК загружались с веб-сайта Genewiz. Затем все последовательности обрабатывали вручную, так чтобы они начинались с начала кодирующей области ECD. Проверенные последовательности затем пакетно транслировали с использованием подходящей программы, доступной по URL: www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/. Затем транслированные последовательности выравнивали с использованием подходящей программы, доступной по URL: multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html. Кроме того, последовательности Genewiz были обработаны для создания выравниваний с использованием программного обеспечения Ugene (http://ugene.net).

Клоны, представляющие интерес, затем идентифицировали с использованием

следующих критериев: 1.) идентичный клон встречается, по меньшей мере, два раза при выравнивании и 2.) мутация происходит, по меньшей мере, два раза в выравнивании и предпочтительно в отдельных клонах. Клоны, которые удовлетворяют хотя бы одному из этих критериев, были клонами, которые были обогащены нашим процессом сортировки из-за улучшения связывания.

Для получения иммуномодулирующих белков, которые являются Fc-гибридными белками, содержащими ECD из ICOSL, по меньшей мере, с одним доменом с модифицированной аффинностью (например, вариантный ICOSL ECD-Fc), кодирующую нуклеотидную молекулу получали для кодирования белка, спроектированного следующим образом: сигнальный пептид за которым следует вариантный (мутантный) ECD, за которым следует линкер из трех аланинов (AAA), за которым следует человеческий IgG1 Fc, содержащий мутацию N82G, относительно референсного Fc IgG1 человека или Fc IgG1 человека дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 226 (что соответствует N297G по нумерации EU). Этот примерный Fc также содержал стабилизирующие цистеиновые мутации R77C и V87C и замену остатка цистеина на остаток серина в положении 220 (C220S), по нумерации EU (соответствующему положению 5 (C5S) относительно референсного Fc IgG1 человека или Fc IgG1 человека дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 226 (соответствует R292C, V302C и C220S, соответственно, по нумерации EU). В некоторых случаях сайт клонирования NotI, который вносит вклад в линкерную последовательность AAA, был удален для создания прямого слияния ICOSL ECD и начала Fc. Поскольку конструкции не включают никаких легких цепей антител, которые могут образовывать ковалентную связь с цистеином, человеческий IgG1 Fc также содержал замену остатков цистеина на остаток серина в положении 5 (C5S) по сравнению с диким или немодифицированным Fc, представленным в SEQ ID NO: 226.

ПРИМЕР 5

Экспрессия и очистка Fc-гибридов

Пример 5 описывает крупномасштабную экспрессию и очистку Fc-гибридных белков, содержащих вариантный ECD ICOSL, как описано в Примерах выше.

Рекомбинантные вариантные Fc-гибриды были получены из адаптированных к суспензии клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293 с помощью экспрессирующей системы Expi293 (Invitrogen, США). 4 мкг каждой плазмидной ДНК с предыдущей стадии добавляли к 200 мкл Opti-MEM (Invitrogen, США) с одновременным отдельным добавлением 10,8 мкл ExpiFectamine к другим 200 мкл Opti-MEM. Через 5 минут 200 мкл плазмидной ДНК смешивали с 200 мкл ExpiFectamine и дополнительно

инкубировали в течение дополнительных 20 минут перед добавлением этой смеси к клеткам. Десять миллионов клеток Expi293 распределяли в отдельные стерильные 10 мл лунки 24-луночного глубокого планшета с коническим дном (Thomson Instrument Company, США) в объеме 3,4 мл среды Expi293 (Invitrogen, США). Планшеты встряхивали в течение 5 дней при 120 об./ мин. в инкубаторе для клеточных культур млекопитающих при 95% влажности и 8% CO2. После 5-дневной инкубации клетки осаждали и удаляли культуральные надосадочные жидкости.

Белок очищали из надосадочных жидкостей с помощью высокопроизводительного набора для очистки с протеином А в 96 луночном формате согласно протоколу производителя (каталожный номер 45202, Life Technologies, США). В полученных элюированных фракциях заменяли буфер на PBS с использованием спин-обессоливающего планшета Zeba 96 (каталожный номер 89807, Life Technologies, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Очищенный белок определяли количественно при оптической плотности 280 нм, измеренной прибором Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США), и степень чистоты белка оценивали путем загрузки 5 мкг белка на готовые полиакриламидные гели NUPAGE (Life Technologies, США) в условиях денатурации и восстановления и последующего гель-электрофореза. Белки визуализировали в геле с использованием стандартного окрашивания Кумасси.

ПРИМЕР 6

Оценка связывания и активности молекул, содержащих домен IgSF со зрелой аффинностью

А. Связывание с контрструктурами, экспрессируемыми клетками

В этом примере описаны исследования связывания Fc-гибридов для того, чтобы оценить специфичность и аффинность вариантных иммуномодулирующих белков с доменом ICOSL к когнатным партнерам связывания.

Для получения клеток, экспрессирующих когнатные партнеры связывания, конструкции на основе полноразмерных последовательностей млекопитающих для поверхностной экспрессии для каждого из CD28 и ICOS человека были спроектированы в экспрессирующем векоре pcDNA3.1 (Life Technologies) и получены с помощью GenScript, США. Исследования связывания проводились на трансфицированных клетках HEK293, полученных для экспрессии полноразмерных поверхностных лигандов млекопитающих с использованием системы транзиторной трансфекции (Life Technologies, США), описанной выше. В качестве контроля также оценивали связывание с ложными (нетрансфицированными) клетками. Определяли количество клеток, необходимых для эксперимента, и выполняли в соответствующем 30 мл масштабе с использованием

рекомендованного изготовителем протокола. Для каждой 30 мл трансфекции CD28, ICOS или отрицательного контроля 75 миллионов клеток Expi293F инкубировали с 30 мкг ДНК экспрессирующей конструкции и 1,5 мл разбавленного реактива ExpiFectamine 293 в течение 48 ч, после чего клетки собирали для окрашивания.

Для окрашивания с помощью проточной цитометрии 200 000 клеток соответствующей транзиторной трансфекции или отрицательного контроля (ложных клеток) высевали в 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в буфере для окрашивания (PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) и 0,1% азида натрия) в течение 20 минут для блокирования неспецифического связывания. Затем клетки снова центрифугировали и ресуспендировали в 50 мкл буфера для окрашивания, содержащем 100 нМ-1 нМ вариантного иммуномодулирующего белка, в зависимости от эксперимента с каждым из кандидатных вариантного CD80 Fc, вариантного ICOSL Fc или стекового вариантного IgSF Fc-гибридного белка. Первичное окрашивание проводили на льду в течение 45 минут, перед двухкратной промывкой клеток в буфере для окрашивания. PE-конъюгированные антитела против Fc человека (Jackson ImmunoResearch, США) разбавляли 1: 150 в 50 мкл окрашивающего буфера и добавляли к клеткам и инкубировали еще 30 минут на льду. Вторичное антитело дважды вымывали, клетки фиксировали в 4% формальдегиде/PBS и образцы анализировали на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, США) или проточном цитометре Hypercyt (Intellicyte, США).

Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали для каждого трансфектанта и родительской линии отрицательного контроля с помощью программного обеспечения Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США), или проточного цитометра Hypercyt (Intellicyte, США).

B. Характеристика биоактивности

В этом примере далее описывается характеристика биоактивности вариантного белка Fc-гибрида в in vitro анализах первичных Т-клеток человека.

1. Реакция смешанных лимфоцитов (MLR)

Биоактивность растворимого rICOSL.Fc тестировали в реакции смешанных лимфоцитов (MLR) человека. Первичные дендритные клетки человека (DC) получали путем культивирования моноцитов, выделенных из PBMC (BenTech Bio, США) in vitro в течение 7 дней с 500 Ед./ мл rIL-4 (R & D Systems, США) и 250 Ед./ мл rGM-CSF (R & D Systems, США) в среде Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). 10 000 зрелых DC и 100 000 очищенных аллогенных CD4+ Т-клеток (BenTech Bio, США) совместно культивировали с гибридным белком ICOSL, гибридным белком CF80 Fc или контролем в 96-луночных

круглодонных планшетах в 200 мкл конечного объема среды Ex-Vivo 15. На 5-й день анализировали секрецию IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях с помощью набора ELISA для человеческого IFN-гамма Duoset (R & D Systems, США). Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного ридера VMax ELISA (Molecular Devices, США) и определяли по титрованному стандарту rIFN-гамма, включенному в набор набора для IFN-гамма Duo (R & D Systems, США). Второй протокол MLR состоял из человеческих первичных дендритных клеток (DC), полученных при культивировании моноцитов, выделенных из PBMC (BenTech Bio, США) in vitro в течение 7 дней с 50 нг/мл rIL-4 (R & D Systems, США) и 80 нг/мл rGM -CSF (R & D Systems, США) в среде Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). В дни 3 и 5 половину среды удаляли и заменяли свежей средой, содержащей 50 нг/мл rIL-4 и 80 нг/мл rGM-CSF. Чтобы полностью индуцировать созревание DC, на 6 день добавляли липополисахарид (LPS) (InvivoGen Corp.,США) при 100 нг/мл в культурах DC и клетки инкубировали в течение дополнительных 24 часов. Около 10 000 зрелых DC и 100 000 очищенных аллогенных CD3 + Т-клеток (BenTech Bio, США) совместно культивировали с гибридными белками IFOSL Fc и контролем в 96 -луночных круглодонных планшетах в 200 мкл конечного объема среды Ex-Vivo 15. На 5-й день секрецию IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях анализировали с использованием набора ELISA для человеческого IFN-гамма Duoset (R & D Systems, США). Оптическую плотность измеряли на мультирежимного ридере для микропланшетов BioTek Cytation (BioTek Corp., США) и определяли по титрованному стандарту rIFN-гамма, включенному в набор набора для IFN-гамма Duo (R & D Systems, США).

1. Анализ коиммобилизации с Анти-CD3

Костимулирующую биологическую активность гибридных вариантов ICOSL определяли в анализах коиммобилизации с анти-CD3. 1nM или 10 нМ мышиного анти-CD3 человека (OKT3, Biolegends, США) разводили в PBS с 1 нМ-80 нМ вариантных белков RICOSL.Fc. Эту смесь добавляли к обработанным 96-луночным планшетам с плоским дном для тканевых культур (Corning, США) в течение ночи для облегчения прилипания стимулирующих белков к лункам планшета. На следующий день несвязанный белок смывали с планшетов и в каждую лунку добавляли 100000 очищенных человеческих пан Т-клеток (BenTech Bio, США) или клона Т-клетки человека BC3 (Astarte Biologics, США) в конечном объеме 200 мкл среды Ex- Vivo 15 (Lonza, Швейцария). В некоторых случаях человеческие пан-Т-клетки были помечены 0,25 мкМ карбоксифлуоресцеина сукцинимидилового эфира (CFSE, ThermoFisher Scientific, США).

Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с помощью набора Duoset ELISA (R & D Systems, США), как упомянуто выше. Клеточную пролиферация определяли по проценту исходных клеток, которые вошли в деление, путем измерения с помощью разведения CFSE на клетках, окрашенных флуоресцентно-конъюгированными анти-CD4, анти-CD8 антителами (BD, США) или общими Т-клетками посредством проточного цитометрического анализа на LSR II (BD, США).

C. Результаты

Результаты исследований связывания и активности для примерных протестированных вариантов приведены в Таблице 7, в котором указаны аминокислотные замены (замещения) в примерном домене IgSF в ECD из ICOSL, отборанных при скрининге созревшей аффинности относительно соответствующих когнатных структур ICOS и CD28. В таблицах примерные аминокислотные замены обозначаются номером аминокислотного положения, аналогичного соответствующей референсной (например, немодифицированной) последовательности ECD, как указано далее. Например, референсная (например, немодифицированная) последовательность ECD в Таблице 7 (WT ICOSL) является (например, немодифицированной) последовательностью ECD ICOSL, изложенной в SEQ ID NO: 32. Положение аминокислоты указывается посередине с соответствующей референсной (например, немодифицированной или дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной вариантной аминокислотной заменой, указанной после номера. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для вариантного ECD для каждой вариантной гибридной молекулы ECD-Fc.

Также показана активность связывания, измеренная по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой вариантной Fc-гибридной молекулы с клетками, сконструированными для экспрессии когнатного контрструктурного лиганда, и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей референсной (например, немодифицированной) гибридной молекулы ECD-Fc, не содержащей аминокислотной замены(замен) с тем же самым экспрессируемым в клетке контрструктурным лигандом. Функциональная активность вариантных Fc-гибридных молекул в отношении модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), получаемых либо i) с указанной вариантной гибридной молекулой ECD-Fc, коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной гибридной молекулой ECD-Fc в анализе MLR. В Таблице также показано соотношение IFN-гамма, продуцируемого каждым вариантным ECD-Fc, по сравнению с соответствующим

немодифицированным ECD-Fc (дикого типа) в обоих функциональных анализах.

Как показано, отборы привели к идентификации ряда вариантных доменов ICOSL IgSF, которые были модифицированы по аффинности, демонстрирующих повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях и более чем с одним, когнатным контрструктурным лигандом. Кроме того, результаты показали, что модификация аффинности вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности как для увеличения, так и уменьшения иммунологической активности в зависимости от формата молекулы. Например, коиммобилизация лиганда, вероятно, обеспечивает мультивалентное взаимодействие с клеткой для кластеризации или увеличения авидности, что способствует активности агонистов и повышает активацию Т-клеток по сравнению с референсной (например, немодифицированной или дикого типа) молекулой ECD-Fc, не содержащей аминокислотную замену(ы). Однако, когда молекула представлена в виде двухвалентной молекулы Fc в растворе, те же вариантные домены IgSF проявляют антагонистическую активность в отношении уменьшения активации Т-клеток по сравнению с референсной (например, немодифицированной или дикого типа) молекулой ECD-Fv, не содержащей аминокислотную замену(ы).

ТАБЛИЦА 7. Варианты ICOSL, выбранные против CD28 или ICOS. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание		Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		ICOS OD (исходное соотноше-ние)	CD28 MFI (исходное соотноше-ние)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотноше-ние)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотноше-ние)
N52S	109	1,33 (1,55)	162 (9,00)	1334 (1,93)	300 (0,44)
N52H	110	1,30 (1,51)	368 (20,44)	1268 (1,83)	39 (0,06)
N52D	111	1,59 (1,85)	130 (7,22)	1943 (2,80)	190 (0,28)
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	1,02 (1,19)	398 (22,11)	510* (1,47*)	18 (0,03)
N52H/N57Y/Q100P	113	1,57 (1,83)	447 (24,83)	2199 (3,18)	25 (0,04)
N52S/Y146C/Y152C	114	1,26 (1,47)	39 (2,17)	1647 (2,38)	152 (0,22)
N52H/C198R	115	1,16	363	744*	ND

ТАБЛИЦА 7. Варианты ICOSL, выбранные против CD28 или ICOS. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание		Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		ICOS OD (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
		(1,35)	(20,17)	(2,15*)	(ND)
N52H/C140del/T225A	372	ND (ND)	154 (8,56)	522* (1,51*)	ND (ND)
N52H/C198R/T225A	117	1,41 (1,64)	344 (19,11)	778* (2,25*)	0 (0)
N52H/K92R	118	1,48 (1,72)	347 (19,28)	288* (0,83*)	89 (0,13)
N52H/S99G	119	0,09 (0,10)	29 (1,61)	184* (0,53*)	421 (0,61)
N52Y	120	0,08 (0,09)	18 (1,00)	184* (0,53*)	568 (0,83)
N57Y	121	1,40 (1,63)	101 (5,61)	580* (1,68*)	176 (0,26)
N57Y/Q100P	122	0,62 (0,72)	285 (15,83)	301* (0,87*)	177 (0,26)
N52S/S130G/Y152C	123	0,16 (0,19)	24 (1,33)	266* (0,77*)	1617 (2,35)
N52S/Y152C	124	0,18 (0,21)	29 (1,61)	238* (0,69*)	363 (0,53)
N52S/C198R	125	1,80 (2,09)	82 (4,56)	1427 (2,06)	201 (0,29)
N52Y/N57Y/Y152C	126	0,08 (0,09)	56 (3,11)	377* (1,09*)	439 (0,64)
N52Y/N57Y/H129P/C198R	127	ND (ND)	449 (24,94)	1192 (1,72)	ND (ND)
N52H/L161P/C198R	128	0,18 (0,21)	343 (19,05)	643* (1,86*)	447 (0,65)
N52S/T113E	129	1,51 (1,76)	54 (3,00)	451* (1,30*)	345 (0,50)
S54A	130	1,62 (1,88)	48 (2,67)	386* (1,12*)	771 (1,12)
N52D/S54P	368	1,50 (1,74)	38 (2,11)	476* (1,38*)	227 (0,33)
S54F/V193A	905	0,51 (0,59)	16 (0,87)	294 (0,85)	262 (0,38)
N52K/L208P	132	1,91 (2,22)	291 (16,17)	1509 (2,18)	137 (0,20)
N52S/Y152H	133	0,85	68	2158	221

ТАБЛИЦА 7. Варианты ICOSL, выбранные против CD28 или ICOS. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание		Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		ICOS OD (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
		(0,99)	(3,78)	(3,12)	(0,32)
N52D/V151A	134	0,90 (1,05)	19 (1,06)	341* (0,99*)	450 (0,66)
N52H/I143T	135	1,83 (2,13)	350 (19,44)	2216 (3,20)	112 (0,16)
N52S/L80P	136	0,09 (0,10)	22 (1,22)	192* (0,55*)	340 (0,49)
F120S/Y152H/N201S	137	0,63 (0,73)	16 (0,89)	351* (1,01*)	712 (1,04)
N52S/R75Q/L203P	138	1,71 (1,99)	12 (0,67)	1996 (2,88)	136 (0,20)
N52S/D158G	139	1,33 (1,55)	39 (2,17)	325* (0,94*)	277 (0,40)
N52D/Q133H	140	1,53 (1,78)	104 (5,78)	365* (1,05*)	178 (0,26)
WT ICOSL	32	0,86 (1,00)	18 (1,00)	692 / 346* (1,00)	687 (1,00)

*: родительское соотношение, рассчитанное с использованием 346 пг/мл IFN-гамма для WT ICOSL

Анализы связывания повторяли, по существу, как описано выше, за исключением того, что связывание также оценивали против клеток, экспрессирующих полноразмерный CTLA4 человека. Варианты гибридных белков ICOSL Fc также были дополнительно оценены в анализе коиммобилизации с анти-CD3, как описано выше. Результаты подтвердили идентификацию ряда вариантных доменов ICOSL IgSF, которые проявили повышенную аффинность связывания, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях и более чем с одним когнатным лигандом. Кроме того, результаты показали, что аффинная модификация вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности в анализе коиммобилизации.

ПРИМЕР 7

Дополнительные домены IgSF с модифицированной аффинностью

В этих примерах описываются конструирование, создание и скрининг

дополнительных сенсибилизированных модифицированных CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) и NKM30 иммуномодулирующих белков, которые являются другими компонентами иммунного синапса (IS), которые продемонстрировали двойную роль как в иммунной активации, так и в ингибировании. Эти примеры демонстрируют, что аффинная модификация доменов IgSF дает белки, которые могут действовать как для повышения, так и для снижения иммунологической активности. В этой работе также описываются различные комбинации таких доменов, слитых парами (то есть сложенных в стек), с вариантным ICOSL с модифицированной аффинностью с образованием иммуномодулирующего белка типа II для получения иммуномодулирующей активности.

Мутантные ДНК-конструкции человеческих CD80, CD86 и NKp30 IgSF доменов для трансляции и экспрессии в виде библиотек для дрожжевого дисплея получали по существу так же, как описано в Примере 1. Для библиотек, которые нацелены на конкретные остатки целевого белка, для полной или частичной рандомизации с вырожденными кодонами, кодирующие ДНК для внеклеточных доменов (ECD) человеческих CD80 (SEQ ID NO: 28) и NKp30 (SEQ ID NO: 54) были заказаны у Integrated DNA Technologies (Коралвилл, Айова) в виде набора перекрывающихся олигонуклеотидов длиной до 80 пар оснований (п.о.). В ином случае остатки мутировали путем сайт-направленного мутагенеза по существу так, как описано в Примере 1. В ином случае случайные библиотеки были сконструированы для идентификации вариантов ECD CD80 (SEQ ID NO: 28), CD86 (SEQ ID NO: 29) и NKp30 (SEQ ID NO: 54), по существу, как описано в Примере 1.

Целевую ДНК и ДНК случайной библиотеки вводили в дрожжи, по существу так, как описано в Примере 2, для получений дрожжевой библиотеки. Библиотеки использовали для отбора дрожжей, экспрессирующих варианты CD80, CD86 и NKp30 с модифицированной аффинностью, по существу так, как описано в Примере 3. Клетки обрабатывали для уменьшения количества невзаимодействующих молекул и обогащали варианты CD80, CD86 или NKp30 с возможностью связывания их экзогенных рекомбинантных контрструктурных белков по существу так, как описано в Примере 3. Например, дрожжи презентировали целевые или случайные библиотеки CD80 для каждого из CD28, CTL-4 и PD-L1 по отдельности. Затем следовало от двух до трех циклов сортировки проточной цитометрией с использованием окрашивания экзогенными контрструктурными белками для обогащения фракции дрожжевых клеток, презентирующих улучшенные связывающие молекулы. Обогащение с помощью магнитных гранул и отбор с помощью проточной цитометрии в основном описаны в Keith D. Miller,1 Noah B. Pefaur,2 and Cheryl L. Baird1 Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30,

July 2008.

С помощью библиотек CD80, CD86, ICOSL и NKp30 в R & D Systems (США) были получены следующие целевые белки-лиганды: человеческий rCD28.Fc (т.е. рекомбинантный гибридный белок CD28-Fc), rPDL1.Fc, rCTLA4.Fc и rB7H6.Fc. Двухцветную проточную цитометрию проводили по существу, как описано в Примере 3. Дрожжи, полученные в результате проточной цитометрической сортировки анализировали на предмет более высокой удельной аффинности связывания. Полученные в результате отсортированные дрожжи размножали и повторно индуцировали для того, чтобы экспрессировать специфические варианты доменов IgSF с модифицированной аффинностью, которые они кодируют. Затем эту популяцию можно было сравнить с родительским штаммом дрожжей дикого типа или с любыми другими дрожжами, такими как популяция дрожжей, отобранных на гранулах, с помощью проточной цитометрии.

В случае дрожжей с вариантными NKp30, отобранными по связыванию с B7-H6, выходы сортировки F2 дали значения MFI равные 533 при окраске с помощью 16,6 нМ rB7H6. Fc, тогда как родительский штамм NKp30 дал значение MFI равное 90 при окрашивании той же концентрацией rB7H6.Fc (6-кратное улучшение).

Среди вариантных NKp30, которые были идентифицированы, был вариант, который содержал мутацию L30V/A60V/S64P/S86G относительно положений во внеклеточном домене NKp30, соответствующих положениям, представленным в SEQ ID NO: 54. Среди идентифицированных вариантных CD86 был вариант, который содержал мутации Q35H/H90L/Q102H относительно положений во внеклеточном домене CD86, соответствующих положениям, представленным в SEQ ID NO: 29. Среди идентифицированных вариантных CD80 были варианты, приведенные в Таблице 8 и дополнительно описанные ниже.

Как и с ICOSL, значения MFI для всех выходов F2, описанных выше, при измерении антителом против HA-метки на FL1, не увеличивались и иногда уменьшались по сравнению с штаммами дикого типа, что указывает на то, что увеличенное связывание не было функцией повышенной экспрессии отобранных вариантов на поверхности дрожжей, а валидированных стратегий отбора выше порогового значения только для отбора средних и низких экспрессоров с высоким связыванием лиганда.

Примерные результаты отбора были переформатированы в виде иммуномодулирующих белков, содержащих (вариантнтный) внеклеточный домен (ECD) с модифицированной аффинностью из CD80, скомбинированный с молекулой Fc (вариантные гибридные молекулы ECD-Fc) по существу, как описано в Примере 4, и Fc-гибридный белок экспрессировали и очищали, по существу, как описано в Примере 5.

Затем оценивали по существу связывание примерных вариантных гибридных белков CD80-Fc с экспрессированными клетками контрструктурами, как описано в Примере 6. Для получения клеток, экспрессирующих когнатные партнеры связывания, были созданы конструкции для поверхностной экспрессии полноразмерных белков млекопитающих для каждого из CD28, CTLA4 и PD-L1 человека, как описано в Примере 6. Исследования связывания и проточная цитометрия проводились по существу, как описано в Примере 6. Кроме того, биологическая активность вариантного белка Fc-гибрида характеризовали либо методом реакции смешанных лимфоцитов (MLR), либо коиммобилизацией с анти-CD3, по существу, как описано в Примере 6.

Результаты исследований связывания и активности для примерных протестированных вариантов приведены в Таблицах 8 и 9. В частности, в Таблице 8 приведены примерные аминокислотные замены (замещения) домена IgSF в ECD из CD80, выбранных скринингом для созревания аффинности против соответствующей когнатной структуры CD28. Таблица 9 демонстрирует примерные аминокислотные замены (замещения) домена IgSF в ECD из CD80, выбранных скринингом по созреванию аффинности против соответствующей когнатной структуры PD-L1. Как и выше, для каждой Таблицы примерные аминокислотные замены обозначаются номером аминокислотного положения, аналогичного соответствующему в референсной (например, немодифицированной) последовательности ECD. Например, референсная (например, немодифицированная) последовательность ECD в таблицах 8 и 9 представляет собой немодифицированную последовательность ECD CD80, представленную в SEQ ID NO: 28. Положение аминокислоты указывается посередине с соответствующей референсной (например, немодифицированной) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной вариантной аминокислотной заменой, указанной после номера. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для вариантного ECD для каждой вариантной гибридной молекулы ECD-Fc.

Также показана активность связывания, измеренная по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой вариантной Fc-гибридной молекулы с клетками, сконструированными для экспрессии когнатного контрструктурного лиганда, и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей референсной (например, немодифицированной) гибридной молекулы ECD-Fc, не содержащей аминокислотной замены (замен) к одному и тому же клеточно-экспрессируемому контрструктурному лиганду. Функциональная активность вариантных Fc-гибридных молекул в отношении модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях

(пг/мл), получаемых либо i) с указанной вариантной гибридной молекулой ECD-Fc, коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной гибридной молекулой ECD-Fc в анализе MLR. В таблицах также показано соотношение IFN-гамма, продуцируемое каждым вариантным ECD-Fc, по сравнению с соответствующим референсным (например, немодифицированным) ECD-Fc в обоих функциональных анализах.

Как показано, отборы привели к идентификации ряда доменных вариантов CD80 IgSF, модифицированных по аффинности, которые демонстрировали повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях и более чем с одним, когнатным контрструктурным лигандом. Кроме того, результаты показали, что модификация аффинности вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности как для увеличения, так и уменьшения иммунологической активности в зависимости от формата молекулы. Например, коиммобилизация лиганда, вероятно, обеспечивает мультивалентное взаимодействие с клеткой для кластеризации или увеличения авидности, что способствует активности агонистов и повышает активацию Т-клеток по сравнению с референсной (например, немодифицированной или дикого типа) молекулой ECD-Fc, не содержащей аминокислотную замену(ы). Однако, когда молекула представлена в виде двухвалентной молекулы Fc в растворе, те же вариантные домены IgSF проявляют антагонистическую активность в отношении уменьшения активации Т-клеток по сравнению с референсной (например, немодифицированной или дикого типа) молекулой ECD-Fc, не содержащей аминокислотную замену(ы).

ТАБЛИЦА 8. Варианты CD80, отобранные против CD28. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) CD80	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	PD-L1 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
L70Q/A91G/N144D	508	125 (1,31)	283 (1,36)	6 (0,08)	93 (1,12)	716 (0,83)
L70Q/A91G/T130A	56	96 (1,01)	234 (1,13)	7 (0,10)	99 (1,19)	752 (0,87)
L70Q/A91G/I118A/ T120S/T130A/K169E	59	123 (1,29)	226 (1,09)	7 (0,10)	86 (1,03)	741 (0,86)

ТАБЛИЦА 8. Варианты CD80, отобранные против CD28. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) CD80	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	PD-L1 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
V4M/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	510	89 (0,94)	263 (1,26)	6 (0,09)	139 (1,67)	991 (1,14)
L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	59	106 (1,12)	263 (1,26)	6 (0,09)	104 (1,25)	741 (0,86)
V20L/L70Q/A91S/I118V/T120S/T130A	513	105 (1,11)	200 (0,96)	9 (0,13)	195 (2,34)	710 (0,82)
S44P/L70Q/A91G/T130A	61	88 (0,92)	134 (0,64)	5 (0,07)	142 (1,71)	854 (0,99)
L70Q/A91G/E117G/I118V/T120S/T130A	514	120 (1,27)	193 (0,93)	6 (0,08)	98 (1,05)	736 (0,85)
A91G/I118V/T120S/T130A	515	84 (0,89)	231 (1,11)	44 (0,62)	276 (3,33)	714 (0,82)
L70R/A91G/I118V/T120S/T130A/T199S	516	125 (1,32)	227 (1,09)	6 (0,09)	105 (1,26)	702 (0,81)
L70Q/E81A/A91G/I118V/T120S/I127T/T130A	517	140 (1,48)	185 (0,89)	18 (0,25)	98 (1,18)	772 (0,89)
L70Q/Y87N/A91G/T130A	66	108 (1,13)	181 (0,87)	6 (0,08)	136 (1,63)	769 (0,89)
T28S/L70Q/A91G/I118V/E95K/T120S/I126V/T130A/K169E	518	32 (0,34)	65 (0,31)	6 (0,08)	120 (1,44)	834 (0,96)
N63S/L70Q/A91G/S114T/I118V/T120S/T130A	519	124 (1,30)	165 (0,79)	6 (0,08)	116 (1,39)	705 (0,81)
K36E/I67T/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/N152T	520	8 (0,09)	21 (0,10)	5 (0,08)	53 (0,63)	852 (0,98)
E52G/L70Q/A91G/D107N/I118V/T120S/T130A K169E	521	113 (1,19)	245 (1,18)	6 (0,08)	94 (1,13)	874 (1,01)
K37E/F59S/L70Q/A91G/I118V/T120S/T130A/K185E	522	20 (0,21)	74 (0,36)	6 (0,08)	109 (1,31)	863 (1,00)
A91G/S103P	72	39 (0,41)	56 (0,27)	9 (0,13)	124 (1,49)	670 (0,77)
K89E/T130A	73	90 (0,95)	148 (0,71)	75 (1,07)	204 (2,45)	761 (0,88)
A91G	74	96 (1,01)	200 (0,96)	85 (1,21)	220 (2,65)	877 (1,01)
D60V/A91G/I118V/T120S/T130A/K169E	523	111 (1,17)	222 (1,07)	12 (0,18)	120 (1,44)	744 (0,86)

ТАБЛИЦА 8. Варианты CD80, отобранные против CD28. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация(ии) CD80	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	PD-L1 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
K54M/L70Q/A91G/Y164H	524	68 (0,71)	131 (0,63)	5 (0,08)	152 (1,83)	685 (0,79)
M38T/L70Q/E77G/A91G/I118V/ T120S/T130A/N152T	525	61 (0,64)	102 (0,49)	5 (0,07)	119 (1,43)	796 (0,92)
R29H/E52G/L70R/E88G/A91G/ T130A	78	100 (1,05)	119 (0,57)	5 (0,08)	200 (2,41)	740 (0,85)
Y31H/T41G/M43L/L70Q/A91G/ I118V/T120S/I126V/T130A	526	85 (0,89)	85 (0,41)	6 (0,08)	288 (3,47)	782 (0,90)
V68A/T110A	80	103 (1,08)	233 (1,12)	48 (0,68)	163 (1,96)	861 (0,99)
L65H/D90G/T110A/F116L	527	33 (0,35)	121 (0,58)	11 (0,15)	129 (1,55)	758 (0,88)
R29H/E52G/D90N/I118V/T120S/ T130A	82	66 (0,69)	141 (0,68)	11 (0,15)	124 (1,49)	800 (0,92)
A91G/L102S	83	6 (0,06)	6 (0,03)	5 (0,08)	75 (0,90)	698 (0,81)
I67T/L70Q/A91G/I118V T120S	530	98 (1,03)	160 (0,77)	5 (0,08)	1751 (21,1)	794 (0,92)
L70Q/A91G/T110A/I118V/T120S/ T130A	531	8 (0,09)	14 (0,07)	5 (0,07)	77 (0,93)	656 (0,76)
M38V/T41D/M43I/W50G/D76G/ V83A/K89E/I118V/T120S/I126V/ T130A	532	5 (0,06)	8 (0,04)	8 (0,11)	82 (0,99)	671 (0,78)
V22A/L70Q/S121P	87	5 (0,06)	7 (0,04)	5 (0,07)	105 (1,27)	976 (1,13)
A12V/S15F/Y31H/M38L/T41G/ M43L/D90N/T130A/P137L/ N149D N152T	533	6 (0,06)	6 (0,03)	5 (0,08)	104 (1,25)	711 (0,82)
I67F/L70R/E88G/A91G/I118V/ T120S/T130A	534	5 (0,05)	6 (0,03)	6 (0,08)	62 (0,74)	1003 (1,16)
E24G/L25P/L70Q/A91G/I118V/ T120S/N152T	535	26 (0,27)	38 (0,18)	8 (0,11)	101 (1,21)	969 (1,12)
A91G/F92L/F108L/I118V/T120S	536	50 (0,53)	128 (0,61)	16 (0,11)	59 (0,71)	665 (0,77)
WT CD80	28	95 (1,00)	208 (1,00)	70 (1,00)	83 (1,00)	866 (1,00)

ТАБЛИЦА 9. Варианты CD80, отобранные против PD-L1. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация (ии) CD80	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание			Коиммо-билизация с анти--CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотноше-ние)	CTLA-4 MFI (исходное соотноше-ние)	PD-L1 MFI (исходное соотноше-ние)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотноше-ние)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотноше-ние)
R29D/ Y31L/ Q33H/ K36G/M38 I/ T41A/ M43R/ M47T/ E81V/ L85R/K89 N/A91T/ F92P/K93 V/ R94L/ I118T/ N149S	92	1071 (0,08)	1089 (0,02)	37245 (2,09)	387 (0,76)	5028 (0,26)
R29D/ Y31L/ Q33H/ K36G/M38 I/T41A/ M43R/ M47T/ E81V/ L85R/K89 N/A91T/ F92P/K93 V/R94L/ N144S/ N149S	93	1065 (0,08)	956 (0,02)	30713 (1,72)	400 (0,79)	7943 (0,41)
R29D/Y31 L/Q33H/ K36G/M38 I/T41A/ M42T/M43 R/M47T/ E81V/L85 R/K89N/ A91T/F92P /K93V/ R94L/L148	94	926 (0,07)	954 (0,02)	47072 (2,64)	464 (0,91)	17387 (0,91)

ТАБЛИЦА 9. Варианты CD80, отобранные против PD-L1. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация (ии) CD80	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание			Коиммо-билизация с анти--CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотноше-ние)	CTLA-4 MFI (исходное соотноше-ние)	PD-L1 MFI (исходное соотноше-ние)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотноше-ние)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотноше-ние)
S/N149S						
E24G/R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/H96R	95	1074 (0,08)	1022 (0,02)	1121 (0,06)	406 (0,80)	13146 (0,69)
R29D/Y31L/Q33H/K36G/M38I/T41A/M43R/M47T/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/N149S	96	1018 (0,08)	974 (0,02)	25434 (1,43)	405 (0,80)	24029 (1,25)
R29V/M43Q/E81R/L85I/K89R/D90L/A91E/F92N/K93Q/R94G	97	1029 (0,08)	996 (0,02)	1575 (0,09)	342 (0,67)	11695 (0,61)
T41I/A91G	98	17890 (1,35)	50624 (1,01)	12562 (0,70)	433 (0,85)	26052 (1,36)
E88D/K89R/D90K/A91G/	537	41687 (3,15)	49429 (0,99)	20140 (1,13)	773 (1,52)	6345 (0,33)

ТАБЛИЦА 9. Варианты CD80, отобранные против PD-L1. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности

Мутация (ии) CD80	SEQ ID NO. (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти--CD3	MLR
		CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	PD-L1 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	уровни IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
F92Y/K93R/N122S/N178S						
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	538	51663 (3,91)	72214 (1,44)	26405 (1,48)	1125 (2,21)	9356 (0,49)
K36G/K37Q/M38I/L40M/F59L/E81V/L85R/K89N/A91T/F92P/K93V/R94L/E99G/T130A/N149S	539	1298 (0,10)	1271 (0,03)	3126 (0,18)	507 (1,00)	3095 (0,16)
AE88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	102	31535 (2,38)	50868 (1,02)	29077 (1,63)	944 (1,85)	5922 (0,31)
K36G/K37Q/M38I/L40M	103	1170 (0,09)	1405 (0,03)	959 (0,05)	427 (0,84)	811 (0,04)
K36G/L40M	540	29766 (2,25)	58889 (1,18)	20143 (1,13)	699 (1,37)	30558 (1,59)
WTCD80	28	13224 (1,00)	50101 (1,00)	17846 (1,00)	509 (1,00)	19211 (1,00)

ПРИМЕР 8

Получение и оценка стековых молекул, содержащих различные домены с модифицированной аффинностью

В этом примере дополнительно описаны иммуномодулирующие белки, которые

были созданы в виде стековых конструкций, содержащих, по меньшей мере, два различных домена с модифицированной аффинностью из идентифицированных вариантных полипептидов ICOSL и еще один дополнительный вариант молекул CD80, CD86, ICOSL и NKp30, связанных между собой и слитых с Fc.

Отобранные вариантные молекулы, описанные выше, которые были модифицированы по аффинности к одному или нескольким контрструктурным лигандам, использовали для получения «стековой» молекулы (т.е.иммуномодулирующего белка типа II), содержащей два или более доменов IgSF с модифицированной аффинностью. Стековые конструктции были получены в виде генных блоков (Integrated DNA Technologies, Коралвилл, Айова), которые кодируют стек в формате, который позволяет его слияние с Fc с помощью стандартной сборки Gibson с использованием сборочного набора Gibson (New England Biolabs).

Кодирующую нуклеотидную молекулу всех стеков получали для кодирования белка, сконструированного следующим образом: сигнальный пептид, за которым следует первый вариант IgV, за которым следует 15 аминокислотный линкер, который состоит из трех мотивов GGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 228), за которым следует второй IgV, за которым следуют два линкера GGGGS (SEQ ID NO: 229), за которыми следуют три аланина (AAA), за которыми следует человеческий IgG1 Fc, как описано выше. Чтобы максимизировать вероятность правильного сворачивания доменов IgV в каждом стеке, первому IgV предшествовали все остатки, которые обычно встречаются в белке дикого типа между этим IgV и сигнальным пептидом (лидерная последовательность). Аналогичным образом, за первым IgV следовали все остатки, которые обычно связывают его в белке дикого типа, либо со следующим доменом Ig (обычно с доменом IgC), либо если такой второй домен IgV отсутствует, остатки, которые соединяют его с трансмембранным доменом (трейлерная последовательность). Тот же принцип дизайна был применен ко второму домену IgV, за исключением того, что, когда оба домена IgV были получены из одного и того же родительского белка (например, CD80 IgV в стеке с другим CD80 IgV), линкер между ними не дублировался.

В Таблице 10 представлен дизайн примерных стековых конструкций. Примерные стековые молекулы, показанные в Таблице 10, содержат домены Ig (например, домен IgV), как указано, и дополнительно трейлерные последовательности, как описано выше. В Таблице представлены следующие компоненты: сигнальный пептид (SP, SEQ ID NO: 225), домен Ig 1 (например, Ig1), трейлерная последовательность 1 (TS1), линкер 1 (LR1, SEQ ID NO: 228), Ig-домен 2 (Ig2), трейлерная последовательность 2 (TS2), линкер 2 (LR2, SEQ ID NO: 230) и Fc-домен (SEQ ID NO: 226, содержащий аминокислотную замену

C5S/R77C/N82G/V87C). В некоторых случаях между сигнальным пептидом и IgV1 присутствует лидерная последовательность 1 (LS1), и в некоторых случаях между линкером и IgV2 присутствует лидерная последовательность 2 (LS2).

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
Домен 1: NKp30 WT Домен 2: ICOSL WT	+	-	214	235	+	-	196	233	+	+
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R	+	-	215	235	+	-	212	233	+	+
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G) Домен 2: ICOSL N52D	+	-	215	235	+	-	199	233	+	+
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	215	235	+	-	201	233	+	+
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: Nkp30 WT	+	-	196	233	+	-	214	235	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G	+	-	199	233	+	-	215	235	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	201	233	+	-	215	235	+	+

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G										
Домен 1: CD80 WT Домен 2: ICOSL WT	+	-	152	471	+	-	196	233	+	+
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	-	189	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	-	193	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T Домен 2: ICOSL N52D	+	-	193	471	+	-	199	233	+	+
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	189	471	+	-	201	233	+	+
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	193	471	+	-	201	233	+	+

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P										
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD80 WT	+	-	196	233	+	-	152	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	+	-	213	233	+	-	189	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	213	233	+	-	193	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	+	-	199	233	+	-	189	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	199	233	+	-	193	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD80	+	-	201	233	+	-	189	471	+	+

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R										
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	+	-	201	233	+	-	193	471	+	+
Домен 1: CD86 WT Домен 2: ICOSL WT	+	236	220	237	+	-	196	233	+	+
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	-	192	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	-	175	471	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Домен 2: ICOSL N52D	+	-	192	471	+	-	199	233	+	+
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Домен 2:	+	-	175	471	+	-	199	233	+	+

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
ICOSL N52D										
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	192	471	+	-	201	233	+	+
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	-	175	471	+	-	201	233	+	+
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	+	236	221	237	+	-	213	233	+	+
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Домен 2: ICOSL N52D	+	236	221	237	+	-	199	233	+	+
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	+	236	221	237	+	-	201	233	+	+
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD86 WT	+	-	196	233	+	236	220	237	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9	+	-	213	233	+	-	192	471	+	+

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G /K89E/D90N/A 91G/P109S										
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91 G/T120S	+	-	213	233	+	-	175	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G /K89E/D90N/A 91G/P109S	+	-	199	233	+	-	192	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91 G/T120S	+	-	199	233	+	-	175	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q1 00P Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T4 1G/Y87N/E88G /K89E/D90N/A 91G/P109S	+	-	201	233	+	-	192	471	+	+
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H9 4D/L96F/L98F/ Q100R/G103E/ F120S Домен 2: CD86	+	-	213	233	+	236	221	237	+	+

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO) компонентов примерных стековых конструкций

	SP	Первый домен			LR 1	Второй домен			LR2	Fc
		LS1	Ig1	TS1		LS2	Ig2	TS2		
Q35H/H90L/Q102H										
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	-	199	233	+	236	221	237	+	+
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	+	-	201	233	+	236	221	237	+	+

Крупномасштабную экспрессию и очистку вариантных гибридных молекул IgV-в стеке-Fc, содержащих различные комбинации вариантных доменов IgV из CD80, CD86, ICOSL или Nkp30, содержащих, по меньшей мере, один домен IgV с модифицированной аффинностью, проводили, как описано в Примере 5. Связывание вариантных гибридных молекул IgV-в стеке-Fc с соответствующими контрструктурами и функциональную активность с помощью анализа коиммобилизации с анти-CD3 также оценивали, как описано в Примере 6. Например, костимулирующую биоактивность гибридных стековых белков IgSF Fc определяли в аналогичном анализе с иммобилизованными анти-CD3, как описано выше. В этом случае 4 нМ анти-CD3 (OKT3, Biolegend, США) коиммобилизовали с 4 нМ -120 нМ человеческого rB7-H6.Fc (R & D Systems, США) или человеческого rPD-L1.Fc (R & D Systems, США) в течение ночи в 96-луночных обработанных планшетах для тканевых культур (Corning, США). На следующий день несвязанный белок смывали PBS и 100 000 очищенных пан-Т-клеток добавляли в каждую лунку в 100 мкл среды Ex-Vivo 15 (Lonza, Швейцария). Стековые домены IgSF затем добавляли в концентрациях от 8 нМ до 40 нМ в объеме 100 мкл до общего объема 200 мкл. Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с помощью набора Duoset ELISA (R & D Systems, США), как упомянуто выше.

Результаты приведены в Таблицах 11-13. В частности, в Таблице 11 приведены результаты связывания и функциональной активности вариантных гибридных молекул IgV-в стеке Fc, содержащих домен NKp30 IgV и домен ICOSL IgV. В Таблице 12 и 13 представлены результаты связывания и функциональной активности для вариантных

гибридных молекул с IgV-в стеке-Fc, содержащих вариантный домен ICOSL IgV и вариантные домены Ig80 IgV или CD86 IgV.

Для каждой из Таблиц 11-13 в столбце 1 показана структурная организация и ориентация доменов в стеке с модифицированной аффинностью или доменов дикого типа (WT), с аминоконцевым (N-концевым) доменом, за которым следует средний домен WT или домен с модифицированной аффинностью, расположенных перед С-концевыми доменами человеческого IgG1 Fc. Столбец 2 показывает идентификатор SEQ ID NO для последовательности каждого домена IgV, содержащегося в соответствующей молекуле «в стеке». В столбце 3 показаны партнеры по связыванию, против которых были отобраны указанные стековые домены с модифицированной аффинностью из столбца 1.

Также показана активность связывания, измеренная по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой стековой молекулы, с клетками, сконструированными для экспрессии различных контрструктурных лигандов и соотношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей стековой молекулы, содержащей референсные (например, немодифицированные) домены IgV, которые не включают аминокислотную замену(ы), с тем же самым контрструктурным лигандом, экспрессируемым клетками. Функциональная активность вариантных стековых молекул для модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), полученных с помощью указанной вариантной стековой молекулы и соответствующего лиганда, коиммобилизованного с анти-CD3, как описано в Примере 6. В таблицах также отображено соотношение IFN-гамма, продуцируемого каждой вариантной стековой молекулой по сравнению с соответствующей референсной (например, немодифицированной) стековой молекулой в анализе коиммобилизации.

Как показано, результаты продемонстрировали, что возможно создание стековых молекул, содержащих, по меньшей мере, одни вариантные домены IgSF, которые обладают активностью с модифицированной аффинностью повышенного связывания, по меньшей мере, с одним когнатным контрструктурным лигандом по сравнению с соответствующей стековой молекулой, содержащей аналогичный референсный (например, дикого типа или немодифицированный) домен IgV. В некоторых случаях стековая молекула, либо из одного, либо из комбинации обоих вариантных доменов IgSF в молекуле, демонстрирует повышенное связывание более чем с одним когнатным контрструктурным лигандом. Результаты также показали, что порядок доменов IgV в стековых молекулах может в некоторых случаях изменять степень повышенной активности связывания. В некоторых случаях активность функциональных Т-клеток также

была изменена при оценке в целевом коиммобилизационном анализе.

ТАБЛИЦА 11. Стековые вариантные гибридные белки IgV Fc, включающие домен NKp30 IgV и домен ICOSL IgV

Структура Домена от N-конца к C-концу: домен 1/домен 2/Fc	SEQ ID NO. (домен Ig)	Контр-структура, отобранная против	Активность связывания			Анализ коиммобилизации с анти-CD3 пг/мл IFN-гамма (соотношение IFN-гамма к исходному дикому типу)
			B7H6 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	ICOS MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	CD28 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	
Домен 1: NKp30 WT Домен 2: ICOSL WT	214 196	-	64538 (1,00)	26235 (1,00)	6337 (1,00)	235 (1,00)
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G Домен 2: ICOSL N52S N57Y H94D L96F L98F Q100R	215 212	B7-H6 ICOS-CD28	59684 (0,92)	12762 (0,49)	9775 (1,54)	214 (0,91)
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G Домен 2: ICOSL N52D	215 199	B7-H6 ICOS-CD28	65470 (1,01)	30272 (1,15)	9505 (1,50)	219 (0,93)
Домен 1: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G Домен 2: ICOSL N52H N57Y Q100P	215 201	B7-H6 ICOS-CD28	38153 (0,59)	27903 (1,06)	11300 (1,78)	189 (0,80)
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: Nkp30 WT	196 214	-	117853 (1,0)	70320 (1,0)	7916 (1,0)	231 (1,0)
Домен 1:ICOSL N52D Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G	199 215	ICOS-CD28 B7-H6	100396 (0,85)	83912 (1,19)	20778 (2,62)	228 (0,98)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: NKp30 L30V/A60V/S64P/S86G	201 215	ICOS-CD28 B7-H6	82792 (0,70)	68874 (0,98)	72269 (9,12)	561 (2,43)

ТАБЛИЦА 12. Стековые вариантные гибридные белки IgV Fc, включающие домен CD80 IgV и домен ICOSL IgV

Структура Домена от N-конца к C-концу: домен 1/домен 2/Fc	SEQ ID NO. (домен Ig)	Контр-структура, отобранная против	Активность связывания			Анализ коиммобилизации с анти-CD3 пг/мл IFN-гамма (соотношение IFN-гамма к исходному дикому типу)
			CD28 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	PD-L1 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	ICOS MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	
Домен 1: CD80 WT Домен 2: ICOSL WT	152 196		1230 (1,00)	2657 (1,00)	11122 (1,00)	69 (1,00)
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	189 213	PD-L1 ICOS/CD28	3383 (2,75)	4515 (1,70)	5158 (0,46)	90 (1,30)
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	193 213	PD-L1 ICOS/CD28	2230 (1,81)	2148 (0,81)	3860 (0,35)	112 (1,62)
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T Домен 2: ICOSL N52D	193 199	PD-L1 ICOS/CD28	5665 (4,61)	6446 (2,43)	15730 (1,41)	126 (1,83)
Домен 1: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	189 201	PD-L1 ICOS/CD28	6260 (5,09)	4543 (1,71)	11995 (1,08)	269 (3,90)
Домен 1: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	193 201	PD-L1 ICOS/CD28	3359 (2,73)	3874 (1,46)	8541 (0,77)	97 (1,41)

Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD80 WT	196 152		3000 (1,00)	2966 (1,00)	14366 (1,00)	101 (1,00)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	213 189	ICOS/CD28 PD-L1	3634 (1,21)	4893 (1,65)	6403 (0,45)	123 (1,22)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	213 193	ICOS/CD28 PD-L1	1095 (0,37)	5929 (2,0)	7923 (0,55)	127 (1,26)
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	199 189	ICOS/CD28 PD-L1	2023 (0,67)	5093 (1,72)	16987 (1,18)	125 (1,24)
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	199 193	ICOS/CD28 PD-L1	3441 (1,15)	3414 (1,15)	20889 (1,45)	165 (1,63)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD80 E88D/K89R/D90K/A91G/F92Y/K93R	201 189	ICOS/CD28 PD-L1	7835 (2,61)	6634 (2,24)	20779 (1,45)	95 (0,94)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD80 A12T/H18L/M43V/F59L/E77K/P109S/I118T	201 193	ICOS/CD28 PD-L1	8472 (2,82)	3789 (1,28)	13974 (0,97)	106 (1,05)

ТАБЛИЦА 13. Стековые вариантные гибридные белки IgV Fc, включающие домен CD80 или домен CD86 IgV и домен ICOSL IgV

Структура Домена от N-конца к C-концу: домен 1/домен 2/Fc	SEQ ID NO. (домен Ig)	Контр-структу-ра, отоб-ранная против	Активность связывания		Функциональ-ная ктивность MLR IFN-гамма пг/мл
			PD-L1 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	CTLA-4 MFI (соотношение MFI к исходному дикому типу)	
Домен 1: CD80 WT	152		1230	11122	1756

Домен 2: ICOSL WT	196		(1,00)	(1,00)	(1,00)
Домен 1: CD86 WT Домен 2: ICOSL WT	220 196		29343 (1,00)	55193 (1,00)	6305 (1,00)
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	192 213	CD28 ICOS/CD28	2280 (1,85)	3181 (0,29)	2281 (1,30)
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	175 213	CD28 ICOS/CD28	2309 (1,88)	26982 (2,43)	1561 (0,89)
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Домен 2: ICOSL N52D	192 199	CD28 ICOS/CD28	4285 (3,48)	22744 (2,04)	1612 (0,92)
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Домен 2: ICOSL N52D	175 199	CD28 ICOS/CD28	3024 (2,46)	16916 (1,52)	3857 (2,20)
Домен 1: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	192 201	CD28 ICOS/CD28	6503 (5,29)	7240 (0,65)	6886 (3,92)
Домен 1: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	175 201	CD28 ICOS/CD28	3110 (2,53)	4848 (0,44)	3393 (1,93)
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Домен 2: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S	221 213	CD28 ICOS/CD28	11662 (0,40)	21165 (0,38)	880 (0,14)
Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Домен 2: ICOSL N52D	221 199	CD28 ICOS/CD28	24230 (0,83)	73287 (1,33)	1110 (0,18)

Домен 1: CD86 Q35H/H90L/Q102H Домен 2: ICOSL N52H/N57Y/Q100P	221 201	CD28 ICOS/CD28	1962 (0,07)	1630 (0,03)	587 (0,09)
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD80 WT	196 152		3000 (1,00)	14366 (1,00)	4113 (1,00)
Домен 1: ICOSL WT Домен 2: CD86 WT	196 220		18005 (1,00)	53602 (1,00)	18393 (1,00)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	213 192	ICOS/CD28 CD28	10426 (3,48)	51286 (3,57)	18680 (4,54)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	213 175	ICOS/CD28 CD28	17751 (5,92)	29790 (2,07)	10637 (2,59)
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	199 192	ICOS/CD28 CD28	2788 (0,93)	25870 (1,80)	6205 (1,51)
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD80 I67T/L70Q/A91G/T120S	199 175	ICOS/CD28 CD28	2522 (0,84)	13569 (0,94)	5447 (1,32)
Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD80 R29H/Y31H/T41G/Y87N/E88G/K89E/D90N/A91G/P109S	201 192	ICOS/CD28 CD28	9701 (3,23)	9187 (0,64)	5690 (1,38)
Домен 1: ICOSL N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	213 221	ICOS/CD28 CD28	27050 (1,50)	21257 (0,40)	8131 (0,44)
Домен 1: ICOSL N52D Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	199 221	ICOS/CD28 CD28	34803 (1,93)	80210 (1,50)	6747 (0,37)

Домен 1: ICOSL N52H/N57Y/Q100P Домен 2: CD86 Q35H/H90L/Q102H	201 221	ICOS/CD 28 CD28	5948 (0,33)	4268 (0,08)	26219 (1,43)

ПРИМЕР 9

Получение и оценка сконструированных клеток, экспрессирующих трансмембранный иммуномодулирующий белок

Были сконструированы Т-клетки, в которых трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP), включающий внеклеточный домен (ECD), содержащий либо вариант CD80, как описано выше, либо домен IgSF с модифицированной аффинностью из ICOSL, были совместно экспрессированы с химерным антигенным рецептором (CAR). TIP также содержал трансмембранный домен и цитоплазматический домен соответствующей последовательности трансмембранного белка CD80 или ICOSL дикого типа. Иммуномодулирующую активность сконструированных клеток сравнивали с клетками, которые экспрессировали только CAR или клетки, которые совместно экспрессировали соответствующий трансмембранный белок CD80 или ICOSL дикого типа с CAR.

Примерный CD80-TIP представляет собой вариантный CD80, имеющий домен IgSF с модифицированной афинностью, содержащий аминокислотные мутации в доменах IgV и IgC, соответствующие I67T/L70Q/A91G/T120S, относительно положений во внеклеточном домене CD80, представленном в SEQ ID NO: 28 и трансмембранном и цитоплазматическом домене, соответствующем остаткам 243-288 в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность примерного CD80-TIP изложена в SEQ ID NO: 241 и кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 242. Соответствующий трансмембранный белок CD80 дикого типа имел аминокислотную последовательность, представленную как аминокислотные остатки 35-288 в SEQ ID NO: 1 и кодировался аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 251.

Примерный ICOSL-TIP представляет собой вариантный ICOSL, имеющий домен IgSF с модифицированной аффинностью, содержащий аминокислотные мутации в домене IgV, соответствующие N52H/I143T, относительно положений во внеклеточном домене ICOSL, указанном в SEQ ID NO: 32, и в трансмембранном и цитоплазматическом домене, соответствующем остаткам 257-302 в SEQ ID NO: 5. Аминокислотная последовательность примерного ICOSL-TIP представлена в SEQ ID NO: 243 и кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 244. Соответствующий трансмембранный белок ICOSL дикого типа имел аминокислотную последовательность,

обозначенную как аминокислотные остатки 19-302 в SEQ ID NO: 5 и кодировался последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 252.

TIP, содержащий домен с модифицированной аффинностью или трансмембранный белок дикого типа, содержащий соответствующий домен IgSF с немодифицированной аффинностью, был совместно экспрессирован в Т-клетках с химерным антигенным рецептором 1-го поколения (CAR), содержащим внутриклеточный сигнальный домен CD3дзета. CAR 1-го поколения включал ScFv, специфический для CD19 (SEQ ID NO: 345), шарнирный и трансмембранный домен, полученный из CD8 (SEQ ID NO: 346), и внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3дзета (из SEQ ID NO: 47). Нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 scFv-CD3дзета CAR, представлена в SEQ ID NO: 248, а аминокислотная последовательность CAR19 scFv-CD3дзета CD19 представлена в SEQ ID NO: 479.

Были получены нуклеотидные молекулы, кодирующие CAR отдельно, или также кодирующие один из примерных TIP или трансмембранные белки дикого типа, отделенных от CAR посредством саморасщепляющейся последовательности T2A (SEQ ID NO: 250 и кодируемые нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 249). Примеры конструкций содержат нуклеотидные последовательности, приведенные в Таблице 14. Также в качестве контроля была создана нуклеотидная конструкция, кодирующая CAR 2-го поколения, дополнительно содержащая костимулирующий домен CD28 (CD19 scFv-CD28-CD3 дзета).

ТАБЛИЦА 14. Нуклеотидные конструкции

	CAR (SEQ ID NO)	Линкер T2A (SEQ ID NO)	TIP (SEQ ID NO)
CD19 scFv – CD3 дзета	+ (248)	-	-
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – B7-1	+ (248)	+ (249)	CD80 дикого типа (251)
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – B7-1_TIP	+ (248)	+ (249)	CD80 TIP (242)
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – ICOSL	+ (248)	+ (249)	ICOSL дикого типа (252)
CD19 scFv – CD3 дзета – T2A – ICOSL_TIP	+ (248)	+ (249)	ICOSL TIP (244)

Нуклеотидные молекулы индивидуально клонировали в лентивирусный вектор, который использовали для трансдукции Т-клеток, выделенных из образцов PBMC человека, полученных от трех разных здоровых доноров. Лентивирусные частицы,

содержащие нуклеотидные последовательности, получали после совместной трансфекции клеток HEK293 с помощью векторов и конструкций для упаковки лентивирусов. Лентивирусные частицы собирали из культуральной среды ультрацентрифугированием и титровали с помощью qRT-PCR. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из трех нормальных доноров крови с использованием осаждения в градиенте плотности. PBMC культивировали в течение ночи с анти-CD3 и анти-CD28 антителами и IL-2, затем трансдуцировали препаратами лентивируса при множественности заражения 5:1. Лентивирусные векторы, кодирующие контрольный CAR 2-го поколения, использовали только для трансдуцирования клеток от одного донора.

Через две недели (14 дней) культивирования клетки анализировали на цитотоксичность после совместного культивирования с целевыми антиген-экспрессирующими клетками с использованием анализатора клеток Acea Real-Time Cell Analyzer (RTCA), который измеряет вариации импеданса в культуральной среде 96-луночного микроэлектронного планшета (E-plate), и показывает изменения в количестве клеток и морфологии клеток в графике реального времени. CD19-экспрессирующие клетки-мишени HeLa (HeLa-CD19) высевали в 96-луночный E-планшет, и импеданс каждого монослоя контролировали в течение 24 часов с помощью системы RTCA. Сконструированные T-клетки добавляли к лункам при соотношении эффектор-мишень 10:1, и отслеживали лунки еще 48 часов. Результаты были отображены и записаны как значение клеточного индекса (CI, Cell Index), полученное из изменения измеренного электрического импеданса, и затем были преобразованы путем деления показаний CI всех лунок во всех временных точках на значение CI индивидуальных лунок в одно и то же время (исходный момент времени) для получения нормализованного значения клеточного индекса, представляющего процент значения в исходный момент времени (см. Zhang et al. “Introduction to the Data Analysis of the Roche xCELLigence®System with RTCA Package.” Bioconductor. May, 3, 2016, bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/RTCA/inst/doc/aboutRTCA.pdf. Доступно с 9 сентября 2016 года). В этом анализе уменьшение импеданса монослоя отражает уничтожение клеток-мишеней с помощью трансдуцированных клеток.

Результаты показали, что снижение импеданса наблюдалась в клетках, экспрессирующих CAR 1-го поколения по сравнению с не-трансдуцированными T-клетками, хотя степень снижения импеданса для клеток, экспрессирующих CAR 1-го поколения, была меньше, чем для клеток, экспрессирующих CAR 2-го поколения. Снижение импеданса в клетках, экспрессирующих CAR 1-го поколения продолжалось

вплоть до 8 часов анализа, тогда как импеданс CAR-экспрессирующих клеток 2-го поколения продолжало снижаться и после этого.

Как показано на фиг. 1, у одного донора, каждая из клеток, ко-экспрессирующих TIP или соответствующий трансмембранный белок дикого типа с CAR 1- го поколения, демонстрирует большее уменьшение импеданса, что указывает на большую цитотоксическую активность, по сравнению с клетками, экспрессирующими только CAR 1- го поколения. Кроме того, результаты показали, что цитотоксическая активность была большей в CAR-экспрессирующих клетках, которые совместно экспрессировали CD80-TIP или ICOSL-TIP относительно CAR-экспрессирующих клеток, которые совместно экспрессировали соответствующие трансмембранные белки CD80 или ICOSL дикого типа, содержащие домен IgSF с немодифицированной аффинностью. Наблюдаемые результаты этих сконструированных клеток с TIP показали, что цитотоксическая активность в клетках, коэкспрессирующих CD80-TIP или ICOSL-TIP с CAR, проявляет повышенную активность для модуляции цитотоксического иммунного ответа антигенспецифических Т-клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки.

У двух других донорах клетки, экспрессирующие CD80-TIP, не приводили к намного более сниженному импедансу по сравнению с клетками, экспрессирующими соответствующий трансмембранный белок CD80 дикого типа. У одного донора было недостаточно клеток для трансдукции трансмембранной белковой конструкцией дикого типа, хотя у этого донора ICOS-L TIP обеспечивал лучшую цитотоксичность по сравнению с другими тестируемыми конструкциями. В другом доноре клетки, экспрессирующие ICOS-L-TIP, не приводили к более сниженному импедансу по сравнению с клетками, экспрессирующими соответствующий трансмембранный белок ICOS-L дикого типа. В тестируемых клетках все клетки, коэкспрессирующие либо CD80-TIP, ICOSL-TIP, либо соответствующий трансмембранный белок дикого типа с CAR, проявляли большую цитотоксическую активность, чем клетки, экспрессирующие только CAR первого поколения. Различия в результатах, наблюдаемых среди доноров, могут быть связаны с различиями в Т-клетках среди доноров, различиями в уровнях экспрессии различных сконструированных белков на поверхности клеток, конкретными условиями, используемыми в этом примерном анализе для оценки цитолиза клеток (например, при оценке трансформированных клеток 14-го дня, при оценке отношения одиночный эффектор:клетка-мишень) или другими факторами.

ПРИМЕР 10

Оценка связывания и активности доменных вариантов ICOSL IgSF

Дополнительные варианты ECD ICOSL идентифицировали с помощью способа

селекции дрожжей, по существу, как описано выше, и использовали для получения гибридных белков ECD-Fc, как описано в Примере 5. Были проведены исследования связывания для оценки специфичности и аффинности иммуномодулирующих белков с доменом ICOSL для когнатных партнеров связывания по существу так, как описано в Примере 6.

A. Связывание и функциональная характеристика

Связывание оценивали с клетками, экспресирующими полноразмерные когнатные партнеры связывания CD28, ICOS и CTLA-4, по существу, как описано в Примере 6. Биоактивность вариантов ECD ICOSL также оценивали в анализе коиммобилизации с анти-CD3 или реакции смешанных лимфоцитов человека (MLR) по существу, как описано в Примере 6, за исключением того, что для анализа коиммобилизации костимулирующую активность определяли культурой человеческих Т-клеток со смесью 10 нМ связанных с планшетом антител против CD3 и 40 нМ ICOSL Fc.

В Таблице 15 показаны примерные результаты для дополнительных вариантов домена ICOSL IgSF по связыванию с контрструктурами, экспрессируемыми клетками, и по биоактивности в анализе коиммобилизации с анти-CD3 или MLR-анализе. Примерные аминокислотные замены, изображенные в Таблице 15, обозначены номером аминокислотного положения, соответствующего аналогичной референсной (например, немодифицированной) последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32. Положение аминокислоты указывается посередине с соответствующей немодифицированной (например, дикого типа) аминокислотой, указанной перед номером, и идентифицированной аминокислотной заменой, указанной после номера. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для вариантного ECD для каждой вариантной гибридной молекулы ECD-Fc.

Результаты, представленные в Таблице 15, показывают активность связывания, измеренную с помощью значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для связывания каждой вариантной Fc-гибридной молекулы с клетками, сконструированными для экспрессии когнатного контрструктурного лиганда и отношение MFI по сравнению со связыванием соответствующей референсной (например, немодифицированной) гибридной молекулы ECD-Fc, не содержащей аминокислотных замен, с тем же контрструктурным лигандом, экспрессируемым клетками. Функциональная активность вариантных Fc-гибридных молекул в отношении модуляции активности Т-клеток также показана на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), получаемых либо i) с указанной вариантной гибридной молекулой ECD-Fc, коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной гибридной молекулой

ECD-Fc в анализе MLR. В Таблице также показано отношение IFN-гамма, вырабатываемое каждым вариантом ECD-Fc, по сравнению с соответствующим немодифицированным (родительским) ECD-Fc в обоих функциональных анализах.

Результаты показывают, измененную, в том числе увеличенную, аффинность связывания доменных вариантов ICOSL IgSF с модифицированной аффинностью, по меньшей мере, с одним когнатным контрструктрурным лигандом, и/или улучшение иммунологической активности. В частности, аналогично исходным полученным вариантам, указанным в примере 6, выбор привел к идентификации ряда дополнительных вариантов домена ICOSL IgSF, которые были модифицированы по аффинности, которые проявляют повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях более чем с одним когнатным контрструктурным лигандом. Кроме того, результаты показали, что аффинная модификация вариантных молекул также демонстрирует улучшенные активности как для увеличения, так и для уменьшения иммунологической активности в зависимости от формата молекулы, как описано в Примере 6.

ТАБЛИЦА 15. Варианты ICOSL: данные связывания и данные костимулирующей активности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	ICOS tfxn MFI (исходное соотно-шение)	CD28 tfxn MFI (исходное соотно-шение)	CTLA-4 tfxn MFI (исходное соотно-шение)	анализ коиммоби лизации Анти-CD3 IFN-гамма пг/мл (исходное соотно-шение)	MLR IFN-гамма пг/мл (исходное соотно-шение)
N52H, F78L, Q100R, C198R	373	9568 (0,12)	1966 (0,24)	1454 (0,12)	130 (0,31)	5927 (1,84)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	9418 (1,16)	136665 (16,55)	115352 (9,59)	944 (2,21)	821 (0,25)
N52H, N57Y, R75Q, Q100P, V110D	374	5558 (0,07)	7465 (0,90)	4689 (0,39)	122 (0,28)	1136 (0,35)
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	9148 (1,13)	134923 (16,33)	83241 (6,92)	1060 (2,48)	375 (0,12)
N52H, N57Y, L74Q, V110D, S192G	375	9448 (1,17)	128342 (15,54)	123510 (10,26)	1137 (2,66)	889 (0,28)
N52H, Q100R	285	9478 (1,17)	151977 (18,40)	133929 (11,13)	972 (2,28)	794 (0,25)
N52H, S121G, C198R	376	9128 (1,13)	124732 (15,10)	182607 (15,18)	827 (1,94)	1257 (0,39)
A20V, N52H, N57Y, Q100R, S109G	287	5828 (0,72)	76973 (9,32)	73640 (6,12)	447 (1,05)	2283 (0,71)

ТАБЛИЦА 15. Варианты ICOSL: данные связывания и данные костимулирующей активности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	ICOS tfxn MFI (исходное соотношение)	CD28 tfxn MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 tfxn MFI (исходное соотношение)	анализ коиммобилизации Анти-CD3 IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	MLR IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N52H, N57Y, Q100P, C198R	461	9548 (1,18)	130676 (15,82)	81966 (6,81)	1125 (2,64)	643 (0,20)
N52H, N57Y, R61S, Q100R, V110D, L173S	289	1018 (0,13)	9129 (1,11)	5790 (0,48)	109 (0,25)	5094 (1,58)
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	9978 (1,23)	137372 (16,63)	70764 (5,88)	1316 (3,08)	473 (0,15)
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1028 (1,27)	135821 (16,44)	73320 (6,09)	1561 (3,66)	486 (0,15)
N52H, N57Y, Q100R	283	9858 (1,22)	140612 (17,02)	75106 (6,24)	1648 (3,86)	778 (0,24)
N52S, F120S, N227K	377	9438 (1,17)	67796 (8,21)	82370 (6,85)	1157 (2,71)	1626 (0,50)
N52S, N194D	366	9798 (1,21)	59431 (7,19)	74502 (6,19)	1671 (3,91)	1690 (0,52)
N52S, V97A	294	3138 (0,04)	1733 (0,21)	1541 (0,13)	84 (0,20)	3858 (1,20)
N52S, F120S	293	9068 (1,12)	67233 (8,14)	97880 (8,13)	1178 (2,76)	2814 (0,87)
N52S, G72R	295	9288 (1,15)	51638 (6,25)	62339 (5,18)	1161 (2,72)	2947 (0,91)
N52S, A71T, A117T, T190A, C198R	378	8918 (1,10)	44044 (5,33)	56646 (4,71)	1076 (2,52)	4031 (1,25)
N52S, E220G	297	3878 (0,05)	2047 (0,25)	1796 (0,15)	122 (0,29)	1927 (0,60)
Y47H, N52S, V107A, F120S	298	3268 (0,04)	2562 (0,31)	2104 (0,17)	334 (0,78)	4390 (1,36)
WT ICOSL	32	8088 (1,00)	8260 (1,00)	12033 (1,00)	427 (1,00)	3226 (1,00)
T43A, N52H, N57Y, L74Q, D89G, V110D, F172S	379	2821 (0,02)	2180 (0,49)	2051 (0,12)	184 (0,75)	
N52H, N57Y, Q100R, V107I, V110D, S132F, I154F, C198R, R221G	381	174586 (0,97)	122383 (27,24)	76202 (4,31)	985 (4,01)	1037 (0,36)
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	190765 (1,05)	129070 (28,73)	68488 (3,87)	4288 (17,46)	1225 (0,43)
Q37R, N52H, N57Y, Q100R, V110N, S142F,	301	148638 (0,82)	91104 (20,28)	13498 (0,76)	62 (0,25)	7643 (2,68)

ТАБЛИЦА 15. Варианты ICOSL: данные связывания и данные костимулирующей активности						
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	ICOS tfxn MFI (исходное соотно-шение)	CD28 tfxn MFI (исходное соотно-шение)	CTLA-4 tfxn MFI (исходное соотно-шение)	анализ коиммоби лизации Анти-CD3 IFN-гамма пг/мл (исходное соотно-шение)	MLR IFN-гамма пг/мл (исходное соотно-шение)
C198R, D217V, R221G						
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R	302	179194 (0,99)	123312 (27,45)	84136 (4,76)	762 (3,10)	1342 (0,47)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, V116A, L161M, F172S, S192G, C198R	303	5236 (0,03)	4160 (0,93)	3305 (0,19)	49 (0,20)	2039 (0,72)
F27S, N52H, N57Y, V110N	304	20154 (0,11)	8613 (1,92)	3903 (0,22)	83 (0,34)	7522 (2,64)
F27S, N52H, N57Y, V110N	304	5236 (0,03)	4160 (0,93)	2957 (0,17)	40 (0,16)	-
N52S, H94E, L96I, S109N, L166Q,	305	198604 (1,10)	100361 (22,34)	102892 (5,82)	1253 (5,10)	5645 (1,98)
S18R, N52S, F93L, I143V, R221G	306	154561 (0,85)	7625 (1,70)	4254 (0,24)	203 (0,83)	5239 (1,84)
A20T, N52D, Y146C, Q164L	307	149661 (0,83)	9073 (2,02)	6901 (0,39)	287 (1,17)	4829 (1,69)
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	180016 (1,00)	120230 (26,76)	62809 (3,55)	2218 (9,03)	7283 (2,56)
N52S, H94E, L96I, V122M	309	198717 (1,10)	88901 (19,79)	94231 (5,33)	590 (2,40)	618 (0,22)
N52H, N57Y, H94E, L96I, F120I, S126T, W153R, I218N	310	87711 (0,48)	42035 (9,36)	31798 (1,80)	67 (0,27)	2500 (0,88)
M10V, S18R, N30D, N52S, S126R, T139S, L203F	311	180665 (1,00)	64929 (14,45)	48362 (2,73)	1193 (4,86)	13647 (4,79)
S25G, N30D, N52S, F120S, N227K	312	178834 (0,99)	66127 (14,72)	46631 (2,64)	1246 (5,07)	2202 (0,77)
N30D, N52S, L67P, Q100K, D217G, R221K, T225S	313	18630 (0,10)	1986 (0,44)	1940 (0,11)	54 (0,22)	2752 (0,97)
WT ICOSL	32	180900 (1,00)	4493 (1,00)	17685 (1,00)	246 (1,00)	2850 (1,00)
R26S, N52H, N57Y, V110D, T137A, C198R	908	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N52H, N57Y, Q100R, V110D, A117T, T190S,	314	2831 (0,04)	2881 (0,57)	2464 (0,23)	59 (0,08)	-

ТАБЛИЦА 15. Варианты ICOSL: данные связывания и данные костимулирующей активности

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	ICOS tfxn MFI (исходное соотношение)	CD28 tfxn MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 tfxn MFI (исходное соотношение)	анализ коиммобилизации Анти-CD3 IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)	MLR IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
C198R						
N52H, N57Y, Q100R, V110D, F172S, C198R	315	58478 (0,79)	74031 (14,75)	56850 (5,33)	712 (0,96)	1093 (0,23)
S25G, F27C, N52H, N57Y, Q100R, V110D, E135K, L173S, C198R	316	22514 (0,30)	21320 (4,25)	20450 (1,92)	353 (0,48)	5765 (1,21)
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	84236 (1,14)	81842 (16,31)	121519 (11,39)	4593 (6,18)	1137 (0,24)
M10I, S13G, N52H, N57Y, D77G, V110A, H129P, I143V, F172S, V193M, C198R	318	6362 (0,09)	6001 (1,20)	4834 (0,45)	141 (0,19)	4326 (0,91)
N52H, N57Y, R61C, Y62F, Q100R, V110N, F120S, C198R	319	4355 (0,06)	4316 (0,86)	3430 (0,32)	110 (0,15)	6854 (1,44)
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	96736 (1,31)	77881 (15,52)	148012 (13,88)	8765 (11,79)	630 (0,13)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, N144D, F172S, C198R	321	67578 (0,91)	64953 (12,94)	95731 (8,98)	1672 (2,52)	1490 (0,31)
N52S, H94E, L98F, Q100R,	322	80690 (1,09)	78750 (15,69)	148160 (13,89)	3564 (4,80)	1497 (0,32)
N52S, E90A	323	108908 (1,47)	31086 (6,19)	108866 (10,21)	4564 (6,14)	3927 (0,83)
N30D, K42E, N52S	324	85726 (1,16)	4293 (0,86)	10755 (1,01)	5211 (7,01)	5656 (1,19)
N52S, F120S, I143V, I224V	325	90862 (1,23)	28443 (5,67)	105229 (9,87)	4803 (6,46)	4357 (0,92)
WT ICOSL	32	73964 (1,00)	5018 (1,00)	10665 (1,00)	743 (1,00)	4748 (1,00)

C. Выработка цитокинов в анализах костимуляции с анти-CD3

Примерные вариантные ECD ICOSL Fc-гибридные молекулы, описанные выше, были дополнительно оценены на предмет стимуляции цитокинов IL-17 в анализе костимулирующей (коиммобилизационной) биоактивности с анти-CD3, описанном выше. Смесь 10 нМ связанных с планшетом анти-CD3 и 40 нм ICOSL Fc культивировали с

человеческими Т-клетками. Надосадочные жидкости собирали и определяли уровни IL-17 с помощью ELISA. Измеряли количество IL-17 в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), полученного с помощью указанных вариантных гибридных молекул ECD-Fc и соответствующим немодифицированным (родительским) ECD-Fc, коиммобилизованным с анти-CD3. Для сравнения, также в этой таблице, показаны результаты по выработке IFN-гамма в том же анализе, что отображено в Таблице 15 для примерных вариантов.

Результаты представлены в Таблице 16, который отбражают пг/мл IL-17, измеренного в надосадочной жидкости, а также соотношения (кратное увеличение) IL-17, продуцируемого с помощью каждого варианта ECD-Fc по сравнению с соответствующим немодифицированным ECD-Fc (дикого типа). Аналогичные результаты показаны для IFN-гамма. Также показан % общего количества цитокинов IL-17 или IFN-гамма, продуцируемых клетками. Результаты показали, что в анализе костимуляции аффинная модификация вариантных молекул продемонстрировала измененную функциональную активность Т-клеток в отношении увеличения IL-17 в дополнение к IFN-гамма.

ТАБЛИЦА 16. Данные костимулирующей биоактивности для доменных вариантов ICOSL IgSF

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	IL-17A [пг/мл]	IL-17A кратность ↑WT	IFN-g [пг/мл]	IFN-g кратность ↑WT	Общая кратность ↑WT	% от общего выработанного цитокина		% Общий IL-17 + IFN-g
							% IL-17	% IFN-g	
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	617	7,93	1060	2,48	10,42	5,51	0,77	6,28
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	647	8,33	1316	3,08	11,41	5,79	0,96	6,75
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	549	7,06	1561	3,66	10,72	4,91	1,14	6,05
N52Y, N57Y, F138L, L203P	112	90	1,05	1999	2,69	3,74	0,81	2,91	3,72
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	319	3,16	2218	9,03	12,19	2,85	3,23	6,08
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	510	5,90	8765	11,79	17,70	4,56	12,78	17,33
N52H, N57Y, Q100R	283	473	6,08	1648	3,86	9,94	4,23	1,20	5,43
N52H, Q100R	285	358	4,60	972	7,01	11,62	3,20	0,71	3,91
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	124	1,60	944	2,21	3,81	1,11	0,69	1,80

ТАБЛИЦА 16. Данные костимулирующей биоактивности для доменных вариантов ICOSL IgSF									
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	IL-17A [пг/мл]	IL-17A кратность ↑WT	IFN-g [пг/мл]	IFN-g кратность ↑WT	Общая кратность ↑WT	% от общего выработанного цитокина		% Общий IL-17 + IFN-g
							% IL-17	% IFN-g	
N52H, N57Y, Q100P	113	127	1,47	4922	6,62	8,09	1,14	7,17	8,31
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	22	7,11	130	17,46	24,57	6,41	6,25	12,66
N30D, K42E, N52S	324	349	4,04	5211	7,01	11,05	3,12	7,60	10,71
N52S, F120S, I143V, I224V	325	292	3,39	4803	6,46	9,85	2,61	7,00	9,62
N52S, E90A	323	306	3,54	4564	6,14	9,68	2,73	6,65	9,39
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	290	3,35	4593	6,18	9,53	2,59	6,69	9,28
N52S, N194D	366	428	5,50	1671	3,90	9,4	1,52	5,19	5,40
N52H, I143T	135	84	-	1727	-	3,30	0,75	2,52	3,27
N52D	111	126	-	1447	-	3,41	1,13	2,11	3,23

ПРИМЕР 11

Получение дополнительной сконструированной Т-клетки, экспрессирующей трансмембранный иммуномодулирующий белок, и оценка пролиферации

В этом примере описывается получение дополнительных сконструированных Т-клеток, в которых трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP), содержащий внеклеточный домен (ECD), включающий домен ICOSL IgSF с модифицированной аффинностью, был совместно экспрессирован с химерным антигенным рецептором (CAR). В частности, TIP был получен для включения ECD примерного вариантного ICOSL, содержащего аминокислотные мутации N52D, N52H/N57Y/Q100P, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R или N52H/N57Y/Q100R относительно положений во внеклеточном домене ICOSL, представленном в SEQ ID NO: 32. TIP также содержал трансмембранный домен и цитоплазматический домен соответствующей последовательности трансмембранного белка ICOSL дикого типа, соответствующего остаткам 257-302 SEQ ID NO: 5. Последовательность TIP с сигнальным пептидом и без него выглядит следующим образом: N52D (SEQ ID NO: 496 и 497); N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 498 и 499); E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R (SEQ ID NO: 500 и 501) и

N52H/N57Y/Q100R (SEQ ID NO: 502 и 503). Для сравнения полноразмерный трансмембранный ICOSL дикого типа (аминокислотные остатки 19-302 SEQ ID NO: 5) также был экспрессирован в клетках. Последовательность TIP дикого типа с сигнальным пептидом и без него изложена в SEQ ID NO: 494 и 495. Нуклеиновая кислота, кодирующая TIP, также включала последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP), отделенный от TIP с помощью саморасщепляющейся последовательности T2A.

TIP, содержащий домен с модифицированной аффинностью или трансмембранный белок дикого типа, содержащий соответствующий домен IgSF с немодифицированной аффинностью, был совместно экспрессирован в Т-клетках с химерным антигенным рецептором (CAR). Нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, кодирует, по порядку: сигнальную последовательность CD8 (SEQ ID NO: 481), анти-CD19 scFv (SEQ ID NO: 482), шарнирную/трансмембранную область, полученную из CD8 (SEQ ID NO: 483), костимулирующий сигнальный домен, полученный из 4-1BB (SEQ ID NO: 484) и сигнальный домен CD3 дзета (SEQ ID NO: 247). Полученный анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 490. Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, также включала последовательность, кодирующую синий флуоресцентный белок (BFP, SEQ ID NO: 489), отделенный от CAR с помощью саморасщепляющейся последовательности T2A (приведенной в SEQ ID NO: 488).

По отдельности были получены вирусные векторные конструкции, в которых были клонированы либо нуклеотидная молекула, кодирующая CAR отдельно, либо нуклеотидная молекула, кодирующей один из приведенных в качестве примера TIP или ICOSL дикого типа. Вирусный вектор, кодирующий CAR, и вирусный вектор, кодирующий TIP или ICOSL дикого типа, были совместно трансформированы в Т-клетки. Для трансдукции первичные Т-клетки активировали анти-CD3 и анти-CD28-гранулами (Dynal) при соотношении гранул: 1: 1 и инкубировали в присутствии 100 МЕ/мл IL-2 при 37°C в течение 2 дней. Т-клетки затем собирали и трансдуцировали с помощью 40 0 мкл вирусной надосадочной жидкости CAR и 400 мкл вирусной надосадочной жидкости TIP в присутствии 8 мкг/мл полибрена. Клетки были подвергнуты центрифужной инокуляции при 1000 g в течение 30 минут при 30°C. Затем клетки переносили и инкубировали в течение ночи при 37°C. После инкубации клетки собирали и удаляли вирусную надосадочную жидкость. Клетки ресуспендировали с полной средой и 50 МЕ/мл IL-2. Клетки размножали, пополняли IL-2 и среду каждые два дня в течение 6 дней. Гранулы удаляли из клеток с использованием магнита и подсчитывали перед оценкой в анализе пролиферации. Примерный профиль экспрессии TIP и CAR в примерных

трансдуцированных Т-клетках показан на фиг. 2А.

Для оценки пролиферации Т-клеток CAR и CAR-TIP Т-клеток в ответ на антиген, клетки метили с помощью следовых количеств красителя дальнего красного спектра. CD19-экспрессирующие целевые клетки Nalm6 титровали, начиная с соотношения мишени:Т-клетки 1,5: 1 и разведением 1: 2 с 8-точечным разбавлением. К клеткам Nalm6 добавляли меченные клетки CAR Т или Т-клетки CAR-TIP, и культуру инкубировали в течение 4 дней до того, как клетки были проанализированы с помощью проточной цитометрии. Надосадочную жидкость собирали и дополнительно оценивали в анализе высвобождения цитокинов.

Как показано на фиг. 2B, CAR+ первичные Т-клетки пролиферируют дозозависимым образом в клетки CD19+ NALM6. По сравнению с Т-клетками только с CAR, Т-клетки, коэкспрессирующие CAR и ICOSL дикого типа, или один из примерных ICOSL TIP, демонстрировали повышенную пролиферацию по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими только CAR. Совместная экспрессия CAR и TIP, содержащих либо варианты N52H/N57Y/Q100P, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, либо вариант N52H/N57Y/Q100R ICOSLECD, демонстрировала большую пролиферацию, чем Т-клетки коэкспрессирующие CAR и ICOSL дикого типа, что указывает на то, что TIP, экспрессированные на первичных Т-клетках, обеспечивают улучшенный костимулирующий сигнал для усиления пролиферации Т-клеток.

ПРИМЕР 12

Очистка и оценка очищенных вариантов домена IgSF ICOSL

Стратегия очистки была использована для примерных отобранных кандидатов, описанных в Примерах 6 и 10. Человеческие клетки, полученные из клеточной линии 293 (Expi293), транзиторно трансфицировали экспрессирующей конструкцией, и в клетках экспрессировалась гибридная молекула ECD ICOSL Fc. Затем гибридные белки Fc очищали из надосадочных жидкостей с помощью протеина А и аффинной хроматографии (MabSelect SuRe). За этой начальной стадией очистки проводилась эксклюзионная хроматография (SEC) для дополнительной очистки белков (Superdex200 16x60). Образцы после обеих стадий очистки сохраняли и сравнивали с помощью аналитической SEC. Концентрация белка была определена после очистки на протеине А. Полученные очищенные белки также анализировали аналитической SEC на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для оценки чистоты.

Процент основного пика в очищенных образцах определяли и по сравнению с

белком, очищенным изначально на стадии с протеином А (% основного пика пула прот. А) по сравнению с белком, очищенным с помощью протеина А с последующей препаративной SEC (% основного пика пула SEC T=D0). Как показано в Таблице 17, дополнительная стадия SEC значительно увеличивает чистоту белка очищенных белков. Для дальнейшей оценки стабильности белков, белки, очищенные препаративной SEC, оставляли при комнатной температуре в течение 24 часов, а затем оценивали и сравнивали по основному пику с помощью ВЭЖХ (% основного пика пула SEC T = D24) и сравнивали с образцом D0. Было определено изменение в % основного пика в D0 по сравнению с D24 (▲% основного пика пула SEC). Как показано в Таблице 17, большая часть протестированных примерных вариантных гибридных молекул ECD ICOSL Fc демонстрировали незначительное изменение в % основного пика, что указывает на минимальную агрегацию вариантов белка.

ТАБЛИЦА 17. Очистка вариантов белков ICOSL

Мутация (ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Expi293 прод. Прот. А мг/л	% основного пика пула Прот. А	% основного пика пула SEC T=D0	% основного пика пула SEC T=D24	▲% основного пика пула SEC
N52S, N194D	300	60	73,8	97,1	95,8	1,3
N52H, N57Y, Q100R, F172S	317	95	65,4	90,9	86	4,9
N52S, E90A	364	73	50,6	87,9	78,6	9,3
N52H, Q100R	308	58	-	-	-	-
N52H, N57Y, Q100R	135	134	93,2	96	92,7	3,3
N52S, F120S, I143V, I224V	111	136	90,4	95,5	93,3	2,2
N52H, N57Y, Q100R, C198R	300	60	73,8	97,1	95,8	1,3
N52H, N57Y, Q100P	317	95	65,4	90,9	86	4,9
N30D, K42E, N52S	364	73	50,6	87,9	78,6	9,3
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	308	58	-	-	-	-
N52H, N57Y, Q100R, V122A	135	134	93,2	96	92,7	3,3
N52Y/N57Y/F138L/L203P	111	136	90,4	95,5	93,3	2,2
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	60	73,8	97,1	95,8	1,3
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	95	65,4	90,9	86	4,9
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	73	50,6	87,9	78,6	9,3
V11E, N30D, N52H,	308	58	-	-	-	-

ТАБЛИЦА 17. Очистка вариантов белков ICOSL						
Мутация (ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Expi293 прод. Прот. А мг/л	% основного пика пула Прот. А	% основного пика пула SEC T=D0	% основного пика пула SEC T=D24	▲% основного пика пула SEC
N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T						
N52H, I143T	135	134	93,2	96	92,7	3,3
N52D	111	136	90,4	95,5	93,3	2,2

ПРИМЕР 13

Оценка костимулирующей биоактивности очищенных отобранных вариантов доменов ICOSL IgSF

Примерные гибридные молекулы ECD ICOSL Fc, очищенные, как описано в Примере 12, оценивали по их биоактивности с помощью MLR, по существу, как описано в Примере 6. Смесь из 10 нМ или 40 нМ вариантных ICOSL Fc-белков связывали в течение ночи в 96-луночных планшетах в присутствии 10 нМ анти-CD3. Планшеты промывали и в течение 96 часов добавляли 100 000 меченых CFSE пан Т-клеток. Надосадочные жидкости собирали, и уровни IFN-гамма и IL-17 измеряли с помощью ELISA.

Результаты по секреции цитокинов, индуцированной костимуляцией анти-CD3 с примерными тестируемыми вариантами (10 нМ и 40 нМ ICOSL Fc), показаны на фиг. 3A и 3B, где представлены примерные аминокислотные замены (замещения) доменов IgSF в ECD из ICOSL. Гистограммы на фиг. 3A и 3B демонстрируют количество секретируемого IFN-гамма и IL-17, соответственно, с помощью ELISA в надосадочных жидкостях (пг/мл). Уровень высвобождения цитокинов, индуцированного костимуляцией анти-CD3 с тестируемыми вариантами по сравнению с уровнем, индуцированным костимуляцией анти-CD3 с WT ICOSL, обозначен горизонтальной линией. Результаты показали, что аффинная модификация вариантных молекул проявляет активность в отношении модуляции функциональной активности Т-клеток, в том числе в отношении существенного увеличения секреции IFN-гамма и IL-17 в анализе костимуляции. Повышенная иммунологическая активность наблюдалась с некоторыми вариантами.

ПРИМЕР 14

Оценка пролиферации очищенных отобранных вариантов домена ICOSL IgSF

Примерные варианты гибридных молекул ECD ICOSL Fc, очищенных, как описано в Примере 12, были оценены по способности костимулировать анти-CD3-индуцированную пролиферации Т-клеток. Первичные Т-клетки метили карбоксифлуоресцеин сукцинмидиловым эфиром (CFSE). Смесь 10 нМ или 40 нМ

вариантного белка ECD ICOSL Fc или белка ICOSL дикого типа связывали в течение ночи с 96-луночными планшетами в присутствии 10 нМ анти-CD3 и затем помещали Т-клетки и инкубировали в течение 3 дней. В качестве контроля пролиферация также оценивалась в присутствии связанных анти-CD3 и IgG или IgG отдельно. Клетки окрашивали на поверхностные маркеры CD4 или CD8, а пролиферацию Т-клеток, CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток определяли путем оценки CFSE-разбавления с помощью проточной цитометрии.

Результаты приведены на фиг. 4A и 4B для примерных вариантов, протестированных при 40 нМ и 10 нМ ICOSL, соответственно. Как показано на фиг. 4A, почти все протестированные вариантные гибридные молекулы ECD ICOSL Fc индуцировали пролиферацию, превышающую пролиферацию для контрольного WT. Как показано на фиг. 4B, различия в пролиферации были более очевидными при 10 нМ с некоторыми вариантами, обеспечивающими максимальную пролиферацию даже при этой более низкой концентрации.

ПРИМЕР 15

Оценка связывания и активности очищенных отобранных доменных вариантов ICOSL IgSF

Примерные вариантные гибридные молекулы ECD ICOSL Fc, очищенные, как описано в Примере 12, оценивали на предмет связывания и функциональные активности с использованием способов, по существу, как описано в Примере 6, или Примере 10.

A. Проточные цитометрические анализы связывания

Клетки человека, полученные из клеточной линии 293 (Expi293) трансфицировали CD28, CTLA-4, ICOS или ложно трансфицировали. Затем клетки инкубировали с гибридными молекулами ECD ICOSL Fc или ECD ICOSL-Fc дикого типа, которые титровали от 100000 пМ до 46 пМ, и связывание наблюдали с использованием PE-конъюгированного антитела против Fc человека, как описано в Примере 6. Связывание оценивали с помощью проточной цитометрии и средней интенсивности флуоресценции (MFI), а процент (%) клеток, положительных для сигнала, определяли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США). Определяли концентрацию ICOSL-Fc, которая давала полумаксимальный ответ MFI (MFI EC50) или % положительных клеток (% (+) EC50).

В Таблице 18 представлены результаты. Примерные аминокислотные замены, изображенные в Таблице 18, обозначены номером аминокислотного положения, соответствующего аналогичной референсной (например, немодифицированной) последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32. Для некоторых

значений (например, связывание WT с CD28) невозможно получить EC50, поэтому значение 1000000 пМ было произвольно выбрано для целей форматирования данных. Подобно результатам, полученным в предыдущих анализах связывания, описанных в Примере 10 выше, наблюдалась измененная аффинность связывания вариантной гибридной молекулы ICOSL ECD-Fc, по меньшей мере, для одного когнатного контрструктурного лиганда.

ТАБЛИЦА 18. EC50 по данным проточной цитометрии для вариантов ICOSL

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	CD28 MFI EC50 [пМ]	CD28 % (+) EC50 [пМ]	CTLA-4 MFI EC50 [пМ]	CTLA-4 % (+) EC50 [пМ]	ICOS MFI EC50 [пМ]	ICOS % (+) EC50 [пМ]
WT ICOSL	32	1000000	1000000	1000000	1000000	10543	762
N52H, I143T	135	19147	567	20259	1891	2666	286
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	950	159	73548	422	1032	179
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	29701	152	1008	293	302	64
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1006	231	1332	396	779	130
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	7844	386	7457	994	3104	408
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	5961	595	6909	1026	5514	852
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	1034	307	23328	579	3172	347
N52H, N57Y, Q100R	283	1665	238	11002	533	383	131
N52H, Q100R	285	1305	274	8593	1997	702	167
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	4987	594	30382	922	50219	814
N52H, N57Y, Q100P	113	21137	402	22651	758	4090	320
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	2508	387	5399	806	2381	421
N30D, K42E, N52S	324	-	3683800	8593	1997	3251	558
N52S, F120S, I143V, I224V	325	902400	9060	28126	2948	4366	245
N52S, E90A	323	1339700	31302	31419	5828	5225	473
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	1809	426	7201	841	1293	433
N52S, N194D	366	944669	11876	1254880	5170	473	206
N52D	111	288617	17793	396841	3891	2642	137

B. Анализ связывания ForteBio

Белок-белковые взаимодействия между рецепторами и иммуномодулирующими белками с вариантным доменом ICOSL дополнительно оценивали с использованием

анализов связывания Fortebio. ICOS, CD28 и CTLA-4 загружали индивидуально на анти-человеческие датчики захвата (ForteBio Octet AHC) и немодифицированную молекулу ICOSL ECD-Fc дикого типа, гибридную молекулу PD-L2 ED-Fc дикого типа или вариантные гибридные молекулы ICOSL Fc связывали с рецепторами в 4-точечных титрованиях. Каждое титрование было глобально подогнано для вычисления ассоциации (kon) и диссоциации (Kdis) каждого белка. Определяли ответ анти-человеческих датчиков захвата каждого тестируемого рецептора на вариантную гибридную молекулу ICOSL ECD-Fc. Константу диссоциации (KD) рассчитывали и сравнивали с диким типом, чтобы определить кратное значение улучшения (кратное улучш.).

[0661] Результаты связывания с ICOS приведены в Таблице 19, с CD28 - в Таблице 20, а с CTLA-4 - в Таблице 21. Примерные аминокислотные замены, изображенные в Таблицах 19-21, обозначены номером аминокислотного положения, соответствующего аналогичной исходной немодифицированной последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32.

ТАБЛИЦА 19. Анализ ForteBio связывания с ICOS

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Ответ	KD (M)	Kon (1/Mc)	Kdis (1/c)	Пол-ный R2	Кратное улучш.
WT ICOSL	32	0,73	8,83E-10	1,78E+05	1,58E-04	0,9908	-
N52H, I143T	135	0,87	3,32E-10	3,13E+05	1,04E-04	0,9683	2,7
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	0,74	4,92E-10	3,85E+05	1,89E-04	0,9882	1,8
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	0,67	4,72E-10	3,77E+05	1,78E-04	0,9775	1,9
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	0,68	4,20E-10	4,34E+05	1,82E-04	0,9545	2,1
N52Y/N57Y/F138L/ L203P	112	0,64	7,69E-10	2,22E+05	1,71E-04	0,9782	1,1
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	0,67	3,62E-10	3,55E+05	1,29E-04	0,9687	2,4
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	0,76	4,77E-10	3,29E+05	1,57E-04	0,9616	1,9
N52H, N57Y, Q100R	283	0,74	3,69E-10	2,87E+05	1,06E-04	0,9817	2,4
N52H, Q100R	285	0,79	3,73E-10	4,45E+05	1,66E-04	0,968	2,4
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	0,60	1,29E-09	1,66E+05	2,15E-04	0,9846	0,7
N52H, N57Y, Q100P	113	0,73	3,82E-10	3,71 E+05	1,42E-04	0,9729	2,3
E16V, N52H, N57Y,	300	0,75	5,43E-10	2,65E+05	1,44E-04	0,9848	1,6

ТАБЛИЦА 19. Анализ ForteBio связывания с ICOS							
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Ответ	KD (M)	Kon (1/Mc)	Kdis (1/c)	Пол-ный R2	Кратное улучш.
Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R							
N30D, K42E, N52S	324	0,80	3,71E-10	4,48E+05	1,66E-04	0,9651	2,4
N52S, F120S, I143V, I224V	325	0,80	3,11E-10	5,03E+05	1,56E-04	0,9673	2,8
N52S, E90A	323	0,88	3,40E-10	4,85E+05	1,65E-04	0,9792	2,6
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	0,68	4,77E-10	3,15E+05	1,50E-04	0,976	1,9
N52S, N194D	366	0,88	3,37E-10	3,38E+05	1,14E-04	0,9723	2,6
N52D	111	0,87	3,38E-10	3,91E+ 05	1,32E-04	0,9792	2,6
Wildtype PD-L2 ED-Fc	-	0,03					

ТАБЛИЦА 20. Анализ ForteBio связывания с CD28							
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Ответ	KD (M)	Kon (1/Mc)	Kdis (1/c)	Пол-ный R2	Кратное улучш.
WT ICOSL	32	0,33	1,39E-08	6,69E+04	9,29E-04	0,9715	-
N52H, I143T	135	0,95	5,25E-10	4,27E+05	2,24E-04	0,9877	26,5
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	1,14	4,47E-10	4,12E+05	1,84E-04	0,9877	31,0
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	1,04	3,90E-10	4,07E+05	1,59E-04	0,9878	35,6
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1,06	2,93E-10	4,26E+05	1,25E-04	0,9836	47,3
N52Y/N57Y/F138L/ L203P	112	0,86	7,83E-10	1,79E+05	1,40E-04	0,993	17,7
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	0,92	5,53E-10	2,54E+05	1,40E-04	0,9906	25,1
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	1,10	3,66E-10	3,41 E+05	1,25E-04	0,986	37,9
N52H, N57Y, Q100R	283	1,04	3,68E-10	3,72E+05	1,37E-04	0,983	37,7
N52H, Q100R	285	1,09	4,01E-10	5,0SE+05	2,02E-04	0,9938	34,7
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	0,94	8,96E-10	1,78E+05	1,60E-04	0,9961	15,5
N52H, N57Y, Q100P	113	0,99	4,36E-10	3,29E+05	1,43E-04	0,9835	31,8
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C,	300	1,06	5,03E-10	3,06E+05	1,54E-04	0,9872	27,6

ТАБЛИЦА 20. Анализ ForteBio связывания с CD28							
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Ответ	KD (M)	Kon (1/Mc)	Kdis (1/c)	Пол-ный R2	Кратное улучш.
K156M, C198R							
N30D, K42E, N52S	324	0,54	1,95E-09	2,74E+05	5,33E-04	0,9772	7,1
N52S, F120S, I143V, I224V	325	0,84	9,10E-10	4,51 E+05	4,10E-04	0,9742	15,3
N52S, E90A	323	0,94	9,69E-10	4,74E+05	4,59E-04	0,978	14,3
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	0,94	5,63E-10	2,63E+05	1,48E-04	0,9781	24,7
N52S, N194D	366	0,82	1,04E-09	3,53E+05	3,68E-04	0,9887	13,3
N52D	111	0,86	1,16E-09	3,36E+05	3,90E-04	0,989	11,9
wildtype PD-L2 ED-Fc	-	-0,04					

ТАБЛИЦА 21. Анализ ForteBio связывания с CTLA-4							
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	Ответ	KD (M)	Kon (1/Mc)	Kdis (1/c)	Полный R2	Крат-ное улуч.
WT ICOSL	32	0,21	7,71E-08	1,92E+04	1,48E-03	0,8919	-
N52H, I143T	135	0,96	6,78E-10	7,26E+05	4,92E-04	0,9641	113,8
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	1,57	6,45E-10	4,79E+05	3,09E-04	0,9875	119,6
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	1,43	5,76E-10	4,73E+05	2,72E-04	0,9926	133,9
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	1,47	5,36E-10	5,13E+05	2,75E-04	0,9924	144,0
N52Y/N57Y/F138L/L 203P	112	1,33	8,33E-10	3,45E+05	2,87E-04	0,9943	92,6
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	1,50	6,48E-10	3,12E+05	2,02E-04	0,9943	119,0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	1,60	8,64E-10	4,79E+05	4,14E-04	0,9825	89,2
N52H, N57Y, Q100R	283	1,65	7,19E-10	4,28E+05	3,08E-04	0,9895	107,2
N52H, Q100R	285	1,17	5,92E-10	8,37E+05	4,96E-04	0,9629	130,3
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	1,32	1,47E-09	2,34E+05	3,44E-04	0,9937	52,6
N52H, N57Y, Q100P	113	1,51	6,47E-10	3,61 E+05	2,33E-04	0,9911	119,2
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	1,58	1,06E-09	4,24E+05	4,49E-04	0,9779	72,8
N30D, K42E, N52S	324	0,42	2,81E-09	2,42E+05	6,81E-04	0,9676	27,4

N52S, F120S, I143V, I224V	325	0,58	1,20E-09	3,10E+05	3,72E-04	0,9283	64,3
N52S, E90A	323	0,64	1,12E-09	3,28E+05	3,68E-04	0,9184	68,7
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	1,44	1,07E-09	4,0SE+05	4,32E-04	0,9811	72,3
N52S, N194D	366	0,59	2,52E-09	2,66E+05	6,69E-04	0,9643	30,6
N52D	111	0,62	1,52E-09	4,16E+05	6,32E-04	0,9234	50,7
wildtype PD-L2 ED-Fc	-	0,00					

D. Анализ коиммобилизации

Костимулирующую биоактивность гибридных вариантов ICOSL определяли в анализах коиммобилизации с анти-CD3, по существу, как описано в Примере 6. Примерно 0,37 нМ, 1,3 нМ или 10 нМ мышиного антитела против CD3 человека (OKT3, Biolegends, США) разводили в PBS с помощью 10 нМ или 40 нМ вариантного ICOSL ECD Fc или ICOSL ECD-Fc дикого типа. Эту смесь добавляли к обработанным 96-луночным планшетам с плоским дном для тканевых культур, в течение ночи для облегчения прилипания стимулирующих белков к лункам планшета. На следующий день несвязанный белок промывали с планшетов и в каждую лунку добавляли 100000 очищенных пан Т-клеток человека. Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидокстей и измерения уровней IFN-гамма человека с помощью набора ELISA.

В Таблице 22 представлено количество IFN-гамма (пг/мл), продуцируемого клетками при различных условиях в анализе коиммобилизации с анти-CD3. В Таблице представлены аминокислотные замены примерных вариантных гибридов ICOSL-Fc, которые обозначены номером положения аминокислоты, соответствующим немодифицированной последовательности ICOSL ECD, представленной в SEQ ID NO: 32, и соответствующим идентификатором SEQ ID NO для вариантного ECD для каждый вариантной гибридной молекулы ICOSL ECD-Fc. Показано соотношение IFN-гамма, полученное в присутствии каждого варианта ICOSL ECD-Fc в функциональном анализе по сравнению с присутствием соответствующего немодифицированного ECD-Fc (дикого типа) (кратность ↑ WT). Как показано, костимулирующая сигнализация вариантных молекул ICOSL-ECD-Fc была значительно выше по сравнению с ICOSL дикого типа.

ТАБЛИЦА 22. Оценка ответов IFN-гамма в анализе костимуляции

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	IFN-гамма [пг/мл]						
		40 нМ лиганд		10 нМ лиганд		40 нМ лиганд		
		10 мМ OKT3	Кратное ↑WT	10 мМ OKT3	Кратное ↑WT	10 мМ OKT3	1,1 нМ OKT3	0,37 нМ OKT3
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C,	300	14372	17,3	4903	29,9	8379,2	7422,8	2893,7

ТАБЛИЦА 22. Оценка ответов IFN-гамма в анализе костимуляции								
Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	IFN-гамма [пг/мл]						
		40 нМ лиганд		10 нМ лиганд		40 нМ лиганд		
		10 мМ OKT3	Кратное ↑WT	10 мМ OKT3	Кратное ↑WT	10 мМ OKT3	1,1 нМ OKT3	0,37 нМ OKT3
K156M, C198R								
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	10640	12,8	6456	39,4	5636,2	4724,2	2246,3
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	10379	12,5	3741	22,8	3979,7	4067,7	1415,5
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	9590	11,5	4048	24,7	4215,8	2787,1	1072,4
N52H, N57Y, Q100R	283	9568	11,5	3270	19,9	4412,3	3862,0	1820,0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	6939	8,4	3234	19,7	5495,2	4081,6	1442,8
N52S, F120S, I143V, I224V	325	6567	7,9	717	4,4	2145,4	2185,7	646,1
N52S, N194D	366	5690	6,8	272	1,7	2315,1	1485,0	1140,6
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	5345	6,4	1152	7,0	2747,0	3383,4	1701,2
N52S, E90A	323	5097	6,1	706	4,3	5019,8	3036,4	1482,4
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	4737	5,7	520	3,2	2501,5	1632,1	937,5
N52H, Q100R	285	4122	5,0	1466	8,9	5782,1	2861,4	967,5
N30D, K42E, N52S	324	4080	4,9	273	1,7	1336,8	1260,7	541,1
N52H, N57Y, Q100P	113	3344	4,0	229	1,4	2525,4	2439,5	1233,9
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	3064	3,7	1471	9,0	2699,5	2629,9	678,2
N52Y, N57Y, F138L, L203P	112	2177	2,6	200	1,2	1889,5	1757,9	808,8
N52H, I143T	135	1906	2,3	138	0,8	1417,1	1367,9	275,2
WT ICOSL	32	831	1,0	164	1,0	558,8	377,7	152,0
N52D	111	88	0,1	231	1,4	1288,9	1737,9	289,0

E. Реакция смешанных лимфоцитов для оценки супрессии биореактивности

Модуляция активности Т-клеток гибридными вариантами определяли в реакции смешанных лимфоцитов (MLR), по существу, как описано в Примере 6. Человеческие моноциты инкубировали в течение 6 дней в присутствии IL-4 и GM-CSF и созревали в дендритные клетки при добавлении LPS в течение последних 24 часов. 1 × 104 дендритных клеток и 1 × 105 человеческих Т-клеток, меченных CFSE, высевали на лунку

и инкубировали в течение 4 дней в присутствии трех различных концентраций (40 нМ, 13,3 нМ или 4,4 нМ) дикого типа или рекомбинантной вариантной молекулы ICOSL ECD-Fc, разведенных в PBS. В качестве контролей использовали те же концентрации человеческого IgG, PD-L2-Fc или белатацепта (CTLA4-Fc, содержащий мутации L104E и A29Y). Надосадочные жидкости собирали, и ответы IFN-гамма описывали с помощью ELISA.

На фиг. 5 изображена выработка IFN-гамма при различных условиях. Уровни IFN-гамма, продуцируемые клетками в присутствии ICOSL дикого типа представлены горизонтальной линией. Не наблюдалось подавления образования IFN-гамма в присутствии белка отрицательного контроля PD-L2-Fc. Напротив, большинство тестируемых вариантов ICOSL проявили некоторую степень ингибирования продуцирования IFN-гамма в MLR. В некоторых воплощениях наблюдалось значительное ингибирование IFN-гамма от очень низкой до необнаруживаемой выработки IFN-гамма, полученной в культурах, даже при самой низкой протестированной концентрации 4,4 нМ. Процент супрессии MLR в присутствии 4.4 нМ варианта ECD ICOSL-Fc, приведен в Таблице 23. В Таблице отрицательные значения указывают на воспалительный эффект в анализе.

ТАБЛИЦА 23. Данные костимулирующей биоактивности для ICOSL в MLR

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO. (ECD)	% супрессии MLR (4.4 нМ)
N52H, N57Y, Q100R, C198R	365	93,6
N52H, N57Y, Q100R, V122A	290	94,4
N52H, N57Y, Q100R, F172S	291	100,0
N52Y/N57Y/F138L/L203P	112	100,0
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	308	100,0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	367	100,0
N52H, N57Y, Q100R	283	98,2
N52H, Q100R	285	97,5
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	364	90,4
N52H, N57Y, Q100P	113	100,0
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	300	100,0
N30D, K42E, N52S	324	-38,8
N52S, F120S, I143V, I224V	325	-44,2
N52S, E90A	323	-30,4
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	317	100,0
N52S, N194D	366	-22,3
N52H, I143T	135	-78,0
N52D	111	0,5

F. Оценка пролиферации и внутриклеточных цитокиновых маркеров проточной цитометрией

Меченные карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловым эфиром (CFSE) пан Т-клетки из исследований MLR, как описано выше, которые инкубировали в течение 4 дней в присутствии молекул ICOSL ECD-Fc дикого типа или рекомбинантных вариантных молекул ICOSL ECD-Fc были дополнительно протестированы на предмет уровней цитокинов с помощью рестимуляции форболацетатмиристатом (PMA)/иономицином в течение 6 часов в присутствии ингибитора Гольджи (Golgi/Block/Plug). Т-клетки из исследования MLR, которые были инкубированы с человеческим IgG, анти-CD28, анти-ICOSL, PD-L2-Fc или белатацептом (CTLA4-Fc, содержащим мутации L104E и A29Y), также были рестимулированы. Т-клетки окрашивали для поверхностных маркеров CD4 или CD8, фиксировали, пермеабилизировали и внутриклеточно окрашивали по различным цитокинам, как указано в Таблицах 24 и 25.

Процент (%) CD4 + и CD8 + Т-клеток, которые были положительными в отношении специфических внутриклеточных цитокинов, представлены в Таблице 24 соответственно. Результаты показали, что ряд вариантных молекул ICOSL ECD-Fc способен подавлять один или несколько цитокинов, в том числе в некоторых случаях большинство цитокинов. Суммарная оценка и средняя оценка рассчитывались для оценки суммарных эффектов отдельных молекул, проверенных по параметрам, рассмотренным в этом анализе. Также оценивали пролиферацию и процент клеток, которые вошли в деление, что определялось по разбавлению CFSE, что также показано в Таблице 24 и 25. Из предлагаемых результатов результаты показывают, что определенные варианты демонстрируют сравнимую или лучшую активность, чем белатацепт, особенно на клетках CD8+.

ТАБЛИЦА 24. Оценка пролиферации и внутриклеточных уровней цитокинов в CD4+ Т-клетках

		% Цитокина +									
Вариантный SEQ ID NO (ECD) или Белок	Пролиф	% IFNg+	%IL4+	% IL21 +	% IL22 +	%TNF +	%IL2 +	%IL10 +	% IL17A +	Общий балл	Средний балл
308	3,0	9,9	3,0	1,0	1,3	34,9	31,3	0,1	0,2	41,0	4,6
300	2,7	11,1	3,4	1,1	1,4	38,0	35,0	0,0	0,1	63,0	7,0
317	2,9	10,9	3,3	1,1	1,5	37,3	34,1	0,1	0,2	65,0	7,2
291	3,2	8,1	2,5	0,6	1,1	27,9	24,1	0,9	1,3	66,0	7,3

283	3,3	9,2	3,0	0,8	1,4	31,1	26,3	0,8	1,3	70,0	7,8
364	3,4	10,9	3,3	1,0	1,6	36,5	32,3	0,5	0,9	89,0	9,9
390	3,6	9,5	3,1	0,9	1,5	33,8	29,4	0,8	1,4	92,0	10,2
367	2,8	12,0	3,5	1,1	1,6	40,9	38,5	0,1	0,3	92,0	10,2
CTLA-4-Ig: L104E, A29Y (Белата-цепт)	10,7	10,5	2,7	2,4	2,0	24,5	19,6	0,6	1,4	99,0	11,0
112	3,5	12,0	3,8	1,3	1,6	41,3	36,7	0,2	0,4	109,0	12,1
285	4,4	9,8	3,2	1,2	1,7	32,7	29,3	0,9	1,4	114,0	12,7
113	3,0	13,2	4,1	1,2	1,8	43,2	39,8	0,1	0,2	115,0	12,8
365	3,6	11,3	3,9	1,0	2,0	39,1	34,6	0,8	1,3	118,0	13,1
WT ICOSL	12,7	16,7	5,8	4,9	4,7	36,2	29,2	0,2	0,4	127,0	14,1
113	3,5	12,3	3,9	1,1	1,8	39,2	37,5	0,4	0,6	127,0	14,1
366	10,9	16,0	7,2	4,9	5,4	40,6	33,0	0,1	0,2	135,0	15,0
321	10,6	16,7	6,0	4,3	5,0	41,3	37,3	0,2	0,3	146,0	16,2
mIgG ctl	15,5	15,6	5,9	5,2	4,6	31,7	26,0	0,4	1,7	146,0	16,2
PDL2	12,3	17,9	5,7	4,7	5,2	41,4	36,0	0,3	0,6	163,0	18,1
323	11,9	17,7	6,2	5,2	5,3	42,4	37,5	0,2	0,4	167,0	18,6
WT ICOSL	12,8	17,4	6,3	5,4	5,6	38,9	32,1	0,3	0,6	167,0	18,6
Анти-ICOSL	15,5	16,3	6,5	5,2	5,5	35,1	29,1	0,7	2,0	168,0	18,7
135	12,6	17,4	6,5	5,4	4,9	44,3	37,2	0,4	0,5	179,0	19,9
HuIgG	12,7	17,1	6,3	5,9	4,9	41,1	32,4	0,7	1,3	181,0	20,1
Анти-CD28	88,2	42,9	5,0	5,8	5,4	43,5	25,5	0,4	1,4	183,0	20,3
325	12,7	18,7	6,5	5,4	5,6	44,2	40,0	0,1	0,3	186,0	20,7
111	13,7	18,3	6,8	5,9	6,1	42,1	35,2	0,3	0,5	194,0	21,6

ТАБЛИЦА 25. Оценка пролиферации и внутриклеточных уровней цитокинов в CD8+ Т-клетках

		% Цитокина +									
Вариантный SEQ ID NO (ECD) или Белок	Пролиф	% IFNg+	%IL4+	% IL21+	% IL22+	% TNF+	% IL2+	% IL10+	% IL17A+	Общий балл	Средний балл
308	4,2	8,4	1,6	2,2	47,2	7,6	8,0	0,2	0,1	67,0	7,4
300	3,8	8,5	2,0	2,2	47,2	8,1	9,1	0,1	0,0	69,0	7,7
317	3,9	8,8	2,0	1,7	45,6	8,4	9,0	0,1	0,1	64,0	7,1
291	3,8	7,0	1,4	1,8	46,6	5,9	5,9	1,1	1,1	78,0	8,7
283	4,3	8,4	1,9	1,7	50,2	7,1	6,6	1,1	1,1	98,0	10,9
364	4,1	9,0	1,8	1,8	46,4	8,2	8,5	0,7	0,8	87,0	9,7
390	4,1	7,9	1,8	1,8	49,8	7,3	7,2	1,0	1,2	93,0	10,3
367	3,5	9,0	1,7	2,0	47,3	8,6	10,4	0,2	0,2	78,0	8,7
CTLA-4-Ig:	12,3	14,5	2,0	3,2	38,1	11,2	8,8	0,9	1,6	121,0	13,4

L104E, A29Y (Белатацепт)											
112	4,2	9,6	1,9	1,8	40,4	9,4	9,9	0,3	0,3	81,0	9,0
285	5,4	9,5	2,0	2,7	44,2	7,8	8,4	1,2	1,3	112,0	12,4
113	3,7	9,5	1,9	1,3	44,4	9,4	10,5	0,1	0,1	62,0	6,9
365	4,1	9,6	2,3	1,8	46,8	9,0	9,3	0,9	1,0	122,0	13,6
ICOSL	17,2	22,3	4,9	6,4	46,4	22,0	15,7	0,4	0,7	181,0	20,1
113	4,2	9,5	2,0	2,1	45,6	8,9	10,7	0,5	0,5	110,0	12,2
366	14,5	19,4	5,6	4,8	48,4	19,2	13,8	0,1	0,2	142,0	15,8
321	13,4	18,9	4,3	5,0	46,3	18,4	15,4	0,3	0,6	138,0	15,3
mIgG ctl	20,2	25,0	4,4	4,1	35,5	24,6	15,8	0,7	1,8	174,0	19,3
PDL2	15,6	21,2	4,1	4,8	44,1	20,7	15,6	0,5	0,8	147,0	16,3
323	15,4	20,8	4,7	5,6	44,9	20,6	17,1	0,2	0,5	149,0	16,6
WT ICOSL	17,5	22,1	5,5	4,6	45,0	21,0	12,8	0,2	0,4	148,0	16,4
Анти-ICOSL	21,5	26,4	4,8	5,3	33,4	26,9	19,0	1,0	2,3	198,0	22,0
135	17,2	22,2	4,7	6,7	39,4	22,5	18,1	0,8	0,9	178,0	19,8
HuIgG	15,9	21,5	4,4	6,4	41,6	21,4	15,1	1,4	1,7	179,0	19,9
Анти-CD28	60,6	44,3	3,5	2,1	38,6	32,5	16,0	1,2	1,6	182,0	20,2
325	16,5	22,0	4,9	5,4	44,0	21,9	18,5	0,2	0,6	161,0	17,9
111	17,7	22,8	5,3	6,1	45,4	22,9	16,7	0,4	0,6	183,0	20,3

ПРИМЕР 16

Оценка выработки цитокинов в совместной культуре B-T-клеток

B-клетки и CD4 + T-клетки очищали из одного донора, метили с помощь CSFE и высевали в 96-луночные планшеты при соотношении клеток 1: 1 при 5 × 104 клеток на лунку каждых. Добавляли гибридные молекулы ICOSL ECD-Fc или белатацепт при конечной концентрации 40 нМ на лунку. Клетки либо не стимулировались, либо инкубировались с 100 нг/мл энтеротоксина B стафилококка (SEB), 1 (г/мл митогена фитолакки (PWM) или обоими в течение 7 дней при 37 ° C в конечном объеме 200 л/лунку.

Клетки собирали и окрашивали их поверхность следующими маркерами B- и T-клеточных линий (IgM, IgD, CD38, CD138, CD27, CD19, CD4, CD3). Пролиферацию оценивали с помощью проточной цитометрии и культуральные надосадочные жидкости анализировали на цитокины IL-5, IL-13 или IL-21 с использованием набора для обнаружения цитокинов человека LEGENDplex (Biolegend, США).

Как показано на фиг. 6A, количество делящихся B-клеток было уменьшено в совместных культурах B/T-клеток при инкубации в присутствии вариантных -Fc-гибридных молекул ICOSL ECD по сравнению с контролем без белка. Степень антагонистического эффекта для протестированных примерных вариантов была аналогична эффекту CTLA-4-Ig белатацепта (L104E, A29Y). Аналогично, как показано на фиг. 6B-6D, вариантные гибридные молекулы ICOSL ECD Fc ингибировали продукцию

цитокинов в совместных культурах первичных B/T клеток человека in vitro в сравнении с контролем без белка, а также с культурами, содержащими контрольный ICOSL дикого типа. По сравнению с белатацептом, примерные протестированные вариантные гибридные молекулы ICOSL ECD Fc были более эффективными при блокировании выработки цитокинов в некоторых случаях.

ПРИМЕР 17

Оценка активности выживания и заболевания в модели реакции трансплантат против хозяина (GvHD)

Примерный вариантный белок ICOSL ECD-Fc, оценивали на предмет активности в модели реакции трансплантат против хозяина (GVHD). Самок мышей NSG (n = 10 на группу) облучали (100 рад) и подкожно вводили 10 мг гамма-глобулина в День -1. В день 0 мыши получали 10 миллионов человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и внутрибрюшинную инъекцию либо 100 мкг WT-ICOSL ECD Fc, вариантной молекулы ICOSL ECD Fc N52H/I143T (ECD представлен в SEQ ID NO: 135), вариантной молекулы ICOSL ECD Fc N52H/N57Y/Q100P (ECD представлен в SEQ ID NO: 113), 75 мкг белатацепта (CTLA-4-Ig L104E/A29Y, публикация патентной заявки США № US20160271218) или физиологического раствора в качестве контроля. На 15-й день привитые человеческие клетки CD45 + были фенотипированы проточной цитометрией. После окончания исследования на 35-й день были оценены конечные показатели выживаемости, потери массы тела и активность заболевания.

На фиг. 7A показана выживаемость мышей GVHD, обработанных физиологическим раствором, WT ICOSL-ECD Fc, вариантной молекулой ICOSL ECD-Fc или белатацептом. Наблюдали существенное различие в выживаемости мышей, которым вводили вариантный ICOSL ECD-Fc N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113), по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор или WT ICSOL ECD-Fc ($p < 0{,}0001$ по критерию Кокса-Мантеля и критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). На фиг. 7B показаны сходные различия между потерей массы тела мышей, обработанных физиологическим раствором, WT ICOSL ECD-Fc, вариантными молекулами ICOSL ECD-Fc или белатацептом в ходе исследования.

Индекс активности заболевания (DAI) определяли три раза в неделю в течение исследования и оценивали на предмет потери массы, позы, активности, внешнего вида шерстного покрова и кожи мышей. Градация заболевания в течение исследования показана на фиг. 7C. Группы обработки, которые получали вариантный ICOSL Fc N52H/N57Y/Q100P (ECD, прелставленный в SEQ ID NO: 113) или белатацепт, показали значительно улучшенные баллы DAI. Процент человеческих Т-клеток в периферической

крови на 14-й день исследования также оценивали с помощью проточной цитометрии. Измерения усреднялись по группам обработки, а планки погрешностей представляли стандартную ошибку среднего (SEM). Фиг. 7D показывает процент живых CD3 +/CD4 + или CD3 +/CD8 + клеток в крови. Группы обработки, которые получали вариантный ICOSL ECD Fc с N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113) или белатацепт, показали значимо разные уровни CD4+ Т-клеток по сравнению с группой обработки физраствором (p = 0,008 и 0,006, соответственно, непарный критерий Стьюдента). Это исследование демонстрирует терапевтический эффект Вариантного белка ICOSL Fc на первичных Т-клетках человека и GVHD на модели in vivo.

Аналогичное исследование было проведено с дополнительными вариантными ICOSL ECD-Fc гибридными молекулами, включая вариант ICOSL ECD-Fc N52H/N57Y/Q100R/C198R (ECD указан в SEQ ID NO: 365), N52H/N57Y/Q100R/F172S (набор ECD далее в SEQ ID NO: 291) и N52H/N57Y/Q100P (ECD указан в SEQ ID NO: 288). N52H/Q100R (ECD, представленный в SEQ ID NO: 285), который обладал пониженной активностью в исследованиях MLR in vitro, как показано выше, также был протестирован. Мышей NSG (n = 9/группу) обрабатывали, как описано выше. В этом исследовании дозирование с помощью ICOSL-Fc или Белатацепта продолжалось 3 раза в неделю с 0 по 37 день, а выживших мышей убивали на 49 день. Для определения статистических различий в показателях выживаемости между группами данные анализировали с использованием критерия Мантеля-Кокса (лог-рангового критерия). Полученные кривые выживаемости показаны на фиг. 7E. Белатацепт и варианты ICOSL-Fc N52H/N57Y/Q100R/C198R (ECD указан в SEQ ID NO: 365), N52H/N57Y/Q100R/F172S (ECD указан в SEQ ID NO: 291) и N52H/N57Y/Q100P (ECD указан в SEQ ID NO: 288) значительно продлевают выживаемость по сравнению с физиологическим раствором и WT ICOSL-Fc (p <0,001). Средние баллы DAI наносили на временной график эксперимента, причем последнее наблюдение (т.е. средние баллы, собранные в дни окончания) переносили на график для тех групп, которые были терменированы до последнего запланированного дня исследования (день 49). Значительные различия между группами по данным во времени (то есть по баллам DAI) были определены с использованием двухсторонних повторных измерений ANOVA для эффектов «обработки». Полученные баллы DAI показаны на Фиг. 7F. Белатацепт и варианты ICOSL-Fc N52H/N57Y/Q100R/C198R (ECD указан в SEQ ID NO: 365), N52H/N57Y/Q100R/F172S (ECD указан в SEQ ID NO: 291) и N52H/N57Y/Q100P (ECD указан в SEQ ID NO: 288) значительно снижают баллы DAI по сравнению с солевым раствором и WT ICOSL-Fc ($p<0.001$) , а также между белатацептом и вариантом ICOSL-Fc

с N52H/N57Y/Q100R/C198R с помощью двухфакторного дисперсионного анализа для баллов DAI (p = 0,035).

Активность вариантного ICOSL-Fc в некоторых случаях улучшалась по сравнению с обработкой белатацептом. Введение вариантов ICOSL-Fc защищало от эффектов GVHD, о чем свидетельствует повышенная выживаемость и замедленное развитие заболевания, на уровнях, сопоставимых или лучше, чем у белатацепта. Активность в этой модели коррелировала с активностью in vitro, поскольку WT ICOSL-Fc и вариант ICOSL-Fc с мутациями N52H/Q100R (ECD, представленный в SEQ ID NO: 285) не были столь эффективными в этой модели.

ПРИМЕР 18

Оценка активации стековыми молекулами

Вариантные гибридные белки со стеком IGV Fc, содержащие домен NKp30 IGV в качестве локализирующего домена (обозначенный «L») и домен ICOSL IgV в качестве костимулирующего домена (обозначенный «C») получали и оценивали, по существу так, как описано в Примере 8. В частности, конструкции, протестированные в этом эксперименте, включают: (1) стековую конструкцию с вариантным гибридным белком IgV Fc (vIgD CL), содержащим NKp30, состоящий из Ig с консенсусного варианта NKp30 (SEQ ID NO: 493) и домена IgV вариантного ICOSL N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113 и IgV, представленный в SEQ ID NO: 201); (2) стековуб конструкцию с доменом Ig домена NKp30 дикого типа (SEQ ID NO: 214) и V-доменом ICOSL дикого типа (WT CL) (SEQ ID NO: 196); (3) конструкцию с доменом ICOSL IgV дикого типа (домен WT C, SEQ ID NO: 196) и (3) конструкцию с доменом NKp30 дикого типа (домен WT L, SEQ ID NO: 214).

Клетки CD32 + K562 были сконструированы для стабильного экспрессии B7-H6 на поверхности клетки. Затем клетки обрабатывали митомицином и рассевали с пан T-клетками в присутствии/отсутствии 10нМ анти-CD3 и стековых вариантов или контрольных доменов при 100, 33, 11 или 3,7 нМ. Клетки культивировали за 3 дня до сбора культуральных надосадочных жидкостей и измерения уровней IFN-гамма человека с использованием ELISA.

Как показано на фиг. 8A, костимулирующие-локализующие доменные стеки, как вариантные, так и дикого типа, были способны локализоваться на сконструированных клетках K562 и доставлять ко-стимулирующий сигнал в пан-T-клетки, чтобы индуцировать секрецию IFN-гамма. Стековая конструкция с вариантным гибридным белком IgV Fc (vIgD C-L) показала результат с повышенной функциональной активностью во всех тестируемых концентрациях, в то время как индивидуальные

доменные компоненты не оказывали воздействия, когда они не были объединены друг с другом.

ПРИМЕР 19

Оценка гиперчувствительность замедленного типа in vivo

Вариантные гибридные молекулы ICOSL ECD-Fc оценивали на противовоспалительную активность in vivo в мышиной модели гиперчувствительности замедленного типа (DTH). Иммунные реакции гиперчувствительности замедленного типа выявляли у мышей, сенсетизованных овальбумином (OVA), и оценивали ответ после провокационной пробы. Протестированные вариантные гибридные молекулы ICOSL ECD-Fc, содержали вариант ECD со следующими аминокислотными заменами: N52H/N57Y/Q100P (ECD, представленный в SEQ ID NO: 113), N52H/Q100R (ECD, представленный в SEQ ID NO: 285), или N52H/N57Y/Q100R/F172S (ECD, представленный в SEQ ID NO: 291). Варианты были слиты либо с каркасом Fc, содержащим мутации C220S/L234A/L235E/G237A по нумерации EU (обозначенным Fc # 1), который представлен в SEQ ID NO: 477), либо с каркасом Fc, содержащим мутации C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K по нумерации EU (обозначенным Fc # 2), который представлен в SEQ ID NO: 478), либо с линкером G4S (GGGGS), либо без него. В Таблице 26 приведены протестированные конструкции:

ТАБЛИЦА 26. Гибридные Конструкции ICOSL ECD-Fc

	ICOSL ECD (SEQ ID NO)	Линкер G4S	Fc (SEQ ID NO)
N52H/N57Y/Q100P (G4S)-Fc #1	113	+	477
N52H/Q100R (G4S)-Fc #1	285	+	477
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)-Fc	291	+	478
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)-Fc	291	+	477
N52H/N57Y/Q100R/F172S-Fc	291	-	477

Для сенсибилизации, 8-недельным самкам мышей линии BALB/C вводили подкожно 100 мкг OVA, эмульгированного в адъюванте Sigma (100 мкл; каталожный № S6322-1VL) в основание хвоста на 0-й день. В дни 1 и 4 мышам вводили вариантные гибридные белки ICOSL ECD-Fc, 75 мкг CTLA-4 Fc (абатацепт) или PBS в качестве отрицательного контроля путем внутрибрюшинной инъекции. На 7-й день за два-три часа перед провокационной дозой OVA мышам путем внутрибрюшинной инъекции дополнительно вводили PBS в качестве контроля, 75 мкг CTLA-4 Fc (абатоцепт из Orencia) или указанный вариантный полипептид ICOSL. Абатацепт и различные

гибридные молекулы ICOSL-Fc дозировали в молярных эквивалентах.

Для провокационной дозы OVA проводили внутрикожную инъекцию 10 мкг OVA в левой ушной раковине в объеме 10 мкл PBS под газовой изофлурановой анастезией за 2-3 часа перед терапевтической обработкой. Исходное значение толщины ушей измеряли перед провокационной дозой OVA.

На 8 -й день, толщину уха измеряли под изофлурановой анестезией с помощью штангенциркуля Mitutoyo, и определили изменение толщины уха до и после провокационной дозы OVA. Как показано на фиг. 9, мыши, обработанные указанными вариантными гибридными молекулами ICOSL ECD-Fc, показали значительно меньшее OVA-индуцированное набухание уха по сравнению с контролем PBS (<0,0001 по однофакторному дисперсионному анализу). Не было обнаружено существенных различий между толщиной ушей для мышей, обработанных абатацептом, по сравнению с любым из указанных вариантных гибридных молекул ICOSL ECD-Fc или между обработками вариантными ICOSL. Эти результаты показывают, что вариантные молекулы ICOSL могут снижать иммунные ответы in vivo.

ПРИМЕР 20

Получение и оценка связывания и активности вариантных ICOSL IgSF-доменсодержащих молекул

Дополнительные вариантные ICOSL IgSF (например, ECD) доменсодержащие молекулы, были получены, как описано ниже. В каждой из таблиц ниже в Таблице указаны аминокислотные замены в ECD варианта ICOSL, обозначенные номером аминокислотного положения, соответствующим положениям аминокислот в соответствующей последовательности референсного (например, немодифицированного) внеклеточного домена ICOSL (ECD), представленной в SEQ ID NO: 32. В некоторых случаях удаление линкерной последовательности AAA варианта ICOSL ECD-Fc, обозначенной как “ΔAAA”. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для каждого вариантного домена ECD, содержащегося в вариантной гибридной молекуле ECD-Fc.

A. Получение дополнительных вариантов

1. Варианты растворимости

Из коллекции мутантов, содержащих представленные ниже мутации, включающие E16V, N30D, K42E, N52H, N52Y, N52S, N57Y, E90A, Q100R, Q100P, L102R, V110D, H115R, F120S, V122A, F138L, I143V, I143T, H152C, K156M, F172S, N194D, C198R, L203P, R221I, I224V, мутации H115R, F172S и C198R были идентифицированы как мутации, которые могут потенциально повысить растворимость белка или усилить экспрессию белка («мутации растворимости»). Эти три мутации (H115R, F172S и C198R) случайным

образом вводили сайт-направленным мутагенезом в один и тот же набор клонов для получения набора производных, которые содержат одну или несколько из этих мутаций растворимости. Поскольку реакция направленного мутагенеза была проведена с объединенными мутагенными олигонуклеотидами, которые реагировали с объединенными родительскими клонами в одной реакции, некоторые из клонов также содержат некоторые мутации из других родительских клонов. Полученные варианты содержат от 3 до 10 различных аминокислотных мутаций в различных комбинациях, описанных в Таблице 27A.

ТАБЛИЦА 27A. Примерные вариантные полипептиды ICOSL

Мутация(и)	ECD SEQ ID NO
Дикий тип	32
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	435
N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R	436
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R	437
N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R	438
N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R	439
N52H/V122A/F172S/C198R	440
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D	441
N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R	442
N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R	443
N52H/N57Y/H115R	444
N52H/N57Y/Q100R/H115R	445
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V	446
N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S	447
N52H/N57Y/Q100R/F172S	448
N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S	449
N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S	450
N52Y/N57Y/Q100P/F172S	451
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R	452
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R	453
N52S/E90A/H115R	454
N30D/K42E N52S/H115R	455
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I	456
N30D/K42E/N52S/H115R/C198R	457
N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D	458
N52S/H115R/F120S/I143V/C198R	459
N52S/H115R/F172S/C198R	460
N52H/N57Y/Q100P/C198R	461
N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R	462
N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R	463
N52H/N57Y/Q100P/H115R	464
N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R	465
N52H/Q100R/C198R	466
N52H/Q100R/H115R/F172S	467
N52H/Q100R/H115X/F172S/C198R	468

N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R	469
N52H/N57Y/Q100R /F172S/C198R	470

2. Обратные варианты

Конкретные примеры мутаций, включая N52H, N52Y, N57Y, Q100R, Q100P, F138L, C198R, L203P, идентифицированные в отобранных вариантах, описанных в Примере 6, были дополнительно объединены в ECD референсного (например, дикого типа) ICOSL относительно положений, предлагаемых в SEQ ID NO: 32 для создания дополнительных комбинированных вариантов. Полученные варианты, содержащие от 1 до 3 различных аминокислотных мутаций в различных комбинациях, представлены в Таблице 27B.

ТАБЛИЦА 27B. Примерные вариантные полипептиды ICOSL

Мутация(и)	ECD SEQ ID NO
Дикий тип	32
Q100R	427
F138L/L203P	428
N52Y/F138L/L203P	429
N57Y/Q100R/C198R	430
N57Y/F138L/L203P	431
N52H	110
N57Y	121
N57Y/Q100P	122
Q100R/F138L	432
L203P	433

3. Варианты гликозилирования

Примерные мутации гликозилирования, выбранные из N52H, N52Q, N84Q, N119Q, N155H, N155Q, N168Q, N207Q были объединены в различных комбинациях в ECD референсного (например, дикого типа) ICOSL относительно положений, предлагаемых в SEQ ID NO: 32, для получения дополнительных комбинированных вариантов. Полученные варианты содержат от 1 до 5 различных аминокислотных мутаций в различных комбинациях, предлагаемых в Таблице 27C. Мутации, обозначенные символом «X», обозначают либо N, либо Q в указанном положении.

ТАБЛИЦА 27C (глик.). Примерные вариантные полипептиды ICOSL

Мутация(и)	ECD SEQ ID NO
Дикий тип	32
N84Q	387
N119Q	388
N168Q	389
N207Q	390
N52Q/N207X	391

N168X/N207X	392
N52Q/N168Q	393
N84Q/N207Q	394
N155Q/N207Q	395
N119Q/N168Q	396
N119Q/N207Q	397
N119Q/N155X	398
N52Q/N84Q	399
N52Q/N119Q	400
N84Q/N119Q	401
N52Q/N84Q/N168Q	402
N52Q/N84Q/N207Q	403
N84Q/N155Q/N168Q	404
N84Q/N168Q/N207Q	405
N84Q/N155H/N207Q	406
N155Q/N168Q/N207Q	407
N119Q N155Q/N168Q	408
N119Q/N168Q/N207Q	409
N84Q/N119Q/N207Q	410
N119Q/N155H/N207Q	411
N84Q/N119Q/N155Q	412
N52Q/N119Q/N155Q	413
N52H/N84Q/N119Q	414
N52H/N84Q/N168X/N207X	415
N52Q/N84Q/N155X/N168X	416
N52Q/N84Q/N119Q/N168Q	417
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q	418
N84Q/N155Q/N168Q/N207Q	419
N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	420
N52Q/N84Q/N119Q/N207Q	421
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q	422
N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q	423
N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q	424

B. Связывание с контрструктурами, экспрессируемыми клетками

Дополнительные варианты были отформатированы как Fc-гибридные белки, описанные в Примере 4. Вариантные Fc-гибридные молекулы оценивали в исследованиях связывания для оценки специфичности и аффинности вариантных иммуномодулирующих белков с доменом ICOSL к когнатным партнерам связывания. В исследованиях связывания, описанных в Примере 6, использовали клетки Expi293, трансфецированные когнатными партнерами связывания CD28, ICOS и CTLA4 человека. MFI определяли для каждого трансфектанта и сравнивали с соответствующим немодифицированным (родительским) ECD-Fc.

Результаты по связыванию для примерных вариантных гибридных молекул ICOSL ECD-Fc приведены в Таблицах 28A-C. Как показано в Таблице 28A-C, варианты доменов

ICOSL IgSF (например, ECD), полученные с различными комбинациями специфических мутаций, демонстрируют повышенное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях более чем с одним, когнатным контрструктурным лигандом.

C. Характеристика биоактивности с помощью анализа коиммобилизации с анти-CD3

Костимулирующую биоактивность полученных вариантных Fc-гибридных молекул также оценивали в анализах коиммобилизации с анти-CD3, описанном в Примере 6. В Таблице 28A-C показано отношение IFN-гамма, продуцируемое каждым вариантом ECD-Fc в анализе, по сравнению с соответствующим немодифицированным ICOSL ECD-Fc (дикого типа). Мутации, обозначенные «X», указывают на Q или остаток дикого типа, соответствующий указанному положению SEQ ID NO: 32 в указанном положении. Как показано, полученные вариантные Fc-гибридные молекулы демонстрируют улучшенные активности в отношении увеличения иммунологической активности.

ТАБЛИЦА 28A. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, включающих отобранные мутации

Мутации ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N52H, N57Y, Q100R, F172S, C198R	436	118145 (1,33)	59651 (29,60)	178790 (41,12)	5059 (37,90)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	125341 (1,41)	51604 (25,60)	211000 (48,53)	8218 (61,57)
N52Y, N57Y, Q100P, F172S	451	121280 (1,37)	63663 (31,59)	174224 (40,07)	8123 (60,86)
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, F172S, C198R	453	107819 (1,22)	68883 (34,18)	170080 (39,12)	8936 (66,95)
N52S, H115R, F120S, I143V, C198R	459	116235 (1,31)	25582 (12,69)	22483 (5,17)	125 (0,93)
N52H, N57Y, Q100P, C198R	461	107164 (1,21)	56103 (27,84)	172319 (39,63)	1258 (9,43)
N52H, N57Y, Q100P, H115R, F172S, C198R	462	120864 (1,36)	54586 (27,08)	176637 (40,63)	5507 (41,26)
N52H, N57Y, Q100P, F172S,	463	117954	59376	151265	3884

ТАБЛИЦА 28А. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, включающих отобранные мутации

Мутации ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
C198R		(1,33)	(29,46)	(34,79)	(29,10)
N52H, N57Y, Q100P, H115R	464	126221 (1,42)	53321 (26,46)	178812 (41,13)	4154 (31,13)
N52H, N57Y, Q100P, H115R, C198R	465	137004 (1,55)	55454 (27,51)	148417 (34,14)	5069 (37,98)
N52H, Q100R, C198R	466	111428 (1,26)	58608 (29,08)	116111 (26,71)	3729 (27,94)
N52H, Q100R, H115R, F172S	467	105532 (1,19)	58287 (28,92)	106295 (24,45)	5294 (39,67)
N52H, Q100R, H115X, F172S, C198R	468	106555 (1,20)	73397 (36,42)	171815 (39,52)	6961 (52,16)
N52H, Q100R, H115R, F172S, C198R	469	114223 (1,29)	66686 (33,09)	157154 (36,15)	7592 (56,88)
N52H, N57Y, Q100R, F172S, C198R	470	99350 (1,12)	61292 (30,41)	182288 (41,93)	9167 (68,68)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	114057 (1,29)	52011 (25,81)	146471 (33,69)	6545 (49,04)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S	447	136143 (1,54)	66516 (33,00)	177376 (40,80)	8527 (63,89)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	132970 (1,50)	59633 (29,59)	133247 (30,65)	5999 (44,95)
Q100R	427	62064 (8,31)	16740 (8,31)	29654 (8,31)	35 (0,26)
Q100R ΔAAA	427	1594 (8,20)	16535 (8,20)	33457 (8,20)	87 (0,65)
F138L, L203P	428	53804 (0,75)	1510 (0,75)	2151 (0,75)	35 (0,26)
F138L, L203P ΔAAA	428	53044 (0,93)	1882 (0,93)	1623 (0,93)	35 (0,26)
N52Y, F138L, L203P	429	99761 (23,50)	47369 (23,50)	67300 (23,50)	1489 (11,16)
N52Y, F138L, L203P ΔAAA	429	59576 (26,23)	52865 (26,23)	66553 (26,23)	997 (7,47)
N57Y, Q100R, C198R	430	58706 (28,65)	57739 (28,65)	99426 (28,65)	9962 (74,64)
N57Y, Q100R, C198R ΔAAA	430	98514 (28,63)	57694 (28,63)	131458 (28,63)	6763 (50,67)

ТАБЛИЦА 28A. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, включающих отобранные мутации

Мутации ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N57Y, F138L, L203P	431	109472 (20,98)	42276 (20,98)	64477 (20,98)	4979 (37,30)
N57Y, F138L, L203P ΔAAA	431	97777 (22,29)	44924 (22,29)	64742 (22,29)	6507 (48,75)
N52H	110	91598 (28,91)	58264 (28,91)	103025 (28,91)	3393 (25,42)
N57Y	121	109031 (21,71)	43754 (21,71)	50683 (21,71)	4881 (36,57)
N57Y, Q100P	122	72480 (29,85)	60161 (29,85)	109522 (29,85)	2797 (20,95)
Q100R, F138L	432	65974 (2,23)	4485 (2,23)	8136 (2,23)	685 (5,13)
L203P	433	61554 (0,76)	1533 (0,76)	2031 (0,76)	2434 (18,24)
ECD из ICOSL дикого типа	32	88625 (1,00)	2015 (1,00)	4348 (1,00)	133 (1,00)

ТАБЛИЦА 28B. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, включающих отобранные мутации

Мутации ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N52H, N57Y, Q100R, H115R	445	165027 (1,97)	51666 (9,89)	287581 (60,27)	5858 (20,36)
N52H, N57Y, Q100R, F172S	448	184449 (2,20)	51394 (9,84)	182109 (38,16)	3449 (11,99)
N52H, N57Y, Q100R,	446	165120	46636	274026	2053

H115R, F172S, I224V		(1,97)	(8,93)	(57,43)	(7,13)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S	447	164750 (1,97)	40046 (7,67)	259351 (54,35)	3722 (12,93)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, C198R	435	186017 (2,22)	39073 (7,48)	200505 (42,02)	3909 (13,58)
N52H, N57Y, Q100R, F172S, C198R	436	181118 (2,16)	38233 (7,32)	210709 (44,16)	1199 (4,17)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, F172S, C198R	437	155392 (1,85)	28828 (5,52)	169736 (35,57)	3449 (11,99)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, I143V, F172S, C198R	438	139977 (1,67)	31459 (6,02)	179089 (37,53)	1620 (5,63)
N52H, N57Y, Q100R, L102R H115R, F172S, C198R	439	146799 (1,75)	29636 (5,68)	200000 (41,91)	2712 (9,43)
N52H, N57Y, Q100R, H115R F172S, N194D	441	150863 (1,80)	31304 (5,99)	167783 (35,16)	15607 (54,24)
N52H, N57Y, H115R, F172S, C198R	442	126909 (1,51)	35803 (6,86)	152858 (32,03)	5374 (18,67)
N52H, N57Y, Q100R, H115R, C198R	443	131730 (1,57)	37595 (7,20)	139041 (29,14)	9306 (32,34)
N52H, N57Y, H115R	444	162632 (1,94)	49847 (9,55)	266878 (55,93)	2918 (10,14)
N52H, Q100R, H115R, I143T F172S	449	132873 (1,59)	52058 (9,97)	186366 (39,06)	3086 (10,72)
N52H, N57Y, Q100P, H115R, F172S	450	148160 (1,77)	46851 (8,97)	246636 (51,69)	4987 (17,33)
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, C198R	452	154036 (1,84)	48674 (9,32)	212905 (44,62)	5095 (17,71)
N52S, E90A, H115R	454	142963 (1,71)	3597 (0,69)	3772 (0,79)	2241 (7,79)
N30D, K42E, N52S, H115R, C198R R221I	456	124095 (1,48)	8066 (1,54)	7751 (1,62)	417 (1,45)
N30D, K42E, N52S, H115R, C198R	457	161734 (1,93)	2791 (0,53)	2919 (0,61)	841 (2,92)
N30D, K42E, N52S, H115R, F172S, N194D	458	117880 (1,41)	4395 (0,84)	4941 (1,04)	2904 (10,09)
N30D, K42E, N52S, H115R,	455	114107 (1,36)	2935 (0,56)	2748 (0,58)	549 (1,91)
N52S, E90A, H115R,	454	120450 (1,44)	12768 (2,45)	23282 (4,88)	2890 (10,04)
N30D, K42E, N52S, H115R	455	115273 (1,38)	11964 (2,29)	22779 (4,77)	2241 (7,79)
N52S, H115R, F172S, C198R	460	95537 (1,14)	7614 (1,46)	21701 (4,55)	1458 (5,07)
Дикий тип	32	83813 (1,00)	5222 (1,00)	4772 (1,00)	288 (1,00)

ТАБЛИЦА 28C. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, включающих мутации гликозилирования

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исходное соотношение)
N84Q	387	34426 (0,94)	1755 (1,16)	5757 (1,51)	100 (2,03)
N119Q	388	30806 (0,84)	4102 (2,70)	19836 (5,21)	81 (1,66)
N168Q	389	27041 (0,74)	1410 (0,93)	18641 (4,90)	67 (1,36)
N207Q	390	36516 (1,00)	11923 (7,86)	25701 (6,76)	206 (4,20)
N52Q, N207X	391	30216 (0,83)	12086 (7,97)	27952 (7,35)	77 (1,56)
N168X, N207X	392	37191 (1,02)	5787 (3,81)	12280 (3,23)	104 (2,12)
N52Q, N168Q	393	32576 (0,89)	12638 (8,33)	27167 (7,14)	101 (2,06)
N84Q, N207Q	394	37176 (1,02)	5292 (3,49)	3153 (0,83)	31 (0,63)
N155Q, N207Q	395	34884 (0,95)	1489 (0,98)	987 (0,26)	73 (1,48)
N119Q, N168Q	396	29099 (0,80)	2534 (1,67)	11289 (2,97)	51 (1,05)
N119Q, N207Q	397	32603 (0,89)	1861 (1,23)	6795 (1,79)	153 (3,12)
N119Q N155X	398	38516 (1,05)	15318 (10,10)	27498 (7,23)	173 (3,52)
N52Q, N84Q	399	33988 (0,93)	1675 (1,10)	3525 (0,93)	39 (0,80)
N52Q, N119Q	400	35729 (0,98)	11040 (7,28)	26139 (6,87)	51 (1,03)
N84Q, N119Q	401	34777 (0,95)	1493 (0,98)	2877 (0,76)	39 (0,80)
N52Q, N84Q, N168Q	402	27021 (0,74)	1584 (1,04)	958 (0,25)	38 (0,78)
N52Q, N84Q, N207Q	403	39942 (1,09)	13396 (8,83)	26360 (6,93)	37 (0,76)
N84Q, N155Q, N168Q	404	27812 (0,76)	357 (0,24)	466 (0,12)	30 (0,61)
N84Q, N168Q, N207Q	405	30659	737	861	25 (0,52)

ТАБЛИЦА 28С. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc, включающих мутации гликозилирования

Мутация(ии) ICOSL	SEQ ID NO (ECD)	Связывание			Коиммобилизация с анти-CD3
		ICOS MFI (исходное соотношение)	CD28 MFI (исходное соотношение)	CTLA-4 MFI (исходное соотношение)	IFN-гамма пг/мл (исход-ное соотношение)
		(0,84)	(0,49)	(0,23)	
N84Q, N155H, N207Q	406	13557 (0,37)	685 (0,45)	607 (0,16)	29 (0,59)
N155Q, N168Q, N207Q	407	13999 (0,38)	277 (0,18)	317 (0,08)	40 (0,82)
N119Q, N155Q, N168Q	408	36896 (1,01)	4094 (2,70)	2179 (0,57)	50 (1,02)
N119Q, N168Q, N207Q	409	29543 (0,81)	921 (0,61)	3744 (0,98)	72 (1,47)
N84Q, N119Q, N207Q	410	21357 (0,58)	569 (0,38)	640 (0,17)	59 (1,20)
N119Q, N155H, N207Q	411	37310 (1,02)	614 (0,40)	931 (0,24)	86 (1,75)
N84Q, N119Q, N155Q	412	2675 (0,07)	262 (0,17)	291 (0,08)	34 (0,70)
N52Q, N119Q, N155Q	413	27853 (0,76)	552 (0,36)	772 (0,20)	42 (0,87)
N52H, N84Q, N119Q	414	40700 (1,11)	4580 (3,02)	4601 (1,21)	39 (0,80)
N52H, N84Q, N168X, N207X	415	8796 (0,24)	587 (0,39)	481 (0,13)	32 (0,66)
N52Q, N84Q, N155X, N168X	416	43521 (1,19)	6605 (4,35)	4811 (1,26)	32 (0,66)
N52Q, N84Q, N119Q, N168Q	417	39342 (1,07)	4519 (2,98)	3300 (0,87)	37 (0,76)
N52Q, N84Q, N119Q, N207Q	421	7011 (0,19)	602 (0,40)	433 (0,11)	37 (0,75)
ECD из ICOSL дикого типа	32	36602 (1,00)	1517 (1,00)	3804 (1,00)	49 (1,00)

ПРИМЕР 21

Получение и оценка гибридных молекул с помощью антитела, нацеленного на HER2

Этот пример описывает получение и оценку вариантных гибридных молекул ICOSL ECD-Fc, конъюгированных с нацеливающим на опухоль агентом, для образования

конъюгата («конъюгат vIgD»).

V-домен отдельно из ICOSL vIgD (N52H/N57Y/Q100P; представленный в SEQ ID NO: 201) был слит с амино- и карбоксильными концами легкой цепи (фиг. 10A) и тяжелой цепи (фиг. 10B). антитела, нацеленного на HER2, с промежуточными линкерами GGGSGGGS. Примерные конфигурации конъюгатов vIgD показаны на фиг. 10C.

Для оценки связывания с HER2, трансфектанты Expi293 с ДНК HER2 или пустым контролем окрашивали титруемыми количествами антитела, нацеленного на HER2, которое содержит конъюгат вариантного ICOSL (конъюгат vIgD N52H/N57Y/Q100P) в концентрациях от 100 пМ до 100 нМ. Были также протестированы контрольные белки, включая гибрид ICOSL ECD-Fc дикого типа, гибрид PD-L2 IgV-Fc дикого типа, и вариантную гибридную молекулу ICOSL ECD-Fc с мутациями в N52H/N57Y/Q100P. Для каждого трансфектанта определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) или процент положительных клеток, как описано в Примере 6. Все конъюгаты IgSF, полученные, как показано на фиг. 11A-B, сохраняли связывание с HER2 по сравнению с эндогенным уровнем экспрессии HER2, наблюдаемым в клетках Expi293. Аналогично, конъюгаты vIgD также демонстрировали связывание с когнатными партнерами связывания ICOSL, включая CD28, CTLA-4 и ICOS.

Биологическую активность белка и пролиферацию человеческих первичных Т-клеток в анализах in vitro также характеризовали, как описано в Примере 6. Конъюгаты vIgD связывали в течение ночи с 96-луночными планшетами при 30-0,1 нМ в присутствии 10 нМ анти-CD3. Планшеты промывали и 100 000 меченых CFSE пан Т-клеток добавляли к планшетам и инкубировали в течение 72 часов. Уровни IFN-гамма в надосадочной жидкости анализировали с помощью ELISA. Как показано на фиг. 12, конъюгаты vIgD с указанными конфигурациями показали большую секрецию IFN-гамма и пролиферацию по сравнению с конъюгатом родительской гибридной молекулы ICOSL ECD-Fc дикого типа.

ПРИМЕР 22

Транскрипционная сигнатура «Nanostring» первичных Т-клеток человека

Культуральные планшеты ткани покрывали 10 нМ анти-CD3 с 40 нМ контрольного белка Fc, ICOSL-Fc дикого типа, CD80-Fc дикого типа, обоими этими белками, или вариантными гибридными белками ICOSL Fc с указанными мутациями. Очищенные человеческие Т-клетки затем высевали на планшеты, покрытые белком, и инкубировали при 37 °C. Культуры из каждой обрабатываемой группы, описанной выше, собирали через 24, 48 и 72 ч, и выделяли общую РНК из каждого образца клеток. РНК переносили на Nanostring и чип Cancer Immune использовали для количественного определения транскриптов 750 генов в каждом образце. Значения транскриптов были нормализованы с

использованием проприетарного программного обеспечения Nanostring, позволяющего сравнивать уровни транскрипции между группами обработки и в течение различных временных периодов. Как показано на фиг. 18 и фиг. 19, протестированные вариантные полипептиды ICOSL ECD-Fc продемонстрировали измененную воспалительную активность по сравнению с CD80 ECD-Fc дикого типа, ICOSL ECD-Fc дикого типа или их комбинации.

ПРИМЕР 23

Получение и оценка гибридных молекул с помощью антитела, нацеленного на HER2

Пролиферация человеческих Т-клеток, культивируемых совместно с VmAb и целевыми клетками, экспрессирующими HER2, также была охарактеризована. CFSE-меченые пан-Т-клетки стимулировали в течение 72 часов с помощью искусственных клеток-мишеней, полученных из клеток K562, презентирующих анти-CD3 одноцепочечную Fv (OKT3) клеточной поверхности и HER2 в присутствии VmAb или контрольных белков. Пролиферацию измеряли с помощью проточного цитометрического анализа CFSE-разведения на окрашенных CD4+ или CD8+ Т-клетках. Vmab анализировали, изменяя либо количество клеток-мишеней, либо концентрацию используемого VmAb. В первом анализе клетки-мишени K562 титровали от 2500 до 78 клеток/лунку и добавляли к 100000 Т-клеток для диапазона эффектор: мишень (E: T) от 40 до 1280:1. VmAb, родительский домен IgSF или WT ICOSL добавляли при 1000 пМ. Во втором анализе клетки-мишени K562 добавляли в количестве от 625 клеток/лунку до 100 000 Т-клеток для соотношения эффектор:мишень 160:1. VmAb или контрольные белки титровали и добавляли при 3000-37 пМ. Как показано на фиг. 20A и 20B, обе конфигурации анализа демонстрируют, что VmAb, содержащие конъюгат vIgD, обеспечивают превосходную пролиферацию по сравнению с родительским антителом, родительским доменом IgSF или WT ICOSL. Кроме того, vIgD-конъюгаты опосредуют пролиферацию при низких соотношениях E:T (1280:1) или при низких концентрациях белка (37 пМ).

ПРИМЕР 24

Получение и оценка сконструированных клеток, экспрессирующих трансмембранный иммуномодулирующий белок и Т-клеточный рецептор

В этом примере описывается экспрессия трансмембранных иммуномодулирующих белков (TIP), содержащих различные вариантные домены IgSF из ICOSL, с примерным рекомбинантным E6-специфическим Т-клеточным рецептором (TCR) в Т-клетках человека и оценка пролиферации Т-клеток.

HLA-A2 + Т-клетки человека активировали в день 0 с помощью активирующих гранул анти-CD3/анти-CD28 (ThermoFisher Scientific, США) и трансдуцировали в день 1 с помощью TCR, специфичного к HPV E6 (описанного в WO 2015/009606), и различных трансмембранных иммуномодулирующих белков (TIP), содержащих вариантные домены IgSF из ICSL. Примерные ICOSL-TIP имели модифицированный по аффинности домен IgSF, содержащий аминокислотные мутации, соответствующие либо E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, либо N52H/N57Y/Q100R относительно положений во внеклеточном домене ICOSL, представленном в SEQ ID NO: 32. ICOSL TIP также включали трансмембранный и цитоплазматический домен, соответствующий остаткам 257-302 из SEQ ID NO: 5. Для сравнения, Т-клетки также совместно трансдуцировали с TCR HPV E6 и либо с WT CD80-TIP (представлен в виде аминокислот 35-288 SEQ ID NO: 1 и кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO : 251) или WT ICOSL-TIP (указан как аминокислоты 19-302 из SEQ ID NO: 5 и кодируется последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO: 252). Для трансдукции клетки трансдуцировали вирусной векторной конструкцией, в которую был вставлен полинуклеотид, кодирующий последовательности цепи TIP и TCRα и TCRβ, при этом каждая отделена друг от друга последовательностью, кодирующей последовательность рибосомального проскока P2A (SEQ ID NO: 863), для совместной экспрессии TIP и TCR, содержащих цепи TCRα и TCRβ в сконструированных клетках. В частности, нуклеотидная конструкция имела следующую структуру: ICOSL - P2A1 - TCRβ - P2A2 - TCRα, в которой каждая из нуклеотидных последовательностей P2A1 и P2A2 кодирует P2A, представленный в SEQ ID NO: 863, но отличается по нуклеотидной последовательности, чтобы избежать рекомбинации между последовательностями.

В качестве контроля Т-клетки подвергались ложной трансдукции или трансдукции только с помощью примерного E6 TCR.

Гранулы активации Т-клеток удаляли на 3-й день и добавляли в культуру цитокины IL-2, IL-7 и IL-15. На 6-й день после трансдукции, экспрессию TIP и TCR на клеточной поверхности оценивали с помощью проточной цитометрии, причем 35-65% сконструированных клеток были положительными как по TCR, так и по TIP. Экспрессирующие TCR клетки размножали в присутствии пептида E6 HPV, что приводило к популяции клеток, которые были> 90% дважды положительными по TCR/TIP, согласно оценке на 14 день. На 14 день сконструированные клетки инкубировали с клетками, инфицированными HPV, либо с клеточной линией плоскоклеточной карциномы UPCI: SCC152 (ATCC® CRL-3240™; HPV+, HLA-A2+), либо с клетками эпидермоидной карциномы CaSki (ATCC® No. CRL-1550™; Клетки

HPH+, HLA-A2+) или плоскоклеточной карциномы SiHa (ATCC® HTB-35™; HPV+, HLA-A2-). Пролиферацию сконструированных клеток оценивали на 3 день после начала совместного культивирования с клетками-мишенями. Как показано на фиг. 21, повышенная пролиферация Т-клеток, сконструированных с помощью E6 TCR, наблюдалась в двух клеточных линиях HPV+, но незначительно в линии HPV-SiHa. Сконструированные клетки, которые совместно экспрессировали вариантные ICOSL и TIP, имели повышенную пролиферацию в ответ на клеточные линии HLA-A2 + HPV + SCC152-мишени и Caski.

ПРИМЕР 25

Получение и оценка Fc-гибридных иммуномодулирующих белков

Молекулы, содержащие домен IgOSF варианта ICOSL (например, ECD), форматировали в виде Fc-гибридных белков, по существу, как описано в Примере 4, за исключением применения различных линкеров и молекул Fc. Для получения иммуномодулирующих белков, которые являются Fc-гибридными белками, содержащими ECD из ICOSL, по меньшей мере, с одним доменом с модифицированной аффинностью (например, вариантный ICOSL ECD-Fc), кодирующую нуклеотидную молекулу получали для кодирования белка, спроектированного следующим образом: вариантный (мутантный) ECD связанный прямо или опосредованно через линкер с инертным Fc IgG1 человека. В частности, полученные иммуномодулирующие белки либо не содержали линкер (ни один), либо содержали линкер AAA или G4S (SEQ ID NO: 636). Инертный Fc IgG1 человека содержал следующие мутации по нумерации EU: C220S/R292C/N297G/V302C (SEQ ID NO: 476), C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (SEQ ID NO: 478), C220S/L234A/L235E/G237A (SEQ ID NO: 477) или их аллотипы. Замена C220S была включена, потому что полученные белки не включают легкую цепь антитела, которая может образовывать ковалентную связь с помощью цистеина. Рекомбинантные вариантные Fc-гибридные белки продуцировали в клетках 293 и очищали с помощью протеина A, по существу, как описано в Примере 5.

Вариантные иммуномодулирующие белки ICOSL Fc оценивали в исследованиях по связыванию для оценки связывания с когнатными партнерами по связыванию. В исследованиях связывания, описанных в Примере 6, использовали клетки Expi293, трансфецированные когнатными партнерами связывания CD28, ICOS и CTLA4 человека. Определяли MFI связывания вариантных гибридных иммуномодулирующих белков ICOSL Fc с клеткой-мишенью, экспрессирующей каждого партнера по связыванию, и сравнивали со связыванием соответствующего немодифицированного (дикого типа) ECD-Fc ICOSL с теми же клетками-мишенями. Модуляцию активности Т-клеток вариантными

гибридными иммуномодулирующими белками ICOSL Fc также определяли с использованием реакции смешанных лимфоцитов (MLR), по существу, как описано в Примере 6.

Результаты связывания примерных вариантных гибридных иммуномодулирующих белков ICOSL ECD-Fc, содержащих различные линкеры и Fc-области, показаны в Таблице 29. В таблице указаны аминокислотные замены в ECD варианта ICOSL, обозначенные номером аминокислотного положения, соответствующим положениям аминокислот в соответствующей последовательности референсного (например, немодифицированного) внеклеточного домена ICOSL (ECD), представленной в SEQ ID NO: 32. В столбце 1 также указан идентификатор SEQ ID NO для каждого вариантного домена ECD, содержащегося в вариантном гибриде ICOSL Fc. В столбце 2 указан линкер, используемый в Fc-гибридном белке и идентификатор SEQ ID NO для линкера. В столбце 3 приведены мутации в Fc с помощью нумерации EU и идентификатора SEQ ID NO для Fc, содержащегося в вариантном гибридном белке ICOSL Fc.

Как показано в таблице 29, аналогичные результаты наблюдались для связывания с когнатными связывающими партнерами среди протестированных вариантных гибридных белков ICOSL Fc. Эти результаты показывают, что формат Fc-гибрида с разными молекулами Fc или разными линкерами не влиял на связывание вариантов домена IgSF из ICSL для их родственного связывающего партнера. Кроме того, все форматы Fc-гибридов, когда они представлены в виде двухвалентных молекул Fc в растворе в реакции MLR, проявляют антагонистическую активность по уменьшению активации Т-клеток по сравнению с референсной (например, немодифицированной или дикого типа) молекулой ECD-Fc, не содержащей аминокислотную замену. В некоторых случаях в надосадочной жидкости не определяли детектируемый IFN-гамма, что согласуется с полной блокировкой взаимодействий костимулирующих партнеров, связывающих когнатный лиганд, с их лигандами для индукции секреции IFN-гамма.

ТАБЛИЦА 29. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL ECD-Fc

Мутация(ии) ICOSL (SEQ ID NO)	Линкер (SEQ ID NO)	Мутации Fc (SEQ ID NO)	Связывание			MLR
			CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма
			MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
N52H/N57Y/Q100R/ F172S (291)	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (476)	67870 (13,0)	213333 (22,7)	120042 (1,5)	3 (0,02)
N52H/N57Y/Q100R/ F172S (291)	AAA	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	57272 (10,9)	192595 (20,5)	103983 (1,3)	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100R/	AAA	C220S/L234A/L235E/G237A	65506	193704	105432	0 (0,00)

F172S (291)		(477)	(12,5)	(20,6)	(1,3)	
N52H/N57Y/Q100R/ F172S (291)	G4S (636)	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)				
N52H/N57Y/Q100R/ F172S (291)	G4S (636)	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	67596 (12,9)	212875 (22,7)	106576 (1,4)	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100R/ F172S (291)	Нет	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	-	-	-	-
N52H/N57Y/Q100R/ F172S (291)	Нет	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	59987 (11,5)	210061 (22,4)	106405 (1,4)	0 (0,00)
N52H/Q100R (285)	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (476)	57419 (11,0)	190012 (20,2)	86522 (1,1)	30 (0,26)
N52H/Q100R (285)	AAA	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)				
N52H/Q100R (285)	AAA	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	58772 (11,2)	211494 (22,5)	88969 (1,1)	25 (0,22)
N52H/Q100R (285)	G4S (636)	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	62331 (11,9)	207285 (22,1)	110512 (1,4)	31 (0,28)
N52H/Q100R (285)	G4S (636)	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	70142 (13,4)	187699 (20,0)	125505 (1,6)	49 (0,44)
N52H/Q100R (285)	Нет	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	58726 (11,2)	206110 (21,9)	110721 (1,4)	54 (0,48)
N52H/Q100R (285)	Нет	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	62746 (12,0)	198281 (21,1)	96948 (1,2)	16 (0,14)
N52H/N57Y/Q100P (113)	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (476)	79792 (15,3)	193633 (20,6)	91384 (1,2)	1 (0,01)
N52H/N57Y/Q100P (113)	AAA	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	69603 (13,3)	314593 (33,5)	103387 (1,3)	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100P (113)	AAA	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	68729 (13,1)	171223 (18,2)	97068 (1,2)	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100P (113)	G4S (636)	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	67753 (13,0)	188192 (20,0)	93424 (1,2)	1 (0,01)
N52H/N57Y/Q100P (113)	G4S (636)	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	69887 (13,4)	160705 (17,1)	104124 (1,3)	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100P (113)	Нет	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K (478)	68979 (13,2)	184726 (19,7)	98512 (1,3)	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100P (113)	Нет	C220S/L234A/L235E/G237A (477)	67863 (13,0)	154563 (16,5)	97714 (1,2)	0 (0,00)
WT (32)	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (476)	5232 (1,0)	9394 (1,0)	78795 (1,0)	113 (1,00)

ПРИМЕР 26

Экспрессия вариантных молекул ICOSL в клетках CHO

В качестве альтернативы экспрессии вариантных гибридных белков ICOSL Fc в клетках Expi293, как описано в Примере 5, для получения различных молекул ICOSL использовали клетки яичника китайского хомячка в суспензии (ExpiCHO-S). ДНК-конструкцию, кодирующую примерные вариантные ICOSL IgSF (например, ECD) Fc-гибридные белки, содержащие вариант (мутант) ECD N52H/N57Y/Q100R/F172S (SEQ ID NO: 291), связанный с инертным Fc, содержащим мутации C220S/L234A/L235E/G237A по нумерации EU, указанным в SEQ ID NO: 477, или его аллотипом, указанным в SEQ ID

NO: 637, с линкером GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) использовали для трансфекции клеток.

Клетки ExpiCHO-S и реагенты для трансфекции с использованием системы экспрессии ExpiCHO™ были приобретены у ThermoFisher Scientific (номер по каталогу A29133). Клетки оттаивали и размножали в соответствии с протоколом, рекомендованным изготовителем. После, по меньшей мере, 2 пассажей клетки разделяли за 24 часа до трансфекции и давали возможность размножаться до высокой плотности. Затем клетки разводили до количества клеток для трансфекции, формировали комплекс ДНК с реагентом ExpiFectamine ™ CHO и добавляли к клеткам. Через день после добавления комплекса ДНК к культуре добавляли корм ExpiCHO ™ и Enhancer ExpiFectamine ™ CHO, который затем помещали в инкубатор при 32 ° C. Жизнеспособность клеток и клеточную массу контролировали, и собирали культуру, когда жизнеспособность падала ниже 80%. Затем культуру центрифугировали при низкой скорости, чтобы удалить осадок клеток, и очищенную надосадочную жидкость подвергали стерильной фильтрации на 0,2 мкм. Белок очищали, как описано в Примере 5.

A. Белковый анализ

Очищенный вариант гибридного белка ICOSL Fc прогоняли на SDS-PAGE и анализировали путем окрашивания белка. Множественные полосы наблюдали в клетках, получаемых из клеток CHO, но не из клеток 293, что согласуется с наблюдением, что при экспрессии в клетках CHO происходило протеолизное отсечение ICOSL. В Таблице 30A показаны молекулярные массы неповрежденных, одноцепочечных и дважды укороченных белков, рассчитанные на основе аминокислотных последовательностей и потенциальных углеводов, наблюдемых с помощью SDS-PAGE. Наблюдали протеолиз Fc-слитых белков ICOSL, экспрессируемых в клетках, происходящих из ExpiCHO-S, на что указывает присутствие как восттановленных, так и невостановленных видов с более низкой молекулярной массой (одинарное и двойное укорочение). На основании размера наблюдаемых полос и масс-спектрометрического анализа эти результаты согласуются с потенциальным сайтом расщепления в ECD ICOSL, соответствующим последовательности LQQN/LT («/» обозначает потенциальный сайт расщепления), что приводит к расщеплению перед областью ствола ECD и удалению Fc-части последовательности в одной или обеих цепях белка Fc-гибрида. Наблюдаемое расщепление протеазой может привести к гетерогенному белковому продукту при продуцировании в клетках CHO. Кроме того, для форматов, экспрессируемых в виде трансмембранных иммуномодулирующих белков, расщепление протеазой, происходящее в определенных клетках, может привести к высвобождению растворимого белка из клеток, тем самым уменьшая экспрессируемые на клеточной поверхности формы

вариантного белка на сконструированных клетках.

ТАБЛИЦА 30А. Восстановленные/невостановленные виды, обнаруженные после захвата и элюирования колоночной хроматографии с протеином А с использованием SDS-PAGE для анализа протеолиза

	Рассчитанная MW		Наблюдаемая (кажущаяся) MW1	
	Невосстановленный	Восстановленный	Невосстановленный	Восстановленный
Интактный	105,6 кДа ак ~29 кДа углев, 135 кДа всего	52,8 кДа ак ~14,5 кДа углев, 67,3 кДа всего	150 кДа	80 кДа
Одиночное укорочение	78,8 кДа ак ~16,5 кДа углев, 95,3 кДа всего	52,8 кДа ак ~14,5 кДа углев, 67,3 кДа всего 26 кДа ак ~2 кДа углев, 28 кДа всего	100 кДа	80 кДа 37 кДа
Double Clip	52,1 кДа ак ~4 кДа углев, 56,1 кДа всего	26 кДа ак ~2 кДа углев, 28 кДа всего	65 КДа	37 кДа

1 Расчетная MW по SDS-PAGE относительно белковых маркеров MW

ПРИМЕР 27

Получение устойчивых к протеолизу вариантов молекул, содержащих домен ICOSL IgSF

Для придания вариантным полипептидам ICOSL устойчивости к протеолизу при экспрессии в клетках, таких как клетки CHO, были получены различные дополнительные формы вариантных полипептидов ICOSL. Были получены следующие дополнительные модифицированные референсные последовательности ECD ICOSL: (1) различные укорочения ECD, в которых отсутствует весь сайт расщепления LQQN/LT или его часть (обозначены как Trunc # 4, # 5, # 6, # 7 или # 8); (2) референсные последовательности вариантного ICOSL, содержащие мутации в сайте расщепления N207 и/или L208 относительно положений, указанных в SEQ ID NO: 32; или референсная последовательность только IgV из ICOSL, содержащая домен IgV в качестве единственного домена IgSF молекулы (приведена в SEQ ID NO: 545, соответствует аминокислотам 1-122 из SEQ ID NO: 32). В некоторых случаях комбинации

вышеуказанных стратегий использовались в референсной последовательности ECD ICOSL. В Таблице 30B ниже представлены различные сгенерированные референсные последовательности.

Примерные мутации N52H/N57Y/Q100R/F172S относительно нумерации, приведенной в SEQ ID NO: 32, были введены в различные референсные последовательности. Поскольку референсный ICOSL IgV, представленный в SEQ ID NO: 545, не содержит положения, соответствующего F172S, вариантный ICOSL IgV не содержал мутацию F172S. Сгенерированные вариантные полипептиды ICOSL были отформатированы в виде Fc-гибридного белка, содержащего сгенерированный референсный домен ICSL IgSF, связанный через линкер (G4S) 2 (SEQ ID NO: 229) с инертным Fc, содержащим мутации C220S/L234A/L235E/G237A/K447del, согласно нумерации EU, указанным в SEQ ID NO: 633, или его аллотипом, указанным в SEQ ID NO: 637.

ТАБЛИЦА 30B. Примерные референсные последовательности IgSF-содержащих доменов ICOSL

Референсная последовательность ICOSL	…--------- **ECD** ----------|-------- *Ствол* ----------
Полный ECD (32)	**...VNIGCCIENVLLQQNLT***VGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEK NAAT*
Укороченный вариант #2 (600)	**...VNIGCCIENVLLQQNL**
Укороченный вариант #2 (601)	**...VNIGCCIENVLLQQNLT***VGSQ*
Укороченный вариант #4 (602)	**...VNIGCCIENVLLQQN**
Укороченный вариант #5 (603)	**...VNIGCCIENVLLQQ**
Укороченный вариант #6 (604)	**...VNIGCCIENVLL**
Укороченный вариант #7 (605)	**...VNIGCCIEN**
Укороченный вариант #8 с N207G/L208G (623)	**...VNIGCCIENVLLQQGGT**
ECD с N207A (624)	**...VNIGCCIENVLLQQALTV***GSQTGNDIGERDKITENPVSTGEK NAAT*
ECD с N207G/L208G (628)	**...VNIGCCIENVLLQQGGTV***GSQTGNDIGERDKITENPVSTGEK NAAT*
IgV (545)	**...HVAANFSV**

A. Оценка протеолиза

ДНК-конструкции, кодирующие описанные выше варианты ICOSL Fc-гибридных

молекул, трансфицировали в клетки яичника китайского хомячка (ExpiCHO-S). Затем ICOSL Fc-гибридные белки очищали из надосадочных жидкостей с помощью протеина A с помощью аффинной хроматографии, как описано в Примере 5. Очищенный белок анализировали аналитическим SEC.

По данным SEC, интактный белок отображается в виде одного пика, в то время как укороченный белок отображается в виде нескольких пиков, включая виды с более низкой молекулярной массой. В соответствии с результатами SDS-PAGE, описанными в Примере 26, протеолиз, оцененный с помощью SEC, наблюдался, когда вариантный белок ICOSL ECD Fc-гибридный белок экспрессировался в клетках, происходящих из ExpiCHO-S, что показано множественными пиками, показанными на фиг. 22A. Как показано на фиг. 22B-22G, одиночные пики наблюдали с помощью SEC-анализа вариантных гибридных белков ICOSL Fc, полученных с использованием модифицированных референсных полипептидов ICOSL, в которых предполагаемый сайт расщепления ECD-протеазой был удален или мутирован, что указывает на снижение расщепления белков. Однако в одной партии очистки виды с более низкой молекулярной массой наблюдали с помощью SEC-анализа варианта гибридного белка белка ICOSL Fc, полученного с использованием референсного полипептида ICOSL, представленного в SEQ ID NO: 604 (Trunc. № 5), хотя причины присутствия этих видов в этой партии и не были ясны. Как показано на фиг. 22G, получение видов с более низкой молекулярной массой и, следовательно, протеолиз, также не наблюдались с помощью SEC-анализа вариантных гибридных белков ICOSL Fc, полученных с использованием только референсной последовательности ICOSL IgV.

B. Связывание и Активность

Сравнивали связывание и активность белка, полученного и очищенного после трансфекции конструкциями ДНК, кодирующими вариантные гибридные иммуномодулирующие белки ICOSL Fc в различных референсных последовательностях, описанных выше в клетках CHO. В некоторых случаях очищенные клоны, которые были оценены ниже, позже обнаружили, что они содержат дополнительные мутации, помимо описанных выше, которые, как полагают, не влияют на иммуномодулирующую активность тестируемых белков.

Полученные очищенные вариантные гибридные иммуномодулирующие белки ICOSL Fc оценивали на связывание с когнатными партнерами по связыванию и на модуляцию активности Т-клеток с использованием реакции смешанных лимфоцитов (MLR), по существу, как описано выше. В таблице 30C указаны аминокислотные замены в референсной последовательности ICOSL, обозначенные номером аминокислотного положения, соответствующим аминокислотным положениям в соответствующей

референсной (например, немодифицированной) последовательности внеклеточного домена (ECD) ICOSL, указанного в SEQ ID NO: 32, и представлены идентификаторы SEQ ID NO для каждой референсной последовательности ICOSL. Как показано, активность связывания и антагониста MLR была в целом одинаковой для всех тестируемых форматов.

ТАБЛИЦА 30C. Последовательности молекул, данные связывания и данные костимулирующей биоактивности вариантных молекул ICOSL

Описание	Референсная последователь-ность SEQ ID NO	Связывание			MLR
		CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма
		MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
ICOSL ECD Укороченный вариант # 7 с N52H/N57Y/Q100R/F172S и F83S	605	88329 (51,1)	206566 (27,3)	106493 (1,1)	12 (0,02)
ICOSL ECD Укороченный вариант #6 с N52H/N57Y/Q100R/F172S	604	91273 (52,8)	239746 (31,6)	90074 (0,9)	14 (0,02)
ICOSL ECD Укороченный вариант # 4 с N52H/N57Y/Q100R/F172S и E200G	602	80555 (46,6)	320229 (42,3)	107957 (1,1)	9 (0,01)
ICOSL ECD Укороченный вариант #4 с N52H/N57Y/Q100R/F172S	602	68599 (39,7)	377254 (49,8)	132880 (1,3)	2 (0,00)
ICOSL ECD Укороченный вариант #8 с N207G/L208G и N52H/N57Y/Q100R/F172S	606	107837 (62,4)	308427 (40,7)	132654 (1,3)	8 (0,01)
ICOSL IgV с N52H/N57Y/Q100R и H48R/S54P	545	75304 (43,6)	321613 (42,4)	143141 (1,4)	995 (1,31)
ICOSL ECD с N52H/N57Y/Q100R/F172S	32	110407 (63,9)	323219 (42,6)	136060 (1,4)	0 (0,00)
ICOSL ECD Укороченный вариант #7 с N52H/N57Y/Q100R/C198R и E90K/E111G	605	38876 (22,5)	83695 (11,0)	54596 (0,5)	761 (1,00)
ICOSL ECD Укороченный вариант #6 с N52H/N57Y/Q100R/C198R	604	84566 (49,0)	236011 (31,1)	91357 (0,9)	7 (0,01)
ICOSL ECD Укороченный вариант #5 с N52H/N57Y/Q100R/C198R	603	86289 (50,0)	216071 (28,5)	110188 (1,1)	9 (0,01)
ICOSL ECD Укороченный вариант #8 с N207G/L208G и N52H/N57Y/Q100R/C198R и Y151H	606	94156 (54,5)	368471 (48,6)	142900 (1,4)	2 (0,00)

ICOSL IgV с N52H/N57Y/Q100R	545	84594 (49,0)	204840 (27,0)	117707 (1,2)	0 (0,00)
ICOSL ECD с N52H/N57Y/Q100R/C198R	32	59179 (34,3)	132894 (17,5)	138555 (1,4)	0 (0,00)
ECD из ICOSL дикого типа	32	1727 (1,0)	7579 (1,0)	100466 (1,0)	757 (1,00)

C. Связывание и активность белков, экспрессируемых в клетках 293 (Expi293) или CHO

Вариантные гибридные белки ICOSL Fc, полученные на основе референсных последовательностей ICOSL, описанных выше, оценивали на связывание и активность после экспрессии в клетках 293 (Expi293) или CHO. Кроме того, ДНК-конструкцию, кодирующую типичные варианты домена IgSF из ICOSL N52H/N57Y/Q100R/C198R или N52H/Q100R, в примерных референсных последовательностях ICOSL, как указано в таблице 30D, также связанных с инертным Fc, содержащим мутации C220S/L234A/L235E/G237A по нумерации EU, представленным в SEQ ID NO: 477, продуцировали и очищали после трансфекции клеток клеток 293 или CHO данными ДНК-конструкциями. Кроме того, примерный вариантный иммуномодулирующий белок был получен в виде мономера, в котором клетки трансфицировали ДНК-конструкцией, кодирующей вариант вариантной референсной последовательности ECD ICOSL, но без слияния с последовательностью Fc.

Полученные очищенные вариантные гибридные белки ICOSL Fc или вариантные мономеры ICOSL оценивали на связывание с когнатными партнерами по связыванию и на модуляцию активности Т-клеток с использованием реакции смешанных лимфоцитов (MLR), по существу, как описано выше. В таблице 30D указаны аминокислотные замены в референсной последовательности вариантного ICOSL, обозначенной номером положения аминокислоты, соответствующей аминокислотным положениям в соответствующей референсной (например, немодифицированной) последовательности внеклеточного домена (ECD) ICOSL, представленного в SEQ ID NO: 32. и представлены идентификаторы SEQ ID NO для каждой референсной последовательности ICOSL. Столбец 3 указывает тип клеток (ExpiCHO-S или Expi293), используемых для продуцирования белка ICOSL. Как продемонстрировано в Таблице 30D, результаты показывают, по существу, сходное связывание и активность, независимо от того, продуцируется или нет вариантный иммуномодулирующий белок ICOSL в клетках CHO или 293.

ТАБЛИЦА 30D. Последовательности молекул, данные о связывании и данные о костимулирующей биоактивности вариантных ICOSL ECD Fc-гибридных белков, полученных с использованием различных клеток

Описание	Референсная последовательность SEQ ID NO	Материал CHO или 293	Связывание			MLR
			CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма
			MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
ICOSL ECD с N52H/N57Y/Q100R/C198R	32	293	13710 (3,9)	8715 (0,7)	16746 (1,4)	20 (0,02)
ICOSL ECD с N52H/N57Y/Q100R/C198R	32	CHO	12876 (3,6)	8750 (0,7)	7700 (0,7)	16 (0,02)
ICOSCL ECD с N52H/Q100R	32	293	11664 (3,3)	13429 (1,1)	10284 (0,9)	168 (0,19)
ICOSCL ECD с N52H/N57Y/Q100R/F172S	32	293	12900 (3,6)	8179 (0,7)	15956 (1,4)	14 (0,02)
ICOSCL ECD с N52H/N57Y/Q100R/F172S	32	CHO	14437 (4,1)	8708 (0,7)	12610 (1,1)	21 (0,02)
ICOSCL IgV с N52H/N57Y/Q100R	545	293	16618 (4,7)	9674 (0,8)	9377 (0,8)	10 (0,01)
ICOSCL IgV с N52H/N57Y/Q100R	545	CHO	17343 (4,9)	9039 (0,7)	8673 (0,7)	14 (0,01)
ICOSL ECD Укороченный вариант #4 с N52H/N57Y/Q100R/F172S	602	293	14710 (4,1)	8841 (0,7)	6893 (0,6)	21 (0,02)
ICOSL ECD Укороченный вариант #4 с N52H/N57Y/Q100R/F172S	602	CHO	12743 (3,6)	9000 (0,7)	7606 (0,7)	21 (0,02)
ICOSL ECD Укороченный вариант #7 с N52H/N57Y/Q100R/F172S	605	293	12017 (3,4)	9674 (0,8)	7599 (0,7)	15 (0,02)
ICOSL ECD Укороченный вариант #7 с N52H/N57Y/Q100R/F172S	605	CHO	13043 (3,7)	9039 (0,7)	8077 (0,7)	7 (0,01)
Мономер ICOSL ECD с N52H/N57Y/Q100R без Fc	32	293	20575 (5,8)	19978 (1,6)	11989 (1,0)	133 (0,15)
Димер ICOSL ECD с N52H/N57Y/Q100R без Fc	32	293	18477 (5,2)	22361 (1,8)	12913 (1,1)	119 (0,13)
ECD из ICOSL дикого типа	32	293	3556 (1,0)	12121 (1,0)	11690 (1,0)	905 (1,00)

ПРИМЕР 28

Создание вариантной библиотеки NNK из вариантных доменов ICOSL IgSF и

оценка связывания и активности

Дополнительные вариантные молекулы, содержащие домен ICSL IgSF, получали с мутациями в положениях 52, 57 и 100 относительно положений, указанных в SEQ ID NO: 32. Варианты получали из библиотеки NNK, где K = T или G, так что кодирующие кодоны кодируют все потенциальные аминокислоты, но предотвращают кодирование двух стоп-остатков TAA и TGA. ДНК библиотеки NNK вводили в дрожжи, по существу, как описано в примере 2, для создания дрожжевых библиотек. Библиотеки использовали для отбора дрожжей, экспрессирующих варианты ICOSL с модифицированной аффинностью, по существу так, как описано в Примере 3.

Отобранные молекулы, содержащие вариантные домены ICOSL IgSF, были отформатированы в виде Fc-гибридного белка, по существу так, как описано в Примере 4, за исключением того, что сгенерированный домен ICSL IgSF, связан через линкер (G4S) 4 (SEQ ID NO: 635) с инертным Fc, содержащим мутации C220S/L234A/L235E/G237A/K447del, согласно нумерации EU, указанным в SEQ ID NO: 633, или его аллотипом, указанным в SEQ ID NO: 637.

Вариантные иммуномодулирующие белки ICOSL Fc оценивали в исследованиях по связыванию для оценки связывания с когнатными партнерами по связыванию. В исследованиях связывания, описанных в Примере 6, использовали клетки Expi293, трансфецированные когнатными партнерами связывания CD28, ICOS и CTLA4 человека. Определяли MFI связывания 100 нМ вариантных гибридных иммуномодулирующих белков ICOSL Fc с клеткой-мишенью, экспрессирующей каждого партнера по связыванию, и сравнивали со связыванием соответствующего референсного (например, немодифицированного или дикого типа) ICOSL IgV-Fc с теми же клетками-мишенями. Костимулирующую биоактивность полученных вариантных гибридных молекул ICOSL Fc также оценивали в анализах коиммобилизации с анти-CD3, описанном в Примере 6. Модуляцию активности Т-клеток вариантными гибридными иммуномодулирующими белками ICOSL Fc также определяли с использованием реакции смешанных лимфоцитов (MLR) с 1 нМ ICOSL-Fc, по существу, как описано в Примере 6. Секрецию IFN-гамма определяли из лунок в трех повторах.

Результаты по связыванию и функциональной активности, основанные на костимулирующей биоактивности или активности в анализе MLR, для примерных вариантных гибридных молекул ICOSL IgV-Fc приведены в Таблицах 31. В таблице ниже указаны аминокислотные замены в вариантного ICOSL, обозначенные номером аминокислотного положения, соответствующим положениям аминокислот в соответствующей последовательности референсного (например, немодифицированного)

внеклеточного домена ICOSL (ECD), представленной в SEQ ID NO: 32. В столбце 2 указан идентификатор SEQ ID NO для каждого вариантного домена IgV, содержащегося в вариантной гибридной молекуле IgV-Fc. Как показано, варианты домена ICOSL IgSF (например, IgV), полученные с различными комбинациями специфических мутаций в положениях 52, 57 и 100, демонстрировали измененное связывание, по меньшей мере, с одним, а в некоторых случаях более чем одним, когнатным связывающим партнером. Последние два столбца таблицы также изображают функциональную активность различных Fc-гибридных молекул для модуляции активности Т-клеток на основе рассчитанных уровней IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл), полученных либо i) с указанной вариантной гибридной растворимой молекулой IgV-Fc, коиммобилизованной с анти-CD3 либо ii) с указанной вариантной гибридной молекулой IgV-Fc, в анализе MLR. В Таблице также показано соотношение IFN-гамма, продуцируемого каждым вариантным ECD-Fc, по сравнению с соответствующим немодифицированным ECD-Fc (дикого типа) в обоих функциональных анализах. Вариантные Fc-гибридные белки также демонстрировали измененную иммунологическую активность Прохождение костимулирующих сигналов некоторых вариантных молекул было значительно выше по сравнению с ICOSL дикого типа. Определенные варианты демонстрировали существенное ингибирование IFN-гамма от очень низкой до необнаруживаемой выработки IFN-гамма в культурах, в анализе MLR.

ТАБЛИЦА 31. Дополнительные примерные вариантные полипептиды ICOSL						
Мутации	SEQ ID NO (IgV)	Связывание			Костим	MLR
		CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма	IFN-гамма
		MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
N52A/N57F/Q100S	734	156589 (7,00)	255078 (0,77)	241891 (1,14)	1119 (0,68)	0 (0,00)
N52A/N57H/Q100S	735	159363 (7,10)	321437 (0,97)	304600 (1,44)	2972 (1,80)	0 (0,00)
N52A/N57Y/Q100A	736	147258 (6,60)	319745 (0,97)	260713 (1,23)	2978 (1,81)	0 (0,00)
N52D/N57A/Q100A	737	137882 (6,20)	340186 (1,03)	248975 (1,17)	477 (0,29)	134 (0,60)
N52D/Q100S	738	95731 (4,30)	332743 (1,01)	275097 (1,30)	957 (0,58)	110 (0,49)
N52G/Q100A	739	98652 (4,40)	97118 (0,29)	303229 (1,43)	296 (0,18)	96 (0,43)
N52H/Q100A	740	145762 (6,50)	361334 (1,09)	213008 (1,01)	784 (0,48)	37 (0,17)

ТАБЛИЦА 31. Дополнительные примерные вариантные полипептиды ICOSL						
Мутации	SEQ ID NO (IgV)	Связывание			Костим	MLR
		CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма	IFN-гамма
		MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
N52M/N57H/Q100S	741	114743 (5,10)	463404 (1,40)	265637 (1,25)	1333 (0,81)	0 (0,00)
N52M/N57W/Q100P	742	168057 (7,50)	342659 (1,04)	322277 (1,52)	1865 (1,13)	0 (0,00)
N52Q/N57F	743	131301 (5,90)	366714 (1,11)	192206 (0,91)	1403 (0,85)	0 (0,00)
N52Q/ N57S/Q100A	744	91306 (4,10)	315021 (0,95)	262735 (1,24)	290 (0,18)	123 (0,55)
N52R/ N57L/Q100A	745	118803 (5,30)	402961 (1,22)	307965 (1,45)	709 (0,43)	0 (0,00)
N52R/N57Y/Q100P	746	133283 (6,00)	502179 (1,52)	251264 (1,19)	7380 (4,48)	0 (0,00)
N52R/N57Y/Q100S	747	133454 (6,00)	504037 (1,53)	229271 (1,08)	5841 (3,54)	0 (0,00)
N52S/N57A/Q100A	748	98153 (4,40)	233184 (0,71)	181297 (0,86)	442 (0,27)	52 (0,23)
N52S/N57H/Q100E	749	116821 (5,20)	302383 (0,92)	257518 (1,22)	8412 (5,11)	132 (0,59)
N52S/N57L/Q100S	750	108133 (4,80)	197064 (0,60)	268940 (1,27)	3120 (1,89)	0 (0,00)
N52S/ N57M/Q100S	751	133604 (6,00)	227615 (0,69)	312088 (1,47)	349 (0,21)	199 (0,89)
N52S/N57Y/Q100S	752	161330 (7,20)	204577 (0,62)	223684 (1,06)	7411 (4,50)	0 (0,00)
N52S/N57Y/Q100M	753	156869 (7,00)	395350 (1,20)	302569 (1,43)	2954 (1,79)	0 (0,00)
N52S/N57Y/Q100V	754	126281 (5,70)	304795 (0,92)	218925 (1,03)	1304 (0,79)	0 (0,00)
N52T/N57H/Q100S	755	143441 (6,40)	377542 (1,14)	258634 (1,22)	6312 (3,83)	0 (0,00)
N52T/N57H/Q100A	756	112637 (5,00)	350453 (1,06)	220339 (1,04)	2874 (1,74)	0 (0,00)
N52T/ N57Y/Q100A	757	161333 (7,20)	340845 (1,03)	239136 (1,13)	442 (0,27)	0 (0,00)
N52V/N57L/Q100A	758	132144 (5,90)	252148 (0,76)	181344 (0,86)	518 (0,31)	159 (0,71)
N52H/N57Y/Q100K	759	141720 (6,30)	393476 (1,19)	214270 (1,01)	12919 (7,84)	0 (0,00)
N52K/N57Y/Q100R	760	140729 (6,30)	233283 (0,71)	198941 (0,94)	12515 (7,60)	0 (0,00)
N52L/N57H/Q100R	761	140807 (6,30)	352518 (1,07)	250052 (1,18)	12544 (7,61)	0 (0,00)

ТАБЛИЦА 31. Дополнительные примерные вариантные полипептиды ICOSL						
Мутации	SEQ ID NO (IgV)	Связывание			Костим	MLR
		CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма	IFN-гамма
		MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
N52R/N57F/Q100N	762	161029 (7,20)	233254 (0,71)	252904 (1,19)	448 (0,27)	106 (0,47)
N52R/N57F/Q100P	763	153850 (6,90)	503696 (1,52)	296566 (1,40)	1718 (1,04)	0 (0,00)
N52R/N57F/Q100R	764	185231 (8,30)	463873 (1,40)	234248 (1,11)	11402 (6,92)	0 (0,00)
N52R/N57F/Q100T	765	126875 (5,70)	357505 (1,08)	270134 (1,27)	272 (0,17)	0 (0,00)
N52R/N57H/Q100K	766	-	-	-	-	-
N52R/N57L/Q100S	767	111704 (5,00)	289326 (0,88)	230617 (1,09)	1292 (0,78)	0 (0,00)
N52R/N57W/Q100K	768	130875 (5,90)	477268 (1,44)	349316 (1,65)	10056 (6,10)	0 (0,00)
N52R/N57W	769	136967 (6,10)	318199 (0,96)	298850 (1,41)	12652 (7,68)	0 (0,00)
N52R/N57Y/Q100R	770	3285 (0,10)	4266 (0,01)	6104 (0,03)	349 (0,21)	347 (1,54)
N52C/N57E/Q100S	771	13361 (0,60)	10616 (0,03)	125274 (0,59)	296 (0,18)	372 (1,65)
N52G/N57P/Q100D	772	5715 (0,30)	10181 (0,03)	274629 (1,30)	254 (0,15)	343 (1,53)
N52G/N57V/Q100G	773	23658 (1,10)	14727 (0,04)	260057 (1,23)	325 (0,20)	245 (1,09)
N52G/N57V	774	69117 (3,10)	52498 (0,16)	332068 (1,57)	847 (0,51)	327 (1,45)
N52L/N57V	775	54775 (2,50)	150970 (0,46)	256730 (1,21)	986 (0,60)	270 (1,20)
N52P/N57P	776	21008 (0,90)	27043 (0,08)	222171 (1,05)	260 (0,16)	478 (2,13)
N52P/N57S/Q100G	777	6803 (0,30)	5054 (0,02)	143255 (0,68)	110 (0,07)	481 (2,14)
N52S/N57L/Q100G	778	71895 (3,20)	79432 (0,24)	275602 (1,30)	726 (0,44)	513 (2,28)
N52T/N57K/Q100P	779	88653 (4,00)	78299 (0,24)	312905 (1,48)	116 (0,07)	395 (1,76)
N52V/N57T/Q100L	780	6205 (0,30)	11458 (0,03)	29167 (0,14)	85 (0,05)	562 (2,50)
N57Q/Q100P	781	15195 (0,70)	69058 (0,21)	204533 (0,97)	159 (0,10)	432 (1,92)
WT ICOSL	545	22340 (1,00)	330437 (1,00)	211945 (1,00)	1648 (1,00)	225 (1,00)
Полноразмерный	291	138141	605794	237653	-	0

ТАБЛИЦА 31. Дополнительные примерные вариантные полипептиды ICOSL						
Мутации	SEQ ID NO (IgV)	Связывание			Костим	MLR
		CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-гамма	IFN-гамма
		MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)	пг/мл (ΔWT)
N52H/N57Y/Q100R/F172S		(6,20)	(1,83)	(1,12)		(0,00)
N52H/N57Y/Q100R	565	142274 (6,40)	817010 (2,47)	199528 (0,94)	-	0 (0,00)
N52H/N57Y/Q100R	283	-	-	-	10362 (6,29)	-

ПРИМЕР 29

Оценка клеток K562, экспрессирующих трансмембранный иммуномодулирующий белок (TIP)

Клетки K562 были сконструированы для экспрессии трансмембранного иммуномодулирующего белка (TIP), который содержал ECD доменов ICOSL vIgD, слитых с нативным трансмембранным и внутриклеточным доменом человеческого ICOSL WT, представленного в SEQ ID NO: 5. Примерный вариант ICOSL-TIP имел аффинно-модифицированный домен IgSF, содержащий аминокислотные мутации, соответствующие N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 288), N52H/N57Y/Q100R (SEQ ID NO: 283) или E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R (SEQ ID NO: 300) относительно положений во внеклеточном домене ICOSL, представленном в SEQ ID NO: 32.

Клетки K562 (ATCC) метили CFSE, чтобы лучше отличать их от Т-клеток в анализах совместного культивирования. Очищенные первичные Т-клетки человека метили с помощью Cell Trace Far Red (оба от Thermo-Fisher) и помещали в 96-луночные планшеты с круглодонными лунками для культуры ткани с анти-CD3 антителом. Для обеспечения сигнала TCR для Т-клеток, анти-CD3-антитело включали в растворимом формате в диапазоне концентраций, которые позволяли K562 презентировать это стимулирующее антитело через Fc-рецептор CD32, экспрессируемый клетками. Клетки инкубировали в течение 72 часов, и пролиферацию CD4+ (фиг. 23A) и CD8+ (фиг. 23B) контролировали и сообщали как процент клеток, разделенный по отношению к концентрации анти-CD3. Каждая точка представляет среднее значение трех повторов, а столбцы ошибок показывают стандартное отклонение.

Клетки дикого типа K562 стимулировали пролиферацию Т-клеток при совместной инкубации с растворимым анти-CD3-антителом в зависимости от дозы, тогда как клетки

K562 в отсутствие анти-CD3 этого не делали. Как показано на фиг. 23A и 23B, экспрессия WIP ICOSL TIP на поверхности усиливала ответы, но эффекты были больше, когда клетки K562 экспрессировали вариантные TIP ICOSL, что указывает на то, что эти молекулы, экспрессированные на поверхности клеток, обеспечивали превосходную костимуляцию для Т-клеток.

ПРИМЕР 30

Оценка связывающей и костимуляторной функции гибридных молекул с HER2-нацеливающим антителом

Примерный вариант ICCDL ECD, содержащий мутации N52H/N57Y/Q100R, был слит с N- или C-концевыми концами тяжелой или легкой цепи примерного анти-HER2 антитела, трастузумаба, как изображено в различных конфигурациях, показанных на фиг. 24A-24F. ДНК VmAb, кодирующая каждую из конструкций, предлагаемых на фиг. 24A-24F трансфицировали в клетки HEK-293 и секретированные белки очищали с помощью протеина A и эксклюзионной хроматографии. Полученные белки V-mAb затем оценивали на сохранение соответствующих свойств связывания. Клетки HEK-293 временно трансфицировали экспрессирующими векторами HER2, CD28 или ICOS, и каждый трансфектант затем инкубировали с отдельными белками V-mAb плюс вторичное антитело для обнаружения связанных реагентов. Как показано на фиг. 24A, связывание HER2 сохранялось всеми V-mAb, хотя величина связывания несколько снижалась. Более того, связывание V-mAb с CD28-трансфицированными клетками было в основном интактным, хотя некоторые формы показали некоторое снижение связывания (фиг. 24A). Эти данные указывают на то, что варианты ICOSL, слитые с тяжелыми и/или легкими цепями антитела с образованием гибридных белков, в значительной степени сохраняют контрструктуру и активность связывания антител.

Для того, чтобы проверить, могут ли VmAb управлять целевой специфической костимуляцией Т-клеток, была использована система трансфицированных клеток, включающая репортерную линию Т-клеток для измерения костимуляции. Клетки Jurkat с люциферазным репортером на основе промотора IL-2 использовали для оценки костимулирующей функции. Для стимуляции клеток были сконструированы клетки K562 для применения в качестве искусственной антигенпрезентирующей клетки. В частности, клетки K562 трансдуцировали лентивирусом, кодирующим одноцепочечную Fv-версию анти-CD3 антитела OKT3 с трансдукцией или без нее, с отдельным лентивирусом, направляющим экспрессию HER2. Клетки K562, демонстрирующие одноцепочечное анти-CD3 Fv (OKT3) на клеточной поверхности с или без поверхностной экспрессии HER2, высевали в буфер для анализа Jurkat (RPMI1640 + 5% FBS) в 2 × 104 клеток/лунку.

Клетки-мишени инкубировали с V-mAb, титрованными от 20000 до 6 пМ или контрольными белками в течение 20 минут при комнатной температуре. Эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие репортерный ген IL-2-люциферазы (Promega), добавляли в количестве 1 × 105 клеток/лунку, чтобы довести конечный объем/лунку до 100 мкл. Клетки-мишени и Jurkat инкубировали в течение 5 часов при 37 °C. Планшеты извлекали из инкубатора и акклиматизировали до комнатной температуры в течение 15 минут. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора для лизиса клеток и субстрата люциферазы (реагент BioGlo люциферазы, Promega) и планшеты инкубировали на орбитальном шейкере в течение 10 минут. Люминесценцию измеряли с интеграцией 1 секунда на лунку с использованием устройства считывания изображений Cytation 3 (BioTek Instruments). Определяли и сообщали относительные значения люминесценции (RLU) для каждого тестируемого образца.

Как показано на фиг. 24B, включение нативного трастузумаба не влияло на индукцию люциферазы. Аналогично, включение вариантного белка ICOSL-Fc N52H/N57Y/Q100R (не слитого с трастузумабом) не влияло на показания (фиг. 24B). Однако включение нескольких V-mAb обеспечивало значительный костимулирующий сигнал в присутствии клеток HER2 + K562/OKT3, который был намного более устойчивым, чем с K562/OKT3, у которых отсутствовала экспрессия HER2 (фиг. 24C-24F). В некоторых случаях сигнал индуцировался в клетках K562/OKT3, в которых отсутствовал HER2, но это, скорее всего, было связано с Fc-доменом V-mAb, позволяющим CD32-опосредованную презентацию V-mAb. Результаты показывают, что слияние вариантного полипептида ICOSL с антителом может использоваться для доставки локализованного костимулирующего сигнала Т-клеток.

ПРИМЕР 31

Получение и оценка стековых молекул, содержащих домены ICOSL и NKp30 с модифицированной аффинностью

В этом примере описаны иммуномодулирующие белки, которые были получены в виде многодоменных стековых конструкций, содержащих домен IgV с модифицированной аффинностью из идентифицированных вариантных полипептидов ICOSL и идентифицированных вариантных полипептидов NKp30, описанных выше. В частности, примерный вариант ICOSL IgV (N52D, представленный в SEQ ID NO: 548; N52H/Q100R, представленный в SEQ ID NO: 567; N52H/N57Y/Q100R, представленный в SEQ ID NO: 565; N52L/N57H/Q100R, представленный в SEQ ID NO: 761), и примерная вариантная молекула NKp30 IgV L30V/A60V/S64P/S86G (SEQ ID NO: 504) были связаны вместе и слиты с инертным Fc (содержащим мутации L234A, L235E и L235E в Fc из IgG1 человека,

например, представленном в SEQ ID NO: 637) в различных конфигурациях. Были получены конструкции гомодимерного стека, содержащие идентичные субъединицы Fc, в которых вариант ICOSL IgV и вариант NKp30 IgV по-разному связаны с N- или C-концом области Fc через пептидный линкер GSGGGS (SEQ ID NO: 635) и/или 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228). Другие линкеры и области Fc также подходят для генерации стековых молекул. Примерные сгенерированные стеки изложены ниже.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая иммуномодулирующие белки, также содержала остатки, кодирующие типичный сигнальный пептид MGSTAILALLLAVLQGVSA (приведенный в SEQ ID NO: 225). Экспрессирующие конструкции, кодирующие представляющие интерес Fc-гибридных белков, были временно экспрессированы в клетках Expi293 HEK293 от Invitrogen с использованием коммерческих реактивов Expifectamine и среды производителя. Надосадочные жидкости собирали и белок собирали и элюировали из колонки с протеином A с использованием системы очистки белка АКТА.

Кодирующая молекула нуклеиновой кислоты была разработана для получения гомодимерных стеков в различных конфигурациях последовательностей в порядке, представленном в Таблице 32.

ТАБЛИЦА 32. Описание иммуномодулирующих белков ICOSL/NKp30

Стек	SEQ ID NO белка (SEQ ID NO ДНК)	Описание
ICOSL/NKp30 Стек 1	912 (911)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 548) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)
ICOSL/NKp30 Стек 2	914 (913)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 548) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)
ICOSL/NKp30 Стек 3	916 (915)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 567) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)
ICOSL/NKp30 Стек 4	918 (917)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 567) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)
ICOSL/NKp30 Стек 5	920 (919)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 565) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)

ICOSL/NKp30 Стек 6	922 (921)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 565) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)
ICOSL/NKp30 Стек 7	924 (923)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 761) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)
ICOSL/NKp30 Стек 8	926 (925)	вариант ICOSL (SEQ ID NO: 761) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228) – вариант NKp30 (SEQ ID NO: 504) – GSGGGGS (SEQ ID NO: 635) – Fc (SEQ ID NO: 637)

ПРИМЕР 32

Оценка связывания с клеточно-экспрессированными контр-структурами и биологической активности доменных молекул, содержащих ICOSL и NKp30.

В этом примере описаны исследования связывания, чтобы показать специфичность и аффинность типичных иммуномодулирующих белков стека ICOSL/NKp30, полученных в Примере 31 для когнатных партнеров по связыванию. Типичные иммуномодулирующие белки стека ICOSL/NKp30, полученные в Примере 31, также были оценены для определения характеристик биологической активности в первичных Т-клетках человека в анализе in vitro.

A. Связывание с контрструктурами, экспрессируемыми клетками

Исследования связывания стека ICOSL/NKp30 проводили на клетках со стабильной или транзиторной экспрессией на клеточной поверхности когнатных партнеров связывания, специфичных для иммуномодулирующих белков с вариантным доменом ICOSL или NKp30-Fc.

Для оценки связывания с партнером по связыванию вариантных доменов ICOSL были использованы клетки яичника китайского хомячка (CHO), которые были трансдуцированы лентивирусом для поверхностной экспрессии полноразмерных CD28, CTLA-4 или ICOS человека.

Для получения клеток, экспрессирующих когнатный партнер связывания для NKp30, полноразмерную конструкцию для поверхностной экспрессии у млекопитающих, содержащую человеческий B7-H6, клонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (Life Technologies). Исследования связывания проводились с использованием системы транзиторной трансфекции Expi293F (Life Technologies, США). Вкратце, для 30 мл трансфекции приблизительно 75 миллионов клеток Expi293F инкубировали с 30 мкг экспрессирующей ДНК-конструкции и разведенным 1,5 мл реагентом ExpiFectamine 293 в течение 48 часов, после чего клетки собирали для окрашивания.

Для анализа проточной цитометрией 200 000 клеток данной стабильной клеточной

линии, транзиторной трансфекции или соответствующего отрицательного контроля высевали в 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки центрифугировали и суспендировали в буфере для окрашивания (PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) и 0,1% азида натрия) в течение 20 минут для блокирования неспецифического связывания. После этого клетки снова центрифугировали и суспендировали в окрашивающем буфере, содержащем от 100 нМ до 32 пМ стека ICOSL/NKp30 или контрольного белка в 50 мкл. Первичное окрашивание проводили в течение 45 минут, затем дважды промывали клетки в буфере для окрашивания. Связанный белок детектировали с PE-конъюгированным анти-человеческим IgG (Jackson ImmunoResearch, США), разведенным 1: 150 в 50 мкл окрашивающего буфера, и инкубировали в течение 30 минут. После заключительной инкубации клетки дважды промывали для удаления несвязанных конъюгированных антител, фиксировали в 2% формальдегиде/PBS и анализировали на проточном цитометре LSRII (Becton Dickinson, США). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали для каждого образца с помощью программного обеспечения FlowJo Version 10 (FlowJo LLC, США).

Связывающую активность, измеренную с помощью MFI, оценивали для всех гибридных белков ICOSL-NKp30 Fc или контролей. Как показано на фиг. 25A-25D, типичные стековые белки связывают когнатные белки как ICOSL, так и NKp30 с высокой аффинностью.

B. Оценка биоактивности молекул, содержащих домен IgSF со зрелой аффинностью

Биологическую активность растворимого стекового белка ICOSL/NKp30 тестировали в совместной культуре с клетками B7-H6+ для индукции продуцирования цитокинов в первичных Т-клетках человека. Клетки K562, которые эндогенно экспрессируют B7-H6, трансдуцировали лентивирусом для экспрессии одноцепочечного анти-CD3 Fv человека (OKT3) на клеточной поверхности с получением мишеней K562/OTK3. Первичные Т-клетки человека совместно культивировали при соотношении эффектор/мишень (E: T) 2,5 или 10: 1 со стеком ICOSL/Nkp30 или контрольными белками, титрованными от 100 нМ до 49 пМ в конечном объеме 200 мкл среды Ex-Vivo 15. На 3-5 день анализ прекращали и культуральные надосадочные жидкости тестировали с использованием наборов ELISA MAX для IL-2 и TNF-альфа (Biolegend, США). Оптическую плотность измеряли на мультирежимном ридере для микропланшетов BioTek Cytation (BioTek Corp., США) и определяли по титрованным стандартам rIL-2 и rTNF-альфа, включенным в наборы ELISA.

Результаты исследований биоактивности примерных протестированных стековых белков ICOSL/NKp30 показаны на фиг. 26A и 26B, где приведены рассчитанные уровни IL-2 или IFN-гамма в культуральных надосадочных жидкостях (пг/мл). Идентификатор последовательности (SEQ ID NO) для каждого стекового белка представлен на фиг. 26A и 26B. Инкубация в присутствии примерных стековых белков ICOSL/NKp30 в этом анализе приводила к повышенным уровням индукции B7-H6-зависимого цитокина в первичных Т-клетках человека, что демонстрируется увеличением выработки цитокинов с помощью стеков ICOSL/NKp30 по сравнению только с родительскими белками ICOSL или NKp30.

C. Оценка пролиферации

Была также охарактеризована пролиферация Т-клеток человека, совместно культивированных со стековыми белками ICOSL/NKp30 и клетками B7-H6+. Меченные CFSE первичные Т-клетки человека стимулировали в течение 3-5 дней с помощью K562/OKT3 в соотношении E:T от 2,5 до 10:1 в присутствии стековых белков ICOSL/NKp30 или контрольных белков. Примерные стековые белки ICOSL/NKp30 титровали от 100 нМ до 49 пМ в 200 мкл конечного объема среды Ex-Vivo 15. Пролиферацию измеряли с помощью проточной цитометрии при разведении CFSE на окрашенных CD4+ или CD8+ Т-клетках с использованием проточного цитометра LSRII и программного обеспечения Flowjo, как описано выше.

Как показано на фиг. 27, примерные протестированные стековые белки ICOSL/NKp30 стимулировали пролиферацию первичных CD4+ Т-клеток человека зависимым от B7H6 способом, демонстрируемый увеличением пролиферации стека ICOSL/NKp30 по сравнению только с родительскими белками ICOSL или NKp30.

ПРИМЕР 33

Оценка комбинации стековых молекул, содержащих домены ICOSL и NKp30 и анти-PD-1 антитела в опухолевой модели

В этом примере описывается оценка противоопухолевой активности примерных стековых белков ICOSL/NKp30, полученных, как описано в Примере 31, оцениваемых отдельно или в комбинации с моноклональным антителом против PD-1 мыши (mAD-1 mAb) у мышей, несущих клетки карциномы толстой кишки B7-H6 + CT26.

Мышам имплантировали подкожно приблизительно 0,3 × 105 опухолевых клеток B7-H6 + CT26. Опухоли выращивали до 13 дня, у мышей определяли стадию, и измеряли средние объемы опухолей (от 80 до 120 мм3). Опухоли измеряли в двух измерениях электронными штангенциркулями, начиная с 6 дня после имплантации опухолевых клеток. Объем опухоли измеряли и определяли средний объем опухоли. Три мыши ну группу с наименьшими исходными опухолями (~ 75 мм3) исключили из анализа.

Как показано на фиг. 28, комбинация тестируемого стекового белка ICOSL/NKp30 и mAb mPD-1 значительно снижала рост опухоли (средние объемы опухоли) с течением времени по сравнению с группами, получавшими контроль Fc, либо только ICOSL или NKp30, только стек ICOSL/NKp30, либо только анти-PD-1 mAb мыши. Различий в росте какой-либо группе обработки с родительскими опухолями CT26 (B7-H6-негативными) обнаружено не было. Противоопухолевая активность комбинации, как показано на фиг. 28 согласуется с выводом о том, что комбинация протестированного стекового белка ICOSL/NKp30 и анти-PD-1 антитела лучше, чем индивидуальные реагенты в отдельности.

ПРИМЕР 34

Оценка дозирования и эффектов in vivo гибридных молекул ICOSL IgV-Fc на модели CIA

Вариантные гибридные молекулы ICOSL IgV-Fc оценивали на противовоспалительную активность в модели коллаген-индуцированного артрита (CIA) с профилактическим или терапевтическим дозированием. Вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc дозировали максимум 4 раза или до, или сразу после начала заболевания. Тестируемая вариантная гибридная молекула ICOSL IgV-Fc содержала вариантный ICOSL IgV с N52H/N57Y/Q100P, представленный в SEQ ID NO: 570, или N52H/N57Y/Q100R, представленный в SEQ ID NO: 565, слитый с инертным Fc (содержащим мутации L234A, L235E и L235E в Fc IgG1 человека, например, представленном в SEQ ID NO: 637).

Для индукции воспаления суставов мышам вводили в день -18 или -21 день эмульсию коллагена II/CFA кур или коров в хвост и эмульсию коллагена II/IFA кур или коров («буст») в день 0. Для профилактического введения мышам вводили вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100P) четырьмя дозами, начиная со дня буста, до начала заболевания. Для терапевтической обработки/обработки с замеделнным высвобождением мышам вводили вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), когда наблюдаемый балл лапы была больше единицы, и введение дозы происходило каждые два дня в общей сложности четыре дозы. В качестве контроля были также протестированы только молекулы Fc и молекула CTLA-4-Fc (абатацепт). Балл лапы определяли на основании покраснения или отека. Сыворотку также собирали для измерения антител против коллагена (CII IgG) и провоспалительных цитокинов IL-6 и TNFα. Клетки из дренирующих лимфатических узлов собирали, окрашивали на CD4, CD8, CD44 или маркеры фолликулярных Т-клеток-хелперов (TFH) (CD25-CD4+PD-1+CXCR5+). На фиг. 29A-29D показаны результаты для профилактического дозирования. У мышей, получавших вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc при профилактической обработке, было выявлено подавленное

заболевание в модели ревматоидного артрита у мышей CIA, о чем свидетельствует более низкий средний суммарный балл лапы (фиг. 29A), и уменьшенный сниженный IgG CII (фиг. 29B). * p <0,05 для ICOSL IgV-Fc относительно абатацепта ** p <0,001 ICOSL IgV-Fc относительно PBS (с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями). Более низкие уровни сывороточных цитокинов (фиг. 29C) и CD44+ активированных Т-клеток или TFH-клеток (фиг. 29D) также наблюдали у мышей, получавших вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc, по сравнению с контролем Fc; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001 (с помощью однофакторного дисперсионного анализа). Фракция B-клеток в дренирующем лимфатическом узле также значительно снижалась в группе, получавшей ICOSL IgV-Fc, по сравнению с контрольной группой Fc (p <0,05) (фиг. 29E).

Фиг. 30A-30D показывают результаты для дозировки с замедленным высвобождением. Вариант ICOSL-IgV Fc приводил к наименьшему среднему значению среднего суммарного балла лапы (фиг. 30A) и наибольшему процентному изменению массы тела (фиг. 30B) по сравнению с другими группами, включая контрольный абатацепт. Как показано на фиг. 30C и фиг. 30D, сывороточные цитокины также подавлялись в терапевтической модели CIA у мышей, которых обрабатывали вариантом ICOS IgV-Fc. Статистическая значимость между группами: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 по критерию Стьюдента для одной выборки. На фиг. 30C и фиг. 30D пунктирные горизонтальные линии показывают нижний предел количественного определения (LLOQ) для каждого цитокина.

Вместе эти данные свидетельствуют о том, что пути CD28 и ICOS играют важную роль при воспалительном артрите. В частности, превосходная активность вариантного ICOSL двойного антагониста CD28/ICOS согласуется с наблюдением о том, что необходима блокада обоих путей и что только частичная блокировка приводит только к частичному преимуществу.

ПРИМЕР 35

Оценка in vivo эффектов гибридных молекул ICOSL IgV-Fc на модели EAE

Вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc оценивали на противовоспалительную активность в модели адоптивного переноса экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE). Тестируемая вариантная гибридная молекула ICOSL IgV-Fc включает вариантный ICOSL IgV (N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 565), слитый с инертным Fc (содержащим мутации L234A, L235E и L235E в Fc IgG1 человека).

Самкам мышей C57BL/6 подкожно инъецировали эмульсию MOG35-55/CFA. Через

11 дней клетки получали селезенки и культивировали с пептидом MOG35-55, IL-12 и анти-IFNγ. Через три дня после культивирования энцефалитогенные Т-клетки доставляли посредством внутрибрюшинной инъекции (день 0). Мышам вводили вариантную гибридную молекулу ICOSL IgV-Fc через день, начиная с дня 0, всего в количестве пяти доз. В качестве контроля были также протестированы молекулы Fc отдельно и молекула CTLA-4-Fc (абатацепт). В течение 20 дней после инъекции Т-клеток мышей взвешивали, контролировали и оценивали на балл EAE, как описано в Таблице 33. В конце исследования сыворотку собирали для анализа провоспалительных цитокинов, а клетки из дренирующих лимфатических узлов собирали для анализа проточной цитометрией.

ТАБЛИЦА 33. Балл EAE	
Балл	Клинические наблюдения
0	Отсутствие явных изменений в двигательных функциях
1	вялый хвост
2	вялый хвост и слабость задних ног
3	Вялый хвост и полный паралич задних ног, ИЛИ вялый хвост с параличом одной передней и одной задней лапы, ИЛИ ВСЕ из: тяжелый тремор головы, 2) хотьба только по краям клетки, 3) толкание стенки клетки, 4) вращение, при удерживании за хвост.
4	Вялый хвост, полный паралич задних ног или частичный передних
5	Полный паралич задних и полный паралич передних ног, отсутствие движения; ИЛИ мышь спонтанно кружится по клетке; ИЛИ мыши обнаруживаются мертвыми из-за паралича.

Как показано на фиг. 31A, у мышей, обработанных вариантной гибридной молекулой ICOSL IgV-Fc, подавлялось заболевание в мышиной модели EAE, что подтверждено более низким показателем EAE, * p <0,0001 по однофакторному дисперсионному анализу площади под кривой (AUC); вариантная гибридная молекула ICOSL IgV-Fc по сравнению с контролем.

Для проточного цитометрического анализа Т-клеток пахового лимфатического узла клетки окрашивали красителем для оценке жизнеспособности и анализировали с помощью анти-CD44, анти-CD62L, анти-CD4, анти-CD8 и оценивали процент жизнеспособных наивных (CD62L + CD44-) Т-клеток и эффекторных Т-клеток памяти (Tem) (CD62L-CD44+)CD4+ и CD8+. Как показано на ФИГ. 31C, CD4+ и CD8+ Tem клетки редуцировались при обработке гибридной молекулой ICOSL IgV-Fc (**** p <0,0001; *** p <0,001 по однофакторному дисперсионному анализу).

Цитокины сыворотки крови оценивали в День 0 (через 2 часа после 1-й дозы) и в День 6 (за 1 час до 4-й дозы). Как показано на ФИГ. 31D, протестированная вариантная гибридная молекула ICOSL IgV-Fc приводит к снижению провоспалительных цитокинов в

сыворотке крови в день 0, включая IL-5, IL-10, IL-12p70 и TNFα. На 6 день уровни IFN-гамма и IL-6 в сыворотке снижались при обработке вариантной гибридной молекулой ICOSL IgV-Fc по сравнению с контролем Fc.

ПРИМЕР 36

Исследование зависимости от дозы вариантного Fc ICOSL-IgV в модели «трансплантат-против-хозяина-болезнь» (GvHD)

Исследование диапазона дозирования проводили с 20, 100 или 500 мкг вариантной молекулы ICOSL IgV-Fc, содержащей вариантный ICOSL IgV (N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 565), который слит с инертным Fc (содержащим мутации L234A, L235E и L235E в Fc IgG1 человека, например, как указано в SEQ ID NO: 637), на мышиной модели заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD). Активность вариантной молекулы ICOSL IgV-Fc сравнивали с белатацептом (CTLA-4-FcL104E/A29Y; публикация патентной заявки США № US2016/0271218).

Самкам мышей NSG (n = 5 на группу для группы 1, без обработки; n = 10 на группу для групп обработки 2-7) подкожно вводили 10 мг гамма-глобулина и затем облучали (100 сГр/рад) в день -1. В день 0 (в течение 24 часов после облучения) мышам в группах 2-7 вводили тестируемые изделия, как указано в Таблице 34, и затем всем мышам после введения дозы вводили 1 × 10 7 человеческих PBMC, инъецированных в.в. через в хвостовую вену.

Индекс активности заболевания (DAI) определяли путем оценки мышей три раза в неделю во время исследования и оценки заболевания на основе потери массы тела, осанки, активности, внешнего вида шерсти и кожи мышей. После прекращения исследования на 42 день, были оценены конечные показатели выживаемости, потери массы тела и активности заболевания. Были построены графики выживания Каплана-Мейера, представляющие процент выживших животных до конечной точки исследования, и сравнение кривых выживаемости анализировали с помощью тестов Мантеля-Кокса и Гехана-Бреслоу-Уилкокса (95% CI). Образцы крови/сыворотки отбирали у выживших мышей в конце исследования (день 42) и клетки оценивали с помощью проточной цитометрии на маркеры Т-клеток, включая маркеры мыши или человека, CD4, CD8, CD28, ICOS, маркеры активации или истощения (PD-1, Ki67) и FoxP3 (маркер Treg). Также оценивали уровни сывороточных провоспалительных цитокинов (например, IFN-гамма, IL-10, IL-12 (p70), IL-17A, IL-4, IL-5 и TNFα).

ТАБЛИЦА 34. График дозирования							
группа	N	Тестируемые изделия	Доза (мкг)	Объем дозы (мкл)	Путь	Схема	Начало дозирования
1	5	Без обработки	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Выживание/DAI							
2	10	Солевой раствор	н/д	100	в.б.	3 раза в неделю в течение 4 недель	День 0
3	10	вариантный ICOSL IgV-Fc	500	100	в.б.	3 раза в неделю в течение 4 недель	День 0
4	10	вариантный ICOSL IgV-Fc	100	100	в.б.	3 раза в неделю в течение 4 недель	День 0
5	10	вариантный ICOSL IgV-Fc	20	100	в.б.	3 раза в неделю в течение 4 недель	День 0
6	10	Белатацепт	100	100	в.б.	3 раза в неделю в течение 4 недель	День 0
PK/Выживание//DAI							
7	9	вариантный ICOSL IgV-Fc	100	100	в.б.	однократно День 1	День 1

Фиг. 32A-32B показывают оценки выживаемости и DAI у мышей с GVHD, получавших лечение в соответствии с каждым режимом дозирования. Как показано, тестируемый вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) при всех тестируемых уровнях дозы значительно повышал выживаемость (фиг. 32A) и снижал показатели заболевания (фиг. 32B) по сравнению с мышами, получавшими белатацепт (т.е. 100% по сравнению с 40% выживаемости в день 42, соответственно; $p < 0,01$ по лог-ранговому критерию Мантеля-Кокса). Примечательно, что однократное (100 мкг) введение вариантного ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) приводило к такой же защите от заболевания, что и повторное введение 100 мкг белатацепта.

Проточный цитометрический анализ крови, собранной в конце исследования, продемонстрировал, что тестируемый вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) эффективно подавлял размножение перенесенных Т-клеток человека, что наблюдалось по уменьшенному соотношению клеток человека/клеток мыши (фиг. 33A) и значительно уменьшенному общему количеству Т-клеток (фиг. 33B). Как показано на ФИГ. 33C-33F, проточная цитометрия крови, собранной в конце исследования CD4+ и CD8+ Т-клеток, одновременно окрашенных по ICOS (фиг. 33C-33D) и CD28 (фиг. 33E-33F) продемонстрировала, по существу, отсутствие окрашивания в группах, обработанных вариантным ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), хотя CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие ICOS, были легко обнаружимы у мышей, получавших белатацепт. Эти результаты согласуются с отсутствием Т-клеток, остающихся у мышей, обработанных ICOSL IgV-Fc, а также со способностью вариантного ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) связывать молекулы-мишени CD28 и ICOS и блокировать их детекцию антителами проточной цитометрии. Связывание вариантного ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) с несколькими оставшимися Т-клетками человека было подтверждено детекцией с использованием Fc против IgG человека. Примечательно, что хотя большинство перенесенных человеческих Т-клеток первоначально экспрессировали CD28 и только 10-20% были ICOS+, активированные Т-клетки, оставшиеся у мышей, получавших физиологический раствор или белатацепт, при завершении/в конце исследования составляли > 80% ICOS+.

Наличие маркеров активации или истощения Т-клеток также подавлялось в группах, получавших вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), о чем свидетельствует более низкая экспрессия PD1 в CD4+ и CD8+ Т-клетках и снижение экспрессии Ki67 в CD4+ Т-клетках (ФИГ. 34A-3B). Отношение эффекторных Т-клеток к Treg оставалось стабильным в группах, обработанных вариантным ICOSL IgV-Fc

(N52H/N57Y/Q100R) по сравнению с белатацептом (ФИГ. 34C). Сывороточные провоспалительные цитокины также подавлялись в группах, получавших вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) по сравнению с белатацептом (ФИГ. 35A-35D).

Также для мониторинга воздействия сывороточного варианта ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) проводили фармакокинетический (PK) анализ. Концентрации тестируемого изделия измеряли в образцах сыворотки мыши с помощью количественного PK-ELISA, используя захватывающее mAb антитело против ICOSL человека и Fc-специфические мышиные антитела против IgG человека в качестве детектирующего реагента.

Наблюдаемое сывороточное экспонирование вариантного ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) в модели GVHD было на 45% ниже, чем у нормальных мышей, определенных в отдельном исследовании (ФИГ. 35E). Более длительный период конечного полужизни вариантного ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) в модели GvHD может быть связан с уменьшением мишени (CD28, ICOS) в более поздние моменты времени при GvHD (когда исчезают Т-клетки человека), и/или с образованием антител против лекарств (ADA) у нормальных мышей, которые могут мешать экспонированию лекарств. Наблюдение о том, что вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) имел более низкое сывороточное экспонирование по сравнению с нормальными мышами, может быть связано с мишень-опосредованным распределением лекарства (TMDD), в модели GvHD (т.е. его более высокая аффинность к CD28 и ICOS человека по сравнению с мышиными ортологами) и/или отсутствию FcRn у мышей NOD/SCID (NSG), используемых в этой модели.

Вместе эти результаты согласуются с наблюдением, что вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) проявляет сильную антагонистическую активность, даже при использовании только одной дозы, и превосходную активность по сравнению с белатацептом. Это наблюдение может быть связано с вариантным ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), демонстрирующим превосходный контроль над ICOS+ Т-клетками, которые иначе избегают одиночной блокады пути ICOS или CD28, такой как достигаемая белатацептом, антагонистом пути CD28.

ПРИМЕР 37

Оценка вариантного Fc ICOSL-IgV в модели колита, индуцированного CD4+CD45RBhigh

Оценивали влияние примерного вариантного ICOSL IgV-Fc, содержащего вариантный ICOSL IgV (N52H/ N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 565), слитый с инертным Fc (содержащим мутации L234A, L235E и L235E в Fc IgG1 человека, например, представлен

в SEQ ID NO: 637) на развитие заболевания в модели колита, индуцированного CD4+CD45RBhigh.

Донорные клетки CD4+CD45RBhigh обогащали отрицательным отбором из суспензий клеток селезенки, полученных от 15 мышей-доноров BALB/C. В день 0 0,3 млн. CD4+CD25-CD45RBhigh (истощенных по Treg) донорных клеток инъецировали внутривенно мышам с дефицитом C.B17 (SCID) (n = 12 или 21 на группу) для индукции колита. В качестве контроля 0,3 миллиона CD4+ клеток (содержащих клетки Treg), которые не вызывают развитие колита в этой модели, инъецировали реципиентам мышей SCID (n = 12). В день переноса клеток мышам в каждой группе вводили вариантный ICOSL-IgV Fc или только Fc или контроли-носители. В Таблице 35 приведены схемы лечения для тестируемых групп.

ТАБЛИЦА 35. Схемы лечения

группа	# мыши	Клеток инъецировано	Обработка	Доза	Путь	Частота
1	12	CD4+	PBS (стерильный)	-	в.б.	3х/в неделю (Понедельник, Среда, Пятница)
2	12	CD4+CD45RBhigh	PBS (стерильный)	-	в.б.	3х/в неделю (Понедельник, Среда, Пятница)
3	21	CD4+CD45RBhigh	Fc-контроль	300 мкг	в.б.	3х/в неделю (Понедельник, Среда, Пятница)
5	12	CD4+CD45RBhigh	вариантный ICOSL IgV-Fc	400 мкг	в.б.	3х/в неделю (Понедельник, Среда, Пятница)

Массу тела (измеряемую начиная с 0 дня) и показатель консистенции стула (измеряемый начиная с 10 дня) оценивали три раза в неделю. Суточный индекс активности заболевания (DAI) рассчитывали по баллам массе тела и стула. После того как исследование было прекращено в день 42, собирали толстую кишку для определения длины и массы и гистологического анализа. Статистический анализ конечной массы тела

и конечной массы и длины толстой кишки оценивали для группы вариантного ICOSL-IgV Fc относительно группы носителя с использованием двустороннего критерия Стьюдента. Баллы стула и DAI сравнивались с использованием непараметрического Т-критерия Уилкоксона.

Результаты DAI показаны в Таблицах 36 (DAI) и на ФИГ. 36А, в таблице 37 показаны измерения толстой кишки, а результаты гистологии толстой кишки показаны в Таблице 38 и на ФИГ. 36В. Как показано, протестированный вариантный ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R) демонстрировал значительно сниженное развитие колита в этой модели, что согласуется с полезностью этого двойного антагониста CD28/ICOS для эффективного лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD).

ТАБЛИЦА 36. Оценка активности заболевания

Обработка	Конечный % массы тела +/- SD	p-значение	Конечный балл стула +/- SD	p-значение	Конечный Балл DAI +/- SD	p-значение
Колит не индуцируется/Носитель	112,3% +/- 3,9%		0,3 +/- 0,5		0,3 +/- 0,5	
Носитель	92,7% +/- 11,7%	<0,0001^	1,3 +/- 1,3	0,0016^	3,2 +/- 2,6	0,0003^
Fc-контроль, 300 мкг	96,2% +/- 5,4%	0,2656*	1,4 +/- 1,4	0,8836*	2,5 +/- 1,7	0,6948*
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 400 мкг	109,6% +/- 4,0%	<0,0001~	0,1 +/- 0,3	0,0014~	0,1 +/- 0,3	<0,0001~

^ По сравнению с не индуцированным колитом/Носитель

* По сравнению с носителем

~ По сравнению с Fc-контролем, 300 мкг

ТАБЛИЦА 37. Измерения толстой кишки

Обработка	Конечная масса толстой кишки (мг) +/- SD	p-значение	Конечная длина толстой кишки (мм) +/- SD	p-значение	Конечная масса/длина толстой кишки +/- SD	p-значение
Колит не индуцируется/ Носитель	175,3 +/- 16,9		82,8 +/- 5,2		2,1 +/- 0,2	
Носитель	323,1 +/- 78,0	<0,0001^	77,7 +/- 7,5	0,0668^	4,2 +/- 1,2	<0,0001^
Fc-контроль, 300 мкг	276,7 +/- 92,4	0,1602*	77,6 +/- 8,9	0,9911*	3,6 +/- 1,2	0,1843*
ICOSL IgV-Fc	160,8 +/- 24,4	0,0004~	79,4 +/- 6,1	0,5738~	2,0 +/- 0,3	0,0003~

(N52H/N57Y/ Q100R), 400 мкг						

^ По сравнению с не индуцированным колитом/Носитель

* По сравнению с носителем

~ По сравнению с Fc-контролем, 300 мкг

ТАБЛИЦА 38. Результаты гистологии

				Толстая кишка (swiss roll)			
группа	Клетка #	Мышь #	Мышь ID#	Слизистая	Подсли-зистая	Мышцы	Общий балл
Колит не индуцируется/Носитель	1	1	1-1	0	0	0	0,0
		2	1-2	0	0	0	0,0
		3	1-3	0	0	0	0,0
		4	1-4	0	0	0	0,0
	2	1	2-1	1	1	0	2,0
		2	2-2	0	0	0	0,0
		3	2-3				
		4	2-4				
	3	1	3-1				
		2	3-2				
		3	3-3				
		4	3-4				
Среднее				0,2	0,2	0,0	0,2
Среднеквадратическое отклонение				0,4	0,4	0,0	0,4
SEM				0,2	0,2	0,0	0,2
Носитель	4	1	4-1	3	3	1	7,0
		2	4-2	1	1	0	2,0
		3	4-3	2	2	0	4,0
		4	4-4	2	2	0	4,0
	5	1	5-1	2	3	0	5,0
		2	5-2	2	2	0	4,0
		3	5-3				
		4	5-4				
	6a	1	6a-1				
		2	6a-2				
		3	6a-3				
	6b	1	6b-1				
Среднее				2	2,2	0,2	2,0
Среднеквадратическое отклонение				0,6	0,8	0,4	0,6
SEM				0,3	0,3	0,2	0,3
t-тест против Колит не индуцируется/Носитель				0,0001	0,0002	0,3409	0,0001
Fc-контроль, 300 мкг	6b	2	6b-2	2	1	0	3,0
		3	6b-3	3	3	1	7,0
	6c	1	6c-1	3	3	0	6,0
		2	6c-2	2	2	2	6,0

		3	6c-3	3	2	1	6,0
	7	1	7-1				
		2	7-2	2	2	1	5,0
		3	7-3	2	1	0	3,0
		4	7-4	2	3	0	5,0
	8	1	8-1	2	1	0	3,0
		2	8-2	2	1	0	3,0
		3	8-3				
		4	8-4	1	1	0	2,0
	9	1	9-1				
		2	9-2				
		3	9-3				
		4	9-4				
	10	1	10-1				
		2	10-2				
		3	10-3				
		4	10-4				
Среднее				2,2	1,8	0,5	2,2
Среднеквадратическое отклонение				0,6	0,9	0,7	0,6
SEM				0,2	0,3	0,2	0,2
Т-тест против Носитель				0,5676	0,4240	0,3663	0,5676
ICOSL IgV -Fc (N52H/N57Y/Q100R), 400 мкг	14	1	14-1	0	0	0	0,0
		2	14-2	0	0	0	0,0
		3	14-3	0	0	0	0,0
		4	14-4	0	0	0	0,0
	15	1	15-1	0	0	0	0,0
		2	15-2	0	0	0	0,0
		3	15-3				
		4	15-4				
	16	1	16-1				
		2	16-2				
		3	16-3				
		4	16-4				
Среднее				0,0	0,0	0,0	0,0
Среднеквадратическое отклонение				0,0	0,0	0,0	0,0
SEM				0,0	0,0	0,0	0,0
t-тест против Fc-контроль				0,0000	0,0002	0,1315	0,0000

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными раскрытыми воплощениями, которые предоставляются, например, для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и положений настоящего изобретения. Такие вариации могут быть осуществлены на практике без отхода от истинного объема и духа раскрытия и предназначены для того, чтобы подпадать под объем настоящего раскрытия.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариантный полипептид лиганда ICOS (ICOSL), включающий одну или несколько модификаций аминокислот в домене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) референсного полипептида ICOSL, в котором одна или несколько модификаций аминокислот включают N52A, N52C, N52D, N52G, N52K, N52L, N52M, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, N52K, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100S, Q100T или Q100V относительно нумерации SEQ ID NO:32; и где:

референсный полипептид ICOSL представляет собой укороченный внеклеточный домен ICOSL, содержащий непрерывную последовательность аминокислот, содержащую аминокислоты 1-112, и С-концевое укорочение по меньшей мере на 25 аминокислот относительно последовательности внеклеточного домена ICOSL, представленного в SEQ ID NO:32; или референсный полипептид ICOSL изменен в одной или нескольких аминокислотах, соответствующих аминокислотам 204-209, относительно SEQ ID NO:32.

2. Вариантный полипептид ICOSL по п. 1, где С-концевое укорочение составляет по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125 аминокислотных остатков.

3. Вариантный полипептид ICOSL по п. 1 или п. 2, в котором референсный полипептид ICOSL изменен или утратил сайт расщепления протеазой, который представлен аминокислотами 204-209 из SEQ ID NO:32.

4. Вариантный полипептид лиганда ICOS (ICOSL), содержащий домен IgV или его специфически связывающий фрагмент, домен IgC или его специфически связывающий фрагмент, или оба домена, где вариантный полипептид ICOSL содержит одну или несколько аминокислотных модификаций в референсном полипептиде ICOSL или его

специфически связывающем фрагменте, соответствующих аминокислотным модификациям, выбранным из N52A, N52C, N52G, N52K, N52L, N52M, N52R, N52T, N52V, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, Q100A, Q100D, Q100G, Q100L, Q100M, Q100N, Q100S, Q100T или Q100V относительно нумерации SEQ ID NO:32.

5. Вариантный полипептид ICOSL по п. 4, в котором референсный полипептид ICOSL включает (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, (ii) аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32; или (iii) часть (i) или (ii), содержащую домен IgV или домен IgC или их специфические связывающие фрагменты или и то, и другое.

6. Вариантный полипептид ICOSL по п. 4 или 5, в котором вариантный полипептид ICOSL включает домен IgV или его специфический связывающий фрагмент.

7. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 4-6, в котором домен IgV или его специфический связывающий фрагмент является единственной частью ICOSL вариантного полипептида ICOSL.

8. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-7, в котором референсный полипептид ICOSL включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 545.

9. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-7, в котором референсный полипептид ICOSL состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 545.

10. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 8-9, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении, соответствующем положению(ям) 52, 57 или 100, относительно нумерации SEQ ID NO:32.

11. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-10, в котором одна или

несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,

E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R,

Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N,

M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R,

N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,

M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R,

N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52D, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,

E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/ N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P или R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R относительно нумерации SEQ ID NO:32.

12. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 8-11, в котором вариант ICOSL содержит одну или несколько модификаций аминокислот, представляющих собой N52L/N57H/Q100R, и/или указанный полипептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 761.

13. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 8-11, в котором вариант ICOSL содержит модификацию аминокислот, представляющую собой N52D, и/или

указанный полипептид имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 548.

14. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 8-13, в котором референсный полипептид ICOSL изменен в одной или более аминокислотах, соответствующих аминокислотам 204-209, относительно SEQ ID NO:32, и при этом:

изменение включает делецию одной или нескольких смежных аминокислот, соответствующих аминокислотам 204-209 относительно SEQ ID NO: 32; или

изменение включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в одном или обоих положениях 207 и 208, соответствующих положениям, представленным в SEQ ID NO: 32.

15. Вариантный полипептид ICOSL по п. 14, в котором по меньшей мере одна аминокислотная замена представляет собой N207A, N207G или L208G относительно нумерации SEQ ID NO: 32, или их консервативную аминокислотную замену.

16. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 8-13, в котором вариантный полипептид ICOSL проявляет пониженное протеолитическое расщепление при экспрессии из клетки, по сравнению с полноразмерным внеклеточным доменом вариантного полипептида ICOSL при экспрессии из той же самой клетки.

17. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 14-16, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций находятся в положении, соответствующем положению(ям), выбранным из 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225 или 227 относительно нумерации SEQ ID NO:32.

18. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пунктов 1-3 и 14-17, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из M10V, M10I, V11E, S13G,

E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K относительно нумерации SEQ ID NO:32, или их консервативных аминокислотных замен.

19. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 14-18, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из F120S/Y152H/N201S, E111del, Y33del, N168Q/N207Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N84Q/N119Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q или F138L/L203P относительно нумерации SEQ ID NO:32.

20. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-3 и 14-19, в котором одна или несколько аминокислотных модификаций выбраны из N52Y/N57Y/F138L/L203P,

N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T,

N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N52Q/N168Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R,

N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I,

N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P или R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R относительно нумерации SEQ ID NO:32.

21. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-20, в котором вариантный полипептид ICOSL проявляет повышенное связывание с эктодоменом(ами) ICOS и/или CD28 по сравнению со связыванием референсного полипептида ICOSL с тем(и) же эктодоменом(ами), необязательно при этом связывание увеличивается более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 60 раз.

22. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-21, где вариантный полипептид ICOSL включает вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19 или 20 аминокислотных модификаций, причем необязательно аминокислотные модификации представляют собой аминокислотные замены, вставки и/или делеции.

23. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-22, который является растворимым белком.

24. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-23, где:

вариантный полипептид ICOSL, утратил трансмембранный домен или внутриклеточный сиганльный домен; и/или

при экспрессии из клетки вариантный полипептид ICOSL не экспрессируется на поверхности клетки.

25. Вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-24, где вариантный полипептид ICOSL дополнительно включает трансмембранный домен, необязательно, при этом вариант ICOSL дополнительно включает цитоплазматический сигнальный домен, связанный с трансмембранным доменом.

26. Иммуномодулирующий белок, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-25 и фрагмент, увеличивающий период полужизни.

27. Иммуномодулирующий белок по п. 26, в котором фрагмент, увеличивающий период полужизни, включает 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-связывающую малую молекулу или их комбинацию.

28. Иммуномодулирующий белок по п. 26 или п. 27, в котором фрагмент, увеличивающий период полужизни, представляет собой или содержит домен мультимеризации.

29. Иммуномодулирующий белок, включающий вариантный полипептид ICOSL

по любому из пунктов 1-25, связанный со вторым полипептидом, содержащим домен суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF).

30. Иммуномодулирующий полипептид по п. 29, в котором домен IgSF второго полипептида проявляет повышенное связывание с одним или несколькими его когнатными партнерами по связыванию по сравнению с немодифицированным доменом IgSF или доменом IgSF дикого типа, необязательно, где домен IgSF второго полипептида способен связываться с партнером связывания, отличным от партнера, специфически связываемого вариантным полипептидом ICOSL.

31. Иммуномодулирующий полипептид по любому из пп. 29 или 30, в котором домен IgSF второго полипептида представляет собой фрагмент, локализующий в опухоли, который связывается с лигандом, экспрессируемым на опухоли.

32. Иммуномодулирующий полипептид по п. 31, в котором лиганд представляет собой B7H6 и/или где домен IgSF происходит из NKp30.

33. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26, 27 и 29-32, в котором иммуномодулирующий белок содержит домен мультимеризации, связанный с одним или обоими вариантным полипептидом ICOSL или вторым полипептидом, содержащим домен IgSF, необязательно, при этом домен мультимеризации связан через линкер с одним или обоими вариантным полипептидом ICOSL или вторым полипептидом, содержащим домен IgSF.

34. Иммуномодулирующий белок по п. 28 и п. 33, в котором домен мультимеризации представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

35. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-28, 33 и 34, который является димером.

36. Иммуномодулирующий белок по п. 35, в котором димер представляет собой гомодимер.

37. Иммуномодулирующий белок по п. 35, в котором димер представляет собой

гетеродимер.

38. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 34-37, в котором Fc-область представляет собой IgG1 человека или представляет собой вариант Fc-области, содержащий одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с IgG1 человека дикого типа, необязательно, причем Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226, или ее вариант,, который демонстрирует по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 226.

39. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 34-38, в котором Fc-область проявляет одну или несколько эффекторных функций.

40. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 34-38, в котором Fc-область представляет собой вариантную Fc-область, которая проявляет одну или несколько сниженных эффекторных функций по сравнению с Fc из IgG1 человека дикого типа.

41. Иммуномодулирующий белок по п. 40, в котором вариант Fc-области включает одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K или L234A/L235E/G237A, где остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat.

42. Иммуномодулирующий белок по п. 41, в котором вариантная Fc-область дополнительно включает аминокислотную замену C220S, причем остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU по Kabat и/или указанная Fc-область включает K447del, причем остаток пронумерован в соответствии с индексом EU по Kabat.

43. Иммуномодулирующий белок по п. 41 или 42, в котором Fc-область включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:476, SEQ ID NO:632, SEQ ID NO:478, SEQ ID NO:634, SEQ ID NO:477, SEQ ID NO:633, SEQ ID NO:474 или SEQ ID NO:637.

44. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 34-43, в котором вариантный

полипептид ICOSL связан через линкер с Fc-областью, необязательно, при этом линкер содержит от 1 до 10 аминокислот.

45. Иммуномодулирующий белок по любому из пп. 29-44, в котором вариантный полипептид ICOSL и домен IgSF второго полипептида связаны линкером.

46. Иммуномодулирующий белок по п. 33-45, в котором домен мультимеризации связан через линкер с одним или обоими вариантным полипептидом ICOSL или вторым полипептидом, содержащим домен IgSF.

47. Иммуномодулирующий белок по п. 44, п. 45 или п. 46, в котором линкер представляет собой AAA, G4S (SEQ ID NO: 636), (G4S)2 (SEQ ID NO: 229), 3x GGGGS (SEQ ID NO: 228), или GSGGGGS (SEQ ID NO: 635).

48. Конъюгат, содержащий вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-25 или иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-47 и гетерологичный фрагмент.

49. Конъюгат по п. 48, в котором конъюгат представляет собой гибридный белок.

50. Конъюгат по п. 48 или 49, в котором фрагмент представляет собой нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой на поверхности клетки.

51. Конъюгат по п. 50, в котором нацеливающий фрагмент специфически связывается с молекулой на поверхности иммунной клетки, необязательно, при этом иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку или лимфоцит.

52. Конъюгат по пункту 50, в котором нацеливающий фрагмент представляет собой фрагмент, локализующий на опухоли, который связывается с молекулой на поверхности опухоли.

53. Конъюгат по пп. 50-52, в котором антитело выбрано из цетуксимаба, панитумумаба, залутумумаба, нимотузумаба, трастузумаба, адотрастумумаба, эмтансина, тозитумомаба (Bexxar®), ритуксимаба (Rituxan, Mabthera), Ибритумомаб тиуксетана (Zevalin), даклизумаба (Zenapax), гемтузумаба (Mylotarg), алемтузумаба, фрагмента Fab

CEA-скана, моноклонального антитела OC125, ab75705, B72.3, бевацизумаба (Avastin®), афатиниба, акситиниба, бозутиниба, кабозантиниба, церитиниба, кризотиниба, дабрафениба, дасатиниба, динутуксимаба, эрлотиниба, эверолимуса, ибрутиниба, иматиниба, лапатиниба, ленватиниба, нилотиниба, олапариба, оларатумаба, палбоциклиба, пазопаниба, пертузумаба, рамукирумаба, регорафениба, руксолитиниба, сорафениба, сунитиниба, темсиролимуса, траметиниба, вандетаниба, вемурафениба, висмодегиба, базиликсимаба, ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба, MPDL3280A, пидилизумаба (CT-011), AMP-224, MSB001078C или MEDI4736, BMS-935559, LY3300054, атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба или представляет собой их антигенсвязывающий фрагмент.

54. Моновалентный гибридный белок, содержащий:

(a) вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-25; и

(b) метку для обнаружения или очистки вариантного полипептида ICOSL.

55. Гибридный белок по п. 54, в котором метка для детекции или очистки выбрана из полигистидиновой (His) метки, FLAG-метки, Myc-метки или метки на основе флуоресцентного белка.

56. Молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая(ие) вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-25, иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-47 или гибридный белок по любому из пп. 49-55.

57. Вектор, содержащий молекулу(ы) нуклеиновой кислоты по п. 56.

58. Клетка, содержащая молекулу(ы) нуклеиновой кислоты по п. 56 или вектор по п. 57.

59. Способ получения иммуномодулирующего белка, содержащего вариантный полипептид ICOSL, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 58 или вектора по п. 57 в клетку-хозяина, необязательно в клетку млекопитающего, в условиях для экспрессии белка в клетке.

60. Клетка по п. 58, которая является клеткой яичника китайского хомячка (CHO)

или ее производным, необязательно, где клетка представляет собой CHO DG44.

61. Способ по любому из п. 59 или п. 60, дополнительно включающий выделение или очистку белка из клетки.

62. Белок, полученный способом по любому из пп. 59-61.

63. Композиция, содержащая белок, включающий вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-21 или иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-47, в которой по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% отдельных последовательностей белка или иммуномодулирующего белка в композиции имеют идентичную длину последовательности.

64. Композиция по п. 63, в которой белок или иммуномодулирующий белок очищают из клеток яичника китайского хомяка или их производного.

65. Сконструированная клетка, включающая вариантный полипептид ICOSL по любому из пп.1-25, иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-47 или гибридный белок по любому из пп. 49-55.

66. Сконструированная клетка по п. 65, в которой вариантный полипептид ICOSL, иммуномодулирующий белок или гибридный белок секретируется из сконструированной клетки или где сконструированная клетка содержит вариантный полипептид ICOSL, который представляет собой мембранный белок, экспрессируемый на поверхности клетки.

67. Сконструированная клетка по любому из пп. 65-67, где иммунная клетка представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC) или лимфоцит.

68. Сконструированная клетка по любому из пп. 65-67, дополнительно включающая химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор.

69. Инфекционный агент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-25, или

иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-47 или гибридный белок по любому из пп. 49-55.

70. Фармацевтическая композиция, содержащая вариантный полипептид ICOSL по любому из пп. 1-25, иммуномодулирующий белок по любому из пп. 26-47, конъюгат или гибридный белок по любому из пп. 48-55 или сконструированную клетку по любому из пп. 65-68 или инфекционный агент по п. 69, необязательно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

71. Изделие, включающее фармацевтическую композицию по п. 70 во флаконе.

72. Набор, включающий композицию по п. 70 или изделие по п. 71 и инструкции по применению.

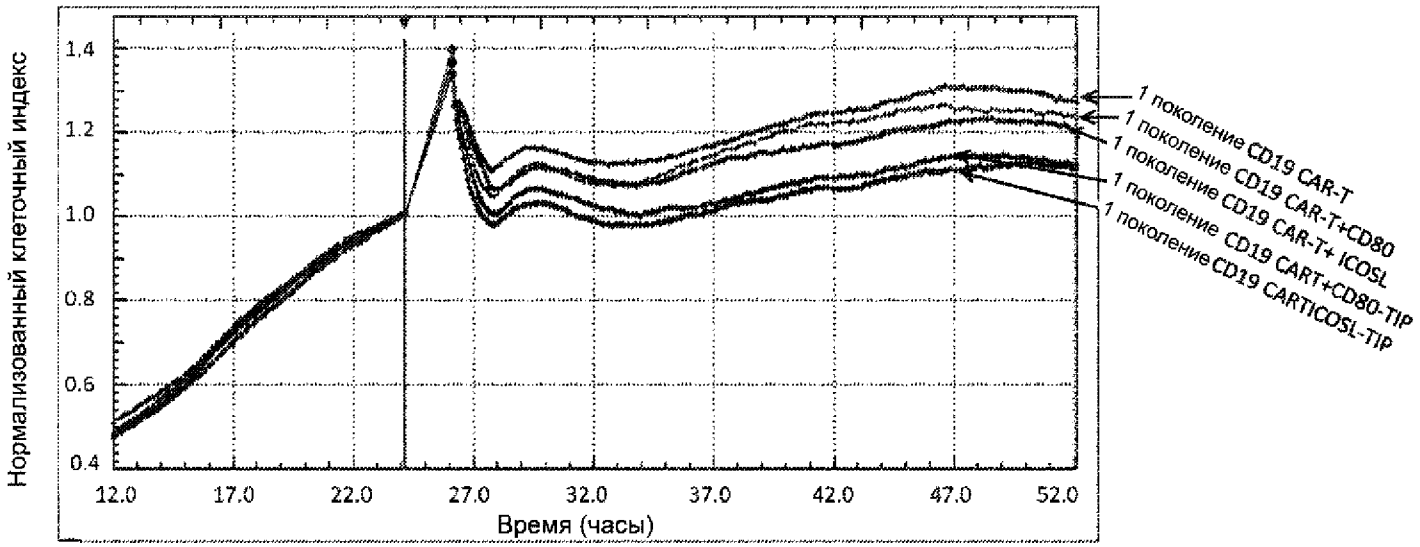
73. Способ модуляции иммунного ответа у объекта, включающий введение фармацевтической композиции по п. 70 объекту.

74. Способ лечения заболевания или состояния у объекта, включающий введение фармацевтической композиции по п. 70 объекту.

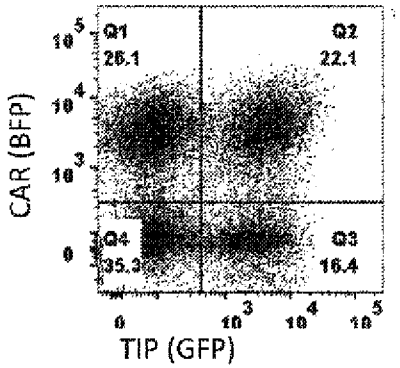
75. Способ по п. 73 или п. 74, в котором введение снижает иммунный ответ у объекта.

76. Способ по п. 74 или 75, в котором заболевание или состояние являются воспалительным или аутоиммунным заболеванием или состоянием.

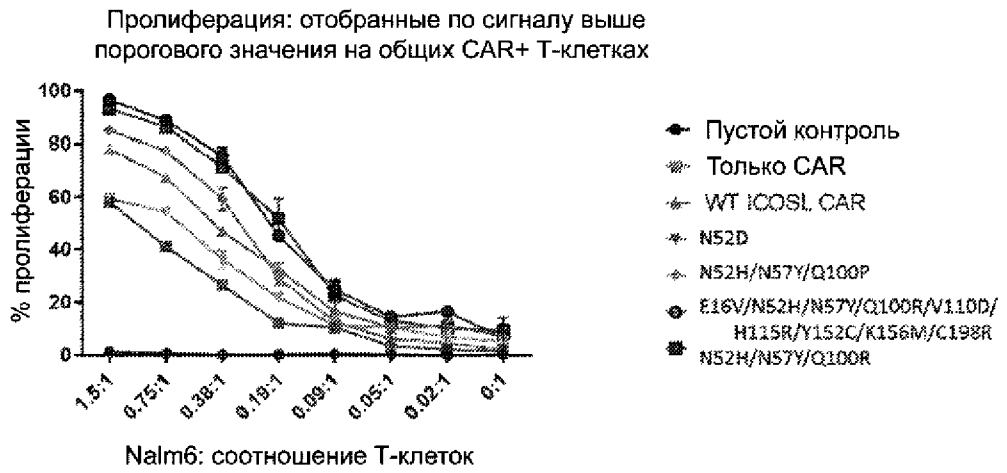
Фиг. 1


Нормализованный клеточный индекс
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
12.0
17.0
22.0
27.0
32.0
37.0
42.0
47.0
52.0
Время (часы)
1 поколение CD19 CAR-T
1 поколение CD19 CAR-T+CD80
1 поколение CD19 CAR-T+ ICOSL
1 поколение CD19 CART+CD80-TIP
1 поколение CD19 CARTICOSL-TIP

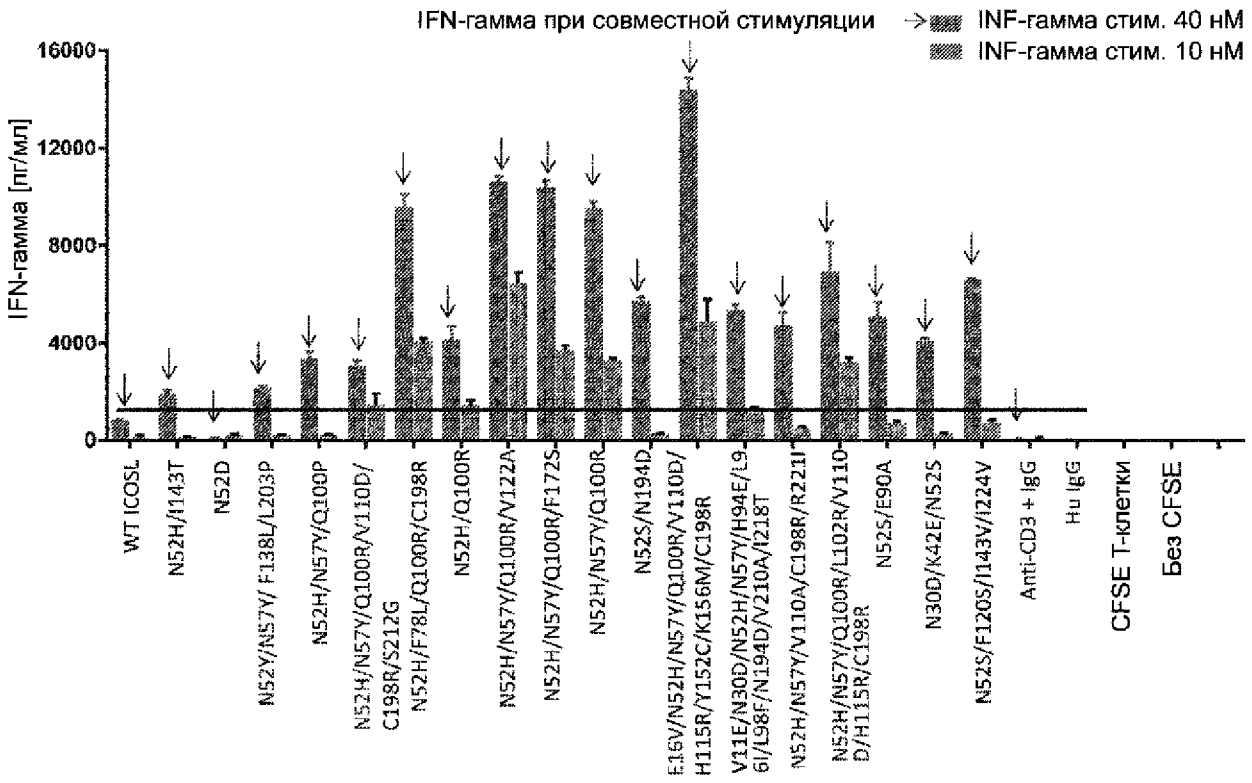
Фиг. 2A


Q1
26.1
Q2
22.1
Q4
35.3
Q3
16.4
CAR (BFP)
TIP (GFP)

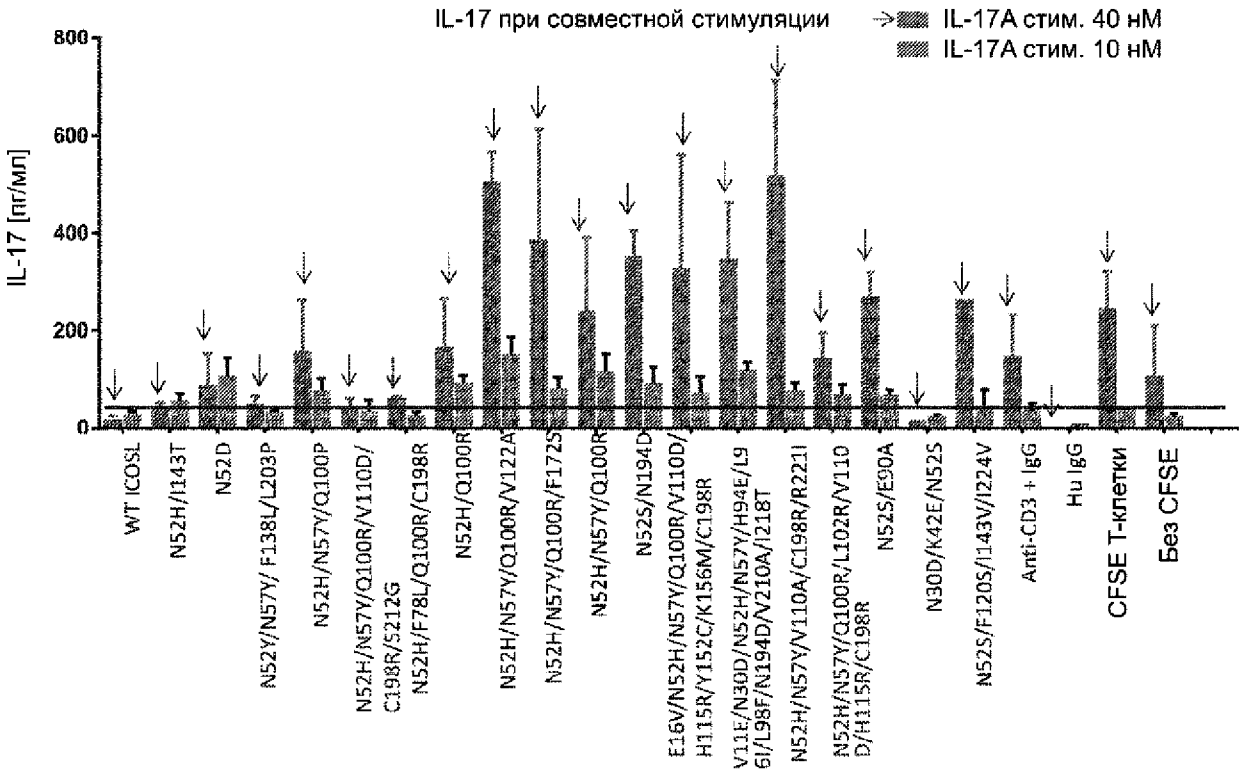
Фиг. 2B


Пролиферация: отобранные по сигналу выше порогового значения на общих CAR+ Т-клетках
% пролиферации
Nalm6: соотношение Т-клеток
1.5:1
0.75:1
0.38:1
0.19:1
0.09:1
0.05:1
0.02:1
0:1
Пустой контроль
Только CAR
WT ICOSL CAR
N52D
N52H/N57Y/Q100P
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/ H115R/Y152C/K156M/C198R
N52H/N57Y/Q100R

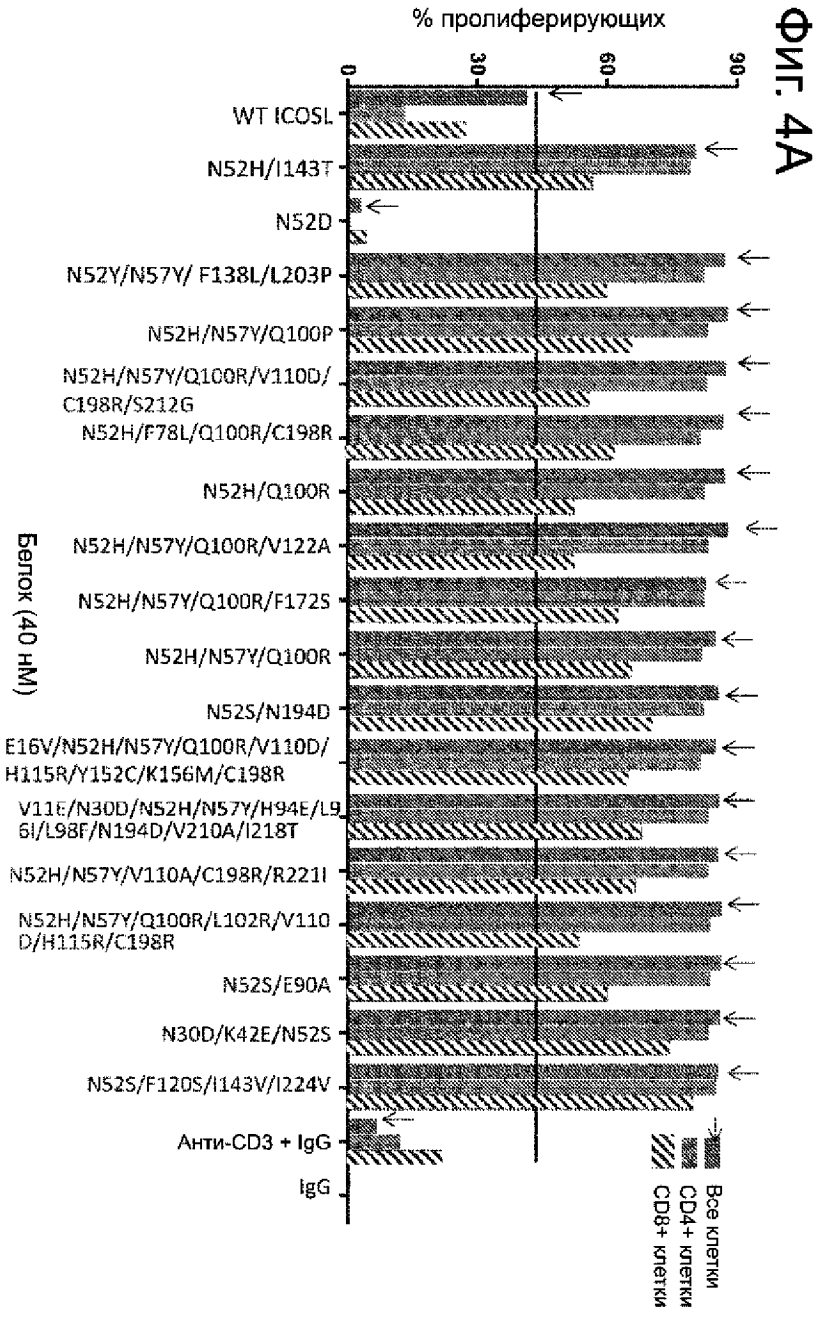
Фиг. 3A

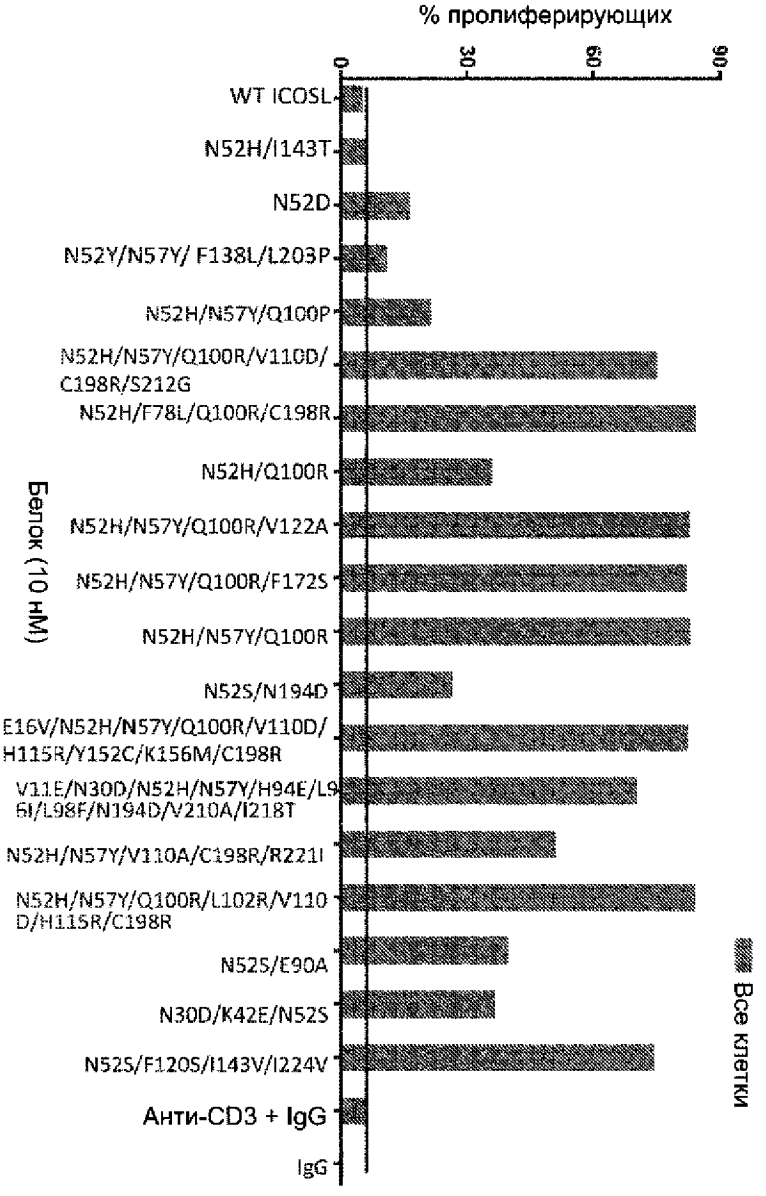

IFN-гамма при совместной стимуляции
INF-гамма стим. 40 нМ
INF-гамма стим. 10 нМ
IFN-гамма [пг/мл]
16000
12000
8000
4000
0
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/ C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/ H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/I9 6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110 D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Anti-CD3 + IgG
Hu IgG
CFSE T-клетки
Без CFSE

Фиг. 3B


IL-17 при совместной стимуляции
IL-17A стим. 40 нМ
IL-17A стим. 10 нМ
IL-17 [пг/мл]
800
600
400
200
0
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/ C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/ H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9 6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110 D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Anti-CD3 + IgG
Hu IgG
CFSE Т-клетки
Без CFSE

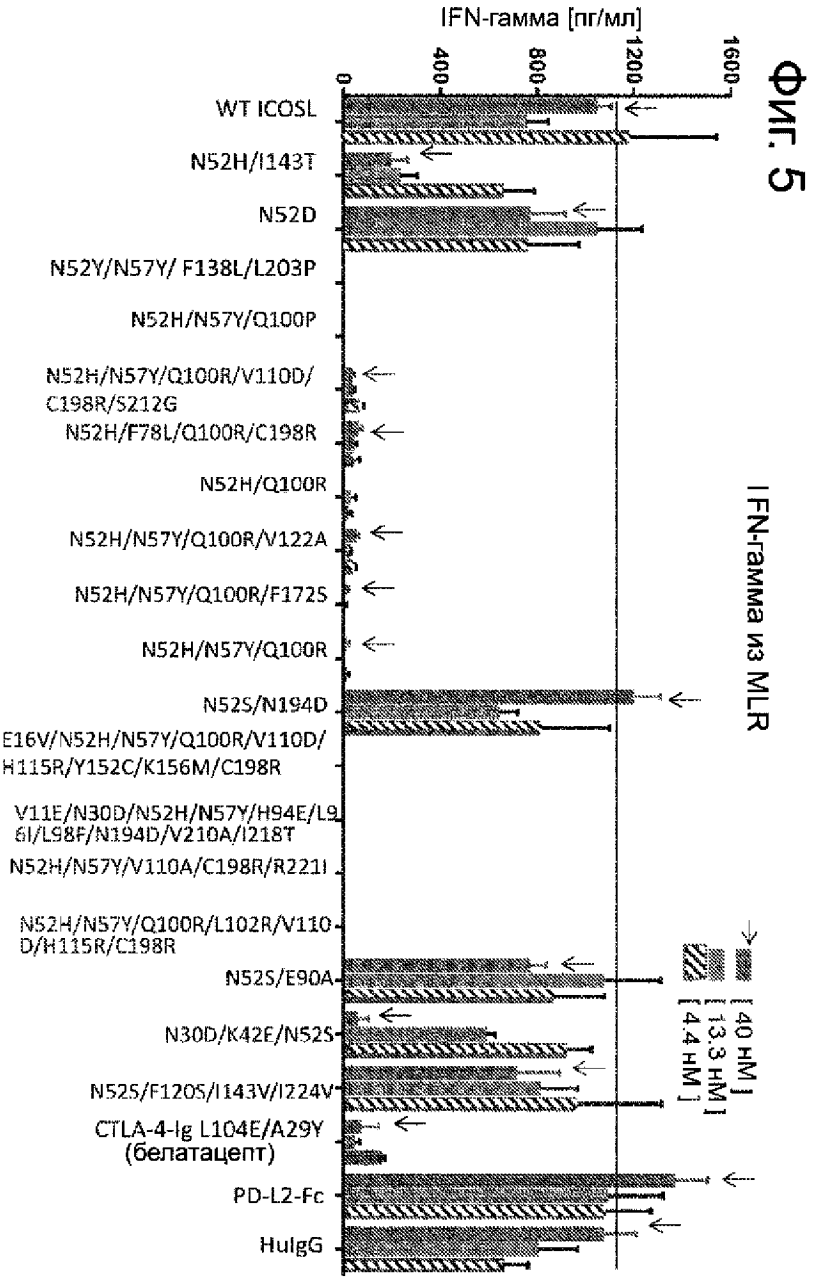
ФИГ. 4A


% пролиферирующих
0
30
60
90
Белок (40 нМ)
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/
H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Анти-CD3 + IgG
IgG
Все клетки
CD4+ клетки
CD8+ клетки

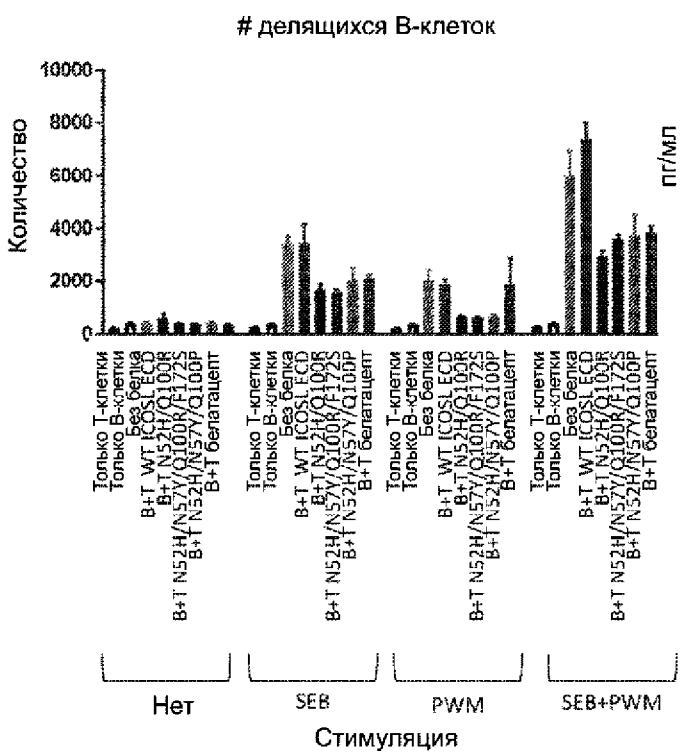

% пролиферирующих
0
30
60
90
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/
H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Анти-CD3 + IgG
IgG
Белок (10 нМ)
Все клетки

Фиг. 4B

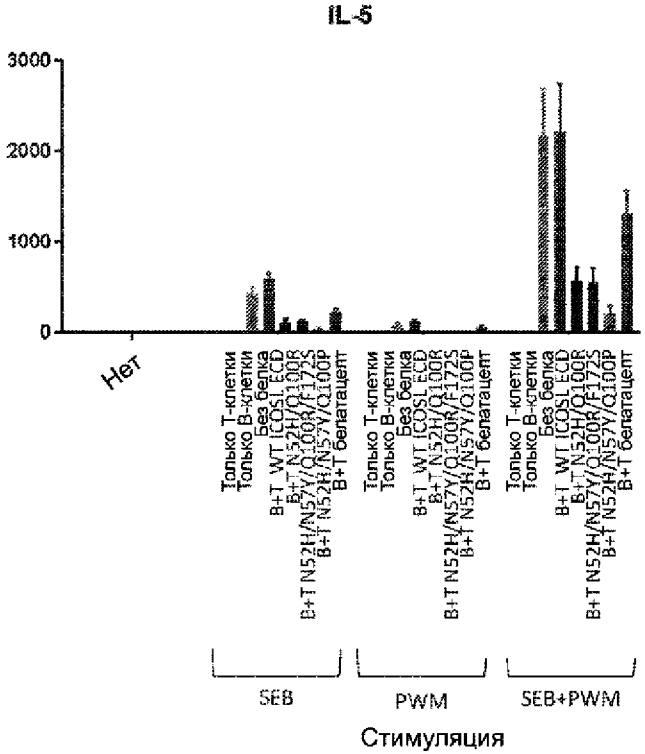
Фиг. 5


IFN-гамма [пг/мл]
0
400
800
1200
1600
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/
H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(белатацепт)
PD-L2-Fc
HuIgG
IFN-гамма из MLR
[40 нМ]
[13.3 нМ]
[4.4 нМ]

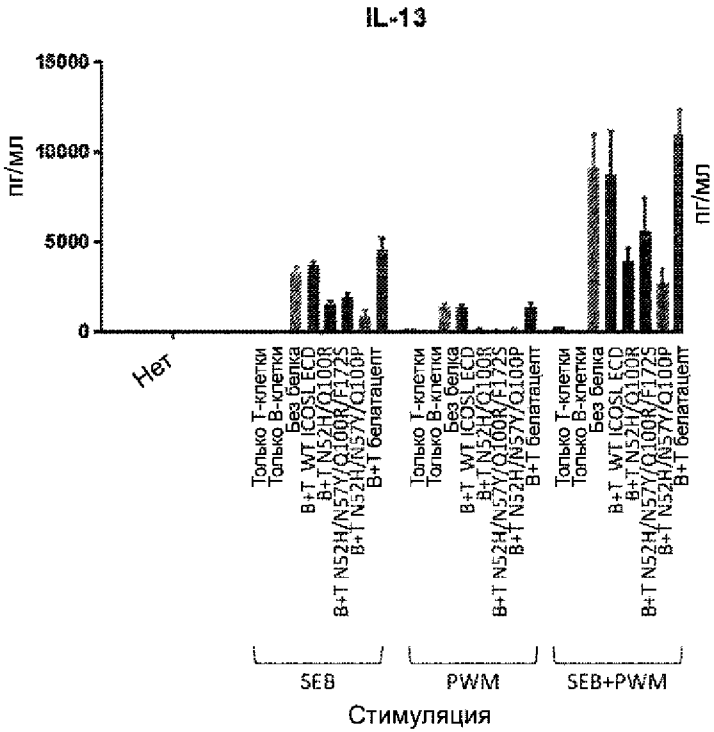
Фиг. 6A


делящихся B-клеток
Количество
10000
8000
6000
4000
2000
0
Только T-клетки
Только B-клетки
Без белка
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T белатацепт
Нет
SEB
PWM
SEB+PWM
Стимуляция

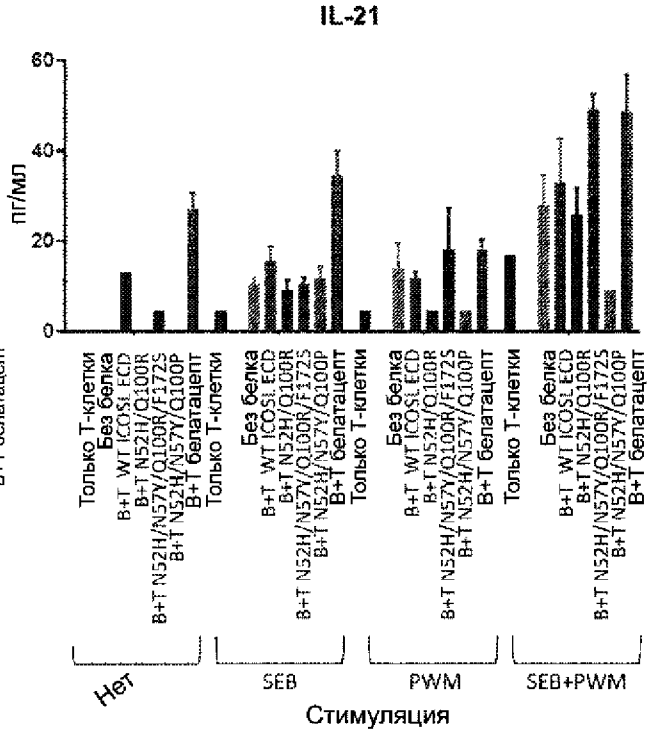
Фиг. 6B


IL-5
пг/мл
3000
2000
1000
0
Нет
Только T-клетки
Только B-клетки
Без белка
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T белатацепт
SEB
PWM
SEB+PWM
Стимуляция

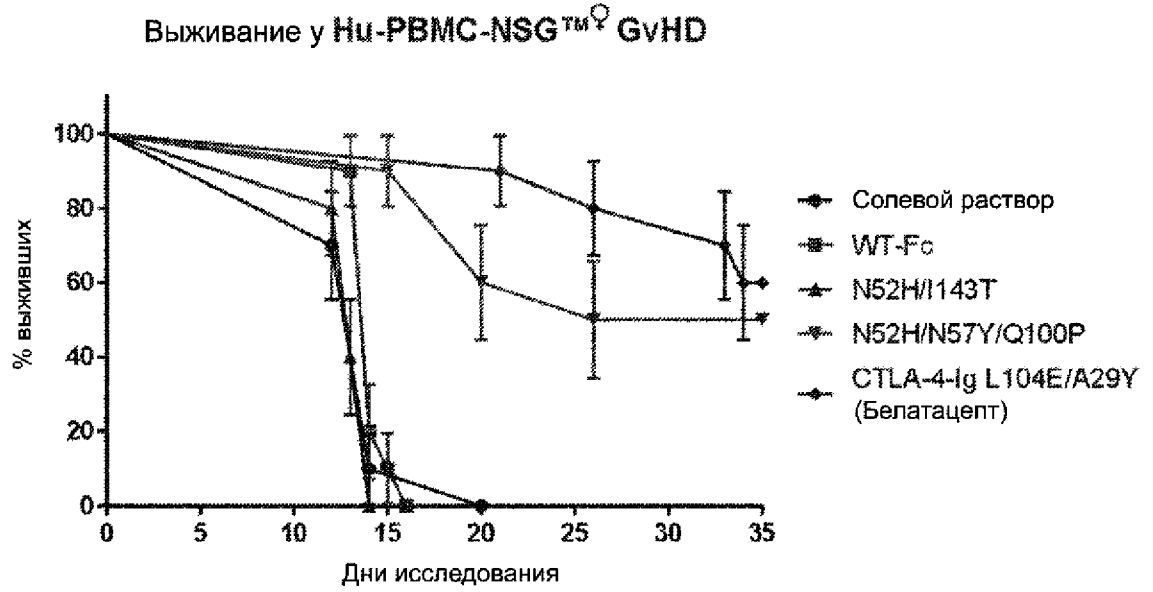
Фиг. 6C


IL-13
пг/мл
15000
10000
5000
0
Нет
Только Т-клетки
Только В-клетки
Без белка
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T белатацепт
SEB
PWM
SEB+PWM
Стимуляция

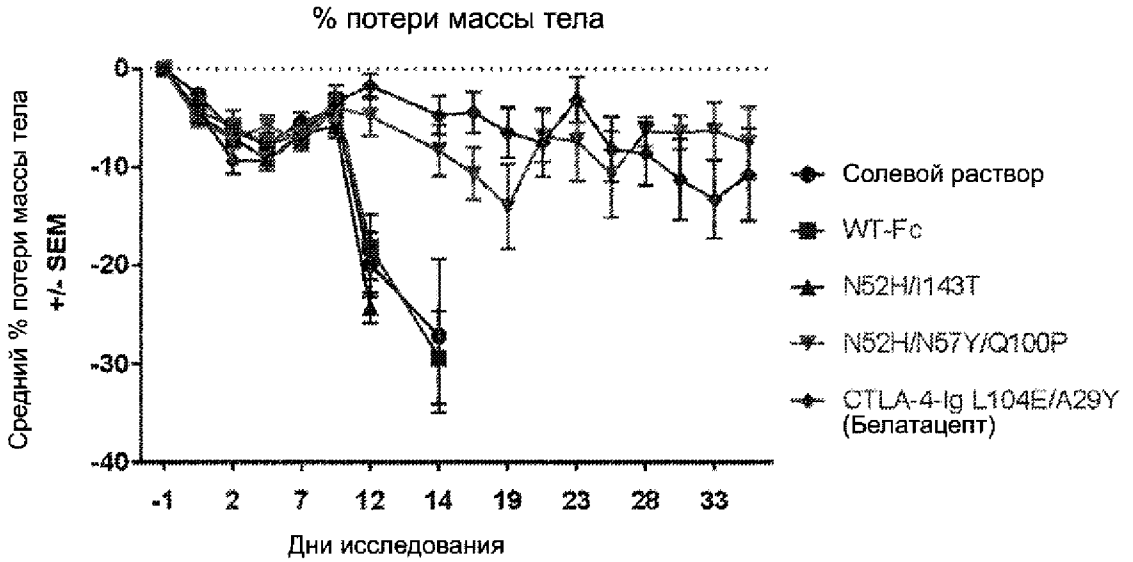
Фиг. 6D


IL-21
пг/мл
60
40
20
0
Нет
Только Т-клетки
Без белка
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T белатацепт
SEB
PWM
SEB+PWM
Стимуляция

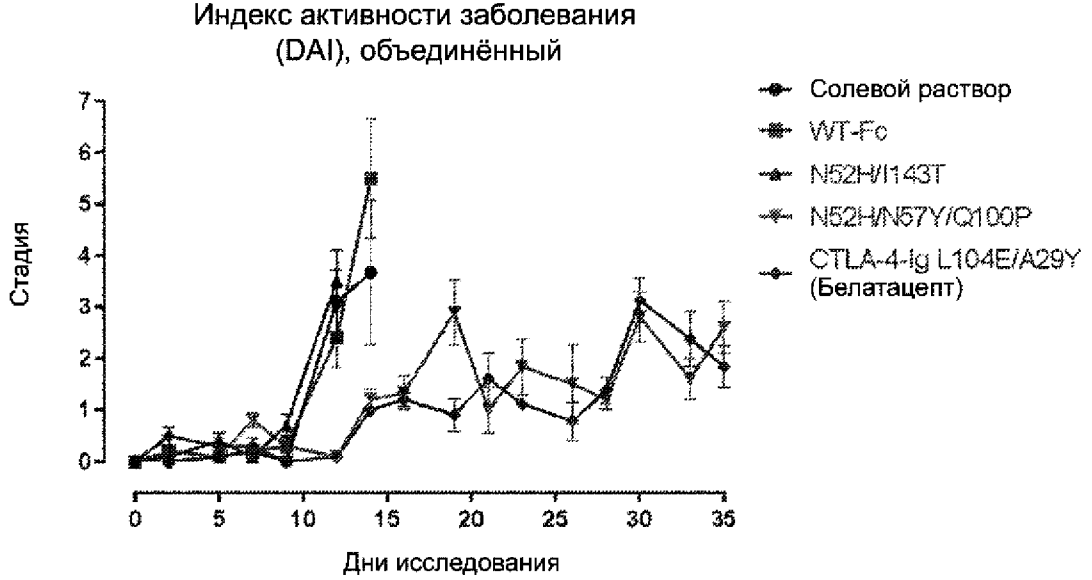
Фиг. 7A


Выживание у Hu-PBMC-NSG™♀ GvHD
% выживших
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Дни исследования
Солевой раствор
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(Белатацепт)

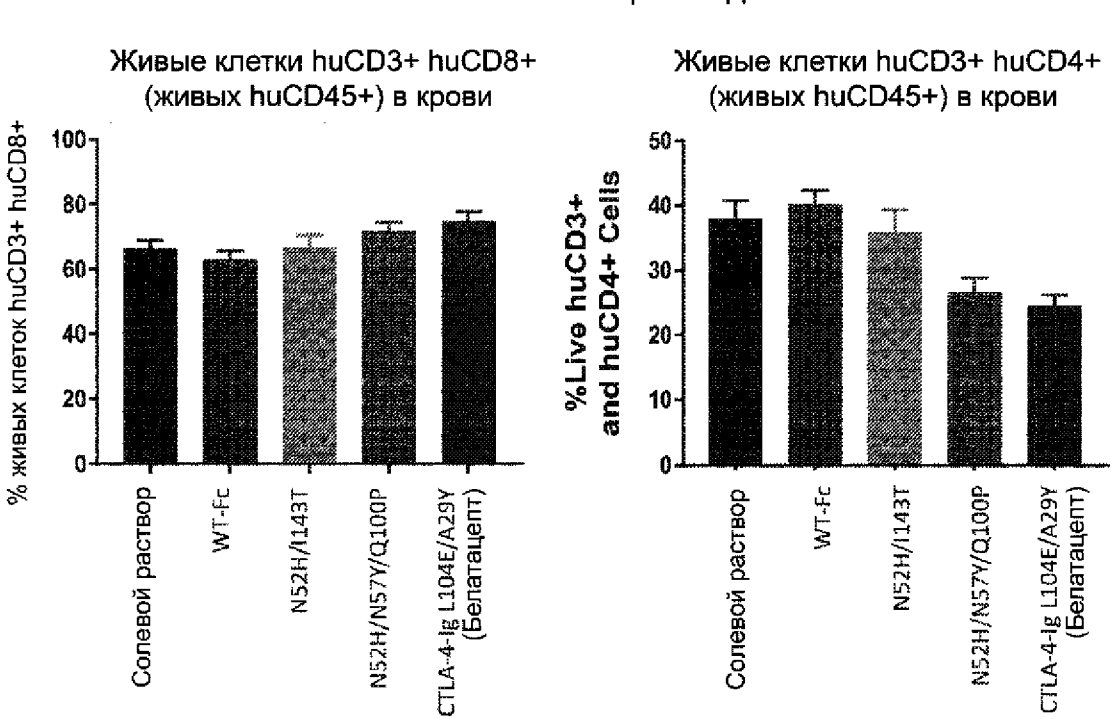
Фиг. 7B


% потери массы тела
Средний % потери массы тела
+/- SEM
0
-10
-20
-30
-40
-1
2
7
12
14
19
23
28
33
Дни исследования
Солевой раствор
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(Белатацепт)

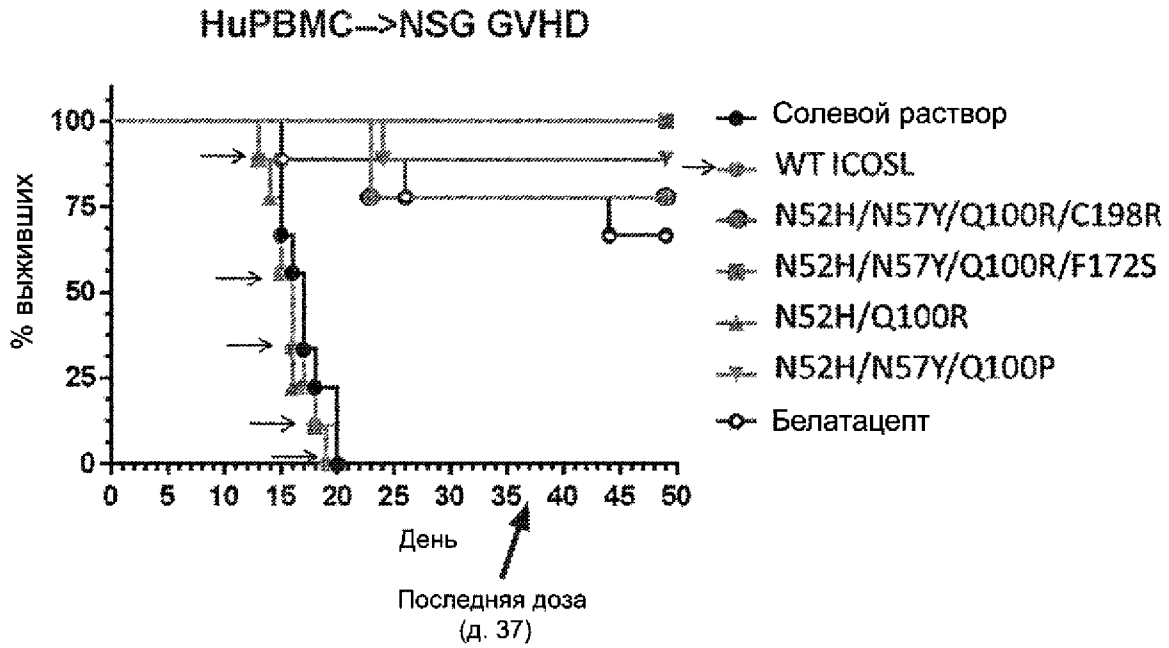
Фиг. 7C


Индекс активности заболевания
(DAI), объединённый
Стадия
0
1
2
3
4
5
6
7
0
5
10
15
20
25
30
35
Дни исследования
Солевой раствор
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(Белатацепт)

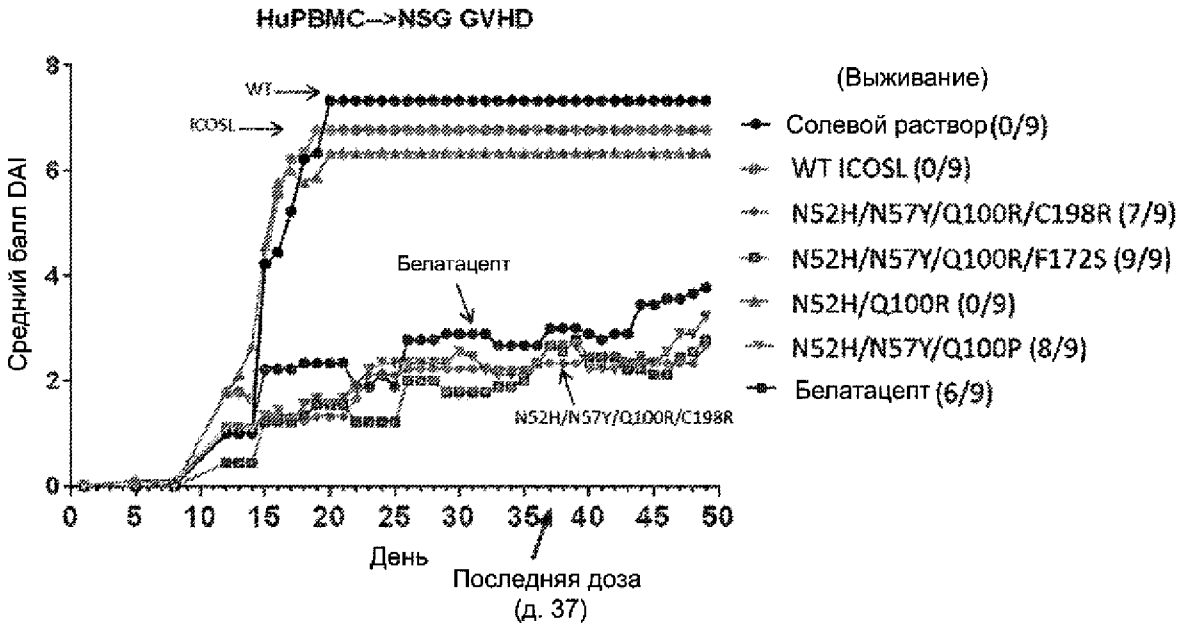
Фиг. 7D


% Т-клеток человека в крови в День 14
Живые клетки huCD3+ huCD8+ (живых huCD45+) в крови
% живых клеток huCD3+ huCD8+
100
80
60
40
20
0
Солевой раствор
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (Белатацепт)
Живые клетки huCD3+ huCD4+ (живых huCD45+) в крови
%Live huCD3+ and huCD4+ Cells
50
40
30
20
10
0
Солевой раствор
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (Белатацепт)

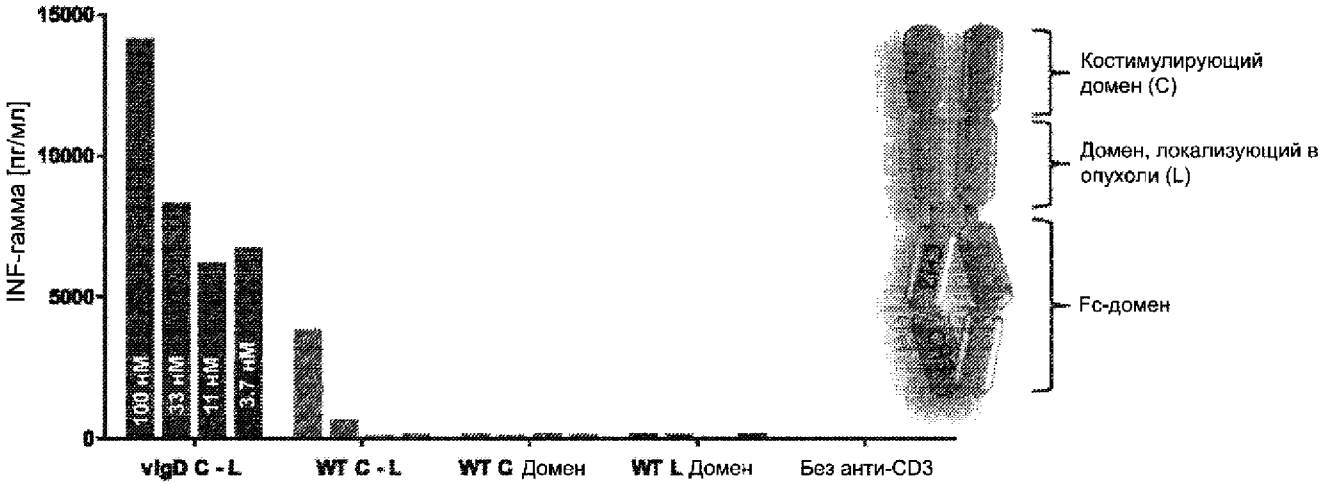
Фиг. 7E


HuPBMC->NSG GVHD
% выживших
100
75
50
25
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
День
Последняя доза
(д. 37)
Солевой раствор
WT ICOSL
N52H/N57Y/Q100R/C198R
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100P
Белатацепт

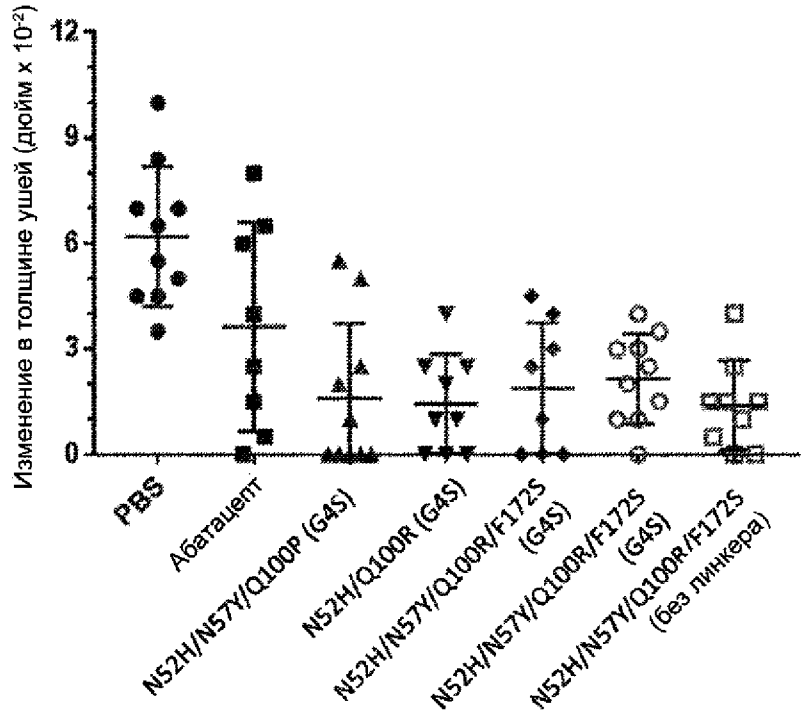
Фиг. 7F


HuPBMC—>NSG GVHD
Средний балл DAI
0
2
4
6
8
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
День
WT
ICOSL
Белатацепт
N52H/N57Y/Q100R/C198R
Последняя доза
(д. 37)
(Выживание)
Солевой раствор (0/9)
WT ICOSL (0/9)
N52H/N57Y/Q100R/C198R (7/9)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (9/9)
N52H/Q100R (0/9)
N52H/N57Y/Q100P (8/9)
Белатацепт (6/9)

Фиг. 8


15000
10000
5000
0
INF-гамма [пг/мл]
100 нМ
33 нМ
11 нМ
3,7 нМ
vIgD C - L
WT C - L
WT C Домен
WT L Домен
Без анти-CD3
Костимулирующий домен (C)
Домен, локализующий в опухоли (L)
Fc-домен

Фиг. 9


Изменение в толщине ушей (дюйм x 10-2)
12
9
6
3
0
PBS
Абатацепт
N52H/N57Y/Q100P (G4S)
N52H/Q100R (G4S)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (без пинкера)

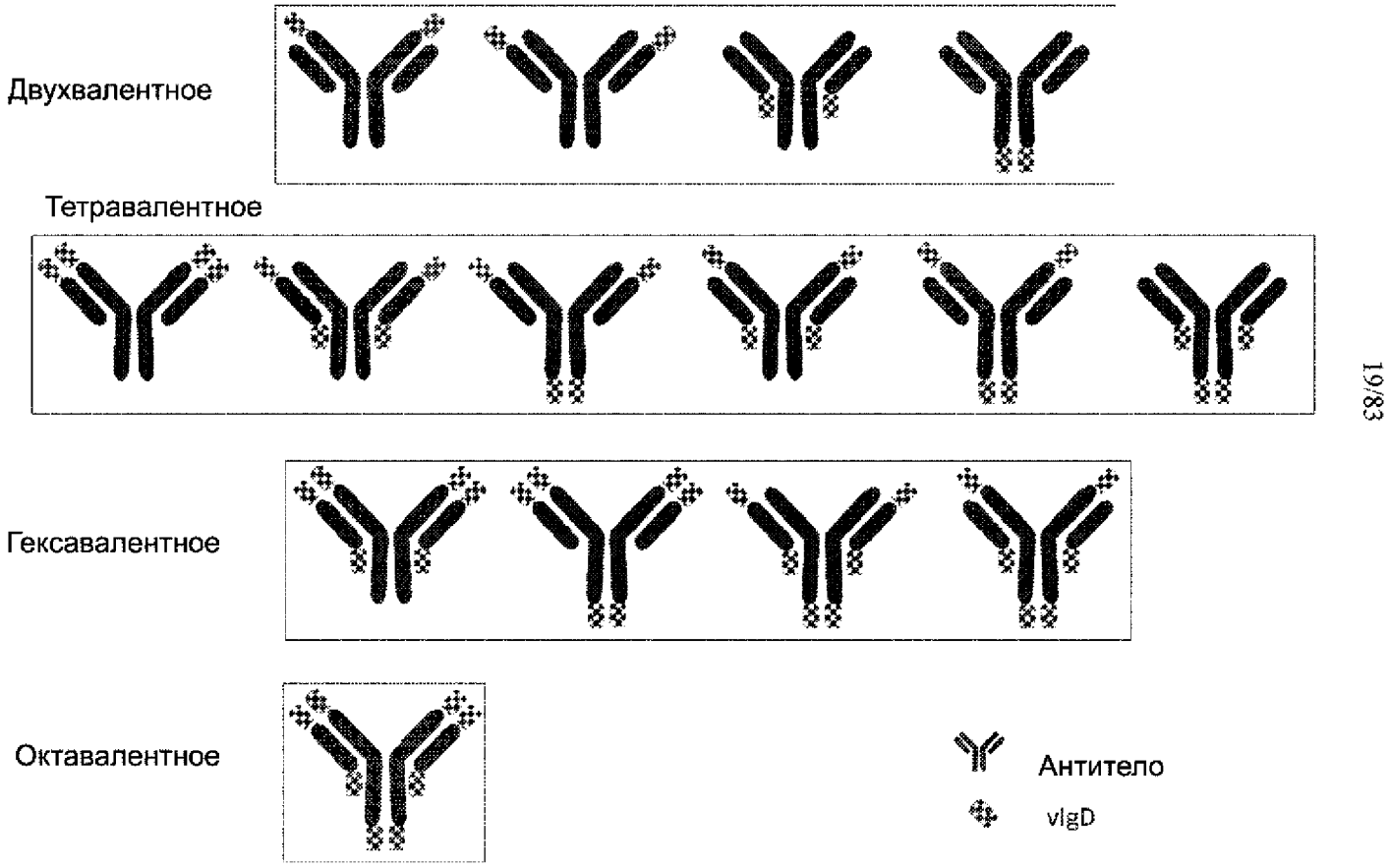
Фиг. 10A



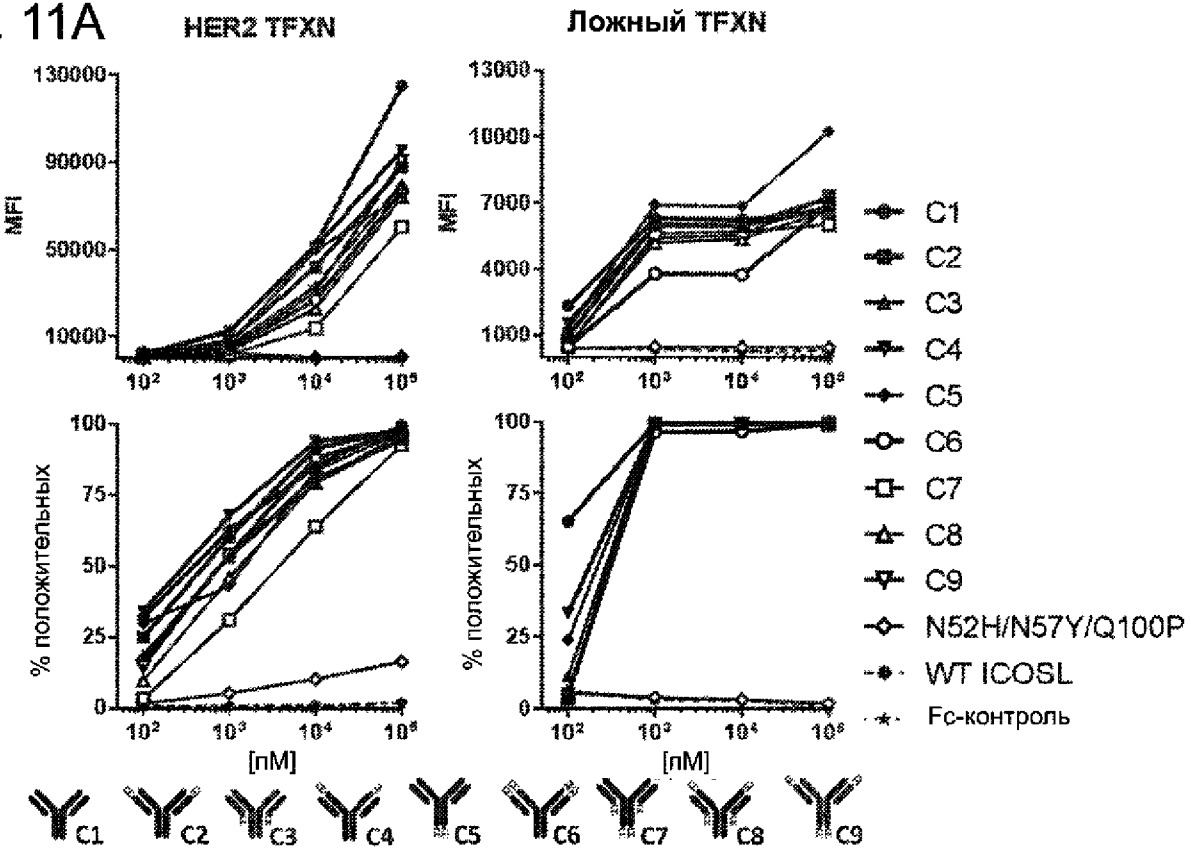
Фиг. 10B



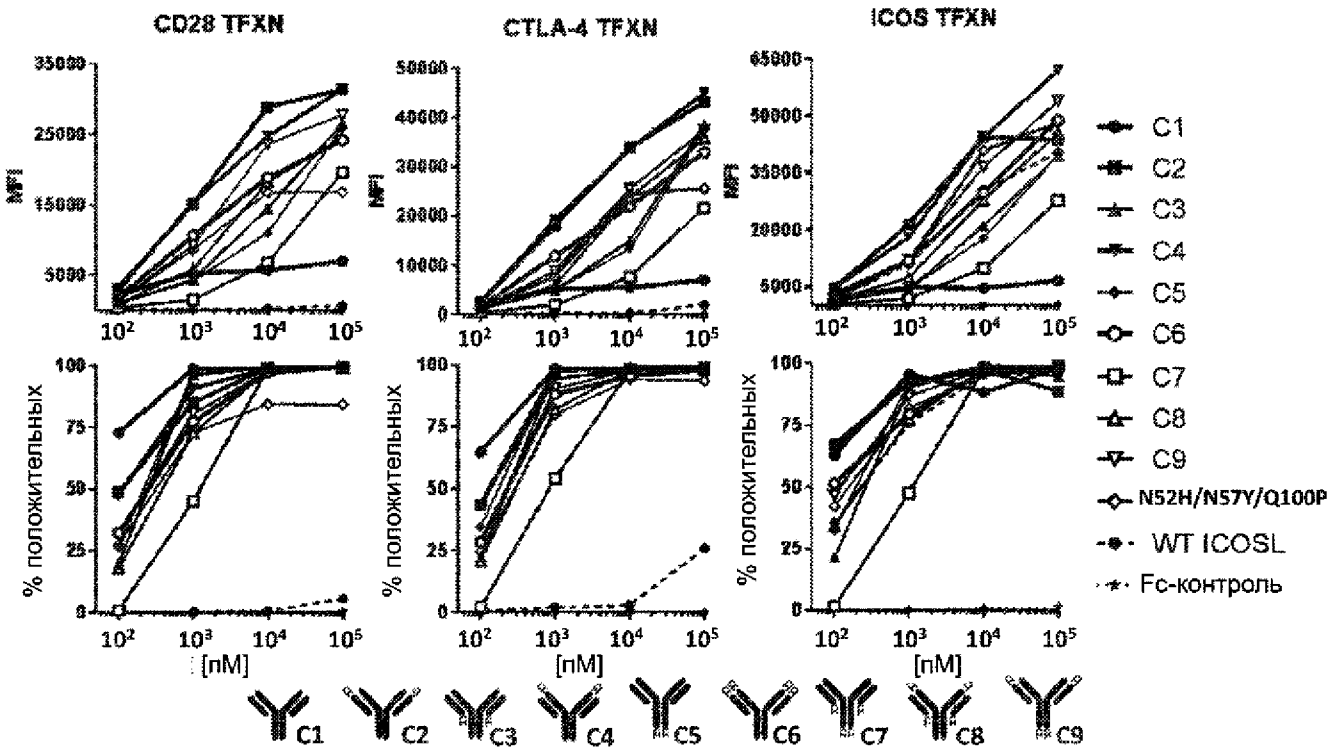
Фиг. 10C


Двухвалентное
Тетравалентное
Гексавалентное
Октавалентное
Антитело
vIgD

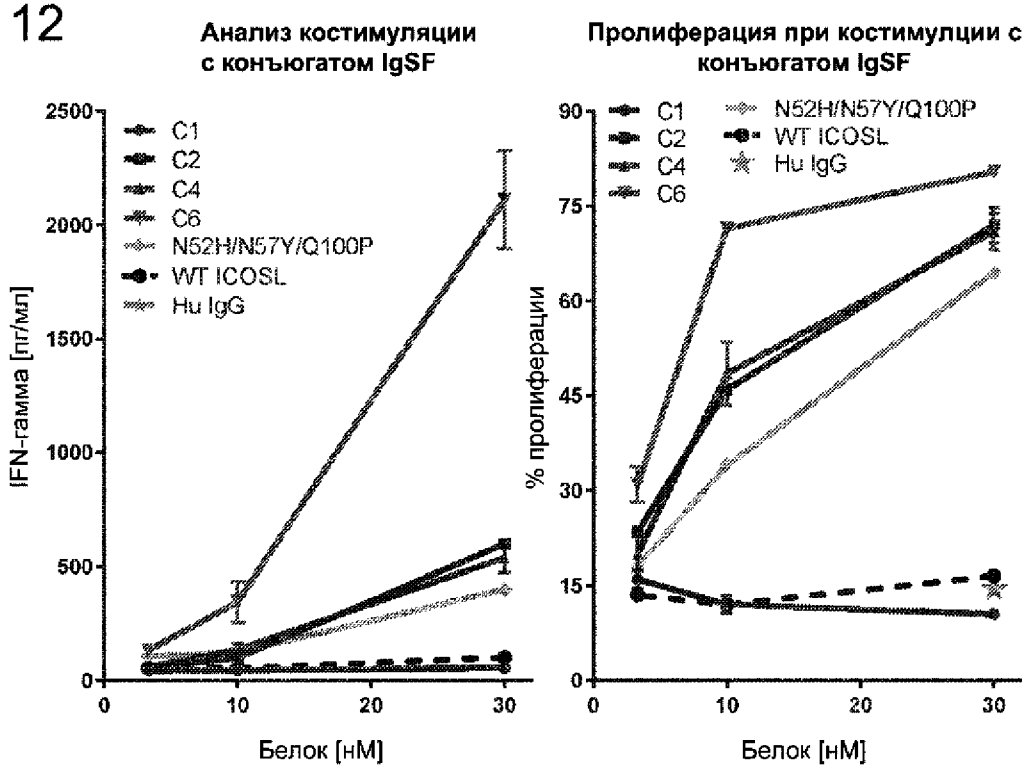
Фиг. 11A


HER2 TFXN
Ложный TFXN
MFI
% положительных
[nM]
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
N52H/N57Y/Q100P
WT ICOSL
Fc-контроль

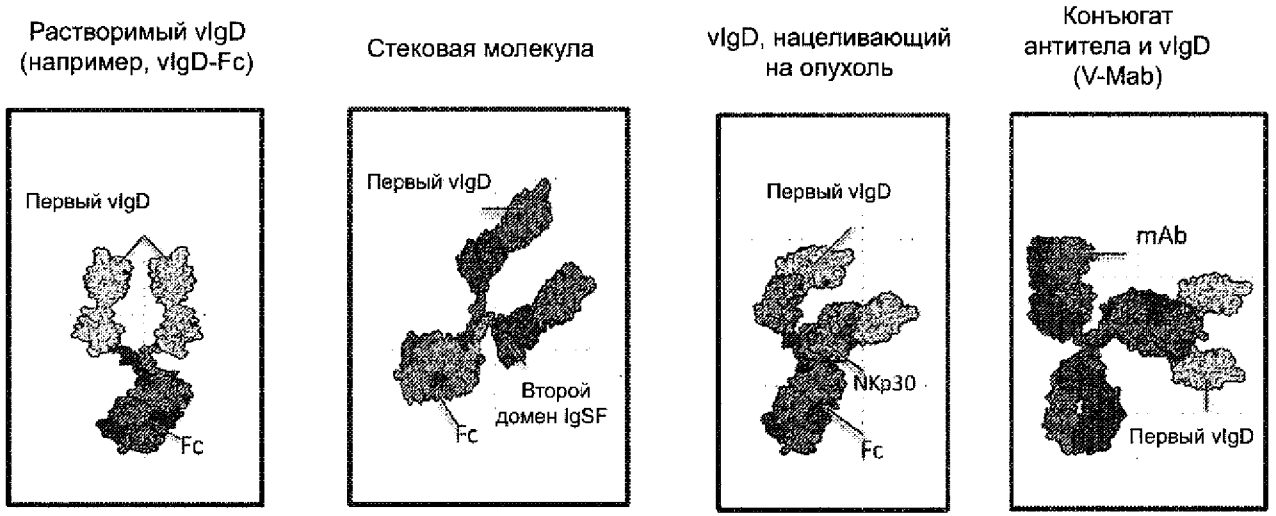
Фиг. 11B


CD28 TFXN
CTLA-4 TFXN
ICOS TFXN
MFI
% положительных
[nM]
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
N52H/N57Y/Q100P
WT ICOSL
Fc-контроль

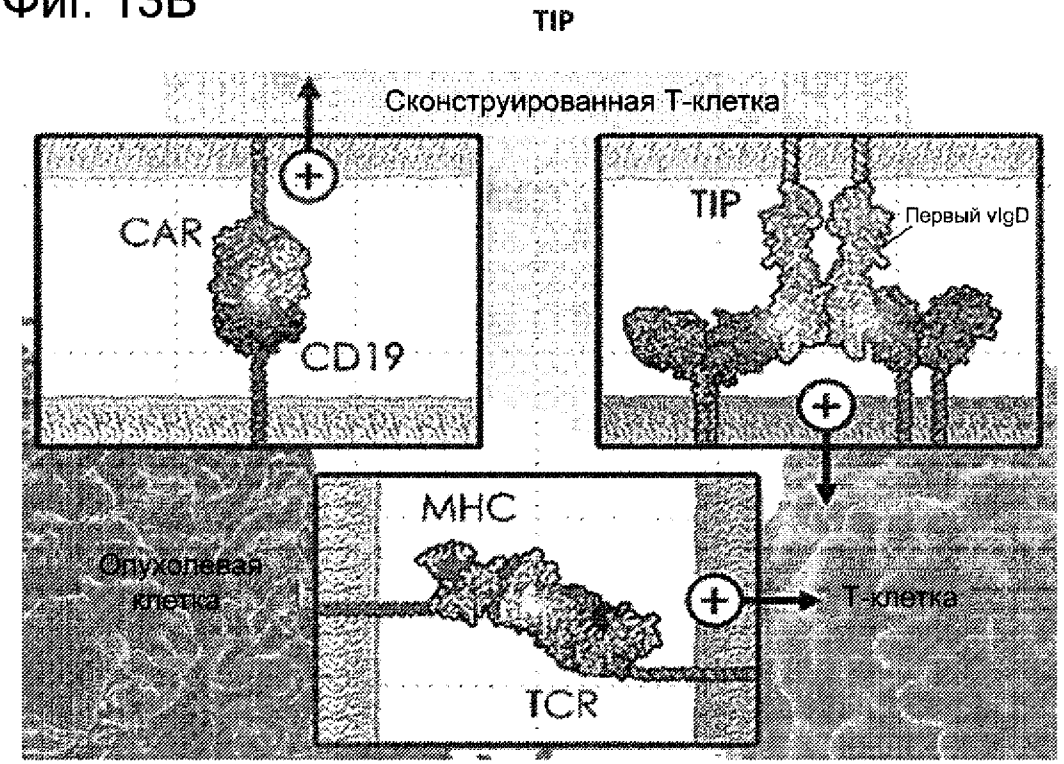
Фиг. 12


Анализ костимуляции с конъюгатом IgSF
IFN-гамма [пг/мл]
2500
2000
1500
1000
500
0
C1
C2
C4
C6
N52H/N57Y/Q100P
WT ICOSL
Hu IgG
0
10
20
30
Белок [нМ]
Пролиферация при костимулции с конъюгатом IgSF
% пролиферации
90
75
60
45
30
15
0
C1
C2
C4
C6
N52H/N57Y/Q100P
WT ICOSL
Hu IgG
0
10
20
30
Белок [нМ]

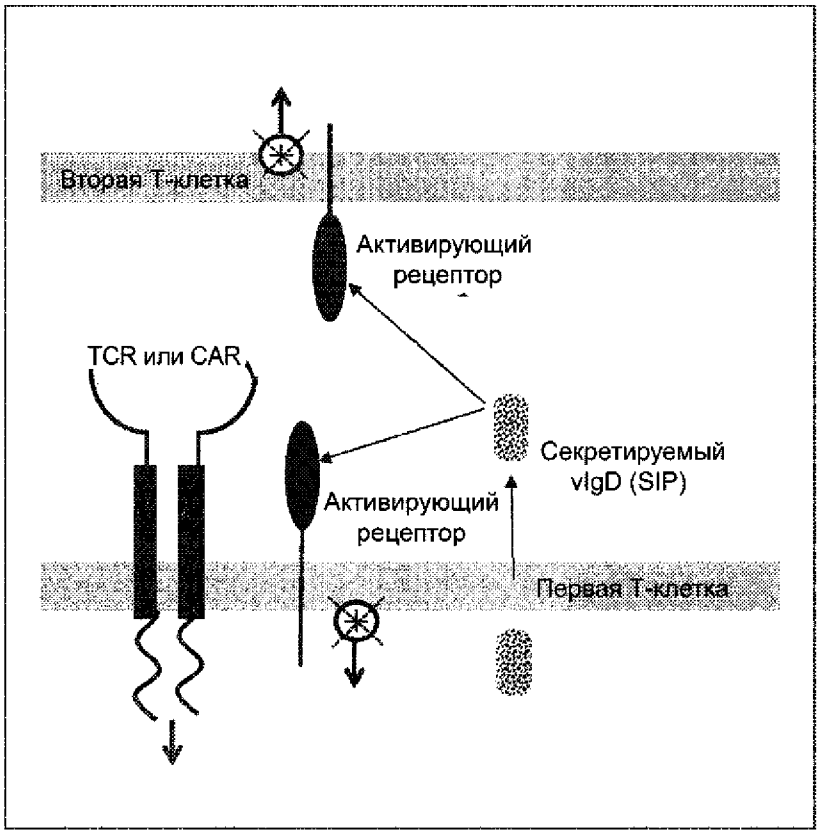
Фиг. 13A


Растворимый vIgD
(например, vIgD-Fc)
Первый vIgD
Fc
Стековая молекула
Первый vIgD
Второй
домен IgSF
Fc
vIgD, нацеливающий
на опухоль
Первый vIgD
NKp30
Fc
Конъюгат
антитела и vIgD
(V-Mab)
mAb
Первый vIgD

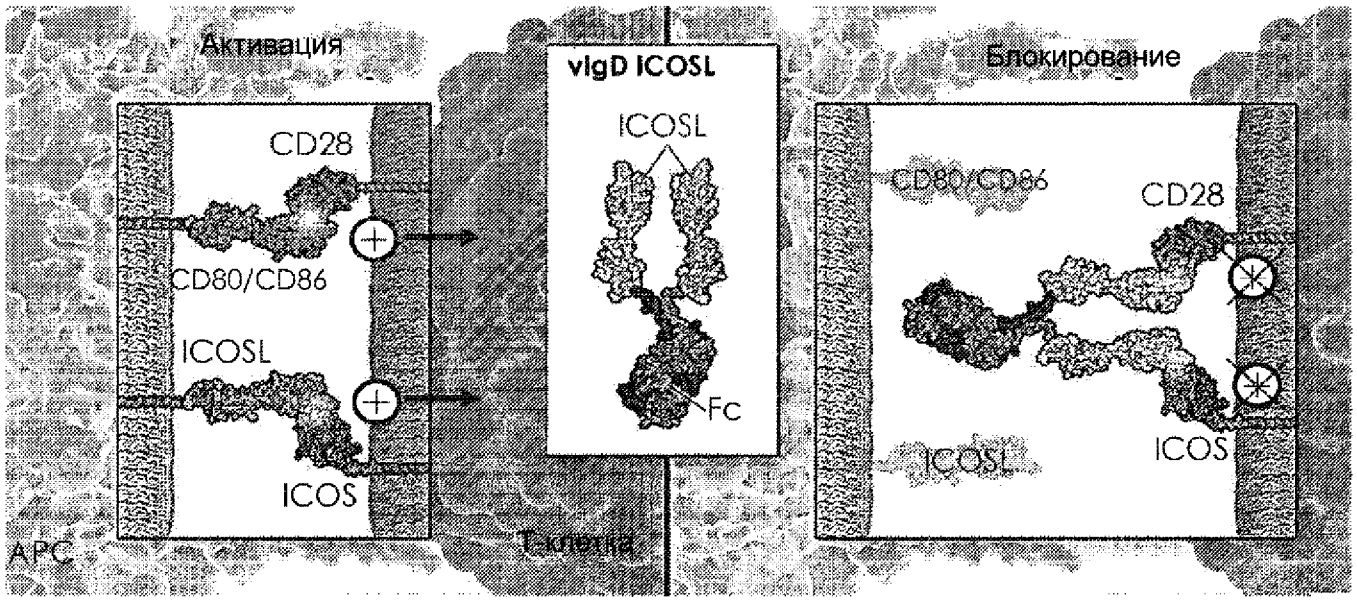
Фиг. 13B


TIP
Сконструированная Т-клетка
CAR
CD19
TIP
Первый vIgD
MHC
Опухолевая клетка
Т-клетка
TCR

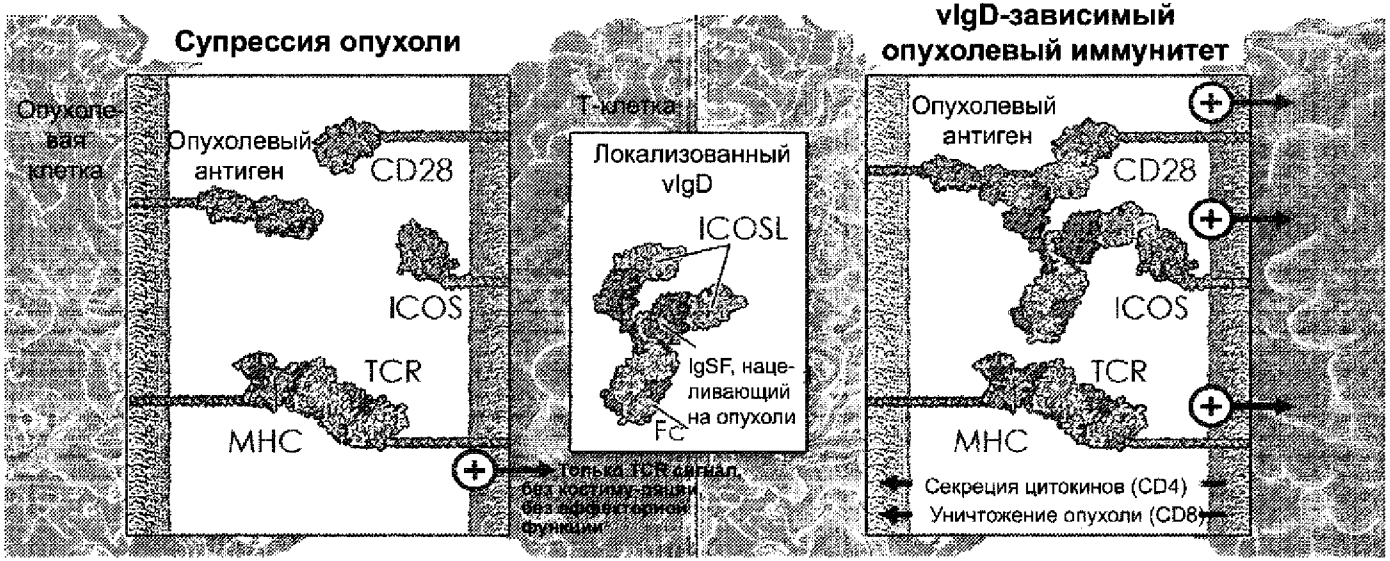
Фиг. 13C


Вторая Т-клетка
Активирующий рецептор
TCR или CAR
Секретируемый vIgD (SIP)
Активирующий рецептор
Первая Т-клетка

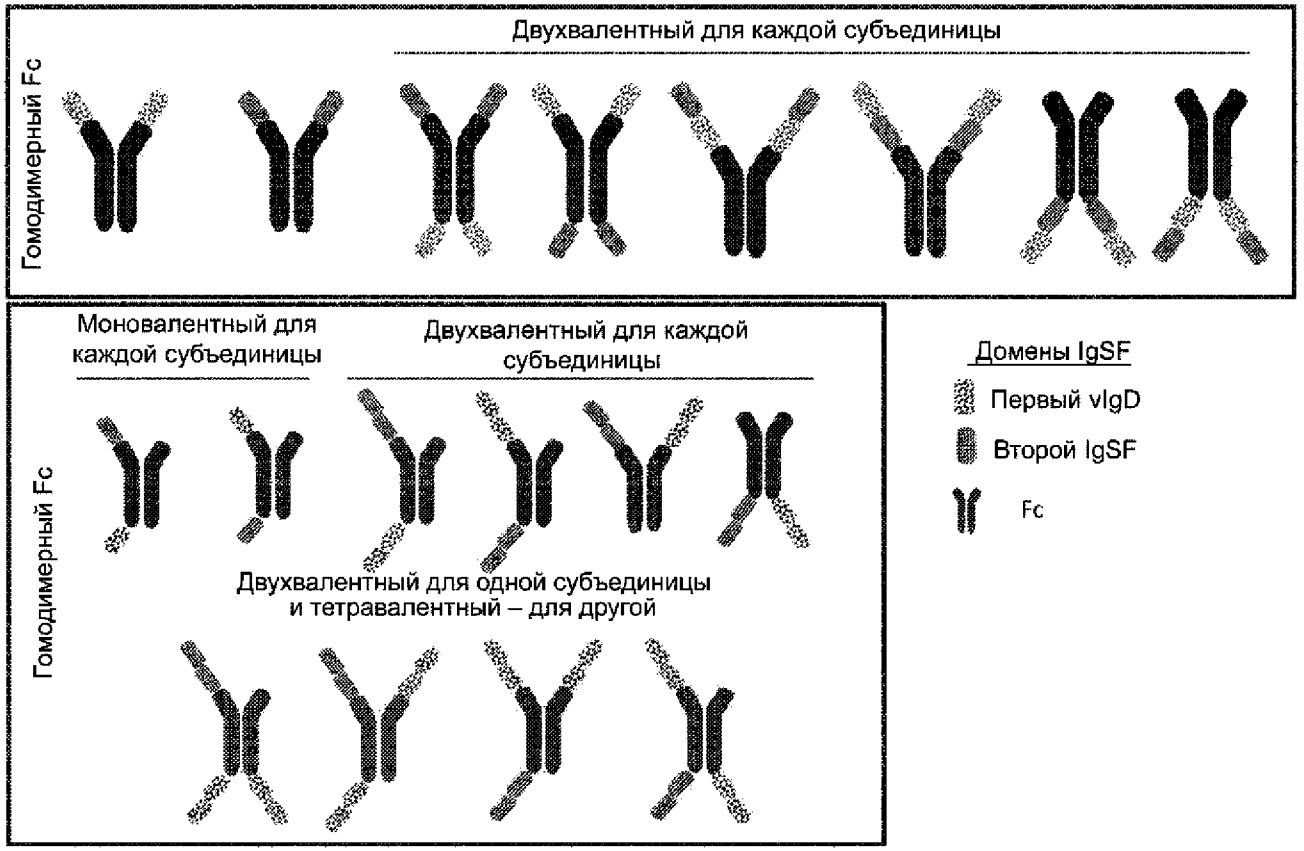
Фиг. 14


Активация
vIgD ICOSL
Блокирование
CD28
ICOSL
CD80/CD86
CD80/CD86
CD28
ICOSL
Fc
ICOSL
ICOS
ICOS
APC
Т-клетка

Фиг. 15


Супрессия опухоли
vIgD-зависимый опухолевый иммунитет
Опухоле-вая клетка
Опухолевый антиген
CD28
ICOS
TCR
MHC
Т-клетка
Локализованный vIgD
ICOSL
IgSF, нацеливающий на опухоли
Fc
Только TCR сигнал, без костимуляции, без эффекторной функции
Опухолевый антиген
CD28
ICOS
TCR
MHC
Секреция цитокинов (CD4)
Уничтожение опухоли (CD8)

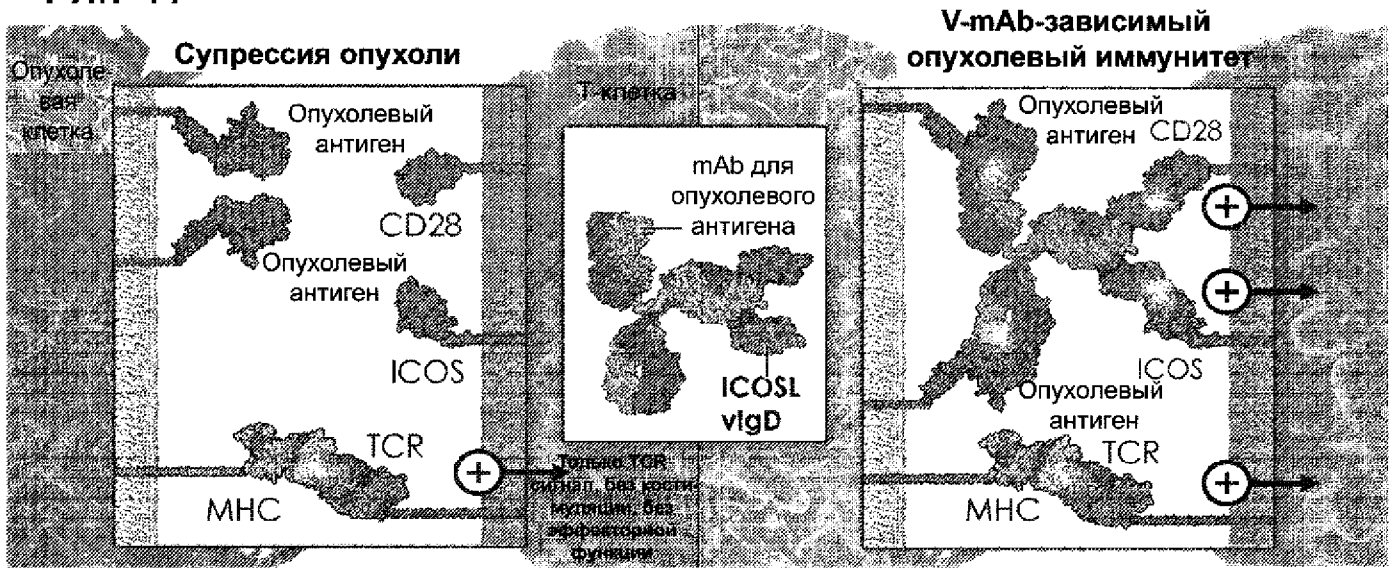
Фиг. 16A


Двухвалентный для каждой субъединицы
Гомодимерный Fc
Моновалентный для каждой субъединицы
Двухвалентный для каждой субъединицы
Гомодимерный Fc
Двухвалентный для одной субъединицы и тетравалентный – для другой
Домены IgSF
Первый vIgD
Второй IgSF
Fc

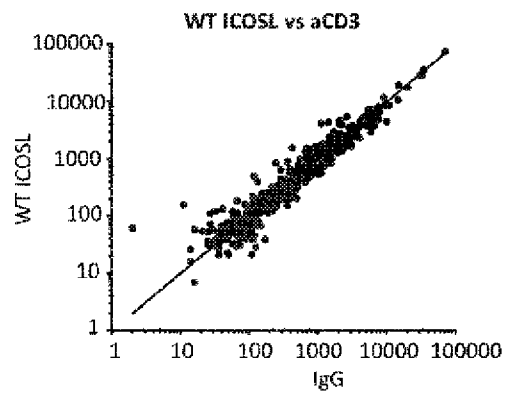
Фиг. 16B

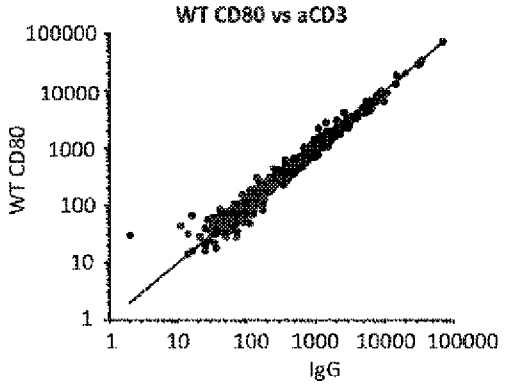

Гомодимерный Fc
Двухвалентный для каждой субъединицы
Домены IgSF
Первый vIgD
Второй IgSF
Третий IgSF
Fc

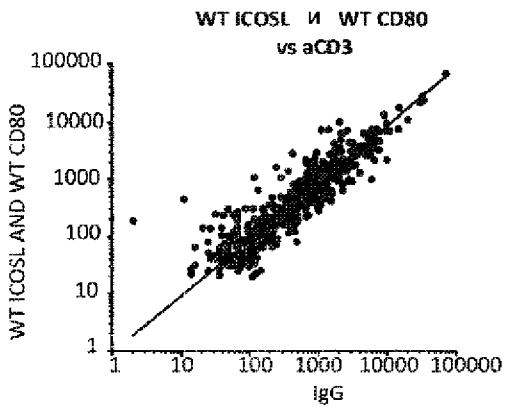
Фиг. 17

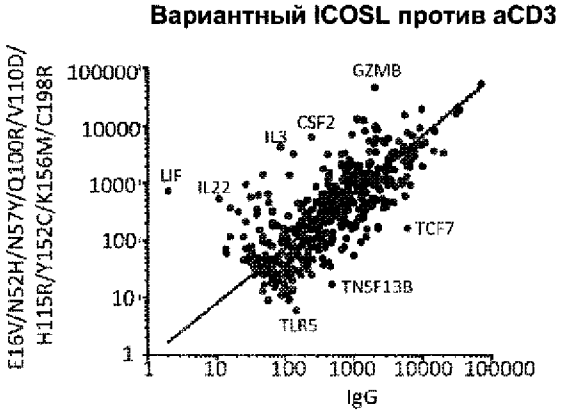

Супрессия опухоли
V-mAb-зависимый опухолевый иммунитет
Опухолевая клетка
Опухолевый антиген
CD28
Опухолевый антиген
ICOS
TCR
MHC
Т-клетка
mAb для опухолевого антигена
ICOSL vIgD
Только TCR сигнал, без костим. мутеинов, без эффекторной функции
Опухолевый антиген
CD28
ICOS
Опухолевый антиген
TCR
MHC

Фиг. 18

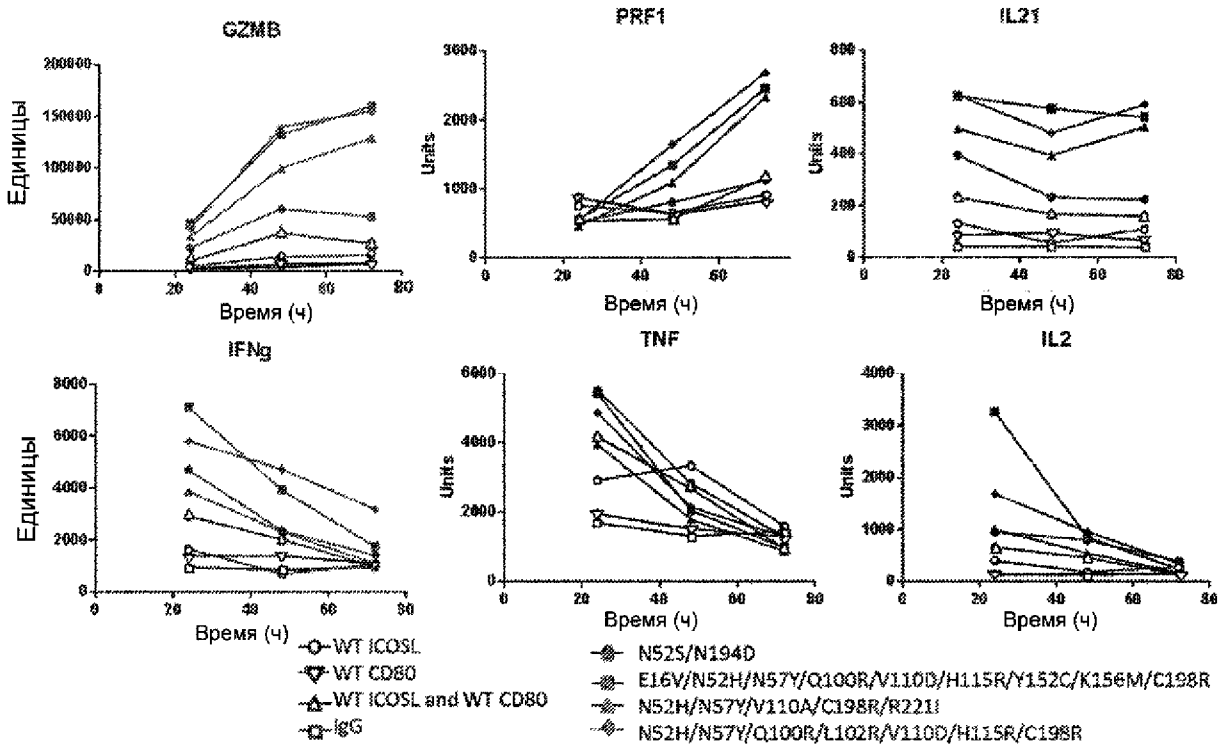

WT ICOSL vs aCD3
WT ICOSL
IgG
100000
10000
1000
100
10
1
1
10
100
1000
10000
100000


WT CD80 vs aCD3
WT CD80
IgG
100000
10000
1000
100
10
1
1
10
100
1000
10000
100000

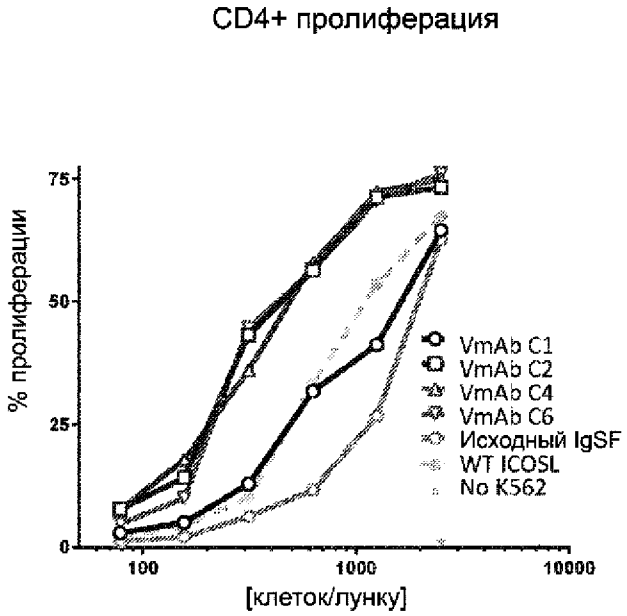

WT ICOSL и WT CD80
vs aCD3
WT ICOSL AND WT CD80
IgG
100000
10000
1000
100
10
1
1
10
100
1000
10000
100000

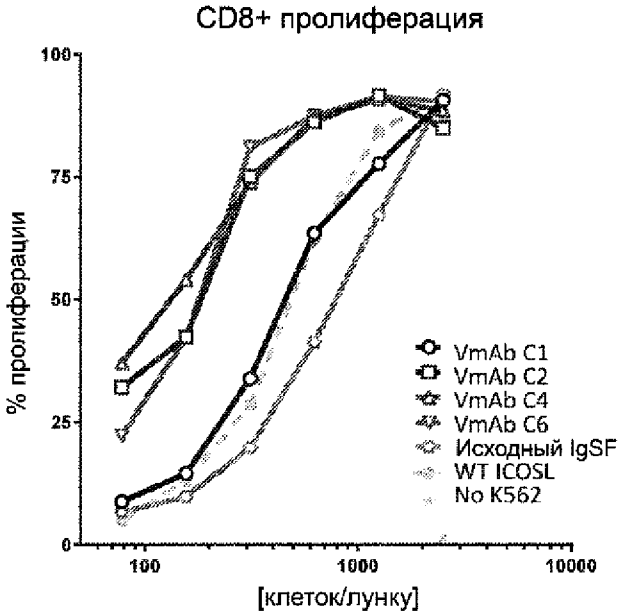

Вариантный ICOSL против aCD3
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/
H115R/Y152C/K156M/C198R
IgG
GZMB
CSF2
IL3
LIF
IL22
TCF7
TNSF13B
TLR5
100000
10000
1000
100
10
1
1
10
100
1000
10000
100000

Фиг. 19

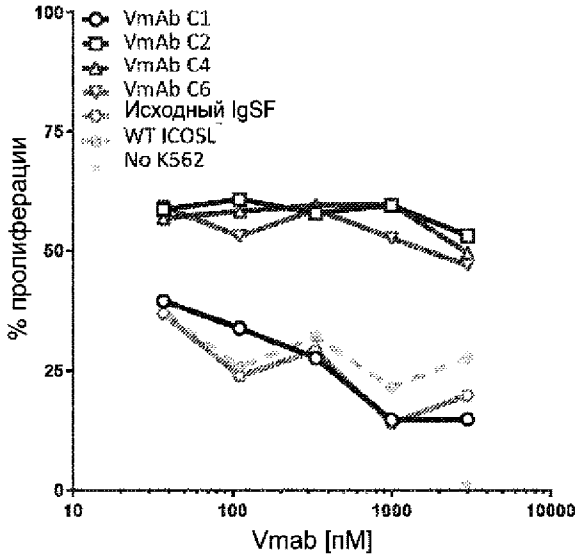

GZMB
PRF1
IL21
IFNg
TNF
IL2
Единицы
Units
Время (ч)
WT ICOSL
WT CD80
WT ICOSL and WT CD80
IgG
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R

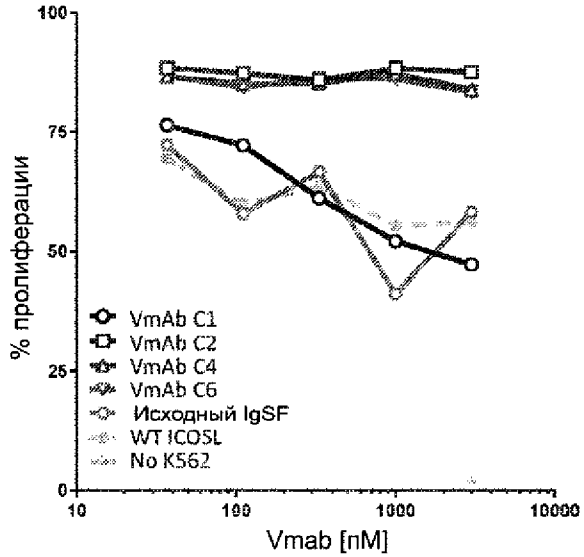
Фиг. 20A


CD4+ пролиферация
% пролиферации
75
50
25
0
100
1000
10000
[клеток/лунку]
VmAb C1
VmAb C2
VmAb C4
VmAb C6
Исходный IgSF
WT ICOSL
No K562

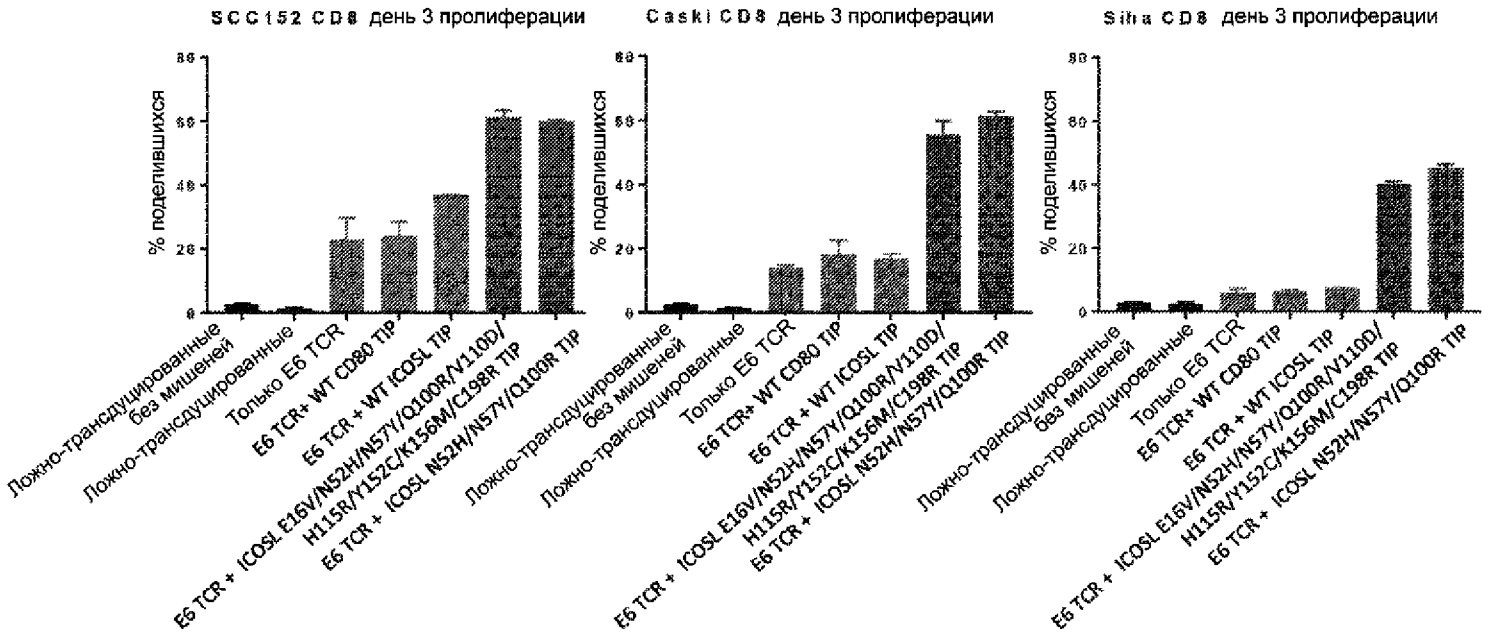

CD8+ пролиферация
% пролиферации
100
75
50
25
0
100
1000
10000
[клеток/лунку]
VmAb C1
VmAb C2
VmAb C4
VmAb C6
Исходный IgSF
WT ICOSL
No K562

Фиг. 20B

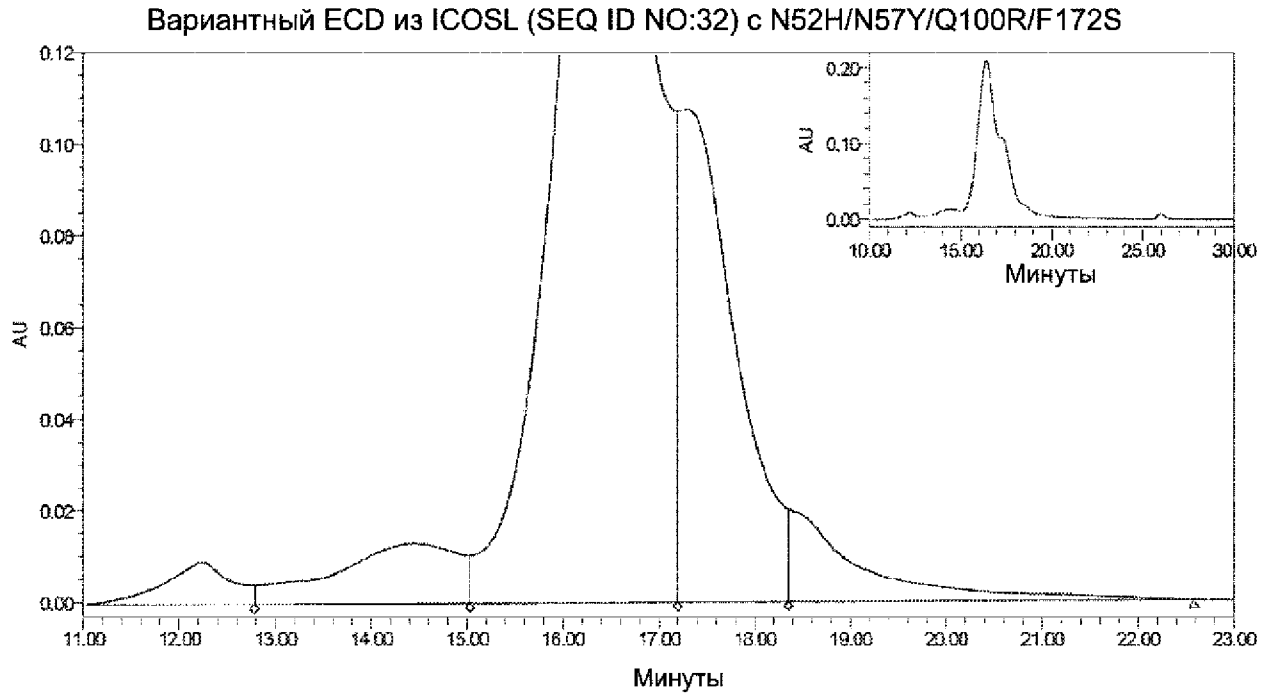

VmAb C1
VmAb C2
VmAb C4
VmAb C6
Исходный IgSF
WT ICOSL
No K562
% пролиферации
Vmab [nM]
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000


VmAb C1
VmAb C2
VmAb C4
VmAb C6
Исходный IgSF
WT ICOSL
No K562
% пролиферации
Vmab [nM]
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000

Фиг. 21

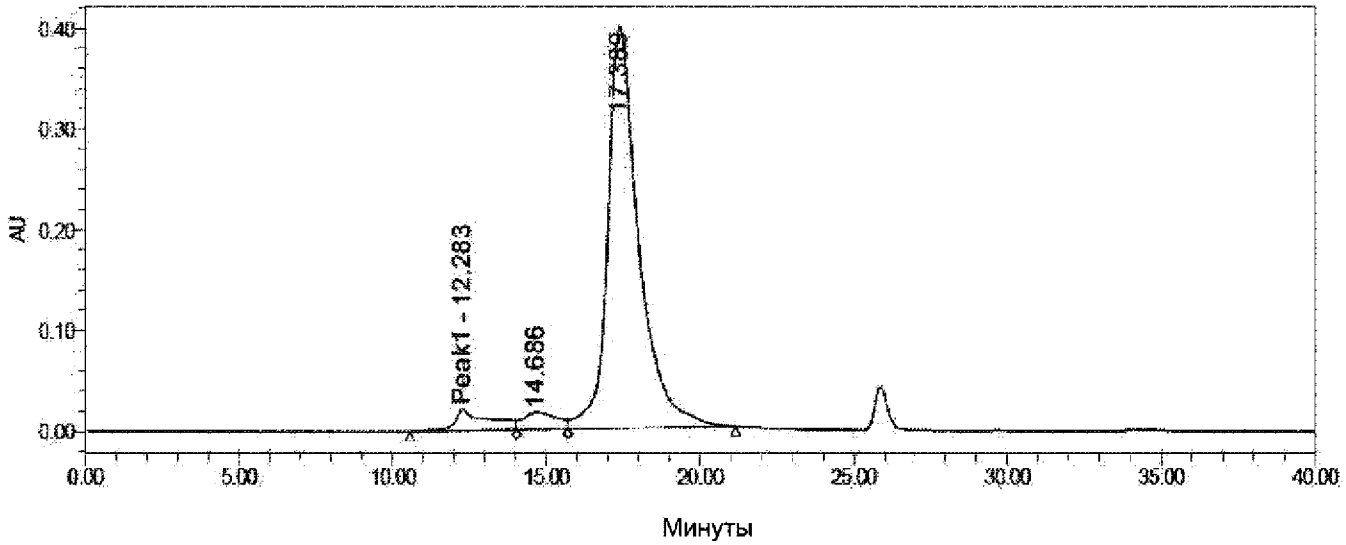

SCC152 CD8 день 3 пролиферации
Caski CD8 день 3 пролиферации
Siha CD8 день 3 пролиферации
% поделившихся
0
20
40
60
80
Ложно-трансдуцированные без мишеней
Ложно-трансдуцированные
Только E6 TCR
E6 TCR+ WT CD80 TIP
E6 TCR + WT ICOSL TIP
E6 TCR + ICOSL E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/ H115R/Y152C/K156M/C198R TIP
E6 TCR + ICOSL N52H/N57Y/Q100R TIP

Фиг. 22A

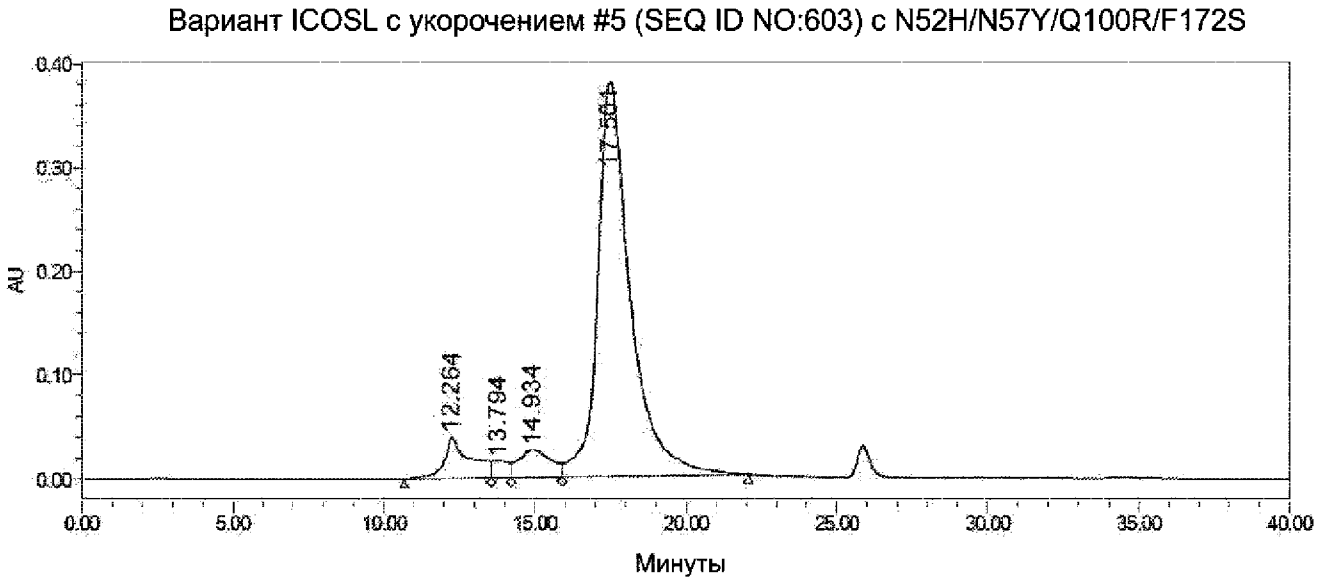

Вариантный ECD из ICOSL (SEQ ID NO:32) с N52H/N57Y/Q100R/F172S
AU
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
23.00
Минуты
AU
0.20
0.10
0.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
Минуты

Фиг. 22B

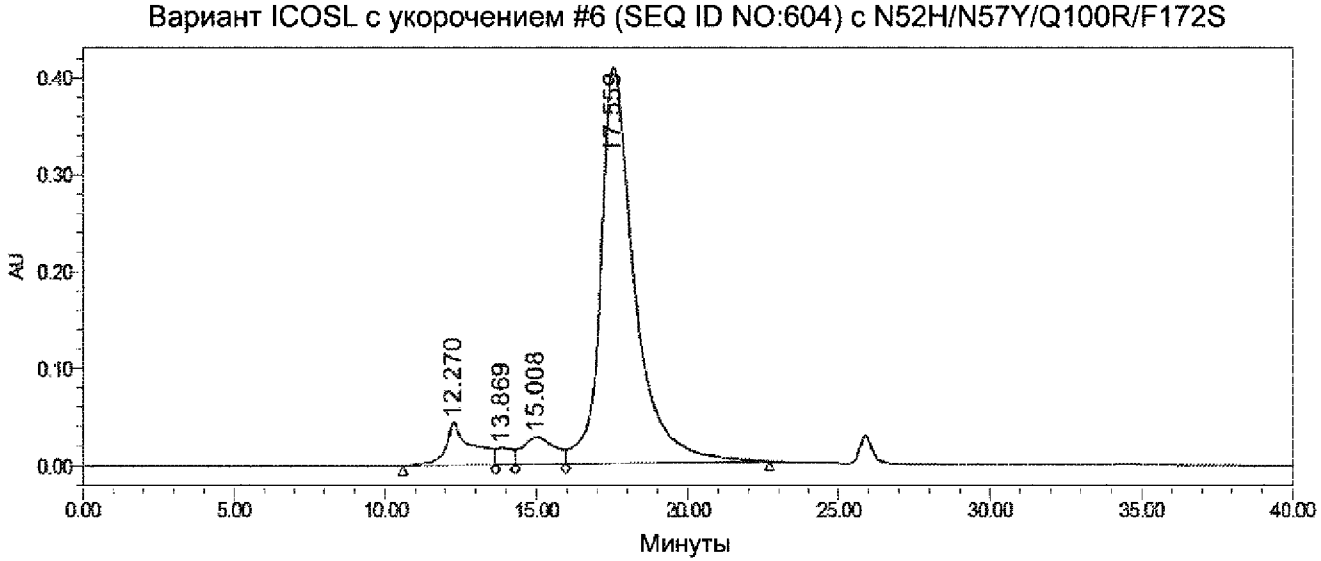
Вариант ICOSL с укорочением #4 (SEQ ID NO:602) с N52H/N57Y/Q100R/F172S



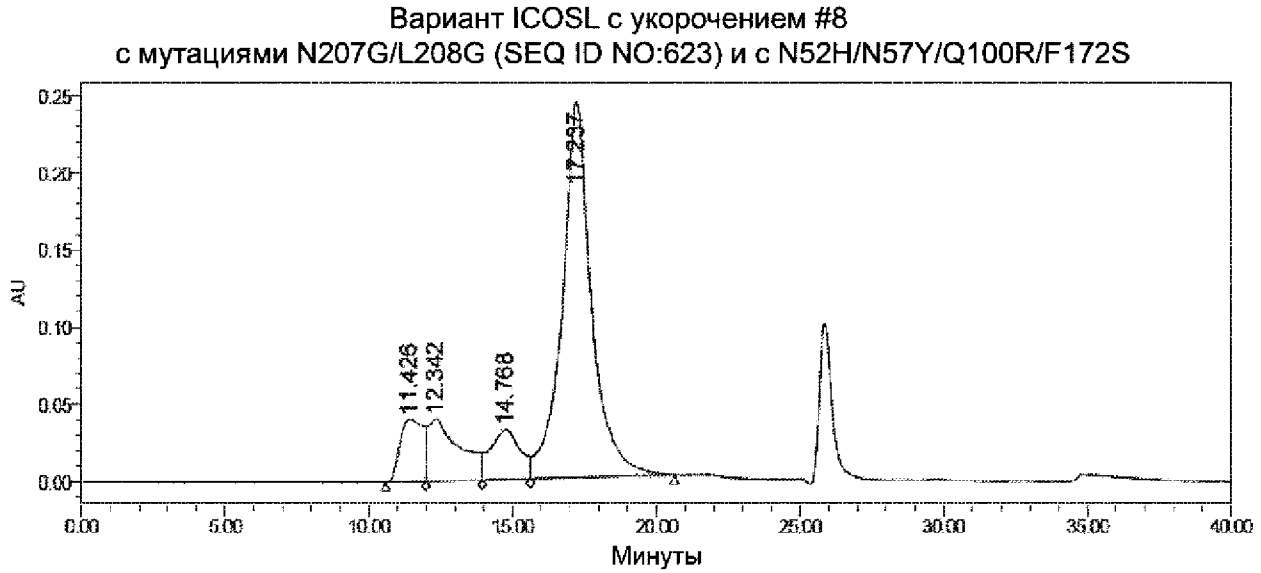
Фиг. 22C


Вариант ICOSL с укорочением #5 (SEQ ID NO:603) с N52H/N57Y/Q100R/F172S
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
12.264
13.794
14.934
17.501
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
Минуты

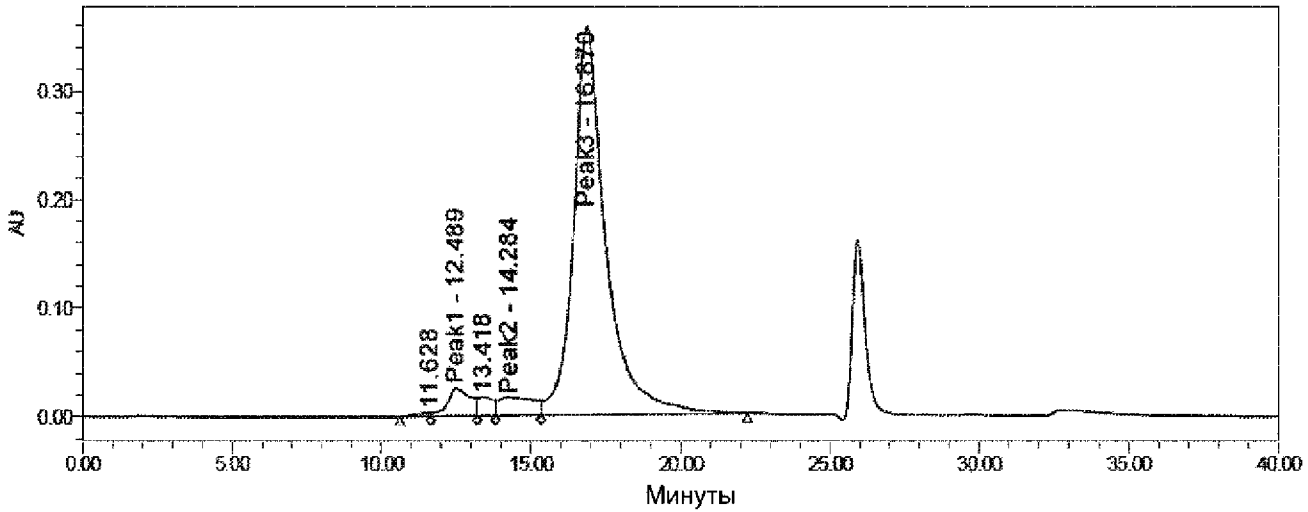
Фиг. 22D


Вариант ICOSL с укорочением #6 (SEQ ID NO:604) с N52H/N57Y/Q100R/F172S
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
12.270
13.869
15.008
17.559
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
Минуты

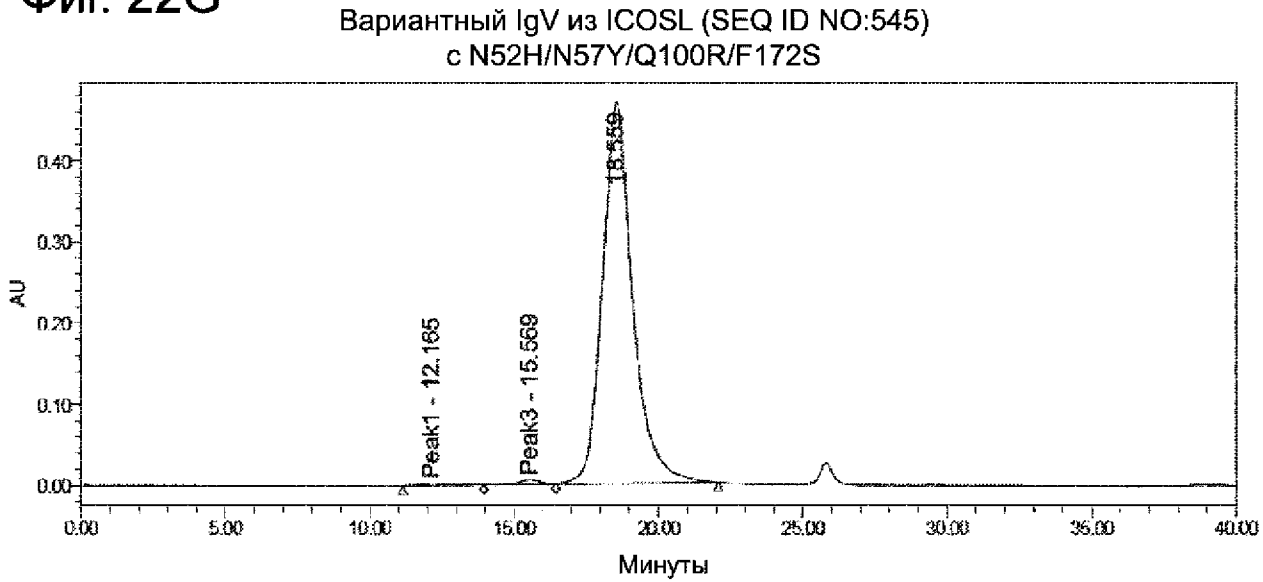
Фиг. 22E


Вариант ICOSL с укорочением #8
с мутациями N207G/L208G (SEQ ID NO:623) и с N52H/N57Y/Q100R/F172S
AU
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
11.428
12.342
14.768
17.237
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
Минуты

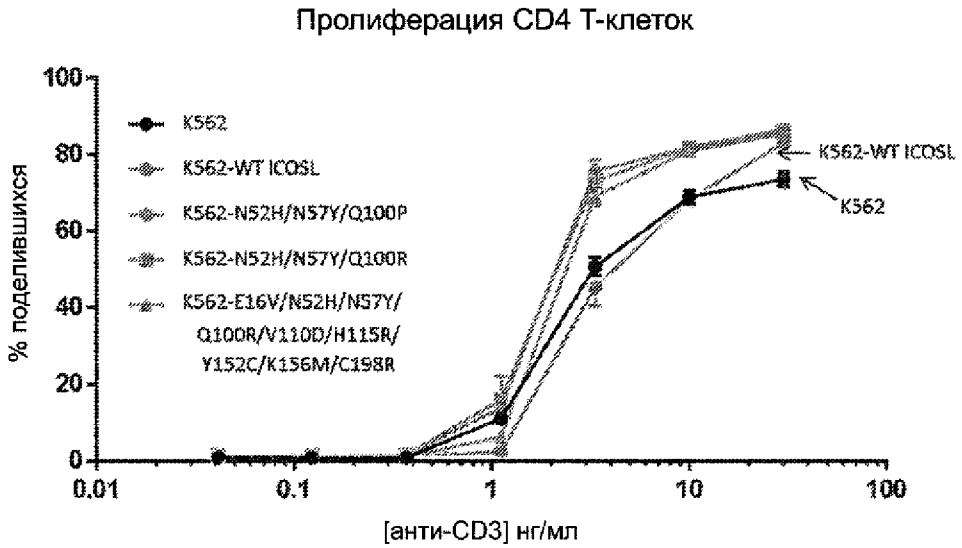
Фиг. 22F Вариантный ECD из ICOSL с мутациями N207G/L208G (SEQ ID NO:628) и с N52H/N57Y/Q100R/F172S



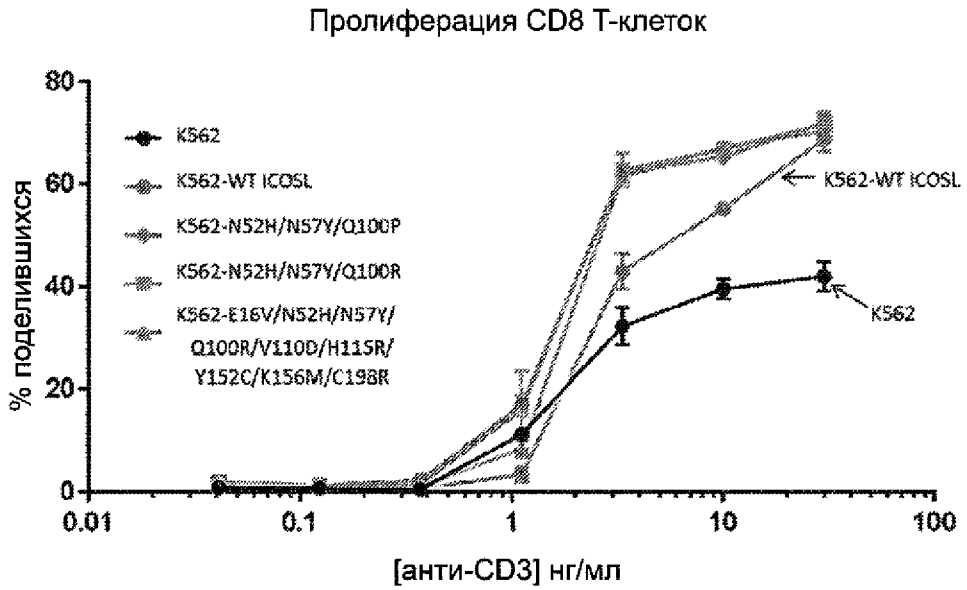
Фиг. 22G


Вариантный IgV из ICOSL (SEQ ID NO:545)
с N52H/N57Y/Q100R/F172S
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Peak1 - 12.165
Peak3 - 15.569
18.459
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
Минуты

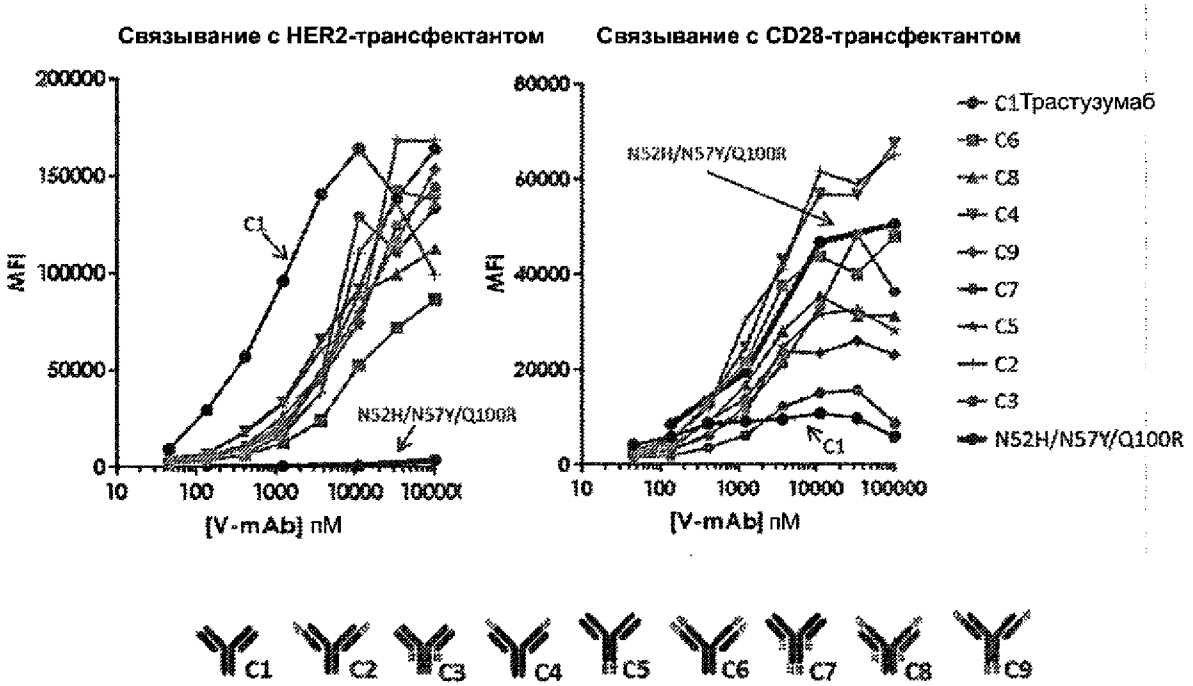
Фиг. 23A


Пролиферация CD4 Т-клеток
% поделившихся
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
[анти-CD3] нг/мл
K562
K562-WT ICOSL
K562-N52H/N57Y/Q100P
K562-N52H/N57Y/Q100R
K562-E16V/N52H/N57Y/
Q100R/V110D/H115R/
Y152C/K156M/C198R
K562-WT ICOSL
K562

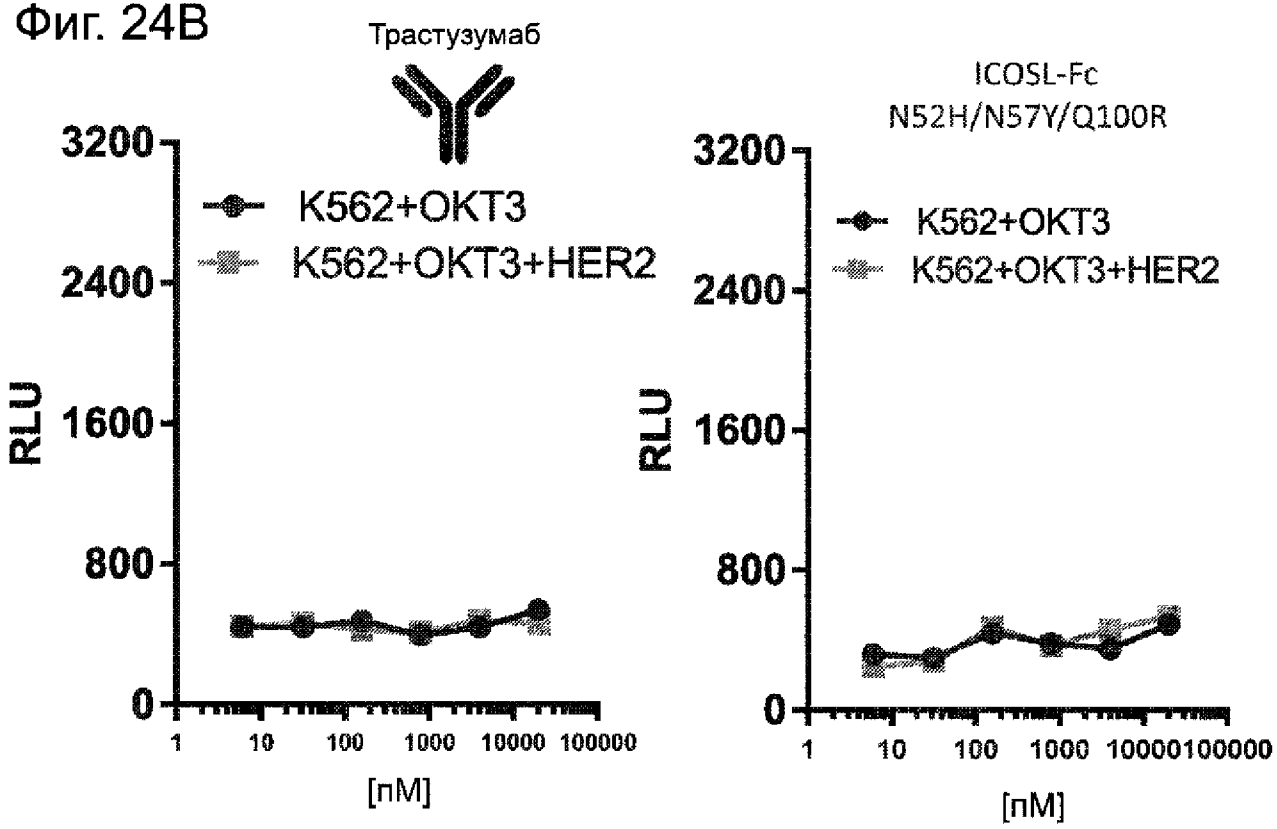
Фиг. 23B


Пролиферация CD8 Т-клеток
% поделившихся
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
[анти-CD3] нг/мл
K562
K562-WT ICOSL
K562-N52H/N57Y/Q100P
K562-N52H/N57Y/Q100R
K562-E16V/N52H/N57Y/
Q100R/V110D/H115R/
Y152C/K156M/C198R
K562-WT ICOSL
K562

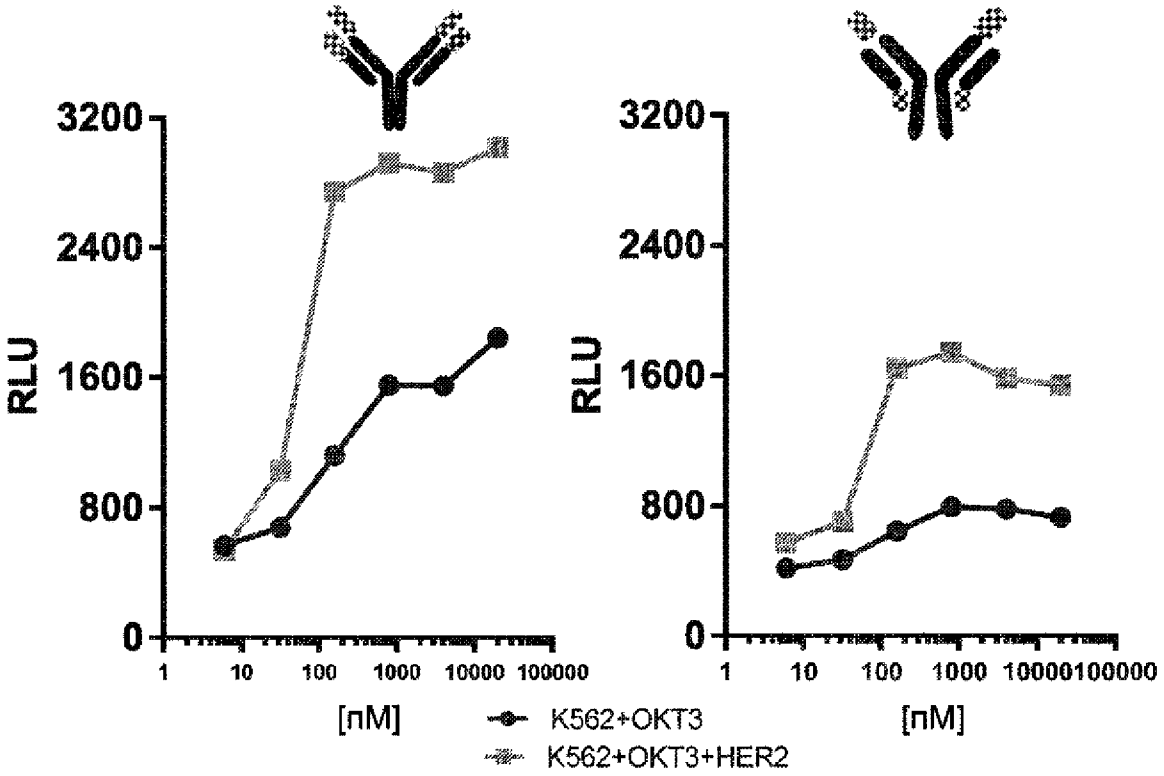
Фиг. 24А


Связывание с HER2-трансфектантом
Связывание с CD28-трансфектантом
MFI
[V-mAb] nM
C1
N52H/N57Y/Q100R
C1Трастузумаб
C6
C8
C4
C9
C7
C5
C2
C3
N52H/N57Y/Q100R
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9

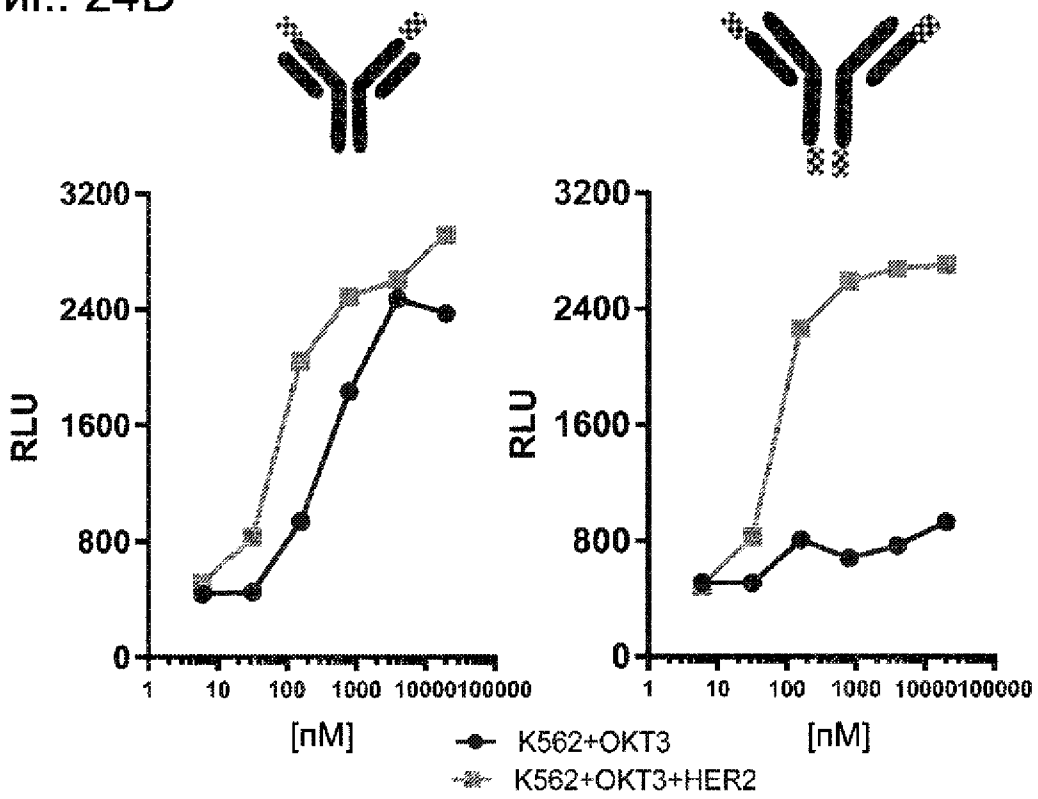
Фиг. 24B


Трастузумаб
K562+OKT3
K562+OKT3+HER2
RLU
3200
2400
1600
800
0
1
10
100
1000
10000
100000
[nM]
ICOSL-Fc
N52H/N57Y/Q100R
K562+OKT3
K562+OKT3+HER2
RLU
3200
2400
1600
800
0
1
10
100
1000
10000100000
[nM]

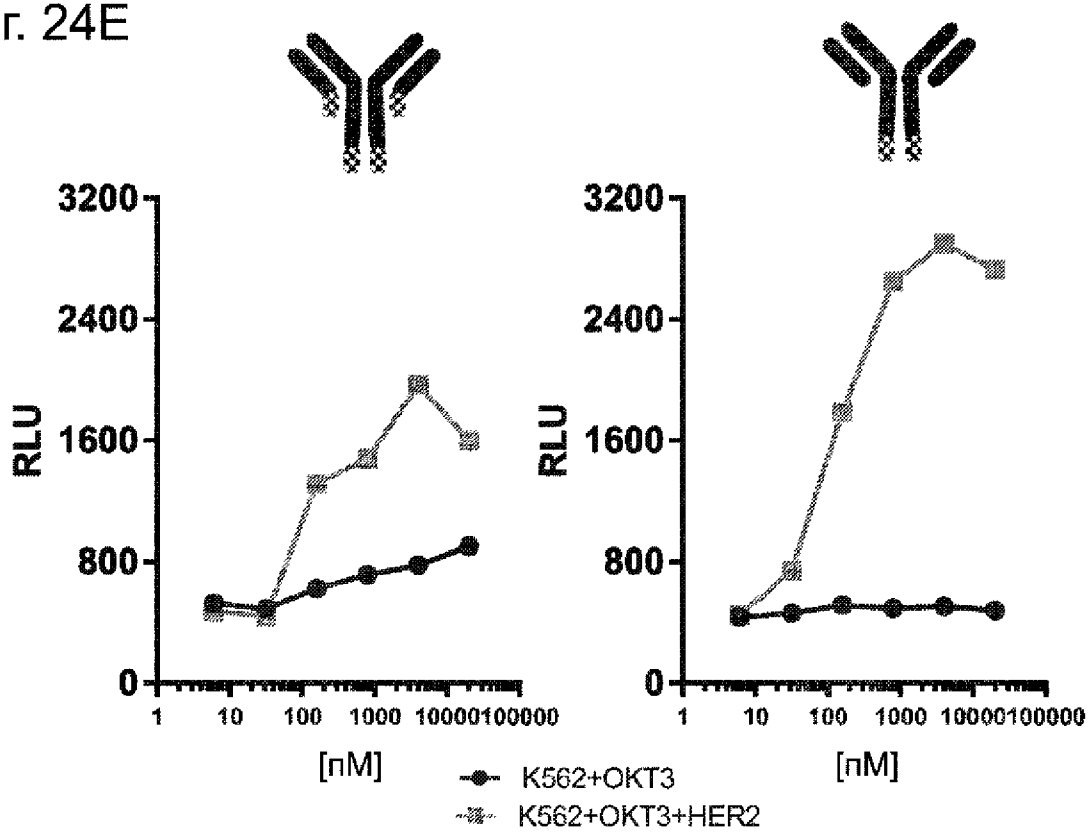
Фиг. 24C


3200
2400
1600
800
0
RLU
1
10
100
1000
10000
100000
[пМ]
K562+OKT3
K562+OKT3+HER2
3200
2400
1600
800
0
RLU
1
10
100
1000
10000100000
[пМ]

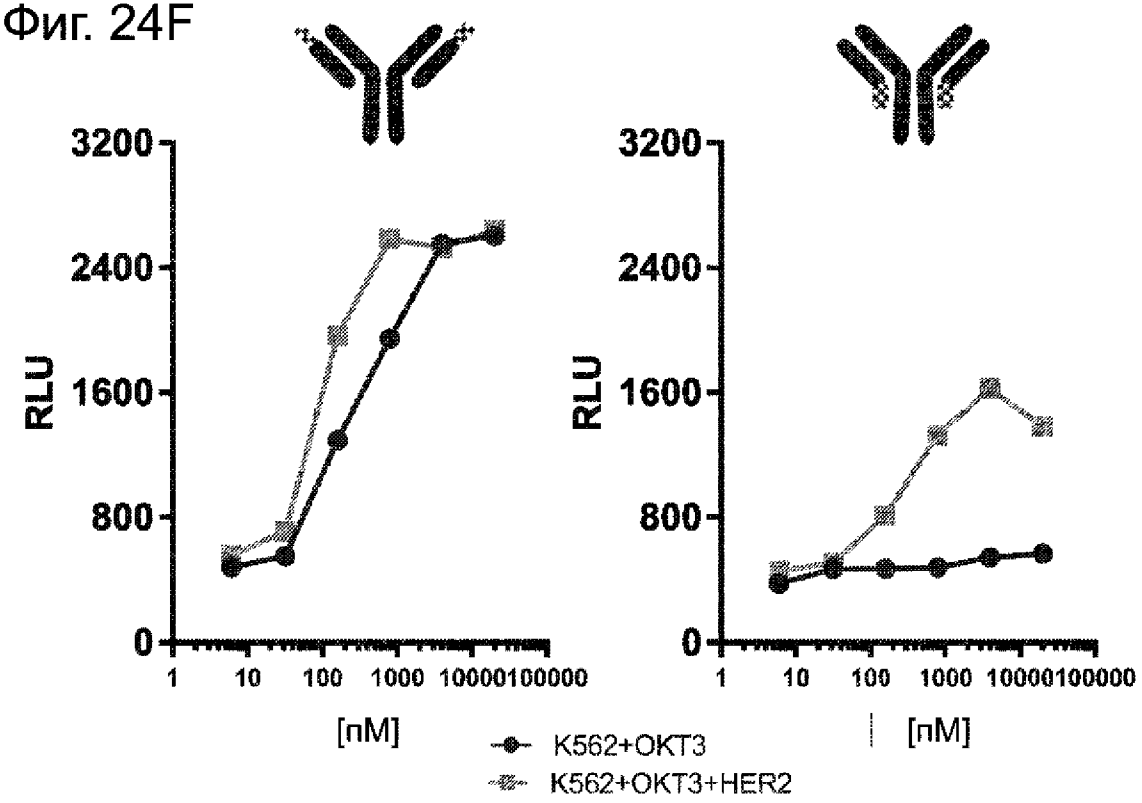
Фиг.. 24D


3200
2400
1600
800
0
RLU
1
10
100
1000
10000100000
[пМ]
K562+OKT3
K562+OKT3+HER2

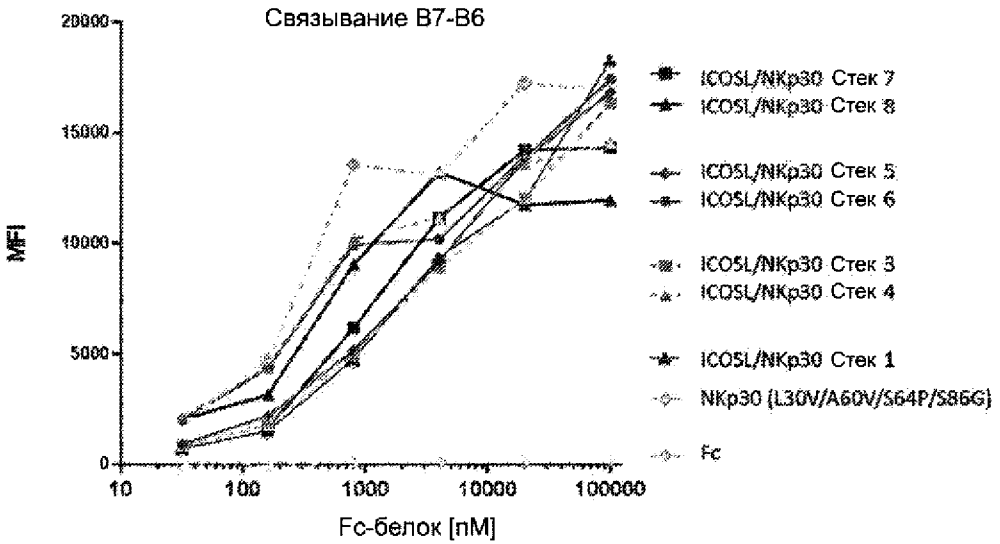
Фиг. 24E


3200
2400
1600
800
0
RLU
1
10
100
1000
10000100000
[nM]
K562+OKT3
K562+OKT3+HER2

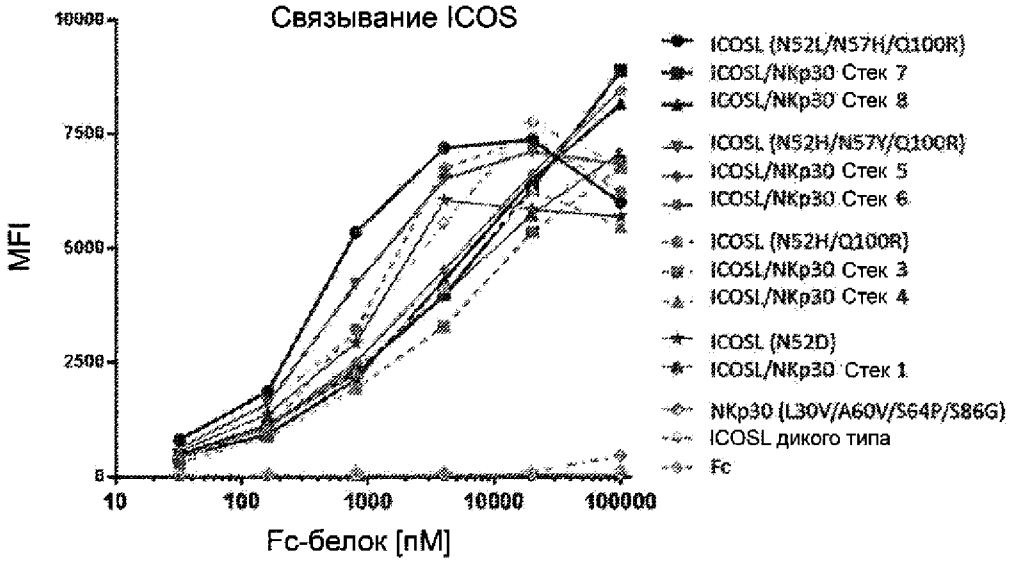
Фиг. 24F


3200
2400
1600
800
0
RLU
1
10
100
1000
10000
100000
[nM]
K562+OKT3
K562+OKT3+HER2

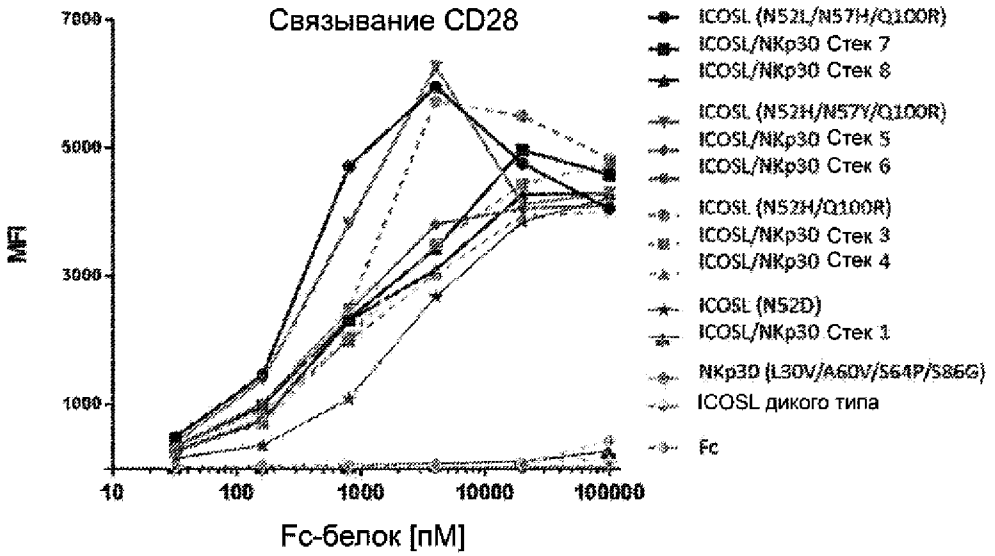
Фиг. 25A


Связывание B7-B6
MFI
20000
15000
10000
5000
0
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [пМ]
ICOSL/NKp30 Стек 7
ICOSL/NKp30 Стек 8
ICOSL/NKp30 Стек 5
ICOSL/NKp30 Стек 6
ICOSL/NKp30 Стек 3
ICOSL/NKp30 Стек 4
ICOSL/NKp30 Стек 1
NKp30 (L30V/A60V/S64P/S86G)
Fc

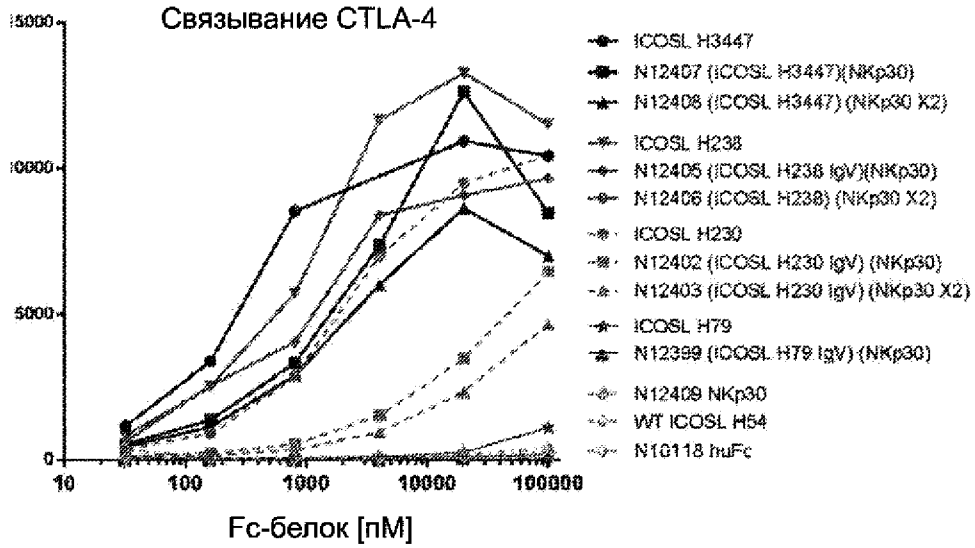
Фиг. 25B


Связывание ICOS
MFI
10000
7500
5000
2500
0
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [пМ]
ICOSL (N52L/N57H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 7
ICOSL/NKp30 Стек 8
ICOSL (N52H/N57Y/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 5
ICOSL/NKp30 Стек 6
ICOSL (N52H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 3
ICOSL/NKp30 Стек 4
ICOSL (N52D)
ICOSL/NKp30 Стек 1
NKp30 (L30V/A60V/S64P/S86G)
ICOSL дикого типа
Fc

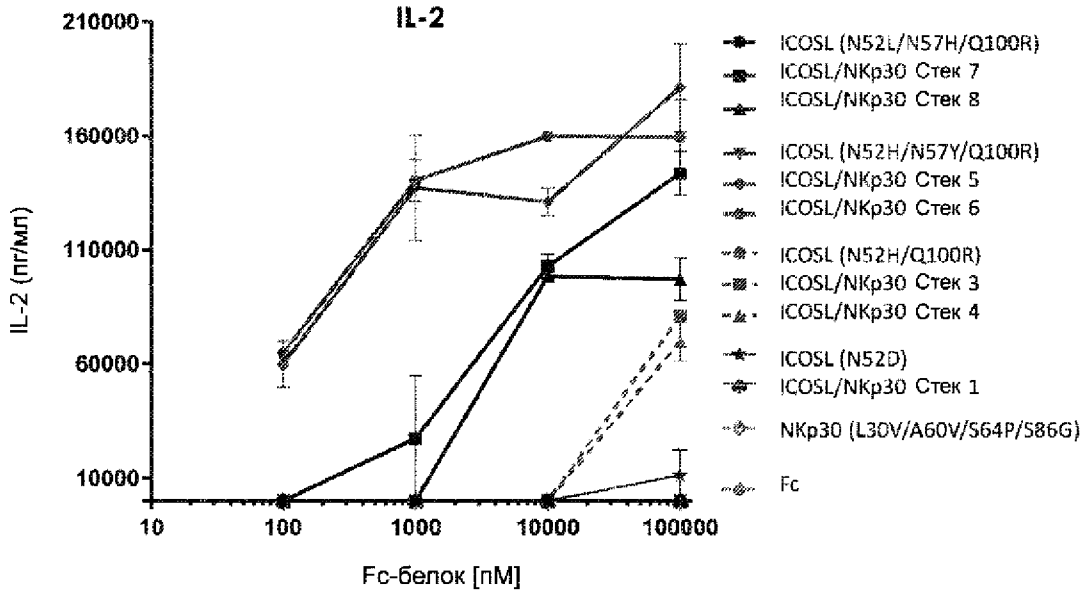
Фиг. 25C


Связывание CD28
MFI
7000
5000
3000
1000
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [пМ]
ICOSL (N52L/N57H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 7
ICOSL/NKp30 Стек 8
ICOSL (N52H/N57Y/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 5
ICOSL/NKp30 Стек 6
ICOSL (N52H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 3
ICOSL/NKp30 Стек 4
ICOSL (N52D)
ICOSL/NKp30 Стек 1
NKp30 (L30V/A60V/S64P/S86G)
ICOSL дикого типа
Fc

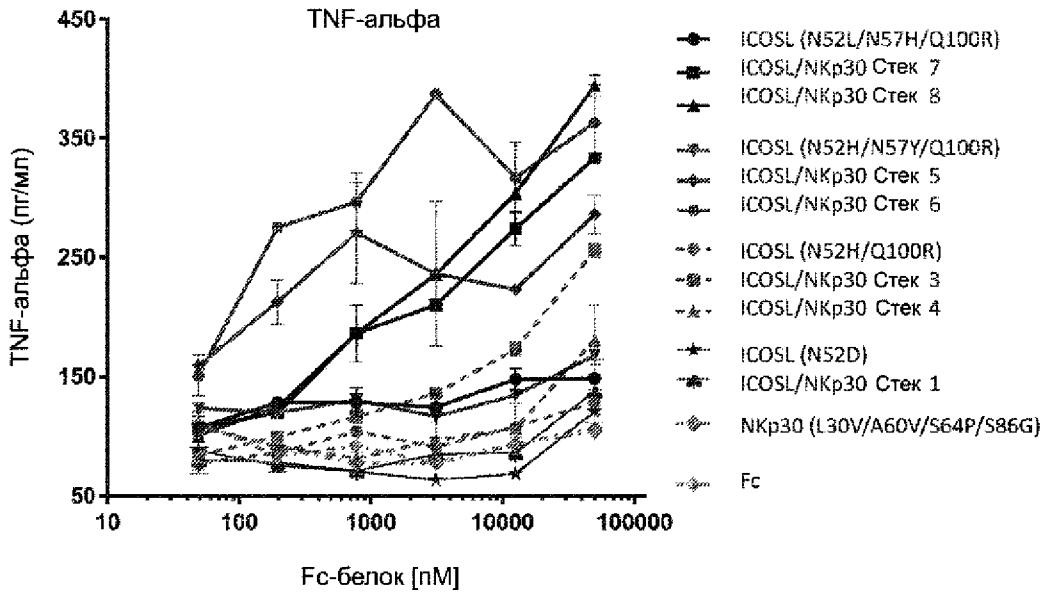
Фиг. 25D


Связывание CTLA-4
15000
10000
5000
0
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [пМ]
ICOSL H3447
N12407 (ICOSL H3447)(NKp30)
N12408 (ICOSL H3447) (NKp30 X2)
ICOSL H238
N12405 (ICOSL H238 IgV)(NKp30)
N12406 (ICOSL H238) (NKp30 X2)
ICOSL H230
N12402 (ICOSL H230 IgV) (NKp30)
N12403 (ICOSL H230 IgV) (NKp30 X2)
ICOSL H79
N12399 (ICOSL H79 IgV) (NKp30)
N12409 NKp30
WT ICOSL H54
N10118 huFc

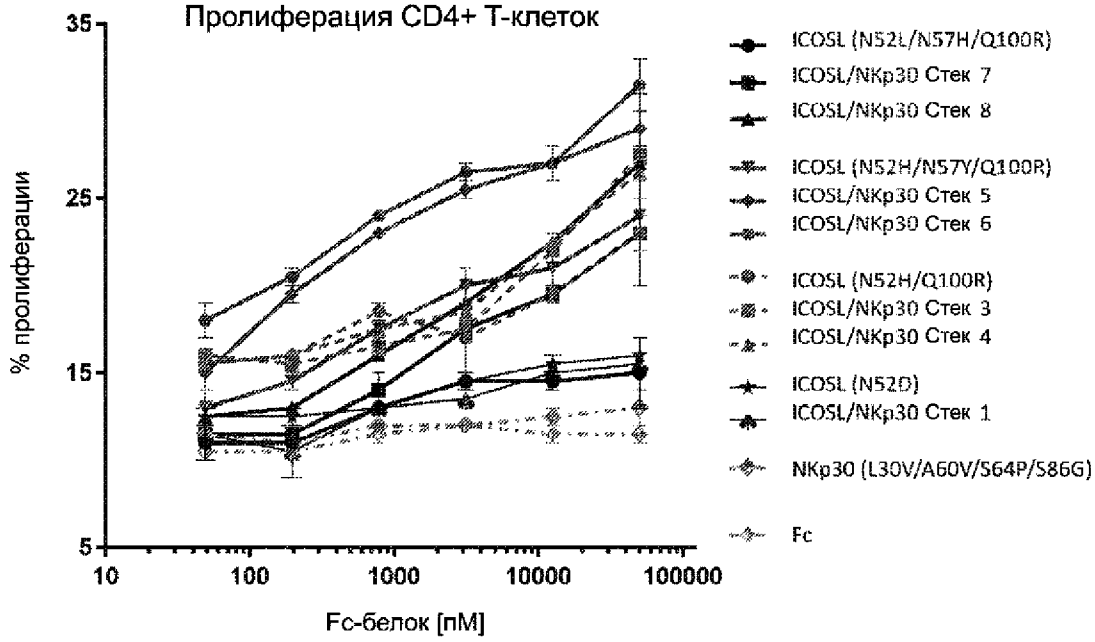
Фиг. 26A


IL-2
210000
160000
110000
60000
10000
IL-2 (пг/мл)
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [пМ]
ICOSL (N52L/N57H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 7
ICOSL/NKp30 Стек 8
ICOSL (N52H/N57Y/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 5
ICOSL/NKp30 Стек 6
ICOSL (N52H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 3
ICOSL/NKp30 Стек 4
ICOSL (N52D)
ICOSL/NKp30 Стек 1
NKp30 (L30V/A60V/S64P/S86G)
Fc

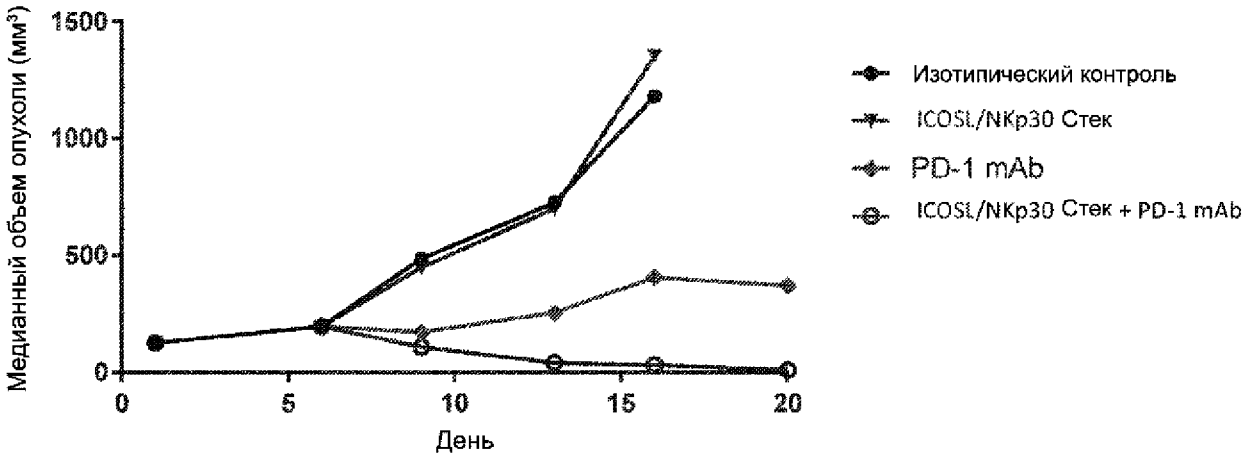
Фиг. 26B


TNF-альфа
TNF-альфа (пг/мл)
450
350
250
150
50
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [nM]
ICOSL (N52L/N57H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 7
ICOSL/NKp30 Стек 8
ICOSL (N52H/N57Y/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 5
ICOSL/NKp30 Стек 6
ICOSL (N52H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 3
ICOSL/NKp30 Стек 4
ICOSL (N52D)
ICOSL/NKp30 Стек 1
NKp30 (L30V/A60V/S64P/S86G)
Fc

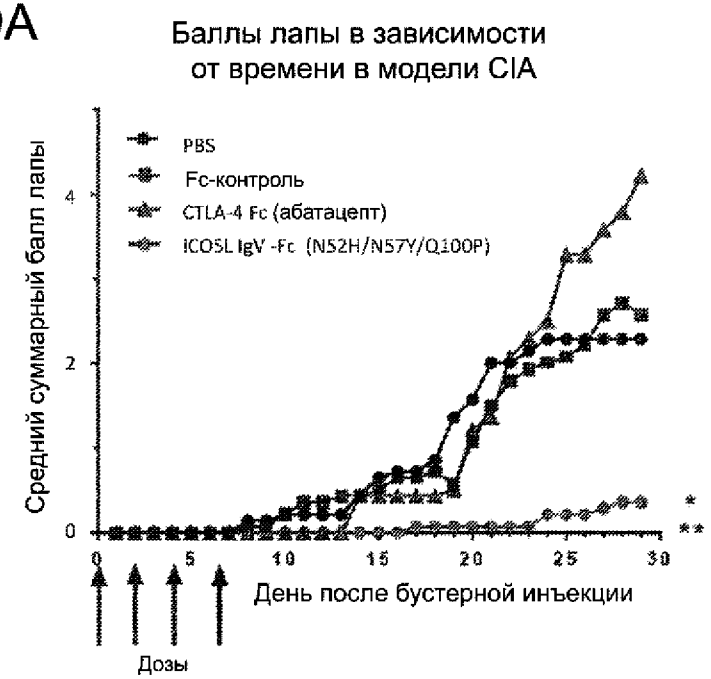
Фиг. 27


Пролиферация CD4+ Т-клеток
% пролиферации
35
25
15
5
10
100
1000
10000
100000
Fc-белок [пМ]
ICOSL (N52L/N57H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 7
ICOSL/NKp30 Стек 8
ICOSL (N52H/N57Y/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 5
ICOSL/NKp30 Стек 6
ICOSL (N52H/Q100R)
ICOSL/NKp30 Стек 3
ICOSL/NKp30 Стек 4
ICOSL (N52D)
ICOSL/NKp30 Стек 1
NKp30 (L30V/A60V/S64P/S86G)
Fc

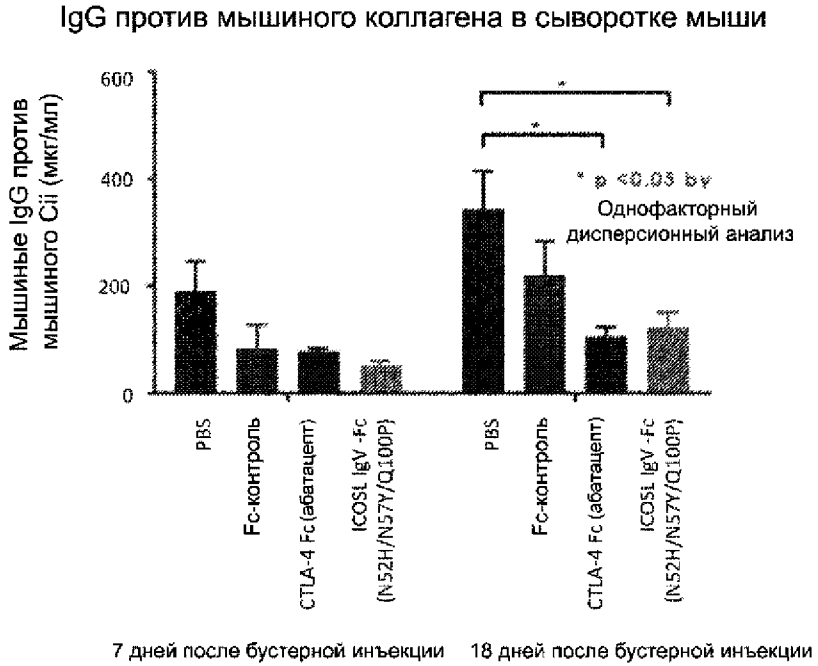
Фиг. 28


Медианный объем опухоли (мм³)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
День
Изотипический контроль
ICOSL/NKp30 Стек
PD-1 mAb
ICOSL/NKp30 Стек + PD-1 mAb

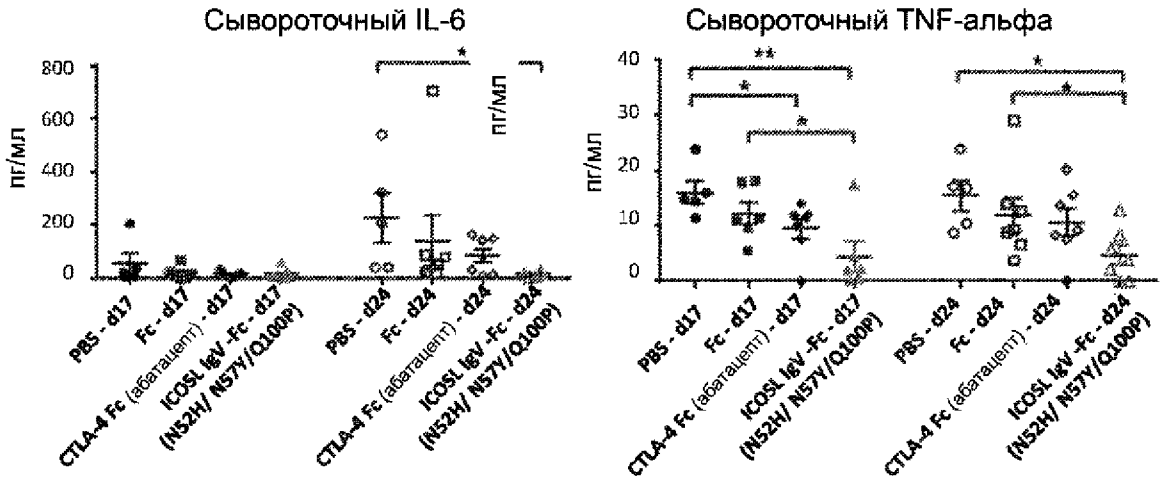
Фиг. 29A


Баллы лапы в зависимости
от времени в модели CIA
PBS
Fc-контроль
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/N57Y/Q100P)
Средний суммарный балл лапы
0
2
4
0
5
10
15
20
25
30
*
**
День после бустерной инъекции
Дозы

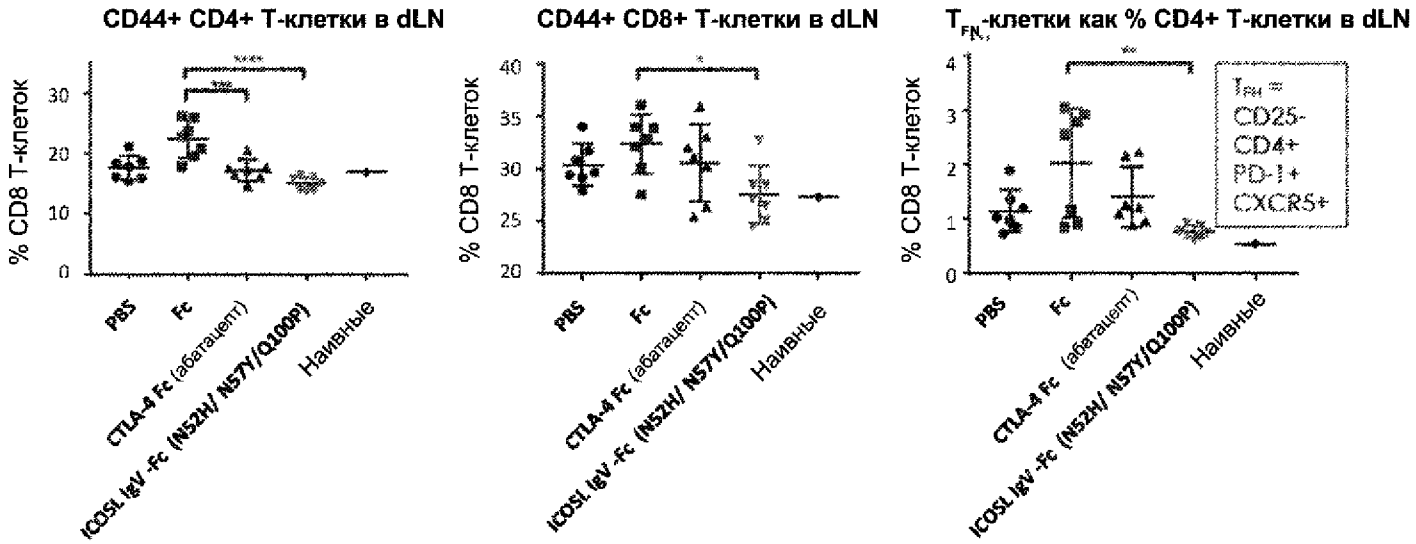
Фиг. 29B


IgG против мышиного коллагена в сыворотке мыши
Мышиные IgG против мышиного Cii (мкг/мл)
600
400
200
0
* p <0.05 by Однофакторный дисперсионный анализ
PBS
Fc-контроль
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/N57Y/Q100P)
PBS
Fc-контроль
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/N57Y/Q100P)
7 дней после бустерной инъекции
18 дней после бустерной инъекции

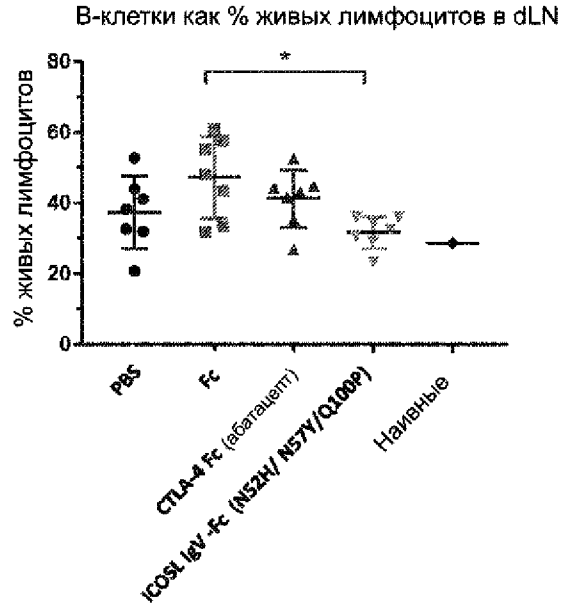
Фиг. 29C


Сывороточный IL-6
пг/мл
800
600
400
200
0
PBS - d17
Fc - d17
CTLA-4 Fc (абатацепт) - d17
ICOSL IgV -Fc - d17 (N52H/ N57Y/Q100P)
PBS - d24
Fc - d24
CTLA-4 Fc (абатацепт) - d24
ICOSL IgV -Fc - d24 (N52H/ N57Y/Q100P)
Сывороточный TNF-альфа
пг/мл
40
30
20
10
0
PBS - d17
Fc - d17
CTLA-4 Fc (абатацепт) - d17
ICOSL IgV -Fc - d17 (N52H/ N57Y/Q100P)
PBS - d24
Fc - d24
CTLA-4 Fc (абатацепт) - d24
ICOSL IgV -Fc - d24 (N52H/ N57Y/Q100P)

Фиг. 29D


CD44+ CD4+ T-клетки в dLN
CD44+ CD8+ T-клетки в dLN
T$_{FN}$-клетки как % CD4+ T-клетки в dLN
% CD8 T-клеток
PBS
Fc
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100P)
Наивные
T$_{FN}$ =
CD25-
CD4+
PD-1+
CXCR5+

Фиг. 29E

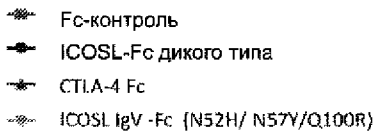

B-клетки как % живых лимфоцитов в dLN
% живых лимфоцитов
80
60
40
20
0
*
PBS
Fc
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100P)
Наивные

Фиг. 30A

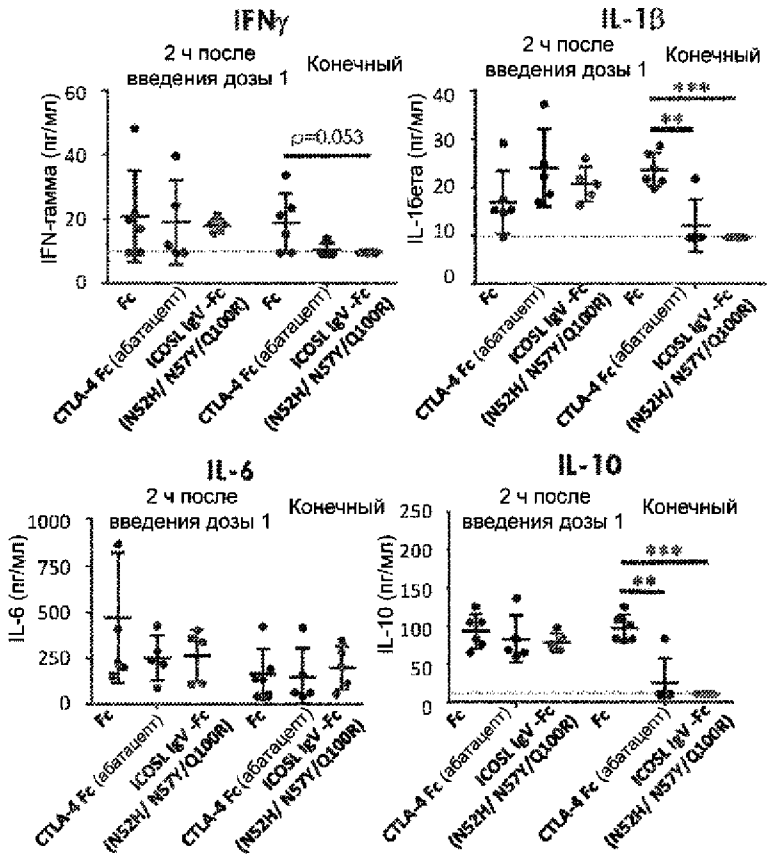


Фиг. 30B

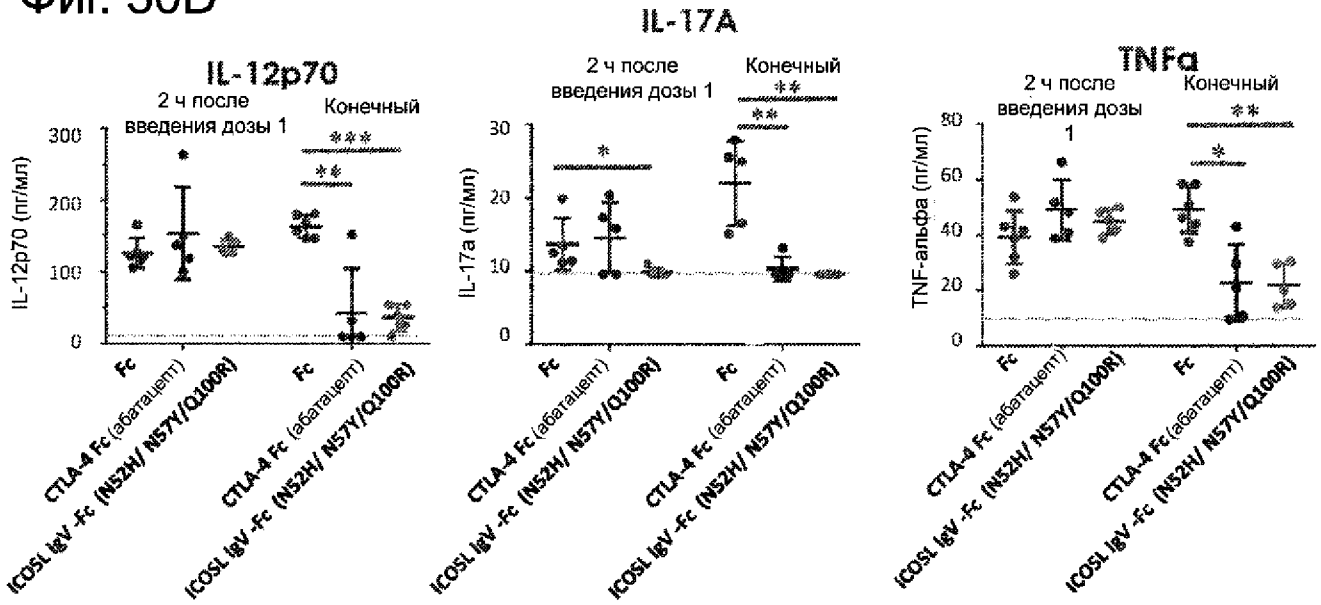




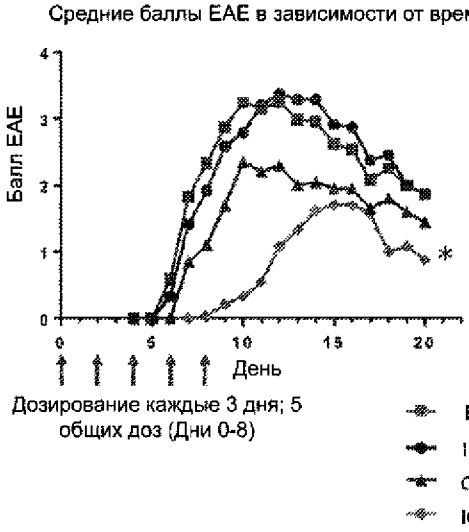
Фиг. 30C


IFNγ
2 ч после введения дозы 1
Конечный
IFN-гамма (пг/мл)
p=0.053
IL-1β
IL-1бета (пг/мл)
***
**
IL-6
IL-6 (пг/мл)
IL-10
IL-10 (пг/мл)
Fc
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

Фиг. 30D


IL-12p70
2 ч после введения дозы 1
Конечный
IL-12p70 (пг/мл)
300
200
100
0
***
**
**
Fc
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)
IL-17A
IL-17a (пг/мл)
30
20
10
0
*
TNFa
TNF-альфа (пг/мл)
80
60
40
20
0

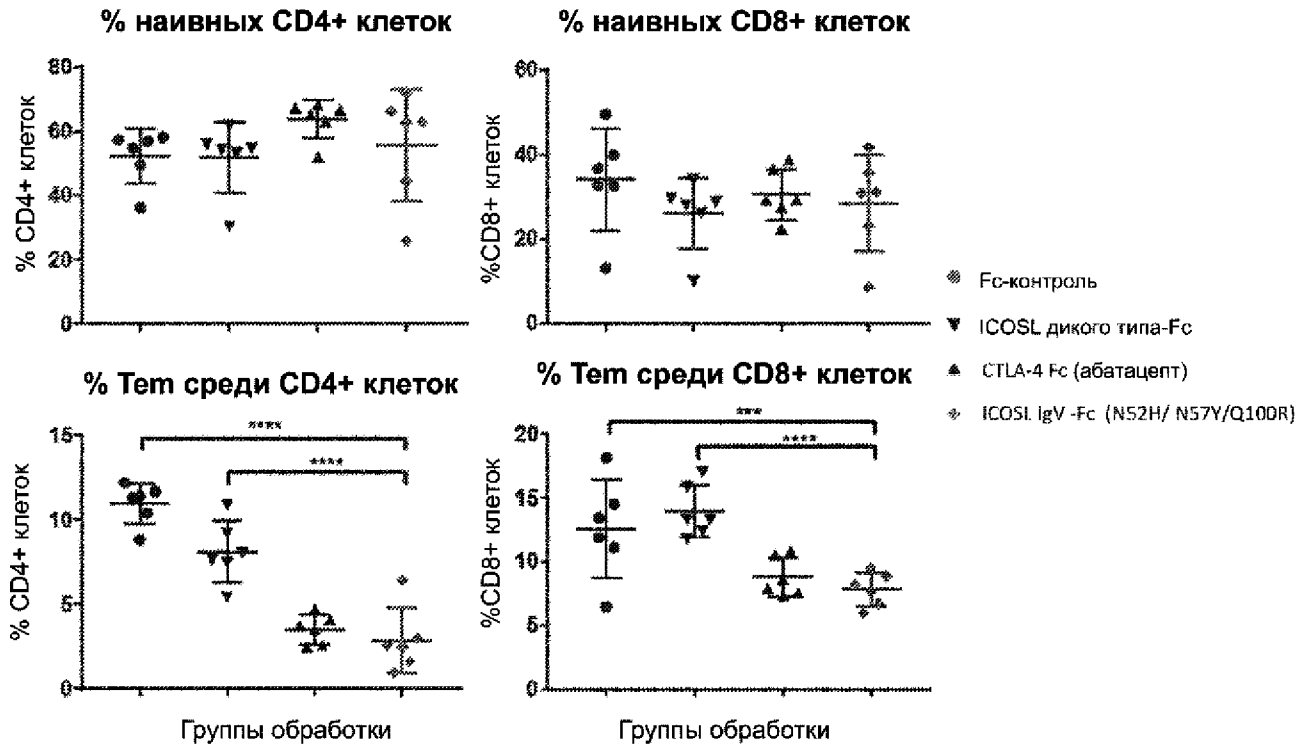
Фиг. 31A



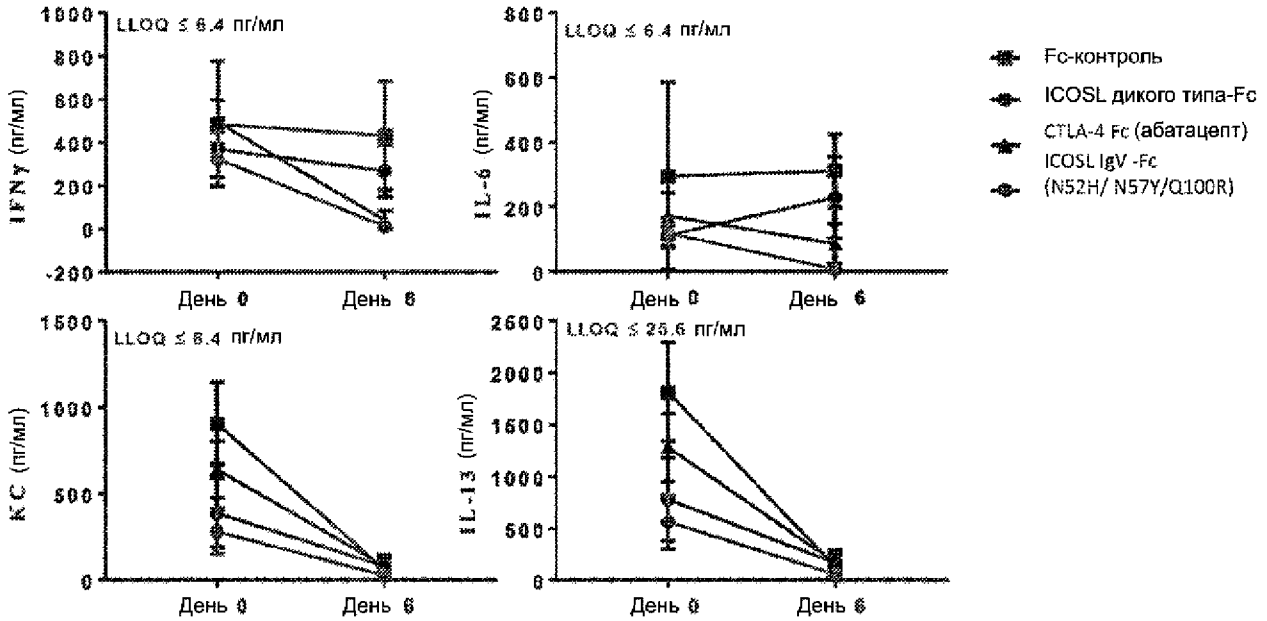
Фиг. 31B



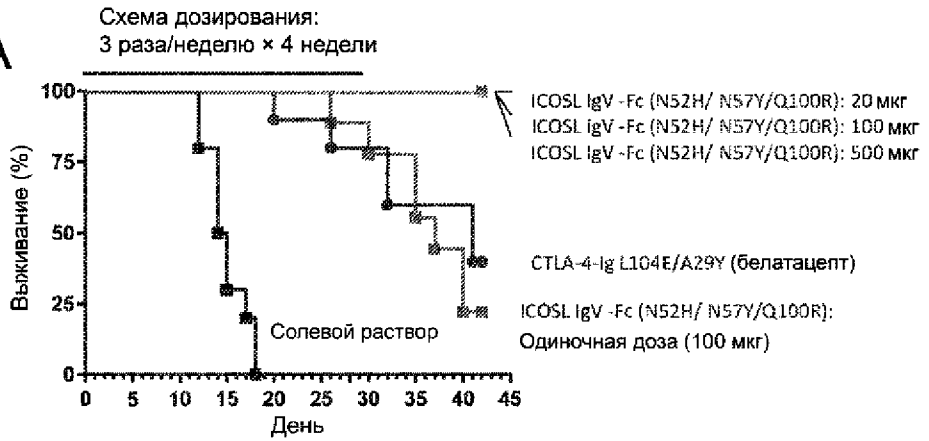
Фиг. 31C


% наивных CD4+ клеток
% CD4+ клеток
% наивных CD8+ клеток
%CD8+ клеток
% Tem среди CD4+ клеток
% CD4+ клеток
% Tem среди CD8+ клеток
%CD8+ клеток
Группы обработки
Группы обработки
Fc-контроль
ICOSL дикого типа-Fc
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

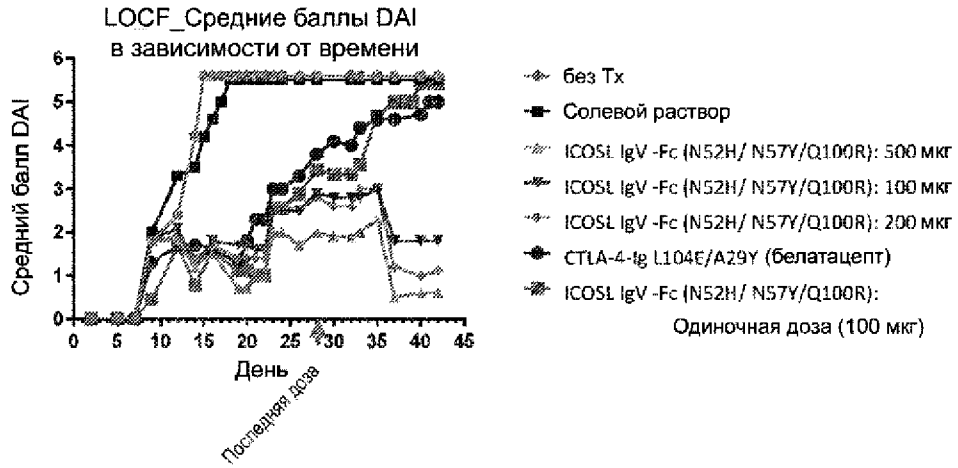
Фиг. 31D


LLOQ ≤ 6.4 пг/мл
IFNγ (пг/мл)
1000
800
600
400
200
0
-200
День 0
День 6
LLOQ ≤ 6.4 пг/мл
IL-6 (пг/мл)
800
600
400
200
0
День 0
День 6
LLOQ ≤ 6.4 пг/мл
KC (пг/мл)
1500
1000
500
0
День 0
День 6
LLOQ ≤ 25.6 пг/мл
IL-13 (пг/мл)
2500
2000
1500
1000
500
0
День 0
День 6
Fc-контроль
ICOSL дикого типа-Fc
CTLA-4 Fc (абатацепт)
ICOSL IgV -Fc
(N52H/ N57Y/Q100R)

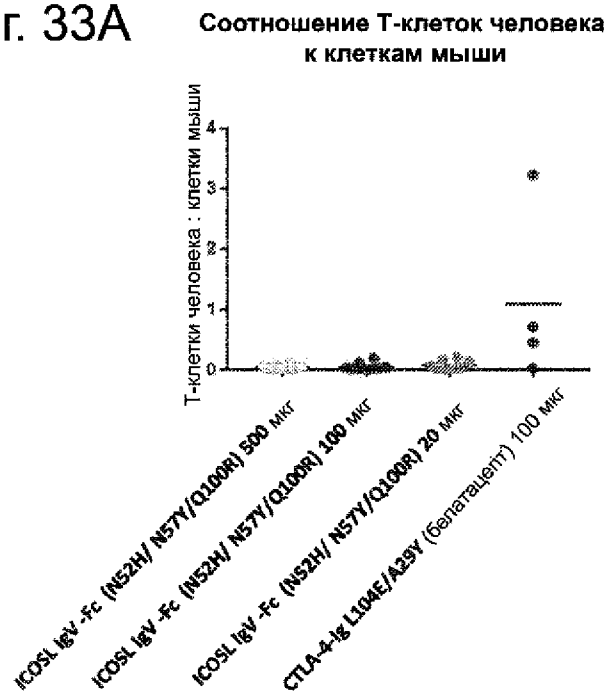
Фиг. 32A



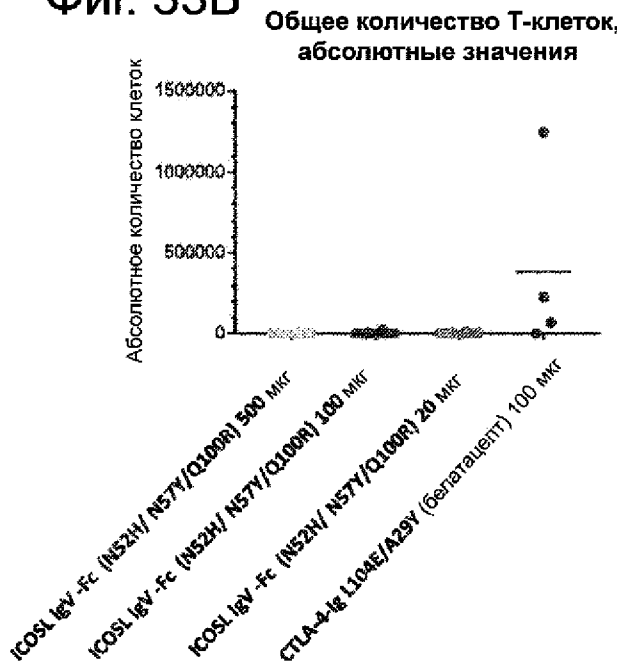
Фиг. 32B



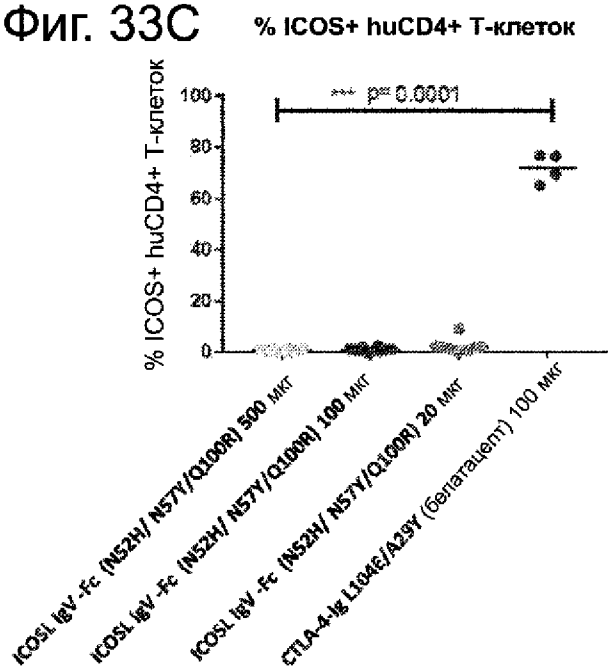
Фиг. 33A



Фиг. 33B

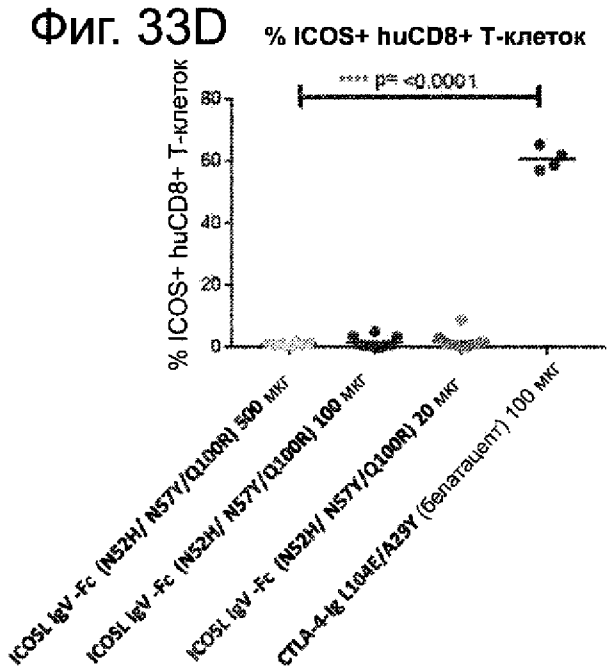


Фиг. 33C



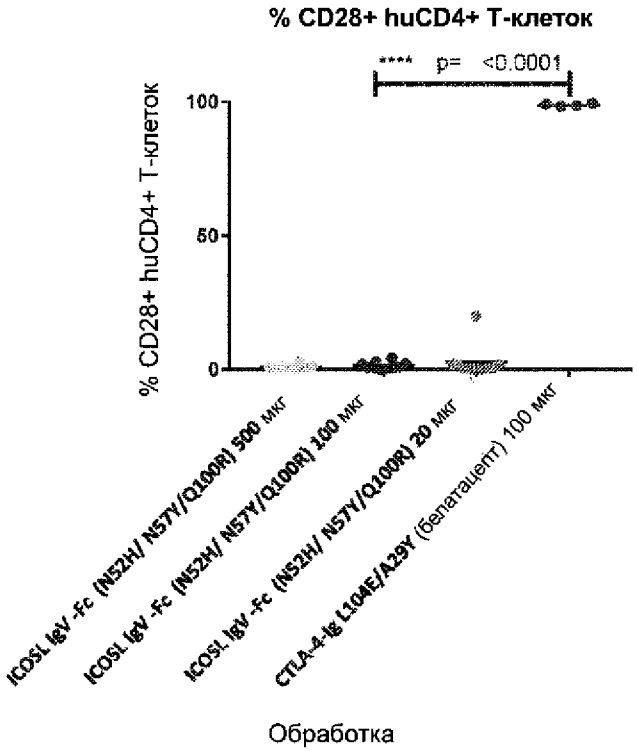
Обработка

Фиг. 33D

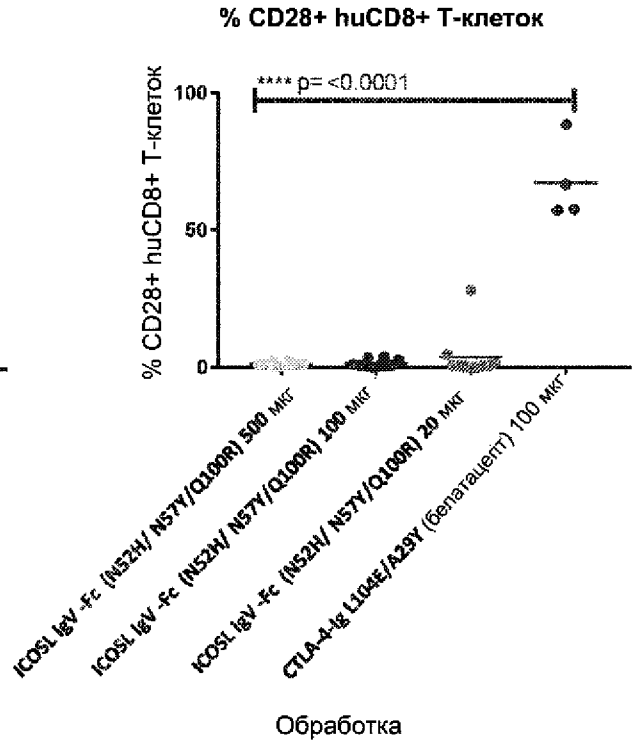


Обработка

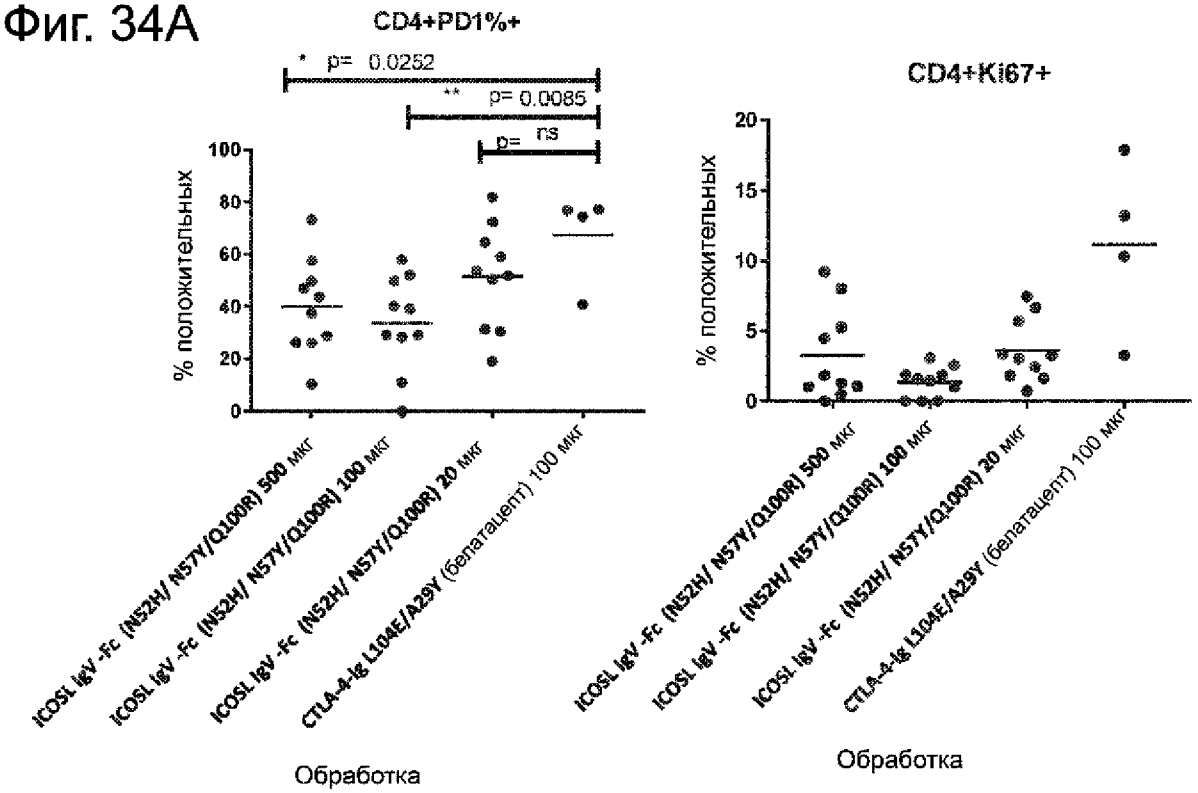
Фиг. 33E



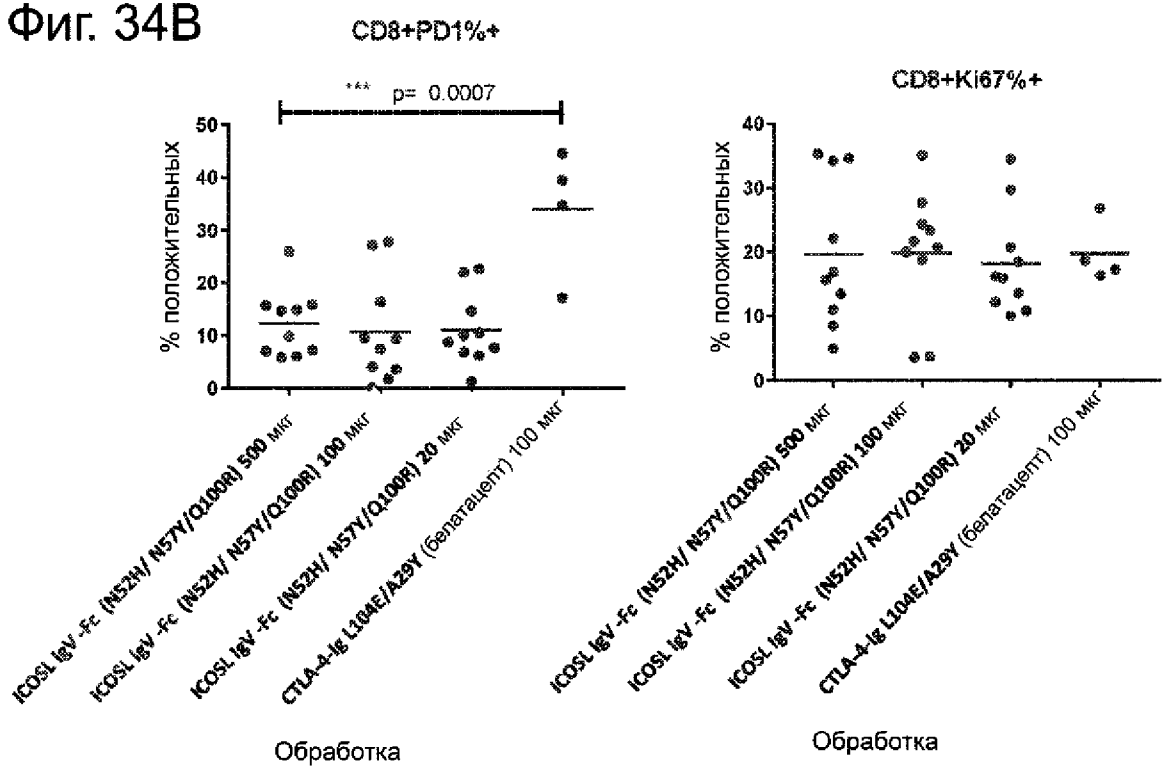
Фиг. 33F



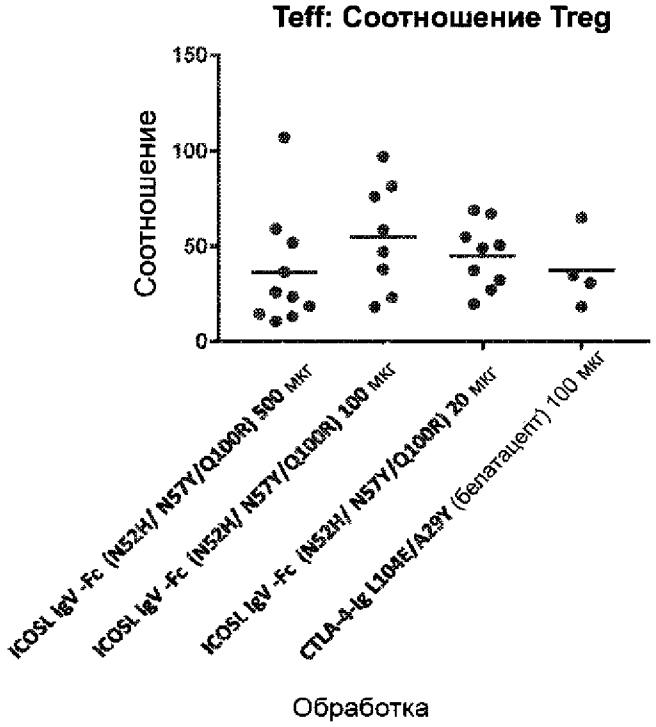
Фиг. 34А


CD4+PD1%+
* p= 0.0252
** p= 0.0085
p= ns
% положительных
0
20
40
60
80
100
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (белатацепт) 100 мкг
Обработка
CD4+Ki67+
% положительных
0
5
10
15
20
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (белатацепт) 100 мкг
Обработка

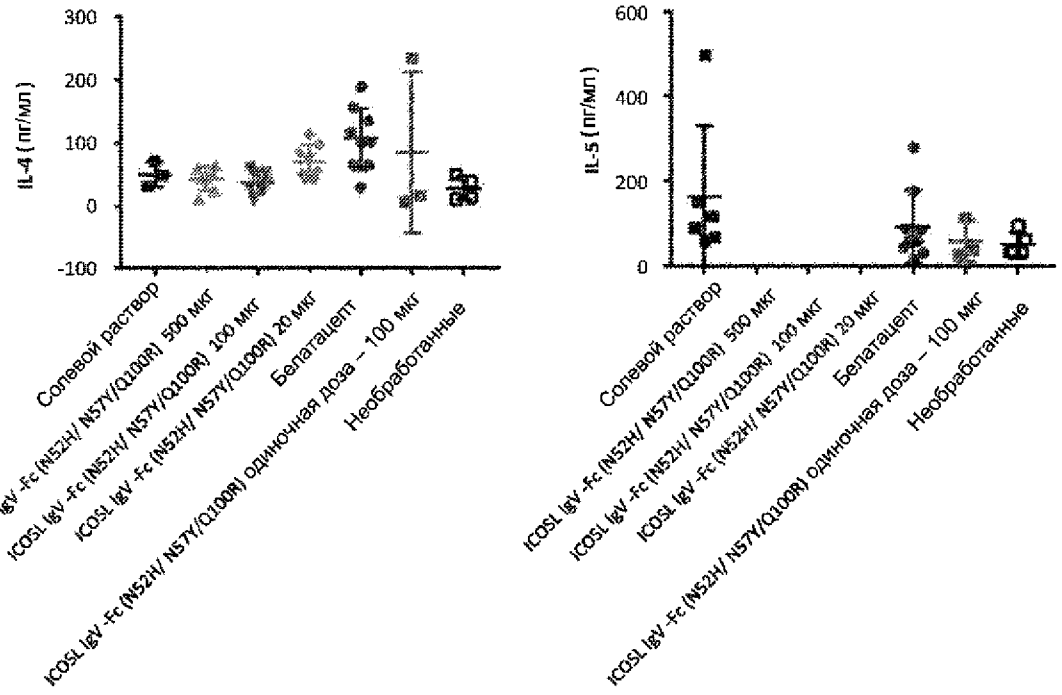
Фиг. 34B


CD8+PD1%+
*** p= 0.0007
% положительных
0
10
20
30
40
50
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (белатацепт) 100 мкг
Обработка
CD8+Ki67%+
% положительных
0
10
20
30
40
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (белатацепт) 100 мкг
Обработка

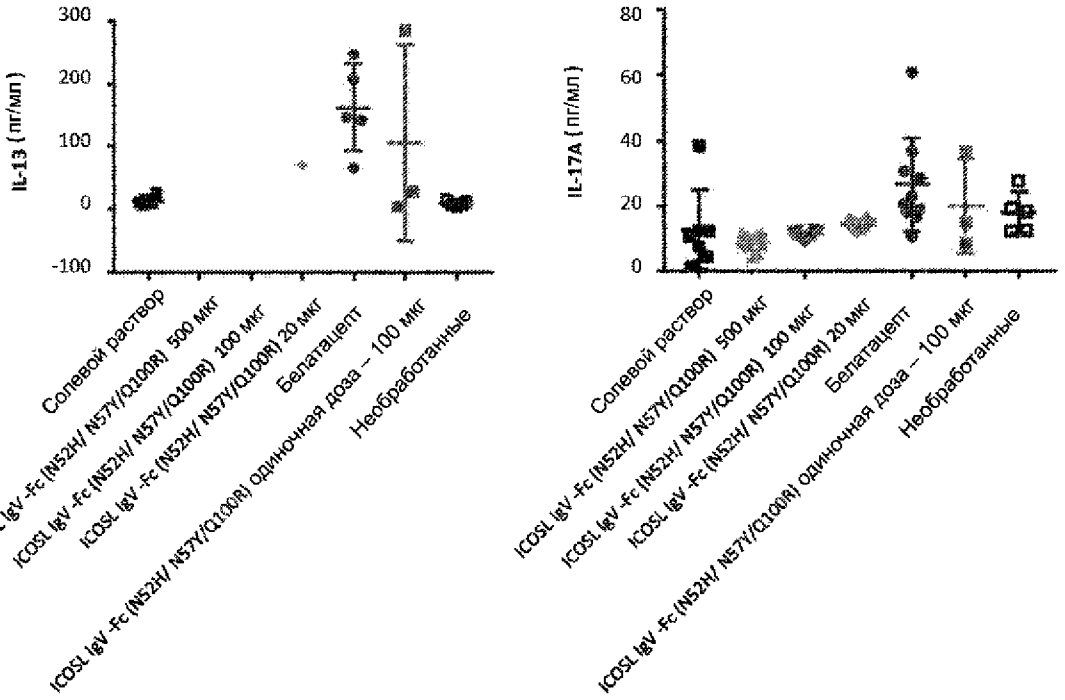
Фиг. 34C


Teff: Соотношение Treg
Соотношение
150
100
50
0
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (белатацепт) 100 мкг
Обработка

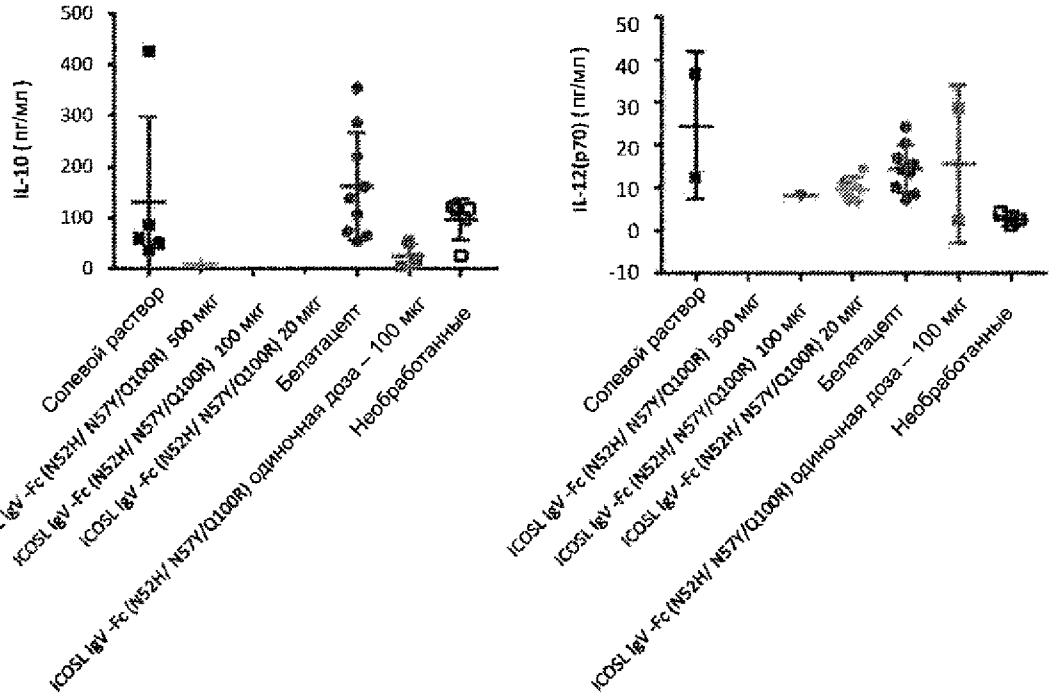
Фиг. 35A


IL-4 (пг/мл)
300
200
100
0
-100
IL-5 (пг/мл)
600
400
200
0
Солевой раствор
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
Белатацепт
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) одиночная доза – 100 мкг
Необработанные

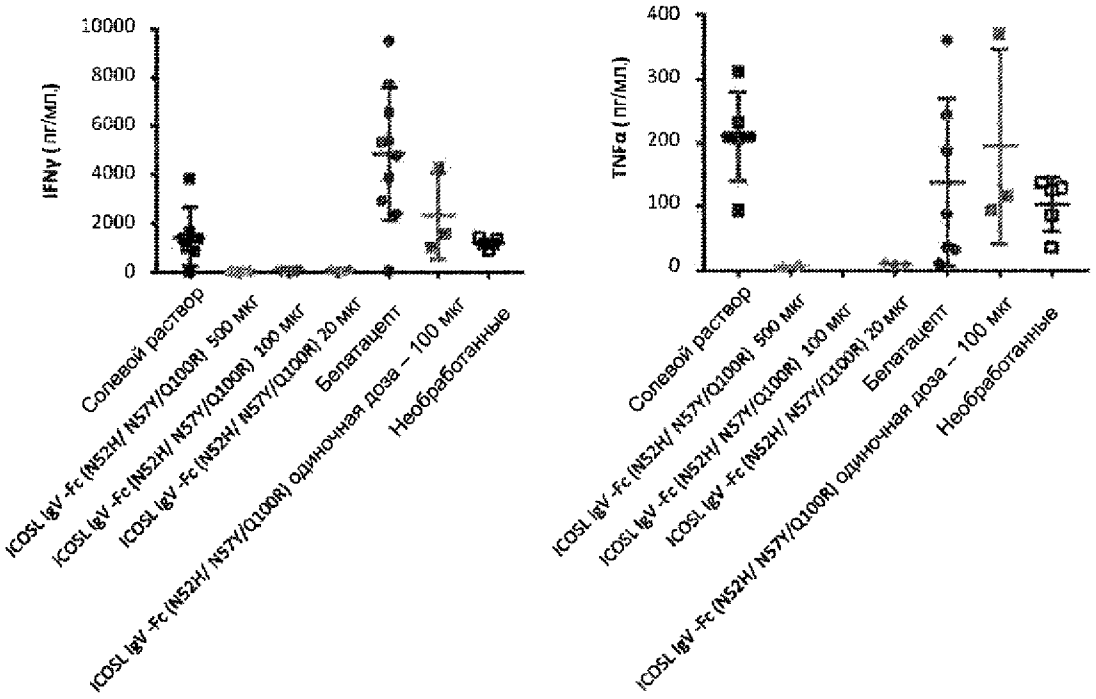
Фиг. 35B


IL-13 (пг/мл)
300
200
100
0
-100
Солевой раствор
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
Белатацепт
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) одиночная доза – 100 мкг
Необработанные
IL-17A (пг/мл)
80
60
40
20
0
Солевой раствор
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
Белатацепт
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) одиночная доза – 100 мкг
Необработанные

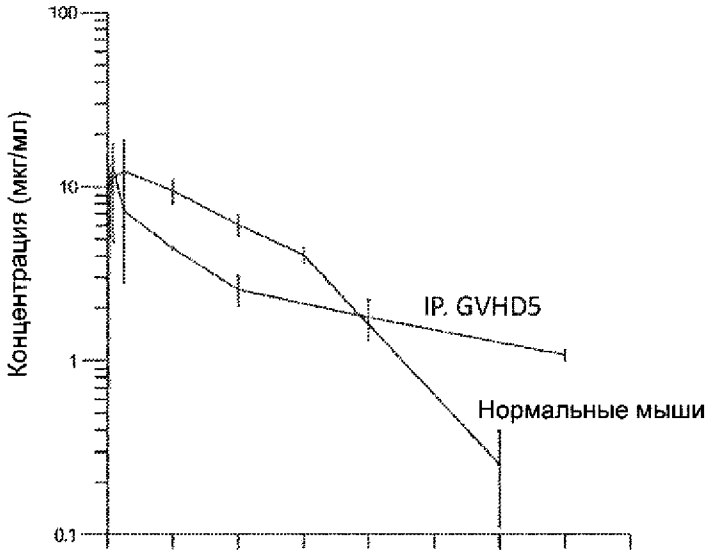
Фиг. 35C


IL-10 (пг/мл)
500
400
300
200
100
0
Солевой раствор
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
Белатацепт
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) одиночная доза – 100 мкг
Необработанные
IL-12(p70) (пг/мл)
50
40
30
20
10
0
-10
Солевой раствор
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
Белатацепт
iCOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) одиночная доза – 100 мкг
Необработанные

Фиг. 35D

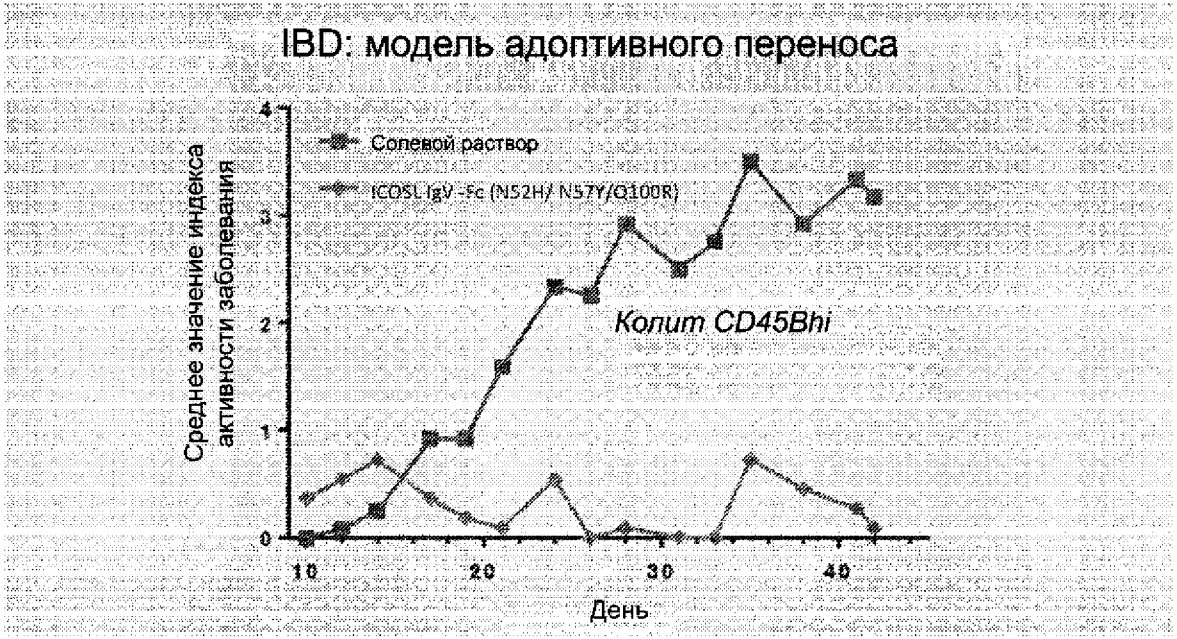

IFNγ (пг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
0
TNFα (пг/мл)
400
300
200
100
0
Солевой раствор
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 мкг
Белатацепт
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) одиночная доза – 100 мкг
Необработанные

Фиг. 35E

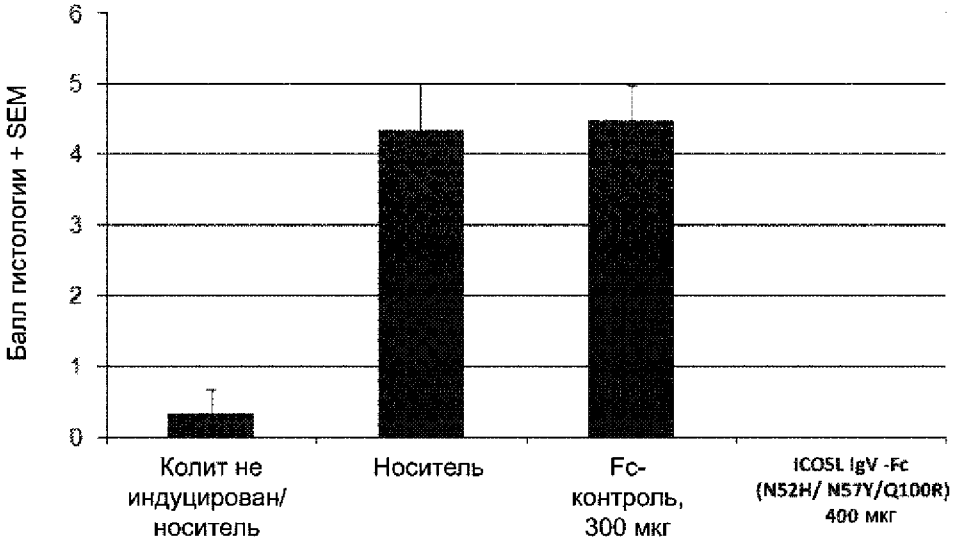


Исследование	Доза (мкг)	Cmax (мкг/мл)	T1/2 (день)	AUC (день*мкг/мл)
GVHD5	100	12.94	4.02	18.97
Нормальные мыши	100	12.30	0.84	30.04

Фиг. 36A


IBD: модель адоптивного переноса
Среднее значение индекса активности заболевания
Солевой раствор
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)
Колит CD45Bhi
0
1
2
3
4
10
20
30
40
День

Фиг. 36B


Балл гистологии + SEM
0
1
2
3
4
5
6
Колит не индуцирован/ носитель
Носитель
Fc-контроль, 300 мкг
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 400 мкг